

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-47101

(P2015-47101A)

(43) 公開日 平成27年3月16日(2015.3.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q</b> 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 M</b> 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B O 2 9
<b>G O 1 N</b> 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 B O 6 3
<b>G O 1 N</b> 37/00 (2006.01)	G O 1 N 37/00 I O 2	
<b>C 1 2 N</b> 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-179877 (P2013-179877)	(71) 出願人	504176911 国立大学法人大阪大学 大阪府吹田市山田丘1番1号
(22) 出願日	平成25年8月30日 (2013.8.30)	(71) 出願人	390014960 シスメックス株式会社 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
		(74) 代理人	110000280 特許業務法人サンクレスト国際特許事務所
		(72) 発明者	野口 眞三郎 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法 人大阪大学内
		(72) 発明者	直居 靖人 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法 人大阪大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳癌術前化学療法に対する感受性の診断補助方法および判定装置

## (57) 【要約】

【課題】 E R 陽性の症例における乳癌術前化学療法に対する感受性および E R 陰性の症例における乳癌術前化学療法に対する感受性の双方を精度よく判定することができる乳癌術前化学療法に対する感受性の診断補助方法を提供する。

【解決手段】 被験者から採取された検体から抽出された R N A を増幅し、測定用試料を調製し、当該測定用試料を用いて、所定の各遺伝子の発現量を測定し、前記発現量を解析した結果に基づいて、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

( I - 1 ) 被験者から採取された検体から R N A を含む測定用試料を調製する工程、  
 ( I - 2 ) 前記工程 ( I - 1 ) で得られた測定用試料を用い、下記 ( A 1 ) ~ ( A 1 9 ) の遺伝子の発現量を測定する工程、

( A 1 ) ヒトのカスパーゼリクルートメントドメインファミリー、メンバー 9 ( C A R D 9 ) 遺伝子、

( A 2 ) ヒトのインドールアミン - 2 , 3 - ジオキシゲナーゼ 1 ( I D O 1 ) 遺伝子、

( A 3 ) ヒトのケモカイン ( C - X - C モチーフ ) リガンド 9 ( C X C L 9 ) 遺伝子、

( A 4 ) ヒトのプリンヌクレオシドホスホリラーゼ ( P N P ) 遺伝子、

( A 5 ) ヒトのケモカイン ( C - X - C モチーフ ) リガンド 1 1 ( C X C L 1 1 ) 遺伝子、

( A 6 ) ヒトの C C A A T / エンハンサーバインディングプロテイン ( C E B P B ) 遺伝子、

( A 7 ) ヒトの C D 8 3 遺伝子、

( A 8 ) ヒトのインターロイキン 6 シグナルトランスデューサー ( I L 6 S T ) 遺伝子、

( A 9 ) ヒトのケモカイン ( C - X 3 - C ) レセプター 1 ( C X 3 C R 1 ) 遺伝子、

( A 1 0 ) ヒトの C D 1 D 遺伝子、

( A 1 1 ) ヒトのカテプシン C ( C T S C ) 遺伝子、

( A 1 2 ) ヒトのケモカイン ( C - X - C モチーフ ) リガンド 1 0 ( C X C L 1 0 ) 遺伝子、

( A 1 3 ) ヒトの免疫グロブリン重鎖遺伝子座 G 1 アイソタイプ ( I G H G 1 ) 遺伝子、

( A 1 4 ) ヒトのジンクフィンガー E - ボックス結合ホメオボックス 1 ( Z E B 1 ) 遺伝子、

( A 1 5 ) ヒトの血管内皮細胞増殖因子 A ( V E G F A ) 遺伝子、

( A 1 6 ) ヒトのセマフォリン - 3 C 前駆体 ( S E M A 3 C ) 遺伝子、

( A 1 7 ) ヒトの補体レセプター ( C R 2 ) 遺伝子、

( A 1 8 ) ヒトの H F E 遺伝子、

( A 1 9 ) ヒトの E D A 遺伝子、

( I - 3 ) 前記工程 ( I - 2 ) で測定された前記各遺伝子の発現量を解析する工程、および

( I - 4 ) 前記工程 ( I - 3 ) で得られた解析結果に基づいて、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定する工程

を含む、乳癌術前化学療法に対する感受性の診断補助方法。

## 【請求項 2】

( I I - 1 ) 被験者から採取された検体から R N A を含む測定用試料を調製する工程、  
 ( I I - 2 ) 前記工程 ( I I - 1 ) で得られた測定用試料を用い、下記 ( B 1 ) ~ ( B 2 3 ) のプローブによって検出される各核酸の発現量を測定する工程、

( B 1 ) 配列番号 : 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 2 ) 配列番号 : 2 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 3 ) 配列番号 : 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 4 ) 配列番号 : 4 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 5 ) 配列番号 : 5 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

10

20

30

40

50

( B 6 ) 配列番号 : 6 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 7 ) 配列番号 : 7 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 8 ) 配列番号 : 8 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 9 ) 配列番号 : 9 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 0 ) 配列番号 : 1 0 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 1 ) 配列番号 : 1 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 2 ) 配列番号 : 1 2 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 3 ) 配列番号 : 1 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 4 ) 配列番号 : 1 4 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 5 ) 配列番号 : 1 5 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 6 ) 配列番号 : 1 6 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 7 ) 配列番号 : 1 7 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 8 ) 配列番号 : 1 8 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 9 ) 配列番号 : 1 9 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 2 0 ) 配列番号 : 2 0 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 2 1 ) 配列番号 : 2 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 2 2 ) 配列番号 : 2 2 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 2 3 ) 配列番号 : 2 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( I I - 3 ) 前記工程 ( I I - 2 ) で測定された前記各核酸の発現量を解析する工程、および

( I I - 4 ) 前記工程 ( I I - 3 ) で得られた解析結果に基づいて、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定する工程

を含む、乳癌術前化学療法に対する感受性の診断補助方法。

**【請求項 3】**

前記発現量を、表 1 に記載されたプローブセットを用いて測定する請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

20

30

40

【表 1】

表1

測定対象の 核酸の番号	プローブセット ID	プローブの標的 ホリスケルトの塩基配列	プローブの 塩基配列
1	220162_s_at	配列番号:1	配列番号:24~34
2	210029_at	配列番号:2	配列番号:35~45
3	203915_at	配列番号:3	配列番号:46~56
4	201695_s_at	配列番号:4	配列番号:57~67
5	211122_s_at	配列番号:5	配列番号:68~78
6	212501_at	配列番号:6	配列番号:79~89
7	204440_at	配列番号:7	配列番号:90~100
8	204864_s_at	配列番号:8	配列番号:101~111
9	205898_at	配列番号:9	配列番号:112~122
10	205789_at	配列番号:10	配列番号:123~133
11	201487_at	配列番号:11	配列番号:134~144
12	204533_at	配列番号:12	配列番号:145~155
13	216541_x_at	配列番号:13	配列番号:156~166
14	211000_s_at	配列番号:14	配列番号:167~177
15	212758_s_at	配列番号:15	配列番号:178~188
16	210512_s_at	配列番号:16	配列番号:189~199
17	203788_s_at	配列番号:17	配列番号:200~210
18	205544_s_at	配列番号:18	配列番号:211~221
19	204863_s_at	配列番号:19	配列番号:222~232
20	211331_x_at	配列番号:20	配列番号:233~243
21	206217_at	配列番号:21	配列番号:244~254
22	210875_s_at	配列番号:22	配列番号:255~265
23	210163_at	配列番号:23	配列番号:266~276

10

20

## 【請求項 4】

前記発現量の解析を、クラス分け手法を用いて行なう請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

30

## 【請求項 5】

前記発現量の解析において、前記発現量と、式 (I) :

## 【数 1】

$$D = \sum_i (w_i \times y_i) - 3.327217 \quad (I)$$

〔式中、 $i$  は表 2 に記載の各核酸に付与された番号を示し、 $w_i$  は表 2 に記載された番号  $i$  の核酸の重み係数を示し、 $y_i$  は式 (II) :

## 【数 2】

$$y_i = x_i - m_i \quad (II)$$

40

〔式中、 $x_i$  は表 2 に記載された番号  $i$  の核酸の発現量を示し、 $m_i$  は表 2 に記載された番号  $i$  の核酸の発現量の検体に渡る平均値を示す〕

で表わされる式にしたがって標準化された核酸の発現量を示し、 $\sum_i$  は各核酸に渡る総和を示す〕

で表わされる判別式とを用いて当該判別式の解  $D$  を求め、

前記工程 (I - 4) または前記 (II - 4) において、前記判別式の解  $D$  が正の数であるとき、乳癌術前化学療法に対して感受性であり、解  $D$  が 0 または負の数であるとき、乳癌術前化学療法に対して非感受性であると判定する請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法

50

## 【表 2】

表2

測定対象の 核酸の番号	重み係数
1	2.36157982
2	0.52753582
3	0.53572137
4	1.29673603
5	0.43776638
6	1.09614395
7	1.15413279
8	-0.9979555
9	-0.8464557
10	0.70349967
11	1.26206632
12	0.48170925
13	0.78467717
14	-1.0561303
15	-0.9015298
16	0.9410118
17	-0.5801453
18	0.79719845
19	-0.9638602
20	-1.352304
21	-1.2313651
22	-0.6378182
23	0.44921773

10

20

## 【請求項 6】

前記検体が乳癌細胞を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 7】

前記発現量が、マイクロアレイを用いて測定される、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

30

## 【請求項 8】

被験者から採取された検体から調製された RNA を含む測定用試料における下記 ( A 1 ) ~ ( A 1 9 ) の各遺伝子の発現量の情報を取得する取得部と、

前記取得部によって取得された各遺伝子の発現量の情報に基づいて、乳癌術前化学療法に対する感受性の感受性を判定する判定部と、

前記判定部の判定結果を出力する出力部と、

を備えていることを特徴とする、乳癌術前化学療法に対する感受性の判定装置。

( A 1 ) ヒトのカスパーゼリクルートメントドメインファミリー、メンバー 9 ( C A R D 9 ) 遺伝子、

( A 2 ) ヒトのインドールアミン - 2 , 3 - ジオキシゲナーゼ 1 ( I D O 1 ) 遺伝子、

( A 3 ) ヒトのケモカイン ( C - X - C モチーフ ) リガンド 9 ( C X C L 9 ) 遺伝子、

( A 4 ) ヒトのプリンヌクレオシドホスホリラーゼ ( P N P ) 遺伝子、

( A 5 ) ヒトのケモカイン ( C - X - C モチーフ ) リガンド 1 1 ( C X C L 1 1 ) 遺伝子、

( A 6 ) ヒトの C C A A T / エンハンサーバインディングプロテイン ( C E B P B ) 遺伝子、

( A 7 ) ヒトの C D 8 3 遺伝子、

( A 8 ) ヒトのインターロイキン 6 シグナルトランスデューサー ( I L 6 S T ) 遺伝子

40

50

- 、
- ( A 9 ) ヒトのケモカイン ( C - X 3 - C ) レセプター 1 ( C X 3 C R 1 ) 遺伝子、
  - ( A 1 0 ) ヒトの C D 1 D 遺伝子、
  - ( A 1 1 ) ヒトのカテプシン C ( C T S C ) 遺伝子、
  - ( A 1 2 ) ヒトのケモカイン ( C - X - C モチーフ ) リガンド 1 0 ( C X C L 1 0 ) 遺伝子、
  - ( A 1 3 ) ヒトの免疫グロブリン重鎖遺伝子座 G 1 アイソタイプ ( I G H G 1 ) 遺伝子
- 、
- ( A 1 4 ) ヒトのジンクフィンガー E - ボックス結合ホメオボックス 1 ( Z E B 1 ) 遺伝子、
  - ( A 1 5 ) ヒトの血管内皮細胞増殖因子 A ( V E G F A ) 遺伝子、
  - ( A 1 6 ) ヒトのセマフォリン - 3 C 前駆体 ( S E M A 3 C ) 遺伝子、
  - ( A 1 7 ) ヒトの補体レセプター ( C R 2 ) 遺伝子、
  - ( A 1 8 ) ヒトの H F E 遺伝子、および
  - ( A 1 9 ) ヒトの E D A 遺伝子

10

## 【請求項 9】

被験者から採取された検体から調製された R N A を含む測定用試料における下記 ( B 1 ) ~ ( B 2 3 ) のプローブによって検出される各核酸の発現量の情報を取得する取得部と

、  
前記取得部によって取得された各遺伝子の発現量の情報に基づいて、乳癌術前化学療法に対する感受性の感受性を判定する判定部と、

20

前記判定部の判定結果を出力する出力部と、

を備えていることを特徴とする、乳癌術前化学療法に対する感受性の判定装置。

( B 1 ) 配列番号： 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 2 ) 配列番号： 2 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 3 ) 配列番号： 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 4 ) 配列番号： 4 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

30

( B 5 ) 配列番号： 5 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 6 ) 配列番号： 6 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 7 ) 配列番号： 7 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 8 ) 配列番号： 8 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 9 ) 配列番号： 9 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

40

( B 1 0 ) 配列番号： 1 0 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 1 ) 配列番号： 1 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 2 ) 配列番号： 1 2 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 3 ) 配列番号： 1 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 4 ) 配列番号： 1 4 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とする

50

プローブ、

( B 1 5 ) 配列番号 : 1 5 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とする  
プローブ、

( B 1 6 ) 配列番号 : 1 6 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とする  
プローブ、

( B 1 7 ) 配列番号 : 1 7 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とする  
プローブ、

( B 1 8 ) 配列番号 : 1 8 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とする  
プローブ、

( B 1 9 ) 配列番号 : 1 9 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とする  
プローブ、

( B 2 0 ) 配列番号 : 2 0 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とする  
プローブ、

( B 2 1 ) 配列番号 : 2 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とする  
プローブ、

( B 2 2 ) 配列番号 : 2 2 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とする  
プローブ、および

( B 2 3 ) 配列番号 : 2 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とする  
プローブ

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、乳癌術前化学療法に対する感受性の診断補助方法および判定装置に関する。さらに詳しくは、本発明は、乳癌術前化学療法に対する感受性の診断を補助する情報の提供に有用な乳癌術前化学療法に対する感受性の診断補助方法および判定装置に関する。

【0002】

近年、局所進行乳癌の手術の適応性を向上させることだけでなく、比較的腫瘍の大きな患者に対する乳房温存手術の適応性を向上させることを目的として、乳癌の術前化学療法を受ける患者の数が増加している。また、乳癌術前化学療法によって病理学的完全寛解（以下、「pCR」ともいう）を得た場合、その患者の予後が良好であることが知られている。

【0003】

現在、臨床上、タキサンおよびアンスラサイクリンを用いる逐次化学療法が多く実施されている。しかし、前記逐次化学療法のpCR率（pCRに至った症例数/化学療法を受けた全症例数）は、10～30%であり、必ずしも高くはないのが現状である。また、エストロゲン受容体（以下、「ER」という）陽性の症例とER陰性の症例とを比べると、ER陰性の症例のほうが、pCR率が高いことが報告されている。しかし、ER陰性を示す症例であっても、全ての症例が乳癌術前化学療法によってpCRとなるとは限らない一方、ER陽性を示す症例であっても、乳癌術前化学療法によってpCRとなることもある。そのため、ER陽性およびER陰性に基づく分類などによらず、乳癌術前化学療法に対する感受性を精度よく判定することができる方法が求められている。

【0004】

乳癌術前化学療法に対する感受性を予測する方法として、例えば、被験者から採取された検体から抽出されたRNAを用いて所定の遺伝子群の発現量を測定および解析して乳癌術前化学療法に対する感受性を判定する方法が提案されている（例えば、特許文献1参照）。しかし、特許文献1に記載の方法では、測定対象の遺伝子群としてER遺伝子を含む遺伝子群が用いられている。

【0005】

一方、非特許文献1には、DNAマイクロアレイを用いる網羅的遺伝子発現解析による遺伝子発現プロファイルから、ケモカインレセプター-3のシグナル伝達に關与する遺伝

10

20

30

40

50

子群、ケモカインレセプター - 5 のシグナル伝達に關与する遺伝子群およびインターロイキン - 8 のシグナル伝達に關与する遺伝子群などが E R 陽性乳癌における化学療法応答性と關連していることが開示されているが、具体的に特定した遺伝子群を用いた感受性の予測判定については行われていない。

【 0 0 0 6 】

また、非特許文献 2 には、体液性免疫系を担う B 細胞に關連する遺伝子群からなる B 細胞メタジーンが、リンパ節転移陰性であって高増殖性の乳癌の予後因子であることが開示されている。そして、非特許文献 3 には、イムノグロブリン C 遺伝子の発現量が、B 細胞メタジーンと相關するとともに、E R 陰性乳癌におけるアンストラサイクリンを用いる化学療法に対する感受性の予測に有用であることが開示されている。

10

【 0 0 0 7 】

さらに、非特許文献 4 には、E R 陰性の乳癌症例における予後マーカーとして免疫応答性に關連する 7 つの遺伝子 ( C 1 Q A 、 X C L 2 、 S P P 1 、 T N F R S F 1 7 、 L Y 9 、 I G L C 2 および H L A - F の各遺伝子 ) からなる遺伝子群が開示されている。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 特許文献 1 】 国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 5 5 3 3 号

【 非特許文献 】

【 0 0 0 9 】

20

【 非特許文献 1 】 イワモト ( I w a m o t o T ) ら、「乳癌の分子サブタイプにおける予後および化学療法感受性に關連する遺伝子経路 ( Gene pathways associated with prognosis and chemotherapy sensitivity in molecular subtypes of breast cancer. )」、ジャーナル・オブ・ザ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート ( Journal of the National Cancer Institute )、2 0 1 1 年、第 1 0 3 卷、p . 2 6 4 - 2 7 2

【 非特許文献 2 】 シュミット ( S c h m i d t M ) ら、「体液性免疫機構は、リンパ節転移陰性乳癌における主要な予後的インパクトを有する ( The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. )」、キャンサー・リサーチ ( Cancer research )、2 0 0 8 年、第 6 8 卷、p . 5 4 0 5 - 5 4 1 3

30

【 非特許文献 3 】 シュミット ( S c h m i d t M ) ら、「ヒト遺伝子発現プロファイルの包括的分析は、ヒト固形腫瘍の適合性予後マーカーとして間質免疫グロブリン C を同定する ( A comprehensive analysis of human gene expression profiles identifies stromal immunoglobulin kappa C as a compatible prognostic marker in human solid tumors. )」、クリニカル・キャンサー・リサーチ ( Clinical Cancer Research )、2 0 1 2 年、第 1 8 卷、p . 2 6 9 5 - 2 7 0 3

40

【 非特許文献 4 】 テッシュェンドルフ ( T e s c h e n d o r f f A E ) ら、「免疫応答性遺伝子発現モジュールは、エストロゲン受容体陰性乳癌における良好な予後サブタイプを同定する ( An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. )」、ゲノム・バイオロジー ( Genome Biology )、2 0 0 7 年、第 8 卷、R 1 5 7

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

50

## 【 0 0 1 0 】

しかしながら、特許文献 1 および非特許文献 2 ~ 4 に記載の遺伝子や遺伝子群を用いて乳癌術前化学療法に対する感受性を予測した場合、後述するように、E R 陽性および E R 陰性に基いて分類された被験者群の検体や、乳癌術前化学療法のレジメンに基いて分類された被験者群の検体においては、乳癌術前化学療法に対する感受性の有無の判定の信頼性が低くなる場合があることが本発明者らによって明らかにされている。

## 【 0 0 1 1 】

本発明は、E R 陽性または陰性、化学療法のレジメンなどの被験者の背景によらず、乳癌術前化学療法に対する感受性の有無の双方をより精度よく診断するための補助となる情報を提供することができる乳癌術前化学療法に対する感受性の診断補助方法および判定装置を提供することを目的とする。

10

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 1 2 】

すなわち、本発明は、

〔 1 〕 ( I - 1 ) 被験者から採取された検体から R N A を含む測定用試料を調製する工程、

( I - 2 ) 前記工程 ( I - 1 ) で得られた測定用試料を用い、下記 ( A 1 ) ~ ( A 1 9 ) の遺伝子の発現量を測定する工程、

( A 1 ) ヒトのカスパーゼリクルートメントドメインファミリー、メンバー 9 ( C A R D 9 ) 遺伝子、

20

( A 2 ) ヒトのインドールアミン - 2 , 3 - ジオキシゲナーゼ 1 ( I D O 1 ) 遺伝子、

( A 3 ) ヒトのケモカイン ( C - X - C モチーフ ) リガンド 9 ( C X C L 9 ) 遺伝子、

( A 4 ) ヒトのプリンヌクレオシドホスホリラーゼ ( P N P ) 遺伝子、

( A 5 ) ヒトのケモカイン ( C - X - C モチーフ ) リガンド 1 1 ( C X C L 1 1 ) 遺伝子、

( A 6 ) ヒトの C C A A T / エンハンサーバインディングプロテイン ( C E B P B ) 遺伝子、

( A 7 ) ヒトの C D 8 3 遺伝子、

( A 8 ) ヒトのインターロイキン 6 シグナルトランスデューサー ( I L 6 S T ) 遺伝子

30

( A 9 ) ヒトのケモカイン ( C - X 3 - C ) レセプター 1 ( C X 3 C R 1 ) 遺伝子、

( A 1 0 ) ヒトの C D 1 D 遺伝子、

( A 1 1 ) ヒトのカテプシン C ( C T S C ) 遺伝子、

( A 1 2 ) ヒトのケモカイン ( C - X - C モチーフ ) リガンド 1 0 ( C X C L 1 0 ) 遺伝子、

( A 1 3 ) ヒトの免疫グロブリン重鎖遺伝子座 G 1 アイソタイプ ( I G H G 1 ) 遺伝子

( A 1 4 ) ヒトのジンクフィンガー E - ボックス結合ホメオボックス 1 ( Z E B 1 ) 遺伝子、

( A 1 5 ) ヒトの血管内皮細胞増殖因子 A ( V E G F A ) 遺伝子、

40

( A 1 6 ) ヒトのセマフォリン - 3 C 前駆体 ( S E M A 3 C ) 遺伝子、

( A 1 7 ) ヒトの補体レセプター ( C R 2 ) 遺伝子、

( A 1 8 ) ヒトの H F E 遺伝子、

( A 1 9 ) ヒトの E D A 遺伝子、

( I - 3 ) 前記工程 ( I - 2 ) で測定された前記各遺伝子の発現量を解析する工程、および

( I - 4 ) 前記工程 ( I - 3 ) で得られた解析結果に基づいて、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定する工程

を含む、乳癌術前化学療法に対する感受性の診断補助方法、

〔 2 〕 ( I I - 1 ) 被験者から採取された検体から R N A を含む測定用試料を調製する

50

工程、

( I I - 2 ) 前記工程 ( I I - 1 ) で得られた測定用試料を用い、下記 ( B 1 ) ~ ( B 2 3 ) のプローブによって検出される各核酸の発現量を測定する工程、

( B 1 ) 配列番号 : 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 2 ) 配列番号 : 2 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 3 ) 配列番号 : 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 4 ) 配列番号 : 4 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 5 ) 配列番号 : 5 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 6 ) 配列番号 : 6 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 7 ) 配列番号 : 7 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 8 ) 配列番号 : 8 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 9 ) 配列番号 : 9 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 0 ) 配列番号 : 1 0 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 1 ) 配列番号 : 1 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 2 ) 配列番号 : 1 2 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 3 ) 配列番号 : 1 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 4 ) 配列番号 : 1 4 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 5 ) 配列番号 : 1 5 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 6 ) 配列番号 : 1 6 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 7 ) 配列番号 : 1 7 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 8 ) 配列番号 : 1 8 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 1 9 ) 配列番号 : 1 9 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 2 0 ) 配列番号 : 2 0 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 2 1 ) 配列番号 : 2 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 2 2 ) 配列番号 : 2 2 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( B 2 3 ) 配列番号 : 2 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、

( I I - 3 ) 前記工程 ( I I - 2 ) で測定された前記各核酸の発現量を解析する工程、お

10

20

30

40

50

よび

( I I - 4 ) 前記工程 ( I I - 3 ) で得られた解析結果に基づいて、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定する工程

を含む、乳癌術前化学療法に対する感受性の診断補助方法、

〔 3 〕 前記発現量を、表 1 に記載されたプローブセットを用いて測定する前記〔 1 〕または〔 2 〕に記載の方法、

〔 4 〕 前記発現量の解析を、クラス分け手法を用いて行なう前記〔 1 〕～〔 3 〕のいずれかに記載の方法、

〔 5 〕 前記発現量の解析において、前記各核酸の発現量と、式 ( I ) :

【 0 0 1 3 】

【 数 1 】

$$D = \sum_i (w_i \times y_i) - 3.327217 \quad (I)$$

【 0 0 1 4 】

〔 式中、 $i$  は表 2 に記載の各核酸に付与された番号を示し、 $w_i$  は表 2 に記載された番号  $i$  の核酸の重み係数を示し、 $y_i$  は式 ( I I ) :

【 0 0 1 5 】

【 数 2 】

$$y_i = x_i - m_i \quad (II)$$

【 0 0 1 6 】

( 式中、 $x_i$  は表 2 に記載された番号  $i$  の核酸の発現量を示し、 $m_i$  は表 2 に記載された番号  $i$  の核酸の発現量の検体に渡る平均値を示す )

で表わされる式にしたがって標準化された核酸の発現量を示し、 $\sum_i$  は各核酸に渡る総和を示す )

で表わされる判別式とを用いて当該判別式の解  $D$  を求め、

前記工程 ( I - 4 ) または前記 ( I I - 4 ) において、前記判別式の解  $D$  が正の数であるとき、乳癌術前化学療法に対して感受性であり、解  $D$  が 0 または負の数であるとき、乳癌術前化学療法に対して非感受性であると判定する前記〔 1 〕～〔 4 〕のいずれかに記載の方法、

〔 6 〕 前記検体が乳癌細胞を含む、前記〔 1 〕～〔 5 〕のいずれかに記載の方法、

〔 7 〕 前記発現量が、マイクロアレイを用いて測定される、前記〔 1 〕～〔 6 〕のいずれかに記載の方法、

〔 8 〕 被験者から採取された検体から調製された RNA を含む測定用試料における前記 ( A 1 ) ~ ( A 1 9 ) の各遺伝子の発現量の情報を取得する取得部と、

前記取得部によって取得された各遺伝子の発現量の情報に基づいて、乳癌術前化学療法に対する感受性の感受性を判定する判定部と、

前記判定部の判定結果を出力する出力部と、

を備えていることを特徴とする、乳癌術前化学療法に対する感受性の判定装置、ならびに

〔 9 〕 被験者から採取された検体から調製された RNA を含む測定用試料における前記 ( B 1 ) ~ ( B 2 3 ) のプローブによって検出される各核酸の発現量の情報を取得する取得部と、

前記取得部によって取得された各遺伝子の発現量の情報に基づいて、乳癌術前化学療法に対する感受性の感受性を判定する判定部と、

前記判定部の判定結果を出力する出力部と、

を備えていることを特徴とする、乳癌術前化学療法に対する感受性の判定装置に関する。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 7 】

本発明の乳癌術前化学療法に対する感受性の診断補助方法および判定装置によれば、 E

10

20

30

40

50

R陽性または陰性、化学療法のレジメンなどの被験者の背景によらず、乳癌術前化学療法に対する感受性の有無の双方をより精度よく診断するための補助となる情報を提供することができるという優れた効果が奏される。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】本発明の一実施形態に係る乳癌術前化学療法に対する感受性の判定装置の概略説明図である。

【図2】図1に示された判定装置の機能構成を示すブロック図である。

【図3】図1に示された判定装置のハードウェア構成を示すブロック図である。

【図4】図1に示された判定装置を用いた乳癌術前化学療法に対する感受性の判定のフローチャートである。

【図5】実施例1において、プローブセット数と正確度との関係を調べた結果を示す。

【図6】実施例1において、トレーニングセットについて、式(I)で表わされる判別式による判定結果と、病理学的診断結果とを比較した結果を示す。

【図7】実施例1において、バリデーションセットについて、式(I)で表わされる判別式による判定結果と、病理学的診断結果とを比較した結果を示す。

【図8】実施例2において、式(I)で表わされる判別式による判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を示す。

【図9】実施例3において、式(I)で表わされる判別式による判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を示す。

【図10】実施例4において、式(I)で表わされる判別式による判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を示す。

【図11】比較例1において、被験者群1-1~1-6について、特許文献1の表1および表2に記載された70個のプローブセットに対応する遺伝子の発現量を用いて得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を示す。

【図12】比較例1において、被験者群2-1~2-3について、特許文献1の表1および表2に記載された70個のプローブセットに対応する遺伝子の発現量を用いて得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を示す。

【図13】比較例1において、被験者群3-1~3-5について、特許文献1の表1および表2に記載された70個のプローブセットに対応する遺伝子の発現量を用いて得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を示す。

【図14】比較例2において、被験者群1-1~1-6について、非特許文献2に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を示す。

【図15】比較例2において、被験者群2-1~2-3について、非特許文献2に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を示す。

【図16】比較例2において、被験者群3-1~3-5について、非特許文献2に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を示す。

【図17】比較例3において、被験者群1-1~1-6について、非特許文献3に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を示す。

【図18】比較例3において、被験者群2-1~2-3について、非特許文献3に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を示す。

【図19】比較例3において、被験者群3-1~3-5について、非特許文献3に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を示す。

【図20】比較例4において、被験者群1-1~1-6について、非特許文献4に記載さ

10

20

30

40

50

れた方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を示す。

【図 2 1】比較例 4 において、被験者群 2 - 1 ~ 2 - 3 について、非特許文献 4 に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を示す。

【図 2 2】比較例 4 において、被験者群 3 - 1 ~ 3 - 5 について、非特許文献 4 に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明の乳癌術前化学療法に対する感受性の診断補助方法は、1つの側面では、

(I - 1) 被験者から採取された検体から RNA を含む測定用試料を調製する工程、

(I - 2) 前記工程 (I - 1) で得られた測定用試料を用い、下記 (A 1) ~ (A 19) の遺伝子の発現量を測定する工程、

(A 1) ヒトのカスパーゼリクルートメントドメインファミリー、メンバー 9 (CARD 9) 遺伝子、

(A 2) ヒトのインドールアミン - 2, 3 - ジオキシゲナーゼ 1 (IDO 1) 遺伝子、

(A 3) ヒトのケモカイン (C - X - C モチーフ) リガンド 9 (CXCL 9) 遺伝子、

(A 4) ヒトのプリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP) 遺伝子、

(A 5) ヒトのケモカイン (C - X - C モチーフ) リガンド 11 (CXCL 11) 遺伝子、

(A 6) ヒトの C C A A T / エンハンサーバインディングプロテイン (CEBP B) 遺伝子、

(A 7) ヒトの CD 8 3 遺伝子、

(A 8) ヒトのインターロイキン 6 シグナルトランスデューサー (IL 6 ST) 遺伝子、

(A 9) ヒトのケモカイン (C - X 3 - C) レセプター 1 (CX3CR 1) 遺伝子、

(A 10) ヒトの CD 1 D 遺伝子、

(A 11) ヒトのカテプシン C (CTSC) 遺伝子、

(A 12) ヒトのケモカイン (C - X - C モチーフ) リガンド 10 (CXCL 10) 遺伝子、

(A 13) ヒトの免疫グロブリン重鎖遺伝子座 G 1 アイソタイプ (IGHG 1) 遺伝子、

(A 14) ヒトのジンクフィンガー E - ボックス結合ホメオボックス 1 (ZEB 1) 遺伝子、

(A 15) ヒトの血管内皮細胞増殖因子 A (VEGFA) 遺伝子、

(A 16) ヒトのセマフォリン - 3 C 前駆体 (SEMA 3 C) 遺伝子、

(A 17) ヒトの補体レセプター (CR 2) 遺伝子、

(A 18) ヒトの HFE 遺伝子、

(A 19) ヒトの EDA 遺伝子、

(I - 3) 前記工程 (I - 2) で測定された前記各遺伝子の発現量を解析する工程、および

(I - 4) 前記工程 (I - 3) で得られた解析結果に基づいて、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定する工程

を含む方法である (以下、「診断補助方法 1」ともいう)。

【0020】

また、本発明の乳癌術前化学療法に対する感受性の診断補助方法は、他の側面では、

(II - 1) 被験者から採取された検体から RNA を含む測定用試料を調製する工程、

(II - 2) 前記工程 (II - 1) で得られた測定用試料を用い、下記 (B 1) ~ (B 2 3) のプローブによって検出される各核酸の発現量を測定する工程、

10

20

30

40

50

- ( B 1 ) 配列番号 : 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 2 ) 配列番号 : 2 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 3 ) 配列番号 : 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 4 ) 配列番号 : 4 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 5 ) 配列番号 : 5 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 6 ) 配列番号 : 6 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 7 ) 配列番号 : 7 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 8 ) 配列番号 : 8 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 9 ) 配列番号 : 9 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 1 0 ) 配列番号 : 1 0 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 1 1 ) 配列番号 : 1 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 1 2 ) 配列番号 : 1 2 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 1 3 ) 配列番号 : 1 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 1 4 ) 配列番号 : 1 4 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 1 5 ) 配列番号 : 1 5 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 1 6 ) 配列番号 : 1 6 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 1 7 ) 配列番号 : 1 7 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 1 8 ) 配列番号 : 1 8 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 1 9 ) 配列番号 : 1 9 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 2 0 ) 配列番号 : 2 0 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 2 1 ) 配列番号 : 2 1 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 2 2 ) 配列番号 : 2 2 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( B 2 3 ) 配列番号 : 2 3 に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドを標的とするプローブ、
- ( I I - 3 ) 前記工程 ( I I - 2 ) で測定された前記各核酸の発現量を解析する工程、および
- ( I I - 4 ) 前記工程 ( I I - 3 ) で得られた解析結果に基づいて、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定する工程

10

20

30

40

50

を含む方法である（以下、「診断補助方法2」ともいう）。

【0021】

なお、以下において、「所定の核酸」は、前記(A1)～(A19)の遺伝子および前記(B1)～(B23)のプロープによって検出される各核酸を包含する概念である。また、以下において、「所定の核酸の発現量」は、前記(A1)～(A19)の遺伝子の発現量および前記(B1)～(B23)のプロープによって検出される各核酸の発現量を包含する概念である。

【0022】

本発明の診断補助方法は、所定の核酸の発現量を測定し、解析するという操作が採用されているので、ER陽性の症例における乳癌術前化学療法に対する感受性の有無およびER陰性の症例における乳癌術前化学療法に対する感受性の有無の双方を精度よく判定することができる。したがって、本発明の診断補助方法によれば、得られた判定結果を診断支援情報として、診断を行なう者（医師など）に提供することにより、乳癌術前化学療法に対する感受性の診断を補助することができる。

10

【0023】

本発明者らは、配列番号：1～23のそれぞれを標的とする表1に記載されたプロープセットを用い、当該プロープセットによって検出される各核酸の発現量を測定し、かかる発現量を網羅的に解析した結果に基づいて乳癌術前化学療法に対する感受性を評価した場合に、ER陽性およびER陰性に基づく分類や、乳癌術前化学療法のレジメンに基づく分類などによらず、乳癌術前化学療法に対する感受性の有無を精度よく判定できることを見出した。本発明は、かかる知見に基づき完成されたものである。

20

【0024】

なお、本明細書において、「ポリヌクレオチドを標的とするプロープ」とは、当該ポリヌクレオチドの検出を目的として設計されたプロープをいう。通常、「ポリヌクレオチドを標的とするプロープ」は、当該ポリヌクレオチドの塩基配列の部分配列、または前記部分配列のうち1または数個のヌクレオチドが前記ポリヌクレオチドの塩基配列と異なる配列からなる。また、本明細書において、「ストリンジェントな条件」とは、ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションを行なう際に当業者が一般的に用いる条件である。前記「ストリンジェントな条件」は、プロープと検出対象となる核酸とがハイブリダイゼーションすることができる条件であれば、特に限定されるものではない。ハイブリダイゼーションを行なう際の条件のストリンジェンシーは、温度、ハイブリダイゼーション緩衝液の塩濃度、プロープの鎖長、プロープの塩基配列のGC含量およびハイブリダイゼーション緩衝液中のカオトロピック剤の濃度の関数であることが知られており、当業者であれば、これらの条件を考慮して適宜設定することができる。ストリンジェントな条件としては、例えば、モレキュラー・クロニング・ア・ラボラトリー・マニュアル第2版〔ザンブルーク(Sambrook, J.)ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.)、1998年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス発行〕に記載された条件などを用いることができる。

30

【0025】

本明細書において、「術前化学療法」とは、乳癌患者に対して手術前に腫瘍組織サイズの縮小を図ることなどの目的で施される抗がん剤治療法をいう。当該術前化学療法に用いられる薬剤は、抗がん作用を有していればよく、特に限定されるものではない。前記薬剤としては、例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、エピルピシン、シクロホスファミド、5-フルオロウラシル、アドリアマイシン、イキサベピロン、アンスラサイクリンなどが挙げられる。術前化学療法においては、これらの薬剤を単独でまたは2種類以上を併用して、所定の投薬スケジュールに基づいて患者に投与する。

40

【0026】

本発明の診断補助方法では、まず、被験者から採取された検体からRNAを含む測定用試料を調製する〔診断補助方法1の工程(I-1)および診断補助方法2の工程(II-2)〕。

50

## 【 0 0 2 7 】

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

## 【 0 0 2 8 】

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

10

## 【 0 0 2 9 】

つぎに、遺伝子の発現量、すなわち、当該遺伝子に対応する転写産物（mRNA）の産生量などを測定するのに適した測定用試料を調製する。例えば、所定の核酸の発現量の定量をRT-PCRによって行なう場合は、前記のように抽出されたRNAから精製されたmRNA、または前記のように抽出されたRNAをそのまま測定用試料として用いることができる。前記mRNAの精製は、公知の精製方法を用いて行なうことができる。また、mRNAの精製には、市販の精製キットを用いてもよい。一方、所定の核酸の発現量の定量をマイクロアレイによって行なう場合は、抽出されたRNAを用いて、対応するcDNAまたはcRNAを調製することによって測定用試料を取得することができる。

20

## 【 0 0 3 0 】

ここで、本明細書において、「cDNA」は、mRNAから逆転写により精製したDNAだけでなく、当該DNAの相補鎖、およびcDNAとcDNAの相補鎖との二本鎖DNAも含む。cDNAの増幅は、公知の方法により行なうことができる。cDNAの増幅には、cDNAの増幅するための市販のキットおよび核酸増幅装置を用いることもできる。ここで、前記市販のキットとしては、例えば、ニューゲン・テクノロジーズ（NuGEN Technologies）社製、商品名：WT-Ovation™ FFPE System V2などが挙げられる。

30

## 【 0 0 3 1 】

cRNAは、mRNAから逆転写されたcDNAから、DNA依存性RNAポリメラーゼを用いてインビトロ転写反応（IVT）によって合成され得る。DNA依存性RNAポリメラーゼとしては、例えば、T7 RNAポリメラーゼなどが挙げられるが、本発明は、かかる例示のみに限定されるものではない。マイクロアレイに適用する前に、必要に応じて、合成されたcRNAを精製してもよい。cRNAの精製には、エタノール沈殿などの当該技術分野において公知の方法や、市販の核酸精製キットを用いることができる。さらに、cRNAとマイクロアレイ上のプローブとのハイブリダイゼーションを容易にするために、cRNAを断片化してもよい。cRNAの断片化は、当該技術において公知の方法により行なうことができる。当該方法としては、例えば、金属イオン存在下で加熱する方法、リボヌクレアーゼなどの酵素を用いる方法などが挙げられるが、本発明は、かかる例示のみに限定されるものではない。

40

## 【 0 0 3 2 】

後述のマイクロアレイによる核酸の検出方法において、測定用試料中のcDNAまたはcRNAとプローブとのハイブリッドの形成を蛍光、色、放射線などの検出により測定する場合、当該cDNAまたはcRNAを、検出可能なシグナルを発生する物質、前記検出可能なシグナルを発生する物質と結合可能な物質などの標識物質で標識することが好ましい。当該標識物質としては、当該技術において通常用いられる物質であればよく、例えば、Cy3、Cy5、Alexa Fluor（登録商標）、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）などの蛍光物質；ビオチンなどのハプテン；放射性物質などが挙げら

50

れるが、本発明は、かかる例示のみに限定されるものではない。cDNAまたはcRNAを前記標識物質で標識する方法は、当該技術において公知である。例えば、cDNAやcRNAを合成する工程において、ビオチン化リボヌクレオチドまたはビオチン化デオキシリボヌクレオチドを基質として反応液に混合しておくことにより、ビオチンで標識されたcDNAまたはビオチンで標識されたcRNAを合成することができる。

【0033】

つぎに、得られた測定用試料を用い、前記所定の核酸の発現量を測定する〔診断補助方法1の工程(I-2)および診断補助方法2の工程(II-2)〕。

【0034】

診断補助方法1の工程(I-2)および診断補助方法2の工程(II-2)において、所定の核酸の発現量は、例えば、マイクロアレイ、定量的RT-PCR、定量的PCR、ノーザンブロット解析などにより測定することができる。これらのなかでは、所定の核酸の発現量を迅速、かつ簡便に測定することができることから、マイクロアレイを用いて測定することが好ましい。ここで、前記「所定の核酸の発現量」には、測定用試料中に含まれる所定の核酸のコピー数、測定用試料における当該所定の核酸の濃度、または前記所定の核酸のコピー数もしくは前記所定の核酸の濃度を表す値を含む。前記所定の核酸のコピー数もしくは前記所定の核酸の濃度を表す値としては、例えば、マイクロアレイに測定用試料を適用し、前記所定の核酸とマイクロアレイ上のプローブとをハイブリダイズさせた後、測定される蛍光の強度などが挙げられるが、本発明は、かかる例示のみに限定されるものではない。

10

20

【0035】

マイクロアレイによる前記所定の核酸の発現量の測定は、公知の方法を用いて行なうことができる。具体的には、例えば、ヒトゲノムの発現解析が可能なマイクロアレイであるアフィメトリクス(Affymetrix)社製の商品名: Human Genome U133 Plus 2.0 Arrayを用いることにより、前記所定の核酸の発現量を一度に測定することができる。具体的には、測定用試料をマイクロアレイに接触させて、測定用試料中のcDNAまたはcRNAをマイクロアレイ上のプローブとハイブリダイズさせ、前記所定の核酸を検出することができる。

【0036】

本発明の診断補助方法に用いられるマイクロアレイは、後述の(B1)~(B23)のプローブが基材上に配置されたものであればよく、特に限定されるものではない。前記マイクロアレイは、好ましくはDNAマイクロアレイ(DNAチップ)である。このようなマイクロアレイとしては、当該技術において公知の方法によって作製されたマイクロアレイ、市販のマイクロアレイなどが例示される。

30

【0037】

前記測定用試料とマイクロアレイとの接触は、前記測定用試料をマイクロアレイに添加することによって行なうことができる。この場合、前記測定用試料は、当該測定用試料の核酸濃度を定量し、当該核酸濃度がマイクロアレイによる検出に適する濃度になるように測定用試料を希釈した希釈物として用いてもよい。なお、前記測定用試料とマイクロアレイとの接触は、用いられるマイクロアレイの種類によって異なるが、通常、約10~70で2~20時間行なえばよい。また、前記測定用試料とマイクロアレイとの接触には、アフィメトリクス(Affymetrix)社の商品名: Hybridization Oven 640などを用いることもできる。

40

【0038】

さらに、測定用試料との接触後、プローブを介してマイクロアレイの基材上に固定されたcDNAまたはcRNAの染色および当該マイクロアレイの洗浄を行なってもよい。例えば、測定用試料中の前記所定の核酸に対応するcDNAもしくはcRNAがビオチンによって標識されている場合は、当該ビオチンに、アビジンまたはストレプトアビジンで標識した蛍光物質などを結合させることにより、マイクロアレイのプローブとハイブリダイズしたcDNAまたはcRNAの染色を行なうことができる。前記蛍光物質としては、例

50

えば、FITC、Alexa Fluor (商標)、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、ルシフェリン、フィコエリスリンなどが挙げられるが、本発明は、かかる例示のみに限定されるものではない。また、本実施形態においては、ビオチンにアビジンまたはストレプトアビジンを結合させた後、前記アビジンまたはストレプトアビジンに結合可能であり、かつ蛍光物質などで標識された抗体を、マイクロアレイに接触させることにより、プローブとハイブリダイズした測定対象の核酸の染色を行なうことができる。マイクロアレイの染色および洗浄は、マイクロアレイ洗浄・染色装置 (Affymetrix) 社の商品名: Fluidic Station 450) などを用いて行なうことができる。

#### 【0039】

前記 (A1) のヒトのカスパーゼリクルートメントドメインファミリー、メンバー9 (CARD9) 遺伝子は、GenBankアクセッション番号: NM\_022352に対応する配列を有する。

前記 (A2) のヒトのインドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ1 (IDO1) 遺伝子は、GenBankアクセッション番号: M34455に対応する配列を有する。

前記 (A3) のヒトのケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド9 (CXCL9) 遺伝子は、GenBankアクセッション番号: NM\_002416に対応する配列を有する。

前記 (A4) のヒトのプリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP) 遺伝子は、GenBankアクセッション番号: NM\_000270に対応する配列を有する。

前記 (A5) のヒトのケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド11 (CXCL11) 遺伝子は、GenBankアクセッション番号: AF002985またはAF030514に対応する配列を有する。

前記 (A6) のヒトのCCAAT/エンハンサーバインディングプロテイン (CEBPB) 遺伝子は、GenBankアクセッション番号: AL564683に対応する配列を有する。

前記 (A7) のヒトのCD83遺伝子は、GenBankアクセッション番号: NM\_004233に対応する配列を有する。

前記 (A8) のヒトのインターロイキン6シグナルトランスデューサー (IL6ST) 遺伝子は、GenBankアクセッション番号: NM\_002184、AB015706またはBE856546に対応する配列を有する。

前記 (A9) のヒトのケモカイン (C-X<sub>3</sub>-C) レセプター1 (CX3CR1) 遺伝子は、GenBankアクセッション番号: U20350に対応する配列を有する。

前記 (A10) のヒトのCD1D遺伝子は、GenBankアクセッション番号: NM\_001766に対応する配列を有する。

前記 (A11) のヒトのカテプシンC (CTSC) 遺伝子は、GenBankアクセッション番号: NM\_001814に対応する配列を有する。

前記 (A12) のヒトのケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド10 (CXCL10) 遺伝子は、GenBankアクセッション番号: NM\_001565に対応する配列を有する。

前記 (A13) のヒトの免疫グロブリン重鎖遺伝子座G1アイソタイプ (IGHG1) 遺伝子は、GenBankアクセッション番号: AJ275397に対応する配列を有する。

前記 (A14) のヒトのジンクフィンガーE-ボックス結合ホメオボックス1 (ZEB1) 遺伝子は、GenBankアクセッション番号: AI373166またはU12170に対応する配列を有する。

前記 (A15) のヒトの血管内皮細胞増殖因子A (VEGFA) 遺伝子は、GenBankアクセッション番号: AF022375に対応する配列を有する。

前記 (A16) のヒトのセマフォリン-3C前駆体 (SEMA3C) 遺伝子は、GenBankアクセッション番号: AI962897に対応する配列を有する。

前記 (A17) のヒトの補体レセプター (CR2) 遺伝子は、ヒトの補体レセプター (

10

20

30

40

50

C R 2 ) 遺伝子 ( G e n B a n k アクセション番号 : N M \_ 0 0 1 8 7 7 ) に対応する配列を有する。

前記 ( A 1 8 ) のヒトの H F E 遺伝子は、 G e n B a n k アクセション番号 : A F 1 4 4 2 4 3 に対応する配列を有する。

前記 ( A 1 9 ) のヒトの E D A 遺伝子は、 G e n B a n k アクセション番号 : N M \_ 0 0 1 3 9 9 に対応する配列を有する。

【 0 0 4 0 】

前記 ( B 1 ) のプローブは、配列番号 : 1 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 1 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

10

【 0 0 4 1 】

前記 ( B 2 ) のプローブは、配列番号 : 2 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 2 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

【 0 0 4 2 】

前記 ( B 3 ) のプローブは、配列番号 : 3 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 3 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

【 0 0 4 3 】

前記 ( B 4 ) のプローブは、配列番号 : 4 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 4 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

20

【 0 0 4 4 】

前記 ( B 5 ) のプローブは、配列番号 : 5 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 5 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

【 0 0 4 5 】

前記 ( B 6 ) のプローブは、配列番号 : 6 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 6 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

30

【 0 0 4 6 】

前記 ( B 7 ) のプローブは、配列番号 : 7 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 7 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

【 0 0 4 7 】

前記 ( B 8 ) のプローブは、配列番号 : 8 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 8 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

【 0 0 4 8 】

前記 ( B 9 ) のプローブは、配列番号 : 9 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 9 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

40

【 0 0 4 9 】

前記 ( B 1 0 ) のプローブは、配列番号 : 1 0 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 1 0 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

【 0 0 5 0 】

前記 ( B 1 1 ) のプローブは、配列番号 : 1 1 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 1 1 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

50

## 【 0 0 5 1 】

前記 ( B 1 2 ) のプローブは、配列番号 : 1 2 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 1 2 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

## 【 0 0 5 2 】

前記 ( B 1 3 ) のプローブは、配列番号 : 1 3 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 1 3 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

## 【 0 0 5 3 】

前記 ( B 1 4 ) のプローブは、配列番号 : 1 4 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 1 4 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

10

## 【 0 0 5 4 】

前記 ( B 1 5 ) のプローブは、配列番号 : 1 5 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 1 5 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

## 【 0 0 5 5 】

前記 ( B 1 6 ) のプローブは、配列番号 : 1 6 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 1 6 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

20

## 【 0 0 5 6 】

前記 ( B 1 7 ) のプローブは、配列番号 : 1 7 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 1 7 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

## 【 0 0 5 7 】

前記 ( B 1 8 ) のプローブは、配列番号 : 1 8 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 1 8 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

## 【 0 0 5 8 】

前記 ( B 1 9 ) のプローブは、配列番号 : 1 9 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 1 9 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

30

## 【 0 0 5 9 】

前記 ( B 2 0 ) のプローブは、配列番号 : 2 0 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 2 0 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

## 【 0 0 6 0 】

前記 ( B 2 1 ) のプローブは、配列番号 : 2 1 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 2 1 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

40

## 【 0 0 6 1 】

前記 ( B 2 2 ) のプローブは、配列番号 : 2 2 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 2 2 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

## 【 0 0 6 2 】

前記 ( B 2 3 ) のプローブは、配列番号 : 2 3 に示される塩基配列からなるポリペプチドを標的とするプローブである。かかるプローブは、配列番号 : 2 3 に示される塩基配列のうちの部分配列またはその相補的な配列からなる。

## 【 0 0 6 3 】

前記 ( B 1 ) ~ ( B 2 3 ) のプローブの長さは、通常、10 ~ 60ヌクレオチド長であ

50

り、乳癌術前化学療法に対する非感受性の有無をより精度よく判定する観点から、15～50ヌクレオチド長である。

【0064】

本発明においては、乳癌術前化学療法に対する感受性の有無を精度よく判定する観点から、表1に記載されたプローブセットを用いて前記所定の核酸の発現量の測定を行なうことが好ましい。

【0065】

【表1】

表1

測定対象の核酸の番号	プローブセットID	プローブの標的ホリスヌクレオチドの塩基配列	プローブの塩基配列
1	220162_s_at	配列番号:1	配列番号:24～34
2	210029_at	配列番号:2	配列番号:35～45
3	203915_at	配列番号:3	配列番号:46～56
4	201695_s_at	配列番号:4	配列番号:57～67
5	211122_s_at	配列番号:5	配列番号:68～78
6	212501_at	配列番号:6	配列番号:79～89
7	204440_at	配列番号:7	配列番号:90～100
8	204864_s_at	配列番号:8	配列番号:101～111
9	205898_at	配列番号:9	配列番号:112～122
10	205789_at	配列番号:10	配列番号:123～133
11	201487_at	配列番号:11	配列番号:134～144
12	204533_at	配列番号:12	配列番号:145～155
13	216541_x_at	配列番号:13	配列番号:156～166
14	211000_s_at	配列番号:14	配列番号:167～177
15	212758_s_at	配列番号:15	配列番号:178～188
16	210512_s_at	配列番号:16	配列番号:189～199
17	203788_s_at	配列番号:17	配列番号:200～210
18	205544_s_at	配列番号:18	配列番号:211～221
19	204863_s_at	配列番号:19	配列番号:222～232
20	211331_x_at	配列番号:20	配列番号:233～243
21	206217_at	配列番号:21	配列番号:244～254
22	210875_s_at	配列番号:22	配列番号:255～265
23	210163_at	配列番号:23	配列番号:266～276

10

20

30

【0066】

なお、表1において「プローブセットID」は、アフィメトリクス(Affymetrix)社製のヒトゲノム発現解析用アレイ〔商品名:Human Genome U133 Plus 2.0 Array〕において、基材上に固定されたプローブの11～20個をまとめたプローブセットそれぞれにつけられているID番号を示す。各プローブセットは、表1に示される配列番号の塩基配列からなるプローブを含む。

40

【0067】

つぎに、前記所定の核酸の発現量を解析する〔診断補助方法1の工程(I-3)および診断補助方法2の工程(II-3)〕。その後、得られた解析結果に基づいて、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定する〔診断補助方法1の工程(I-3)および診断補助方法2の工程(II-3)〕。

【0068】

診断補助方法1の工程(I-3)および診断補助方法2の工程(II-3)において、前記所定の核酸の発現量は、例えば、クラス分け手法、スコア化手法、クラスター解析手法などによって行なうことができる。

【0069】

50

前記クラス分け手法として、公知の方法を用いることができる。かかるクラス分け手法としては、例えば、対角線形判別分析〔Diagonal Linear Discriminant Analysis (DLDA)〕、Between-group analysis (BGA)、サポートベクターマシン (SVM)、k最近傍分類 (kNN)、決定木、Random Forest、ニューラルネットなどが挙げられる。これらのなかでは、乳癌術前化学療法に対する感受性の有無を簡便な操作で判定することができる観点から、DLDAが好ましい。かかるクラス分け手法を用いて発現量を解析する場合、前記発現量に基づいて、乳癌術前化学療法に対して感受性である検体と、非感受性である検体とにクラス分けがされる。したがって、この場合、診断補助方法1の工程 (I-3) および診断補助方法2の工程 (II-3) においては、かかるクラス分けの結果によって、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定することができる。

10

【0070】

診断補助方法1の工程 (I-3) および診断補助方法2の工程 (II-3) において、前記所定の核酸の発現量の解析をクラス分け手法であるDLDAによって行なう場合、DLDAを用いて構築された判別式を用いることができる。

【0071】

前記判別式としては、式 (I) :

【0072】

【数3】

$$D = \sum_i (w_i \times y_i) - 3.327217 \quad (I)$$

20

〔式中、 $i$  は表2に記載の各核酸に付与された番号を示し、 $w_i$  は表2に記載された番号  $i$  の核酸の重み係数を示し、 $y_i$  は式 (II) :

【0073】

【数4】

$$y_i = x_i - m_i \quad (II)$$

〔式中、 $x_i$  は表2に記載された番号  $i$  の核酸の発現量を示し、 $m_i$  は表2に記載された番号  $i$  の核酸の発現量の検体に渡る平均値を示す〕

30

で表わされる式にしたがって標準化された核酸の発現量を示し、 $\sum_i$  は各核酸に渡る総和を示す〕

で表わされる判別式が挙げられる。

【0074】

【表 2】

表2

測定対象の 核酸の番号	重み係数
1	2.36157982
2	0.52753582
3	0.53572137
4	1.29673603
5	0.43776638
6	1.09614395
7	1.15413279
8	-0.9979555
9	-0.8464557
10	0.70349967
11	1.26206632
12	0.48170925
13	0.78467717
14	-1.0561303
15	-0.9015298
16	0.9410118
17	-0.5801453
18	0.79719845
19	-0.9638602
20	-1.352304
21	-1.2313651
22	-0.6378182
23	0.44921773

10

20

## 【0075】

式 ( I ) で表わされる判別式を用いて各核酸の発現量を解析する場合、式 ( I ) で表わされる判別式の  $x_i$  (  $i = 1, 2, \dots, 23$  ) に、順に、検体における当該核酸の発現量の値を代入し、解 D を求める。この場合、前記工程 ( D ) においては、解 D が正の値のとき、乳癌術前化学療法に対して感受性であり、解 D がゼロまたは負の値のとき、乳癌術前化学療法に対して非感受性であると判定することができる。

30

## 【0076】

以上説明したように、本発明の診断補助方法によれば、前記所定の核酸の発現量を測定し、解析するという操作が採用されているので、ER陽性の症例における乳癌術前化学療法に対する感受性の有無およびER陰性の症例における乳癌術前化学療法に対する感受性の有無の双方を精度よく判定することができる。したがって、本発明の診断補助方法は、被験者の分類の種類によらず、乳癌術前化学療法に対する感受性の有無の双方を精度よく判定することができるので、乳癌術前化学療法の実施の適否の判断を助けるための情報や、治療を最適化するためのより適切な情報を提供するのに好適である。

40

## 【0077】

前述した乳癌術前化学療法に対する感受性の判定は、例えば、図 1 に示される判定装置 1 によって行なうことができる。以下、乳癌術前化学療法に対する感受性の判定に用いることができる判定装置を、添付の図面を参照しながら、より詳細に説明するが、本発明は、かかる実施形態のみに限定されるものではない。図 1 は、本発明の一実施形態に係る乳癌術前化学療法に対する感受性の判定装置の概略説明図である。図 1 に示された判定装置 1 は、測定装置 2 と、当該測定装置 2 と接続されたコンピュータシステム 3 とを含んでいる。

## 【0078】

本実施形態において、測定装置 2 は、マイクロアレイ上のプローブと結合した前記所定

50

の核酸に基づくシグナルを検出するマイクロアレイスキャナーである。本実施形態において、前記シグナルは、光学的情報である。前記光学的情報としては、例えば、蛍光シグナルなどが挙げられるが、本発明は、かかる例示のみに限定されるものではない。この場合、前記測定用試料と接触させた後のマイクロアレイを測定装置 2 にセットすると、測定装置 2 は、マイクロアレイ上のプローブに結合した前記所定の核酸に基づく光学的情報を取得し、得られた光学的情報をコンピュータシステム 3 に送信する。

【 0 0 7 9 】

前記マイクロアレイスキャナーは、前記所定の核酸に基づくシグナルの検出が可能なものであればよい。前記所定の核酸に基づくシグナルは、前記測定用試料中の c D N A または c R N A の標識に用いられた標識物質によって異なることから、マイクロアレイスキャナーは、標識物質の種類に応じて、当該標識物質から生じるシグナルを検出するのに適したものを適宜選択することができる。例えば、前記標識物質が放射性物質である場合、測定装置 2 として、当該放射性物質から生じる放射線を検出可能なマイクロアレイスキャナーを用いることができる。

10

【 0 0 8 0 】

なお、遺伝子の発現量を核酸増幅法により検出する場合、測定装置 2 は、核酸増幅検出装置であってもよい。この場合、測定用試料、核酸増幅用の酵素、プライマーなどを含む反応液を測定装置 2 にセットし、核酸増幅法によって反応液中の核酸を増幅する。測定装置 2 は、増幅反応によって反応液から生じる蛍光や反応液の濁度などの光学的情報を取得し、この光学的情報をコンピュータシステム 3 に送信する。

20

【 0 0 8 1 】

コンピュータシステム 3 は、コンピュータ本体 3 a と、入力デバイス 3 b と、検体情報、判定結果などを表示する表示部 3 c とを含む。コンピュータシステム 3 は、測定装置 2 から光学的情報を受信する。そして、コンピュータシステム 3 のプロセッサは、前記光学的情報に基づいて、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定するプログラムを実行する。

【 0 0 8 2 】

図 2 は、図 1 に示された判定装置の機能構成を示すブロック図である。

コンピュータシステム 3 は、図 2 に示されるように、取得部 3 0 1 と、記憶部 3 0 2 と、算出部 3 0 3 と、判定部 3 0 4 と、出力部 3 0 5 とを備える。取得部 3 0 1 は、測定装置 2 と、ネットワークを介して通信可能に接続されている。なお、算出部 3 0 3 と判定部 3 0 4 とは、制御部 3 0 6 を構成している。

30

取得部 3 0 1 は、測定装置 2 から送信された情報を取得する。記憶部 3 0 2 は、式 ( I ) で表わされる判定式および判定基準を記憶する。算出部 3 0 3 は、取得部 3 0 1 で取得された情報を用い、記憶部 3 0 2 に記憶された判定式にしたがって、判定式の解 D を算出する。判定部 3 0 4 は、算出部 3 0 3 によって算出された解 D と、記憶部 3 0 2 に記憶された判定基準とに基づいて乳癌術前化学療法に対する感受性の有無を判定する。出力部 3 0 5 は、判定部 3 0 4 による判定結果を出力する。

【 0 0 8 3 】

図 3 は、図 1 に示された判定装置のハードウェア構成を示すブロック図である。

図 3 に示されるように、コンピュータ本体 3 a は、CPU ( Central Processing Unit ) 3 0 と、ROM ( Read Only Memory ) 1 2 1 と、ROM 3 2 と、ハードディスク 3 3 と、入出力インターフェイス 3 4 と、読出装置 3 5 と、通信インターフェイス 3 6 と、画像出力インターフェイス 3 7 とを備えている。CPU 3 0、ROM 3 1、RAM ( Random Access Memory ) 3 2、ハードディスク 3 3、入出力インターフェイス 3 4、読出装置 3 5、通信インターフェイス 3 6 および画像出力インターフェイス 3 7 は、バス 3 8 によってデータ通信可能に接続されている。

40

CPU 3 0 は、ROM 3 1 に記憶されているコンピュータプログラムおよび ROM 3 2 にロードされたコンピュータプログラムを実行することが可能である。CPU 3 0 がアプリケーションプログラムを実行することにより、前述した各機能ブロックが実現される。

50

これにより、コンピュータシステムが、乳癌術前化学療法に対する感受性の有無の判定装置としての端末として機能する。

ROM 31は、マスクROM、PROM、EPROM、EEPROMなどによって構成されている。ROM 31には、CPU 30によって実行されるコンピュータプログラムおよびこれに用いるデータが記録されている。

ROM 32は、SRAM、DRAMなどによって構成されている。ROM 32は、ROM 31およびハードディスク 33に記録されているコンピュータプログラムの読み出しに用いられる。ROM 32はまた、これらのコンピュータプログラムを実行するとき、CPU 30の作業領域として利用される。

ハードディスク 33は、CPU 30に実行させるためのオペレーティングシステム、アプリケーションプログラム（乳癌術前化学療法に対する感受性の有無の判定のためのコンピュータプログラム）などのコンピュータプログラムおよび当該コンピュータプログラムの実行に用いるデータがインストールされている。

読出装置 35は、フレキシブルディスクドライブ、CD-ROMドライブ、DVD-ROMドライブなどによって構成されている。読出装置 35は、可搬型記録媒体 40に記録されたコンピュータプログラムまたはデータを読み出すことができる。

入出力インターフェイス 34は、例えば、USB、IEEE 1394、RS-232Cなどのシリアルインターフェイスと、SCSI、IDE、IEEE 1284などのパラレルインターフェイスと、D/A変換器、A/D変換器などからなるアナログインターフェイスとから構成されている。入出力インターフェイス 34には、キーボード、マウスなどの入力デバイス 3bが接続されている。操作者は、当該入力デバイス 3bを使用することにより、コンピュータ本体 3aにデータを入力することが可能である。

通信インターフェイス 36は、例えば、Ethernet（登録商標）インターフェイスなどである。コンピュータシステム 3は、通信インターフェイス 36により、プリンタへの印刷データの送信が可能である。

画像出力インターフェイス 37は、LCD、CRTなどで構成される表示部 3cに接続されている。これにより、表示部 3cは、CPU 30から与えられた画像データに応じた映像信号を出力することができる。表示部 3cは、入力された映像信号にしたがって画像（画面）を表示する。

#### 【0084】

つぎに、判定装置 1による乳癌術前化学療法に対する感受性の有無の判定の処理手順を説明する。図 4は、図 1に示された判定装置を用いた乳癌術前化学療法に対する感受性の判定のフローチャートである。ここでは、測定用試料と接触させたマイクロアレイ上のプローブに結合した測定対象の核酸に基づく蛍光情報を用いて判定を行なう場合を例として挙げて説明するが、本発明は、かかる実施形態のみに限定されるものではない。

#### 【0085】

まず、ステップ S1-1において、判定装置 1の取得部 301は、測定装置 2から蛍光情報を取得する。そして、ステップ S1-2において、算出部 303は、取得部 301が取得した蛍光情報から蛍光強度を算出し、記憶部 302に送信する。

つぎに、ステップ S1-3において、算出部 303は、記憶部 302に記憶された前記蛍光強度に基づき、記憶部 302に記憶された式 (I) で表わされる判定式 (I) にしたがって、式 (I) の解 D を算出する。

その後、ステップ S1-4において、判定部 304は、算出部 303で算出された解 D の値と、記憶部 302に記憶された判定基準とを用い、乳癌術前化学療法に対する感受性の有無（すなわち、感受性および非感受性）を判定する。

ここで、解 D が正の数であるとき、処理は、ステップ S1-4に進行し、判定部 304は、乳癌術前化学療法に対して対して感受性であることを示す判定結果を出力部 305に送信する。また、解 D が 0 または負の数であるとき、乳癌術前化学療法に対して非感受性であることを示す判定結果を出力部 305に送信する。

その後、ステップ S1-7において、出力部 305は、判定結果を出力し、表示部 3c

10

20

30

40

50

に表示させたり、プリンタに印刷させたりする。これにより、医師などが乳癌術前化学療法に対して感受性が、あるいは非感受性かについて判断することを補助する情報を提供することができる。

#### 【実施例】

##### 【0086】

以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、以下の実施例などにおいては、特に断りのない限り、CELファイルのデータの前処理（正規化）は、解析ソフトウェア〔アフィメトリクス（Affymetrix社）社製、商品名：Affymetrix Expression Consoleソフトウェア〕のRMA統計アルゴリズムを用いて行なった。また、それ以外の解析は、全

10

##### 【0087】

（実施例1）

##### （1）被験者からの検体の採取

2002年から2010年の間に大阪大学医学部附属病院で術前化学療法が施された117人の乳癌患者それぞれから、採取針（サイズ8G）を取り付けた吸引装置付き針生検装置〔ジョンソン・エンド・ジョンソン（株）製、商品名：マンモトム（登録商標）〕を用いて乳癌細胞を含む検体を採取した。検体の採取後すぐに、当該検体を、液体窒素に入れ、使用時まで、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

20

##### 【0088】

##### （2）被験者の分類

前記（1）における検体の採取後、前記117人の患者に、乳癌術前化学療法として、12週間にわたる毎週1回のパクリタキセル（paclitaxel） $80\text{mg}/\text{m}^2$ の投与、つづく3週間毎に計4回のエピルビシン（epirubicin） $75\text{mg}/\text{m}^2$ 、シクロホスファミド（cyclophosphamide） $500\text{mg}/\text{m}^2$ および5-フルオウラシル（5-FU） $500\text{mg}/\text{m}^2$ の投与を行なった。

##### 【0089】

その後、組織病理学的検査によって病理学的診断と抗癌剤の効果の判定とを行ない、前記117人の患者を、病理学的完全寛解群（pCR群）と非寛解群（npCR群）とに分類した。ここで、「pCR」とは、腫瘍が完全消失しているか、または腫瘍が乳管内だけに残存し浸潤部位が無く、かつリンパ節転移がない状態をいう。また、「npCR」とは、前記pCR以外の状態をいう。

30

##### 【0090】

##### （3）検体からのRNAの抽出およびcDNAの調製

前記（1）で得られた検体（約20mg）より、RNA抽出用試薬〔インビトロジェン（Invitrogen）社製、商品名：TRIzol（登録商標）、またはキアゲンサイエンス（QIAGEN Sciences）社製、商品名：RNeasy mini kit〕を用いて、RNAを抽出して、RNA試料を得た。

40

##### 【0091】

前記RNA試料（RNA50ng相当量）と、転写産物増幅用キット〔ニューゲン・テクノロジー（NuGEN Technologies）社製、商品名：WT-Ovation FFPE System V2〕に添付のランダムプライマーとを用いて、first-strand cDNAおよびsecond-strand cDNAを合成し、Ribo-SPIA<sup>TM</sup>増幅技術によって、cDNAを増幅した。このようにして、117例の検体に対応する117種類のcDNAを得た。

##### 【0092】

##### （4）遺伝子発現解析

断片化・標識用試薬〔ニューゲン・テクノロジー（NuGEN Technologies）

50

ies)社製、商品名：FL-Ovation™ cDNA Biotin Module V2)を用いて、前記(3)で得られたcDNAを、ビオチンで標識するとともに、断片化した。

【0093】

得られた断片化ビオチン標識cDNAを、ヒトゲノム発現解析用アレイ〔アフィメトリクス(Affymetrix)社製、商品名：Human Genome U133 Plus 2.0 Array〕上の核酸(プローブセット)と一晚ハイブリダイズさせた。なお、前記断片化ビオチン標識cDNAと前記アレイ上の核酸(プローブセット)とのハイブリダイゼーションは、製造者〔アフィメトリクス(Affymetrix)社〕による推奨条件に従って行なった。

10

【0094】

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

【0095】

その後、前記アレイをマイクロアレイスキャナー〔アフィメトリクス(Affymetrix)社製、商品名：GeneChip(登録商標) Scanner 3000〕に供して、前記アレイ上の核酸(プローブセット)にハイブリダイズしたcDNAの蛍光標識物質に基づくシグナルを読み取り、蛍光強度を定量化した。得られた蛍光強度のデータをソフトウェア〔アフィメトリクス(Affymetrix)社製、商品名：GeneChip(登録商標) Operating Software〕によって処理して、CELファイルを得た。前記CELファイルを遺伝子発現解析に用いた。このようにして、117例の検体それぞれにおける前記プローブセットのプローブに対応する核酸に基づく蛍光強度のデータについて、CELファイルを得た。

20

【0096】

(5) プローブセットの選択、および乳癌術前化学療法に対する感受性の判定のための判別式の構築

アフィメトリクス(Affymetrix)社製、商品名：Human Genome U133 Plus 2.0 Array上に搭載されている全54675個のプローブセットに対応するデータのうち、アフィメトリクス(Affymetrix)社製、商品名：Human Genome U133A Arrayと共通している22283個のプローブセットを以下の解析に用いた。

30

【0097】

さらに、前記22283個のプローブセットのうち、アフィメトリクス(Affymetrix)社より公開されている各プローブセットの情報(バージョンna32、<http://www.Affymetrix.com/>)を参照し、ジーン・オンロジー・バイオロジカル・プロセス上で“Immune response”と分類されている934個のプローブセットを選択した。

【0098】

取得された117例それぞれのCELファイルのデータにおいて、前記934個のプローブセットのそれぞれについて、プローブセットによって検出される核酸の発現量から、117例における当該核酸の発現量の平均値を減算することで発現量を標準化した(mean-centering)。

40

【0099】

つぎに、前記117例の検体それぞれの蛍光強度のデータを、トレーニングセット58例とバリデーションセット59例とに無作為に振り分けた。このとき、プローブセットに対応する遺伝子の発現量と、pCRおよびnpCRとの関連性を検定した際の検出力を高めるため、トレーニングセットにおけるpCR例数がバリデーションセットにおけるpCR例数の約2倍となるように振り分けを実施した。以降の解析については、別途記載のあ

50

るもの以外は全てトレーニングセットのデータに対して適用した。

【0100】

プローブセットに対応する遺伝子の発現量が pCR および npCR の間で異なることを Welch の T 検定で評価し、p 値が 0.01 未満となるプローブセットを選択した。

【0101】

つぎに、判別式のアルゴリズムとして対角線形判別分析〔Diagonal Linear Discriminant Analysis (DLDA)〕を用い、前記 Welch の T 検定における p 値の低い順に、1 個ずつ選択するプローブセットの個数を増加させながら、当該プローブセット群を選択し、判別式の構築を行なった。

【0102】

そして、Leave-One-Out Cross-Validation 法を用い、正確度が最大となるプローブセットの個数を決定した。前記 Leave-One-Out Cross-Validation 法は、トレーニングセットのデータのなかから 1 例のデータを除いて構築した判別式を用い、前記で除かれた 1 例を予測した結果を、除外する 1 例のデータを入れ替えながら 58 回繰り返し、58 例分の病理学的診断結果と判別式で予測された 58 例分の結果とを集計することによって行なった。また、正確度は、〔病理学的診断結果が pCR であり、かつ pCR と予測された検体の数〕と、〔病理学的診断結果が npCR であり、かつ npCR と予測された検体の数〕との和を、全検体の数で除算することによって求めた。実施例 1 において、プローブセット数と正確度との関係を調べた結果を図 5 に示す。

10

【0103】

図 5 に示された結果から、正確度が最大となるプローブセットとして、Welch の t 検定における p 値の低い順で上位 23 番目までの 23 個のプローブセット（表 3 参照）を用いた場合に、正確度が最大になることがわかる。これらの 23 個のプローブセットは、それぞれ、配列番号：1～23 に示されるポリヌクレオチドを標的とするものである。これらの 23 個のプローブセットについて、全トレーニングセットのデータを用いて最終的な判別式を構築した。

20

【0104】

【 表 3 】

測定対象の 核酸の番号	プローブセット ID	プローブの標的 ホリスクレオパドの塩基配列	遺伝子 記号	プローブの 塩基配列	重み係数	Welchの t検定	p値	高発現
1	220162_s_at	配列番号:1	CARD9	配列番号:24~34	2.36157982	4.323	0.0001	pCR
2	210029_at	配列番号:2	IDO1	配列番号:35~45	0.52753582	3.835	0.0004	pCR
3	203915_at	配列番号:3	CXCL9	配列番号:46~56	0.53572137	3.760	0.0005	pCR
4	201695_s_at	配列番号:4	PNP	配列番号:57~67	1.29673603	3.804	0.0006	pCR
5	211122_s_at	配列番号:5	CXCL11	配列番号:68~78	0.43776638	3.686	0.0007	pCR
6	212501_at	配列番号:6	CEBPB	配列番号:79~89	1.09614395	3.631	0.0009	pCR
7	204440_at	配列番号:7	CD83	配列番号:90~100	1.15413279	3.397	0.0013	pCR
8	204864_s_at	配列番号:8	IL6ST	配列番号:101~111	-0.9979555	-3.444	0.0015	npCR
9	205898_at	配列番号:9	CX3CR1	配列番号:112~122	-0.8464557	-3.327	0.0020	npCR
10	205789_at	配列番号:10	CD1D	配列番号:123~133	0.70349967	3.263	0.0021	pCR
11	201487_at	配列番号:11	CTSC	配列番号:134~144	1.26206632	3.314	0.0022	pCR
12	204533_at	配列番号:12	CXCL10	配列番号:145~155	0.48170925	3.165	0.0030	pCR
13	216541_x_at	配列番号:13	IGHG1	配列番号:156~166	0.78467717	3.158	0.0031	pCR
14	211000_s_at	配列番号:14	IL6ST	配列番号:167~177	-1.0561303	-3.189	0.0031	npCR
15	212758_s_at	配列番号:15	ZEB1	配列番号:178~188	-0.9015298	-3.130	0.0034	npCR
16	210512_s_at	配列番号:16	VEGFA	配列番号:189~199	0.9410118	3.102	0.0036	pCR
17	203788_s_at	配列番号:17	SEMA3C	配列番号:200~210	-0.5801453	-3.133	0.0040	npCR
18	205544_s_at	配列番号:18	CR2	配列番号:211~221	0.79719845	3.149	0.0040	pCR
19	204863_s_at	配列番号:19	IL6ST	配列番号:222~232	-0.9638602	-3.083	0.0043	npCR
20	211331_x_at	配列番号:20	HFE	配列番号:233~243	-1.352304	-2.993	0.0047	npCR
21	206217_at	配列番号:21	EDA	配列番号:244~254	-1.2313651	-3.001	0.0049	npCR
22	210875_s_at	配列番号:22	ZEB1	配列番号:255~265	-0.6378182	-2.930	0.0054	npCR
23	210163_at	配列番号:23	CXCL11	配列番号:266~276	0.44921773	2.919	0.0061	pCR

表3

【 0 1 0 5 】

得られた判別式は、式 ( I ) :

【 0 1 0 6 】

10

20

30

40

【数 5】

$$D = \sum_i (w_i \times y_i) - 3.327217 \quad (I)$$

【0107】

〔式中、 $i$  は表 2 に記載の各核酸に付与された番号を示し、 $w_i$  は表 2 に記載された番号  $i$  の核酸の重み係数を示し、 $y_i$  は式 (I I) :

【0108】

【数 6】

$$y_i = x_i - m_i \quad (II)$$

10

【0109】

〔式中、 $x_i$  は表 2 に記載された番号  $i$  の核酸の発現量を示し、 $m_i$  は表 2 に記載された番号  $i$  の核酸の発現量の検体に渡る平均値を示す〕

で表わされる式にしたがって標準化された核酸の発現量を示し、 $\sum_i$  は各核酸に渡る総和を示す〕

で表わされる判別式である。ここで、式 (I) で表わされる判別式の解  $D$  が正の数であるとき、乳癌術前化学療法に対して感受性であり、解  $D$  が 0 または負の数であるとき、乳癌術前化学療法に対して非感受性であると判定する。

【0110】

(6) 判別式による判定結果と、病理学的診断結果との対比

20

トレーニングセットに振り分けられた 58 例の検体について測定された発現量のデータ (蛍光強度のデータ) と、式 (I) で表わされる判別式とを用いて、58 例の検体それぞれが pCR 群および npCR 群のいずれの乳癌患者の検体に該当するかを判定した。そして、病理学的診断結果を真値として用い、式 (I) で表わされる判別式による判定結果と、当該病理学的診断結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。実施例 1 において、トレーニングセットについて、式 (I) で表わされる判別式による判定結果と、病理学的診断結果とを比較した結果を図 6 に示す。図中、「Gp - R」は判別式によって「乳癌術前化学療法に対して感受性を有する被験者の検体である」と判定された検体、「Gp - NR」は判別式によって「乳癌術前化学療法に対して非感受性である被験者の検体である」と判定された検体を示す。

30

【0111】

つぎに、バリデーションセットに振り分けられた 59 例の検体について測定された発現量のデータ (蛍光強度のデータ) と、前記判別式とを用いて、59 例の検体それぞれが pCR 群および npCR 群のいずれの乳癌患者の検体に該当するかを判定することによって、乳癌術前化学療法に対する感受性を判定した。また、病理学的診断結果を真値として、当該病理学的診断結果と前記判別式による判定結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。実施例 1 において、バリデーションセットについて、式 (I) で表わされる判別式による判定結果と、病理学的診断結果とを比較した結果を図 7 に示す。図中、「Gp - R」は判別式によって「乳癌術前化学療法に対して感受性を有する被験者の検体である」と判定された検体、「Gp - NR」は判別式によって「乳癌術前化学療法に対して非感受性である被験者の検体である」と判定された検体を示す。

40

【0112】

図 6 に示された結果から、トレーニングセットに振り分けられた 58 例の検体のうち、式 (I) で表わされる判別式により、26 例が Gp - R、32 例が Gp - NR と判定されていることがわかる。また、図 6 に示された結果から、Gp - R と判定された検体のうちの 16 例が pCR 群の乳癌患者の検体であり、Gp - NR と判定された検体のうちの 30 例が npCR 群の乳がんの患者の検体であることがわかる。したがって、これらの結果から、トレーニングセットにおいて、式 (I) で表わされる判別式により、乳癌術前化学療法に対して感受性である検体と乳癌術前化学療法に対して非感受性である検体とを判別することができることがわかる。

50

## 【0113】

さらに、図7に示された結果から、バリデーションセットに振り分けられた59例の検体のうち、式(I)で表わされる判別式により、24例がGp-R、35例がGp-NRと判定されていることがわかる。また、図7に示された結果から、Gp-Rと判定された検体のうちの9例がpCR群の乳癌患者の検体であり、Gp-NRと判定された検体のすべてがnpCR群の乳がんの患者の検体であることがわかる。したがって、これらの結果から、バリデーションセットにおいて、式(I)で表わされる判別式により、乳癌術前化学療法に対して感受性である検体と乳癌術前化学療法に対して非感受性である検体とを判別することができることがわかる。

## 【0114】

以上の結果から、被験者から採取された検体における前記(1)~(23)のプロープによって検出される各核酸の発現量を用いることにより、乳癌術前化学療法に対する感受性の有無を精度よく判定することができることが示唆される。

## 【0115】

(実施例2)

マイクロアレイ実験の遺伝子発現情報データベース[NCBI Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)]のアクセッション番号: GSE16446(被験者群1-1)、GSE20194(被験者群1-2)、GSE20271(被験者群1-3)、GSE22093(被験者群1-4)、GSE23988(被験者群1-5)およびGSE41998(被験者群1-6)の6つの被験者群のデータセットから、術前化学療法の施された乳癌症例901例分のデータを抽出した。抽出されたデータについて、データセット毎に、RMA正規化およびmean-centeringを行なった。得られたデータにおける前記(1)~(23)のプロープによって検出される各核酸の発現量と、式(I)で表わされる判別式とを用い、乳癌術前化学療法に対する感受性の有無を判定した。

## 【0116】

つぎに、データセット毎に、式(I)で表わされる判別式による判定結果と、前記データベースから取得された病理学的診断結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。実施例2において、式(I)で表わされる判別式による判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を図8に示す。

## 【0117】

図8に示された結果から、被験者群1-1~1-6のすべてについて、オッズ比が1を超えており(3.09以上)、95%信頼区間における最小値も1を超えていることから、式(I)で表わされる判別式による判定は、いずれも偶然の結果ではなく、有意な結果であることがわかる。したがって、これらの結果から、前記(1)~(23)のプロープによって検出される各核酸の発現量を用いることにより、乳癌術前化学療法に対する感受性を精度よく判定することができることが示唆される。

## 【0118】

(実施例3)

実施例2において抽出された901例分のデータを、ERおよびHER2それぞれの有無に基づき、下記被験者群2-1~2-3:

被験者群2-1: ER陽性を示し、かつHER2陰性を示す被験者(ER<sup>+</sup>、HER2<sup>-</sup>)からなる群、

被験者群2-2: ER陽性またはER陰性を示し、かつHER2陽性を示す被験者(ER<sup>+</sup>、HER2<sup>+</sup>)からなる群、および

被験者群2-3: ER陰性を示し、かつHER2陰性を示す被験者(ER<sup>-</sup>、HER2<sup>-</sup>)からなる群

の3通りのデータセットに分類した。なお、「ER陽性を示し、かつHER2陽性を示す被験者(ER<sup>+</sup>、HER2<sup>+</sup>)からなる群」および「ER陰性を示し、HER2陽性を示す被験者(ER<sup>-</sup>、HER2<sup>+</sup>)からなる群」は、ハーセプチンに対して感受性である点が共

10

20

30

40

50

通していることから、被験者群 2 - 2 に求めている。

【 0 1 1 9 】

つぎに、データセット毎に、式 ( I ) で表わされる判別式による判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。実施例 3 において、式 ( I ) で表わされる判別式による判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を図 9 に示す。

【 0 1 2 0 】

図 9 に示された結果から、被験者群 2 - 1 ~ 2 - 3 のすべてについて、オッズ比が 1 を超えており ( 3 . 4 1 以上 )、9 5 % 信頼区間における最小値も 1 を超えていることから、式 ( I ) で表わされる判別式による判定は、いずれも偶然の結果ではなく、有意な結果であることがわかる。したがって、これらの結果から、E R および H E R 2 それぞれの有無に基づいて分類されたデータセットにおいても、前記 ( 1 ) ~ ( 2 3 ) のプローブによって検出される各核酸の発現量を用いることにより、乳癌術前化学療法に対する感受性を精度よく判定することができることが示唆される。また、これらの結果から、前記 ( 1 ) ~ ( 2 3 ) のプローブによって検出される各核酸の発現量を用いることにより、E R 陽性および E R 陰性に基づく分類によらず、乳癌術前化学療法に対する感受性の有無を精度よく判定することができることが示唆される。

【 0 1 2 1 】

( 実施例 4 )

実施例 2 において抽出された 9 0 1 例分のデータを、用いられた乳癌術前化学療法のレジメンの種類に基づき、5 通りのデータセットに分類した。

【 0 1 2 2 】

つぎに、データセット毎に、式 ( I ) で表わされる判別式による判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。実施例 4 において、式 ( I ) で表わされる判別式による判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を図 1 0 に示す。図中、「E p i r u b i c i n」はエピルピシンを投与された被験者からなる群 ( 被験者群 3 - 1 )、「F A C o r F E C」は 5 - フルオロウラシルとアドリアマイシンとシクロホスファミドとの組み合わせまたは 5 - フルオロウラシルとエピルピシンとシクロホスファミドとの組み合わせが投与された被験者からなる群 ( 被験者群 3 - 2 )、「A . p a c l i t a x e l」はアンスラサイクリンとパクリタキセルとが投与された被験者からなる群 ( 被験者群 3 - 3 )、「A . d o c e t a x e l」はアンスラサイクリンとドセタキセルとが投与された被験者からなる群 ( 被験者群 3 - 4 )、「A . I x a b e p i l o n e」はアンスラサイクリンとイキサベピロンとが投与された被験者からなる群 ( 被験者群 3 - 5 ) を示す。

【 0 1 2 3 】

図 1 0 に示された結果から、被験者群 3 - 1 ~ 3 - 5 のすべてについて、オッズ比が 1 を超えており ( 3 . 4 5 以上 )、9 5 % 信頼区間における最小値も 1 を超えていることから、式 ( I ) で表わされる判別式による判定は、いずれも偶然の結果ではなく、有意な結果であることがわかる。したがって、これらの結果から、用いられた乳癌術前化学療法のレジメンに基づいて分類されたデータセットにおいても、前記 ( 1 ) ~ ( 2 3 ) のプローブによって検出される各核酸の発現量を用いることにより、乳癌術前化学療法に対する感受性を精度よく判定することができることが示唆される。また、これらの結果から、前記 ( 1 ) ~ ( 2 3 ) のプローブによって検出される各核酸の発現量を用いることにより、乳癌術前化学療法のレジメンに基づく分類によらず、乳癌術前化学療法に対する感受性の有無を精度よく判定することができることが示唆される。

【 0 1 2 4 】

( 比較例 1 )

実施例 2 において抽出された 9 0 1 例分のデータにおける特許文献 1 の表 1 および表 2 に記載された 7 0 個のプローブセットに対応する遺伝子の発現量を用い、特許文献 1 に記

載の診断補助方法にしたがって、乳癌術前化学療法に対する感受性の有無を判定した。

【0125】

つぎに、前記被験者群 1 - 1 ~ 1 - 6 のデータセット毎に、特許文献 1 の表 1 および表 2 に記載された 70 個のプローブセットに対応する遺伝子の発現量を用いて得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。比較例 1 において、被験者群 1 - 1 ~ 1 - 6 について、特許文献 1 の表 1 および表 2 に記載された 70 個のプローブセットに対応する遺伝子の発現量を用いて得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を図 11 に示す。

【0126】

また、前記被験者群 2 - 1 ~ 2 - 3 のデータセット毎に、特許文献 1 の表 1 および表 2 に記載された 70 個のプローブセットに対応する遺伝子の発現量を用いて得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。比較例 1 において、被験者群 2 - 1 ~ 2 - 3 について、特許文献 1 の表 1 および表 2 に記載された 70 個のプローブセットに対応する遺伝子の発現量を用いて得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を図 12 に示す。

【0127】

さらに、前記被験者群 3 - 1 ~ 3 - 5 のデータセット毎に、特許文献 1 の表 1 および表 2 に記載された 70 個のプローブセットに対応する遺伝子の発現量を用いて得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。比較例 1 において、被験者群 3 - 1 ~ 3 - 5 について、特許文献 1 の表 1 および表 2 に記載された 70 個のプローブセットに対応する遺伝子の発現量を用いて得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を図 13 に示す。図中、「Epirubicin」、「FAC or FEC」、「A. paclitaxel」、「A. docetaxel」および「A. Ixabepilone」は図 10 における「Epirubicin」、「FAC or FEC」、「A. paclitaxel」、「A. docetaxel」および「A. Ixabepilone」と同じである。

【0128】

図 11 に示された結果から、判定結果に関するオッズ比およびその 95% 信頼区間における最小値のいずれもが 1 以下となっているものがあり、被験者群の母体の種類によっては、判定結果の信頼性が低くなる場合があることがわかる。また、図 12 に示された結果から、ER および HER2 それぞれの有無に基づいて分類された被験者群のデータセット毎の判定結果においても、判定結果に関するオッズ比の 95% 信頼区間における最小値が 1 以下となっているものがあることから、特許文献 1 の表 1 および表 2 に記載された 70 個のプローブセットに対応する遺伝子の発現量を用いた場合、ER 陽性の症例および ER 陰性の症例それぞれにおける判定結果の信頼性が低いことがわかる。さらに、図 13 に示された結果から、用いられた乳癌術前化学療法のレジメンの種類に基づいて分類された被験者群のデータセット毎の判定結果においても、判定結果に関するオッズ比およびその 95% 信頼区間における最小値のいずれもが 1 以下となっているものがあることから、特許文献 1 の表 1 および表 2 に記載された 70 個のプローブセットに対応する遺伝子の発現量を用いた場合、投与される抗癌剤の種類によっては、判定結果の信頼性が低くなる場合があることがわかる。

【0129】

(比較例 2)

実施例 2 において抽出された 901 例分のデータにおける非特許文献 2 に記載の B 細胞メタジンの発現量を用い、非特許文献 2 に記載された方法にしたがって、乳癌術前化学療法に対する感受性の有無を判定した。

【0130】

つぎに、前記被験者群 1 - 1 ~ 1 - 6 のデータセット毎に、非特許文献 2 に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。比較例 2 において、被験者群 1 - 1 ~ 1 - 6 について、非特許文献 2 に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を図 1 4 に示す。

【0131】

また、前記被験者群 2 - 1 ~ 2 - 3 のデータセット毎に、非特許文献 2 に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。比較例 2 において、被験者群 2 - 1 ~ 2 - 3 について、非特許文献 2 に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を図 1 5 に示す。

10

【0132】

さらに、前記被験者群 3 - 1 ~ 3 - 5 のデータセット毎に、非特許文献 2 に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。比較例 2 において、被験者群 3 - 1 ~ 3 - 5 について、非特許文献 2 に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を図 1 6 に示す。図中、「Epirubicin」、「FAC or FEC」、「A. paclitaxel」、「A. docetaxel」および「A. Ixabepilone」は図 1 0 における「Epirubicin」、「FAC or FEC」、「A. paclitaxel」、「A. docetaxel」および「A. Ixabepilone」と同じである。

20

【0133】

図 1 4 に示された結果から、判定結果に関するオッズ比の 9 5 % 信頼区間における最小値が 1 以下となっているものがあり、非特許文献 2 に記載された方法によれば、被験者群の母体の種類によっては、判定結果の信頼性が低くなる場合があることがわかる。また、図 1 5 に示された結果から、ER および HER 2 それぞれの有無に基づいて分類された被験者群のデータセット毎の判定結果においても、判定結果に関するオッズ比の 9 5 % 信頼区間における最小値が 1 以下となっているものがあることから、非特許文献 2 に記載された方法は、ER 陽性の症例および ER 陰性の症例それぞれにおける判定結果の信頼性が低いことがわかる。さらに、図 1 6 に示された結果から、用いられた乳癌術前化学療法のレジメンの種類に基づいて分類された被験者群のデータセット毎の判定結果においても、判定結果に関するオッズ比の 9 5 % 信頼区間における最小値が 1 以下となっているものがあることから、非特許文献 1 に記載された方法によれば、投与される抗癌剤の種類によっては、判定結果の信頼性が低くなる場合があることがわかる。

30

【0134】

(比較例 3)

実施例 2 において抽出された 9 0 1 例分のデータにおける非特許文献 3 に記載のイムノグロブリン C 遺伝子の発現量を用い、非特許文献 3 に記載された方法にしたがって、乳癌術前化学療法に対する感受性の有無を判定した。

【0135】

つぎに、前記被験者群 1 - 1 ~ 1 - 6 のデータセット毎に、非特許文献 3 に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。比較例 3 において、被験者群 1 - 1 ~ 1 - 6 について、非特許文献 3 に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を図 1 7 に示す。

40

【0136】

また、前記被験者群 2 - 1 ~ 2 - 3 のデータセット毎に、非特許文献 3 に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。比較例 3 において、被験者群 2 - 1 ~ 2 - 3 について、非特許文献 3 に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、

50

データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を図18に示す。

【0137】

さらに、前記被験者群3-1~3-5のデータセット毎に、非特許文献3に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。比較例3において、被験者群3-1~3-5について、非特許文献3に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を図19に示す。図中、「Epirubicin」、「FAC or FEC」、「A. paclitaxel」、「A. docetaxel」および「A. Ixabepilone」は図10における「Epirubicin」、「FAC or FEC」、「A. paclitaxel」、「A. docetaxel」および「A. Ixabepilone」と同じである。

10

【0138】

図17に示された結果から、判定結果に関するオッズ比の95%信頼区間における最小値が1以下となっているものがあり、非特許文献3に記載された方法によれば、被験者群の母体の種類によっては、判定結果の信頼性が低くなる場合があることがわかる。また、図18に示された結果から、ERおよびHER2それぞれの有無に基づいて分類された被験者群のデータセット毎に、非特許文献3に記載された方法によって乳癌術前化学療法に対する感受性を判定した場合、前記(1)~(23)のプロープによって検出される各核酸の発現量を用いる本発明の診断補助方法によって乳癌術前化学療法に対する感受性を判定した場合(図9参照)と比べ、判定結果に関するオッズ比およびが小さいことから、非特許文献3に記載された方法は、前記(1)~(23)のプロープによって検出される各核酸の発現量を用いる本発明の方法よりも、ER陽性の症例およびER陰性の症例それぞれにおける判定結果の信頼性が低いことがわかる。さらに、図19に示された結果から、用いられた乳癌術前化学療法のレジメンの種類に基づいて分類された被験者群のデータセット毎の判定結果においても、判定結果に関するオッズ比の95%信頼区間における最小値が1以下となっているものがあることから、非特許文献3に記載された方法によれば、投与される抗癌剤の種類によっては、判定結果の信頼性が低くなる場合があることがわかる。

20

【0139】

(比較例4)

実施例2において抽出された901例分のデータにおける非特許文献4に記載のC1QA、XCL2、SPP1、TNFRSF17、LY9、IGLC2およびHLA-Fの各遺伝子の発現量を用い、非特許文献4に記載された方法にしたがって、乳癌術前化学療法に対する感受性の有無を判定した。

30

【0140】

つぎに、前記被験者群1-1~1-6のデータセット毎に、非特許文献4に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。比較例4において、被験者群1-1~1-6について、非特許文献4に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を図20に示す。

40

【0141】

また、前記被験者群2-1~2-3のデータセット毎に、非特許文献4に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。比較例4において、被験者群2-1~2-3について、非特許文献4に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を図21に示す。

【0142】

さらに、前記被験者群3-1~3-5のデータセット毎に、非特許文献4に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較することによって、当該判別式の性能を評価した。比較例4において、被験者群3

50

- 1 ~ 3 - 5 について、非特許文献 4 に記載された方法にしたがって得られた判定結果と、データベースから取得された病理学的診断結果とを比較した結果を図 2 2 に示す。図中、「Epirubicin」、「FAC or FEC」、「A. paclitaxel」、「A. docetaxel」および「A. Ixabepilone」は図 1 0 における「Epirubicin」、「FAC or FEC」、「A. paclitaxel」、「A. docetaxel」および「A. Ixabepilone」と同じである。

【 0 1 4 3 】

図 2 0 に示された結果から、判定結果に関するオッズ比の 9 5 % 信頼区間における最小値が 1 以下となっているものがあり、非特許文献 4 に記載された方法によれば、被験者群の母体の種類によっては、判定結果の信頼性が低くなる場合があることがわかる。また、図 2 1 に示された結果から、ER および HER 2 それぞれの有無に基づいて分類された被験者群のデータセット毎の判定結果においても、判定結果に関するオッズ比の 9 5 % 信頼区間における最小値が 1 以下となっているものがあることから、非特許文献 4 に記載された方法は、ER 陽性の症例および ER 陰性の症例それぞれにおける判定結果の信頼性が低いことがわかる。さらに、図 2 2 に示された結果から、用いられた乳癌術前化学療法のレジメンの種類に基づいて分類された被験者群のデータセット毎の判定結果においても、判定結果に関するオッズ比の 9 5 % 信頼区間における最小値が 1 以下となっているものがあることから、非特許文献 4 に記載された方法によれば、投与される抗癌剤の種類によっては、判定結果の信頼性が低くなる場合があることがわかる。

【 0 1 4 4 】

以上の結果から、前記 ( 1 ) ~ ( 2 3 ) のプローブによって検出される各核酸の発現量を用いることにより、ER 陽性および ER 陰性に基づく分類や、乳癌術前化学療法のレジメンの種類に基づく分類などの被験者の分類の種類によらず、乳癌術前化学療法に対する感受性の有無をより精度よく判定することができることが示唆される。したがって、本発明の診断補助方法は、乳癌術前化学療法の実施の適否の判断を助けるための情報や、治療を最適化するためのより適切な情報を提供するのに好適である。

【 配列表フリーテキスト 】

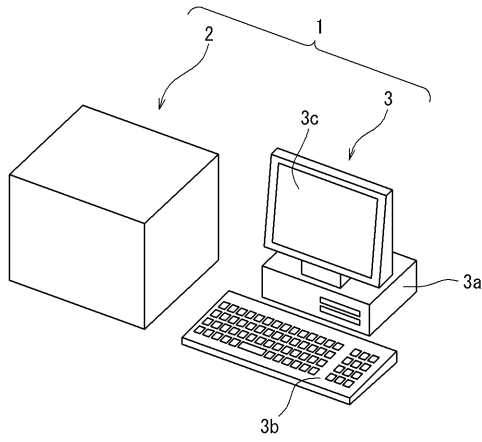
【 0 1 4 5 】

配列番号： 2 4 ~ 2 7 2 は、プローブセットに含まれる配列である。

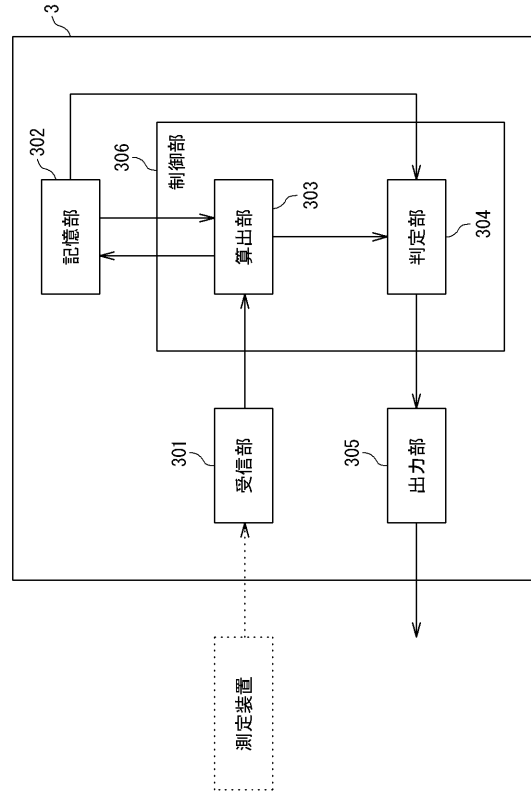
10

20

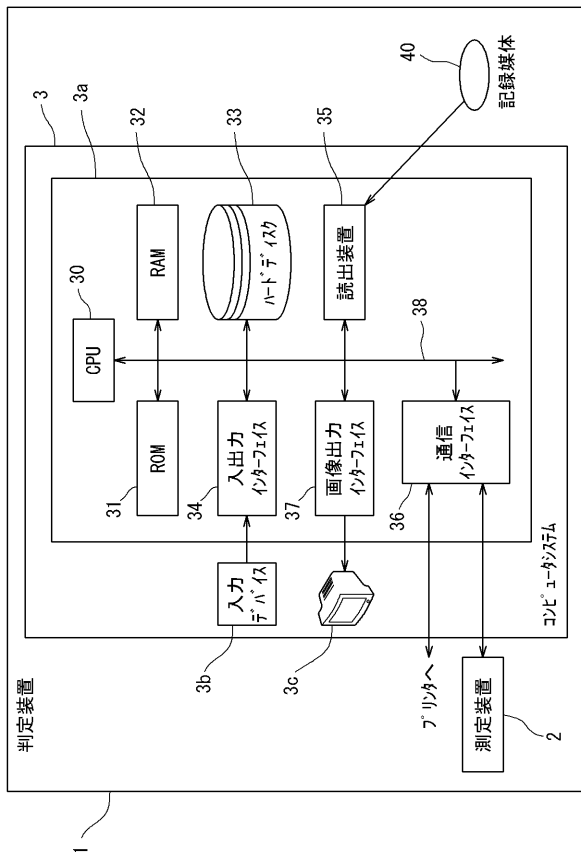
【 図 1 】



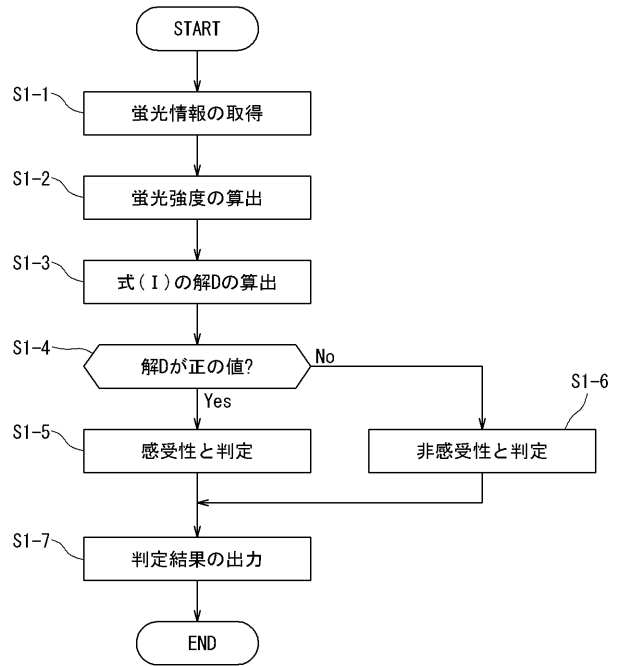
【 図 2 】



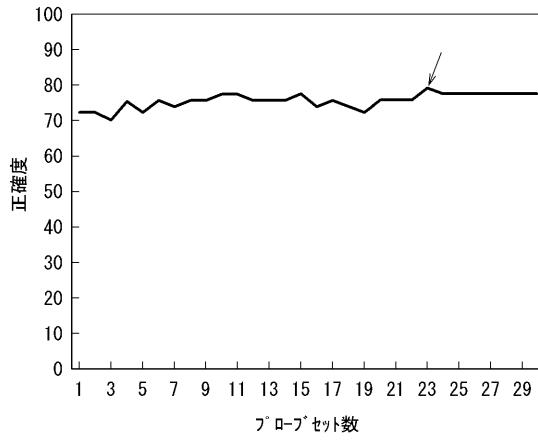
【 図 3 】



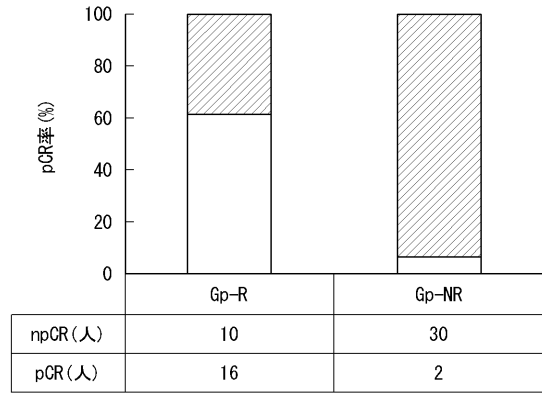
【 図 4 】



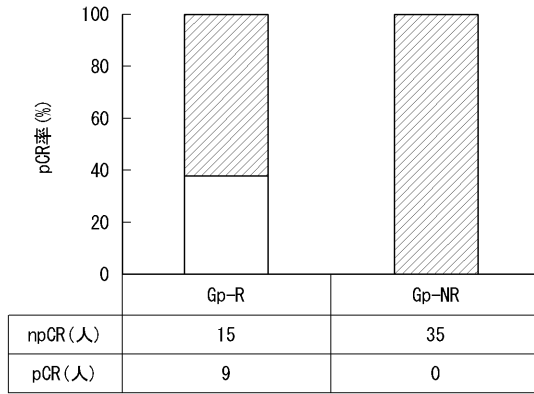
【 図 5 】



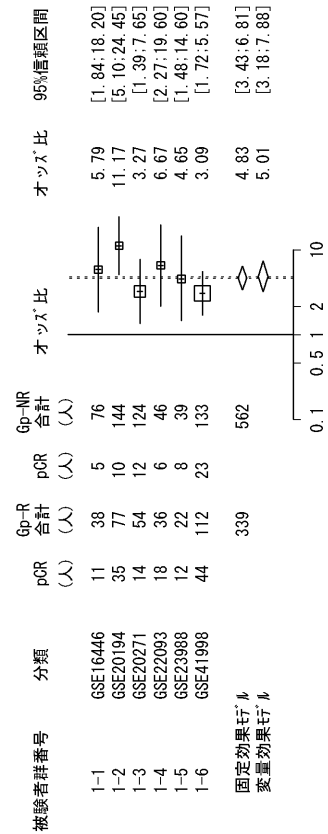
【 図 6 】



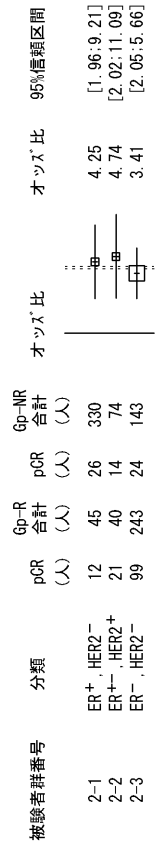
【 図 7 】



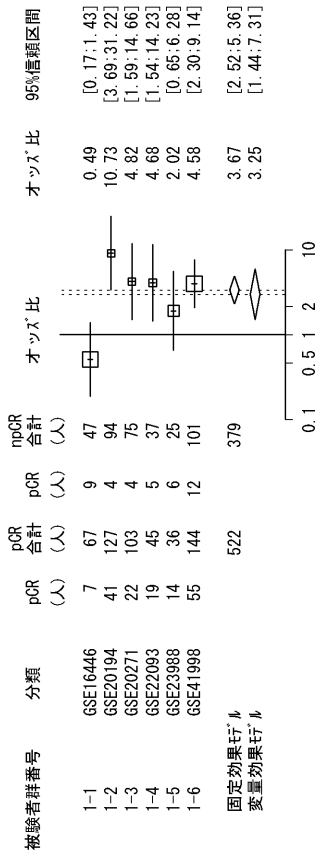
【 図 8 】



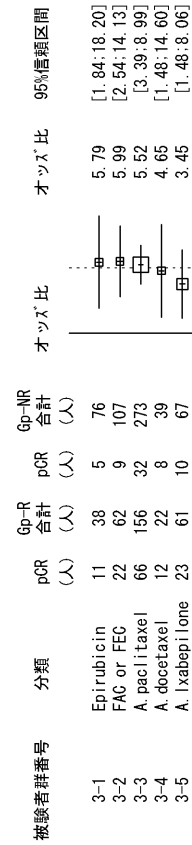
【 図 9 】



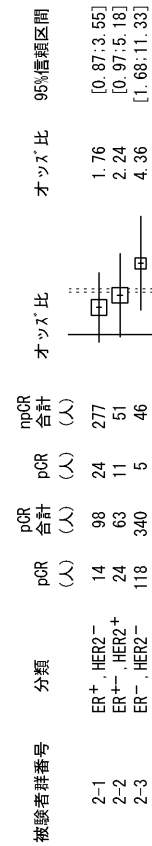
【 図 1 1 】



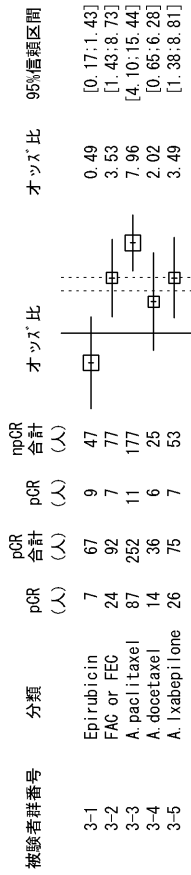
【 図 1 0 】



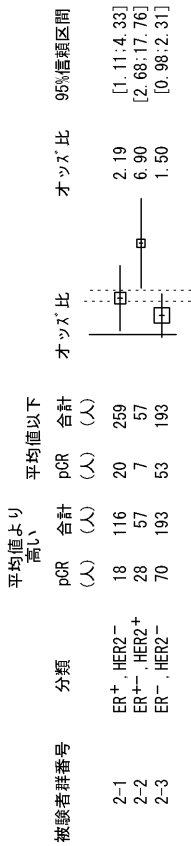
【 図 1 2 】



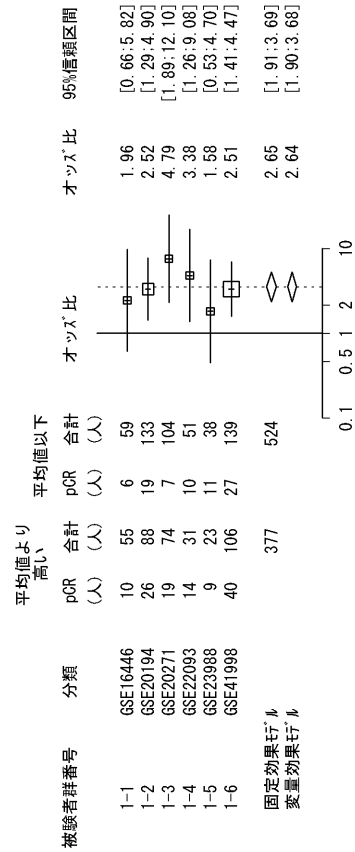
【 図 1 3 】



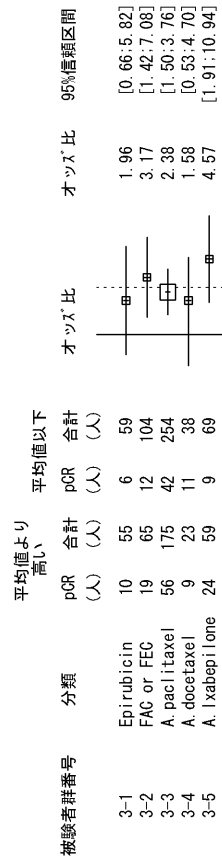
【 図 1 5 】



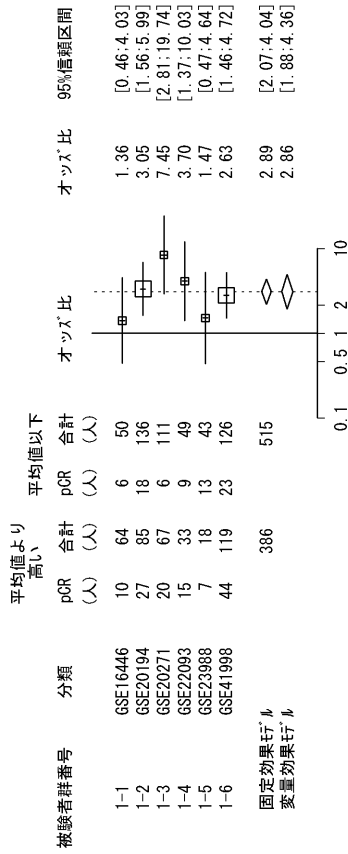
【 図 1 4 】



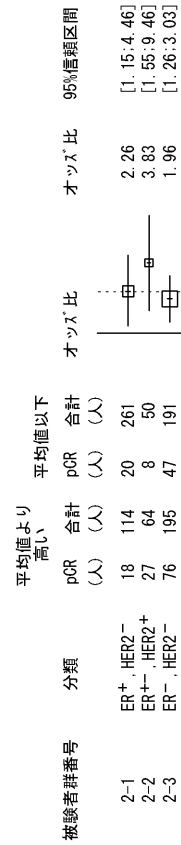
【 図 1 6 】



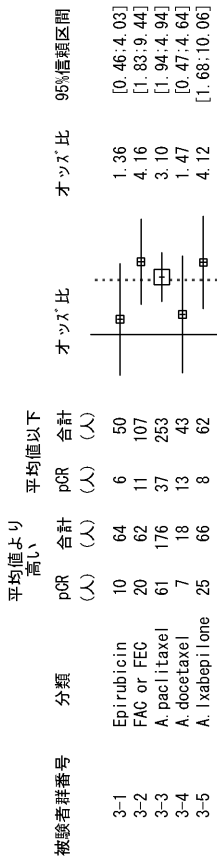
【 図 1 7 】



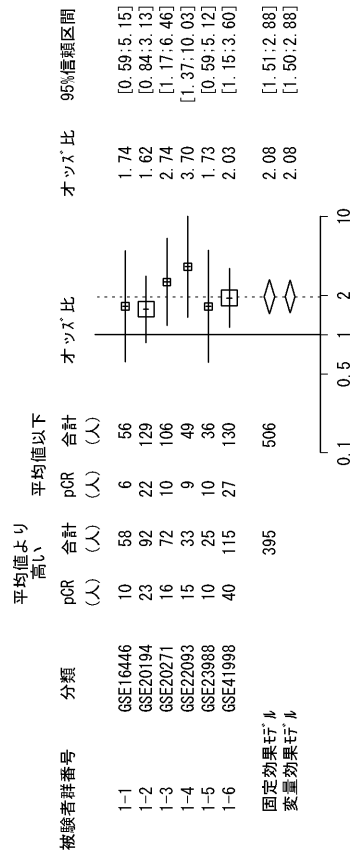
【 図 1 8 】



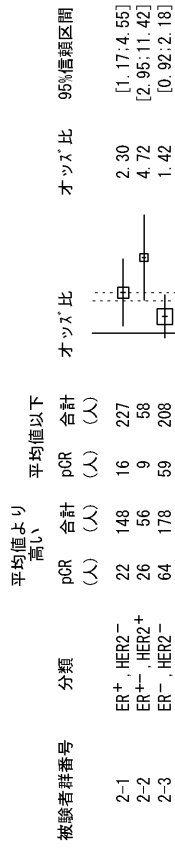
【 図 1 9 】



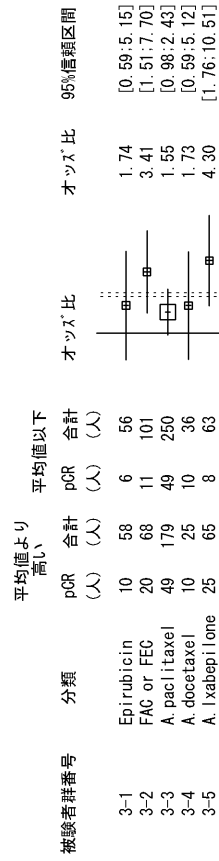
【 図 2 0 】



【 図 2 1 】



【 図 2 2 】



【 配列表 】

2015047101000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
C 1 2 N 15/00 F

(72)発明者 草田 義昭  
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内

(72)発明者 岸 和希  
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA12 CA02 CA09 HA12  
4B029 AA07 BB20 CC01 CC03 CC08 FA12 FA15  
4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ43 QQ44 QQ46 QQ53 QR32 QR55 QR62  
QR66 QR82 QS03 QS25 QS36 QX02

专利名称(译)	用于诊断乳腺癌术前化疗易感性的方法和装置		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015047101A</a>	公开(公告)日	2015-03-16
申请号	JP2013179877	申请日	2013-08-30
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人大阪大学 希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人大阪大学 希森美康公司		
[标]发明人	野口真三郎 直居靖人 草田義昭 岸和希		
发明人	野口 真三郎 直居 靖人 草田 義昭 岸 和希		
IPC分类号	C12Q1/68 C12M1/00 G01N33/53 G01N37/00 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/112 G16H20/40 G16H50/30 G16H70/20 G06F19/3481		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12M1/00.A G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.A C12N15/00.F C12N15/09.200 C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA12 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ44 4B063/QQ46 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02		
其他公开文献	JP6164689B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

要解决的问题：提供一种辅助诊断乳腺癌术前化疗的方法，能够准确确定ER阳性病例对乳腺癌术前化疗的敏感性和ER阴性病例对术前化疗的乳腺癌的敏感性。提供。解决方案：扩增从受试者收集的样品中提取的RNA，制备测量样品，使用测量样品测量每个预定基因的表达水平，并分析表达水平。根据获得的结果，确定对乳腺癌术前化疗的敏感性。  
[选择图]无

表1

測定対象の核酸の番号	プロブセット ID	プロブの標的ホリスレオチドの塩基配列	プロブの塩基配列
1	220162_s_at	配列番号:1	配列番号:24~34
2	210029_at	配列番号:2	配列番号:35~45
3	203915_at	配列番号:3	配列番号:46~56
4	201695_s_at	配列番号:4	配列番号:57~67
5	211122_s_at	配列番号:5	配列番号:68~78
6	212501_at	配列番号:6	配列番号:79~89
7	204440_at	配列番号:7	配列番号:90~100
8	204864_s_at	配列番号:8	配列番号:101~111
9	205898_at	配列番号:9	配列番号:112~122
10	205789_at	配列番号:10	配列番号:123~133
11	201487_at	配列番号:11	配列番号:134~144
12	204533_at	配列番号:12	配列番号:145~155
13	216541_x_at	配列番号:13	配列番号:156~166
14	211000_s_at	配列番号:14	配列番号:167~177
15	212758_s_at	配列番号:15	配列番号:178~188
16	210512_s_at	配列番号:16	配列番号:189~199
17	203788_s_at	配列番号:17	配列番号:200~210
18	205544_s_at	配列番号:18	配列番号:211~221
19	204863_s_at	配列番号:19	配列番号:222~232
20	211331_x_at	配列番号:20	配列番号:233~243
21	206217_at	配列番号:21	配列番号:244~254
22	210875_s_at	配列番号:22	配列番号:255~265
23	210163_at	配列番号:23	配列番号:266~276