

(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2010-518868
(P2010-518868A)

(43) 公表日 平成22年6月3日(2010.6.3)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 ZNAA	2G045
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B024
GO1N 33/50 (2006.01)	GO1N 33/50 P	4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 M	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁)

(21) 出願番号 特願2009-551054 (P2009-551054)
 (86) (22) 出願日 平成20年2月25日 (2008.2.25)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年10月20日 (2009.10.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/054820
 (87) 国際公開番号 W02008/103971
 (87) 国際公開日 平成20年8月28日 (2008.8.28)
 (31) 優先権主張番号 60/891,477
 (32) 優先日 平成19年2月23日 (2007.2.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509237114
 バイオセラノスティクス、インコーポレイ
 ティド
 アメリカ合衆国、カリフォルニア 921
 21, サンディエゴ、ローゼル ストリ
 ート 11025, スイート 200
 (71) 出願人 592017633
 ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイ
 ション
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 114, ボストン、フルーツ ストリ
 ート 55
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤

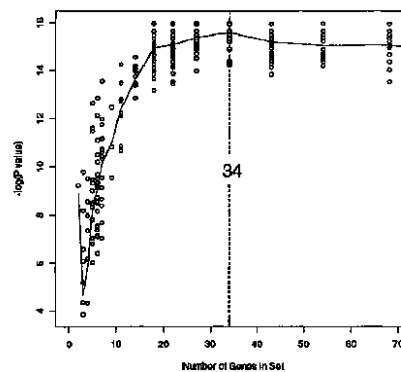
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺癌の生存及び再発

(57) 【要約】

本明細書の開示は、前立腺癌に臨床的に関連する遺伝子発現プロファイルの同定及び使用を含む。特に、本明細書の開示は、患者の生存及び前立腺癌再発と関連する遺伝子の同定に基づく。該遺伝子発現プロファイルは、核酸発現、タンパク質発現、又は他の発現フォーマットを含み、そして前立腺癌に罹患する対象の生存を予測し、そして前立腺癌再発を予測するために使用することができる。また、該プロファイルは前立腺癌細胞及び組織の研究及び/又は診断、ならびに患者の予後の研究及び/又は決定のために使用することができる。診断又は予後のために使用される場合、該プロファイルは平均余命及び癌再発及び/又は転移の可能性に基づき前立腺癌の治療を決定するために使用することができる。

Figure 2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

前立腺癌に罹患している対象の癌の再発及び / 又は生存結果、又は予後を決定するための方法であって、該方法は、該対象の前立腺癌細胞を含む試料を遺伝子の発現レベルについてアッセイする工程を含んで成り、ここで該発現レベルは、

癌の再発及び / 又は転移の低いリスク、

癌の再発及び / 又は転移の高いリスク、又は

前立腺切除から約 1 年後の上昇した P S A レベル、

に相関することを特徴とする、方法。

【請求項 2】

対象における前立腺癌の再発及び / 又は転移のリスクを決定するための方法であって、該方法は、

該対象由来の前立腺癌細胞を含む試料を図 1 4 及び 1 5 の遺伝子番号 1 ~ 3 6 2 から選択される 2 以上の遺伝子の発現レベルについてアッセイする工程、

各々の遺伝子の発現レベル又は集合発現レベルと前立腺癌細胞における平均発現値又は中央発現値とを比較する工程、及び

該対象における前立腺癌の再発及び / 又は転移のリスクを決定する工程、を含んで成り、ここで該発現レベルは、

癌の再発及び / 又は転移の低いリスク、又は

癌の再発及び / 又は転移の高いリスク、

に相関することを特徴とする、方法。

【請求項 3】

前記方法が、決定された癌の再発及び / 又は生存結果を伴う対象のための治療を選択する工程をさらに含んで成る、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記アッセイが、前記試料から R N A を調製する工程を含んで成る、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記 R N A が P C R のために使用される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記アッセイがアレイを使用する工程を含んで成る、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記試料が、前立腺切除において除去された組織から解体される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記 P C R が、R T - P C R、任意にはリアルタイム R T - P C R である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

前記発現レベルが、 < 0.0001 の p 値と相関する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記試料が、単離された前立腺癌細胞を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前立腺切除後の前立腺癌患者のための治療処置を決定するための方法であって、該方法は、

該患者由来の前立腺癌細胞の試料を遺伝子の発現レベルについてアッセイすることにより、該患者についての癌の再発及び / 又は生存結果を決定する工程であって、ここで該発現レベルは、

癌の再発及び / 又は転移の低いリスク、

10

20

30

40

50

癌の再発及び／又は転移の高いリスク、又は前立腺切除から約1年後の上昇したPSAレベル、に相関することを特徴とする、工程、及びかかる癌の再発及び／又は生存結果を伴う患者のための治療を選択する工程、を含んで成る方法。

【請求項12】

前記治療が化学療法を含んで成る、請求項3又は11に記載の方法。

【請求項13】

前記治療が放射線治療を含んで成る、請求項3又は11に記載の方法。

【請求項14】

i) 前記試料における前立腺癌のグレードを決定する工程、

ii) 前記試料における前立腺癌のステージを決定する工程、又は

iii) これらの両方の工程；

をさらに含んで成り、ここでi)、ii)又はi)とii)の両方は、前記対象における前立腺癌の再発及び／又は転移のリスクを決定する前に任意に行われることを特徴とする、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項15】

前立腺癌グレードの決定がグリソン・スコアの決定を含んで成る、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前立腺癌ステージの測定がAJCCステージの決定を含んで成る、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

前記方法が、前記対象における前立腺癌の再発及び／又は転移のリスクを決定するための多変量分析を生成するためにグリソン・スコアにより前立腺癌グレードを決定する工程、及びAJCCステージに従い前立腺癌ステージを決定する工程を含んで成る、請求項14に記載の方法。

【請求項18】

前立腺癌細胞を含む試料を提供するために用いられる前立腺切除の任意的な前に、対象における前立腺血清抗原(PSA)を決定する工程をさらに含んで成る、請求項2に記載の方法。

【請求項19】

4以上、例えば6以上、8以上、10以上、12以上、14以上、16以上、18以上、20以上、22以上、24以上、26以上、28以上、30以上、32以上、34以上、36以上、38以上、40以上、45以上、50以上、55以上、60以上、65以上、70以上又は92以上の遺伝子の発現レベルがアッセイされる、請求項2に記載の方法。

【請求項20】

前記アッセイが、プローブとして配列番号1の使用を任意に介して、遺伝子番号1の発現レベルを決定する工程を含んで成る、請求項2に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2007年2月23日(12ヶ月後の2008年2月23日は土曜日で祝日である)に出願した米国仮出願第60/891,477号の優先権の利益を主張し、記載された全てが参考として本明細書中に組み込まれている。

【0002】

開示される分野

本明細書の開示は、前立腺癌に臨床的に関連する遺伝子(又は配列)発現プロフィール

10

20

30

40

50

又はパターンの同定及び使用に関する。特に、本明細書の開示は遺伝子又は発現配列の同定に基づき、その発現は患者の生存、前立腺癌の再発、及び/又は前立腺癌転移の発生に関係する。該遺伝子発現プロフィール(核酸発現、タンパク質発現、又は他の発現型を包含する)は、前立腺癌に罹患する患者の生存、前立腺癌の再発、及び/又は前立腺癌転移の発生を予測するために使用することができる。また、該プロフィールは前立腺癌細胞及び組織の研究及び/又は診断において、ならびに患者の予後の診断及び/又は決定のために使用することができる。診断や予後診断のために使用される場合、該プロフィールは、平均余命、癌再発、及び/又は癌転移の可能性に基づき、前立腺癌の処置を決定するために使用される。

【背景技術】

【0003】

前立腺癌は、米国人男性に最も一般的に診断される癌であり、毎年、およそ240,000人の新たに診断される患者及び40,000人の癌死亡者を伴う。前立腺癌を診断し、管理することは、分子や遺伝子レベルにおける癌の知識が不足しており、また自然疾患進行の理解についても不良なことから臨床的に極めて困難である。

【0004】

研究用途に利用可能な前立腺癌組織検体、特に病理学的に十分に特徴づけられており、RNA及びタンパク質研究のために適当に保存されており、かつ患者の臨床的、病理学的及び追跡情報に関連する検体は資源として不十分であるため、前立腺癌の研究は制限されている。

【0005】

前立腺癌、例えばT2前立腺癌の治療のいくつかのケースにおいては、外科的治療が用いられる。しかしながら、一部の患者は治療に失敗する恐れがある。これは、化学的失敗(chemical failure)(手術から1年後のPSAの評価)又は転移の進行(一般に、リンパ節及び骨における)によって判定される。PSA再発(PSA failure)、前立腺癌の再発、及び/又は転移の進行に遭遇する術後患者を同定又は予測するための能力は、患者に複数の利益を提供する。

【発明の概要】

【0006】

本明細書の開示は、前立腺癌に臨床的に関連する遺伝子(又は配列)発現パターン(又はプロフィール又は「特性」(signature))の同定及び使用を含む。遺伝子発現プロフィール(核酸発現、タンパク質発現、又は他の発現型を包含する)は、前立腺癌に罹患する患者の生存、前立腺癌の再発、及び/又は前立腺癌転移の発生を予測するために使用することができる。前立腺切除を含む実施形態において、本明細書の開示は、前立腺癌再発、癌転移及び/又は上昇したPSAレベルの再発の可能性を予測するための方法を含む。

【0007】

ある態様において、本明細書の開示は、前立腺癌に関連する予測情報を提供する遺伝子(又は配列)発現プロフィールを同定し、これらを使用するための方法を含む。該発現プロフィールは、良好又は不良な癌再発、癌転移、及び/又は生存結果を有する患者に相関し、これにより患者を区別することができる。いくつかの実施形態において、本明細書の開示は、前立腺癌に罹患する患者における癌再発及び/又は転移に関する発現プロフィールを同定するための方法を含む。他の実施形態において、本明細書の開示は、患者、例えば前立腺切除後に生じる結果を決定するために同定された発現結果に対して、患者由来の前立腺癌細胞試料中の遺伝子(又は配列)の発現を比較する方法を含む。これらの本明細書に開示される実施形態は、患者が前立腺癌の治療のための手術から利益を得ることができるか、あるいは患者に他の治療を行ったほうが良いのか、あるいは手術に加えてアジュバント処置が必要なのかを予測するための能力のための対処されていない重要な診断の必要性を満足するために有効に用いることができる。

【0008】

手術、例えば前立腺全摘出術から利益を受ける患者の制限されない一例は、本明細書に

10

20

30

40

50

開示される患者の前立腺癌の発現プロフィールによって、手術後の癌再発及び／又は転移を有さないことが予測される者である。関連する様式において、手術から利益を受けないことが予想される患者の制限されない例は、患者の前立腺癌細胞の発現プロフィールによって、本明細書に開示される手術後の癌転移が発現することが予測される者である。例えば、前立腺癌の再発は同じ場所で生じうるが、転移はしばしば異なる部位又は組織、例えば制限されることなく、リンパ管や骨で生じうる。

【0009】

さらなる実施形態において、前立腺癌細胞を有するか、あるいはその後の前立腺切除後の患者を患者の母集団 (population) から患者を同定するための方法は、良好な癌再発及び／又は生存結果 (例えば再発又は転移の低いリスク) を有する患者の部分母集団 (subpopulation) に属するものとして他の部分母集団に関連するか、あるいは不良な癌再発及び／又は生存結果 (再発又は転移の上昇したリスク) を有する部分母集団 (subpopulation) に属するものとして他の部分母集団に関連する。したがって、該方法は、少なくとも2つの部分母集団又はサブタイプに区別することができる。

10

【0010】

本明細書の開示は、本明細書に開示される発現パターンをアッセイすることにより、任意に前立腺切除後の良好な又は不良な癌再発、癌転移、及び／又は生存結果を有するような前立腺癌を有する患者の同定のための非主観的 (non-subjective) 手段を含む。したがって、主観的解釈 (例えば、免疫組織化学染色及び主観的分析) が、前立腺癌患者又は前立腺切除後患者の予後及び／又は治療を決定するために使用されている場合、これは、単独で、あるいは患者の結果、例えば生存及び癌の再発又は転移のより正確な評価を供するための他の (主観的及び／又は客観的な) 基準との組み合わせにおいて使用することができる。したがって、本明細書に開示される発現パターンは、前立腺癌、前立腺切除後の予後を決定するための手段を含む。

20

【0011】

本明細書に開示される発現パターンは、有意な正確性を伴い、前立腺癌又は前立腺切除後の結果において区別できる1以上の遺伝子又は発現配列を含む。遺伝子又は発現配列の発現レベルは、該発現レベルが患者の好ましい治療プロトコルの決定に関する結果に相関するように同定される。したがって、本発明は、本明細書に開示されるとおり、対象由来の試料を含有する前立腺癌細胞を患者の結果に相関する発現レベルについてアッセイすることにより、任意に前立腺切除後の前立腺癌に罹患する対象の結果を決定するための方法を提供する。

30

【0012】

他の態様において、本明細書の開示は、対象における前立腺癌の再発及び／又は転移のリスクを決定するための方法を含む。該方法は対象由来の前立腺癌細胞を含む試料を図14及び15中の遺伝子番号1~362から選択される2以上の遺伝子の発現レベルについてアッセイし、そして各々の遺伝子の発現レベル又は全体としての集合発現レベルを前立腺癌細胞の母集団の平均発現値又は中央発現値と比較することを含む。その後、この評価は試料が得られた対象の前立腺癌再発及び／又は転移のリスクを決定するために使用することができる。開示された遺伝子 (又は発現配列) の発現レベルは、前立腺癌細胞の母集団における発現の平均値又は中央値との比較に基づき、癌再発及び／又は転移の低いリスク、あるいは癌再発及び／又は転移の高いリスクに相関する。換言すれば、本明細書に開示される個々の遺伝子 (又は発現配列) は、本明細書に開示される高い又は低いリスクに相関する平均値又は中央値からはずれるように、(前立腺癌細胞母集団における発現の平均値又は中央値と比較して) 高い又は低いレベルにおいて発現する。2以上の遺伝子 (又は発現配列) における偏差の各々の集積が、本明細書に開示されるパターン又はプロフィール (profile) となる。

40

【0013】

いくつかの実施形態において、発現レベルについてのアッセイは、本明細書に開示される配列番号1~362から選択される2以上の核酸プローブを用いて行うことができる。

50

これらのプローブは適当な条件下でハイブリダイズし、そして本明細書に開示される発現配列を検出する。他の実施形態においては、配列番号 1 ~ 362 と同一の発現配列とハイブリダイズする他のプローブを使用することができる。他の場合において、追加的なプローブ配列は、遺伝子番号 1 ~ 362 として同定される配列の全て又は一部であってよい。多くの実施形態において、プローブは本明細書に記載される発現配列（又は遺伝子）から増幅した配列の領域を検出するために使用することができる。

【0014】

本明細書に開示される 2 以上の配列の発現レベルの検出又は測定は、発現プロフィール又は発現特性を検出又は測定することを意味する。本明細書に開示される 2 以上の配列を含む本明細書に開示される発現パターンは、本明細書に記載されるとおり同定され、使用される。これらの同定のために、前立腺癌細胞を含有する試料中の遺伝子発現レベルの大量のサンプリングは、mRNA の発現レベルを定量することによって得られる。ある実施形態において、本明細書の開示は、単純な生体検査ができないような、コンタミネートした細胞から解離し、あるいは単離又は精製したグローバル又はニアグローバルな単一の細胞又は均一な細胞群を分析することにより、遺伝子（又は配列）発現レベルを検出することを含む。多くの遺伝子の発現は、異なる患者由来の細胞間、ならびに同じ患者の試料由来の細胞間で異なるため、個々の遺伝子配列の発現からの複数のデータが、個々の遺伝子及び配列の同定を順々に許容するモデルを作成するための参照データとして使用され、特に前立腺癌、あるいは前立腺切除後に相関する発現の結果がもたらされる。

10

【0015】

その後、これらのモデルにおける多様な遺伝子の発現レベルが分析され、前立腺癌又は前立腺切除後の結果に陽性的又は陰性的に相関する核酸配列の発現が同定される。本明細書の開示は、本明細書に記載される結果に相関するように同定される細胞中の発現配列のサブセットである核酸配列を含む。本明細書に開示される発現パターン又はプロフィールは、これらの同定された配列（又は遺伝子）の組み合わせを含む。発現配列の同定のための複数の試料の使用は、前立腺癌の再発、転移及び/又は生存結果に対する遺伝子の相関性についての信頼性を向上させる。十分な信頼性がない場合、特定の遺伝子が実際に結果に相関するのかを予測することはできず、また遺伝子の発現が、前立腺癌、前立腺切除後の対象又は患者の結果を同定するために成功的に使用できるかを予測することもできない。一度同定すれば、予測的なプロフィールについて検出又は評価される発現プロフィールとしての評価のために、開示される遺伝子（又は発現配列）に対応する 2 以上の核酸配列を選択することができる。

20

30

【0016】

他と関連する 1 つの結果と高度に相関する発現レベルのプロフィールは、対象又は患者由来の試料を含有する前立腺癌細胞をアッセイし、試料が得られた対象の結果を予測することが可能である。このようなアッセイは、同定された結果に基づき、対象の治療処置を決定するための方法の一部として使用することができる。

【0017】

相関した遺伝子は、前立腺癌又は前立腺切除後の結果との分子発現表現型を的確に相互に関連付けるための能力を向上させるために、（有意な正確性を伴う）ペアで、あるいはより多くのメンバーにおいて使用することができる。該相関性は、本明細書に開示されるとおり、前立腺癌再発、癌転移及び/又は生存結果の分子定量を供する。理論に拘束されることなく、本明細書の開示の理解を改善するために、本明細書に開示される分子定量は、前立腺癌に関する他の分子指標、例えば前立腺血清抗原（PSA）値よりも強力である。相関した発現パターン及びプロフィールの更なる使用は、細胞及び組織の分類；診断及び/又は予後の決定；及び治療の決定及び/又は変更におけるものである。

40

【0018】

区別するための能力は、関連のある個々の遺伝子配列の発現の同定によって確認され、発現の実際のレベルを測定するために使用されるアッセイの形態によって確認されるものではない。アッセイは、該アッセイが定量的又は定性的に「トランスクリプトーム」（ゲ

50

ノム中の遺伝子の転写されたフラクシオン)又は「プロテオーム」(ゲノム中の発現遺伝子の翻訳されたフラクシオン)中の遺伝子配列の発現を反映する限り、本明細書に開示される同定された個々の遺伝子の同定特性(identifying feature)を利用できる。同定特性は、制限されることなく、コード(DNA)するため、又は発現(RNA)するために使用されるユニークな核酸配列該遺伝子又は該遺伝子によりコードされるタンパク質に特異的なエピトープ又はその活性を含む。必要とされる全てのものは、前立腺癌又は前立腺切除後の結果を区別するために必要な遺伝子配列の同定、ならびに発現アッセイにおける使用のための試料を含有する適当な細胞である。

【0019】

同様に、試料を含有する細胞の性質は、制限されることなく、新鮮な組織、新鮮に凍結された組織、及び固定された組織、例えばホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織として、本明細書に開示される方法において使用することができる。いくつかの実施形態において、試料は、ニードル(コア)生検又は他の生検のものであってよい。

10

【0020】

同定された発現パターン又はプロフィールを検出するために、本明細書に開示された発明は、単純な生体検査ができないようなコンタミネートした細胞から解離し、あるいは単離又は精製したグローバル又はニアグローバルな単一の細胞又は均一な細胞群を分析することにより、遺伝子(又は配列)発現レベルの同定を供する。該パターン又はプロフィールにおける遺伝子(配列)の発現レベルは、その後検出されるか、あるいは測定される。他の実施形態において、方法は、他の遺伝子又は配列の発現を評価又は測定することなく、該プロフィールにおける遺伝子(配列)の発現レベルのみを検出又は測定することができる。

20

【0021】

さらなる態様において、発現レベルの分析は、前立腺癌の他の評価又は指標と組み合わせ、あるいは置き換えて行うことができる。いくつかの実施形態において、該分析は、対象由来の前立腺癌細胞を含む試料中の前立腺癌のグレードを決定する方法と組み合わせを行うことができる。他の実施形態において、該組み合わせは、試料中の前立腺癌のステージを決定する方法との組み合わせである。3つ目の可能性は、任意的に、前立腺癌細胞を単離するために使用される手順の前に、対象におけるPSAレベルを検出又は測定する方法との組み合わせである。当然に、これらの例のいずれか1つ、2つ又は3つ全てと組み合わせることが可能である。1以上の評価が使用される場合、該結果は多変量分析となる。本明細書の開示は、多変量的な実施形態として本明細書に記載される評価の全ての可能な組み合わせを明確に含む。

30

【0022】

一般に前立腺癌グレード及び/又はステージを評価するために当業者に受け入れられている方法が使用できる。いくつかのケースにおいて、前立腺癌グレードを決定するための方法は、グリーン・スコア(グリーン・グレード)の決定を含む。他のケースにおいて、前立腺癌ステージを決定する方法は、前立腺癌ステージを評価するための対癌米国合同委員会(AJCC)腫瘍ステージング・システムに従う決定を含む。また、本明細書に記載されるとおり、遺伝子(配列)発現レベルの分析は、グリーン・スコア又はAJCC腫瘍ステージ決定のいずれかに代えて行うことができる。

40

【0023】

PSAレベルの場合、その評価は、本明細書に記載されるいずれかの方法における使用のための前立腺癌細胞を含む試料を提供するために使用される前立腺切除前に行うことができる。

【0024】

更なる態様において、本明細書の開示は、本明細書に開示される遺伝子(又は配列)の発現を検出するための物理的及び方法論的な手段を含む。これらの手段は、遺伝子(又は配列)の発現の原因となるDNA鋳型、該遺伝子(又は配列)を発現するための中間体として使用されるRNA、又は該遺伝子(又は配列)により発現されるタンパク質生成物の

50

1 又は複数の態様をアッセイすることに関してよい。

【0025】

本明細書により提供される1つの利点は、コンタミネートした非前立腺癌細胞（例えば、浸潤性リンパ球又は他の免疫系細胞）を除去し、本明細書に開示される発現パターン又はプロファイルの測定における、これらの影響を減少させ、患者の癌再発/生存結果を予測できることである。このようなコンタミネーションは、遺伝子発現プロファイルを産生するために、多くの細胞種を含有する生検が使用される場合に存在する。

【0026】

本発明はヒト前立腺癌において主に記載されているが、前立腺癌に罹患する可能性が知られているいずれかの動物の前立腺癌においても実施することができる。本発明の適用についての動物の制限されない例は、哺乳類、特に農業に重要な動物（例えば、制限されることなく、ウシ、ヒツジ、ウマ、及び他の「家畜」）、前立腺癌の動物モデル、及びヒトにかかわる動物（例えば、制限されることなく、イヌ及びネコ）である。

10

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】図1は、本明細書の実施例1及び表1に記載される、ヒト患者試料に基づく、代表的なデータ分析スキームを表す。

【図2】図2は、本明細書に記載される、Random Forests™ アルゴリズムの500遺伝子選択反復の結果を示す。

【図3A】図3Aは、同定された癌組織領域を有する前立腺全摘出術検体（FFPE組織）を含有するスライドにおける前立腺癌の代表的な同定を示す。

20

【図3B】図3Bは、非癌組織の除去後の切除された（微小切開した）前立腺癌材料を示す。

【図4】図4は、トレーニング及びテスト・セット由来の試料の遺伝子リスク特徴とグリソン・グレード又はスコア（ ≤ 6 、7又は ≥ 8 ）の相関を示す。

【図5】図5は、トレーニング及びテスト・セット由来の試料の遺伝子リスク特徴とAJCC病理学的腫瘍ステージ（II又はIII）の相関を示す。

【図6】図6は、トレーニング及びテスト・セット由来の試料の遺伝子リスク特徴と術前PSA（前立腺血清抗原）値の相関を示す。

【図7】図7は、前立腺癌を治療するための外科的介入後のPSA再発が存在しないカプラン・マイヤー分析からの結果を示す。該結果は、良好な癌再発及び生存結果（再発及び転移による脂肪の低い発生率）の可能性を有する「低」リスク部分母集団及び不良な結果（再発及び転移による脂肪の高い発生率）を有する「高」リスク部分母集団への分離を示す。

30

【図8】図8は、 ≤ 6 、7のグリソン・グレード又はスコアを有する細胞試料における、前立腺癌を治療するための外科的介入後のPSA再発が存在しないカプラン・マイヤー分析からの結果を示す。該結果は、良好な癌再発及び生存結果（再発及び転移による脂肪の低い発生率）の可能性を有する「低」リスク部分母集団及び不良な結果（再発及び転移による脂肪の高い発生率）を有する「高」リスク部分母集団への分離を示す。試料が、 ≤ 6 のグリソン・グレード又はスコア、7のスコア、又は ≥ 8 のスコアを伴うものに分離される場合、同様の結果が観察された。

40

【図9】図9は、グリソン・グレード単独に基づく生存曲線を示す。

【図10】図10は、AJCCステージ単独に基づく生存曲線を示す。

【図11】図11は、10年間にわたり、189人の患者を良好な生存結果の可能性（転移による死亡の低い発生率）を有する「低」リスク部分母集団と不良な結果（転移による高い発生率）を有する「高」リスク部分母集団とに分離するための開示されたリスク・スコア（62の代表的な遺伝子に基づく）を使用した結果を示す。

【図12】図12は、図11の10年間のリスク・スコア対転移の可能性のプロットを示す。グラフに示されるとおり、対象の前立腺癌における0のスコアは、外科的介入後10年間で生じた転移の増加したリスクを示す。

50

【図13】図13は、PSA再発についての一変量及び多変量分析の使用を概要し、比較する。示されたAJCCステージはII対IIIである。CIは信頼区間を意味する。

【図14-1】図14は本明細書に記載される使用のための337の遺伝子の注釈及び同定情報の一覧である。遺伝子番号は、各々の遺伝子と以下の表1中の対応するプローブの配列番号及びそのパフォーマンス情報を相互参照するために用いることができる。同定された分子が500の産生したセット（実施例1に記載される）の間で生じる頻度は、「頻度」列に示される。残りの列は各々の遺伝子の同定情報、例えば遺伝子登録番号（「探索キー」列）、表1中の対応するプローブ配列の登録番号（「プローブID」列）、遺伝子記号（「記号」列）、及び簡単な説明（最後の列）を含む。

【図14-2】図14は本明細書に記載される使用のための337の遺伝子の注釈及び同定情報の一覧である。遺伝子番号は、各々の遺伝子と以下の表1中の対応するプローブの配列番号及びそのパフォーマンス情報を相互参照するために用いることができる。同定された分子が500の産生したセット（実施例1に記載される）の間で生じる頻度は、「頻度」列に示される。残りの列は各々の遺伝子の同定情報、例えば遺伝子登録番号（「探索キー」列）、表1中の対応するプローブ配列の登録番号（「プローブID」列）、遺伝子記号（「記号」列）、及び簡単な説明（最後の列）を含む。

【図14-3】図14は本明細書に記載される使用のための337の遺伝子の注釈及び同定情報の一覧である。遺伝子番号は、各々の遺伝子と以下の表1中の対応するプローブの配列番号及びそのパフォーマンス情報を相互参照するために用いることができる。同定された分子が500の産生したセット（実施例1に記載される）の間で生じる頻度は、「頻度」列に示される。残りの列は各々の遺伝子の同定情報、例えば遺伝子登録番号（「探索キー」列）、表1中の対応するプローブ配列の登録番号（「プローブID」列）、遺伝子記号（「記号」列）、及び簡単な説明（最後の列）を含む。

【図14-4】図14は本明細書に記載される使用のための337の遺伝子の注釈及び同定情報の一覧である。遺伝子番号は、各々の遺伝子と以下の表1中の対応するプローブの配列番号及びそのパフォーマンス情報を相互参照するために用いることができる。同定された分子が500の産生したセット（実施例1に記載される）の間で生じる頻度は、「頻度」列に示される。残りの列は各々の遺伝子の同定情報、例えば遺伝子登録番号（「探索キー」列）、表1中の対応するプローブ配列の登録番号（「プローブID」列）、遺伝子記号（「記号」列）、及び簡単な説明（最後の列）を含む。

【図14-5】図14は本明細書に記載される使用のための337の遺伝子の注釈及び同定情報の一覧である。遺伝子番号は、各々の遺伝子と以下の表1中の対応するプローブの配列番号及びそのパフォーマンス情報を相互参照するために用いることができる。同定された分子が500の産生したセット（実施例1に記載される）の間で生じる頻度は、「頻度」列に示される。残りの列は各々の遺伝子の同定情報、例えば遺伝子登録番号（「探索キー」列）、表1中の対応するプローブ配列の登録番号（「プローブID」列）、遺伝子記号（「記号」列）、及び簡単な説明（最後の列）を含む。

【図14-6】図14は本明細書に記載される使用のための337の遺伝子の注釈及び同定情報の一覧である。遺伝子番号は、各々の遺伝子と以下の表1中の対応するプローブの配列番号及びそのパフォーマンス情報を相互参照するために用いることができる。同定された分子が500の産生したセット（実施例1に記載される）の間で生じる頻度は、「頻度」列に示される。残りの列は各々の遺伝子の同定情報、例えば遺伝子登録番号（「探索キー」列）、表1中の対応するプローブ配列の登録番号（「プローブID」列）、遺伝子記号（「記号」列）、及び簡単な説明（最後の列）を含む。

【図14-7】図14は本明細書に記載される使用のための337の遺伝子の注釈及び同定情報の一覧である。遺伝子番号は、各々の遺伝子と以下の表1中の対応するプローブの配列番号及びそのパフォーマンス情報を相互参照するために用いることができる。同定された分子が500の産生したセット（実施例1に記載される）の間で生じる頻度は、「頻度」列に示される。残りの列は各々の遺伝子の同定情報、例えば遺伝子登録番号（「探索キー」列）、表1中の対応するプローブ配列の登録番号（「プローブID」列）、遺伝子記

10

20

30

40

50

号（「記号」列）、及び簡単な説明（最後の列）を含む。

【図14-8】図14は本明細書に記載される使用のための337の遺伝子の注釈及び同定情報の一覧である。遺伝子番号は、各々の遺伝子と以下の表1中の対応するプローブの配列番号及びそのパフォーマンス情報を相互参照するために用いることができる。同定された分子が500の産生したセット（実施例1に記載される）の間で生じる頻度は、「頻度」列に示される。残りの列は各々の遺伝子の同定情報、例えば遺伝子登録番号（「探索キー」列）、表1中の対応するプローブ配列の登録番号（「プローブID」列）、遺伝子記号（「記号」列）、及び簡単な説明（最後の列）を含む。

【図14-9】図14は本明細書に記載される使用のための337の遺伝子の注釈及び同定情報の一覧である。遺伝子番号は、各々の遺伝子と以下の表1中の対応するプローブの配列番号及びそのパフォーマンス情報を相互参照するために用いることができる。同定された分子が500の産生したセット（実施例1に記載される）の間で生じる頻度は、「頻度」列に示される。残りの列は各々の遺伝子の同定情報、例えば遺伝子登録番号（「探索キー」列）、表1中の対応するプローブ配列の登録番号（「プローブID」列）、遺伝子記号（「記号」列）、及び簡単な説明（最後の列）を含む。

【図14-10】図14は本明細書に記載される使用のための337の遺伝子の注釈及び同定情報の一覧である。遺伝子番号は、各々の遺伝子と以下の表1中の対応するプローブの配列番号及びそのパフォーマンス情報を相互参照するために用いることができる。同定された分子が500の産生したセット（実施例1に記載される）の間で生じる頻度は、「頻度」列に示される。残りの列は各々の遺伝子の同定情報、例えば遺伝子登録番号（「探索キー」列）、表1中の対応するプローブ配列の登録番号（「プローブID」列）、遺伝子記号（「記号」列）、及び簡単な説明（最後の列）を含む。

【図14-11】図14は本明細書に記載される使用のための337の遺伝子の注釈及び同定情報の一覧である。遺伝子番号は、各々の遺伝子と以下の表1中の対応するプローブの配列番号及びそのパフォーマンス情報を相互参照するために用いることができる。同定された分子が500の産生したセット（実施例1に記載される）の間で生じる頻度は、「頻度」列に示される。残りの列は各々の遺伝子の同定情報、例えば遺伝子登録番号（「探索キー」列）、表1中の対応するプローブ配列の登録番号（「プローブID」列）、遺伝子記号（「記号」列）、及び簡単な説明（最後の列）を含む。

【図14-12】図14は本明細書に記載される使用のための337の遺伝子の注釈及び同定情報の一覧である。遺伝子番号は、各々の遺伝子と以下の表1中の対応するプローブの配列番号及びそのパフォーマンス情報を相互参照するために用いることができる。同定された分子が500の産生したセット（実施例1に記載される）の間で生じる頻度は、「頻度」列に示される。残りの列は各々の遺伝子の同定情報、例えば遺伝子登録番号（「探索キー」列）、表1中の対応するプローブ配列の登録番号（「プローブID」列）、遺伝子記号（「記号」列）、及び簡単な説明（最後の列）を含む。

【図14-13】図14は本明細書に記載される使用のための337の遺伝子の注釈及び同定情報の一覧である。遺伝子番号は、各々の遺伝子と以下の表1中の対応するプローブの配列番号及びそのパフォーマンス情報を相互参照するために用いることができる。同定された分子が500の産生したセット（実施例1に記載される）の間で生じる頻度は、「頻度」列に示される。残りの列は各々の遺伝子の同定情報、例えば遺伝子登録番号（「探索キー」列）、表1中の対応するプローブ配列の登録番号（「プローブID」列）、遺伝子記号（「記号」列）、及び簡単な説明（最後の列）を含む。

【図14-14】図14は本明細書に記載される使用のための337の遺伝子の注釈及び同定情報の一覧である。遺伝子番号は、各々の遺伝子と以下の表1中の対応するプローブの配列番号及びそのパフォーマンス情報を相互参照するために用いることができる。同定された分子が500の産生したセット（実施例1に記載される）の間で生じる頻度は、「頻度」列に示される。残りの列は各々の遺伝子の同定情報、例えば遺伝子登録番号（「探索キー」列）、表1中の対応するプローブ配列の登録番号（「プローブID」列）、遺伝子記号（「記号」列）、及び簡単な説明（最後の列）を含む。

10

20

30

40

50

【図15-1】図15は、本明細書に記載される使用のための更なる25遺伝子の注釈及び同定情報の一覧である。遺伝子番号及びパフォーマンス情報（z及びp値）は、各々の遺伝子と以下の表3中の対応するプローブの配列番号及びそのパフォーマンス情報を相互参照するために用いることができる。各々の遺伝子の同定情報は、遺伝子登録番号（「探索キー」列）、表3中の対応するプローブ配列の登録番号（「プローブID」列）、遺伝子記号（「記号」列）、及び簡単な説明（最後の列）を含む。

【図15-2】図15は、本明細書に記載される使用のための更なる25遺伝子の注釈及び同定情報の一覧である。遺伝子番号及びパフォーマンス情報（z及びp値）は、各々の遺伝子と以下の表3中の対応するプローブの配列番号及びそのパフォーマンス情報を相互参照するために用いることができる。各々の遺伝子の同定情報は、遺伝子登録番号（「探索キー」列）、表3中の対応するプローブ配列の登録番号（「プローブID」列）、遺伝子記号（「記号」列）、及び簡単な説明（最後の列）を含む。

10

【0028】

本発明を実施するための詳細な説明

用語の定義

遺伝子発現「パターン」又は「プロファイル」又は「特徴」は、2以上の前立腺癌又は前立腺切除後、癌再発、転移及び/又は生存結果における2以上の遺伝子（発現配列）の相対的な発現を意味し、その関連する発現は該結果を区別することができる。

【0029】

「遺伝子」又は「発現配列」は、別個の生成物（本質的にはRNA又はタンパク質）をコードし、そして検出可能な様式において発現するポリヌクレオチドである。1以上のポリヌクレオチドは、別個の生成物をコードすることができる。該用語は、染色体位置及び正常な有糸分裂における組換え能力に基づき、同じ生成物をコードする遺伝子又は発現配列の対立遺伝子及び多型、又は機能的に関連する（機能の獲得、喪失又は修飾を含む）その類似体を含む。

20

【0030】

用語「関連する」又は「関連」又はこれらの相当語句は、2以上の遺伝子の発現と、本明細書に記載される方法の使用により同定される1以上の他の状態を除く前立腺細胞の生理状態の関連性を意味する。遺伝子は高レベル又は低レベルにおいて発現し、そして1又は複数の前立腺癌、又は前立腺切除後の状態若しくは結果に関連する。関連性を表現するための1つの方法は、多様な遺伝子（又は発現配列）の発現のために本明細書に開示されるz値によるものである。z値は、遺伝子（又は発現配列）の発現レベルと、特定の結果、例えば癌再発、癌転移及び/又は経時生存との関連性の強度（strength）又は加重（weight）を示すように見ることができる。該値は、任意に、しかしながら一貫して、それぞれ発現の過剰又は不足を示す正符号又は負符号（+/-）を有する。該符号は任意であるため、これらの指定は、悪影響を与えることなく、容易に（しかしながら一貫して）逆にすることができる。

30

【0031】

いくつかの実施形態において、強度（又は加重）は、標準化（例えば、相対的に一定レベルにおいて発現する参照遺伝子の発現に対する）後、与えられた遺伝子（又は発現配列）の発現レベルで乗じられ、遺伝子（又は配列）の発現の値又はスコアを供する。多くのケースにおいて、該発現データは、更なる使用、例えばクラスタリング及び判別分析の前に、当業者に知られるように標準化され、中央化され、そしてlog変換される。1以上の発現レベルが（遺伝子発現プロファイル又はパターンのケースとして）使用される場合、該値又はスコアは合計され、その後相関を評価するため、あるいは相関に基づく分類を行うために総合値として分析される。

40

【0032】

「ポリヌクレオチド」は、いずれかの長さのヌクレオチドのポリマー形態であって、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドのいずれかである。該用語は、分子の一次構造のみを意味する。したがって、該用語は、二本鎖-及び一本鎖DNA及びRNAを含

50

む。これはまた、既知のタイプの修飾、例えば当業界に既知の標識、メチル化、「キャップ」、1又は複数の天然ヌクレオチドの類似体による置換、及びヌクレオチド内修飾、例えば非荷電リンケージ（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等）、ならびにポリヌクレオチドの未修飾ポリヌクレオチドを含む。

【0033】

用語「増幅する」は、広い意味で用いられ、増幅産物の作成がDNA又はRNAポリメラーゼにより酵素的に行うことができることを意味する。本明細書において使用される「増幅」は、一般に、所望の配列、特に試料の配列の複数のコピーを産生する方法を意味する。「複数のコピー」は少なくとも2つのコピーを意味する。「コピー」は、鋳型配列と完全に相補的又は同一の配列を必ずしも意味しない。

10

【0034】

用語「対応する」は、適当な場合には、核酸分子が他の核酸分子と相当量の配列同一性を共有することを意味してよい。相当量は、少なくとも95%、通常少なくとも98%、そしてより一般的には少なくとも99%を意味し、そして配列同一性は、Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:403-410に記載されるとおり（公開された初期設定、すなわちパラメーター、 $w = 4$ 、 $t = 17$ を使用する）、BLASTアルゴリズムを使用して決定される。mRNAを増幅するための方法は、当業界に一般に知られており、逆転写PCR（RT-PCR）及び米国特許出願第10/062,857号に記載されるもの（2001年10月25日出願）、ならびに米国仮特許出願第60/298,847号（2001年6月15日出願）及び第60/257,801号（2000年12月22日出願）に記載されるものを含み、これら全ては参考として本明細書中にその記載された全てが組み込まれている。使用することができる他の方法は、定量PCR（又はQ-PCR）である。あるいは、RNAは当業者に既知の方法により対応するcDNAとして直接標識することができる。

20

【0035】

「マイクロアレイ」は、別個の領域の直線的又は二次元的なアレイであり、各々は、固形支持体、例えば、制限されることなく、ガラス、プラスチック又は合成膜の表面上に形成され、一定の範囲を有する。マイクロアレイ上の別個の領域の密度は、単一の固相支持体の表面上で検出される固定化ポリヌクレオチドの総数により決定され、いくつかの実施形態においては、例えば、少なくとも約 $50 / \text{cm}^2$ 、少なくとも約 $100 / \text{cm}^2$ 、少なくとも約 $500 / \text{cm}^2$ であるが、約 $1000 / \text{cm}^2$ 以下である。該アレイは、合計で、約500以下、約1000、約1500、約2000、約2500又は約3000の固定化ポリヌクレオチドを含んでよい。本明細書において使用される場合、DNAマイクロアレイは、試料由来の増幅又はクローン化したポリヌクレオチドにハイブリダイズするために使用されるチップ又は他の表面上に置かれたオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドのアレイである。該アレイ中のポリヌクレオチドの各々の特定の群の位置は既知であるため、試料ポリヌクレオチドの同定は、該マイクロアレイ中の特定の位置に対するこれらの結合に基づき決定することができる。

30

【0036】

本明細書の開示は、過剰又は不足して発現される遺伝子（又は発現遺伝子）の同定に依存するため、本発明の開示の実施形態は、試料細胞のmRNA又はその増幅もしくはクローン化バージョン（例えば、DNA又はcDNA）の特定の遺伝子配列にユニークなポリヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションにより、発現を決定することを含む。このタイプのポリヌクレオチドは、他の遺伝子配列には見られない、少なくとも約20、少なくとも約22、少なくとも約24、少なくとも約26、少なくとも約28、少なくとも約30又は少なくとも約32の遺伝子配列の連続した塩基対を含む。上記において使用される用語「約」は、言及した数値から1の増加又は減少を意味する。他の実施形態は、少なくとも又は約50、少なくとも又は約100、少なくとも又は約150、少なくとも又は約200、少なくとも又は約250、少なくとも又は約300、少なくとも又は約350、又は少なくとも又は約400の、他の遺伝子配列には見られない遺伝子配列の塩基対のポリヌクレオチドを使用できる。上記において使用される用語「約」は、言及した数値が

40

50

ら10%の増加又は減少を意味する。このようなポリヌクレオチドはまた、本明細書に記載される遺伝子又はそのユニークな部分の配列とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドプローブを意味してもよい。多くのケースにおいて、ハイブリダイゼーション条件は、約30% v/v ~ 約50%のホルムアミド、及び約55 ~ 約65 又はそれ以上における、約0.01M ~ 約0.15Mのハイブリダイゼーションのための塩、及び0.01M ~ 約0.15Mの洗浄のための塩の条件のストリンジェント条件、あるいはこれらと同等の条件である。

【0037】

他の実施形態において、配列番号1 ~ 362と同一の発現配列とハイブリダイズする他のプローブを使用することができる。これらの更なるプローブは、配列番号1 ~ 362により検出された発現配列の分析によって調製又は選択することができる。本明細書の開示において使用するための、このような更なるポリヌクレオチドプローブは、使用される遺伝子配列と約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有してよい。同一性は、上記のとおり、BLASTアルゴリズムを使用して決定される。これらの更なるプローブはまた、上述のストリンジェントな条件又はそれと同等の条件下において、本明細書の開示の発現遺伝子及び配列とハイブリダイズするための能力に基づき記載されてよい。

10

【0038】

多くのケースにおいて、該配列は、該遺伝子、mRNAに対応するcDNA、及びこれらの配列の増幅バージョンによりコードされるmRNAのものである。本明細書の開示のいくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドプローブは、アレイ、他のデバイス、又はプローブが1又は複数のする個々のスポットに固定化される。多くの実施形態において、該プローブは、3'末翻訳領域の一部を含む遺伝子(又は発現配列)の領域に関する。いくつかのケースにおいて、該領域は、ポリアデニル化シグナル又はポリアデニル化mRNAの約100、200、300、400、500、600、700、800又は900又はそれ以上のヌクレオチド内にある。

20

【0039】

あるいは、本発明の開示の他の実施形態において、遺伝子発現は、細胞試料中の個々の遺伝子産物(タンパク質)1又は複数のエピトープに特異的な1又は複数の抗体の使用により、注目の細胞試料中の発現タンパク質の分析によって決定することができる。このような抗体は、遺伝子産物に結合後、簡単な検出を許容するために標識化することができる。

30

【0040】

用語「標識」は、標識された分子の存在の指標となる検出可能なシグナルを産生することが可能な組成物を意味する。適当な標識は、ラジオアイソトープ、ヌクレオチド発色団、酵素、基質、蛍光分子、化学発酵部分、磁性粒子、生物発光部分等を含む。例えば、標識は、分光的、光化学的、生物化学的、免疫化学的、電気的、光学的又は化学的手段により検出可能ないずれかの組成物である。

【0041】

用語「支持体」は、慣習的な支持体、例えばビーズ、粒子、ディップスティック、ファイバー、フィルター膜及びシラン又はケイ酸支持体、例えばガラススライドを意味する。

40

【0042】

本明細書において使用される「前立腺組織試料」又は「前立腺癌細胞試料」は、個人、例えば前立腺癌に罹患している者から単離された前立腺組織の試料を意味する。該試料は、前立腺切除、例えば前立腺全摘出術を介して除去された物質に由来してよい。あるいは、これらは、他の手段、例えばニードル(コア)生検又は他の生検技術、例えば外側生検、慣習的な六力所生検法、拡張技術として六力所生検及び外側生検の異なる組み合わせ、経直腸超音波誘導前立腺生検、及び当業者に既知の他の手段によって得られる。このような試料は主に単離物(培養細胞に対比する)であり、そして当業界に認識されるいずれかの適当な方法により回収できる。いくつかの実施形態において、「試料」は、侵襲的方法

50

、例えば制限されることなく、外科的生検により回収することができる。試料は、当業者に所望される機知の方法又は他の適当な方法によって単離される前立腺癌細胞を含んでよい。単離方法は、制限されることなく、本明細書の開示に従う使用の前の顕微解剖、レーザー・キャプチャー・マイクロダイセクション(LCM)、又はレーザー・マイクロダイセクション(LMD)を含む。

【0043】

「発現」及び「遺伝子発現」は、核酸材料の転写及び/又は翻訳を含む。

【0044】

本明細書において使用される「含んで成る」の用語、及びその同義語は、包括的な意味において使用される：すなわち用語「含む」及びその同義語と同じである。

10

【0045】

ある事象が発生することを「許容する」条件、又はある事象が生じるために「適当な」条件、例えばハイブリダイゼーション、鎖伸張等に適当な条件は、このような事象が生じることを妨害しない条件である。したがって、これらの条件は、該事象を許容し、増強し、促進し、そして/あるいは誘導する。当業者に既知であり、本明細書に記載されるこのような条件は、例えばヌクレオチド配列の性質、温度及び緩衝液の条件に依存する。これらの条件はまた、どのような事象が所望されているか、例えばハイブリダイゼーション、切断、鎖伸張又は転写に依存する。

【0046】

本明細書において使用される配列「突然変異」は、参照配列と比較して注目の本明細書に開示される遺伝子の配列におけるいずれかの変化を意味する。配列突然変異は、例えば置換、欠失、又は挿入による、配列中の単一のヌクレオチド変化又は1以上のヌクレオチド変化を含む。単一のヌクレオチド多型(SNP)もまた、本明細書において使用される配列突然変異である。本発明の開示は、遺伝子(又は配列)発現レベルに基づくため、本明細書に開示される遺伝子の非コードの制御領域中の突然変異は、本明細書の開示の実施においてアッセイすることができる。同様に、「検出可能な程度に多い」生成物は、直接又は間接的に観察されるいずれかの増加を含む。

20

【0047】

「検出」は、検出するためのいずれかの手段、例えば遺伝子発現のその変化の直接的及び間接的な検出を含む。例えば、「検出可能な程度に少ない」生成物は、直接的又は間接的に観察することができ、そして該用語は、いずれかの減少(検出可能なシグナルの不存在を含む)を意味する。同様に「検出可能な程度に多い」生成物は、直接的又は間接的に観察されるいずれかの増加を意味する。

30

【0048】

前立腺切除は、当業者、例えば外科医による前立腺組織の除去を意味する。制限のない例は、前立腺全摘出術；オープン(伝統的な)前立腺切除(会陰を介する切開に関する)；腹腔鏡前立腺切除；及びロボット(神経温存)前立腺切除を含む。

【0049】

グリソン・スコアは、グリソン・システムの経験のある病理学者による前立腺癌の試料の等級付け(grading)を意味し、これは正常な前立腺組織と比較した前立腺組織の試料の細胞における類似性に基づく1~5の数字を用いてグリソン・スコアを与える。正常な前立腺組織と極めて類似する組織は1のスコア又はグレードが与えられ、一方正常なプロフィールを喪失し、そして該細胞が前立腺にでたらめに広がっているような組織は5のスコア又はグレードが与えられる。2~4のスコア又はグレードは、包括的に、これらの可能性におけるプロフィールを有する。しかしながら、前立腺癌は異なるスコア又はグレードを伴う領域を有しうるため、ほとんどの組織を網羅する2つの領域に対して別々のスコア又はグレードが与えられる。該2つのスコア又はグレードが合計され、2~10のグリソン・スコア(又はグリソン合計)が作成される。

40

【0050】

別に定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術的及び科学的用語は、

50

本発明の属する当業者が慣習的に理解するものと同じ意味を有する。

【0051】

概要

本明細書の開示は、1993～1995年に達成されたFFPE組織由来の前立腺癌試料の別々のトレーニング及びテスト・セットを使用することによる、前立腺血清抗原（PSA）再発の遺伝子（又は配列）発現に基づく予測の発見に一部基づく。該試料は、長期間追跡した患者、例えば試料が得られた、術後少なくとも10年間疾患の証拠を伴わない患者（NED）及びその後再発（例えば遠隔転移）に発展した患者に由来する臨床データに関する。62、92、337及び362遺伝子（又は発現配列）（異なる癌タイプ中に高度な動的発現（又は発現レベルにおけるバリエーション）を伴う約1536遺伝子の出発セットに由来する）を、試料のRNAに基づく発現プロファイリングを介して同定した。これらの遺伝子の発現レベルは、本明細書に記載されるPSA再発及び臨床結果と関連し、したがって本明細書に開示される予測因子として使用することができる。同定された遺伝子は、細胞機能、例えば細胞周期、血液凝固、創傷治癒、転写制御及びアポトーシスに参与することが報告されている。

10

【0052】

開示される遺伝子発現パターン（プロフィール）の予測能力は、グリソン・スコア及びAJCC腫瘍ステージに相關する。これはまた、術前PSAレベルと一致する。該プロフィールはまた、 ≤ 6 及び7のグリソン・スコアを有する試料をPSA再発の低リスク及び高リスクに階層化するための能力を有する。既知の予測因子による多変量分析において、該プロフィールは、統計的な有意性（ $p < 0.05$ ）を維持する唯一の予測因子であった。したがって、生検又は前立腺切除において除去された組織におけるプロフィールの検出は、無痛性の進行癌を区別することを許容する。

20

【0053】

本明細書の開示は、対象における前立腺癌生存及び再発結果を区別する（又は相關する）遺伝子発現パターン（又はプロフィール）の同定及び使用を含む。このようなパターンは、いくつかの参照細胞又は組織試料、例えば前立腺癌の病理学における当業者によって検査されたもの、を使用して本明細書に開示される方法によって決定することができ、これは正常又は他の非癌細胞とは対照的に、前立腺癌細胞を示す。試料由来の対象により経験される結果は発現データと関連し、結果に相關するパターンを同定することができる。全ての遺伝子発現プロフィールは、人、癌、癌細胞によって異なるため、一定の細胞と発現した、あるいは発現下にある遺伝子の相關は、本明細書に開示したとおり行い、前立腺癌結果を区別することができる遺伝子を同定できる。

30

【0054】

遺伝子及び配列の同定及び記載

本明細書の開示は、前立腺癌、又は前立腺切除後の結果、例えば0.2ngの術後PSA上昇（「PSA再発」）に関して特異的に発現することが発見された2以上のいずれかの開示された遺伝子（発現遺伝子）により実施することができる。該同定は、多様な均一な前立腺癌細胞群の発現プロフィールを使用して行った。発現プロフィールの各々の遺伝子の発現レベルは、特定の結果に相關することができる。あるいは、2以上の遺伝子（発現配列）の発現レベルは、クラスター（組み合わせ）化し、そして特定の結果の相關に基づき使用することができる。結果の例は、制限されることなく、遠隔転移、例えばリンパ節又は骨への転移、又は化学治療又は放射線治療又は凍結治療を追跡する必要性を含む。さらなる実施形態において、該発現プロフィールは、対象又は患者を「静観」と「さらなる治療が必要」の異なる予後に分類するために使用することができ、後者の場合には、前立腺癌/腫瘍を除去する手術を超えて、ネオアジュバント又はアジュバント治療を含む。したがって、開示される方法は、前立腺癌管理として使用することができる。

40

【0055】

前立腺癌（又は前立腺切除後）生存、転移又は再発結果に対する有意な相關性を有する遺伝子は、結果を区別するために使用される。あるいは、有意な相關性を有する遺伝子は

50

、結果を区別する能力の有意な喪失を伴わずに開示される発現パターン又はプロフィールを形成するための低い相関性を有する遺伝子との組み合わせにおいて使用することができる。このような組み合わせ（又は発現パターン）は、当業界に認識されるいずれかの適当な手段、例えば制限されることなく、クラスター分析、支持されたベクトル機械、ニューラル・ネットワーク又は当業界に既知の他のアルゴリズムによって選択及び試験することができる。該パターン又はプロフィールは、該モデルにおける区別のために使用される遺伝子の発現に基づき、未知の試料の分類を予測することができる。「Leave one out」クロス・バリデーションは、多様な組み合わせの性能を試験するため、そして組み合わせの予測能力に対して情報が不足しかつ有害な加重（発現遺伝子又は配列）を同定するのを助けるために使用することができる。クロス・バリデーションはまた、遺伝子又は配列を同定するために使用することができ、その発現は該モデルの予測能力を増強する。

10

【0056】

特に前立腺癌又は前立腺切除後の結果に相関するように発現した開示される遺伝子（配列）は、遺伝子発現分析を、異なる結果における対象を分類するための能力に寄与するこれらの遺伝子だけに焦点を当てる能力を供する。前立腺癌細胞中の他の遺伝子の発現は、相対的に関連する情報を供することができず、したがって前立腺癌結果の異なる予後（又は区別）を支援しうる。

【0057】

当業者に理解されるとおり、該組み合わせ（発現パターン又はプロフィール）は、参照遺伝子発現データの少数のセットに基づく場合であっても極めて有用であり、正確性における増加は追加的なデータに従い減少するように見えるが、追加的な参照データの含有によりますます正確性が増す。前立腺癌又は前立腺切除後の異なる結果を区別するために同定され、本明細書において開示される遺伝子を使用する追加的な参照遺伝子発現データの同定はルーチンであり、当業者によって容易に行うことができ、上述のモデルを産生することを許容し、これらの遺伝子の発現レベルに基づき未知の試料の状態を予測することができる。

20

【0058】

本発明の開示は、図14中の以下の遺伝子における発現配列を含む。

【0059】

【表 1】

表 1

配列 番号:	頻度	プローブ配列	z	P	62の セット
1	500	GGCTCCTAGAAGCCCCATTCAATATCACTACTCTTTAACGAGTGCC	-3.00978	0.004298	有
2	488	TGACTGGATGGACACATTGCTGTGGGTAGTCCCTCCTACTAGGA	3.250421	0.000878	有
3	475	CCAACTATGAAAGGCCATAGAAACGTTTTAATTTTCAATGAAGTCACTGA	1.295466	0.199714	有
4	386	ATATTTTGGTGTTTGGGAGGCATGCAGTCAATATTTGTACAGTTAGT	2.775622	0.00728	有
5	349	TGCATGGTTGGTCTGAAAATAGAGTTGGGCTTAATGTTGACTTCTATTAC	5.04529	6.51E-06	有
6	338	TCACATCAGTCTTCGGGAATCAAGATCAACATATCAGGTGGTCATT	3.405667	0.000631	有
7	334	CCCCACCCCTATCGTGGTTATTGTGTTTTGGACTGAATTTACTTG	4.583428	2.21E-07	有
8	297	CCGGATGGTGCTTCTAATTTCTGCTAACCTGTAAGTGGTGTGTGTA	3.80189	0.000379	有
9	291	CCTCCGAGCTGCTAGCTGACAAATACAATTTGAAGGAATCCAAA	3.710157	0.00019	有
10	287	GCCTGTATCCCGGTGGGAGTACTATGAGTCAGTGTACACAGAACG	-3.6928	0.000507	有
11	287	AAACCATCAGCCGGCCTTTTATATGGGTCTTCACTCTGACTAGAATT	3.57085	0.0014	有
12	267	GACTGATGCCAGGACAACCTTTCTCCAGATGTAAACAGAGAGACATG	-4.19554	2.68E-05	有
13	259	CACTGGACACCCCTTCGAGTGTGGGTTTTAACATCCCTGTGAGATT	2.634469	0.008429	有
14	254	GATCTGGGATCACGCCTTGCCAAGTGTGAGATTACCTTTCT	2.052031	0.040119	有
15	244	TTCAGGCTTAATGCTGCACCTAGATATAAATGCTAATGATACTTGGGTT	5.729346	2.33E-07	有
16	232	GAGTCAGTGGATGGACAGGTGGTTTCTCCACAAGAGAGAAAAT	-3.406	0.001156	有
17	227	TGGTAGGAGATACTAATTGGATTGGGAGATTAATTGGATTTGGCCA	-1.61758	0.110916	有
18	211	CCTAAGGTGGTTGTGCTCGGAGGGTTTCTTGTTCTTTTCCATTTT	1.001552	0.315659	有
19	194	GCTCAATATCCAGAAATAGTTTTCAATGTATTAATGAAGTGATTAATTGGCT	4.402902	4.56E-06	有
20	189	TTGCTTTTTCTCCTTTGGGATGTTGGAAGCTACAGAAATATTTATAAA	3.113451	0.002649	有
21	181	AGGCCTCATCCTCCACTGAAGAGTATGGATTGAAGGATTGTGAAC	4.029959	5.79E-05	有
22	181	GCTGAAGGACCCTGAGGAGCTTCGCAACTACATGGAGAGGATC	2.98415	0.004216	有
23	178	TGTTTTCAAACCACTTGCCATCCTGTTAGATTGCCAGTTCTGG	1.89886	0.057651	有
24	164	ATCAAGCAAGTTCTGCTGCTGAAGGATAAGACACAGATGACCTG	-0.84556	0.373466	有
25	142	TAAGTCGGGTGGCAATTGTCAGGGTGTGGGAATTTCTTTTCTAC	3.39272	0.000659	有
26	140	AGTTCTGACCCAACCACAGAGGATGCTGACATCATTTGTATTATGTTT	-2.26722	0.020347	有
27	135	CCATGGCAGTGGGAAAAATGTAGGAGACTGTTTGGAAATTGATTTT	-1.91339	0.060183	有

【 0 0 6 0 】

【表 2】

28	118	AGGACCTGAAGGGTGACATCCAGGAGGGGCCTCTGAAATTC	1.467298	0.152499	有	
29	117	GGACTCATCTTCCCTCCTGGTGATTCCGCAGTGAGAGAGT	2.349832	0.026905	有	
30	117	CTCCCTGAAAAACCATTCCCTGCTGAAACTGCTGTAGAAATTGTGAAG	3.856822	3.49E-05	有	
31	114	CCCTGAAAAGTGAGCAGCAACGTAAAAACGTATGTGAAGCCTCT	2.97408	0.002585	有	
32	109	CACCTGCTCTAGGGACGATTCGTTTGAAGAGAGTAAGATGCATTAA	-3.92943	0.000275	有	
33	103	CCACCTGTTCTCAATTTGCAAGAATTAGAGGCGTATAGAGACAAATTG	1.583424	0.10573	有	
34	102	TGTTTGGTCGTAATGTCTGCATGATTTTGTGCACATTTATTAAGTATCG	-3.38591	0.000419	有	
35	102	GBCTGGGTGTTTTCAAATGTCAGCTTAAAATTGGTAATTGAATGGAA	-2.34381	0.021355	有	
36	99	GCAAGCATAAGGGAAAATGTCACGTAAACTAGATCAGGGAACAAAATC	1.603483	0.122455	有	10
37	92	GCCAAGACCACCCAGGAAACCATCGACAAGACTGCTAACCAG	-2.61622	0.013024	有	
38	81	TTTGCAAAGAATCCAGGACAAAAGGATTAGATCTAGAAATGGCCATT	-0.1063	0.915443	有	
39	77	GGTGACTTTTGAATTCAGGGAAGATTTGGGCATTTAAATGAAAGA	-2.49834	0.012822	有	
40	74	ATTATGCCACCTTGGATGGAGCCAAGGATATCGAAGGCTTGTCT	-0.69455	0.484731	有	
41	71	TTGATTTGGGACTTGGGAGACCTCTCTTCTGTAAGCAACTCAATAAA	3.539216	0.00045	有	
42	67	AATCCTGTGGTGAATGGTGGTGTACTTTAAGCTGTCACCATGTTA	1.171006	0.231962	有	
43	64	CTTGAGTCCCACCCAAAACCTCTAGTAGGGTTTTAATAACGCTCAC	3.521289	0.000326	有	
44	64	TCTTTCAGAAAGTGAAGAGGGGGCTAGAAGGACTCTGAGAAGTTGGTA	3.320872	0.001015	有	
45	60	GCAGAGAGTGCCGATCTTACTCAAGTACCTAGACTCAGATACAGAGAAGG	2.934405	0.002862	有	
46	60	CGGAACTCTTGTGCGTAAGGAAAAGTAAGGAAAACGATTCCTTCTAA	2.370805	0.019885	有	
47	59	AATGTGGGAAGGTGGGGGTTATGGAGGAGATAAAGCAAACTTCT	3.829441	0.00022	有	
48	59	CCCCATCTTGTGGTAACTTGGCTGCTTCTGCACTTCATATCCATATTT	1.175431	0.263596	有	
49	54	TTATCCATTCGTTGTGGACCCACAGATTGCATCTTAAATTCATAAT	1.210782	0.239402	有	
50	52	AGGTCCCTCAGATGGGAATTGCACAGTAGGATGTGGAACCTGTTT	-1.45819	0.141876	有	20
51	51	TGTAACATTCCTGAAGCTGTTCCCACTCCAGATGGTTTTATCAATA	1.852187	0.06511	有	
52	48	TTTTAACTTCTATATGGGACCCGAATTAGACACTGCTGAATCCTGTAC	3.449622	0.000296	有	
53	46	AGAAGAGCACAAAGCAAGGCCATTGCAACAGGCATTTAAAAATTATT	-4.08976	7.22E-05	有	
54	46	CTCAATGCATCCATCTTGGGCTGATCATGCCACAGATCTCATTCT	3.285094	0.001303	有	
55	45	AATTCCTCGGGAAAGGTGAACCTGAACAACCCAAGTCTCTCTCT	-4.17274	3.78E-05	有	
56	45	GCTCTGTTACAGCTCTGACCACGAAAACTGAAGCCTCAGTACTTG	-3.86847	0.000157	有	
57	44	CCACTTGACAGTGGAGCAGAGGGGTTACCCAGATTTCAACCTCAT	1.389785	0.187738	有	
58	44	TTCTGGGATTTCTCTAGAGGCTGGCAAGAACCAGTTGTTTTGTCTTG	0.718713	0.475575	有	

【 0 0 6 1 】

【表 3】

39	42	TGAGCACCTTTTAAACCTGCTGCACAATAATTGAGGAAATAGACTCTTT	1.253049	0.204046		
30	42	CGTGTCAACAATGGTAAAGGGGATGTATGGCATTGAGAATGAAGTC	-4.22412	0.000197	有	
31	41	TCAAAGTTCOCCCAAGAAGAACTGGAAAATGCCAGCCTAGTGTTTAC	-1.17228	0.26041	有	
32	37	ATGTTACCTGGCAATCAGCTGAGTTGAGACTTTGGAATAAGACT	3.369271	0.000783		
33	37	TTTAATTATGGTGAGCGTTTCCGTTTGGGTACAAGGAATATGAGAGAT	-1.57416	0.125115		
34	34	TGAGAGCATGCCAAAATTTGCTAAGTCTTACAAAGATCAAGGGCT	3.791155	0.000213	有	
35	33	TCCCTACCAAGTAAAAATTGATGTGTGTTAAGAGGGTACAGAATTATCAAC	2.285228	0.014636		
36	33	GBTGATTTGCTGCTGGCTTTCTATCATTTTTATGTTTTAATGCAAAG	-3.31128	0.001117	有	
37	33	GGCCAAGAATATTGCAAAATACATGAAGCTTCATGCACCTAAAGAAGTA	-0.5838	0.561233		10
38	32	CTCCTCAGGACCCTCTGGGTACACATCTTTAGGGTCAGTGAAC	-3.24137	0.000608	有	
39	32	GGCAACAGGAAACAGGTTTTGCAAGTTCAGGTTCACTCCCTATAT	3.728802	4.82E-05		
40	30	TGAAAAAGTTATCTCTGGGTATTGCATAAAGGCTTCATCTTATAAAGTGA	-1.39464	0.192516		
41	29	CCACGAGGATGGCCACAAGCAGATCTACTACTCGGACAAGT	0.902775	0.379221		
42	28	TCTGCTCTCCATCCAGAGCCTTCTAGGAGAACCCAACATTGATAGT	4.556078	1.33E-05		
43	27	GTGAGGAGCGAAGAGCCCTCTGCTCTAGGATTTGGGTTGAAAA	1.185538	0.24293		
44	27	TGGCACTTTGTTTGTGTTGTTGAAAAAGTCACATTGCCATTAAC	0.806045	0.423301	有	
45	26	GGCTGGATCAAGGGCAAAAAGTGGTCATTAAGTCATCTGACATTAA	2.219451	0.029617		
46	26	GAGAGAAAATTTAGGTGGTTGAAATGATTAATGGAAAGAGATTTATTTTCA	-2.55709	0.010361		
47	26	TCTTTGAGAAACAGCGTGGATTTTACTTATCTGTATTACAGAGCCT	1.067981	0.294969	有	
48	25	ATAGAGCACCCAGCCCCACCCCTGTAAATGGAATTTACCAGATG	1.605946	0.10608	有	
49	24	TCACAGGATCCTGAGCTGCACCTACCTGTGAGAGTCTTCAAACCTTT	0.054807	0.956306		
30	24	GCTGAAGTGTTCATAAGATAACAATAGGCTTGAATCTCCAATTCAAATGAAT	0.213151	0.831225		
31	24	TTGTGACATTGTGACAAGCTCCATGTCTTTAAATCAGTCACTCTG	-5.23137	3.27E-07	有	20
32	24	TGGAACCTCTTGACCAAGATTAGGATTAATTTGTTTTGAAGTTTTTTG	0.949064	0.344716		
33	22	CATTCAATCCGGACCATTTTCTGGAGAATGGACAGTTTAAAGAAAAGG	0.784157	0.439473		
34	22	TGCTGAACCTACAGTTAGACAATCCATGGTTTAAATGCACATGAAATTACC	-0.14282	0.887169		
35	22	ACGATAACCTGGCAGTGGAAGGAAAGAAGCATGGTCTACTTTAGGT	-2.47268	0.010003		
36	21	CTGCTTGATTTTTGCCTCTTCCAGTCTTCCCTGACACTTAATTACCA	-4.14257	2.03E-05		
37	21	TGAACATCACAATGGCAAAGAAGAAATATACTGTACAAAAGTGCAGGAA	-1.72036	0.093687		
38	21	TTTGCATGTCCAAATTGCTTCCCTCTTTTAGCAGAAAGGAGGAGT	-1.91298	0.083553	有	
39	21	TCCAGGCATTTTAGAATATGCAATTGTGATTTAAATGCAACTTTGT	-2.15046	0.037021		

【 0 0 6 2 】

【表 4】

30	21	GAGACAGGGAAACACAAGGGGAGTAGAAGGCTTCAGTAGAAGATTC	1.665338	0.12772	
31	20	GTGGTCATCATCAAGGCATGCCAGGATACCTTCCTGGTGCTAT	-1.18886	0.2414	
32	20	CCTGGTAAGTATGCAGCACATTGCTTATATCCTGGGTATGCATTATTT	3.422692	0.000874	
33	20	TCAATGAGTAACAGGAAAATTTAAAAATACAGATAGATATATGCTCTGCATG	3.192274	0.001222	
34	20	TGCCAGTTTGTCAAGAAGCCACTTACAAGGAAGTAAGCAAAATG	-0.54687	0.573053	
35	19	GAAACGGGGCCATATAGTTTGGTTATGACATCAATATTTACCTAGGTG	4.220137	3.53E-05	
36	18	ATTTCCATGCCGTCTACAGGGATGACCTGAAGAAATTGCTAGAGAC	-1.16115	0.230302	
37	18	TGCATAATTCAATTGTTGCCAAGGAATAAAGTGAAGAAACAGCACCTT	-1.41926	0.138831	
38	18	CTGCTCTGTGCCCTTCTGAGCCACAATAAAGGCTGAGCTCTTA	2.079621	0.016021	
39	18	CCTCCGGAAGCTGTGCGACTTCATGACAAGCATTGTTGTAAGTAG	1.81169	0.070381	有
00	18	CATAGCTCTTTGGCTCGTGAACCTAATTGTAACCTTCAGGTATTTTTG	1.766145	0.074049	
01	17	CCAGTTATGCAGCACCTGGCTAAGAATGTAGTCATGGTAAATCAAGG	3.991931	0.000108	
02	17	GGCAGGCACITTAATACCAAAGTGAACATGCTCAACTGTATACAACCTCA	1.692111	0.097387	有
03	16	GCCACACTGAAAAGGAAAATGGGAATTTATAACCCAGTGAGTTCAGC	0.852486	0.40553	
04	16	CTGGGCATACAACCCTCTGCTTTCACATCTCTGAGCTATATCCTCA	-3.7346	0.000251	
05	16	AGCAGACAAAAAGCCAGTTTTGAGAACATCAATTCCTAATGAAGAAG	-3.23615	0.002278	有
06	15	TGCTTCATTGTGCCCTTTTTCTTATTGGTTTGAAGCTCTTGATTTTTG	3.311718	0.001031	
07	15	GATGTGGCAGAATCCACACAGCTTATCAACCAACACAGCTAATTT	1.389693	0.166098	
08	15	GGGGGAGTAAAAAATTGAATTTTAAACAAAAGATCTTAGGGGAATGTGATT	-3.0524	0.002691	
09	14	CCTTGATGCTGTCTGTACAGGGTTCATATTTGTAGCGAAAGTCGTTT	-2.22662	0.020629	
10	14	CATCCAGGACACTGGGAGCACATAGAGATTCAACCCATGTTTGTT	1.067035	0.287699	
11	14	CGGAAGAAGTGAAGCACTCTGTTCTCCAAACCTATCAGAAATTTGTGG	3.742475	0.000285	
12	13	ACCAGTAGGGGCTTATAATAAAGGACTGTAATCTTATTTAGGAAGTTGACTT	-4.16547	2.91E-05	20
13	13	CACTTTCAGATAAGAGGTGTTTGTGGGATGGAAGAACTACCTGGC	1.85552	0.076369	
14	13	GAAAGCCTTCTCGGGTTCAAAGCTGGATTTTGAAGTGAAGAAGAT	3.344591	0.000724	
15	12	TGAAAATTGGTAGATCAGAGTTGAGCTGATTGGAGGACCAAATTAATA	-2.61178	0.007099	
16	12	TTCCATTGTAATTGCTATCGCCATCACAGCTGAAGTGTGAGAT	3.126618	0.001574	
17	12	GACACAGATGACTCTTTGGTGTGGTCTTTTGTCTGCAGTGAATGTT	1.891374	0.056055	
18	11	TCAAGAAAGGGATTCCGAGGCCAATAAGCCCTCCTTTCTCTTG	-1.24114	0.198279	
19	10	TCCAGATAACTTTAGGCACTGCTGGAGTGTGGATAAATTTCTGGT	1.813774	0.066896	
20	10	AATCCTCACATCGTGCCAAACTTAGTCTGGTTACTAAGCCTAAAAACA	2.403548	0.016851	

【 0 0 6 3 】

【表 5】

21	10	ATTGAGGATTTGTGGGCAGCCAGAGGGAGTCTGACTGAAGTTTAC	-2.29581	0.02535
22	9	TGCCAGAATCTAGTGGGATGGAAGTTTTGCTACATGTTATCCACC	-0.34425	0.731248
23	9	TTCTTCATGTAACCTCCCTGAAAAATCTAAGTGTTCATAAATTTGAGAG	2.695661	0.00798
24	9	CTCTGGTGTTCGCCAGACAATAAACTTACACTGGAAGCTTTGAT	-3.03684	0.002403
25	9	TTGAACACAGGCTTTGTCTGAATGATGTTCTTTTATCTCTTGAACACAA	-3.59572	0.000682
26	9	GAAGCCAAAGTACCCGCACTGCGAGGAGAAGATGGTTATCATCAC	1.937332	0.052778
27	9	AGCTGGCGCCAGCTTCTCTCCTGGATCCAGTAAGAGTTTCG	-0.59083	0.544181
28	9	CCTGAAGGAAACCACTGGCTTGATATTTCTGTGACTCGTGTTGC	-0.58376	0.559447
29	8	CCACCTTTCCTCCAGCAAGCATCTGGCCAATCCTATTCTTC	-2.29915	0.014561
30	8	GTGAGGTACAGGCGGAAGTTGGAATCAGTTTTAGGATTCTGTCTC	4.941946	1.50E-05
31	8	CTTGGCCTGAAGAGGTGCAGAAAATACAGACCAAGTTGACCAAG	-1.962	0.049061
32	8	ACATAGTGACATGCACACGGGAAAGCCTTAAAAATATCCTTGATGTAC	-3.61201	0.000318
33	8	TAATGCAAGCCCTGACTGGGTGGAAGCTGAAGTCTTGCTGTTTTA	2.396608	0.012659
34	8	TCCTTTTTGGGGAAATCTGAGCCTAGCTCAGAAAAACATAAAGCAC	-3.97531	0.00059
35	7	GGCCCTTCCTGATGATCATTGTCCCTACAGACACCCAGAACATCTT	-2.36278	0.018244
36	7	GGAGCTGGGAGCTGTGTTAAGTCAAAGTAGAAACCCTCCAGTGTT	-4.42673	3.56E-06
37	7	GCAGAAAAGAAGACGAGAATGCAACCATACCTAGATGGACTTTCCAC	2.728168	0.006056
38	7	AACAAGTGGGATTTTCTGGGCCAGCAAGTCTTCCAAACTGTATATG	-0.21615	0.829698
39	7	GCTGTGTGGGTCAACAAGGTCTACATTACAAAAGACAGAATTCAGG	-2.47087	0.013094
40	7	TGCACAGATCTGCTTGATCAATCCCTTGAATAGGGAAGTAACATTTG	3.051955	0.001684
41	7	CCCTATGAGTGGAAAGGTCATTTTGAAGTCAAGTGGAGTAAGCTTTA	-1.23786	0.21761
42	7	AGAGCTTCTGAGGCGCTGCTTTGTCAAAGGAAGTCTCTAGGTTTC	1.688918	0.097307
43	6	TGTGAAAACAAGCTTCAAAGCCATATGGACACTGTGACAATGACTA	3.369288	0.000926
44	6	GCATCTCCCTGACCTTCTCCAGGGACAGAAGCAGGAGTAAGTTTC	-4.1766	1.77E-05
45	6	CGCCAGCTACAATCCCATGGTGCTCATTCAAAGACCCGACAC	-1.32939	0.195817
46	6	GATCCGGGATGGGAGACCCCACTTTAGAAAGGGTCGTCCTC	2.803856	0.002763
47	6	TGGATTGAGAAAACCTATATCCATTCTTTATATCAATGTATAGTTTTAGTCTCCT	2.448797	0.019091
48	6	GGTGAATGCCCTCAACTTCTCAGTGAATTACAGTGAAGACTTTGTTGA	1.886404	0.063745
49	6	ATACGGCGAGGTAGAGTTGGCCATATTTAGAGACTTAGATTGACGT	4.337458	1.70E-05
50	6	GCTCGTTTGGTGCCTCTCGTGGGAGACAATCAGAGAACAACATA	1.225008	0.19426
51	6	GCCTTCCATCTGGCATTCCCGCTCATTTATATGACTTGCTGAG	2.968053	0.002255

10

20

【 0 0 6 4 】

30

【表 6】

52	6	TCCGGTGACCAGGTGCTACAAGGACAAGGTTCCAGAAATTGTACAG	2.304752	0.025941
53	5	GCAGAGGTTCTTTTAAAGGGCCAGAAAACTCTGGGAAATAAGAGAG	-3.24369	0.000993
54	5	TTTTCCCCACCCGAGATGAAGGATACGCTGTATTTTTGCCTAAT	2.24033	0.011993
55	5	ACTGCAGGATACACTCCCCTCCTGCTACCTAGGCAGGCGTGAG	-0.88751	0.353721
56	5	GTTTTAACCCGAGTCACCCAGCTGGTCTCATACATAGACAGCACTT	2.232118	0.02553
57	5	GACACTTGTTTAGACGATTGGCCATTCTAAAGTTGGTGAGTTTGTCAA	1.647226	0.102927
58	5	TCACCAAAGCTGTATGACTGGATGTTCTGGTTACCTGGTTTACAAAAT	2.938772	0.002383
59	5	CATAAGCTGGTATCAGTGGTTCGGGGAAATAGTTCATTCTATGACTC	-3.01637	0.003841
60	5	TTGGCGATCATTTCCCAAGATTGGTTTCCCTTGAGTTTTTGTAAA	-4.22349	5.18E-05
61	5	CCTAGTTTGATGCCCTTATGTCCCGGAGGGGTTACAAAAGTGCT	-0.55135	0.58089
62	5	TTTTCGAAGGATAATTTTGGAGGCNAGAAAAATGGACGGGG	-2.37921	0.016098
63	5	TGTTCCGACTAGTTGGCTCTGAGATACTAATAGGTGTGTGAGGCTC	-2.17442	0.018122
64	5	CACCTGGACCCCTGCATTGGAAGTGGAGGCAGGGAACAT	-2.2306	0.022824
65	5	TGGAAGGATGGAAGAAACGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACAC	-1.79624	0.085727
66	5	GCATTACTTTGAATTTAATGTTGCGCTTGTGCACTGTGTTAATATTGTTT	-2.46291	0.016207
67	5	GGTGATGGGGACCGTCTTTCTTTTACTGACACATGACCAATCATA	-2.30099	0.020722
68	5	TGGGCAAAACCATTGAATTTACATGGGTGGTAAATGGAGTTAAA	-2.99545	0.002532
69	5	AACCAGCCTTCAGAGCGTCTCTGTCTGCTTCTAACGTCACTT	0.01801	0.987237
70	5	TGCCACATTTGACTGAATTGAGCTGCTATTTGTACATTTAAAGCAGC	-0.67643	0.497085
71	4	TATATGGTTTTCCAAAGGGTGCCCTATGATCCATTGTCCCACT	-1.76935	0.075774
72	4	TTTAAGGACTGATCATTGGCTCTGAGGACACTTCAACTAGTTAGCCTTCT	0.11679	0.907115
73	4	CCCTCATCAAAGTCCTCGGTGTTTTTAAATTATCAGAACTGCC	-2.8669	0.003674
74	4	CAAATGGTTACCTTGTTATTTAACCCATTTGTCTCTACTTTTCCCTGTACTT	3.411476	0.000689
75	4	GCCAGCTGCATGCAGGAGCGTGCCATCCAGACAGACTTC	-2.24724	0.024396
76	4	CCTCCAGGCAGGTCTTGGGGCTCCTATGTAAGCTGTGTTAAGC	-1.38308	0.168369
77	4	GGCTGGCAACTTAGAGGTGGGGAGCAGAGAATTCCTTATCCAAC	-2.0969	0.052047
78	4	GATTCATCCAGCCTCCAGCTCTGTTATTTAAAGCAAGAACAACCTTCTG	4.423002	2.51E-05
79	4	CCTAAAGCAAGCCTGAATTTGGCTATGCAGTACATTGTATTCTGTTG	-4.28624	2.42E-05
80	4	CGGGCTTTTAGCAGCATGTACCCAAAGTGTCTGATTCTTCAACT	-0.69941	0.485384
81	4	CTAAGGGATGGGGCAGTCTCTGCCAAACATAAAGAGAACTCTGG	0.451498	0.654537
82	4	AAATCCAAACTCTCAATTACGCCATGGTAATTCAGTCACTAAAAATATGT	-3.42088	0.000689

10

20

【 0 0 6 5 】

30

【表 7】

83	4	GCAGGAACCGCGAGATGETCTAGAGTCAGCTTACATCCCTGA	-2.37983	0.026005
84	4	TGTTCCACTGAGCTCCTGTTGCTTACCATGAAGTCAACAGTTATCA	0.232032	0.818608
85	4	CTCAATGTAACCTCAGGGGCCAGTTTTAGCATTTGAAATGGTTCT	-1.76115	0.095531
86	4	TCTGACCAGTTACAGCCDCAAAGATGCAGTGATAACTGTGATGTATG	-1.37322	0.133757
87	4	GCATCCAGAACAGCCCTGCTTGGACACAGCTCGGTGGAAGAT	-2.12389	0.039832
88	3	TTACAAATGACTCAGCCCACGTGCCACTCAATACAAATGTTCTGCTAT	2.395553	0.016443
89	3	ACAGCCCTGCTCCCAAGTACAAATAGAGTGACCCGTAATACTAGG	-3.50224	0.000637
90	3	CCAGATACTACTCGGCCTGCGACACTACATCAACCTCATCACC	-2.27536	0.031464
91	3	AATAAGCAGGATGTTGGCCACCAGGTGCCTTTCAAATTTAGAAA	-1.68039	0.069608
92	3	GGAATTTGATTCTTCCAGAATGACCTTCTATTTATGTAAGTGGCTTTCA	3.817877	0.000172
93	3	CAAGGTGTAGCAAGTGTACCCACACAGATAGCATTCAACAAAAGCTG	-2.7616	0.00587
94	3	CACAGAGTCTGAAAAGCGGGTCTCCGTCTACCAGAAGGTGACCTCC	-0.46636	0.642653
95	3	TGAGGACTCAGAAGTTCAAGCTAAATATTGTTTACATTTTCTGGTACTCTG	2.004388	0.050059
96	3	TGGAATGGTAAAAGAGAGATGCCGTGTTTTGAAAGTAAGATGATGAAA	1.286332	0.218274
97	3	CAGGGGTTGAGAGCTTTCTGCCTTAGCCTACCATGTGAAACTCTA	0.396152	0.693055
98	3	CACAGATGAGAACCACGCCTAGCCAAAATCACTTTTCTGTTTGC	0.932001	0.350214
99	3	AGGCATGGGAGTCATTGTCCACATCATCGAGAAGGACAAAATC	1.048222	0.289167
00	3	AACGGGATCCTCTGTGGTCCGACACTGACCTAGACGGCTT	1.930889	0.05573
01	3	TGTGTGGCTTCTGCAAGGTACCTTCATCTCTGAGTTACCTGACTC	-2.12276	0.038612
02	3	GCTGTCCCTCAAAGCATCCAGTGAACACTGGAAGAGGCTTCTAGAA	2.647942	0.012248
03	3	CCCTTTCTTTGATGGTGCCTTGCAGGTTTTCTAGGTAGAAATTATTTCA	1.507454	0.122396
04	3	AAATGTACCAATCAGCATGCTGTGTCTAGCTCAAGAAGTCAAGCTCC	-0.57666	0.565438
05	3	CGTCACCCCAAAAGTTCCCTCCATATCCCTTTGCAGTCAGTTC	0.760999	0.450353
06	3	CATGACCCGATGGTATACCTGGGCCTCTCAGACTACTTCTTCAACA	-2.48108	0.008418
07	3	GCATTAGTATGACAGTAGGGGGGCTGTTAGAATTGCTGCTATACTGGT	-1.3436	0.203689
08	3	CCAGGATAAAGCTTCCGGGAAAACAGCTATTATATCAGCTTTTCTGA	2.988968	0.005851
09	3	TTCTGCTACACATGCCCTGAATGAATTGCTAAATTTCAAAGGAAAT	0.810494	0.410805
10	2	TGGCCTGTGGTTATCTTGGAAATTTGGTGAATTTATGCTAGAAAGCTTT	-2.73832	0.007474
11	2	GGGAGAAAAGCTAATGTTTTCCACAAGACTGAACAACGTGTATTTACAG	-3.19477	0.000546
12	2	GTGCTGGGTGCATATCATCCAGGATAATATCTGCCCAACTCCAT	-1.23963	0.215301
13	2	CCCAGGATTATGTTTGTGGACCCATCTCTGACAGTTAGAGCCGATAT	-1.35681	0.189959

10

20

【 0 0 6 6 】

30

【表 8】

14	2	GCTGGACAGGAGCACTTTATCTGAAGACAAACTCATTTAATCATCTTTG	1.270148	0.203802
15	2	AGTTGCAAAAATGGCTCCATCGGTAACCAAGCTTCAGAATGTTATG	2.416151	0.015977
16	2	TCATCGGAGTAGATTCCGGGTGCCTTTACTCCACTGTGACCTCATA	-1.28409	0.192946
17	2	GTGTGCTCAGGCAATTATTTTGCTAAGAATGTGAATTCAAGTGCAG	2.642687	0.006795
18	2	TGGGAAAGTATCAGGAGTGCCATGATTCCAATGTTTTCTTCTTTA	2.157816	0.025861
19	2	AGACGGCCGACAGCATGTCAGAACAAAGTAAGGATCTGAGCGAC	-3.49114	0.000292
20	2	CCAGCATTAAAGTACTGTATATCGCCCTGACTTGGATAGGCTGGCTAAC	0.144643	0.885072
21	2	AGGCAAGGAGGAGGGGAATTTAAACCATCTTATTTGAACTGAGAG	1.851673	0.064779
22	2	TGGTGCTCTATGCTCAATGATGGTCTTACACATTCCTCTAGGGAAAG	3.451224	0.001721
23	2	CCCTTTCTATTCTGAACAACCTGTCTCCATTTTTCAAGTGTGAGAGATAAGG	2.35354	0.015021
24	2	CAGTCGAGACCCAGATCCACTGAACATCTGTGTCTTTATTTTGTCTG	1.792116	0.072731
25	2	GCAGACATCCTGTGAAGCAGGACCTGCTGAAGAGGAGACTTTCTAT	0.353515	0.72344
26	2	TGAGAAAGCTCAAGATTCGAAGGCCTATTCAAAACTACTGAAGGAAA	2.674193	0.01623
27	2	CAATCCGAGTCCCGGATGAGGGAACATTCTGCAGTATAAAGGG	-1.59105	0.109934
28	2	CAGCACCAAGTCTACGGGTGCCAGATCAGTAGGGCCTGTGATT	2.448186	0.011472
29	2	AGCAACAGCAAATCAGCACCCTGATAGATGTCTATTCTTGTGGA	1.239036	0.208803
30	2	CTTGCCCATCTAGCACTTTGGAAATCAGTATTTAAATGCCAAATAATC	1.984819	0.047707
31	2	TTTTCAGGTTTATTTCTTTTAGCAGGTGTAGTTAAACGACCTCCACTGAAC	0.755574	0.449369
32	2	TGCCAAAAATTAAGTGCAATATTGTATTTTTAAGAACAAATTTAAATAGAA	-0.31259	0.755488
33	2	TTCTGAGGAGGAGAGAGTGAGGGTTTTGCTATTGACTGACTTGAAC	-0.56128	0.582467
34	2	CTGGGGGCGCAACCACCCCTTCTTAGGTTGATGTGCTT	-2.07743	0.039244
35	2	ACGCTGTGCGTTTGTGAGAATGAAGTATACAAGTCAATGTTTTTCCC	-0.98359	0.325597
36	2	TGTTGAATACTTGGCCCCATGAGCCATGCCTTTCTGTATAGTACAC	-1.61334	0.089292
37	2	GCTATACCTCATTACAGCTCCTTGTGAGTGTGTGACAGGAAATAAG	0.661879	0.50136
38	2	ACACTGTTGGACCTGACCCACACTGAATGTAGTCTTTCAGTACGAGA	1.423365	0.138012
39	1	TCCTGCAAGTAAGAATGTTTTCACACTGAGCTATTGATTTAACCAAGC	0.61193	0.55105
40	1	GGGAGGTCAGACACGCTTCATTATCTCCGCTCTTTTATGGTTT	0.118933	0.905287
41	1	TGGTTGTGCTTGCTTTCTTTTTAGAAAGTTCTAGAAAATAGGAAAACG	-0.29803	0.763403
42	1	GCTCCGGCAGCACCTTTATCTATGGTTATGTGGATGCAGCATATAAG	0.36714	0.713965
43	1	AACCTCCCAGAGTTAGCCAGCCTTTCAGAGTTGAAGTCACAGCT	3.427416	0.000767
44	1	ATGTGCACCTTTGAGGCTACGGGCTTCTCCAAAGACTTAGGAATCT	-2.69533	0.003868

10

20

【 0 0 6 7 】

【表 9】

45	1	ATGTGGCCATTACCGTCATTGGCCTGTGAAGCATTGGACATTTATA	1.572459	0.10227	
46	1	GGCCTGTGAAAACAGAGGCTTTTGCATTGTCTCTTGACATCAGAAGT	-1.55078	0.126022	
47	1	AGCCAAGGCAGGGTGGACAGTGTGAGAGAGCTAGTGAAGCTGT	-4.58277	3.08E-05	
48	1	ACATGGTTGTGCAGGGCCATGTGTGAAGACAGCATGAGTCTTA	-1.37266	0.163501	
49	1	TGATGTTGGTTGT AATGGTTGGTTTAGGATGAACATTTTAAGGAT	-3.34973	0.000692	
50	1	GTCCAAAGGTGGAATACAACCAGAGGTCTCATCTCTGAACTTTCTT	-0.7171	0.473628	
51	1	GGCGTCTACAGAGACCAGCCATATGGCAGATACTGATTGTAAGTCT	3.48851	0.000532	
52	1	TGTTTGCCTCAAACGCTGTGTTTAAACAACGTTAAACTCTTAGCCT	0.57799	0.564212	
53	1	TGCCAAAATAAACTCACATGAGCACATGACAGTCTGAGCTCTATAATCA	0.417675	0.679323	10
54	1	GTGCATGGACGACTGAACACAATCAACTGTGAGGAAGGAGATAAACT	-0.49188	0.625569	
55	1	CCTTGCCACGGTTCTAGAGCAGCGTAGACAGCTGGTAAACTGAAGA	-1.4853	0.140016	
56	1	CATCGAGAGCGCACACAAGACGCCACTGTAAAAGGATCACAGAT	-2.23853	0.021028	
57	1	GGAGTTCCAGGAGATTCAACCAGGATGTTTCTACACCTGTGGGTTA	-2.6129	0.009463	
58	1	CAGCCACCATCAAAGCCATTTCGTAGGAAATTCAGACCAGAAAAC	-2.13238	0.039635	
59	1	TTTGAAGGCATTGAAGCTTGCACCTTTTCATGTACAGCATTAAAA	2.984702	0.00337	
60	1	GACCAGGTCTATCAGCCGCTCCGAGATCGAGATGATGCTCAGTAC	0.012992	0.989634	
61	1	ATCCAACACAGCCAGAACCOCGCGATTCTACCACAAGTGACCATC	-2.02092	0.048641	
62	1	TTGCCTGGAGAAAAGAGAAGAAAATTTTTTAAAAAGCTAGTTTATTAGC	-0.31184	0.755184	
63	1	TCACCCCTGACACAACATTTTCAGAATTCAGACGATACTGTGATAA	0.561867	0.577848	
64	1	ACGGAACAGACCCCTGCTTTCGAATTTACATGTTTCATGATGTGC	-3.07043	0.001314	
65	1	CTTCGCCCTCCCTTGTTTTATTTTTATGAAGTTAGTGCGGG	-0.71287	0.476918	
66	1	ACCAACCAATACTCAGGAGAACCCTGCCTATGAGGAATATATAAGACCA	-3.58227	0.000386	
67	1	TGTTTGGAAAATCACATCATGCCTAGAATCTGAAATTGAATTAGCAA	1.822415	0.059401	20
68	1	GCCAAGAGAATCAGAGAAAAGATGCTGCATTTTATAATCAAAGCCCAAAC	3.532588	0.000225	
69	1	CGTTACAGTATTCTGATTATATTACTGACACAGTCAAATGATTAAGTACAA	2.897694	0.007766	
70	1	TTGTGCCTGTGTGTTACCATGCTAAGAATGTCTTTGTTTAAAGGGAA	-1.30273	0.21043	
71	1	GCAACAGCAAGCTGTAGAGCGGGCCAATGATAAATCACATTGAATC	2.236428	0.023294	
72	1	AAGCCAAAGGAACTGGAGGCACTGATTTAATGAATTCCTGAAGA	0.742825	0.459843	
73	1	TTTCCTCTTGATCGGGAACCTCCTGCTTCTCCTTGCCCTCGAAAT	-3.54509	0.000263	
74	1	CCAGGTACAATGGCAGAGCCTTCCATACCTGTACTCACAACCTAGC	-0.50817	0.617396	
75	1	TGTCCTTCTTGCATCGATGATCCAACAGCAACACCATTTTAAATTA	2.61129	0.008828	

【 0 0 6 8 】

【表 1 0】

76	1	TGTCCCTTTGATACTTGTGCTCTGCTGAGAATGTACAGTTTGCATTAA	4.051892	5.82E-05
77	1	GAGAGGCAGCATTGCACAGTGAAGAATTCTGGATATCTCAGGAG	0.118343	0.905829
78	1	TTGGATGAGATTAGGAGATCAGAGGCTGGACCTTCTCTTGATAATGC	3.212168	0.003088
79	1	AATTGTTGACATTCATGTCTCTGAGTTACAAAAGTGCTAATTCACACTCATGT	1.92036	0.050161
80	1	GGGAAATTCAGCAGTGTTCCTCAACCAGTCACATAGAACTCTG	-0.78853	0.427972
81	1	CTGTCCAGCCGCATGGAGGGCATGGCTTCCTACAC	2.265809	0.038306
82	1	TGTC AATCTGTCTCGGCTGCCCTTCTCATTGTTGATGGGAC	2.656332	0.009243
83	1	GGAGACTTTCACAAGTGGTTCCATGGAGATAGAATGAAGCATTCTGT	0.674533	0.493893
84	1	AGTAGTTTCTCCAAGTACTTTTGTGCTATCAATGAGTTCTTCTCAAAAAAT	-2.07479	0.048611
85	1	TTTCTTTGCTAAGCCTTGCATGCAAAATTTGAAATTTAACATTGGC	0.55078	0.582445
86	1	ACAAAACGAGTCCAGCGACGAGGAGAGCCTGAGAAAAGAGAGAG	-1.49962	0.131713
87	1	AAATGAGGGCCCGTAACAGAACCAGTGTGTGTATAACGAAAACCAT	-1.4828	0.140027
88	1	TCACCTCAGTCTCTAATTGGCTGTGAGTCAGTCTTTCATTACATAGGGT	1.359493	0.181639
89	1	CGTCCAGCCAAGAGCTCTTCTCATCTGCTACAAGAACATTTGAATCTT	-0.00765	0.993894
90	1	GATTGCAATGATGATGTCCAAGGTAAGCTATTAAGGAGCAGGTTACT	2.290805	0.021577
91	1	CTTGCCAGCAGCAATCATTTCGGGAAGAATCTACAGTTGCTGAT	1.790334	0.066752
92	1	TTCTTTGGGAGAAACCTGTTCAATCCAATCTTCTAATTACAGTGGTT	-2.87514	0.002884
93	1	CAGGACATCATGAGCAGGCAGCAGGGAGAGCAACCAAGAG	2.201609	0.048986
94	1	ACTCGAATCTTTTGCATGATGGGGTAAAGCTTAGCAGAGAATCATG	-4.84228	2.94E-06
95	1	GACGTGAAGTCTCGGGCAAAGCGTTATGAGAACTGGACTTCCT	1.175155	0.244078
96	1	CCTCTGTGTTCACTTCGCCTTGTCTTGAAGTGCAGTATTTTCT	1.150612	0.26183
97	1	TCAGGTGTCATCACTGTTCAAAGGTAAGCACATTTAGAATTTTGTCTT	0.963905	0.33534
98	1	CCCTTACCCCTCTCTGGGCCCATGAATTCCTGGCTTGGTTA	-3.09019	0.003466
99	1	GGGAAAACATCCATGCTGGACTCCTGAAGAAGTTAAATGAACTGGA	0.235534	0.813451
00	1	CTCCACCAGAAAGGCACACTTTCATCTAATTTGGGGTATCACTGAG	-1.26117	0.216194
01	1	TTCTCTCAAAATACTAAACAGAGGTGGTTTTATTGATAAGATTTTGGCTGT	-0.63027	0.53117
02	1	GCATGCTGTTGTACATGATCCTGACAAGAAGAAAATGAAGCTCAAAGT	2.105255	0.032858
03	1	GTTCTCCCTCTGGCCCTGGAGAGAAGGGAGCATTCTTA	0.808842	0.416399
04	1	TCTTGGTGGGTCAAGACTTTCTGATAAATCAGTTAGCACCATGCAT	-0.87476	0.375354
05	1	CTGGAATAATGGAAGAAATGGGGCTTTGGAGAACTAGGATGTTTC	3.031192	0.002176
06	1	GCCACATGGATAGCACAGTTGTCTCAGACAAGATTCCTTCAGATTC	-2.85804	0.004514

10

20

【 0 0 6 9】

30

【表 1 1】

07	1	CGCCTTCCTCTTTTTAAGCTGTTTTATGAAAAAGACCTAGAAGTTCTTG	3.505339	0.000639	
08	1	CTCCAAGCCGATCACCAAGAGTAAATCAGAAGCAAACCTCATC	-3.8295	0.000169	
09	1	AAAGTTGTGTAAGCGCCTGCGTTCTTCTGGGTTTGGCTAGATAG	-0.09465	0.924545	
10	1	ATGGACTGCTTTGCTGGATTGGCACTGAGCAACTTTAGGAAATGTC	-1.62044	0.109697	
11	1	TGATGAAATAACTTGGGGCGTTGAAGAGCTGTTAATTTTAAATGCC	1.824359	0.047857	
12	1	GCTCGCCCTGTTTTTGTAGAATCTCTCATGCTTGACATACCTAC	1.700431	0.04944	
13	1	CATAGGTGCCATCGTGGTTGAGACAAGTGCAAAAATGCTATTAAT	-0.74552	0.463916	
14	1	TGTCTGTGTCAGACGTACAGCCAGACATGTTCTCTATTGGCATTTTT	-1.1303	0.263264	
15	1	CAGGCOCTGGTGCTCAGTCGTACGACCTGTACCTCTCAACTTTTG	0.790296	0.40455	10
16	1	AACTCCTGCGATCAGCTTGTGACTTACAAAACCTTGTAAAAGCTG	2.767204	0.006542	
17	1	TCAGTGAGAGACTCCAGGACTTTGACAAAAGCAAGCATGTCATCTATG	2.720559	0.00547	
18	1	AGCCACTTGCCCCAGTTTCATAACCCCATAGTGTCTAAGAAGATTTT	-0.77978	0.423543	
19	1	CACCAGGGACACATTTCTGTCTTTTGTATCAGTGTCTATACATC	0.388028	0.695317	
20	1	GTCAGCTTGCCAGGTTCAAACCTGGAAGAGAGTTACACTCTCAACTC	-3.24347	0.001134	
21	1	TGATACCCACCGGTCTGACATTCGAAGTAAACAGTATGTAAGTGG	2.310635	0.02143	
22	1	TTGTGCAGATAGTATTTCTGATTGATGTCATCTATCAAGAATTTCAAGAGATT	-0.97212	0.33353	
23	1	AAGACTGTCAGGAAGGGTCGGAGTCTGTAACCAGCATACAGTTT	2.012969	0.039001	
24	1	AATGGGCATAAAGCTTCACACTAGTAACAAAATGGCTTAACTTTATTACA	-0.49582	0.664998	
25	1	TCACATCAGGGCAAATGAAATATCCATCAACTCCAGCATTATCAT	2.686802	0.005053	
26	1	TGCCTTTTGCTTTGGTAACATAACTCTGGGAGTCTTGGTTTAT	-2.86852	0.003159	
27	1	CCACTGGTCATGCTGTGGAATAATTAAGAGAAATCTGAATGCACAT	-2.15718	0.038994	
28	1	CATTCCGCTCAAAGGTCAGTACTGAGACTTTTGCCTCACCTAAAGAGA	1.771767	0.077694	
29	1	TGAGGAAATCAAAGTGTATTACGAAGTTCAAGATCAAAAAGGCTTATAA	1.823273	0.066945	20
30	1	GCTTTGGGGAGGACAAAACCTGTAAGTACAGTCAAGGACAAGAGCTTG	3.022171	0.002277	
31	1	ACGTTCCAGGGCCCAAAGCCAGCTCTTTGTTGAGTTGACTTA	3.641037	0.000299	
32	1	TGGCCAAATTAGATGTGTGCTGAAGACAATCAGTCACTGGGTCTATA	0.779861	0.438386	
33	1	TGGCTTGTCACTTCTGTACACTGACCTTAGGCATGGAGAAAATTAAGT	1.77954	0.072713	
34	1	TCATGAATTTTTAATCCATTGCAACATTATCCAAAGATATCCAG	0.918826	0.36453	
35	1	CCCCGTCTCCCTCCCAACTTATACGACTGATTTCCCTTAGGA	-2.18861	0.026936	
36	1	CCACACAGCCAAGCTGAGACTGTGGCAATGTGTTGAGTCATATACATT	1.12795	0.260712	
37	1	ATTACCTCAGTCCCCGAGGACAGTTTTGAAGGACTTGTTCAGTTAC	1.485189	0.158865	

【0070】

アッセイ方法

本明細書の開示の実施における遺伝子（発現配列）の（増加又は減少した）発現レベルを測定するために、当業界に既知のいずれかの方法を利用することができる。いくつかの実施形態において、本明細書において同定され、開示される遺伝子（プローブ配列）とハイブリダイズするRNAの検出に基づく発現が使用される。これは、当業界に知られる、又は同等であると認められる、いずれかのRNA検出又は増幅+検出方法、例えば制限されることなく、逆転写PCR（RT-PCR）、リアルタイムPCR、リアルタイムRT-PCR、米国特許出願第10/062857（2001年10月25日出願）に開示される方法、ならびに米国仮特許出願第60/298847号（2001年6月15日出願）及び第60/257801号（2000年12月2日出願）、及びRNA安定化又は不安定化配列の存在又は不存在を検出するための方法により、容易に行われる。

【0071】

あるいは、DNA状態の検出に基づく発現を使用することができる。メチル化又は欠失として同定された遺伝子のDNAの検出は、特定の前立腺癌又は前立腺切除後の結果と相関する減少する発現を有する遺伝子のための使用することができる。これは、当業界に既知のPCRに基づく方法、例えば制限されることなくQ-PCRにより、容易に行うことができる。反対に、増幅として同定された遺伝子のDNAの検出は、特定の前立腺癌又は前立腺切除後の結果と相関する増加する発現を有する遺伝子のために使用することができる。これは、当業界に既知のPCRに基づく蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）及び染色体in situハイブリダイゼーション（CISH）法により、容易に行うことができる。

【0072】

10

20

30

40

50

タンパク質レベル又は活性の存在、増加又は減少の検出に基づく発現もまた使用できる。検出は、当業界に知られている、あるいはタンパク質の検出に相当であると認識されている、免疫組織化学（IHC）に基づく方法、血液に基づく方法（特に分泌タンパク質）、抗体（タンパク質に対する自己抗体を含む）に基づく方法、剥脱細胞（癌由来）に基づく方法、質量分析に基づく方法、及びイメージ（標識リガンドの使用を含む）に基づく方法により行うことができる。抗体及びイメージに基づく方法は、癌細胞の起源が知られていない場合、非侵襲的手順（例えば洗浄又は針吸引）により得られた細胞の使用によって癌の決定後に腫瘍の位置を特定するために有用である。標識抗体又はリガンドは、患者内の癌の位置を特定するために使用できる。

【0073】

発現を決定するための核酸に基づくアッセイを使用する1実施形態は、固形支持体、例えば制限されることなく、当業界に既知のアレイ又はビーズとしての固形基質又はビーズに基づく技術における、本明細書においてポリヌクレオチドとして同定された遺伝子の1又は複数の配列の固定化によるものである。いくつかの実施形態において、該アッセイは、Illuminaから入手可能なDASL（cDNA媒介アニーリング、選択、伸張及びライゲーション）アッセイである。あるいは、当業界に既知の溶液に基づく発現アッセイもまた使用できる。

【0074】

固定化ポリヌクレオチドプローブは、該ポリヌクレオチドが遺伝子（又は発現配列）に対応するDNA又はRNAに対してハイブリダイズすることが可能なように、開示される遺伝子（又は発現配列）に特异的又は特異的であってよい。これらのポリヌクレオチドは、該遺伝子（又は発現配列）の完全長であっても、あるいは任意的な遮断が少ない（例えばミスマッチ又は挿入された非相補的な塩基対による）、これらと該遺伝子（又は発現配列）に対応する関連DNA又はRNAとのハイブリダイゼーションは影響を受けないような、より短い長さ（該配列の5'又は3'末端からの欠失により当業界に既知の完全長配列よりも最大1つのヌクレオチドだけ短い）のプローブであってよい。多くの実施形態において、ポリヌクレオチドプローブは、開示される遺伝子又は発現配列の3'末端からの配列を含む。また、開示される遺伝子の配列に関連する突然変異を含むポリヌクレオチドプローブは、該突然変異の存在がなお検出可能なシグナルを産生するようなハイブリダイゼーションを許容する限り、使用することができる。

【0075】

固定化ポリヌクレオチドは、試料の対象（例えば試料が得られた患者）の結果が知られていないか、あるいは試料の対象にすでに与えられた結果を確認するため、試料前立腺細胞から調製された核酸試料の状態を決定するために使用することができる。本明細書の開示を制限することなく、このような細胞は、前立腺癌を有する患者に由来するもの、例えば前立腺切除によって除去された材料であってよい。固定化ポリヌクレオチドは、適当な条件下において試料由来の対応する核酸分子に特異的にハイブリダイズすれば十分である。単一の相関する遺伝子の発現は、2つの前立腺癌結果における区別において適当な正確性を提供することができるが、本明細書の開示は、1以上の遺伝子又は発現配列からの発現レベルの使用を含む。

【0076】

したがって、本発明の開示は、結果を区別するために、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、又は11以上の本明細書に開示される遺伝子又は発現配列の使用を含む。更に、12以上、14以上、16以上、18以上、20以上、22以上、24以上、26以上、28以上、30以上、32以上、34以上、36以上、38以上、40以上、45以上、50以上、55以上、60以上、62以上、65以上、70以上、75以上、80以上、85以上、90以上、又は92以上の遺伝子又は発現配列の発現レベルを開示された方法においてアッセイし、使用することができる。当然に更なる実施形態は、本明細書に開示されるとおり、表1及び図14の各々において100以上、150以上、200以上、250以上、300以上、最大337、あるいは

10

20

30

40

50

合計 362 遺伝子（又は発現配列）の使用を含む。

【0077】

いくつかの実施形態において、62のセット又は92のセットの遺伝子（発現配列）が使用される。他の実施形態において、使用される遺伝子（又は発現配列）は、表1及び図14中の337のセットに由来し、あるいはこれら由来の遺伝子と表3及び図15中のものとの組み合わせである。多くのケースにおいて、使用される遺伝子（又は発現配列）の組み合わせ又はセットは、遺伝子番号1（FEV）又は配列番号1とハイブリダイズする発現配列を含む。更なる実施形態において、組み合わせは p 値 < 0.0001 の相関性を伴い発現した1又は複数の遺伝子又は発現配列を含む。

【0078】

あるいは、組み合わせは、本発明に開示される発生の高い頻度を伴う遺伝子又は発現配列を含む。このような遺伝子又は発現配列の制限されない例は、本明細書に開示されるとおり、400以上、350以上、300以上、250以上、200以上、150以上、又は100以上の頻度を有するものである。しかしながら、当然に、より高い頻度を伴う1又は複数の遺伝子（又は配列）とより低い頻度を伴う1又は複数の遺伝子（又は配列）との組み合わせもまた使用できる。

【0079】

2又は数個の遺伝子しか分析されない実施形態においては、前立腺癌細胞試料由来の核酸は、分析すべき僅かな遺伝子が増幅され、試料中の他の発現遺伝子又は配列由来のバックグランドシグナルのコンタミネーションが低下するように、好ましくは適当なプライマー（例えばPCRにおいて使用される）の使用によって増幅することができる。開示されるPCRアンプリコンのサイズは、例えば少なくとも又は約50、少なくとも又は約100、少なくとも又は約150、少なくとも又は約200、少なくとも又は約250、少なくとも又は約300、少なくとも又は約350、又は少なくとも又は約400の連続ヌクレオチドであり、使用されるPCRプライマーに相補的な部分を含有する全てを含む。当然に、PCRは任意に、逆転写結合PCR（又はRNA出発材料の場合にはRT-PCR）又は定量PCR、例えばリアルタイムPCR、又はこれらの組み合わせであってよい。当然に、本明細書に記載される試料由来のRNAは、当業者に容易に知られる手段によって調製し、使用することができる。

【0080】

あるいは、複数の遺伝子が分析される場合、又は極めて少数の細胞（又は1つの細胞）が使用される場合、試料由来の核酸は、固定化ポリヌクレオチドプローブ、アレイ又はマイクロアレイとのハイブリダイゼーション前に、グローバルに増幅することができる。当然に、RNA又は対応するcDNAは、当業界に既知の方法によって、増幅することなく、直接的に標識し使用することができる。

【0081】

本明細書の開示は、前立腺癌又は前立腺切除後の結果を区別する（又は表す）ための、別個の遺伝子セットの遺伝子発現プロファイルの形態におけるより客観的な基準のセットを提供する。いくつかの実施形態において、該アッセイは、前立腺癌腫瘍を除去するための外科的介入から10年以内又は約10年後の良好な又は不良な結果を区別するために使用される。約10ヶ月、約20ヶ月、約30ヶ月、約40ヶ月、約50ヶ月、約70ヶ月、約80ヶ月、約90ヶ月、又は約100ヶ月後の結果を区別する比較もまた行うことができる。

【0082】

良好な及び不良な癌の再発、転移及び/又は生存結果は、互いの比較において相対的に定義することができるが、「良好な」結果は、前立腺癌腫瘍を除去するための外科的介入から約60ヶ月後における、癌再発の50%の可能性及び/又は生存の50%の可能性よりも優れたものとして評価することができる。「良好な」結果はまた、外科的介入後約60ヶ月目の、約60%、約70%、約80%又は約90%の癌再発及び/又は生存の可能性よりも優れたものであってよい。「不良な」結果は、前立腺癌腫瘍を除去するための外

10

20

30

40

50

科的介入から約60ヶ月後における、50%以上の癌再発の可能性、及び/又は50%以下の生存の可能性として評価することができる。

【0083】

また、開示された方法は、固形組織材料と共に使用することができる。例えば、固形生検は、前立腺癌又は前立腺切除後の結果を決定するために本明細書において同定された2以上の遺伝子又は発現配列の発現の視覚化、及びその後の決定のために回収し、調製することができる。1つの手段は、前記遺伝子の発現をアッセイするための、ポリヌクレオチド又はタンパク質同定プローブとのin situ ハイブリダイゼーションの使用によるものである。

【0084】

いくつかの実施形態において、試料由来の遺伝子発現の検出は、利便性及び正確性のために本明細書に開示されるいくつか又は全ての遺伝子からの遺伝子発現をアッセイすることが可能な単一のマイクロアレイの使用によるものである。

【0085】

更なる実施形態

本明細書に開示される他の用途は、更なる研究又は実験のために、特定の前立腺癌生存又は再発結果と相関する前立腺癌細胞試料を同定するための能力を提供することである。これは、客観的な遺伝子又は分子基準に基づく細胞の同定を必要とする多くの場合において特別な利点を提供する。

【0086】

本明細書に開示される方法における使用のための材料は、周知の手順に従い製造されるキットの調製に理想的である。したがって、本明細書の開示は、前立腺癌又は前立腺切除後の結果を同定するための開示された遺伝子及び配列の発現を検出するための薬剤を含んで成る。このようなキットは、該薬剤と共に、本明細書に開示される方法におけるこれらの使用に関連する記載又はラベル又は指示書を任意に含んで成る。このようなキットは、該方法に有用な1以上の多様な試薬(典型的には濃縮形態)を各々伴う容器を含んでよく、予め組み立てられたマイクロアレイ、バッファー、適当なヌクレオチド三リン酸(例えば、dATP、dCTP、dGTP及びdTTP;又はrATP、rCTP、rGTP及びUTP)、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、及び本明細書に開示される1又は複数のプライマー・コンプレックス(例えば、RNAポリメラーゼと反応性のプロモーターと連結した適当な長さのポリ(T)又はランダム・プライマー)を含む。指示書のセットもまた典型的には含まれる。

【0087】

また、本明細書の開示において提供される方法は、全体又は一部が自動化されていてよい。本明細書の開示の全ての態様はまた、細胞含有試料を介する前立腺癌再発、転移及び/又は生存結果の同定とは無関係な材料を除外して、開示された遺伝子のサブセットから本質的に成るように実施されていてよい。

【0088】

本明細書において一般的な開示が適用されているが、実例によって提供される以下の実施例を参照することによって、より容易に理解できるものと考えられる。なお、特定されていない限り、本明細書の開示を制限することは意図されない。

【実施例】

【0089】

例I: 臨床検体回収及び臨床病理学的パラメーター

1993年~1995年における前立腺全摘除術からのPSA及び他の患者結果データを伴う前立腺試料を、発現レベルが臨床的前立腺癌又は前立腺切除後の結果に相関する遺伝子(発現遺伝子)のセットを発見するために用いた。他の試料は、同定した遺伝子セットの予測的又は予知的な能力を試験又は検証するために用いた。

【0090】

該試料に対応する患者プロフィールの特徴を表2に示す。

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 2

因子記述		トレイン (n=124)	テスト (n=67)	全て (n=191)
年齢	Mean	61.8	62.7	62.1
	Range	45-77	50-78	45-78
グリソン・スコア	<=6	42 (34%)	27 (40%)	69 (36%)
	7	65 (52%)	32 (48%)	97 (51%)
	>=8	17 (14%)	8 (12%)	25 (13%)
AJCC ステージ	II	95 (77%)	49 (73%)	144 (75%)
	III	29 (23%)	18 (27%)	47 (25%)
切除縁	正	51 (41%)	26 (39%)	77 (40%)
	負	73 (59%)	41 (61%)	114 (60%)
BCF フォローアップ (年)	平均	6.9	7.7	7.2
	範囲	0.2-11.5	1.6-11.4	0.2-11.5
BCF 事象	無	71 (57%)	43 (64%)	114 (60%)
	有	53 (43%)	24 (36%)	77 (40%)
MFS フォローアップ (年)	平均	9	8.7	8.9
	範囲	0.2-13.3	0.3-12.7	0.2-13.3
	未知	1	1	2
転移事象	無	112 (91%)	62 (94%)	174 (92%)
	有	11 (9%)	4 (6%)	15 (8%)
	未知	1	1	2
Pre-op PSA	平均	8.4	8.9	8.6
	範囲	1.1-37.2	1.7-31.8	1.1-37.2
	未知	49	20	69

10

20

30

【0091】

この同定のために患者試料を使用する方法は、図 1 で図式的に説明される。端的には、210 の初期セットから 191 の患者試料を選択した。この 191 の試料をトレーニング・セット (124 試料) とテスト・セット (67 試料) に分け、ここで前者は、Random Forests™ アルゴリズムを介して遺伝子セットを同定するために使用した。該アルゴリズムを使用して得られた 500 の独立ラン (遺伝子セット) を伴う代表的な結果を、セット中の遺伝子 (発現配列) 数と未調整 P 値のログ値のプロット (ログ・ランク・テストに相当する) として図 2 に示す。図 2 は、これらの 500 セットのパフォーマンスを示し、これは多数の遺伝子 (発現配列) 及び観察された未調整 P 値により示される有意性を伴い、癌再発及び / 又は転移の高い又は低いリスクとして正確に試料 (及び患者) を分類するための能力を含む。500 セット中の遺伝子 (発現配列) は、上記表 1 及び図 1 4 に概要される 337 のユニークな (複製のない) 核酸分子を反映する。

40

【0092】

上記アルゴリズムによって生じた 34 遺伝子の 7 セットを調査し、そして上記表 1 に同定されている 62 の非複製分子を反映することが発見された (「62 のセット」の列を参照のこと、これは遺伝子番号 (配列番号に対する比較) 及び 337 のエントリー中の発現頻度を介して図 1 4 と相互参照することができる)。これらの 62 遺伝子 (発現配列) の発現レベルは、制限のない遺伝子セットの代表的な例として本明細書において議論されており、図 2 及び本明細書に示される追加的なセットを含む。前立腺癌細胞試料中の 62 遺伝子の発現レベルは、図 1 に示されるテスト・セットにおける結果のリスク指標 (予測因

50

子)として使用した。

【0093】

例II：異なる患者結果を伴うサブタイプの同定

遺伝子選択は、結果を予測した遺伝子を同定するために124の試料のトレーニング・セットと共に使用した。その後、同定した遺伝子を癌細胞の単離による67の試料のテスト・セットにおける結果を予測するために使用した(図3A及び3Bを参照のこと)。予測された結果を、試料が得られた患者について実証された結果と比較した。

【0094】

代表的な例として、遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドプローブを、例えばマイクロアレイ上に固定し、その後1×ハイブリダイゼーション緩衝液中65の共ハイブリダイゼーション反応において、Cy5-標識化試料RNA及びCy3-標識化参照RNAとハイブリダイズさせる。固定化標識を、0.1×SSC/0.005% Triton X-102により37で洗浄する。イメージ分析ソフトウェアを用いてイメージ分析を行う。強度依存性非線形回帰を用いて粗Cy5/Cy3比を標準化する。

10

【0095】

全試料からの標準化したCy5/Cy3比を、各々の遺伝子について中央化(又は平均化)する。適当なソフトウェア、例えばCox回帰分析及びRandom Forests™を用いて異なる遺伝子発現の有意性についての同定及び並び替えテストを行う。診断データから疾患を伴わない生存を計算する。事象を一次再発又は遠隔転移としてスコア化する。生存曲線をカプラン-マイヤー評価により算出し、そしてlog-ランク・テスト

20

【0096】

図4~6は、前立腺癌試料及び患者を評価するために使用された既知の因子との比較における組み合わせとして、本明細書に開示される62の遺伝子セットを用いた代表的なリスク指標(又はリスク・スコア)の成績を示す。該因子は、グリソン・グレード(又はグリソン・スコア)、前立腺癌のためのAJCCステージング系、及び術前(外科的介入前)PSA(前立腺血清抗原)レベルである。これらの比較は、本明細書に開示される遺伝子発現プロファイルがこれらの他因子と関連し、したがって、これらの因子のいずれか1又は複数の組み合わせにおいて、あるいは単独で使用し、各々のこれらの因子によって提供される情報を概括できることを示す。

30

【0097】

該62遺伝子(発現配列)の発現レベルはまた、トレーニング・セットの124試料及びテスト・セットの67試料を「高」及び「低」リスク分類に分けることができることを見出された(図7を参照のこと)。

【0098】

例III：異なる前立腺癌グレードにおけるサブタイプの同定

図7との組み合わせにおいて、図4は、代表的な62遺伝子の発現レベルに基づく「高」及び「低」サブクラスにおけるリスク・スコア(又はリスク指標)が、グリソン・グレードと一致する様式において試料(及び患者)を分類するために使用できることを実証する。ここで、グレードが高くなるにつれ、ゼロ値以上のリスク・スコアの可能性がより上昇し、したがって不良な結果のリスクが高くなる。ゼロ値は、セット中の全前立腺癌試料におけるスコアの平均値及び/又は中央値を表す。「高リスク」分類はゼロ以上のリスク・スコアに基づき、そして「低リスク」分類はゼロ以下の値に基づく。結果として、該リスク・スコア(又はリスク指標)は、 ≤ 6 又は7(あるいは ≥ 8)のグリソン・グレードを伴う試料及び患者を本明細書に記載される「高」及び「低」リスクグループに分類するために使用することができる。図8を参照のこと。

40

【0099】

これは、該リスク・スコア(又はリスク指標)が、グリソン・グレードの使用とは独立して、試料及び患者を分類するために使用できることを実証する。あるいは、2つの分析は、任意の順番で一緒に使用することができる。例えば、グリソン・グレードの決定後、

50

< = 6 又は 7 (あるいは > = 8) のグレードを伴う試料 (及び患者) におけるリスク・スコアが決定される。

【0100】

該併用は、適当な又は更なる臨床治療、例えば当業者に既知の化学治療、放射能治療、又は凍結治療のための高リスクの対象を「決定 (rule in)」し、そして所望されない副作用を伴う治療を不必要にしないように低リスクの対象を「除外 (rule out)」するために特に有利である。

【0101】

例 I V : 異なる前立腺癌ステージにおけるサブクラスの同定

図 7 との組み合わせにおいて、図 5 は、代表的な 62 の遺伝子セットの発現レベルに基づく「高」及び「低」サブクラスにおけるリスク・スコア (又はリスク指標) が、A J C C 前立腺癌ステージと一致する様式において試料 (及びその患者) を分類するために使用できることを実証する。ここで、ステージ I I I は、ゼロ値以上のリスク・スコアとより関連するようであり、そして不良な結果のより高いリスクが存在する。ゼロ値はまた、セット中の全前立腺癌試料におけるスコアの平均値及び / 又は中央値を表す。「高リスク」グループはゼロ以上のリスク・スコアに基づき、そして「低リスク」グループはゼロ以下の値に基づく。結果として、該リスク・スコア (又はリスク指標) は、A J C C ステージ I I 又は I I I 分類を伴う試料及びその患者を、本明細書に記載される「高」及び「低」リスクグループに分類するために使用することができる。

【0102】

これは、該リスク・スコア (又はリスク指標) が、A J C C ステージ評価の使用から独立して、試料及びその患者を分類するために使用できることを実証する。あるいは、2 つの分析は、任意の順番で一緒に使用することができる。例えば、A J C C ステージの決定後、ステージ I I 又は I I I 前立腺癌を伴う試料 (及びその患者) におけるリスク・スコアが決定される。

【0103】

該併用は、熟練した臨床医に既知の適当な臨床治療のための高いリスクの対象を「決定 (rule in)」し、そして所望されない副作用を伴う治療を合理的に回避するため低リスクの対象を「除外 (rule out)」するために特に有利である。併用はまた、「静観」に適した患者又は対象の分類を変更することができる。

【0104】

例 V : 術前 P S A 分析との比較

上記グリソン・グレード及び A J C C ステージ分析は共に前立腺癌細胞試料の使用を必要とするが、代表的な 62 の遺伝子セットの発現レベルに基づく「高」及び「低」サブクラスにおけるリスク・スコア (又はリスク指標) の図 6 における一貫性は、上述のリスク・スコアとの組み合わせにおいて術前 P S A 値を考慮すべきことを示す。該組み合わせは、順番に、例えば術前 P S A 値の決定後、30 以上、25 以上、20 以上、15 以上、10 以上又は 5 以上の P S A 値を有する試料 (及びその患者) のリスク・スコアを決定する。

【0105】

例 V I : C o x 回帰分析による遺伝子の同定

92 遺伝子 (又は発現配列) を同定するために C o x 回帰分析を使用した。その発現レベルは、上述のとおり、前立腺癌細胞含有試料を同定することが可能である。これらの 92 遺伝子 (又は発現配列) 中 67 遺伝子は、図 14 及び表 1 の 337 遺伝子 (又は発現配列) と共通する (図 14 又は表 1 の「C o x 92」列を参照のこと。これは遺伝子番号 (対配列番号) 及び頻度により互いに相互参照させることができる)。92 遺伝子中の残りの 25 遺伝子 (又は発現配列) を図 15 及び以下の表 3 に挙げる。これは、遺伝子番号 (配列番号との比較における)、ならびに z 及び p 値により、互いに相互参照させることができる。

【0106】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

表 3

配列 番号:	プローブ配列	Z	p	
338	GATGCACCAGGCGAGGAAACGAGACCTCTTCGTTCCCTTAG	-4.999253	4.18E-06	
339	ATGCCTGAGGCATGAGTGACTGTGCATTTGAGATAGTTTTCCCTAT	-4.834638	4.97E-06	
340	TGAAAAAGAACAAGAGCTGGACACATTA AAAAGAAAGAGTCCATCAGATT	4.3810131	2.31E-05	
341	CAGAAGGACCTGGGGGATGGCGTGTATGGCTTCGAGTATTACC	-4.181005	2.89E-05	10
342	AGGGCTGTCATCAACATGGATATGACATTTACAACAGTGACTAG	-3.804427	5.90E-05	
343	TGGCTTTGCACAGAACCAGCTAGTTATTTGGAAGTACCCAACC	4.2565288	5.95E-05	
344	TGTGGTTAGCATCAAGTTCTCCCCAGGGTAGAATTCATCAGAGCT	-4.211286	8.06E-05	
345	CAATGCAAAAAGTATTCGCTGCTGTTTACATTAGAAATCACTTCCAGC	-3.829636	8.59E-05	
346	TGTACAGTGAACCATGTGACCATGTCTTGCTTGCAATATAGAAA	3.7423758	0.0001308	
347	GGCAAATCCTTCAAGCAGGGATAAAAAGTCGATCTCAAACATTAECTT	-3.604833	0.0001884	
348	GGGTTTGGGGGAGATTTTACTCCTTTCTTCAACAACATTCACTGGA	-3.554167	0.0003955	
349	TTTTAGGCCTTTGGGGGAATTGATTTTTATCCACAGGTAGAAAATG	-3.576323	0.0004075	
350	CTATGCAGGAAAATAGCACCCCCCGTGAGGACTAATCCAGATACATC	-3.553166	0.0004276	
351	AGGTATGGCCTCAACAAGTCTTGGTCTACCCACCATATGTTTATCAA	-3.464213	0.0006149	
352	AGGAGGTGTCAGACTGCTGAAGCCGACTCTGAAAGTGATCATGAAGT	3.5820846	0.0006381	20
353	GAGGGCATGTTGTCCATATCCCTGTGGAATACAGACCGTGAAC	3.4420595	0.0006641	
354	TCTAATGTGCACGGTGTGACTGGCAGAGTGAGTTTAAAAGCTTTACGA	-3.230789	0.0007048	
355	TGTTGCCAAGCTAGTCTACAAAGCATCTGATTTTGAAGTACATGGAAT	3.6130547	0.0007484	
356	TTACACCTTTCCCCCTGAAATGTATAGAATCCATTTGTCATCAGG	-3.434091	0.0007518	
357	AATTGGTGAACAAAAAATGCCCAAGGCTTCTCATGTCTTTATTCTG	-3.341571	0.0007655	
358	GGAGAATTCTTTAGGTTGCCCCATAAGATTCTGAAAAGAGAATCAGA	3.3060176	0.0007756	
359	GTAGCCTCACCATTAGTGGCAGCATCATGAACTGAGTGGACTGTG	3.8470148	0.0007772	
360	TTTGCTCACAAAGCCATATTGGCCCCGATTAGTGGTACTGTCTGACTC	3.2305915	0.000808	
361	TGAGCTTACAACAGGTCTCGAGCTGGTGGACTCCTGTATTAGGTCACT	3.2987578	0.000825	
362	GCATGCAGATGTCAAGGCAGTTAGGAAGTAAATGGTGTCTTGTA	3.2511294	0.0008645	

30

【 0 1 0 7 】

本明細書に引用される全ての参考文献、例えば特許、特許出願及び公報は、予め具体的に組み込まれているかにかかわらず、その全てが参考により本明細書に組み込まれている。

【 0 1 0 8 】

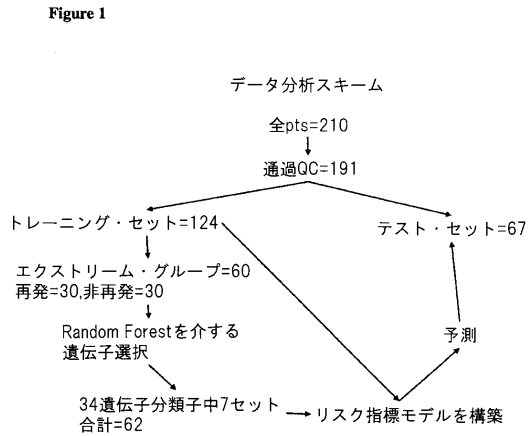
このたび、本発明は十分に記載されているため、当業者は、本明細書の開示の精神の範囲を離れることなく、かつ過剰な実験をすることなく、同等のパラメーター、濃度、及び条件の広い範囲において実施することが可能である。

【 0 1 0 9 】

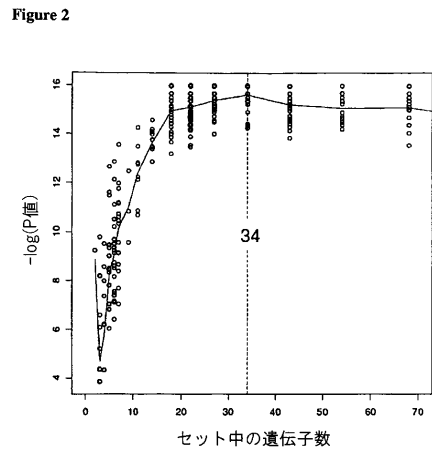
本明細書は、具体的な実施形態に関連して記載されているが、更なる改変が可能であることが理解されるものと考えられる。本願は、一般的な開示の原則に従い、本発明のいずれかの変更、使用、又は適合を網羅することを意図し、本発明に属する当業界に既知又は慣習的な実施内の本明細書の開示を離れたものを含み、かつ本明細書に記載される本質的な特徴に適用されることができる。

40

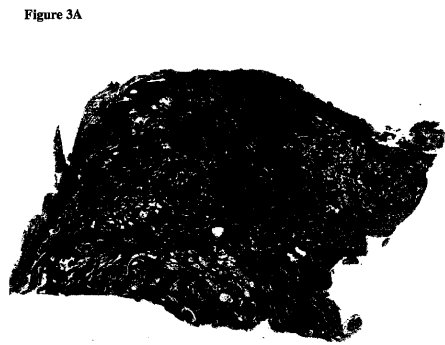
【 図 1 】



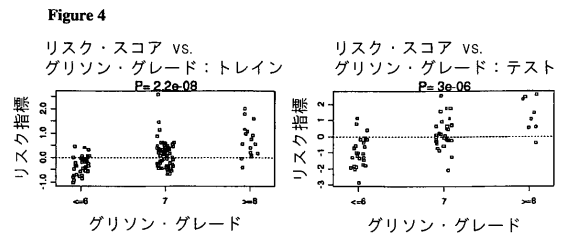
【 図 2 】



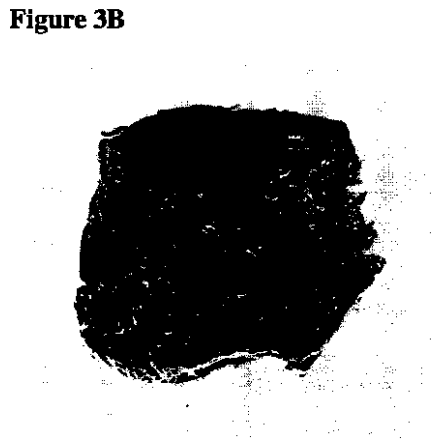
【 図 3 A 】



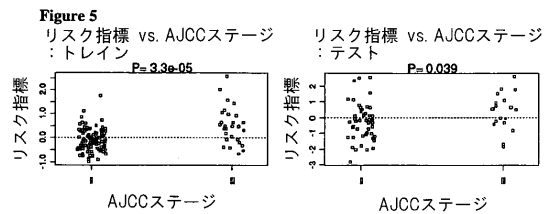
【 図 4 】



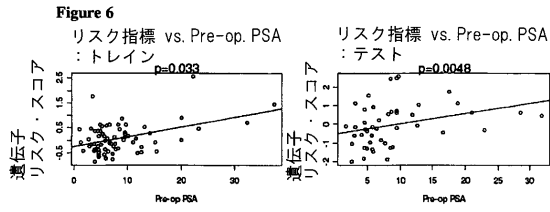
【 図 3 B 】



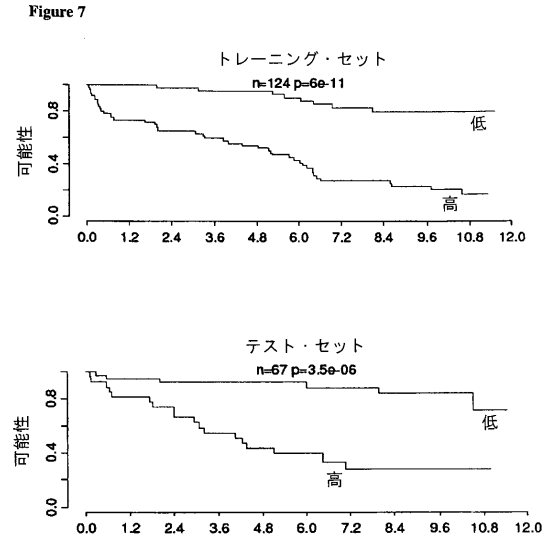
【 図 5 】



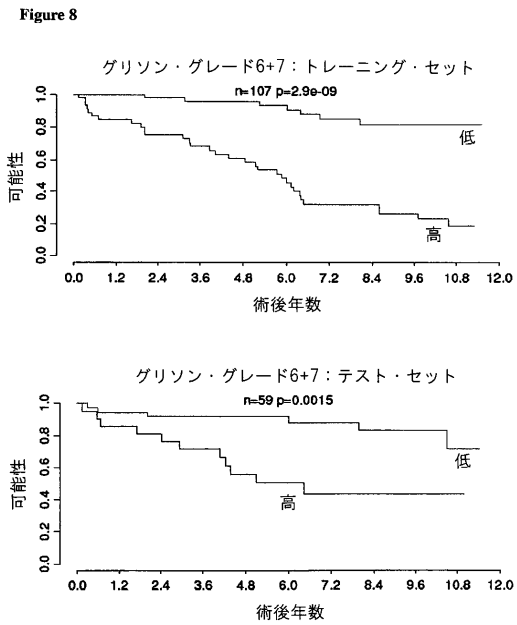
【 図 6 】



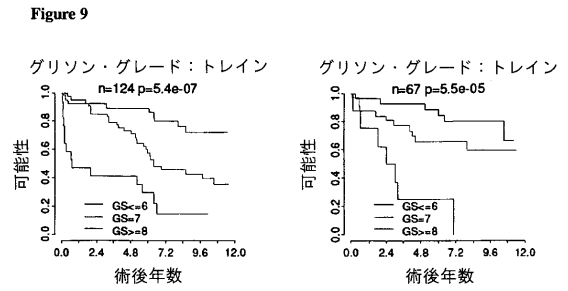
【 図 7 】



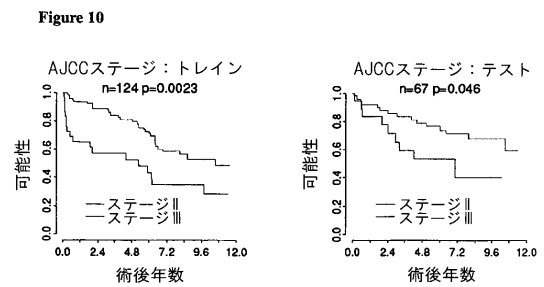
【 図 8 】



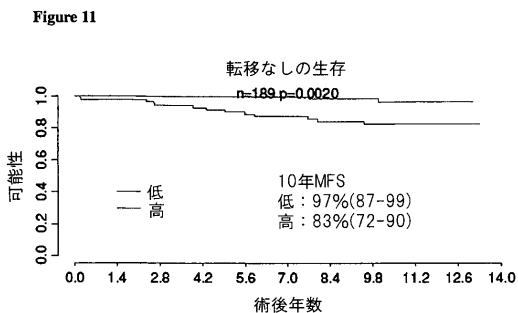
【 図 9 】



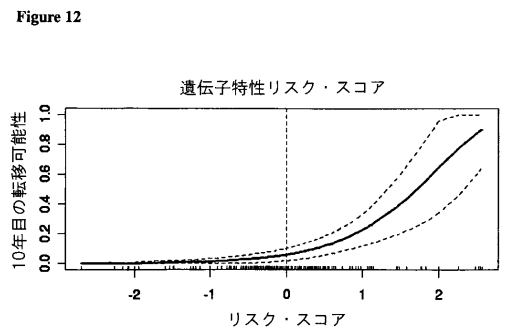
【 図 10 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 4 - 1 】

遺伝子番号	探査ID	探査名	プロローブID	記号	記述	62のセット	Cox2
1	500	Y08765.3	FEV	Homo sapiens FEV (ETS oncogene family) (FEV), mRNA	有	有	
2	486	AF64708	AF64708.S2	TUSC4	Homo sapiens tumor suppressor candidate 4 (TUSC4), mRNA	有	有
3	475	NM_005848.S1	GSF6	Homo sapiens immunoglobulin superfamily, member 6 (IGSF6), mRNA	有	有	
4	386	AB34367	AB34367.S2	INHBA	WDR40L, NCL, GCGAP, GCG4, Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5429242.3, mRNA sequence (cdna=IMAGE:5429242.3) (cdna_end=3) (g=AW544287)	有	有
5	349	BE64593	BE64593.S3	OPF5	Homo sapiens OPF5 (OPF5), mRNA	有	有
6	338	NM_012292	TFEC	Homo sapiens transcription factor EC (TFEC), transcript variant 2, mRNA	有	有	
7	334	AN22698	AN22698.S2	FLJ2225	Homo sapiens transcription factor EC (TFEC), transcript variant 2, mRNA	有	有
8	297	NM_005858	HCT116	Homo sapiens homeobox C4 (HOXC4), transcript variant 2, mRNA	有	有	
9	281	NM_020445	ACTR3B	3, mRNA sequence (cdna=IMAGE:1930397) (cdna_end=3) (g=AW54583)	有	有	
10	287	M6826	M6826.S2	TPX2	U1H-BW5-9p5-08-U1, NCL, GCGAP, Subd Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2731287.7, mRNA sequence (cdna=IMAGE:2731287.7) (cdna_end=3) (g=AW54583)	有	有
11	287	AF098158	AF098158.S3	TPX2	Homo sapiens TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis) (TPX2), mRNA	有	有
12	287	BF246115	BF246115.S1	MTIF	Homo sapiens metallothionein 1F (functional) (MT1F), mRNA	有	有
13	259	NM_022750	PAIP12	Homo sapiens poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12 (PAIP12), mRNA	有	有	
14	254	AF59763	AF59763.S3	TLE1	Homo sapiens transcription factor 15 (TF15), mRNA	有	有
15	244	A452789	A452789.S5	LOC46989	Homo sapiens transcription factor 15 (TF15), mRNA	有	有
16	232	NM_002275	NM_002275.S1	KRT15	Homo sapiens keratin 15 (KRT15), mRNA	有	有
17	227	A197496	A197496.S1	GAT3A	Homo sapiens GATA binding protein 3 (GAT3), transcript variant 2, mRNA	有	有
18	211	A199169	A199169.S2	GAT3A	Homo sapiens GATA binding protein 3 (GAT3), transcript variant 2, mRNA	有	有
19	184	NM_004800	NM_004800.S2	APOBEC3B	Homo sapiens apolipoprotein B (APOB), mRNA	有	有
20	189	NM_004626	NM_004626.S5	WNT11	Homo sapiens wingless-type MMTV integration site family, member 11 (WNT11), mRNA	有	有
21	181	A923254	A923254.S4	MAOA	Homo sapiens monoamine oxidase A (MAOA), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA	有	有

Figure 14

遺伝子番号

探査ID

探査名

プロローブID

記号

記述

62のセット

Cox2

【 図 1 3 】

Figure 13

一変量	トレニング・セット		テスト・セット			
	ハザード比	p-値	ハザード比	p-値		
リスク・スコア(低 vs. 高)	8.3	3.9-17.7	<0.0001	6.3	2.5-16.0	0.0001
多変量						
リスク・スコア(低 vs. 高)	5.2	2.1-12.9	<0.0001	4.6	1.1-18.4	0.03
グリニン・グレート	1.7	0.59-4.89	0.32	2.1	0.50-8.62	0.32
グリニン・グレート	1.7	0.49-6.14	0.4	5.4	0.73-39.8	0.098
AUCスケーラ	0.62	0.28-1.39	0.24	0.65	0.15-2.80	0.56
Pre-op PSA	1	0.97-1.08	0.32	1.1	1.0-1.14	0.05

【 図 1 4 - 2 】

22	181	NM_017870	NM_017870.S3	HSPA8BP1	Homo sapiens transmembrane protein 152A (TMEM152A), transcript variant 2, mRNA	有	有
23	176	NM_004225	UBE2L6	UBE2L6	Homo sapiens ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6 (UBE2L6), transcript variant 2, mRNA	有	有
24	164	IGSF1	IGSF1	IGSF1	Homo sapiens immunoglobulin superfamily, member 1 (IGSF1), transcript variant 2, mRNA	有	有
25	142	NM_001848	NM_001848.S1	EPF3	Homo sapiens E2F transcription factor 3 (EPF3), mRNA	有	有
26	140	NM_000129	NM_000129.S2	FLJ91	Homo sapiens transcription factor XIII, A1 polypeptide (F13A1), mRNA	有	有
27	135	NM_002241	NM_002241.S4	LTB	Homo sapiens lymphotom beta (TNF superfamily, member 3) (LTB), transcript variant 1, mRNA	有	有
28	118	NM_001665	NM_001665.S1	PTOC1	Homo sapiens apolipoprotein C1 (APOC1), mRNA	有	有
29	117	NM_006025	NM_006025.S4	PTC2	Homo sapiens phosphatase 2C domain containing 2 (PTC2), mRNA	有	有
30	117	A176968	A176968.S1	ATP9A1	7q47q43.1, NCL, GCGAP, P24, Homo sapiens cDNA clone IMAGE:362924.1, mRNA sequence (cdna=IMAGE:362924.1) (cdna_end=3) (g=BF437169)	有	有
31	114	A137603	A137603.S3	COL10A1	Homo sapiens collagen, type X, alpha 1 (Schmid metaphase chondrocytoplast) (COL10A1), mRNA	有	有
32	109	A153295	A153295.S3	CLUC5	Homo sapiens chloride intracellular channel 6 (CLIC6), mRNA	有	有
33	103	FLJ20097	FLJ20097.A	FLJ20097	Homo sapiens hypothetical protein LOC55810, isoform b (FLJ20097), transcript variant 1, mRNA	有	有
34	102	M3859	M3859.S3	COL13A1	Homo sapiens collagen, type XIII, alpha 1 (COL13A1), transcript variant 15, mRNA	有	有
35	102	NM_005544	NM_005544.S5	IRS1	Homo sapiens insulin receptor substrate 1 (IRS1), mRNA	有	有
36	99	A137069	A137069.S2	RSAD2	Homo sapiens radical S-adenosyl methionine domain containing 2 (RSAD2), mRNA	有	有
37	92	NM_006829	NM_006829.S3	C1orf116	Homo sapiens chromosome 10 open reading frame 116 (C1orf116), mRNA	有	有
38	81	H18004	H18004.S8	RP42	Homo sapiens poly (ADP-ribose) polymerase 1, domain containing 1 (PARG) (DQAD1D), mRNA	有	有
39	77	NM_007231	NM_007231.S3	SLOC414	Homo sapiens solute carrier family 6 (amino acid transporters), member 14 (SLOC414), mRNA	有	有
40	74	H0XB13	H0XB13	H0XB13	Homo sapiens homeobox B13 (H0XB13), mRNA	有	有
41	71	A028316	A028316.S2	EN2H	hg58405.1, NCL, GCGAP, Homo sapiens cDNA clone IMAGE:292978.7, mRNA sequence (cdna=IMAGE:292978.7) (cdna_end=3) (g=AW584945)	有	有
42	67	A1576253	A1576253.S3	DOC2B	Homo sapiens protein kinase domain containing 2 (DOC2B), mRNA	有	有
43	64	BC001193	BC001193.S4	HST3HA2	Homo sapiens dedicator of cytokinesis 9 (DOCK9), mRNA	有	有
44	64	NM_014388	NM_014388.S1	C1orf107	hg42905.1, NCL, GCGAP, P12, Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1274409, mRNA sequence (cdna=IMAGE:1274409) (cdna_end=3) (g=AW584945)	有	有
45	60	A1769122	A1769122.S1	E1F4C3	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 107 (C1orf107), mRNA	有	有
46	60	NM_005467	NM_005467.S5	MYC	Homo sapiens nuclear translation initiation factor 4 gamma, 3 E1F4C3, mRNA	有	有

【 図 1 4 - 7 】

有

148	6	NOX4	GL204683S-6	NOX4	Homo sapiens MADPH oxidase 4 (NOX4), mRNA
149	6	BC018111	RS1	Homo sapiens RRS1 (Rossmo biglycan regulator homolog (S. cerevisiae) (RHS1)), mRNA	
150	6	BP22182	LPP	Homo sapiens LIM domain containing preferred transcription partner 1 (LPP), mRNA	
151	6	AA74620	MGC13138	Homo sapiens zinc finger protein 764 (ZF764), mRNA	
152	6	AK021786	FLJ11724	hcd18c.11, Sorex, NFL, T, GBC, S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE209878	
153	5	NM_00450	SELE	2 similar to 1936 INTERCELLULAR ADHESION MOLECULE 2, mRNA	
154	5	BE29300	JMD2B	1936 INTERCELLULAR ADHESION MOLECULE 2, mRNA	
155	5	SEPHL	GL230031S-5	Alpha-1B-galactosidase (EC 3.2.1.26) (alpha-1B-galactosidase (alpha-1B-galactosidase)), mRNA	
156	5	NM_04915	ABCG1	Homo sapiens selenin E (endothelial adhesion molecule 1) (SELE), mRNA	
157	5	AB58986	LPTM5	Homo sapiens jumellin domain containing 2B (JMJD2B), mRNA	
158	5	AB58948	SLC9A6	Homo sapiens selenin G (selenin G) (SELENG), member 1 (ABCG1), transcript variant 7, mRNA	
159	5	AV123501	SLC1A1	Homo sapiens selenin G (selenin G) (SELENG), member 1 (ABCG1), mRNA	
160	5	NM_003022	SH3BPGL	Homo sapiens SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like (SH3BPGL), mRNA	
161	5	AA706319	FLC81	hcd4c.11, Sorex, NtMfA, S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE185526.3	
162	5	BF03093	RHEB	1 Homo sapiens RHEB (Ras binding protein) (RBE), mRNA	
163	5	LA1827	NRD1	Homo sapiens NRD1 (Nucleosome remodeling deacetylase 1), mRNA	
164	5	XG390	UBTF	Homo sapiens ubiquitin binding transcription factor (UBTF), mRNA	
165	5	BC209096	NOO1	Homo sapiens MAD(PH) demethylase, quonins 1 (NOO1), transcript variant 1, mRNA	
166	5	AL04593	FLC81	Homo sapiens phosphoglucoase C, beta 1 (phosphoglucosidase-specific) (PLGB1), transcript variant 2, mRNA	
167	5	NM_007124	DCAMK1	Homo sapiens doublecortin and CAM kinase-like 1 (DCAMK1), mRNA	
168	5	US3586	SCGB	Homo sapiens strobilactin and CAM kinase-like 1 (DCAMK1), mRNA	
169	5	AL121985	LOC41454 // LOC41456	Homo sapiens strobilactin, beta (beta) (strobilactin-associated glycoprotein) (SCGB), mRNA	

【 図 1 4 - 8 】

有

170	5	NM_021122	ACS1	Homo sapiens acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 (ACS1), mRNA
171	4	AT43713	NOTCH4	Homo sapiens Notch homolog 4 (Drosophila) (NOTCH4), mRNA
172	4	ALJ2398	TRAF3IP3	wf3b2c.1, NCL CGAP, LU18 Homo sapiens cDNA clone IMAGE245091.3 similar to TR078590 HYPOTHETICAL 377: KO PROTEIN, mRNA
173	4	L19877	DWVD	Alpha-1B-galactosidase (EC 3.2.1.26) (alpha-1B-galactosidase (alpha-1B-galactosidase)), mRNA
174	4	NM_001211	BU616	Homo sapiens dystrophin myofibrils-containing WD repeat motif (DMWD), mRNA
175	4	SNP8	SNP1	Homo sapiens BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast) (BUB1B), mRNA
176	4	NS9230	NS9230-S-1	Homo sapiens syntrophin (SNPH), mRNA
177	4	NM_004048	BM	U-H-BW1-19y4-12-0-L151 NCL CGAP, Sub7 Homo sapiens cDNA clone IMAGE245091.3 similar to TR078590 HYPOTHETICAL 377: KO PROTEIN, mRNA
178	4	NM_024629	MLF1P	Homo sapiens beta-2-microglobulin (B2M), mRNA
179	4	AB8941	COL4A6	Homo sapiens MLF1 interacting protein (MLF1P), mRNA
180	4	NM_00213	CSTA	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 6 (COL4A6), transcript variant A, mRNA
181	4	BC209096	CD86	Homo sapiens Cystatin A (CSTA), mRNA
182	4	NM_004688	SLC16A4	Homo sapiens CD86 molecule (CD86), transcript variant 2, mRNA
183	4	NM_007178	CD8	Homo sapiens solute carrier family 16, member 4 (monocarboxylic acid transporter) (SLC16A4), mRNA
184	4	AB1432	AB3142-S-1	Homo sapiens CD9 molecule (CD9), mRNA
185	4	NM_006300	SLC20A1	Homo sapiens solute carrier organic anion transporter family, member 2A1 (SLC20A1), mRNA
186	4	NM_012532	OR1A2	Homo sapiens olfactory receptor, family 1, subfamily A, member 2 (OR1A2), mRNA
187	4	NM_00201	ISG20	Homo sapiens interferon stimulated exonuclease gene 20C (ISG20), mRNA
188	3	AL4243	SCUB2	Homo sapiens signal peptide, CUB domain, EGF-like 2 (SCUB2), mRNA
189	3	NM_009550	MTIG	Homo sapiens metallothionein 1G (MTIG), mRNA
190	3	NM_009550	NPY	Homo sapiens neuropeptide Y (NPY), mRNA
191	3	AF193712	TNFSF11	Homo sapiens tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11 (TNFSF11), mRNA
192	3	NM_003504	CD44L	Homo sapiens CD44 cell adhesion cycle 45-like (S. cerevisiae) (CD44L), mRNA
193	3	NM_00670	TPBG	Homo sapiens trophoblast glycoprotein (TPBG), mRNA
194	3	AB8470	FLJ20021	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC9824 (FLJ20021), mRNA
195	3	U02718	FAP	Homo sapiens fibroblast activation protein, alpha (FAP), mRNA
196	3	AB8985	WNT5A	Homo sapiens wingless-type MTV integration site family, member 5A (WNT5A), mRNA
197	3	U18671	STAT2	Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa (STAT2), mRNA

【 図 1 4 - 9 】

有

198	3	AW574594	PECAM1	image2_7_20019m1 (Sporin) 1, NML_MGC_122 Homo sapiens cDNA clone IMAGE222989.3, mRNA
199	3	NM_00795	FSMB3	NM_00795.3, mRNA sequence clone IMAGE520297 (clone_image520297), mRNA
200	3	COMP	GL07164S-3	Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 3 (PSMA3), mRNA
201	3	AL031167	BML4	Homo sapiens cartilage oligomeric matrix protein (COMP), mRNA
202	3	X89974	ACTRL1	1736A, x1 NCL CGAP, Pan1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE222989.3, mRNA
203	3	X79504	ATXN1	Alpha-1B-galactosidase (EC 3.2.1.26) (alpha-1B-galactosidase (alpha-1B-galactosidase)), mRNA
204	3	NM_006780	SMA3	hcd84. Human Fetal Cerebellum cDNA Library Homo sapiens cDNA clone c2854.5, mRNA
205	3	BC001149	RFC3	Alpha-1B-galactosidase (EC 3.2.1.26) (alpha-1B-galactosidase (alpha-1B-galactosidase)), mRNA
206	3	BPI	BPI	Homo sapiens membrane protein 1 (S. cerevisiae) (RAD51), transcript variant 1, mRNA
207	3	AV193286	INFT	Homo sapiens baculovirus (immaturity)-increasing protein (BIP), mRNA
208	3	NM_00875	RAO51	wf3b2c.1, Sorex, NSF, F3, SW, OT, P, A, P, S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE222989.3, mRNA
209	3	NM_01193	FZD4	Homo sapiens RAO51 homolog (Rao51 homolog) (Rao51), transcript variant 1, mRNA
210	2	NM_00882	NAT1	Homo sapiens fused homolog 4 (Drosophila) (FZD4), mRNA
211	2	NM_00370	MYOM8	Homo sapiens myosin (M-protein) 2, 18kDa (MYOM2) (NAT1), mRNA
212	2	AL52814	RFP	Homo sapiens ret finger protein (RFP), transcript variant alpha, mRNA
213	2	AF08867	AGR2	Homo sapiens BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (Xenopus laevis) (BAMBI), mRNA
214	2	NM_012342	BAMBI	alpha201.1, Sorex, NFL, T, GBC, S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE1296580
215	2	A157062	SNRPC5	alpha-1B-galactosidase (EC 3.2.1.26) (alpha-1B-galactosidase (alpha-1B-galactosidase)), mRNA
216	2	X5999	RNA5E	Homo sapiens ribonuclease, RNase A family, 3 (neuronal cationic protein) (RNA5E), mRNA
217	2	BC00903	HMB2	Homo sapiens ribonuclease, RNase A family, 3 (neuronal cationic protein) (RNA5E), mRNA
218	2	AC00934	ACSM1	Homo sapiens acyl-CoA synthetase medium-chain family member 1 (ACSM1), mRNA
219	2	NDN	NDN	Homo sapiens neudin (mouse) (NDN), mRNA
220	2	NM_001321	CSRP2	Homo sapiens cysteine and glycine-rich protein 2 (CSRP2), mRNA

【 図 1 4 - 1 0 】

有

221	2	BF511081	SLC18A1	HUM108B1A Clonex human fetal brain poly(A), mRNA (AF553) Homo sapiens SLC18A1 (Solute carrier family 18, member 1) (SLC18A1) (clone_image520297), mRNA
222	2	U79777	YHNAZ	U-H-BW1-19y4-12-0-L151 NCL_MGC_210 Homo sapiens cDNA clone IMAGE2097340.5, mRNA
223	2	NM_023147	IFG2B	hcd18c.11, Sorex, NFL, T, GBC, S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE2097340.5, mRNA
224	2	NM_023147	IFG2B	hcd18c.11, Sorex, NFL, T, GBC, S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE2097340.5, mRNA
225	2	BC01327	PRF2	Homo sapiens alpha-1B-galactosidase (EC 3.2.1.26) (alpha-1B-galactosidase (alpha-1B-galactosidase)), mRNA
226	2	MN87	MN87	Homo sapiens interferon-related developmental regulator 2 (IFRD2), mRNA
227	2	H2AF2	H2AF2	Homo sapiens antigen identified by monoclonal antibody 4147 (MN87), mRNA
228	2	N2732	FOXO3A	Homo sapiens H2A histone family, member 2 (H2AF2), mRNA
229	2	NM_009688	ALOX5	Homo sapiens forkhead box O3A (FOXO3A), transcript variant 2, mRNA
230	2	W37431	MAPK9	Homo sapiens methionine 5-lysoxigenase (ALOX5), mRNA
231	2	R6374	HEY1	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 9 (MAPK9), transcript variant 4, mRNA
232	2	AV89866	SGH3	Homo sapiens hairpin/antenna-to-ear1 related with YERP motif 1 (HEY1), mRNA
233	2	BC38561	SALL2	Homo sapiens serpin/glucuronidase regulated kinase family, member 3 (SGN3), transcript variant 1, mRNA
234	2	AB44548	EIF4EBP1	Homo sapiens salivary 2 (Drosophila) (SALL2), mRNA
235	2	AB51043	ERG	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (EIF4EBP1), mRNA
236	2	NM_002497	NER2	Homo sapiens vesicular glutamate transporter 2 (vesicular glutamate transporter 2) (NER2), mRNA
237	2	NM_009589	SIM2	Homo sapiens vesicular glutamate transporter 2 (vesicular glutamate transporter 2) (NER2), mRNA
238	2	AB9779	DERL1	Homo sapiens single-minded homolog 2 (Drosophila) (SIM2), transcript variant SIM2, mRNA
239	1	BC020748	CD96	Homo sapiens Dsr-like domain family, member 1 (DERL1), mRNA
240	1	BM76932	LOC400388	DSP9605 PLACE1, Homo sapiens cDNA clone IMAGE2215798.3, mRNA
241	1	NM_00035	PLD2	Homo sapiens phospholipase C, delta 2 (PLD2), mRNA
242	1	NM_00260	PGMB8	Homo sapiens phospholipase C, delta 2 (PLD2), mRNA
243	1	A45377	LOC103224	CH1-HN001071100-553-008 HN0016 Homo sapiens cDNA, mRNA sequence (g-bf524812) (g-1216877) (g-h4539581) (fmm-37)

【 図 1 5 - 1 】

遺伝子番号	探索キーワード	ブローフ ID	記号	z	p	記述
338	S8728	S8728-S-1	MYH11	4.9925302	4.18E-06	Homo sapiens myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle (MYH11), transcript variant S87A, mRNA
339	NM_000587	NM_000587-S-1	C7	4.8345794	4.97E-06	Homo sapiens complement component 7 (C7), mRNA
340	AU159942	AU159942-S-2	TOP2A	4.3810309	2.31E-05	Homo sapiens topoisomerase (DNA II) alpha 170kDa (TOP2A), mRNA
341	FLNA	GL_5302744-S-6	FLNA	-4.1810045	2.98E-05	Homo sapiens filamin A, alpha (actin binding protein 280) (FLNA), mRNA
342	NM_001449	NM_001449-S-1	FHL1	3.8944654	5.90E-05	Homo sapiens four and a half LIM domains 1 (FHL1), mRNA
343	NM_001255	NM_001255-S-1	CDC20	4.2552983	5.95E-05	Homo sapiens CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae) (CDC20), mRNA
344	NM_003012	NM_003012-S-1	SFRP1	4.2112814	8.08E-05	Homo sapiens secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1), mRNA
345	S87155	S87155-S-2	ASPA	3.8295352	8.55E-05	Homo sapiens aspartoacylase (Carneian disease) (ASPA), mRNA
346	A813483	A813483-S-5	E1F2C2	3.7429759	0.00013079	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC728862 (LOC728862), mRNA
347	AW157094	AW157094-S-2	IDA	3.69483294	0.00019837	Homo sapiens inhibitor of DNA binding 4, dominant negative Helix-loop-helix protein (ID4), mRNA
348	NM_005864	NM_005864-S-2	EFS	3.55416721	0.00039551	Homo sapiens embryonal Fyn-associated substrate (EFS), transcript variant 2, mRNA
349	AH16000	AH16000-S-5	GPMB8	-3.57623	0.0040747	Y24493.1 Morton Fetal Cochlear Home sapiens cDNA clone IMAGE:289500 3', mRNA sequence (clone IMAGE:289500 clone_end=3' (gi=146653 gi=121660))
350	J0480	J0480-S-2	C15	3.5316554	0.0042759	Homo sapiens complement component 1, s subcomponent (C15), transcript variant 1, mRNA
351	HIPK3	GL_23469068-S-1	HIPK3	3.4621319	0.005149	Homo sapiens homeodomain-interacting protein kinase 3 (HIPK3), mRNA
352	NM_022346	NM_022346-S-1	HCAP-G	3.5200464	0.00053807	Homo sapiens chromosomal condensation protein G (HCAP-G), mRNA
353	NM_013382	NM_013382-S-3	PON12	3.4209950	0.0005641	Homo sapiens protein-O-mannosyltransferase 2 (POMT2), mRNA
354	AH75175	AH75175-S-1	ITGA8	3.2307817	0.0007079	qf5504.1 Soares_McInt Home sapiens cDNA clone IMAGE:175303 3', mRNA sequence (clone IMAGE:175303 clone_end=3' (gi=119880 gi=9751509))

【 図 1 5 - 2 】

355	NM_004150	NM_004150-S-1	ORC1L	3.61955489	0.00074838	Homo sapiens origin recognition complex, subunit 1 like (yeast) (ORC1L), mRNA
356	NM_002048	NM_002048-S-4	GAS1	3.43409132	0.00075175	Homo sapiens growth arrest-specific 1 (GAS1), mRNA
357	AF277990	AF277990-S-3	HERPUD1	3.34157071	0.00076546	Homo sapiens herpudins, ubiquitin-specific protease, ubiquitin-like domain member 1 (HERPUD1), transcript variant 3, mRNA
358	NM_014726	NM_014726-S-1	KIAA0101	3.30607763	0.0007756	Homo sapiens KIAA0101 (KIAA0101), transcript variant 1, mRNA
359	NM_001809	NM_001809-S-1	CENPA	3.84701476	0.00077719	Homo sapiens centromere protein A, 170kD (CENPA), mRNA
360	BF038366	BF038366-S-6	MAC3D	3.23059154	0.000808	Homo sapiens transmembrane protein 97 (TMEM97), mRNA
361	CTNND2	GL_38911165-S-4	CTNND2	3.29815775	0.00082505	Homo sapiens cadherin-associated protein, alpha 2 (membrane plakophilin-related arm-repeat protein) (CTNND2), mRNA
362	NM_001384	NM_001384-S-3	DUSP4	3.25112943	0.00086446	Homo sapiens dual specificity phosphatase 4 (DUSP4), transcript variant 1, mRNA

【 配 列 表 】

2010518868000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 08/54820																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER - IPC(8) - C12Q 1/68 (2009.01) USPC - 435/6 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC - 435/6 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/7.23 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (PGPB, USPT, EPAB, JPAB); Google/Scholar; PubMed: Prostate, cancer, tumor, PSA, prostatectomy, Gleason score, ETS transcription, ETS oncogene, FEV, HSRNAFEV, PET-1, PET, tumor suppressor candidate 4, TUSC4, NPRL2, NPR2L, risk, recurrence, metastasis, AJCC, radiation, chemotherapy. GenCore 6.3: SEQ ID NO: 1																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2006/0211017 A1 (CHINNAIYAN et al.) 21 Sep 2006 (21.09.2006); para [0007], [0015], [0023], [0030], [0059], [0060], [0319], [0360], [0366], [0381], [0296], [0424]</td> <td>1, 4-8, 11-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>2-3, 16-20</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Maurer et al. FEV acts as a transcriptional repressor through its DNA-binding ETS domain and alanine-rich domain. Oncogene 2003, 22:3319-3329; Fig 1; pg 3320, para 3</td> <td>2-3, 18-20</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2004/0016006 A1 (Ji et al.) 22 Jan 2004 (22.01.2004); para [0021]</td> <td>2-3, 18-20</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2004/0253256 A1 (CHEUNG) 16 Dec 2004 (16.12.2004); para [0006]</td> <td>16-17</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2006/0211017 A1 (CHINNAIYAN et al.) 21 Sep 2006 (21.09.2006); para [0007], [0015], [0023], [0030], [0059], [0060], [0319], [0360], [0366], [0381], [0296], [0424]	1, 4-8, 11-15	Y		2-3, 16-20	Y	Maurer et al. FEV acts as a transcriptional repressor through its DNA-binding ETS domain and alanine-rich domain. Oncogene 2003, 22:3319-3329; Fig 1; pg 3320, para 3	2-3, 18-20	Y	US 2004/0016006 A1 (Ji et al.) 22 Jan 2004 (22.01.2004); para [0021]	2-3, 18-20	Y	US 2004/0253256 A1 (CHEUNG) 16 Dec 2004 (16.12.2004); para [0006]	16-17
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	US 2006/0211017 A1 (CHINNAIYAN et al.) 21 Sep 2006 (21.09.2006); para [0007], [0015], [0023], [0030], [0059], [0060], [0319], [0360], [0366], [0381], [0296], [0424]	1, 4-8, 11-15																		
Y		2-3, 16-20																		
Y	Maurer et al. FEV acts as a transcriptional repressor through its DNA-binding ETS domain and alanine-rich domain. Oncogene 2003, 22:3319-3329; Fig 1; pg 3320, para 3	2-3, 18-20																		
Y	US 2004/0016006 A1 (Ji et al.) 22 Jan 2004 (22.01.2004); para [0021]	2-3, 18-20																		
Y	US 2004/0253256 A1 (CHEUNG) 16 Dec 2004 (16.12.2004); para [0006]	16-17																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>																				
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family																				
Date of the actual completion of the international search 08 October 2009 (08.10.2009)		Date of mailing of the international search report 22 OCT 2009																		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young 05.1.2010 PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 08/54820
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 9-10 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
Group I+: claims 1-8, 11-20, drawn to a method comprising assaying a sample the expression level of at least two gene markers of prostate cancer. The first invention encompasses assaying the expression level of FEV and TUSC4 genes, the first two entries depicted in Fig 14. Additional markers will be searched for an additional fee, if Applicant specifies them.		
The inventions listed as Group I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:		
Please see Continuation Sheet		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-8 and 11-20 restricted to FEV and TUSC4 genes, the first two entries depicted in Fig 14.
Remark on Protest	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/54820

Continuation of Box No. III

Inventions of Group I+ share the technical feature of assaying a sample the expression level of at least two gene markers of prostate cancer. However, this shared technical feature does not represent a contribution over the prior art. Specifically, an article entitled "Advances in Brief Analysis of Gene Expression Identifies Candidate Markers and Pharmacological Targets in Prostate Cancer" by Welsh, et al. (CANCER RESEARCH 15 Aug 2001, 61:5974-5978) discloses said method. "To better estimate the extent of the similarity among prostate cancers, we selected 788 of these genes the expression of which was inferred to be specific to the malignant cells... Among the 20 most significantly different genes identified by this method, we found high expression of IGFBP-2 and IGFBP-5 [i.e., Gene #306 depicted in Fig 14 of instant application] in group 3 (Gleason score, 8 or 9) compared with groups 1 and 2 (Gleason scores, 5, 6, or 7; data not shown). Both of these genes have been reported as elevated in high-grade tumors" (pg 5978, col 1). As the claimed method was known at the time of the invention, it cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the inventions of Group I+.

Group I+ therefore lacks unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

NOTE:

Claims 9-10 are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4 (a). These claims are improper multiple dependent claims.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100077517

弁理士 石田 敬

(74)代理人 100087871

弁理士 福本 積

(74)代理人 100087413

弁理士 古賀 哲次

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 マ, シャオ - ジュン

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 3 0, サンディエゴ, カレ マー ドゥ アルモニア
4 4 8 2

(72)発明者 ウー, チン - リー

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 4 5 9, ニュートン, パーカー ストリート 4 2

(72)発明者 アーランダー, マーク ジー .

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 0 2 4, エンシニタス, ローゼル ストリート 1 1 0 2
5, スイート 2 0 0

F ターム(参考) 2G045 AA26 CB01 DA14 FB02

4B024 AA12 CA04 CA12 HA14

4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ42 QQ53 QR32 QR36 QR40 QR55 QR62

QR72 QS25 QS34

专利名称(译)	前列腺癌的存活和复发		
公开(公告)号	JP2010518868A	公开(公告)日	2010-06-03
申请号	JP2009551054	申请日	2008-02-25
[标]申请(专利权)人(译)	生物治疗诊断学团雷开球德 总医院集团		
申请(专利权)人(译)	生物治疗诊断学，团雷开球德 总医院集团		
[标]发明人	マシャオジュン ウーチンリー アーランダーマークジー		
发明人	マ,シャオ-ジュン ウー,チン-リー アーランダー,マーク ジー.		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/50.P G01N33/53.M		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB01 2G045/DA14 2G045/FB02 4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR40 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QS25 4B063/QS34		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 中村弘 池田 达则		
优先权	60/891477 2007-02-23 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开包括基因表达谱或模式的鉴定和使用，其与前列腺癌具有临床相关性。特别地，本公开内容基于与患者存活和前列腺癌复发相关的基因的身份。基因表达谱可以体现在核酸表达，蛋白质表达或其他表达形式中，并用于预测患有前列腺癌的受试者的存活并预测前列腺癌复发。该谱还可以用于前列腺癌细胞和组织的研究和/或诊断，以及用于研究和/或确定患者的预后。当用于诊断或预后时，概况可用于基于可能的预期寿命和癌症复发和/或转移来确定前列腺癌的治疗。

Figure 2

