

(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2011-520451

(P2011-520451A)

(43) 公表日 平成23年7月21日(2011.7.21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 2 4
G O 1 N 37/00 (2006.01)	G O 1 N 37/00 1 0 2	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 A	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 83 頁)

(21) 出願番号	特願2011-509722 (P2011-509722)	(71) 出願人	506332074 ダームテック インターナショナル アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ラ ホヤ プロスペクト ストリート 1 0 2 O 스위트 3 0 1
(86) (22) 出願日	平成21年5月14日 (2009.5.14)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成22年12月22日 (2010.12.22)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/044035	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 国際公開番号	W02009/140550	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 国際公開日	平成21年11月19日 (2009.11.19)	(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(31) 優先権主張番号	61/127, 731		
(32) 優先日	平成20年5月14日 (2008.5.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/053, 988		
(32) 優先日	平成20年5月16日 (2008.5.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/058, 149		
(32) 優先日	平成20年6月2日 (2008.6.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸解析による黒色腫および日光黒子の診断法

(57) 【要約】

本発明は、対象から得られた核酸分子を解析することにより、対象における黒色腫および/または日光黒子を診断する方法を提供する。本発明は、黒色腫と日光黒子および/または異形成母斑および/または正常な色素沈着皮膚とを区別する方法もまた提供する。本方法は、1つまたは複数の皮膚マーカーの、表皮試料における発現または変異を解析することを含む。本方法は、試料由来の遺伝子またはタンパク質プロファイルを解析するためのマイクロアレイの使用を含み得る。

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

皮膚病変の試料中の、表1~8、10~12、および15に列挙した1つまたは複数の遺伝子に由来する核酸分子を解析する段階を含み、それによって対象の皮膚病変を特徴づける、対象における皮膚病変を特徴づける方法。

【請求項2】

核酸分子がRNAである、請求項1記載の方法。

【請求項3】

核酸分子を解析する段階が、核酸分子の核酸配列における1つまたは複数の変異を検出する段階を含む、請求項1記載の方法。

10

【請求項4】

1つまたは複数の変異が、置換、欠失、および挿入からなる群より選択される、請求項3記載の方法。

【請求項5】

解析前に、試料から得られた核酸分子を増幅する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項6】

粘着テープに付着している試料を単離するのに十分な様式で、粘着テープを皮膚の標的部に貼り付けることによって試料が得られる、請求項1記載の方法。

【請求項7】

特徴づけを用いて治療計画を決定する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

20

【請求項8】

単離された核酸分子またはその増幅産物をマイクロアレイに適用する、請求項2記載の方法。

【請求項9】

マイクロアレイを用いて発現プロファイルを検出する、請求項8記載の方法。

【請求項10】

皮膚病変の部位または周囲の周縁部において採取された生検材料から試料が得られる、請求項1記載の方法。

【請求項11】

テープがポリウレタンフィルム上にゴム系接着剤を含む、請求項6記載の方法。

30

【請求項12】

約1~10枚の粘着テープまたは1~10回のテープの貼り付けを適用し、かつ皮膚からはがす、請求項6記載の方法。

【請求項13】

約1~8枚の粘着テープまたは1~8回のテープの貼り付けを適用し、かつ皮膚からはがす、請求項6記載の方法。

【請求項14】

約1~5枚の粘着テープまたは1~5回のテープの貼り付けを適用し、かつ皮膚からはがす、請求項6記載の方法。

40

【請求項15】

皮膚の標的部位の生検材料を採取する段階をさらに含む、請求項6記載の方法。

【請求項16】

解析をインサイチューで行う、請求項2記載の方法。

【請求項17】

対象の試料中の、表8に列挙した1つまたは複数の遺伝子に由来する核酸分子を解析する段階を含み、それによって対象における黒色腫と異形成母斑または正常な色素沈着皮膚とを区別する、対象における黒色腫と異形成母斑または正常な色素沈着皮膚とを区別する方法。

【請求項18】

50

表1~7のいずれかに列挙した1つもしくは複数の遺伝子またはそれらの任意の組み合わせに由来する核酸分子を解析する段階をさらに含む、請求項17記載の方法。

【請求項19】

核酸分子がRNAである、請求項17記載の方法。

【請求項20】

核酸分子を解析する段階が、核酸分子の核酸配列における1つまたは複数の変異を検出する段階を含む、請求項17記載の方法。

【請求項21】

1つまたは複数の変異が、置換、欠失、および挿入からなる群より選択される、請求項20記載の方法。

【請求項22】

解析前に、試料から得られた核酸分子を増幅する段階をさらに含む、請求項17記載の方法。

【請求項23】

粘着テープに付着している試料を単離するのに十分な様式で、粘着テープを皮膚の標的部位に貼り付けることによって試料が得られ、該試料が核酸分子を含む、請求項17記載の方法。

【請求項24】

単離された核酸分子またはその増幅産物をマイクロアレイに適用する、請求項19記載の方法。

【請求項25】

マイクロアレイを用いて発現プロファイルを検出する、請求項22記載の方法。

【請求項26】

対象由来の皮膚の標的部位から採取された生検材料から試料が得られる、請求項17記載の方法。

【請求項27】

テープがポリウレタンフィルム上にゴム系接着剤を含む、請求項23記載の方法。

【請求項28】

約1~10枚の粘着テープまたは1~10回のテープの貼り付けを適用し、かつ皮膚からはがす、請求項23記載の方法。

【請求項29】

約1~8枚の粘着テープまたは1~8回のテープの貼り付けを適用し、かつ皮膚からはがす、請求項23記載の方法。

【請求項30】

約1~5枚の粘着テープまたは1~5回のテープの貼り付けを適用し、かつ皮膚からはがす、請求項23記載の方法。

【請求項31】

皮膚の標的部位の生検材料を採取する段階をさらに含む、請求項23記載の方法。

【請求項32】

解析をインサイチューで行う、請求項19記載の方法。

【請求項33】

対象の試料中の、表10~12および15に列挙した1つまたは複数の遺伝子に由来する核酸分子を解析する段階を含み、それによって対象における黒色腫と異形成母斑または正常な色素沈着皮膚とを区別する、対象における日光黒子と黒色腫または異形成母斑または正常な色素沈着皮膚とを区別する方法。

【請求項34】

表1~8のいずれかに列挙した1つもしくは複数の遺伝子またはそれらの任意の組み合わせに由来する核酸分子を解析する段階をさらに含む、請求項33記載の方法。

【請求項35】

核酸分子がRNAである、請求項33記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項36】

核酸分子を解析する段階が、核酸分子の核酸配列における1つまたは複数の変異を検出する段階を含む、請求項33記載の方法。

【請求項37】

1つまたは複数の変異が、置換、欠失、および挿入からなる群より選択される、請求項36記載の方法。

【請求項38】

解析前に、試料から得られた核酸分子を増幅する段階をさらに含む、請求項33記載の方法。

【請求項39】

粘着テープに付着している試料を単離するのに十分な様式で、粘着テープを皮膚の標的部位に貼り付けることによって、核酸分子を含む試料が得られる、請求項33記載の方法。

10

【請求項40】

単離された核酸分子またはその増幅産物をマイクロアレイに適用する、請求項25記載の方法。

【請求項41】

マイクロアレイを用いて発現プロファイルを検出する、請求項38記載の方法。

【請求項42】

対象由来の皮膚の標的部位から採取された生検材料から試料が得られる、請求項33記載の方法。

20

【請求項43】

テープがポリウレタンフィルム上にゴム系接着剤を含む、請求項39記載の方法。

【請求項44】

約1~10枚の粘着テープまたは1~10回のテープの貼り付けを適用し、かつ皮膚からはがす、請求項39記載の方法。

【請求項45】

約1~8枚の粘着テープまたは1~8回のテープの貼り付けを適用し、かつ皮膚からはがす、請求項39記載の方法。

【請求項46】

約1~5枚の粘着テープまたは1~5回のテープの貼り付けを適用し、かつ皮膚からはがす、請求項39記載の方法。

30

【請求項47】

皮膚の標的部位の生検材料を採取する段階をさらに含む、請求項39記載の方法。

【請求項48】

解析をインサイチューで行う、請求項35記載の方法。

【請求項49】

黒色腫を有さない対象由来の対応する試料中の標的タンパク質のレベルと比較して、対象由来の試料中の標的タンパク質のレベル変化を検出する段階であって、該タンパク質が表8に列挙した遺伝子の発現産物である段階を含み、それによって対象における黒色腫を診断する、対象における黒色腫を診断する方法。

40

【請求項50】

表1~7のいずれかに列挙した遺伝子またはそれらの任意の組み合わせの1つまたは複数の発現産物のレベル変化を検出する段階をさらに含む、請求項49記載の方法。

【請求項51】

粘着テープに付着している試料を単離するのに十分な様式で、粘着テープを皮膚の標的部位に貼り付けることによって細胞を含む試料が得られ、かつ該細胞を溶解して標的タンパク質を抽出する段階をさらに含む、請求項49記載の方法。

【請求項52】

テープがポリウレタンフィルム上にゴム系接着剤を含む、請求項51記載の方法。

【請求項53】

50

粘着テープ1~10枚を皮膚に貼り付け、かつ皮膚からはがす、請求項51記載の方法。

【請求項54】

粘着テープ約1~8枚を貼り付け、かつ皮膚からはがす、請求項51記載の方法。

【請求項55】

粘着テープ約1~5枚を貼り付け、かつ皮膚からはがす、請求項51記載の方法。

【請求項56】

皮膚の標的部位の生検材料を採取する段階をさらに含む、請求項51記載の方法。

【請求項57】

生検試料からタンパク質を抽出し、かつ生検材料中のタンパク質のレベルおよびテープ試料中のタンパク質のレベルを解析する、請求項56記載の方法。

10

【請求項58】

皮膚の標的部位の生検材料から試料が得られる、請求項49記載の方法。

【請求項59】

対象の非病変組織から試料を得る段階をさらに含む、請求項49記載の方法。

【請求項60】

非病変皮膚の生検材料を採取することによって非病変組織由来の試料が得られる、請求項59記載の方法。

【請求項61】

a) 粘着テープに付着している皮膚試料を単離するのに十分な様式で、粘着テープを対象の皮膚に貼り付ける段階であって、該皮膚試料が角質層由来の細胞を含み、かつ該皮膚が試験すべき疾患に罹患していない段階；

20

b) 該細胞を溶解してタンパク質を抽出する段階；および

c) 抽出したタンパク質を定量する段階

により、非病変組織由来の試料が得られる、請求項59記載の方法。

【請求項62】

非病変皮膚が乳様突起または上背部に由来する、請求項59記載の方法。

【請求項63】

黒色腫を有さない対象由来の対応する試料中の標的タンパク質のレベルと比較して、対象由来の試料中の標的タンパク質のレベル変化を検出する段階であって、該タンパク質が表10~12に列挙した遺伝子の発現産物である段階を含み、それによって対象における黒色腫を診断する、対象における日光黒子を診断する方法。

30

【請求項64】

表1~8のいずれかに列挙した遺伝子またはそれらの任意の組み合わせの1つまたは複数の発現産物のレベル変化を検出する段階をさらに含む、請求項63記載の方法。

【請求項65】

粘着テープに付着している試料を単離するのに十分な様式で、粘着テープを皮膚の標的部位に貼り付けることによって細胞を含む試料が得られ、かつ該細胞を溶解して標的タンパク質を抽出する段階をさらに含む、請求項63記載の方法。

【請求項66】

テープがポリウレタンフィルム上にゴム系接着剤を含む、請求項65記載の方法。

40

【請求項67】

粘着テープ1~10枚を皮膚に貼り付け、かつ皮膚からはがす、請求項65記載の方法。

【請求項68】

粘着テープ約1~8枚を貼り付け、かつ皮膚からはがす、請求項65記載の方法。

【請求項69】

粘着テープ約1~5枚を貼り付け、かつ皮膚からはがす、請求項65記載の方法。

【請求項70】

皮膚の標的部位の生検材料を採取する段階をさらに含む、請求項65記載の方法。

【請求項71】

生検試料からタンパク質を抽出し、かつ生検材料中のタンパク質のレベルおよびテープ

50

試料中のタンパク質のレベルを解析する、請求項70記載の方法。

【請求項72】

皮膚の標的部位の生検材料から試料が得られる、請求項63記載の方法。

【請求項73】

対象の非病変組織から試料を得る段階をさらに含む、請求項63記載の方法。

【請求項74】

非病変皮膚の生検材料を採取することによって非病変組織由来の試料が得られる、請求項73記載の方法。

【請求項75】

a) 粘着テープに付着している皮膚試料を単離するのに十分な様式で、粘着テープを対象の皮膚に貼り付ける段階であって、該皮膚試料が角質層由来の細胞を含み、かつ該皮膚が試験すべき疾患に罹患していない段階；

b) 該細胞を溶解してタンパク質を抽出する段階；および

c) 抽出したタンパク質を定量する段階

により、非病変組織由来の試料が得られる、請求項73記載の方法。

【請求項76】

非病変皮膚が乳様突起または上背部に由来する、請求項73記載の方法。

【請求項77】

以下の段階を含む、対象における黒色腫を診断する方法：

a) 対象の皮膚上の黒色腫の疑いがある標的部位の遺伝子発現プロファイルを提供する段階であって、皮膚の該標的部位が黒色腫のマーカーである複数の遺伝子をタンパク質レベルで同時に発現する段階；および

b) 対象の遺伝子発現プロファイルを対応する正常皮膚試料から得られた参照遺伝子発現プロファイルと比較する段階であって、該参照遺伝子発現プロファイルが、エンドセリン受容体B型、仮説タンパク質MGC40222、テトラトリコペプチド反復ドメイン3、staufen RN A結合タンパク質(ショウジョウバエ(*Drosophila*))、アクチニン 4、KIAA1212、糖タンパク質M6B、v-kit Hardy-Zuckerman 4ネコ肉腫ウイルス癌遺伝子相同体、c-Maf誘導タンパク質、アダプター関連タンパク質複合体2 μ 1サブユニット、シンタキシン5A、ケモカイン様因子スーパーファミリー4、UDP-Gal: GlcNAc 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼポリペプチド5、フィブロシン1、高可能性のマウスneighbor of Punc E11のオルソログ、ミオシン重鎖ポリペプチド14、黒色腫における選択的(preferentially)発現抗原、十文字ドメイン含有3、BCL2関連タンパク質A1、フォルミン結合タンパク質1、またはそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される標的遺伝子の発現値を含む段階。

【請求項78】

参照遺伝子発現プロファイルが、チロシナーゼ関連タンパク質1、LIMホメオボックス2、メラニン-A、スベルミジン/スベルミンN1-アセチルトランスフェラーゼ、NDRGファミリーメンバー2、炭水化物(N-アセチルグルコサミン-6-O)スルホトランスフェラーゼ2、シンデカン結合タンパク質(シンテニン)、クリスタリン、 B、エンドセリン受容体B型、テトラトリコペプチド反復ドメイン3、WAP4-ジスルフィドコアダメイン3、チトクロムP450(ファミリー1、サブファミリーB、ポリペプチド1)、p8タンパク質(転移の候補1)、インターフェロン誘導タンパク質16、ドパクロムトートメララーゼ(ドパクロム -イソメララーゼ、チロシン関連タンパク質2)、溶質輸送体ファミリー39(亜鉛輸送体)、メンバー6、熱ショック70 kDaタンパク質2、小胞結合膜タンパク質2(シナプトブレビン2)、A1661453タンパク質に類似、および一過性受容体電位カチオンチャネル(サブファミリーM、メンバー1)、チロシナーゼ(眼皮膚白皮症IA)、エンドセリン受容体B型、テトラトリコペプチド反復ドメイン3、シンデカン結合タンパク質(シンテニン)、v-kit Hardy-Zuckerman 4ネコ肉腫ウイルス癌遺伝子相同体、OTUドメイン、ユビキチンアルデヒド結合1、タンパク質ホスファターゼ1調節(阻害)サブユニット12A、カルボニン2、dishevelled dsh相同体3(ショウジョウバエ)、tribbles相同体2(ショウジョウバエ)、ムコリピン3、アクチニン 4、リボソームタンパク質S15、CDC37細胞分裂周期37相同体(*S. cerevisiae*)、十文字ド

10

20

30

40

50

メイン含有3、v-maf筋腱膜線維肉腫癌遺伝子相同体B(鳥類)、c-Maf誘導タンパク質、ミオシン重鎖ポリペプチド14、仮説タンパク質MGC40222、またはそれらの任意の組み合わせのヒトmRNAの発現値をさらに含む、請求項77記載の方法。

【請求項79】

参照遺伝子発現プロファイルが、表1~7に列挙した任意の標的遺伝子の発現値をさらに含む、請求項77記載の方法。

【請求項80】

参照遺伝子発現プロファイルがデータベース中に含まれる、請求項77~79のいずれか一項記載の方法。

【請求項81】

前記比較する段階をコンピュータアルゴリズムを用いて行う、請求項77記載の方法。

【請求項82】

以下の段階を含む、対象における日光黒子を診断する方法：

a) 対象の皮膚上の黒色腫の疑いがある標的部位の遺伝子発現プロファイルを提供する段階であって、皮膚の該標的部位が黒色腫のマーカーである複数の遺伝子をタンパク質レベルで同時に発現する段階；および

b) 対象の遺伝子発現プロファイルを対応する正常皮膚試料から得られた参照遺伝子発現プロファイルと比較する段階であって、該参照遺伝子発現プロファイルが、インターフェロン調節因子6、クローディン23、メラニン-A、大理石骨病関連膜貫通タンパク質1、RAS様ファミリー11メンバーB、アクチニン 4、膜貫通タンパク質68、グリシンリッチタンパク質(GRP3S)、転写因子4、仮説タンパク質FLJ20489、チトクロムc体細胞性、転写因子4、フォークヘッドボックスP1、ERBB2-2のトランスデューサー、グルタミル-ペプチドシクロトランスフェラーゼ(グルタミルシクラゼ)、仮説タンパク質FLJ10770、セレノリン酸合成酵素2、胚性Fyn関連基質、Kruppel様因子8、Discs large相同体5(シヨウジョウバエ)、Gタンパク質シグナル伝達調節因子10、ADP-リボシル化因子関連タンパク質2、TIMPメタロペチダーゼインヒビター2、5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミドリボヌクレオチドホルミルトランスフェラーゼ/IMPシクロヒドロラーゼ、RIKEN cDNA 5730421E18遺伝子に類似、Gタンパク質シグナル伝達調節因子10、推定核内RNA結合タンパク質、チロシナーゼ関連タンパク質1、TIMPメタロペチダーゼインヒビター2、クローディン1、転写因子4、溶質輸送体ファミリー16(モノカルボン酸トランスポーター)メンバー6(溶質輸送体ファミリー16メンバー6に類似；モノカルボン酸トランスポーター6)、セレノリン酸合成酵素2、アネキシンA5、メラニン-A、プレクストリン相同様ドメイン、ファミリーA、メンバー1、切断点クラスター領域；切断点クラスター領域アイソフォーム1に類似、脂肪腫HMGIC融合パートナー様3、Aキナーゼ(PRKA)アンカータンパク質13、Rho関連BTBドメイン含有3、Ras結合(RaIGDS/AF-6)ドメインファミリー8、ADP-リボシル化因子様6相互作用タンパク質2、E74様因子5(etsドメイン転写因子)、仮説タンパク質FLJ21924、ジンクフィンガー、DHC型含有11、膜成分、第11染色体、表面マーカー1、FLJ20259タンパク質、第9染色体オープンリーディングフレーム3、血清/グルコシルコイド調節性キナーゼ、エクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ2(オータキシン)、複数のスプライシングを伴うRNA結合タンパク質、アポリタンパク質L、2、インスリン受容体基質2、第14染色体オープンリーディングフレーム65、仮説タンパク質MGC10911、関連RASウイルス(r-ras)癌遺伝子相同体2、T細胞免疫調節タンパク質/T細胞免疫調節タンパク質、KIAA0754タンパク質、第14染色体オープンリーディングフレーム1、3要素モチーフ含有63、またはそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される標的遺伝子の発現値を含む段階。

【請求項83】

参照遺伝子発現プロファイルが、表1~8、10、11に列挙した遺伝子またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む、請求項82記載の方法。

【請求項84】

参照遺伝子発現プロファイルが、表10または11に列挙した任意の標的遺伝子の発現値をさらに含む、請求項82記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 85】

参照遺伝子発現プロファイルがデータベース中に含まれる、請求項82～84のいずれか一項記載の方法。

【請求項 86】

前記比較する段階をコンピュータアルゴリズムを用いて行う、請求項82記載の方法。

【請求項 87】

皮膚試料採取装置、ならびに表10～12および15中の1種もしくは複数種の核酸分子に、または表10～12および15中の核酸分子の核酸もしくはタンパク質発現産物に選択的に結合する1つまたは複数のプローブまたはプライマーを含む、対象における皮膚病変を特徴づけるためのキット。

10

【請求項 88】

表1～8のいずれかにおける1種もしくは複数種の核酸分子に、または表1～8のいずれかにおける核酸分子の核酸もしくはタンパク質発現産物に選択的に結合する1つまたは複数のプローブまたはプライマーをさらに含む、請求項87記載のキット。

【請求項 89】

表1～8、10～12、および15のいずれかにおける核酸分子の一部に結合するプローブを提供する、請求項87記載のキット。

【請求項 90】

一方の鎖上の遺伝子の上流と選択的に結合するフォワードプライマー、および相補鎖上の遺伝子の上流と選択的に結合するリバースプライマーを含む1つまたは複数のプライマー対を提供するキットであって、該遺伝子が表1～8、10～12、および15のいずれかに列挙されている、請求項87記載のキット。

20

【請求項 91】

皮膚試料採取装置が生検針である、請求項87記載のキット。

【請求項 92】

皮膚試料採取装置が粘着テープである、請求項87記載のキット。

【請求項 93】

粘着テープがポリウレタンフィルム上にゴム系接着剤を含む、請求項92記載のキット。

【請求項 94】

表1～8、10～12、15のいずれかにおいて特定される遺伝子またはそれらの任意の組み合わせの、遺伝子または核酸もしくはタンパク質産物の少なくとも断片を含むマイクロアレイをさらに含む、請求項87記載のキット。

30

【請求項 95】

アプリケーション、ならびに表10～12および15中の1種もしくは複数種の核酸分子に、または表10～12および15のいずれかにおける核酸分子の核酸もしくはタンパク質発現産物に選択的に結合する1つまたは複数のプローブまたはプライマーを含む、対象における皮膚病変を特徴づけるためのキット。

【請求項 96】

表1～8のいずれかにおける核酸分子の1つもしくは複数に、または表1～8のいずれかにおける核酸分子の核酸もしくはタンパク質発現産物に選択的に結合する1つまたは複数のプローブまたはプライマーをさらに含む、請求項95記載のキット。

40

【請求項 97】

プローブが検出可能に標識されている、請求項95記載のキット。

【請求項 98】

対象がヒトである、請求項1、17、33、49、63、77、または82のいずれか一項記載の方法。

【請求項 99】

試料が表皮試料である、請求項1、17、33、49、63、77、または82のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は一般に、主に非侵襲的な皮膚試料採取を用いて、黒色腫の疑いがある色素性皮膚病変を特徴づける方法に関する。

【背景技術】

【0002】

背景情報

黒色腫はヒトにおける皮膚癌の重篤な形態である。これは、通常は皮膚の色素細胞(メラノサイト)から生じる。黒色腫の発生率は、米国においてすべての癌のうち最も早い速度で増加しており、生涯リスクは68人に1人である。黒色腫は全皮膚癌の4%を占めるにすぎないが、皮膚癌による全死亡の80%を占める。早期疾患である場合の黒色腫の認識および診断がその治療にとって重要であることは、長い間認められている。

10

【0003】

このことから、黒色腫の治療のみならず、予防および検出を含む黒色腫のすべての局面において研究を行うことが必須である。黒色腫によるこれらの死亡の大部分は、最初に皮膚に位置した黒色腫が早期に検出できていれば、防げた可能性がある。黒色腫が適切に外科的に切除されるならば、最も初期の皮膚段階である表皮内の黒色腫を治療する能力は実質的に100%である。黒色腫が後期に発見された場合には、これは4 mmまたはそれ以上の深さに浸潤しており、10年生存率は50%未満である。黒色腫が体の遠隔部位に広がる(病期IV)まで検出されなければ、予後は不良となり、患者の7~9%しか5年生存することができず、生存期間中央値は8~9ヶ月である。病期IVの黒色腫の長期「治療」率はわずか1~2%である。

20

【0004】

黒色腫の早期発見を進めるためには、いくつかの事柄を改善しなければならない。人々は、黒色腫のリスク、ならびに自身の皮膚において黒色腫を予防および発見する方法に関して、より良い教育を受ける必要がある。また、医師は黒色腫の可能性にさらに注意する必要がある、検出のより良い訓練を受ける必要がある。これら2つの領域が改善されたとしても、皮膚における黒色腫の診断は依然として難しい。黒色腫が専門である色素性病変クリニックに勤務している熟練した臨床医でさえ、疑わしい色素性病変が黒色腫であるか否かを60~80%の感度で判定できるにすぎないことが、研究から示されている。このため、検出されるすべての黒色腫について多数の色素性病変の外科生検が必要となり、また疑いなく、いくつかの黒色腫はその早期に見逃される。

30

【0005】

現在の診療では、黒色腫は生検および組織病理学的検査によって診断される;1つの黒色腫を見出すのにおよそ20~30回の生検を行わなければならない、その場合でさえ、いくつかの黒色腫は最初期段階において見逃される。視覚的検出の限界は、最初に切除する必要なしに、疑わしい病変が黒色腫であるか否かをより良く判定する方法を常に模索している皮膚科医にも明らかである。このために、エピルミネッセンス顕微鏡(ELM)が使われ始めた。これは、皮膚-空気界面における屈折率差による視覚的干渉を軽減しながら、それと同時に病変を拡大する装置を用いて、病変を検査する方法である。ELMは異なる見方を提供するが、改善には限界がある。人がこの機器の利用にかなり熟練するまでに、黒色腫の検出の感度は実際に低下することが、研究から示されている。ELMの非常に熟練した使用者でさえ、黒色腫を検出する能力を5~10%向上させるにすぎない。このために依然として、検出は容認できない感度であり、数個の黒色腫を検出するために多数の良性病変の生検を行うことが必要となる。この場合もまた、いくつかの黒色腫はその早期に完全に見逃されることになる。

40

【0006】

医師が皮膚の疑わしい病変の性質および程度を判定することを可能にする技術をさらに開発する必要性が明らかに存在する。そのような技術は理想的には、疑わしい病変の生理

50

機能を直接アッセイして、高感度診断を可能にする。

【発明の概要】

【0007】

発明の概要

本発明は、特定の遺伝子に由来する核酸分子または核酸分子のタンパク質発現産物の解析を用いて、対象における皮膚病変を特徴づけることができるという発見に一部基づいている。この方法は、例えば、DNA、メッセンジャーRNA、またはそこから得られたタンパク質発現産物に基づいた有益な遺伝情報を提供する。

【0008】

1つの態様において、本方法は、バイオマーカーの直接的な定量的および定性的評価を可能にするテープ剥ぎ取り手順による、皮膚の表面からDNAもしくはメッセンジャーRNAなどの核酸またはタンパク質を回収するための非侵襲的アプローチの使用を含む。テープで回収した核酸およびタンパク質発現産物は、生検によるそのような分子の回収と質および有用性の上で匹敵することが示されるが、非侵襲的方法は、生検試料を用いた場合には得られない皮膚の最外層の細胞に関する情報を提供する。最終的に、非侵襲的方法は生検よりもはるかに外傷が少ない。

10

【0009】

このようにして、非侵襲的方法を用いて、黒色腫の疑いがある色素性皮膚病変上の細胞を捕獲する。病変の性質(例えば、悪性黒色腫)を診断するために、非侵襲的方法によって捕獲した皮膚細胞から得られた核酸分子を解析する。1つの態様では、解析前に核酸分子を増幅する。二次的な結果は、様々な色素性皮膚病変の診断および予後診断のため、ならびにさらには治療計画を予測するための検査を含み得る。別の態様では、皮膚細胞を溶解して1種または複数種のタンパク質を抽出し、次にこれを定量して病変の性質を診断する。本発明の方法が皮膚試料を得るための非侵襲的技法に限定されないことが理解されるべきである。例えば、非限定的に、当業者は、皮膚の剥離、生検、吸引、吹きつけ、およびその他の技法など、皮膚試料を得るための他の技法を知っている。本明細書に記載する通り、非侵襲的なテープ剥ぎ取りは皮膚試料を得るための説明例である。

20

【0010】

別の態様において、本方法は、皮膚から得られた核酸分子の核酸配列における1つまたは複数の変異の検出を含む。そのような変異は、皮膚試料が得られた対象において疾患状態を引き起こす、核酸配列の置換、欠失、および/または挿入であってよい。

30

【0011】

1つの態様において、解析する核酸分子は表10~12および15に列挙したものである。別の態様において、本方法は、表1~8に列挙した1種または複数種の核酸分子を解析する段階をさらに含む。例えば、1つの態様において、解析する遺伝子は、インターフェロン調節因子6、クローディン23、メラニン-A、大理石骨病関連膜貫通タンパク質1、RAS様ファミリー-11メンバーB、アクチニン 4、膜貫通タンパク質68、グリシンリッチタンパク質(GRP3S)、転写因子4、仮説タンパク質FLJ20489、チトクロムc体細胞性、転写因子4、フォークヘッドボックスP1、ERBB2-2のトランスドューサー、グルタミル-ペプチドシクロトランスフェラーゼ(グルタミルシクラゼ)、仮説タンパク質FLJ10770、セレノリン酸合成酵素2、胚性Fyn関連基質、Kruppel様因子8、Discs large相同体5(ショウジョウバエ(*Drosophila*)), Gタンパク質シグナル伝達調節因子10、ADP-リボシル化因子関連タンパク質2、TIMPメタロペチダーゼインヒビター2、5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミドリボヌクレオチドホルミルトランスフェラーゼ/IMPシクロヒドロラーゼ、RIKEN cDNA 5730421E18遺伝子に類似、Gタンパク質シグナル伝達調節因子10、推定核内RNA結合タンパク質、チロシナーゼ関連タンパク質1、TIMPメタロペチダーゼインヒビター2、クローディン1、転写因子4、溶質輸送体ファミリー-16(モノカルボン酸トランスポーター)メンバー-6(溶質輸送体ファミリー-16メンバー-6に類似；モノカルボン酸トランスポーター-6)のいずれか1つもしくは複数、またはそれらの任意の組み合わせである。別の態様において、核酸分子は、表10~12および15に列挙した1つまたは複数種の遺伝子に由来する。

40

50

【0012】

したがって、対象における皮膚病変の生検によって核酸分子またはタンパク質を得る段階、ならびに核酸分子を解析して、対象における黒色腫と異形成母斑および/または正常な色素沈着皮膚とを区別する段階を含む、対象における黒色腫を特徴づけるおよび/または診断する方法を本明細書に提供する。この方法では、その発現が黒色腫の情報を提供する少なくとも1種の核酸分子を表皮試料において検出する。一例では、表1~8、10~12、15に列挙した遺伝子の1つもしくは複数またはそれらの組み合わせの発現を表皮試料において検出して、黒色腫を特徴づける。1つの態様において、遺伝子は、インターフェロン調節因子6、クローディン23、メラニン-A、大理石骨病関連膜貫通タンパク質1、RAS様ファミリー11メンバーB、アクチニン 4、膜貫通タンパク質68、グリシンリッチタンパク質(GRP 3S)、転写因子4、仮説タンパク質FLJ20489、チトクロムc体細胞性、転写因子4、フォークヘッドボックスP1、ERBB2-2のトランスデューサー、グルタミル-ペプチドシクロトランスフェラーゼ(グルタミルシクラゼ)、仮説タンパク質FLJ10770、セレノリン酸合成酵素2、胚性Fyn関連基質、Kruppel様因子8、Discs large相同体5(ショウジョウバエ)、Gタンパク質シグナル伝達調節因子10、ADP-リボシル化因子関連タンパク質2、TIMPメタロペチダーゼインヒビター2、5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミドリボヌクレオチドホルミルトランスフェラーゼ/IMPシクロヒドロラーゼ、RIKEN cDNA 5730421E18遺伝子に類似、Gタンパク質シグナル伝達調節因子10、推定核内RNA結合タンパク質、チロシナーゼ関連タンパク質1、TIMPメタロペチダーゼインヒビター2、クローディン1、転写因子4、溶質輸送体ファミリー16(モノカルボン酸トランスポーター)メンバー6(溶質輸送体ファミリー16メンバー6に類似；モノカルボン酸トランスポーター6)のいずれか1つもしくは複数、またはそれらの任意の組み合わせである。

【0013】

本発明の非侵襲的方法は、粘着テープに付着している試料を単離するのに十分な様式で、粘着テープを皮膚の標的部に貼り付ける段階であって、該試料が核酸分子またはタンパク質を含む段階を含む。典型的には、その発現が黒色腫の情報を提供する少なくとも1種の核酸分子またはタンパク質を試料において検出する。テープ剥ぎ取りを用いて皮膚を特徴づける方法は、以下のようないくつかの適用を有する：(i) 疾患分類/下位分類；(ii) 疾患の重症度および進行のモニタリング；(iii) 治療効力のモニタリング；ならびに(iv) 特定の治療計画の予測。これらの適用はすべて、それら自体で本明細書に開示する態様を表すが、別の方法で(例えば、生検を用いて)回収するのが困難なまたは実際的ではない情報を回収するために、非侵襲的な試料採取を用いることが好ましい。情報は、皮膚表面に近い皮膚細胞のDNA、タンパク質、またはRNA中に含まれている可能性がある。1つの態様では、表1~8、10~12、15に列挙した遺伝子の1つもしくは複数またはそれらの組み合わせの発現を試料において検出して、試料を特徴づける。この例示的な方法は、黒色腫と異形成母斑および/または正常な色素沈着皮膚とを区別するのに特に有用である。1つの態様では、表12または15に列挙した遺伝子の1つまたは複数の発現を試料において検出して、試料を特徴づける。

【0014】

そのようにして、粘着テープに付着している試料を単離するのに十分な様式で、粘着テープを皮膚の標的部に貼り付ける段階であって、該試料が核酸分子を含む段階を含む、対象における日光黒子と異形成母斑および/または基底細胞癌および/または正常な色素沈着皮膚とを区別する方法もまた、本明細書に提供する。その発現が日光黒子の情報を提供する少なくとも1種の核酸分子を試料において検出する。1つの態様では、表10~12、15に列挙した遺伝子の1つもしくは複数またはそれらの組み合わせの発現を試料において検出して、黒色腫を特徴づける。別の態様では、表12または15に列挙した遺伝子の1つまたは複数の発現を試料において検出して、日光黒子の特徴づける。

【0015】

その他の態様は、皮膚のテープ剥ぎ取りには、非極性の柔軟な粘着テープ、特にゴム系接着剤を含む柔軟なテープの方が他の種類の粘着テープよりも効果的であるという発見に

一部基づいている。ゴム系接着剤を含む柔軟なテープを用いると、わずか10回またはそれ未満のテープ剥ぎ取り、およびある特定の例ではわずか4回またはさらには1回のテープ剥ぎ取りを用いて、皮膚の表皮層から核酸分子を単離および/または検出することができる。

【0016】

別の態様において、本発明の方法は、視覚的解析のために検出可能に標識されたプローブを皮膚病変に直接適用する段階を含む、インサイチューでの皮膚病変の特徴づけを提供する。その発現が黒色腫または異形成母斑または正常皮膚の情報を提供する少なくとも1種の核酸分子を、皮膚病変または周囲の周縁部もしくは組織において、特異的プローブを用いて検出する。一例では、表1~8、10~12、15に列挙した遺伝子の1つもしくは複数またはそれらの組み合わせの発現を、皮膚病変または周囲の周縁部もしくは組織において検出して、黒色腫を特徴づける。1つの態様では、表10~12または15に列挙した遺伝子の1つまたは複数の発現を試料において検出して、黒色腫を特徴づける。

10

【0017】

対象の皮膚上の黒色腫の疑いがある標的部位の遺伝子発現パターンを確立し、対象の遺伝子発現プロファイルを対応する正常皮膚試料から得られた参照遺伝子発現プロファイルと比較することによって疾患状態を診断する方法もまた、本明細書に提供する。1つの態様において、皮膚の標的部位は、黒色腫のマーカーである複数の遺伝子をタンパク質レベルで同時に発現する。別の態様において、遺伝子は表1~8、10~12、15に列挙したものの、またはそれらの任意の組み合わせである。別の態様において、遺伝子は表8または12に列

20

【0018】

1つの態様において、疾患状態を診断する方法は、遺伝子の核酸配列における1つまたは複数の変異の検出を含む。そのような変異は、皮膚試料が得られた対象において疾患状態を引き起こす、核酸配列の置換、欠失、および/または挿入であってよい。1つの態様において、遺伝子は表1~8、10~12、15に列挙したものの、またはそれらの任意の組み合わせである。別の態様において、遺伝子は表8または12に列挙したものである。

【0019】

別の態様において、本発明は、対象における皮膚病変を特徴づけるためのキットを提供する。1つの態様において、キットは、生検針または非侵襲的なテープ剥ぎ取りのための粘着テープなどの皮膚試料採取装置、ならびに表1~8、および10~12、15のいずれかにおける1種もしくは複数種の核酸分子に、または表1~8、10~12、および15のいずれかにおける核酸分子の核酸もしくはタンパク質発現産物に選択的に結合する1つまたは複数のプローブまたはプライマーを含む。例えば、1つの態様において、解析する遺伝子は、インターフェロン調節因子6、クローディン23、メラニン-A、大理石骨病関連膜貫通タンパク質1、RAS様ファミリー11メンバーB、アクチニン 4、膜貫通タンパク質68、グリシンリッチタンパク質(GRP3S)、転写因子4、仮説タンパク質FLJ20489、チトクロムc体細胞性、転写因子4、フォークヘッドボックスP1、ERBB2-2のトランスドューサー、グルタミル-ペプチドシクロトランスフェラーゼ(グルタミルシクラーゼ)、仮説タンパク質FLJ10770、セレノリン酸合成酵素2、胚性Fyn関連基質、Kruppel様因子8、Discs large相同体5(ショウジョウバエ)、Gタンパク質シグナル伝達調節因子10、ADP-リボシル化因子関連タンパク質2、TIMPメタロペチダーゼインヒビター2、5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミドリボヌクレオチドホルミルトランスフェラーゼ/IMPシクロヒドロラーゼ、RIKEN cDNA 5730421E18遺伝子に類似、Gタンパク質シグナル伝達調節因子10、推定核内RNA結合タンパク質、チロシナーゼ関連タンパク質1、TIMPメタロペチダーゼインヒビター2、クローディン1、転写因子4、溶質輸送体ファミリー16(モノカルボン酸トランスポーター)メンバー6(溶質輸送体ファミリー16メンバー6に類似；モノカルボン酸トランスポーター6)のいずれか1つもしくは複数、またはそれらの任意の組み合わせである。別の態様において、キットは、表1~8、10~12、15のいずれかにおいて特定される遺伝子またはそれらの任意の組み合わせの、遺伝子または核酸もしくはタンパク質産物の少なくとも断片を含むマイクロアレイを

30

40

50

含む。

【0020】

別の態様において、対象における皮膚病変を特徴づけるためのキットは、アプリケーション、ならびに表1~8、および10~12、15のいずれかにおける1種もしくは複数種の核酸分子に、または表1~8、10~12、および15のいずれかにおける核酸分子の核酸もしくはタンパク質発現産物に選択的に結合する1種または複数種のプローブまたはプライマーを含む。1つの態様では、RNAの発現の視覚的同定のために、プローブを検出可能に標識する。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1AおよびBは、母斑と原発性黒色腫との間のプローブ/遺伝子発現差の有意性を示す閾値を $p < 0.05$ と想定した、サンプルサイズの関数としてのEDR、PTP、およびPTNによるデータを示すグラフィック図である。

10

【図2】図2AおよびBは、正常皮膚、母斑、および原発性黒色腫を比較する分散分析(ANOVA)の状況における、母斑対原発性黒色腫の対比結果を考慮したサンプルサイズ解析によるデータを示すグラフィック図である。

【図3】図3AおよびBは、異なる想定有意水準に関して、事後の真の確率(PTP)にもっぱら焦点をおいた解析によるデータを示すグラフィック図である。

【図4A】黒色腫と異型母斑および正常な色素沈着皮膚とを区別するための遺伝子分類器の開発を示す絵図およびグラフィック図である。

【図4B-1】黒色腫と異型母斑および正常な色素沈着皮膚とを区別するための遺伝子分類器の開発を示す絵図およびグラフィック図である。

20

【図4B-2】黒色腫と異型母斑および正常な色素沈着皮膚とを区別するための遺伝子分類器の開発を示す絵図およびグラフィック図である。

【図4C】黒色腫と異型母斑および正常な色素沈着皮膚とを区別するための遺伝子分類器の開発を示す絵図およびグラフィック図である。

【図4D】黒色腫と異型母斑および正常な色素沈着皮膚とを区別するための遺伝子分類器の開発を示す絵図およびグラフィック図である。

【図5A】黒色腫と異型母斑および正常な色素沈着皮膚とを区別するために開発された分類器の予測解析によるデータを示すグラフィック図である。

【図5B】黒色腫と異型母斑および正常な色素沈着皮膚とを区別するために開発された分類器の予測解析によるデータを示すグラフィック図である。

30

【図6A】黒色腫と異型母斑および正常な色素沈着皮膚とを区別するために開発された分類器の予測解析によるデータを示すグラフィック図である。

【図6B】黒色腫と異型母斑および正常な色素沈着皮膚とを区別するために開発された分類器の予測解析によるデータを示すグラフィック図である。

【図6C】黒色腫と異型母斑および正常な色素沈着皮膚とを区別するために開発された分類器の予測解析によるデータを示すグラフィック図である。

【図6D】黒色腫と異型母斑および正常な色素沈着皮膚とを区別するために開発された分類器の予測解析によるデータを示すグラフィック図である。

【図6E】黒色腫と異型母斑および正常な色素沈着皮膚とを区別するために開発された分類器の予測解析によるデータを示すグラフィック図である。

40

【図7】黒色腫と異型母斑および正常な色素沈着皮膚とを区別する同定された遺伝子の階層的クラスター解析である。

【図8】同定された遺伝子の分類モデリングによる結果を示すグラフィック図である。

【図9】黒色腫と異型母斑および正常な色素沈着皮膚とを区別するために開発された分類器のデータを示すグラフィック図である。

【図10-1】非侵襲的なテープ剥ぎ取りに基づいたゲノムプロファイリングを用いる、黒色腫と異型母斑とを識別するための分類器の開発を示す絵図である。

【図10-2】非侵襲的なテープ剥ぎ取りに基づいたゲノムプロファイリングを用いる、黒色腫と異型母斑とを識別するための分類器の開発を示す絵図である。

50

【図10-3】非侵襲的なテープ剥ぎ取りに基づいたゲノムプロファイリングを用いる、黒色腫と異型母斑とを識別するための分類器の開発を示す絵図である。

【図10-4】非侵襲的なテープ剥ぎ取りに基づいたゲノムプロファイリングを用いる、黒色腫と異型母斑とを識別するための分類器の開発を示す絵図である。

【図11】黒色腫と異型母斑とを識別する19遺伝子分類器の開発を説明する絵図である。

【図12】図11において同定された19遺伝子分類器に由来する同定された遺伝子の階層的クラスタ解析を示す絵図である。

【図13】図11において同定された19遺伝子分類器に対する黒色腫試料10例および母斑試料10例による結果を示す絵図である。

【図14】日光黒子と正常な色素沈着皮膚とを区別するために開発された分類器のデータを示すグラフィック図である。

【図15】日光黒子と正常な色素沈着皮膚とを区別する、図14による同定された遺伝子の階層的クラスタ解析である。

【図16】日光黒子と正常な色素沈着皮膚とを区別するために開発された分類器の予測解析によるデータを示すグラフィック図である。

【図17】日光黒子と異型母斑および基底細胞癌とを区別する遺伝子発現プロファイルの階層的クラスタ解析である。

【図18】日光黒子と悪性黒子とを区別する遺伝子発現プロファイルの階層的クラスタ解析である。

【図19】日光黒子と悪性黒子とを区別する28遺伝子分類器の階層的クラスタ解析である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

発明の詳細な説明

本発明は、特定の遺伝子に由来する核酸分子または核酸分子のタンパク質発現産物の解析を用いて、対象における皮膚病変を特徴づけることができるという発見に一部基づいている。したがって、本発明は、関心対象の1つまたは複数の特異的遺伝子の発現プロファイルを決定的により、癌、特に黒色腫を検出するのに有用な方法およびキットを提供する。加えて、本発明は、関心対象の1つまたは複数の特異的遺伝子の発現プロファイルを決定的により、日光黒子と癌とを区別するのに有用な方法およびキットを提供する。

【0023】

黒色腫において全ゲノム発現プロファイリング研究を行うことには、2つの主要な動機づけがある。第一に、黒色腫は、良性病変から癌へ：正常な色素沈着細胞から母斑へ、異型母斑へ、原発性表皮内黒色腫へ、浸潤性原発性黒色腫へ、侵襲性転移性黒色腫への緩徐進行の最もよく特徴づけられた発癌モデルの1つである。この進行は特有の染色体変化と相関することが知られており、また遺伝子発現の段階的な漸進的变化を介して起こると考えられており、発現プロファイリングによって黒色腫における腫瘍形成の原因である遺伝子が同定され得ることが示唆される。実際に、黒色腫細胞株のマイクロアレイ解析により、候補腫瘍遺伝子が同定されている。第二の理由は、腫瘍の分子的特徴づけによって、より良好な腫瘍の病期分類および予後予測が可能になることである。腫瘍の深さおよび潰瘍化などの組織学的特徴づけは進行の予測因子としていくらか価値があるものの、どの患者が回復するか、ならびにどの患者が進行性疾患および転移を有するかを判断するのに役立つ情報価値のあるマーカーが不足している。腫瘍のマイクロアレイ実験において同定された分子マーカーは、乳癌管理における臨床診療に既に導入されている。黒色腫および黒色腫細胞株における遺伝子発現プロファイリング実験から、黒色腫の分類は改善され得るが、診断の分子基準を規定する、または予後マーカーを同定するための十分な力を備えた研究が不足しており；そのようなマーカーの確立が黒色腫ケアにおける大きな進歩となることが示唆される。黒色腫での効果的なマイクロアレイ研究が不足していることの主な理由は、大部分の固形腫瘍とは異なり、組織学的検査のために全病変をパラフィン包埋し切片

10

20

30

40

50

を作製する必要があり、RNA単離のための試料が残らないことである。この状況は現在変わりつつあるが、確定診断がなされるまで生検を回避する能力は、1回または複数回の生検に通常適さない対象にとって有力となるであろう。

【0024】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用する単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」とは、特に文脈によって明白に指示されていない限り、その対象物の複数形も含む。したがって、例えば「その方法(the method)」への言及は、本開示を読んだ際に当業者に明らかとなるであろう、本明細書に記載される種類の1つまたは複数の方法および/または段階を含み、以下同様である。

【0025】

特記しない限り、本明細書で使用する専門用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有する。本発明の実施または試験において、本明細書に記載のものと類似のまたは同等の任意の方法および材料を用いることができるが、好ましい方法および材料は本明細書に記載するものである。

【0026】

本明細書で使用する「対象」という用語は、本発明の方法を行う対象である任意の個体または患者を指す。一般的には対象はヒトであるが、当業者によって理解されるように、対象は動物であってもよい。したがって、齧歯類(マウス、ラット、ハムスター、およびモルモットを含む)、ネコ、イヌ、ウサギ、例えばウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタ等を含む家畜、および霊長類(サル、チンパンジー、オランウータン、およびゴリラを含む)などの哺乳動物を含む他の動物も、対象の定義に含まれる。

【0027】

本明細書で使用する「試料」および「生物試料」という用語は、本発明によって提供する方法に適した任意の試料を指す。細胞の試料は、例えば、対象の非侵襲的なテープ剥ぎ取りもしくは生検によって得られた皮膚試料、または対象の体液の試料を含む任意の試料であってよい。したがって1つの態様において、本発明の生物試料は、組織試料、例えば針生検による試料などの生検標本である。1つの態様において、「試料」という用語は、対象の皮膚に由来する任意の調製物を指す。例えば、本明細書に記載の非侵襲的方法を用いて得られた細胞の試料を用いて、本発明の方法のための核酸分子またはタンパク質を単離することができる。本発明のための試料は、典型的には、乾癬または皮膚炎などの、疾患または病理的もしくは生理的状态の結果である疑いがある皮膚病変、あるいは周囲の周縁部または組織から採取される。本明細書で使用する「周囲の周縁部」または「周囲の組織」とは、皮膚病変に隣接しているが、その他の点では正常であるかまたは病変を含まないように見える、対象の組織を指す。

【0028】

本明細書で使用する「対応する正常細胞」または「対応する正常試料」とは、検査する細胞と同じ臓器に由来する、およびそのような細胞と同じ種類の、対象由来の細胞または試料を指す。1つの局面において、対応する正常細胞は、皮膚病変も皮膚癌も有さない健康個体から得られた細胞の試料を含む。このような対応する正常細胞は、検査する細胞を提供する個体と同年齢および/または同じ性別の個体に由来してよいが、そうである必要はない。よって、「正常試料」または「対照試料」という用語は、健康であるか、またはさもなくば特定の疾患、病的もしくは生理的状态に罹患していないと見なされる類似種の対象から、あるいは皮膚病変を含まない部位における同一対象から採取された任意の試料を指す。したがって、RNAの正常/標準レベルとは、正常試料に由来する試料中に存在するRNAのレベルを意味する。RNAの正常レベルは、正常な健康対象から採取された皮膚試料または細胞抽出物を混合し、存在する1種または複数種のRNAのレベルを測定することによって、確立することができる。加えて、RNAの正常レベルはまた、健康と見なされるか、または少なくとも特定の疾患、病的もしくは生理的状态のない対象の集団から得られた平均値として決定され得る。したがって、対象、対照、および疾患試料におけるRNAのレベルを、標準値と比較することができる。標準値と対象値との間の偏差により、疾患を診断す

10

20

30

40

50

るまたは特徴づけるためのパラメータが確立される。

【0029】

「皮膚」という用語は、表皮(角質層を含む)および下層の真皮からなる身体の外側の保護被覆を指し、汗腺および皮脂腺ならびに毛包構造体を含むと理解されている。本出願を通して「皮膚の」という形容詞を用いることができるが、それらが用いられる文脈に応じて、一般的に皮膚の特質を指すことが理解されるべきである。ヒト皮膚の表皮は、皮膚組織のいくつかの異なる層を含む。最も深い層は、円柱細胞からなる基底層である。上を覆っている層は、多面細胞から構成される有棘層である。有棘層から押し上げられた細胞は扁平化し、ケラトヒアリン顆粒を合成して顆粒層を形成する。これらの細胞が外側に移動するにつれて、細胞は核を失い、ケラトヒアリン顆粒は融合し張原線維と混ざる。これは、透明層と称される透明な層を形成する。透明層の細胞は密に詰まっている。細胞が透明層から上方に移動するにつれて、それらは多層の不透明な鱗片に圧縮される。これらの細胞はすべて、ケラチンで完全に満たされ、核を含むすべての他の内部構造を失った細胞の扁平な残存物である。これらの鱗片は、表皮の外層である角質層を構成する。角質層の底部では細胞は密に詰まっており、相互に強く付着しているが、層の上部にいくほど細胞は緩く詰まるようになり、最終的に表面から剥がれ落ちる。

10

【0030】

本明細書で使用する「皮膚病変」という用語は、皮膚のある部位における色または肌理の変化を指す。したがって「黒色腫の疑いがある皮膚病変」とは、皮膚科医および癌専門医など、その分野の当業者に周知である悪性黒色腫の特徴を有する皮膚病変である。そのような病変は時々生じ、個体の正常な皮膚の色とは異なる色(例えば、茶色、黒色、赤色、または青色)を有し得る。黒色腫の疑いがある病変は場合によっては混色を含み、非対称である場合が多く、時間と共に外観は変化し得、出血する場合もある。黒色腫の疑いがある病変は、ほくろまたは母斑であってもよい。黒色腫病変は通常は直径6 mmよりも大きい、必ずしもそうとは限らない。黒色腫には、表在拡大型黒色腫、結節性黒色腫、末端黒子型黒色腫、および悪性黒子型黒色腫が含まれる。「悪性黒子」という用語は、不規則な輪郭を有して扁平で、斑状で、かつ褐色であり、何年もの期間にわたってゆっくりと増殖する、特に日光にさらされた部位における皮膚上の前癌病変を指す。黒色腫は、日光に過度にさらされた皮膚において起こり得る。したがって1つの態様において、皮膚試料は、日光に過度にさらされた皮膚の部位から採取される。

20

30

【0031】

「異形成母斑」という用語は、異型ほくろまたは外観が通常のほくろのものとは異なるほくろを指す。異形成母斑は一般的に通常のほくろよりも大きく、不規則で不明瞭な境界を有する。その色は均一でない場合が多く、淡紅色から暗褐色に及ぶ；それらは通常は扁平であるが、一部が皮膚表面上に隆起する場合もある。異形成母斑はどの場所にも見出され得るが、対象の体幹に最も多く見られる。

【0032】

本明細書で使用する「癌」という用語は、癌腫および肉腫を含むがこれらに限定されない任意の悪性腫瘍を含む。癌は細胞の無制御なおよび/または異常な分裂から生じ、これらは次いで周囲の組織に浸潤しこれを破壊する。本明細書で使用する「増殖すること」および「増殖」とは、有糸分裂を起こしている細胞を指す。本明細書で使用する「転移」とは、悪性腫瘍の出現部位から遠隔への伝播を指す。癌細胞は、血流を通じて、リンパ系を通じて、体腔を通過して、またはそれらの任意の組み合わせにより転移し得る。本明細書に提供する「癌性細胞」という用語は、本明細書に提供する癌性状態のいずれか1つに罹患した細胞を含む。「癌腫」という用語は、周囲の組織に浸潤する、および転移を引き起こす傾向がある上皮細胞で構成された悪性新生物を指す。「黒色腫」という用語は、主に皮膚に見出されるが腸および眼にも見出されるメラノサイトの悪性腫瘍を指す。「メラノサイト」とは、皮膚の表皮の底層である基底膜、および眼の中間層に位置する細胞を指す。したがって、「黒色腫転移」とは、局所リンパ節および/または遠隔臓器(例えば、肝臓、脳、乳房、前立腺等)への黒色腫細胞の伝播を指す。

40

50

【0033】

「基底細胞癌」または「BBC」という用語は、局所浸潤性であるが稀に転移する、ゆっくりと増殖する新生物を指す。これは、表皮または毛包の上皮細胞の最深層である基底細胞に由来する。BCCは、日光への過剰曝露と関連している場合が多い一般的な皮膚癌である。

【0034】

「日光黒子(solar lentigo)」という用語は、日光誘発性のしみまたは老人性黒子としても知られており、自然のまたは人工的な紫外線(UV)光によって起こる黒色(色素過剰)病変である。日光黒子は単一である場合もあれば、複数である場合もある。日光黒子は良性であるが、これは皮膚癌の発症のリスク因子である過度の日光曝露を示す。この病変は加齢に伴って数が増加する傾向があり、中年および高齢集団によく見られる。これらは約0.2~2.0 cmとサイズが異なり得る。この扁平な病変は通常は分離した境界を有し、暗黒色であり、また不規則な形状を有する。

10

【0035】

本明細書で使用する「遺伝子」という用語は、タンパク質に翻訳された場合に遺伝形質の発現をもたらすRNAを合成するためのコード化された指示を提供する、DNAのセグメントに沿ったヌクレオチドの直鎖状配列を指す。したがって、「皮膚マーカ―」または「バイオマーカ―」という用語は、その発現レベルが悪性黒色腫の部位における皮膚表面試料と、正常皮膚の、または良性母斑のような良性である病変の皮膚表面試料との間で異なる遺伝子を指す。よって、本発明の黒色腫皮膚マーカ―の発現は黒色腫に関連しているか、または黒色腫を示す。発現の統計的有意差が高い(例えば、90%または95%)信頼水準で認められるかどうかを判定するために用いることのできる多くの統計的技法が、当技術分野で公知である。したがって、これらの遺伝子の発現の増加または減少は悪性黒色腫と関連しており、悪性黒色腫を特徴づけることができる。1つの態様において、悪性黒色腫の部位近傍の皮膚試料と正常皮膚由来の皮膚試料の間には、少なくとも2倍のレベルの差が存在する。

20

【0036】

本明細書で使用する「核酸分子」という用語は、一本鎖、二本鎖、または三本鎖のDNA、RNA、およびそれらの任意の化学的修飾物を意味する。実質的に核酸のあらゆる修飾が意図される。「核酸分子」は、10、20、30、40、50、60、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、6000、7000、8000、9000、10,000、15,000、20,000、30,000、40,000、50,000、75,000、100,000、150,000、200,000、500,000、1,000,000、1,500,000、2,000,000、5,000,000塩基長、またはさらにそれ以上の塩基長から全長染色体DNA分子まで、ほぼすべての長さのものであってよい。遺伝子の発現を解析する方法のために、試料から単離する核酸は典型的にRNAである。

30

【0037】

マイクロRNA(miRNA)とは、ヒトを含む多様な種においてmRNA発現の調節に關与する、平均22ヌクレオチド長の小さな一本鎖RNA分子である(Bartel 2004に概説されている)。miRNAの最初の報告は、ワーム(worm)であるC.エレガンス(C. elegans)で発見されたlin-4遺伝子のものであった(Lee, Feinbaum et al. 1993)。それ以来、八工、植物、および哺乳動物において何百ものmiRNAが発見されている。miRNAは、mRNAの3'非翻訳領域に結合することによって遺伝子発現を調節し、i) mRNAの切断；または2) 翻訳の抑制のいずれかを触媒する。miRNAによる遺伝子発現の調節は、細胞の発生、分化、連絡、およびアポトーシスなどの多くの生物学的過程の中心をなす(Reinhart, Slack et al. 2000 ; Baehrecke 2003 ; Brennecke, Hipfher et al. 2003 ; Chen, Li et al. 2004)。最近、miRNAはマウス皮膚の胚形成中に活性を有し、皮膚の形態形成において重要な役割を果たすことが示された(Yi, O'Carroll et al. 2006)。

40

【0038】

遺伝子発現におけるmiRNAの役割を考えると、miRNAが特定の細胞型において、mRNAの相

50

対量を完全に指定しないとしてもこれに影響し、よって異なる細胞型において特定の遺伝子発現プロファイル(すなわち、特異的mRNAの集団)を決定することが明らかである。加えて、細胞における特異的miRNAの特定の分布もまた異なる細胞型で特有である可能性が高い。よって、組織のmiRNAプロファイルの決定を、その組織における実際のmRNA集団の発現プロファイリングのツールとして用いてもよい。したがって、miRNAレベルおよび/またはmiRNA変異の検出は、疾患の検出、診断、予後診断、もしくは治療に関連した決定(すなわち、治療計画を開始する前または後いずれかの応答を示す)、または対象における特定の疾患の特徴づけの目的に有用である。

【0039】

本明細書で使用する「タンパク質」という用語は、共有結合している少なくとも2つのアミノ酸を指し、これにはタンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、およびペプチドが含まれる。タンパク質は、天然アミノ酸およびペプチド結合、または合成ペプチド模倣構造体により構成され得る。したがって、本明細書で使用する「アミノ酸」または「ペプチド残基」とは、天然アミノ酸および合成アミノ酸の両方を意味する。例えば、ホモ-フェニルアラニン、シトルリン、およびノルロイシンは、本発明の目的のためのアミノ酸であると見なされる。「アミノ酸」には、プロリンおよびヒドロキシプロリンなどのイミノ酸残基もまた含まれる。側鎖は、(R)または(S)立体配置のいずれかであってよい。

【0040】

「プローブ」または「プローブ核酸分子」とは、少なくとも部分的に1本鎖であり、かつ関心対象の配列に少なくとも部分的に相補的であるか、または少なくとも部分的に実質的に相補的な核酸分子である。プローブは、RNA、DNA、またはRNAとDNA双方の組み合わせであってよい。骨格の糖がリボースまたはデオキシリボース以外である核酸を含むプローブ核酸分子を有することも、本発明の範囲内である。プローブ核酸はペプチド核酸であってもよい。プローブは、核酸分解活性に耐性の連結または検出可能な標識を含んでよく、他の部分、例えばペプチドに機能的に連結させることができる。

【0041】

1本鎖の核酸分子は、グアニン(G)がシトシン(C)と塩基対合し、またアデニン(A)がチミン(T)またはウリジン(U)と塩基対合する能力に基づいて、他の核酸分子の全体または一部と塩基対合(ハイブリダイズ)して二重らせん(2本鎖核酸分子)を形成し得る場合に、別の1本鎖核酸分子に対して「相補的」である。例えば、ヌクレオチド配列5'-TATAC-3'は、ヌクレオチド配列5'-GTATA-3'に相補的である。

【0042】

本発明で使用する「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の完全な分子、ならびにエピトープ決定基に結合することができるそれらの断片、例えばFabおよびF(ab')₂、FvおよびSCA断片を含むことを意味する。「特異的に結合する」または「特異的に相互作用する」という用語は、抗体に関して用いる場合、抗体と特定のエピトープの相互作用が少なくとも約 1×10^{-6} 、一般的には少なくとも約 1×10^{-7} 、通常は少なくとも約 1×10^{-8} 、および特に少なくとも約 1×10^{-9} または 1×10^{-10} もしくはそれ未満の解離定数を有することを意味する。

【0043】

本明細書で使用する「ハイブリダイゼーション」とは、核酸鎖が塩基対形成により相補鎖と結合する過程を指す。ハイブリダイゼーション反応は感受性が高く選択的であってよく、したがって関心対象の特定の配列は、それが低濃度で存在する試料中であっても同定され得る。インピトロの状況では、例えばプレハイブリダイゼーション溶液およびハイブリダイゼーション溶液中の塩もしくはホルムアルデヒドの濃度によって、またはハイブリダイゼーション温度によって、適切にストリンジェントな条件を規定することができ、そのような条件は当技術分野で周知である。特に、塩濃度を減少させる、ホルムアルデヒドの濃度を増加させる、またはハイブリダイゼーション温度を上昇させることによって、ストリンジェンシーを高めることができる。例えば、高ストリンジェンシー条件下でのハイブリダイゼーションは、約37 ~ 42 の約50%ホルムアミド中で起こり得る。ハイブリダ

10

20

30

40

50

イゼーションは、約30 ~ 35 の約35%~25%ホルムアミド中の低ストリンジェンシー条件下でも起こり得る。特に、ハイブリダイゼーションは、42 で、50%ホルムアミド、5×SS PE、0.3% SDS、および200 mg/ml 剪断変性サケ精子DNA中の高ストリンジェンシー条件下で起こり得る。ハイブリダイゼーションは、上記のような、ただし35%ホルムアミド中で35 の低い温度の低ストリンジェンシー条件下でも起こり得る。特定のレベルのストリンジェンシーに対応する温度範囲は、関心対象の核酸のプリン対ピリミジン比を算出し、それに応じて温度を調整することによってさらに狭めることができる。上記の範囲および条件の変更は当技術分野で周知である。

【0044】

本明細書で使用する「変異」という用語は、標準野生型配列に対するゲノムの変化を指す。変異は、ゲノムのある位置での核酸配列の欠失、挿入、もしくは再編成であってよく、または変異は、「点変異」と称されるゲノムのある位置での一塩基変化であってよい。変異は遺伝し得、または変異は個体の寿命の間に1つまたは複数の細胞で起こり得る。

10

【0045】

本明細書で使用する「キット」または「研究キット」という用語は、例えば検出、アッセイ、分離、精製等のような生物学的研究反応、手順、または合成を行うために用いられる製品の収集物を指し、これらの製品は典型的には、エンドユーザーに対して通常は一般的な包装内で共に輸送される。

【0046】

本明細書で使用する「改善すること」または「治療すること」という用語は、行った行為の結果として、癌または黒色腫に伴う臨床徴候および/または症状が軽減することを意味する。モニターすべき徴候または症状は特定の癌または黒色腫に特徴的であって、熟練した臨床医に周知であり、徴候および症状をモニターする方法もまた熟練した臨床医に周知である。したがって、「治療計画」とは、対象における疾患または癌を治療するための任意の系統的な計画または過程を指す。

20

【0047】

組織由来の試料は、当技術分野で周知のいくつもの手段によって単離することができる。試料を単離するための侵襲的方法には、例えば様々な組織の生検過程における針またはメスの使用が含まれるが、これに限定されない。試料を単離するための非侵襲的方法には、テープ剥ぎ取りおよび皮膚の剥離が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0048】

したがって1つの態様において、本発明は、疑わしい病変の試料を得るために非侵襲的なテープ剥ぎ取り技術を使用する。そのようにして、DNAマイクロアレイアッセイを用いて、非侵襲的な黒色腫の診断および/または黒色腫と日光黒子の区別を創出する。テープ剥ぎ取りにより、皮膚の表面からの表層細胞および付属器細胞が採取される。テープで剥ぎ取られた細胞から単離した少量の核酸分子を増幅し、マイクロアレイ解析および定量的PCRに用いることができる。加えて、溶解した細胞から得られたタンパク質を、疾患の診断のために定量してもよい。結果として、テープ剥ぎ取りは、その後の組織学的解析を妨げない非侵襲的診断方法であり、これにより黒色腫の現在の発現プロファイリング研究の大きな限界が回避される。テープ剥ぎ取りでは表皮から表層細胞が主に試料採取されるが、以下の理由で本方法は色素性病変の診断および予後予測にかなり有望である：第一に、良性母斑とは対照的に多くの黒色腫では、色素沈着細胞は表皮および/または付属器に遊走する。結果的に、この特徴は、テープ剥ぎ取りに基づいて良性色素性病変と黒色腫とを区別するのに役立つ。第二に、黒色腫に隣接した真皮および表皮に変化が生じる。黒色腫を覆っている表皮過形成は、血管新生および転移能の両方と相関するようである；これらの変化は、テープ剥ぎ取り方法によって試料採取されると予測される。最後に、いくつかの進行性黒色腫は皮膚の表面に到達し、黒色腫癌細胞はテープ剥ぎ取りによって直接試料採取される。加えて、テープ剥ぎ取りは、ありとあらゆる病変を生検することが実際的ではない、複数の色素性病変を有する患者のケアにおいて有用である。したがって、本発明は、表皮遺伝情報検索(Epidermal Genetic Information Retrieval : EGIR)によるテ

40

50

テープ剥ぎ取りによって回収された角質層RNA(参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,949,338号を参照されたい)を用いて、疑わしい色素性病変における黒色腫と異形成母斑とを区別することができる。

【0049】

示した通り、本明細書に提供するテープ剥ぎ取り方法は、典型的には、1回または複数回、粘着テープを対象の皮膚に貼り付け、該粘着テープを対象の皮膚からはがす段階を含む。ある特定の例では、約1~10回、粘着テープを皮膚に貼り付け、皮膚からはがす。あるいは、粘着テープ約10枚を皮膚に順次貼り付け、皮膚からはがすこともできる。これらの粘着テープはその後、さらなる解析のために混合する。したがって、10回、9回、8回、7回、6回、5回、4回、3回、2回、もしくは1回、粘着テープを標的部位に貼り付け、標的部位からはがすことができ、および/または粘着テープ10枚、9枚、8枚、7枚、6枚、5枚、4枚、3枚、2枚、もしくは1枚を標的部位に貼り付け、標的部位からはがすことができる。1つの説明例では約1~8回、別の例では1~5回、粘着テープを皮膚に貼り付け、別の説明例では4回、テープを貼り付け、皮膚からはがす。

10

【0050】

ゴム系接着剤は、例えば合成ゴム系接着剤であってよい。説明例におけるゴム系接着剤は、高い引き剥がし、高い剪断、および高い粘着性を有する。例えば、ゴム系接着剤は、D-SQUAME(商標)のようなアクリル系テープのピーク力粘着性よりも少なくとも25%、50%、または100%大きいピーク力粘着性を有し得る。D-SQUAME(商標)は、2ニュートンのピーク力を有することが見出されており、本明細書に提供する方法に用いられるゴム系接着剤のピーク力は、4ニュートンまたはそれ以上であり得る。さらに、ゴム系接着剤は、アクリル系テープの2倍、5倍、または10倍大きい接着力を有し得る。例えば、D-SQUAME(商標)は0.0006ニュートンメートルの接着力を有することが見出されているのに対して、本明細書に提供するゴム系テープは、テクスチャ分析器を用いて約0.01ニュートンメートルの接着力を有し得る。さらに、特定の説明例において、本明細書に提供する方法に用いられる接着剤は、他のゴム系接着剤、特に医療用途に用いられるものおよびダクトテープよりも高い引き剥がし、剪断、および粘着性を有する。

20

【0051】

実質的にいかなるサイズおよび/または形状の粘着テープならびに標的皮膚部位のサイズおよび形状も、それぞれ、本発明の方法によって使用し解析することができる。例えば、粘着テープは、直径10ミリメートル~100ミリメートル、例えば直径15~25ミリメートルの円板に製作することができる。粘着テープは、約50 mm²~1000 mm²、約100 mm²~500 mm²、または約250 mm²の表面積を有し得る。

30

【0052】

別の態様においては、生検などの侵襲的手順によって試料を得る。テープ剥ぎ取りの代わりにまたはその後、生検材料を採取してよく、これは標準的な組織病理学的解析に供される。テープ剥ぎ取り試料と同時に採取した生検試料の解析は、次に、DNAマイクロアレイによる選択された病変RNA試料の解析、遺伝子発現データと組織病理診断との相関、および黒色腫を診断するための候補発現分類器の創出の1つまたは複数から作成されたデータと相関させることができる。

40

【0053】

本明細書で使用する「生検」とは、解析のための細胞または組織の採取を指す。当技術分野で公知の多くの異なる種類の生検手順が存在する。最も一般的な種類には以下のものが含まれる：(1) 組織の試料のみを採取する切開生検；(2) 塊または疑わしい部位全体を採取する切除生検；および(3) 針を用いて組織または液体の試料を採取する針生検。太い針を用いる場合、この手順はコア生検と称される。細い針を用いる場合、この手順は細針吸引生検と称される。他の種類の生検手順には、薄片生検、パンチ生検、搔爬生検、およびインサイチュー生検が含まれるが、これらに限定されない。別の態様では、皮膚から1種または複数種の核酸分子を採取するための機器を用いて皮膚を剥離することにより、皮膚試料を得る。

50

【0054】

テープ剥ぎ取り方法を用いて得られる皮膚試料には、付属器構造体を含む細胞を含む表皮細胞が含まれる。ある特定の説明例において、試料は主に表皮細胞を、またはさらには表皮細胞のみを含む。表皮は主にケラチノサイト(>90%)からなり、これは基底層から分化し、細胞構成のレベルが減少していく様々な層を経て外側へ移動し、角質層の角化細胞になる。表皮の再生は、非病変皮膚において20~30日間ごとに起こる。表皮に存在する他の細胞型には、メラノサイト、ランゲルハンス細胞、およびメルケル細胞が含まれる。本明細書の実施例において説明するように、本発明のテープ剥ぎ取り方法は、表皮試料を単離するのに特に効果的である。

【0055】

当業者に周知のあらゆる手段により、皮膚試料から回収された細胞および細胞物質を溶解することによって、核酸を単離することもできる。例えば、RNeasy(商標)(Qiagen, Valencia, CA)およびTriReagent(商標)(Molecular Research Center, Inc, Cincinnati, OH)を含むがこれらに限定されない、ポリヌクレオチドを単離するのに利用可能ないくつかの市販製品を用いることができる。単離されたポリヌクレオチドは次に、サイトカインをコードするポリヌクレオチドを含む特定の核酸配列について試験またはアッセイすることができる。核酸試料中の標的核酸分子を回収する方法は当技術分野で周知であり、これにはマイクロアレイ解析が含まれ得る。

【0056】

当技術分野で公知のありとあらゆる方法で、核酸分子を解析することができる。例えば、特定の核酸分子のプロブまたは断片を用いるDNA-DNAもしくはDNA-RNAハイブリダイゼーションまたは増幅によって、核酸分子の存在を検出することができる。核酸増幅に基づくアッセイ法は、特定のDNAまたはRNAを含む形質転換体を検出するための核酸配列に基づくオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーの使用を含む。

【0057】

1つの態様において、核酸分子の解析は遺伝子のヌクレオチド配列を決定するための遺伝子解析を含む。試料から単離されたDNA断片と公知の配列のDNA断片との間の長さまたは配列の差は、1つまたは複数のヌクレオチドの挿入、欠失、または置換に起因するため、核酸配列を決定することにより、対象における疾患状態の生理に対して絶対的な影響を及ぼす変異に関する情報が提供される。これらの変異には転位または逆位もまた含まれてよく、直接的な配列決定以外の技法によって検出することは難しい。例えば、c-kit活性化変異であるL576Pの存在が悪性黒色腫を示すことが最近示された(表1を参照されたい)。したがって、本発明の方法を用いて、対象における皮膚病変の診断および/または特徴づけのために、表1~8および10~12に列挙した1つまたは複数の遺伝子の遺伝子変異を検出することができる。

【0058】

タンパク質発現産物に特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いた、核酸分子の発現を検出および測定するための様々なプロトコールが、当技術分野で公知である。例として、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、放射免疫測定法(RIA)、および蛍光活性化細胞選別(FACS)が含まれる。これらおよびその他のアッセイ法は、いくつかある箇所の中でとりわけ、Hampton, R. et al.(1990; Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, Minn.)、およびMaddox, D. E. et al.(1983; J. Exp. Med. 158:1211-1216)に記載されている。

【0059】

別の態様では、本発明の核酸分子の発現産物と特異的に結合する抗体を用いて、対象の皮膚病変を特徴づけることができる。抗体は修飾してまたは修飾せずに用いてよく、また共有結合もしくは非共有結合のいずれかによってレポーター分子と結合させることによって、標識してもよい。

【0060】

多種多様な標識および複合化技法が当業者には公知であり、様々な核酸およびアミノ酸

10

20

30

40

50

アッセイ法において用いることができる。表1~8、10~12、および15の核酸分子と関連する配列を検出するための、標識されたハイブリダイゼーションプローブまたはPCRプローブを作製するための手段には、オリゴ標識、ニックトランスレーション、末端標識、または標識ヌクレオチドを使用するPCR増幅が含まれる。あるいは、核酸分子またはその任意の断片をmRNAプローブ産生用ベクターにクローニングしてもよい。このようなベクターは当技術分野で公知であり、市販されており、T7、T3、またはSP6などの適切なRNAポリメラーゼおよび標識ヌクレオチドを添加することにより、そのようなベクターを用いてRNAプローブをインビトロで合成することができる。これらの手順は、様々な市販のキット(Pharmacia & Upjohn, (Kalamazoo, Mich.) ; Promega(Madison Wis.) ; およびU.S. Biochemical Corp., Cleveland, Ohio)を用いて行うことができる。検出を容易にするために用いる

10

【0061】

PCRシステムでは通常、2種類の増幅プライマー、および単位複製配列内のある部位に特異的に結合する付加的な単位複製配列特異的な蛍光発生ハイブリダイゼーションプローブを使用する。プローブは、1つまたは複数の蛍光標識部分を含み得る。例えば、プローブを2つの蛍光色素：1) レポーターとして役立つ、5'末端に位置する6-カルボキシ-フルオレセイン(FAM)、および2) 消光剤として役立つ、3'末端に位置する6-カルボキシ-テトラメチル-ローダミン(TAMRA)で標識することができる。増幅が起こると、伸長期に、Taq DNAポリメラーゼの5'-3'エキソヌクレアーゼ活性がプローブからレポーターを切断し、したがってレポーターは消光剤から遊離する。PCR過程の間、結果として生じたレポーター色素の蛍光放射の増加をモニターし、それが生成されたDNA断片の数を表す。標的核酸分子の直接的な位置特定および可視化のためにインサイチュ-PCRを利用してもよく、これは、発現と組織病理学的所見を相関させる上でさらに有用であり得る。

20

【0062】

本発明の核酸分子のための特異的ハイブリダイゼーションプローブを作製する手段には、mRNAプローブ産生用のベクターへの核酸配列のクローニングが含まれる。このようなベクターは当技術分野で公知であり、市販されており、適切なRNAポリメラーゼおよび適切な標識ヌクレオチドを添加することにより、そのようなベクターを用いてRNAプローブをインビトロで合成することができる。ハイブリダイゼーションプローブは、様々なレポーター基、例えば³²Pもしくは³⁵Sなどの放射性核種、またはアビジン/ビオチンカップリングシステムを介してプローブに結合しているアルカリホスファターゼなどの酵素標識等によって標識することができる。

30

【0063】

本発明の核酸分子の発現と関連した疾患の診断または特徴づけの基礎を提供するために、発現の正常なまたは標準的なプロファイルを確立する。公知の皮膚の特徴を有する対象から(例えば、黒色腫を有する、異形成母斑を有する、および/または日光黒子を有する対象から)得られた値を比較することにより、標準的なハイブリダイゼーションを定量することができる。そのような試料から得られた標準値を、黒色腫の疑いがある皮膚病変を有する対象由来の試料から得られた値と比較することができる。標準値と対象値との間の偏差を用いて、疾患の存在が証明される。

40

【0064】

したがって、本発明の1つの局面では、皮膚上の皮膚病変を特徴づけるための非侵襲的な試料採取方法を提供する。1つの態様では、色素性皮膚病変の試料セットを作製する。各試料は、病変を覆っている表層表皮のテープ剥ぎ取りまたは生検試料によって回収した核酸分子からなる。テープ剥ぎ取りに加えて、付随する組織学的検査および診断と共に、同じ病変の標準的な生検を行ってもよい。正常皮膚の表層表皮のテープ剥ぎ取りによって回収した核酸分子は、負の対照として役立つ。

【0065】

別の局面において、本発明は、対象における黒色腫と日光黒子および/または異形成母

50

斑および/または正常な色素沈着皮膚とを区別する方法を提供する。1つの態様において、本方法は、表1~8、10~12、15のいずれかに列挙した1つもしくは複数の遺伝子またはそれらの任意の組み合わせに由来する核酸分子を解析する段階を含む。黒色腫の疑いがある対象の皮膚の標的部位を、多数の遺伝子の発現についてアッセイする。発現の解析は、遺伝子の発現を検出するための任意の定性的または定量的方法を含み、それらの多くは当技術分野で公知である。本方法は、定量的方法を用いてマーカーの発現を測定することにより、または定性的方法を用いることにより、特異的マーカーの発現を解析する段階を含み得る。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを解析するための非限定的な方法を、以下に考察する。

【0066】

別の局面において、本発明は、対象における日光黒子と異形成母斑および/または基底細胞癌および/または正常な色素沈着皮膚とを区別する方法を提供する。1つの態様において、本方法は、表1~8、10~12、15のいずれかに列挙した1つもしくは複数の遺伝子またはそれらの任意の組み合わせに由来する核酸分子を解析する段階を含む。黒色腫の疑いがある対象の皮膚の標的部位を、多数の遺伝子の発現についてアッセイする。発現の解析は、遺伝子の発現を検出するための任意の定性的または定量的方法を含み、それらの多くは当技術分野で公知である。本方法は、定量的方法を用いてマーカーの発現を測定することにより、または定性的方法を用いることにより、特異的マーカーの発現を解析する段階を含み得る。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを解析するための非限定的な方法を、以下に考察する。

【0067】

本発明の遺伝子の発現を解析する方法は、1つまたは複数の遺伝子産物の発現を検出するために、マイクロアレイまたはその他の小型ハイスループット技術を利用することができる。このようなマイクロアレイを用いた発現レベルの定量的測定もまた当技術分野で公知であり、典型的には、本明細書に記載されているような発現を測定するための伝統的方法の改変型を含む。例えば、そのような定量は、リン光体画像化装置および画像化ソフトウェアを用いて、マイクロアレイのスポットに結合する放射性標識プローブのリン光体画像を測定することによって行うことができる。

【0068】

関連局面において、本発明は、新規診断マーカーを同定することにより、対象における様々な疾患状態を診断する方法、特に黒色腫の分類および診断を提供する。加えて、本発明は、日光黒子と異形成母斑および/または悪性黒子および/または正常皮膚とを区別する方法を提供する。したがって本発明は、新規診断マーカーを同定することにより、対象における様々な疾患状態を診断する方法、特に黒色腫の分類および診断を提供する。所与の状態に特有である遺伝子セットを同定することにより、遺伝子発現のこれらの差を診断目的に利用することができる。1つの態様において、核酸分子は、対象由来の試料から単離されたメッセンジャーRNA(mRNA)を含むRNAである。所与の疾患状態に関する上方制御される遺伝子と下方制御される遺伝子を、その後組み合わせてもよい。組み合わせることにより、当業者が、所与の疾患状態に特有である遺伝子のセットまたはパネルを同定することが可能になる。そのような遺伝子セットは、マイクロアレイ解析よりも簡便なアッセイ法(例えば「リアルタイム」定量的PCR)において日常的に用いることができるため、診断上非常に価値がある。そのような遺伝子セットはまた、発病への洞察および新規薬物を設計するための標的を提供する。

【0069】

正常(すなわち、非黒色腫)ならびに様々な皮膚癌疾患状態および/または色素性非癌状態などの公知の状態である対象の皮膚試料から、いくつかの参照投影プロファイルを含む参照データベースもまた作成される。次に投影プロファイルを、参照投影プロファイルを含む参照データベースと比較する。対象の投影プロファイルがデータベース中の特定の疾患状態のプロファイルと最もよく一致する場合、この対象はそのような疾患状態を有すると診断される。本発明の解析方法を実行するために、様々なコンピュータシステムおよび

10

20

30

40

50

ソフトウェアを利用することができ、これらは当業者に明らかである。例示的なソフトウェアプログラムには、Cluster & TreeView(Stanford、URL : rana.1b1.govまたはmicroarray.org)、GeneCluster(MIT/Whitehead Institute、URL : MPR/GeneCluster/GeneCluster.html)、Array Explorer(SpotFire Inc、URL : spotfire.com/products/scicomp.asp#SAE)、およびGeneSpring(Silicon Genetics Inc、URL : sigenetics.com/Products/GeneSpring/index.html)が含まれるが、これらに限定されない(コンピュータシステムおよびソフトウェアについては、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,203,987号もまた参照されたい)。

【0070】

別の局面において、本発明の方法は、皮膚病変を特徴づけるためのそのインサイチュー解析を含む。インサイチュー方法のために、解析前に核酸分子を対象から単離する必要はない。1つの態様では、発現したRNAを視覚的に検出するために、検出可能に標識されたプローブを対象の細胞または組織と接触させて、皮膚病変を特徴づける。

10

【0071】

別の局面において、本発明の方法はまた、疾患の進行および治療の有効性をモニターするのに有用であり得る。例えば、治療前の投影プロファイル进行治疗後のプロファイルと比較することによる。1つの態様において、本方法は、表1~8に由来する1つまたは複数の核酸分子の解析に基づいて、癌を黒色腫転移と特徴づける。別の態様において、本方法は、表10~12および15に由来する1つまたは複数の核酸分子の解析に基づいて、日光黒子の特徴づける。黒色腫は、多様な増殖速度、核型、細胞表面特性、抗原性、免疫原性、浸潤、転移、および細胞毒性薬または生物学的作用物質に対する感受性によって特徴づけられる複数の細胞集団を含むため、対象で黒色腫の診断が確立するまでに転移は既に起こっていることが多くの症例で知られている。したがって、本発明を用いて、臓器の癌を黒色腫から転移したものと特徴づけることができる。

20

【0072】

関連局面において、本発明の方法はまた、特定の癌または黒色腫を有する対象に対して適切な治療計画を決定するのに有用であり得る。別の関連局面において、本発明の方法はまた、日光黒子を有する対象に対して適切な治療計画を決定するのに有用であり得る。したがって、本発明の方法は、対象における癌または皮膚病変の特定の特徴に基づいて治療を対象に合わせる個別化医療を行うための手段を提供するのに有用である。本方法は、例えば、上記のように、皮膚病変が黒色腫であるかまたは日光黒子であるかを最初に判定することによって行うことができる。

30

【0073】

本発明の方法に従って調べる細胞の試料は、治療すべき対象から得てもよいし、または対象のものと同じ種類の確立された癌細胞株の細胞であってもよい。1つの局面において、確立された細胞株は、同じ種類の疾患の異なる細胞株ならびに/または関心対象の遺伝子の発現と関連する異なる疾患の異なる細胞株を含み得る、一連のそのような細胞株の1つであってもよい。そのような一連の細胞株は、例えば、治療すべき対象から少数の細胞しか得られず、そのため対象の細胞の代用試料を提供する場合に、本発明の方法を実施するのに有用であり得、また本発明の方法を実施する上で対照試料として含めるのにも有用であり得る。

40

【0074】

ひとたび疾患および/または皮膚病変の特徴づけが確立され、治療プロトコールを開始したならば、対象における関心対象の遺伝子の発現プロファイルをモニターするために、本発明の方法を定期的に繰り返してもよい。継続的なアッセイから得られた結果を用いて、数日間~数ヶ月間の期間にわたる治療の有効性を示すことができる。したがって、本発明の別の局面は、皮膚癌を有する対象を治療するための治療計画をモニターする方法に向けられる。治療前と治療中における発現プロファイルまたは核酸分子の核酸配列における変異を比較することにより、治療の有効性が示される。これによって、当業者は、必要に応じて治療的なアプローチを認識し、これを調整することができる。

50

【0075】

癌を治療するための治療計画の経時的な有効性は、治療の開始時点の対象における特定の癌の症状または臨床徴候が存在しないことによって同定され得る。特定の癌を有すると診断された対象において、本発明の方法の有効性は、対象における徴候もしくは症状の重症度の軽減を測定することによって、または障害についての代用エンドポイントの発生によって評価することができる。

【0076】

加えて、そのような方法は、個体が疾患を発症する素因を有すると同定するのに役立つ可能性があり、または実際の臨床症状が出現する前に疾患を検出する手段を提供し得る。この種のより決定的な診断により、医療従事者が予防手段または積極的な治療を早くから用いて、それによって癌の発生またはさらなる進行を防ぐことが可能となり得る。

10

【0077】

本発明の方法は、ハイスループット(またはウルトラハイスループット)型式で行う場合、細胞試料および/または関心対象の遺伝子を各々が互いに線引きされるように(例えば、ウェル中で)配置した固体支持体(例えば、マイクロタイタープレート、シリコンウエハ、またはスライドガラス)上で行うことができる。使用する特定の支持体に応じて、任意の数の試料または遺伝子(例えば、96個、1024個、10,000個、100,000個、またはそれ以上)を、このような方法を用いて並行して調べることができる。試料をアレイ状(すなわち、規定されたパターン)に配置する場合、アレイ状の各試料はその位置によって(例えば、x-y軸を用いて)規定され得、したがって各試料に「アドレス」が提供される。アドレス可能なアレイ型式を用いることの利点は、細胞試料、試薬、関心対象の遺伝子等を所望の時点で特定の位置に分注する(またはそこから除去する)ことができ、かつ試料(または分割量)を、例えば表1~8、10~12、および15に列挙した遺伝子のいずれか1つに由来する、発現産物および/または核酸分子の核酸配列における変異に関してモニターすることができるように、本方法を全体的にまたは部分的に自動化することができることである。

20

【0078】

したがって、マイクロアレイを用いて、多数の遺伝子の発現レベルを同時にモニターすること(転写産物像を作製すること)、ならびに遺伝子の変種、変異、および多型を同定することができる。マイクロアレイにおいて用いられるポリヌクレオチドは、少なくとも配列の断片が公知である関心対象の遺伝子もしくは遺伝子群に特異的であるか、または特定の細胞型、発達もしくは疾患の状態に共通の1種もしくは複数種の未同定cDNAに特異的なオリゴヌクレオチドであってよい。マイクロアレイ用に公知の配列に対するオリゴヌクレオチドを作製するためには、ヌクレオチド配列の5'末端またはより好ましくは3'末端から開始するコンピュータアルゴリズムを用いて、関心対象の遺伝子を調べる。このアルゴリズムにより、その遺伝子に独特であり、ハイブリダイゼーションに適した範囲内のGC含量を有し、かつハイブリダイゼーションを妨げる恐れのある推定上の二次構造を欠く、規定の長さのオリゴマーが同定される。ある種の状況では、マイクロアレイにおいて対のオリゴヌクレオチドを用いることが適している場合がある。「対」は、好ましくは配列の中央に位置する1つのヌクレオチドを除いて同一である。対(1つがミスマッチ)における第2オリゴヌクレオチドは、対照として役立つ。オリゴヌクレオチド対の数は、2~100万の範囲であってよい。オリゴマーは、光指向性化学工程を用いて、基板上の指定の部位において合成する。基板は、紙、ナイロンもしくは他の種類の膜、フィルター、チップ、スライドガラス、または任意の他の適切な固体支持体であってよい。

30

40

【0079】

本発明の別の局面に従って、例えば、対象における皮膚病変を特徴づけるための、本発明によって提供する方法を用いる、細胞または組織において癌を検出するのに有用なキットを提供する。1つの態様において、本発明のキットは、皮膚試料採取装置、ならびに表1~8、10~12、および15のいずれかにおける核酸分子の1つまたは複数に選択的に結合する1つまたは複数のプローブまたはプライマーを含む。別の態様において、キットは、皮膚試料採取装置に加えて、またはその代わりに、1つまたは複数のアプリケーションを含む。そ

50

のようなアプリケーションは、対象の皮膚における遺伝子発現をインサイチューで解析するのに有用である。例えば、アプリケーションを用いて、発現したRNAを視覚的に検出するために検出可能に標識されたプローブを適用して、皮膚病変を特徴づけることができる。

【0080】

別の態様において、本発明のキットは、表1~8、10~12、および15のいずれかにおける核酸分子の一部に結合するプローブを含む。別の態様において、キットは、表1~8、10~12、および15に列挙した遺伝子のいずれか1つの、遺伝子または核酸分子またはタンパク質産物の少なくとも断片を含むマイクロアレイをさらに含む。いくつかの態様では、本発明のキット中に多くの試薬が提供されてもよく、そのうちの一部のみが特定の反応または手順において共に用いられるはずである。例えば、複数のプライマーが提供され得るが、そのうちの2つのみが特定の適用に必要である。

10

【0081】

別の態様において、本発明のキットは、プライマー対を含む第1容器を含む区分化された運搬体を提供する。プライマーは典型的に、一方の鎖上の遺伝子の上流と選択的に結合するフォワードプライマー、および相補鎖上の遺伝子の上流と選択的に結合するリバースプライマーである。任意に、本発明のキットは、例えば試料採取装置を用いた試料採取の方法を開示する説明添付文書、および/または対象から採取した試料の発現プロファイルと比較するための例示的な遺伝子発現プロファイルをさらに含み得る。

【0082】

以下の実施例は本発明の利点および特徴をさらに説明するために提供するが、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。これらは使用可能なものの典型例であるが、当業者に公知の他の手順、方法論、または技法を代わりに用いてもよい。

20

【実施例】

【0083】

実施例1

RNAの定量およびプロファイリング

本研究の核となる仮説は、角質層、透明層、および顆粒層を含むがこれらに限定されない、表皮内または浸潤性黒色腫を覆っている表皮細胞を、粘着手段によって回収することができる、ならびにこの試料中に含まれるRNAの形態での遺伝子発現の質および量が近傍の表皮試料とは異なって発現する、すなわち黒色腫が基礎にあるため、試料採取されたRNAは診断となるというものである。表皮の外科標本から得られた皮膚ヒト黒色腫試料を覆っている表皮過形成において、特定の遺伝子の遺伝子発現の変化が検出可能であることが以前に示されている(McCarty et al., 2003)。

30

【0084】

本研究は、試料の採取および特徴づけの相(第1相)ならびにRNAプロファイリング相(第2相)という2つの別々の相に分けられる。第1相において、研究責任者または研究責任者に委任された訓練を受けた個人によって、テープ剥ぎ取り標本および生検試料の採取が行われ、様々な部位の生検試料が得られた。生検材料はすべて、標準的な組織病理学的解析に供した。RNAプロファイリング相(第2相)には、RNAの精製および遺伝子発現プロファイリングのためのDNAマイクロアレイへのハイブリダイゼーションが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0085】

材料および試薬

粘着テープはバルクロールでAdhesives Research(Glen Rock, PA)から購入した。これらのロールは、Diagnostic Laminations Engineering(Oceanside, CA)により、直径17ミリメートルの小さな円板に特注で加工された。ヒト脾臓全RNAはAmbion(catalogue # 7970; Austin, TX)から購入した。RNeasy RNA抽出キットはQiagen(Valencia, CA)から購入した。逆転写酵素、PCRプライマーおよびプローブ、ならびに特定のcDNAの増幅および蛍光検出に必要なすべての緩衝液および酵素を含むTaqMan Universal Master Mixは、Applied Biosystems(Foster City, CA)から購入した。MELT全核酸単離システムはAmbion(Austin,

50

TX)から購入した。

【0086】

RNAの単離

圧力サイクリング技術(PCT; Garrett, Tao et al. 2002; Schumacher, Manak et al. 2002)またはMELT全核酸システムのいずれかを用いて、テープからRNAを抽出した。緩衝液RLT(Qiagen RNeasyキット中に供給される) 1.2 mlと共にPULSE(商標)チューブ(Pressure Biosciences, Gaithersburg, MD)に挿入することにより、テープを対で抽出した。PULSE(商標)チューブをPCT-NEP2017圧力サイクラーに挿入し、以下のパラメータを用いて試料を抽出した; 室温: 各サイクルの最初および最後の20秒間にわたり圧力を35 Kpsiに保持する5回の圧力サイクル。圧力抽出後、緩衝液を除去し、その部位を剥ぎ取るために用いた残りのテープを処理するために用いた; 緩衝液は次いで、大きなRNA分子(すなわちmRNA)が結合する精製カラムに供することにより、大きなRNA(>200ヌクレオチド)を回収するための標準的なQiagen RNeasyプロトコールに従って処理したが、マイクロRNAを精製するためにカラムのフロースルーも保存する。mRNAから分離されたmiRNAを含むカラムのフロースルーは、Qiagen miRNA精製手順(qiagen.com/literature/protocols/pdf/RN20.pdfでのワールドワイドウェブにおける)に従って処理して、マイクロRNAを精製する。各対象において剥ぎ取られた2部位からのRNAをプールして、各対象由来の単一試料を作製した。

10

【0087】

MELT全核酸プロトコールを用いたRNA単離

MELT緩衝液192 ml + MELTカクテル8 mlを含む2 mlエッペンドルフチューブ中でテープを抽出し、室温で10分間ボルテックスした。MELT溶解液を $>10,000 \times g$ で3分間遠心沈殿させた後、分注済みの結合ビーズマスターミックスに移し、300 mlの洗浄溶液1および2で洗浄した。溶出溶液100 ml中にRNAを溶出した。

20

【0088】

mRNAの定量

実験データは、特定のcDNAについて閾値蛍光を達成するのに必要なPCRサイクル数として報告され、「 C_t 」値として記載される(Gibson, Heid et al. 1996; Heid, Stevens et al. 1996; AppliedBiosystems 2001)。全RNA量の定量は、以前に記載されている通りに行った(Wong, Tran et al. 2004)。簡潔に説明すると、商業的に購入したヒト脾臓全RNAから作成された標準曲線(C_t 、アクチュオン対 $\log[RNA]$; AppliedBiosystems 2001)を参照して、定量的RT-PCRを用いることにより、テープから回収されたRNA量を決定する。標準曲線を参照して、6回の反復した C_t 、アクチュオン値の平均値を用いて試料中のRNAの濃度を算出した。

30

【0089】

RNAの増幅およびアレイハイブリダイゼーション

Multi-Enzymatic Liquefaction of Tissue法(Ambion, Austin, TX)によって単離したRNAを、WT-Ovationピコ増幅システム(NuGen, San Carlos, CA)を用いて増幅した。増幅されたRNAをAffymetrix U133 plus 2.0マイクロアレイにハイブリダイズさせ、BioconductorによるRを用いてデータを処理し解析した。

40

【0090】

サンプルサイズ

サンプルサイズ計算を実施例2に示す。この解析から、良性母斑と黒色腫とを識別するための高い予測値($p < 0.001$)を有する25~40個の遺伝子を見出すためには、およそ30例の黒色腫および30例の非黒色腫病変が必要であると予測される。

【0091】

GeneChipデータの前処理

Affymetrixシリーズ3000スキャナーでAffymetrix GeneChipをスキャンして得られた画像ファイルは、GCOSソフトウェア(Affymetrix)を用いて「CEL」形式ファイルに変換する。Bioconductor suite(bioconductor.orgでのワールドワイドウェブにおける)によるソフトウェアを用いて、CELファイルの正規化を行う。特に、「gcrma」パッケージ中の関数「

50

just.gcrma」により実行して光学的ノイズおよびオリゴヌクレオチドプローブの結合親和性(Wu et al., 2006; およびWu et al., 2004)を調整するロバストマルチアレイ解析を用いて、GeneChipデータを正規化する。

【0092】

マイクロアレイデータ解析の統計的アプローチ

本提案では、2つの一般的な統計的課題に取り組む：(i) 異なるクラスの病変(すなわち、黒色腫病変 対 非黒色腫病変)において差次的に発現する遺伝子を同定すること、および(ii) 遺伝子発現データに基づいて黒色腫病変と非黒色腫病変を群に分類するための規則を形成すること(および評価すること)。

【0093】

最も重要な分類では、生検結果に基づいて黒色腫と非黒色腫を分類する。上記で特定した課題に取り組むために用いる方法は、マイクロアレイデータの統計的評価における現在の基準である(総説については、Smyth et al., 2003; およびLee, 2004を参照されたい)。これらの方法は、前立腺癌における遺伝子発現を研究するため(Stuart et al., 2004)、HIV感染の後に起こる遺伝子発現の変化を特徴づけるため(Mitchell et al., 2003)、およびハイスループット遺伝子型同定プラットフォームを開発するために(Wolyn et al., 2004; およびBorevitz et al., 2003)、他の研究者によってAffymetrixアレイによるデータに適用されている。差次的に発現する遺伝子を同定するには、偽発見率の順列ベースの推定(Efron et al., 2002に概説されている)が好ましい。本発明者らの以前の研究では、これらの方法を実行するために、R定量的プログラミング環境のスクリプトを開発したが、これは本プロジェクトではBioconductor suiteによる「siggenes」パッケージを用いるかまたは適合させる可能性が高い。分類規則の開発は、単純ベイズ分類器および最短収縮重心分類器(Tibshirani et al., 2002)に適用される再サンプリング法(k-分割交差検定、632+ ブートストラップ、および/またはバギング(Hastie et al., 2001))ならびにサポートベクターマシン(SVM)に依存し、これらはいずれも、本発明者らの以前の研究で使用して、前立腺組織を悪性または良性として分類する上で良好に機能した。用いられる可能性の高い実行では、k-分割交差検定を行う。k回の訓練/試験サイクルのそれぞれにおいて、差次的発現遺伝子の訓練データの最初のスクリーニングを行い、それらの差次的発現の事後確率に従って遺伝子を順序づける。1~1024の間のrの十分な値を選択して、差次的発現の事後確率が最も高いr個の遺伝子に基づいた単純ベイズ分類器および最短収縮重心分類器が形成されて、分類誤差率の正確な補間が可能になる。試験セットについて「1 se則」(Brieman et al., 1984)を誤差率に適用して、誤差率を最小にする分類器を選択する。SVMに関しては、内部632+ ブートストラップを各訓練サンプルに適用して、分類器を形成する際に用いるべき遺伝子の数を選択する。k個の試験セットによる「1 se則」誤差率を用いて、分類精度を特徴づける。

【0094】

単変量および多変量統計解析ツールの使用に加えて、精緻なバイオインフォマティック解析アプローチは、例えば黒色腫試料と非黒色腫試料との間で差次的に発現することが見出された遺伝子間の考えられ得る生物学的関連を理解するのに役立つ。これらのアプローチは、遺伝子ネットワークおよび経路の解析に焦点をおき(Edelman et al., 2006; Kong et al., 2006; およびPang et al., 2006)、Ingenuity(ingenuity.comでのワールドワイドウェブにおける)およびMetaCore(genego.comでのワールドワイドウェブにおける)などのソフトウェアパッケージにおいて実行されている。遺伝子発現マイクロアレイ解析から浮かび上がる遺伝子間の生物学的関連を同定することは、それらの発現パターンの生物学的有意義性を理解するのに役立つとともに、それらの生物学に基づいて、診断パネル上に表示されるべき差次的発現遺伝子のセットを減少させるのにも役立つ。この解析の最終結果は、将来、より大きな臨床試験で検証される候補発現分類器を規定することである。

【0095】

RNA、増幅cDNA、およびマイクロアレイデータのQC測定基準

10

20

30

40

50

インフォームドコンセントの後、疑わしい色素性病変をEGIRを用いてテープで剥ぎ取り、次いで標準的ケアの通り生検した。EGIRテープから単離して得られたRNAを増幅し、Affymetrix U133 plus 2.0 GeneChipにおいてプロファイリングした。GCRMAアルゴリズムにより、マイクロアレイデータを正規化した。高品質のマイクロアレイデータが作成されることを保証するため、RNA、増幅cDNA、およびマイクロアレイデータについてQC測定基準を確立した。Experionシステム(Biorad, Hercules, CA)を用いたキャピラリー電気泳動によりRNAの質を評価し、少なくとも1つの可視的18S rRNAを含むRNAをRNA増幅用にさらに処理した。増幅したcDNAはNanodropシステムにより定量し、増幅cDNAの質もまたExperionシステムによって評価した。収量5 mgを超える増幅cDNAおよび平均サイズ分布750 ntを超えるcDNAを、マイクロアレイハイブリダイゼーションに進めた。R中のsimpleaffyプログラムを用いてアレイデータの質をさらに評価し、5.0未満の拡大縮小係数および30%を超える%存在コールを有するアレイデータをさらなるデータ解析に使用した。

10

【0096】

クラスモデリング PAM

アレイデータQCに合格した後、黒色腫14例、異形成母斑40例、および正常皮膚標本12例をさらに解析した。最初に、全試料にわたる50未満の遺伝子発現値をフィルター処理して除去し、16716個のプローブセットを試験した。これら16716個のプローブセットを、ANOVA($p < 0.05$)、多重検定補正アルゴリズム(WestfallおよびYoung順列)、および偽発見率(FDR) 0.05を用いた、黒色腫、異形成母斑、および正常皮膚の間の差次的発現の統計解析に供した。上記の通り、元の117遺伝子のうち、89遺伝子パネル(表2)が潜在的な黒色腫分類器であることが判明した。さらなる試験により、5遺伝子分類器(表3)、新たに同定された遺伝子を含む30遺伝子分類器(表4)、新たに同定された遺伝子を含む20遺伝子分類器(表5)、および新たに同定された遺伝子を含む19遺伝子分類器が同定されたが、これらはすべて黒色腫と異型母斑とを識別するために用いることができる。スタンフォード大学(Stanford, CA)から自由に利用できるマイクロアレイ予測解析(Prediction Analysis of Microarrays: PAM)ソフトウェアを用いて、遺伝子およびそれぞれの分類器パネルを解析した。

20

【0097】

PAMソフトウェアは、訓練セットにおいて各クラスの標準化重心を計算する最短重心法の変法を使用する。これは、その遺伝子のクラス内標準偏差で除した、各クラス内の各遺伝子の平均遺伝子発現である。最短重心分類は、新規サンプルの遺伝子発現プロファイルを取得し、それをこれらのクラス重心それぞれと比較する。平方距離で重心が最も近接したクラスが、その新規サンプルの予測されるクラスである。

30

【0098】

これらの遺伝子をすべて階層的クラスタリング解析に供したが、黒色腫標本は共に分類され、異形成母斑および正常皮膚と明らかに区別された。加えて、3つの異なるクラスの異形成母斑が存在する；1つ目は正常皮膚と共に分類され、2つ目は正常皮膚と黒色腫の間に位置し、3つ目は黒色腫と共に分類された。これらのデータから、EGIRによるテープ剥ぎ取りによって回収された角質層RNAを用いて、疑わしい色素性病変における黒色腫と異形成母斑とを区別することができることが示唆される。

40

【0099】

黒色腫と異形成母斑とを識別するための潜在的な黒色腫分類器としての遺伝子の解析を、t検定($p < 0.01$)、FDR(0.05)、および黒色腫と異形成母斑との間の2倍差を用いて行った。元の117遺伝子のうち、89遺伝子パネル(表2)が潜在的な黒色腫分類器であることが判明し、これら89遺伝子の機能をIngenuity Pathway Analysis(IPA)(Ingenuity, Redwood City, CA)に供した。これらのうち15遺伝子は毛髪および皮膚の発生および機能に関与し、18遺伝子は細胞発達に関与し、16遺伝子は細胞の成長および増殖に関与し、また24遺伝子は癌に関連している。このように、差次的発現遺伝子は、メラニン生合成、メラノサイトの増殖、分化、および発達を含む、メラノサイトにおける生物学的機能に関連している遺伝子である。(図5および6を参照されたい)。

【0100】

50

クラスモデリング ランダムフォレスト(Random Forests)

黒色腫31例、異型母斑71例、および正常皮膚対照15例をGeneChipアッセイによって解析したさらなる研究では、284個の差次的発現遺伝子が同定された($p < 0.001$ 、偽発見率 $q < 0.05$)。これらの遺伝子の階層的クラスター解析から、黒色腫が異型母斑および正常皮膚と区別され得ることが示され、異型母斑の異なるクラスの存在が示唆された(図7)。遺伝子のいくつかは、インジェヌイティパスウェイ(Ingenuity Pathways)解析によって、メラノサイトの発達および機能、ならびに皮膚発生、細胞増殖、および癌において役割を果たすことが見出された。これらの知見から、黒色腫の存在によって直接または間接的に角質層の遺伝子発現プロファイルが変化することがさらに実証された。229遺伝子をランダムフォレスト解析に供したところ、それら229遺伝子のうち61遺伝子が、黒色腫と異型母斑とを識別することが認められた(図8を参照されたい)。

10

【0101】

ランダムフォレスト解析は、複数の型の予測因子を作成し、これらを用いて集合予測因子を得る方法であるバギング予測因子(Bagging Predictors)に基づいている。その集合体は、数値結果を予測する場合には型にわたって平均化し、クラスを予測する場合には多数決投票をする。複数の型は、学習セットのブートストラップ反復を作成し、これらを新たな学習セットとして用いることにより形成される。分類木および回帰木ならびに線形回帰におけるサブセット選択を用いた実際のおよび模擬のデータセットの試験から、バギングが精度の点で実質的な利益を付与し得ることが示される。学習セットの無秩序によって、構築される予測因子に顕著な変化が生じ得る場合、バギングで精度を向上させることができる。

20

【0102】

クラスモデリング TREENET(登録商標)

82個のさらなる遺伝子が同定された(表7)。TREENET(登録商標)ソフトウェア(Salford Systems, San Diego, CA)を用いて20遺伝子パネル(表8)が同定されたが、これらはすべて黒色腫と異型母斑とを識別するために用いることができる(図9を参照されたい)。黒色腫と母斑との間の7199個の差次的発現遺伝子から、さらなる19遺伝子分類器が同定された(表6; 図11および12もまた参照されたい)。19遺伝子分類器を独立したサンプルに対して試験したところ、黒色腫の検出に関して感度100%および特異度88%であることが示された。加えて、黒色腫10例および母斑10例による結果から、qRT-PCRが、GeneChipマイクロアレイを用いて得られたデータを再現することが示された(図12、ならびに表13および14の生データを参照されたい)。

30

【0103】

TREENET(登録商標)は、増強決定木に基づくデータマイニングツールである。TREENET(登録商標)は、初期データ探索ツールとしても役立つ、モデル構築および関数近似システムである。これはデータ中の関連性を抽出し、結果がどれほど予測可能であるかを較正することができ、また分類および回帰の問題のどちらも対処することができる。

【0104】

実施例2

予備的な検出力(power)およびサンプルサイズの研究

40

母斑 対 原発性黒色腫

以下のサンプルサイズおよび検出力の計算は、もっぱらHaqq et al (2005)において提供されている大規模cDNA研究データに基づいている。そのデータは、正常皮膚($n=3$ サンプル)、母斑($n=9$)、原発性黒色腫($n=6$)、および転移性黒色腫($n=19$)に焦点をおいていた。サンプルサイズ計算の目的で、焦点を母斑と原発性黒色腫との比較においた。Pageらによって概説されているブートストラップ戦略に基づいて、検出力およびサンプルサイズの評価を計算した。Haqq et al (2005)の研究から利用できる生データを用いて、母斑と原発性黒色腫との間の筆者らのcDNAアッセイで用いられた全14,772個のプロープに基づいた遺伝子発現差を、各プロープ/遺伝子について単純t検定を用いて計算した。複数のプロープを用いて個々の遺伝子を調べることができるとに留意されたい。加えて、正常皮膚

50

、母斑、および原発性黒色腫の遺伝子発現差もまた、3群分散分析(ANOVA)で評価し、母斑と原発性黒色腫との間の特異的な対比がこのANOVAから計算された。この後の図面では、3つの主要なパラメータを用いて、検出力およびサンプルサイズを評価する。表9(出典Pageら)は、真に差次的に発現するまたは真に差次的に発現しない遺伝子の数を示し、以下のように定義されるこれらのパラメータを説明する簡単な方法を提供する(図1Aおよび2Aでは、括弧内に提供される各パラメータに対応する曲線を色で示すが、図1Bおよび2Bは、以下に定義するEDRにのみ焦点をおいている)。

【0105】

EDR: 予測発見率(表9より、 $D/(B+D)$)。これは、既定の閾値(本明細書ではほとんどの場合 $p<0.05$ とする)で有意に差次的に発現すると示され、実際に母斑と原発性黒色腫との間で差次的に発現するプローブ/遺伝子の予測比を反映する。

10

【0106】

PTP: 真の陽性であるプローブ/遺伝子の予測比(表9、 $D/(C+D)$)。この比は、その発現値が閾値(例えば、0.05)未満の試験統計量をもたらす遺伝子の総数のうち、真に差次的に発現する可能性の高い発現差を示すプローブ/遺伝子の数を反映する。

【0107】

PTN: 真の陰性結果の確率(表9、 $A/(A+B)$)。この確率は、想定閾値(例えば、0.05)で有意に差がなく、実際に皮膚と黒色腫との間で差次的に発現しないプローブ/遺伝子に関連する。

【0108】

(表9) マイクロアレイ研究の検出力を評価するための関連性のパラメータ

20

アレイ解析に基づいた結果	差次的に発現しない	真に差次的に発現する
有意でない遺伝子	A	B
有意な遺伝子	C	D

これらの欄は、所与の制約を満たすことが認められた遺伝子の数を表す；A=アレイ実験において差次的に発現しないことが判明し、かつ真に差次的に発現しない遺伝子；B=差次的に発現するが、アレイ実験において差次的に発現しないことが判明した遺伝子(偽陰性)；C=アレイ実験において差次的に発現することが判明したが、真に差次的に発現しない遺伝子(偽陽性)；D=アレイ実験において差次的に発現することが判明し、かつ真に差次的に発現する遺伝子。

30

【0109】

母斑 対 原発性データ

サンプルサイズ解析では、Haqq et al. (2005)によって得られたプローブ/遺伝子発現差に基づいて、母斑と原発性黒色腫とを区別し得るプローブもしくは遺伝子またはプローブ/遺伝子のセットを「発見する」または同定するのに必要なサンプル数を考えた。図1aは、母斑と原発性黒色腫との間のプローブ/遺伝子発現差の有意性を示す閾値を $p<0.05$ と想定して、サンプルサイズの関数としてのEDR、PTP、およびPTNのプロットを提供する。このようにしてプロットから、チップで調べ、試験統計量 p 値 <0.05 を生じるプローブ/遺伝子発現差を示し、真のプローブ/遺伝子発現差を実際に示す全遺伝子の80%を「発見する」または同定するためには、母斑および原発性黒色腫群当たりおおよそ20のサンプルサイズが必要であると考えられる。全部で14,772個のプローブを考えた場合、単に偶然によって p 値 <0.05 を示す $14,772 \times 0.05 = 738$ 個が得られる可能性が高く、そのうち $1,727 \times 0.80 = 1,381$ 個がその有意(すなわち、 p 値)水準で真の遺伝子発現差を示す可能性が高い。真に差次的に発現すると検出される確率がより高い、より小さな遺伝子セットの同定に関心がある場合には、統計的有意性のさらに厳密な閾値(例えば、0.001)を用いることができる。これによって、偶然に p 値 <0.001 を有する $14,772 \times 0.001 = 15$ 個の遺伝子が得られ、そのうちおおよそ45%(すなわち、 $34 \times 0.45 = 15$)個がその水準で真に差次的に発現する可能性が高い；図1bを参照されたい；図1bの曲線は、想定した第一種過誤率が異なるEDRにのみ対

40

50

応することに留意されたい)。

【0110】

正常皮膚、母斑、および原発性黒色腫を比較する分散分析(ANOVA)の状況における、母斑対原発性黒色腫の対比結果を考慮したサンプルサイズ解析もまた追求した。この論理的根拠は、母斑と原発性黒色腫との間に存在するよりも正常皮膚と母斑または原発性黒色腫のいずれかとの間により大きな差がある(Haqq et al (2005)データの解析に基づく)、および正常皮膚遺伝子発現変動を考慮する解析が、母斑対原発性黒色腫遺伝子発現差の評価におけるノイズを低減するのに役立ち得るというものである。図2aおよび2bはこれらの解析の結果を示し、図1aおよび1bにおいて示されたものと類似のサンプルサイズ指針を提供する。

10

【0111】

先に述べたように、ある特定の確率水準では、純粋に偶然によって母斑と原発性黒色腫との間で差を示す多くのプローブ/遺伝子が存在し得るため(多数のプローブ/遺伝子を調べたことを考えて)、事後の真の確率(PTP)にもつばら焦点をおいた解析もまた検討した。したがって、真に差次的に発現するこれらのプローブ/遺伝子の起こり得る割合が、評価に重要である。図3aおよび3bは、異なる想定有意水準に関する結果を示す。

【0112】

このようにして、母斑対原発性黒色腫群当たりおよそ20サンプルを用いる研究は、実際にp値水準0.05で差次的に発現するために、この水準で差次的発現を示す可能性の高い全遺伝子の80%を検出する十分な検出力を有するという立論が立てられ得る。しかしながら、10,000~30,000個のプローブを用いるかまたは5,000~10,000個の遺伝子を検討する場合、差次的発現遺伝子のこのセットに寄与する遺伝子(またはプローブ)の数は何百という数である可能性が高い。差次的に発現する確率がより高い、より少数のプローブまたは遺伝子(およそ25~40個)の同定に関心がある場合には、例えば、p値0.001で、母斑サンプルおよそ30例および原発性黒色腫サンプルおよそ30例が必要となる(図1、2、および3を参照されたい)。

20

【0113】

実施例3

正常皮膚から核酸を回収するためのテープ剥ぎ取り

以下の手順を用いて、対象の正常皮膚(例えば、乳様突起または上背部部位)から核酸を回収した。

30

【0114】

テープは常に手袋をはめた手で扱った。プロトコールによる特段の規定のない限り、比較的傷がなくかつ健常な特定の部位を定める。好ましい正常皮膚部位は、乳様突起(頭蓋底の耳後方の骨突起)および肩甲棘のすぐ上方の上背部である。非産毛を除去する必要がある場合には、その部位を剪毛する。アルコールで拭き取り(70%イソプロピルアルコール)、その部位を清潔にする。テープの適用前に、その部位を完全に風乾させる。テープの適用前にその部位が完全に乾燥することを確実にするため、およそ2分待つことを推奨する。

【0115】

皮膚部位にテープを貼り付ける。複数のテープを用いる場合には、左側から開始して順番にテープを貼り付ける。次のテープを整列させるために、外科用皮膚マーカーおよび/または水溶性マーカーを用いて、皮膚にテープの位置の印を付ける。

40

【0116】

圧力をかける(テープをしっかりと押す)ことにより、テープ回収手順を開始する。圧力をかけている間にテープが動かないことを確実にするため、皮膚をピンと張った状態で保持するようにする。次いで、テープを一方向にゆっくりとはがす。試料を保護するためにテープの接着面を伏せて、テープの端を小包の上部の条片上に置く。2枚目のテープを同じ部位に貼る;上記の通り、圧力をしっかりとかける。直前の適用で用いた方向と逆方向に、テープをゆっくりとはがす。

50

【0117】

さらなるテープを同じ部位に貼り、上記に提供した段階に従うことにより、テープ剥ぎ取りを継続する。プロトコルにおいて特段の規定のない限り、全部で少なくとも4枚のテープでその部位を剥ぎ取ってよい。条片を保存用バッグに入れ、直ちに試料をドライアイス上に置くか、または-20℃もしくはそれ未満の貯蔵庫に入れて、解析時まで置いておく。

【0118】

実施例4

色素性病変から核酸を回収するためのテープ剥ぎ取り

以下の手順を用いて、対象の色素性病変および/または黒色腫の疑いがある皮膚から核酸を回収した。正常皮膚とは対照的に、病変皮膚は、直径が約6 mmよりも大きいかまたはそれに等しいが、テープ円板の直径よりも小さい術前生検材料を有するはずである。複数の病変は、少なくとも約4 mm離れていなくてはならない。病変に接触するテープの領域は、不溶性インクペンでテープ上に多めに境界を画定すべきである。そうすることで、研究室においてRNA抽出手順の一部として、この領域を周囲のテープから切り取ることができる。

10

【0119】

上記の通り、テープは常に手袋をはめた手で扱った。非産毛を除去する必要がある場合には、その部位を剪毛する。アルコールで拭き取り(70%イソプロピルアルコール)、その部位を清潔にする。テープの適用前に、その部位を完全に風乾させる。テープの適用前にその部位が完全に乾燥することを確実にするため、およそ2分待つことを推奨する。

20

【0120】

皮膚部位にテープを貼り付ける。複数のテープを用いる場合には、左側から開始して順番にテープを貼り付ける。次のテープを整列させるために、外科用皮膚マーカーおよび/または水溶性マーカーを用いて、皮膚にテープの位置の印を付ける。約6 mmよりも大きいかまたはそれに等しい直径を有するはずの疑わしい病変に、テープを貼り付ける。

【0121】

周囲の正常皮膚を避けて病変に直接圧力をかける(テープをしっかりと押す)ことにより、テープ回収手順を開始する。圧力をかけている間にテープが動かないことを確実にするため、皮膚をピンと張った状態で保持するようにする。印付けした境界内に病変の領域が包含され、かつ該境界が病変の縁からおよそ1 mm離れるように、マーキングペンを用いて病変周囲の区域の境界を画定する。

30

【0122】

テープを一方向にゆっくりとはがす。試料を保護するために細胞を伏せて、テープの端を粘着条片上に置く。上記に提供した指示に従って、2枚目のテープを同じ部位に貼る。プロトコルにおいて特段の規定のない限り、病変が全部で少なくとも4回剥ぎ取られるまでこれを繰り返す。条片を保存用バッグに入れ、直ちに試料をドライアイス上に置くか、または-20℃もしくはそれ未満の貯蔵庫に入れて、解析時まで置いておく。

【0123】

実施例5

黒色腫と異型母斑とを区別するための遺伝子発現プロファイル

本研究の目的は、EGIRによるテープ剥ぎ取りによって回収された角質層RNAを用いて、疑わしい色素性病変における黒色腫と異型母斑とを区別することができるかどうかを判定することである。図4Aを参照されたい。

40

【0124】

疑わしい色素性病変をEGIRを用いてテープで4回剥ぎ取り、次いで標準的ケアの通り生検した。正常な非病変皮膚をテープで剥ぎ取って、陰性対照とした。生検材料はすべて、組織病理診断の一次判定および中央判定に供した。MELT(Ambion, Inc.)を用いてテープから全RNAを単離し、Experion(Bio-Rad, Inc.)解析によって質について評価した。-アクトン遺伝子発現に関する標本の定量的RT-PCRにより測定して、RNAの収量はおよそ1 ngで

50

あった。次いで、WT-OvationピコRNA増幅システム(NuGen, Inc.)を用いて全RNA(200~500 pg)を増幅し、U133 plus 2.0 GeneChip(Affymetrix, Inc.)を用いて遺伝子発現プロファイルについてアッセイした。

【0125】

EGIRテープから単離して得られたRNAを次に増幅し、Affymetrix U133 plus 2.0 GeneChipでプロファイリングする。GCRMAアルゴリズムを用いてマイクロアレイデータを正規化する。偽発見率0.05ならびにWestfallおよびYoung順列を用いる多重補正検定を用いたANOVA解析($p < 0.05$)によるさらなる解析によって、およそ117遺伝子が黒色腫、異形成母斑、および正常皮膚の間で差次的に発現すると同定された(表1)。これらの遺伝子の階層的クラスタリングから、黒色腫標本が共に分類され、異形成母斑および正常皮膚と明らかに区別されることが示された(図4B)。加えて、表1に示す117遺伝子のうち89遺伝子(表2)が、黒色腫と異形成母斑との間の潜在的識別器であるとさらに同定された($p < 0.01$ 、偽発見率 $q < 0.05$)。これらの89遺伝子をインジェヌイティパスウェイ解析に供したところ、多くが、黒色腫、毛髪および皮膚の発生および機能、細胞発達、細胞の成長および増殖、ならびに癌において役割を果たすことが判明した。これらの知見から、疑わしい色素性皮膚病変からEGIRで回収したRNAを用いて、黒色腫と異形成母斑とを区別することができることが実証される(図4C)。さらに、これらの結果から、黒色腫の存在によって直接または間接的に角質層の遺伝子発現プロファイルが変化することが示唆される(図4D)。

10

【0126】

正常皮膚と炎症皮膚を比較するその後の研究では、同一皮膚部位での4枚の小さなテープの連続適用によって、遺伝子発現を調べるための定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)アッセイおよびDNAマイクロアレイ解析を行うのに十分な無傷のRNAを回収した。後者のアッセイは、全RNA試料10 ngの2ラウンドの増幅によりアンチセンスRNA 30~80 μ gを得た後に、Affymetrix HG-U133A GeneChipを用いて行った。それぞれ3ヶ所の別個の部位で試料採取した対象2名による結果の比較から、遺伝子測定値において12%の対象内および対象間変動が示されたが、これは十分にGeneChipアッセイのAffymetrix特異的変動係数(CV)の範囲内の結果である。異なる性別の対象2名を正確に区別した結果である、Y染色体遺伝子の差次的発現が認められたことは注目すべきである。次に、正常、水密封、およびラウリル硫酸ナトリウム刺激試験群による対象3名のそれぞれのテープ剥ぎ取りから単離したRNAにおいて、GeneChipアッセイを行った。その発現が未処理皮膚とSLS処理皮膚との間で最も顕著に変化する遺伝子100個の大部分が明らかとなり、これらは組織の炎症および障害の機能に關与することが既知であった。このように、EGIR技術によって回収されたRNAは、マイクロアレイベースの遺伝子発現プロファイリングにこの上なく適しており、皮膚の病的状態を適切に反映する。

20

30

【0127】

Benson et al (2006)による最近の研究から、乾癬病変からRNAを回収することができること、およびテープ剥ぎ取りで回収したRNAの一般的なRNA発現プロファイルが、同じ患者の病変に由来する生検RNAと一致することが実証される。さらなる研究(参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第7,183,057号を参照されたい)から、Enbrelによる治療中に乾癬病変をテープで試料採取できること、ならびに治療の1週目の遺伝子発現と4週目および8週目における臨床反応が強力に關係づけられ得ることが示された。この研究から、テープ剥ぎ取りには、皮膚表面から生理的に關連したRNAを回収する資質があることがさらに確証される。

40

【0128】

実施例6

日光黒子と黒色腫、異型母斑、および/または正常皮膚とを区別するための遺伝子発現プロファイル

本研究の目的は、角質層RNAを用いて、疑わしい色素性病変における日光黒子と黒色腫、異型母斑、および/または正常皮膚とを区別することができるかどうかを判定することである。

50

【0129】

疑わしい色素性病変を上記の通りにテープ剥ぎ取り、次いで標準的ケアの通り生検した。正常な非病変皮膚をテープで剥ぎ取って、陰性対照とした。生検材料はすべて、組織病理診断の一次判定および中央判定に供した。上記に提供された通りに全RNAを単離し、次いで上記に提供された通りに増幅し、プロファイリングした。日光黒子と正常皮膚対照との間で差次的に発現した1600個の遺伝子が選択された。さらなる試験により103遺伝子分類器(表10)が同定されたが、これを用いて日光黒子と正常な色素沈着皮膚とを識別することができる(図14~16)。

【0130】

さらなる研究では、ANOVA($p < 0.05$)、FDR($p < 0.05$)、および多重検定補正を用いて、日光黒子試料11例、異型母斑試料12例、および基底細胞癌(BCC)試料8例を解析して、82個の差次的発現遺伝子が同定された(表11)。82遺伝子分類器の階層的解析から、これを用いて黒色腫と異型母斑および/または基底細胞癌(BCC)とを識別することができることが示される(図17)。最後に、32遺伝子分類器(表12)が同定されたが、これを用いて日光黒子と悪性黒子とを識別することができる(図18)。スタンフォード大学(Stanford, CA)から自由に利用できるマイクロアレイ予測解析(PAM)ソフトウェアを用いて、遺伝子およびそれぞれの分類器パネルを解析した。

10

【0131】

TREENET(登録商標)解析によって、悪性黒子と日光黒子との間の差次的発現遺伝子2437個から、さらなる28遺伝子分類器が同定された(表15; 図19も参照されたい)。加えて、悪性黒子試料26例および日光黒子試料34例による結果から、qRT-PCRが、GeneChipマイクロアレイを用いて得られたデータを再現することが示された(表16~21の生データを参照されたい)。

20

【0132】

参考文献

Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ: Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 2003, 53(1):5-26.

Gloster HM, Jr., Brodland DG: The epidemiology of skin cancer. *Dermatol Surg* 1996, 22(3):217-226.

Albert VA, Koh HK, Geller AC, Miller DR, Prout MN, Lew RA: Years of potential life lost: another indicator of the impact of cutaneous malignant melanoma on society. *J Am Acad Dermatol* 1990, 23(2 Pt 1):308-310.

10

Morhenn VB, Chang EY, Rheins LA: A noninvasive method for quantifying and distinguishing inflammatory skin reactions. *J Am Acad Dermatol* 1999, 41(5 Pt 1):687-692.

Wong R, Tran V, Morhenn V, Hung SP, Andersen B, Ito E, Wesley Hatfield G, Benson NR: Use of RT-PCR and DNA microarrays to characterize RNA recovered by non-invasive tape harvesting of normal and inflamed skin. *J Invest Dermatol* 2004, 123(1):159-167.

20

Benson NR, Papenfuss J, Wong R, Motaal A, Tran V, Panko J, Krueger GG: An analysis of select pathogenic messages in lesional and non-lesional skin using non-invasive tape harvesting. *Journal of Investigative Dermatology* 2006, 126(10):2234-2241.

Baldi A, Santini D, De Luca A, Paggi MG: cDNA array technology in melanoma: an overview. *J Cell Physiol* 2003, 196(2):219-223.

30

Carr KM, Bittner M, Trent JM: Gene-expression profiling in human cutaneous melanoma. *Oncogene* 2003, 22(20):3076-3080.

Gershenwald JE, Bar-Eli M: Gene expression profiling of human cutaneous melanoma: are we there yet? *Cancer Biol Ther* 2004, 3(1):121-123.

Kim CJ, Reintgen DS, Yeatman TJ: The promise of microarray technology in melanoma care. *Cancer Control* 2002, 9(1):49-53.

40

Seftor RE, Seftor EA, Koshikawa N, Meltzer PS, Gardner LM, Bilban M, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V, Hendrix MJ: Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res* 2001, 61(17):6322-6327.

Su YA, Bittner ML, Chen Y, Tao L, Jiang Y, Zhang Y, Stephan DA, Trent JM: Identification of tumor-suppressor genes using human melanoma cell lines UACC903, UACC903(+6), and SRS3 by comparison of expression profiles. *Mol Carcinog* 2000, 28(2):119-127.

10

Haqq C, Nosrati M, Sudilovsky D, Crothers J, Khodabakhsh D, Pulliam BL, Federman S, Miller JR, 3rd, Allen RE, Singer MI *et al*: The gene expression signatures of melanoma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(17):6092-6097.

20

Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T *et al*: A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004, 351(27):2817-2826.

Pavey S, Johansson P, Packer L, Taylor J, Stark M, Pollock PM, Walker GJ, Boyle GM, Harper U, Cozzi SJ *et al*: Microarray expression profiling in melanoma reveals a BRAF mutation signature. *Oncogene* 2004, 23(23):4060-4067.

30

McCarty MF, Bielenberg DR, Nilsson MB, Gershenwald JE, Barnhill RL, Ahearn P, Bucana CD, Fidler IJ: Epidermal hyperplasia overlying human melanoma correlates with tumour depth and angiogenesis. *Melanoma Res* 2003, 13(4): 379-387.

Stolz W, Schmoeckel C, Welkovich B, Braun-Falco O: Semiquantitative analysis of histologic criteria in thin malignant melanomas. *J Am Acad Dermatol* 1989, 20(6): 1115-1120.

40

Wu Z, Irizarry RA: Stochastic models inspired by hybridization theory for short oligonucleotide arrays. *J Comput Biol* 2005, 12(6):882-893.

Wu Z, Irizarry RA: Preprocessing of oligonucleotide array data. *Nat Biotechnol* 2004, 22(6):656-658; author reply 658.

Smyth GK, Yang YH, Speed T: Statistical issues in cDNA microarray data analysis. *Methods Mol Biol* 2003, 224:111-136.

Lee M-LT: Analysis of microarray gene expression data. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2004.

Stuart RO, Wachsman W, Berry CC, Wang-Rodriguez J, Wasserman L, Klacansky I, Masys D, Arden K, Goodison S, McClelland M *et al*: In silico dissection of cell-type-associated patterns of gene expression in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(2):615-620. 10

Mitchell R, Chiang CY, Berry C, Bushman F: Global analysis of cellular transcription following infection with an HIV-based vector. *Mol Ther* 2003, 8(4):674-687.

Wolyn DJ, Borevitz JO, Loudet O, Schwartz C, Maloof J, Ecker JR, Berry CC, Chory J: Light-response quantitative trait loci identified with composite interval and eXtreme array mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 2004, 167(2):907-917. 20

Borevitz JO, Liang D, Plouffe D, Chang HS, Zhu T, Weigel D, Berry CC, Winzeler E, Chory J: Large-scale identification of single-feature polymorphisms in complex genomes. *Genome Res* 2003, 13(3):513-523.

Efron B, Tibshirani R: Empirical bayes methods and false discovery rates for microarrays. *Genet Epidemiol* 2002, 23(1):70-86. 30

Hastie T, Tibshirani R, Friedman J: The elements of statistical learning: Data mining, inference, and prediction. New York: Springer-Verlag; 2001.

Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G: Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99(10):6567-6572. 40

Brieman L, Friedman J, Olshen R, Stone C: Classification and regression trees. Belmont, CA: Wadsworth International Group; 1984.

Edelman E, Porrello A, Guinney J, Balakumaran B, Bild A, Febbo PG, Mukherjee S: Analysis of sample set enrichment scores: assaying the enrichment of sets of genes for individual samples in genome-wide expression profiles. *Bioinformatics* 2006, 22(14):e108-116.

Kong SW, Pu WT, Park PJ: A multivariate approach for integrating genome-wide expression data and biological knowledge. *Bioinformatics* 2006.

Pang H, Lin A, Holford M, Enerson BE, Lu B, Lawton MP, Floyd E, Zhao H: Pathway analysis using random forests classification and regression. *Bioinformatics* 2006, 22(16):2028-2036.

Page GP, Edwards JW, Gadbury GL, Yelisetti P, Wang J, Trivedi P, Allison DB: The PowerAtlas: a power and sample size atlas for microarray experimental design and research. *BMC Bioinformatics* 2006, 7:84.

10

【 0 1 3 3 】

(表 1)

名称	対応語	別名	説明	ヒトの Entrez 遺伝子ID	マウスの Entrez 遺伝子ID	ラットの Entrez 遺伝子ID
ACTR1B (EG:10120 を含む)	202135_s_at	2310066K23Rik, AA960180, ACTR1B, AI851923, ARP1B, CTRN2, MGC36526	ARP1 actin-related protein 1 homolog B, centractin beta (yeast)	10120	226977	
ANGEL1	213099_at	1110030H02Rik, KIAA0759, mKIAA0759, RGD1306238	angel homolog 1 (Drosophila)	23357	68737	362765
ANKRD13B	227720_at	AW124583, B930093C12Rik, FLJ20418, FLJ25555, RGD1564005	ankyrin repeat domain 13B	124930	268445	360575
ANKRD44	228471_at	4930444A19Rik, A130096K20, E130014H08Rik, LOC91526, MGC21968, MGC70444, RGD1561893	ankyrin repeat domain 44	91526	329154	301415
ARHGEF19	226857_at	6030432F23, 6430573B13Rik, FLJ33962, RP4- 733M16.1, WGEF	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 19	128272	213649	362648
ATPBD4	238662_at	5730421E18Rik, MGC14798, RGD1310006	ATP binding domain 4	89978	66632	362191

20

30

40

BARX2	210419_at	2310006E12Rik, Barx2b, MGC133368, MGC133369	BarH-like homeobox 2	8538	12023	
BDNF	206382_s_at	MGC105254, MGC34632	brain-derived neurotrophic factor	627	12064	24225
BLOC1S1	202592_at	AI839753, BLOC-1 subunit 1, BLOS1, GCN5-like protein 1, GCN5L1, MGC87455, RT14	biogenesis of lysosome- related organelles complex-1, subunit 1	2647	14533	288785
BTG2	201236_s_at	AA959598, Agl, An, an-1, APRO1, MGC126063, MGC126064, PC3, TIS21	BTG family, member 2	7832	12227	29619
C16ORF48	223407_at	AI606951, DAKV6410, DKFZP434A131 9, E130303B06Rik, RGD1307357	chromosome 16 open reading frame 48	84080	102124	291975
C6ORF218	244829_at	MGC40222	chromosome 6 open reading frame 218	221718		
C8ORF13	233641_s_at	A030013D21, BC065085, D8S265, DKFZp761G151, MGC120649, MGC120650, MGC120651, RGD1561302	chromosome 8 open reading frame 13	83648	219148	498533
CCDC95	227286_at	AI225782, AI854876, Ccdc85, FLJ00079, FLJ90652, MGC31515	coiled-coil domain containing 95	283899	233875	
CCHCR1	37425_g_at	C6orf18, HCR, MGC126371, MGC126372, MGC28303, RGD:1302992, SBP	coiled-coil alpha-helical rod protein 1	54535	240084	406196
CIRBP	230142_s_at	A18 HNRNP, CIRP, R74941	cold inducible RNA binding protein	1153	12696	81825

10

20

30

40

CLSTN2	219414_at	2900042C18Rik, AI448973, alcagamma, CS2, Cst-2, CSTN2, FLJ39113, FLJ39499, KIAA4134, MGC119560, mKIAA4134	calsyntenin 2	64084	64085	171394
COL7A1	217312_s_at	AW209154, EBD1, EBDCT, EBR1	collagen, type VII, alpha 1 (epidermolysis bullosa, dystrophic, dominant and recessive)	1294	12836	301012
DACH1	205471_s_at, 205472_s_at, 228915_at	AI182278, Dac, DACH, E130112M23Rik, FLJ10138	dachshund homolog 1 (Drosophila)	1602	13134	
DCT	205337_at, 205338_s_at	DT, RGD1564975, slaty, slt, TRP-2, TYRP2	dopachrome tautomerase (dopachrome delta-isomerase, tyrosine-related protein 2)	1638	13190	290484
DOCK10	219279_at	9330153B10RIK, A630054M16Rik, DKFZp781A1532, DRIP2, Jr4, Jr5, mKIAA0694, Nbla10300, R75174, RGD1561963, ZIZ3, Zizimin3	dedicator of cytokinesis 10	55619	210293	301556
DRAP1	1556181_at	2310074H19Rik, MGC156767, NC2-ALPHA, negative cofactor 2 alpha	DR1-associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)	10589	66556	293674
EDNRB	204271_s_at, 206701_x_at	ABCDS, AU022549, Ednra, ET>B<, ET-B, ETB RECEPTOR, ETBR, ETRB, GUSB, HSCR, HSCR2, Sox10ml	endothelin receptor type B	1910	13618	50672
EFNA4	205107_s_at	EFL-4, EPHRIN A4, Epl4, EPLG4, LERK-4, MGC125826	ephrin-A4	1945	13639	310643
EHD2	45297_at	BC027084, C130052H20Rik, MGC25606, MGC38650, MGEPS, PAST2	EH-domain containing 2	30846	259300	361512

10

20

30

40

ETS1	224833_at	AI196000, AI448617, C- ETS1, D230050P06, Etsoncb, EWSR2, FLJ10768, MGC124638, MGC130355, MGC18571, p42 ETS1, p51 ETS1, Tpl1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)	2113	23871	24356
FAM33A	225684_at	I110001A07Rik, C78640, EG625534, FLJ12758, MGC109093, MGC110975, MGC151378, RGD1307084	family with sequence similarity 33, member A	348235	66140 62 5534	287598
FGFR1	210973_s_at, 211535_s_at	AW208770, BFGFR, C-FGR, CD331, CEK, FGF1 RECEPTOR, FGFBR, FGFR1- IIC, Fgfr1c, FLG, Flk2, FLT2, H5, HBGFR, KAL2, N-SAM	fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)	2260	14182	79114
FOXO1A	202723_s_at	Afxh, AI876417, FKH1, FKHR, FKHR1, Forkhead, FOXO1	forkhead box O1A (rhabdomyosarcoma)	2308	56458	84482
FOXP1	223936_s_at	12CC4, 3110052D19Rik, 4932443N09Rik, AI461938, AW494214, FLJ23741, hFKH1B, HSPC215, MGC116362, MGC12942, MGC88572, MGC99551, QRF1	forkhead box P1	27086	108655	297480
FRAT2	209864_at	MGC10562, MGC37615	frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 2	23401	212398	

10

20

30

40

GCLM	203925_at	Gamma gclm, Gamma glutamylcysteine synthase (regulatory), GAMMA GLUTAMYL CYSTEINE SYNTHETASE, Gcs Ls, Gcs, Regulatory, GCS- L, GCS1, GcsLc, GLCLR, glutamat-cystein ligase, regulatory subunit	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	2730	14630	29739
GGA3	209411_s_at	C230037M19Rik, KIAA0154, mKIAA0154	golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 3	23163	260302	360658
GLUL	200648_s_at	GLNS, Glutamine Synthase, GLUTAMINE SYNTHETASE, GS, MGC128403, PIG43	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase)	2752	14645	
GPR161	214104_at	FLJ33952, G- protein coupled receptor af091890, Gm208, Gm208Gpr, RE2, RGD1563245	G protein-coupled receptor 161	23432	240888	289180
HEY2	219743_at	CHF1, GRL, HERP1, HESR2, HRT2, MGC10720	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2	23493	15214	155430
HIST2H2AA3	214290_s_at	AI448581, H2A, H2a-615, H2A.2, H2A/O, H2A/q, H2AFO, Hist2, HIST2H2AA, Hist2h2aa1	histone cluster 2, H2aa3	8337	15267	365877
ID1	208937_s_at	AI323524, D2Wsu140e, ID, ID-1H, ID125A, Idb1, MGC156482	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	3397	15901	25261

10

20

30

40

KALRN	227750_at	2210407G14Rik, AV235988, DUET, Duo, E530005C20Rik, FLJ16443, Gm539, HAPIP, KALIRIN, Kalirin7, Pcip10, TRAD	kalirin, RhoGEF kinase	8997	545156	84009
KDELRL1	200922_at	8030486F04Rik, AW215843, ERD2, ERD2.1, HDEL, KDEL RECEPTOR, Kdelr, MGC109169, PM23	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 1	10945	68137	361577
KIAA0738	210529_s_at	2810407D09Rik, 3321401G04Rik, A230020K05Rik, AI848529, RGD1565474	KIAA0738 gene product	9747	77574	362353
KIT	205051_s_at	Bs, C-KIT, c-Kit Gmnk+, CD117, Fdc, SCFR, Ssm, Tr Kit, white-spotted	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	3815	16590	64030
LGR4	230674_at	9130225G07, A930009A08Rik, GPCR48, GPR48	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4	55366	107515	286994
LHX2 (EG-9355 を含む)	211219_s_at	ap, apterous, hLhx2, Lh-2, LH2A, Lhx2, Lim2, MGC138390	LIM homeobox 2	9355	16870	296706
LMO4	209204_at	A730077C12Rik, Crp3, Etohi4, MGC105593	LIM domain only 4	8543	16911	362051
LOC254100	1557131_at		hypothetical protein LOC254100	254100		
LRIG1	236173_s_at, 238339_x_at	D6Bwg0781e, DKFZP586O1624, Img, LIG-1	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1	26018	16206	312574
MED28	222635_s_at	1500003D12Rik, AI451633, AU045690, DKFZP434N185, EG1, FKSG20, magicin, RGD1305875	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 28 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	80306	66999	305391
MKL1	215292_s_at	AI852829, AMKL, AW743281, AW821984, BSAC, MAL, MRTF-A	megakaryoblastic leukemia (translocation) 1	57591	223701	315151

10

20

30

40

MLANA	206426_at, 206427_s_at	A930034P04Rik, MART-1, MELAN-A, MGC130556	melan-A	2315	77836	293890
MLLT6	225628_s_at	AF17, AI315037, FLJ23480	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 6	4302	246198	303504
MLPH	218211_s_at	2210418F23Rik, 5031433I09Rik, AW228792, D1Wsu84e, l(1)- 3Rk, l1Rk3, ln, MGC2771, MGC59733, SLAC2-A	melanophilin	79083	171531	316620
MYEF2	222771_s_at, 232676_x_at	9430071B01, FLJ11213, HsT18564, KIAA1341, MEF-2, MGC109392, MGC87325, mKIAA1341, MST156, MSTP156	myelin expression factor 2	50804	17876	362207
MYL6B	204173_at	5730437E04Rik, Atrial Myosin Light Chain 1, BC037527, MGC41229, MLC1SA, RGD1560334	myosin, light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle	140465	216459	317454
MYO5A	227761_at	9630007J19Rik, AI413174, AI661011, Br Myosin5a, d- 120J, Dbv, Dop, flail, flr, GS1, hcBM-V, MVa, MYH12, MYO5, myosin V, MYOSIN VA, MYOSIN VA EXON CONTAINING, MYOVA, MYOXIN, MYR12, Sev-1	myosin VA (heavy chain 12, myoxin)	4644	17918	25017
NBL1	37005_at	DIS1733E, D4H1S1733E, DAN, Dana, DAND1, MGC123430, MGC8972, NB, NO3	neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1	4681	17965	50594

10

20

30

40

NFIB	230791_at	6720429L07Rik, CTF/NF1B, E030026I10Rik, NF1-B, NFI- RED, NFIB2, NFIB3, Nuclear factor 1/B	nuclear factor I/B	4781	18028	29227
OSTM1	218196_at	1200002H13Rik, AW123348, GIPN, GL, HSPC019	osteopetrosis associated transmembrane protein 1	28962	14628	445370
PDK3	221957_at	2610001M10Rik, AI035637, MGC6383	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 3	5165	236900	296849
PKD1	241090_at	FLJ00285, mFLJ00285, MGC118471, PBP, PC-1, POLYCYSTIN1	polycystic kidney disease 1 (autosomal dominant)	5310	18763	24650
PLEKHA5	220952_s_at	2810431N21Rik, AI428202, AK129423, Ayu21-9, FLJ10667, FLJ31492, Gt(pU21)9Imeg, Image:3710928, KIAA1686, MGC38455, PEPP2, TRS1	pleckstrin homology domain containing, family A member 5	54477	109135	246237
PLP1	210198_s_at	DM20, jimpy, jp, MMPL, Msd, PLP, PLP/DM20, PMD, PROTEOLIPID, RSH, SPG2	proteolipid protein 1 (Pelizaeus-Merzbacher disease, spastic paraplegia 2, uncomplicated)	5354	18823	24943
PLXNC1	213241_at	2510048K12Rik, AW742158, CD232, Plexin C1, VESPR	plexin C1	10154	54712	362873
PPP3CA	202425_x_at	2900074D19Rik, AI841391, AW413465, Calcineurin, Calcineurin A Alpha, CALN, CALNA, CALNA1, CCN1, CN, CnA, CnA- alpha, CNA1, MGC106804, Pp2b Subunit A, PPP2B	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform (calcineurin A alpha)	5530	19055	24674
PRKCSH	200707_at	80K-H, AGE- R2, G19P1, PCLD, PLD, PLD1	protein kinase C substrate 80K-H	5589	19089	300445

10

20

30

40

PRKD3	222565_s_at	4930557O20Rik, 5730497N19Rik, EPK2, MGC47171, nPKC-NU, PKC- NU, PKD3, PRKCN	protein kinase D3	23683	75292	313834
PRMT1	206445_s_at	6720434D09Rik, ANM1, AW214366, HCP1, heterogeneous ribonucleoprotei ns methyltransferase -like 2, Hnmt1l2, Hramt, HRMT1L2, IR1B4, Mrmt1	protein arginine methyltransferase 1	3276	15469	60421
PSCD3	225147_at	AI648983, ARNO3, CYTOHESIN-3, GRP1, KIAA4241, MGC124579, mKIAA4241, Sec7, Sec7C	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 3	9265	19159	116693
PTPRF	200635_s_at, 200637_s_at	AA591035, FLJ43335, FLJ45062, FLJ45567, LAR, Lar ptp2b, LARFN5C, LARS	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	5792	19268	360406
PTPRM	155579_s_at	HR-PTPU, KIAA4044, MGC90724, mKIAA4044, PTP-MU, PTPRL1, R-PTP- MU, RPTPM, RPTPU	protein tyrosine phosphatase, receptor type, M	5797	19274	29616
PVRL1	225211_at	AI835281, AW549174, CD111, CLPED1, ED4, HIgR, HVEC, MGC142031, MGC16207, NECTIN-1, Nectin1 alpha, Nectin1 delta, OFC7, PRR, PRR1, PVRR, PVRR1, SK-12	poliovirus receptor- related 1 (herpesvirus entry mediator C; nectin)	5818	58235	192183
RAB40C	227269_s_at	RAB40, RAR3, RARL, RASL8C	RAB40C, member RAS oncogene family	57799	224624	359728

10

20

30

40

RASSF3	230466_s_at	AW212023, AW322379, MGC119194, MGC119195, MGC119197, RASSF5	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 3	283349	192678	362886
RHOQ	212120_at	ARHQ, RASL7A, Rhot, TC10, TC10 BETA, TC10A	ras homolog gene family, member Q	23433	104215	85428
SAT1	203455_s_at, 210592_s_at, 213988_s_at, 230333_at	AA617398, Ab2- 402, DC21, KFSD, MGC72945, SAT, Spermidine/sper mine N1-acetyl transferase, SSAT, SSAT-1	spermidine/spermine N1- acetyltransferase 1	6303	20229	302642
SDCBP	200958_s_at	MDA-9, ST1, SYCL, SYNTENIN, Syntenin-1, TACIP18	syndecan binding protein (syntenin)	6386	53378	83841
SEC61A1	217716_s_at, 222385_x_at	AA408394, AA410007, HSEC61, rSEC61alpha p, SEC61, Sec61 alpha, SEC61 ALPHA1, SEC61A	Sec61 alpha 1 subunit (S. cerevisiae)	29927	53421	80843
SEMA3C	236947_at	1110036B02Rik, SEMAE, SEMAPHORIN E, SemE	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	10512	20348	296787
SERGEF	220482_s_at, 232983_s_at	DELGEF, Gef, Gnef, Gnefr, MGC141208, MGC141209, RGD1563497	secretion regulating guanine nucleotide exchange factor	26297	27414	365243
SILV	209848_s_at	D10H12S53E, D12S53E, D12S53Eh, GP100, gp87, ME20, PMEL17, SI, SIL	silver homolog (mouse)	6490	20431	362818
SLC2A4RG	227362_at	GEF, HDBP1, Si-1-2, Si-1-2-19	SLC2A4 regulator	56731		
SLC7A1	212295_s_at	4831426K01Rik, AI447493, ATRC1, CAT-1, EcoR, ER, ERR, HCAT1, mCAT- 1, Rec-1, REC1L, REV-1	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	6541	11987	25648

10

20

30

40

SRGAP2	1568957_x_at	9930124L22Rik, AI448945, FBP2, FNBP2, KIAA0456, RGD1566016, srGAP3	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2	23380	14270	360840
SSBP3	217991_x_at, 223635_s_at	2610021L12Rik, 2610200M23Rik, 5730488C10Rik, AI854733, AW551939, CSDP, FLJ10355, LAST, MGC124589, SSDP, SSDP1, Ssdp3	single stranded DNA binding protein 3	23648	72475	84354
STAM (EG:8027 を含む)	203544_s_at	DKFZp686J2352, RGD1564499, Stam, STAM1	signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 1	8027	20844	498798
SYNGR2	201079_at	CELLUGYRIN, Clast2, MGC102914	synaptogyrin 2	9144	20973	89815
TCF7L2 (EG:6934 を含む)	212759_s_at	mTcf-4B, mTcf- 4E, TCF-4, TCF4B, TCF4E, Tcf7l2	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG- box)	6934	21416	
TIMM17A	215171_s_at	17kDa, Mitochondrial import inner membrane translocase, Mitochondrial protein import protein 2, mTim17a, TIM17, TIM17A, Timm17	translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog A (yeast)	10440	21854	54311
TP53	201746_at	bbl, bfy, bhy, Delta N p53, LFS1, MGC112612, P53, TRP53	tumor protein p53 (Li- Fraumeni syndrome)	7157	22059	24842
TP53INP1	235602_at	2700057G22Rik, DKFZP434M131 7, FLJ22139, p53DINP1, SIP, SIP18, SIP27, Stinp, Teap, Thymus Expressed Acidic Protein, TP53DINP1, TP53DINP1alpha , TP53INP1A, TP53INP1B, Trp53inp1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	94241	60599	297822

10

20

30

40

TRIB2	202478_at	AW319517, C5fw, GS3955, RGD1564451, TRB-2	tribbles homolog 2 (Drosophila)	28951	217410	313974
TRPM1 (EG:4308 を含む)	237070_at	4732499L03Rik, AI606771, LTRPC1, melastatin, MLSN, MLSN1, Trpm1	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1	4308	17364	
TSPAN6	209108_at	6720473L21Rik, AI316786, MGC117923, T245, Tm4sf, TM4SF6	tetraspanin 6	7105	56496	302313
TSTA3	36936_at	AI256181, FX, FX protein, MGC113801, P35B, Tstap35b	tissue specific transplantation antigen P35B	7264	22122	300036
TTC3	208073_x_at, 210645_s_at	2610202A04Rik, AA409221, D16Ium21, D16Ium21e, DCRR1, DKFZp686M015 0, KIAA4119, mKIAA4119, Mtp rd, RNF105, TPRD, TPRDIII	tetratricopeptide repeat domain 3	7267	22129	360702
TUBB4	212664_at	AI325297, Beta tubulin, BETA TUBULIN 4 ALPHA, Beta tubulin class iv, beta-5, Beta4 Tubulin, M(beta)4, Tubb, TUBB5, TUBULIN BETA (5-BETA), TUBULIN BETA5	tubulin, beta 4	10382	22153	29213
TYR	206630_at	albino, Dopa oxidase, Melanogenesis Related Tyrosinase, OCA1A, OCA1A, skc35, Tyr<lt;c- em>>, TYROSINASE	tyrosinase (oculocutaneous albinism IA)	7299	22173	308800

10

20

30

40

TYRP1	205694_at	b-PROTEIN, brown, CAS2, CATB, GP75, isa, MELANOMA ANTIGEN GP75, TRP, TRP-1, TYRP	tyrosinase-related protein 1	7306	22178	298182
VDR	204255_s_at	NR1I1, VD3R, VITAMIN D RECEPTOR	vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	7421	22337	24873
VGLL4	214004_s_at	BC048841, KIAA0121, MGC109514, MGC54805, VGL-4	vestigial like 4 (Drosophila)	9686	232334	297523
YIPF5	224949_at	2610311I19Rik, AA408236, Ac2- 256, DKFZp313L2216 , FinGER5, SB140, SMAP-5, YIP1A	Yip1 domain family, member 5	81555	67180	361315
ZFHX1B	1557797_a_at , 203603_s_at	9130203F04Rik, D130016B08Rik, KIAA0569, mKIAA0569, SIP-1, SMADIP1, ZEB2, Zfx1b, Zfxh1b	zinc finger homeobox 1b	9839	24136	311071
	1558019_at	---:Homo sapiens, clone IMAGE:4732650 , mRNA				
	233551_at	LOC642776:hypo thetical protein LOC642776				
	208646_at	RPS14:ribosomal protein S14 /// similar to ribosomal protein S14				
	208929_x_at	RPL13:ribosomal protein L13				
	214351_x_at	RPL13:ribosomal protein L13 /// similar to ribosomal protein L13				
	200817_x_at	RPS10:ribosomal protein S10				
	213296_at	---:Transcribed locus				
	213692_s_at	---:---				
	227957_at	---:---				
	232462_s_at	FLJ23569:BC040 926				

10

20

30

40

	227722_at	RPS23:ribosomal protein S23				
	217466_x_at	RPS2:ribosomal protein S2 /// similar to ribosomal protein S2				
	235534_at	---:Homo sapiens, clone IMAGE:5723825, mRNA				
	230741_at	---:Full length insert cDNA clone YX74D05				
	229067_at	LOC653464:Similar to SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 2 (srGAP2) (Formin0binding protein 2)				

10

【 0 1 3 4 】

(表 2)

20

名称	対応語
ANKRD44	228471 at
ARHGEF19	226857 at
ATPBD4	238662 at
BARX2	210419 at
BDNF	206382 s at
BLOC1S1	202592 at
C16ORF48	223407 at
C6ORF218	244829 at
C8ORF13	233641 s at
CCHCR1	37425 g at
CIRBP	230142 s at
CLSTN2	219414 at
COL7A1	217312 s at
DACH1	205472 s at, 228915 at
DCT	205337 at, 205338 s at
DOCK10	219279 at
DRAP1	1556181 at
EDNRB	204271 s at, 206701 x at
EFNA4	205107 s at
EHD2	45297 at
ETS1	224833 at
FAM33A	225684 at
FGFR1	210973 s at, 211535 s at
FOXO1A	202723 s at
GGA3	209411 s at
GPR161	214104 at
HIST2H2AA3	214290 s at
ID1	208937 s at
KDELRL1	200922 at
KIAA0738	210529 s at
KIT	205051 s at

30

40

LGR4	230674 at	
LHX2 (EG:9355を含む)	211219 s at	
LMO4	209204 at	
LOC254100	1557131 at	
LRIG1	238339 x at	
MED28	222635 s at	
MKL1	215292 s at	
MLANA	206426 at, 206427 s at	
MLPH	218211 s at	
MYEF2	222771 s at, 232676 x at	
MYO5A	227761 at	
NBL1	37005 at	10
OSTM1	218196 at	
PDK3	221957 at	
PKD1	241090 at	
PLEKHA5	220952 s at	
PLP1	210198 s at	
PLXNC1	213241 at	
PRKCSH	200707 at	
PRKD3	222565 s at	
PRMT1	206445 s at	
PSCD3	225147 at	
PTPRF	200637 s at	
PTPRM	1555579 s at	20
RAB40C	227269 s at	
RASSF3	230466 s at	
RHOQ	212120 at	
RPL13	214351 x at	
RPS23	227722 at	
SAT1	203455 s at, 213988 s at, 230333 at	
SDCBP	200958 s at	
SEC61A1	222385 x at	
SEMA3C	236947 at	
SERGEF	232983 s at	
SILV	209848 s at	
SLC2A4RG	227362 at	30
SLC7A1	212295 s at	
SSBP3	217991 x at, 223635 s at	
STAM (EG:8027を含む)	203544 s at	
SYNGR2	201079 at	
TCF7L2 (EG:6934を含む)	212759 s at	
TIMM17A	215171 s at	
TRIB2	202478 at	
TRPM1 (EG:4308を含む)	237070 at	
TSPAN6	209108 at	
TTC3	208073 x at, 210645 s at	
TUBB4	212664 at	
TYR	206630 at	40
VDR	204255 s at	
YIPF5	224949 at	
ZFHX1B	1557797 a at, 203603 s at	
	229067 at	
	213692 s at	
	227957 at	
	213296 at	
	235534 at	
	233551 at	
	1558019 at	

【 0 1 3 5 】

(表 3)

対応語	説明
208073 x at	TTC3:tetratricopeptide repeat domain 3
210645 s at	TTC3:tetratricopeptide repeat domain 3
206630 at	TYR:tyrosinase (oculocutaneous albinism IA)
203544 s at	STAM:signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 1
230741 at	---:Full length insert cDNA clone YX74D05

【 0 1 3 6 】

(表 4)

対応語	説明
205694 at	TYRP1:tyrosinase-related protein 1
206427 s at	MLANA:melan-A
206140 at	LHX2:LIM homeobox 2
206630 at	TYR:tyrosinase (oculocutaneous albinism IA)
203921 at	CHST2:carbohydrate (N-acetylglucosamine-6-O) sulfotransferase 2
205337 at	DCT:dopachrome tautomerase (dopachrome delta-isomerase, tyrosine-related protein 2)
228245 s at	OVOS2:ovostatin 2 /// similar to cDNA sequence BC048546
205338 s at	DCT:dopachrome tautomerase (dopachrome delta-isomerase, tyrosine-related protein 2)
1557797 a at	ZFH1B:Zinc finger homeobox 1b
204271 s at	EDNRB:endothelin receptor type B
237070 at	TRPM1:transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1
200716 x at	RPL13A:ribosomal protein L13a
1555579 s at	PTPRM:protein tyrosine phosphatase, receptor type, M
205051 s at	KIT:v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
200665 s at	SPARC:secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin) /// secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
205174 s at	QPCT:glutaminyl-peptide cyclotransferase (glutaminyl cyclase)
200725 x at	RPL10:ribosomal protein L10
232602 at	WFDC3:WAP four-disulfide core domain 3
202478 at	TRIB2:tribbles homolog 2 (Drosophila)
209230 s at	P8:p8 protein (candidate of metastasis 1)
232676 x at	MYEF2:myelin expression factor 2
222565 s at	PRKD3:protein kinase D3
212295 s at	SLC7A1:solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1
212594 at	PDCD4:programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)
218211 s at	MLPH:melanophilin
206426 at	MLANA:melan-A
207065 at	K6HF:cytokeratin type II
202500 at	DNAJB2:DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 2
203706 s at	FZD7:frizzled homolog 7 (Drosophila)
209969 s at	STAT1:signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa

10

20

30

【 0 1 3 7 】

(表 5)

対応語	説明
205694 at	tyrosinase-related protein 1
206140 at	LIM homeobox 2
206427 s at	melan-A
203455 s at	spermidine/spermine N1-acetyltransferase
206453 s at	NDRG family member 2
203921 at	carbohydrate (N-acetylglucosamine-6-O) sulfotransferase 2
200958 s at	syndecan binding protein (syntenin)
209283 at	crystallin, alpha B
204271 s at	endothelin receptor type B
208073 x at	tetratricopeptide repeat domain 3
232602 at	WAP four-disulfide core domain 3
202435 s at	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
209230 s at	p8 protein (candidate of metastasis 1)
208966 x at	interferon, gamma-inducible protein 16
205337 at	dopachrome tautomerase (dopachrome delta-isomerase, tyrosine-related protein 2)
202088 at	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6
211538 s at	heat shock 70kDa protein 2
201556 s at	vesicle-associated membrane protein 2 (synaptobrevin 2)
241455 at	Similar to A1661453 protein
237070 at	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1

10

【 0 1 3 8 】

(表 6)

20

対応語	説明
155505 a at	tyrosinase (oculocutaneous albinism IA)
204271 s at	endothelin receptor type B
208073 x at	tetratricopeptide repeat domain 3
200958 s at	syndecan binding protein (syntenin)
205051 s at	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
201245 s at	OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 1
201603 at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A
201605 x at	calponin 2
201908 at	dishevelled, dsh homolog 3 (Drosophila)
202478 at	tribbles homolog 2 (Drosophila)
1557292 a at	mucolipin 3
200601 at	actinin, alpha 4
200819 s at	ribosomal protein S15
209953 s at	CDC37 cell division cycle 37 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
213146 at	jumonji domain containing 3
222670 s at	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)
224991 at	c-Maf-inducing protein
226988 s at	myosin, heavy polypeptide 14
244829 at	Hypothetical protein MGC40222

30

【 0 1 3 9 】

(表 7)

40

対応語	説明
204271 s at	endothelin receptor type B
244829 at	Hypothetical protein MGC40222
208073 x at	tetratricopeptide repeat domain 3
213037 x at	staufen, RNA binding protein (Drosophila)
200601 at	actinin, alpha 4
219387 at	KIAA1212
209168 at	glycoprotein M6B
205051 s at	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
224991 at	c-Maf-inducing protein
200613 at	adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit
203330 s at	syntaxin 5A
225009 at	chemokine-like factor superfamily 4
221485 at	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 5
218255 s at	fibrosin 1
227870 at	likely ortholog of mouse neighbor of Punc E11
226988 s at	myosin, heavy polypeptide 14
204086 at	preferentially expressed antigen in melanoma

213146_at	jumonji domain containing 3	
205681_at	BCL2-related protein A1	
213940_s_at	formin binding protein 1	
202478_at	tribbles homolog 2 (Drosophila)	
226702_at	hypothetical protein LOC129607	
218402_s_at	Hermansky-Pudlak syndrome 4	
227099_s_at	hypothetical LOC387763	
218211_s_at	melanophilin	
217738_at	pre-B-cell colony enhancing factor 1	
228488_at	TBC1 domain family, member 16	
215695_s_at	glycogenin 2	
241898_at	Transcribed locus, moderately similar to XP_517655.1 PREDICTED: similar to KIAA0825 protein [Pan troglodytes]	10
202479_s_at	tribbles homolog 2 (Drosophila)	
201453_x_at	Ras homolog enriched in brain	
228415_at	Adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit	
201908_at	dishevelled, dsh homolog 3 (Drosophila)	
225600_at	MRNA; cDNA DKFZp779L1068 (from clone DKFZp779L1068)	
221951_at	transmembrane protein 80	
203455_s_at	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	
201603_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A	
1558702_at	Testis expressed sequence 10	
204527_at	myosin VA (heavy polypeptide 12, myosin)	
235222_x_at	baculoviral IAP repeat-containing 4	20
1560445_x_at	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	
1556205_at	CDNA FLJ37227 fis, clone BRAMY2000277	
226054_at	bromodomain containing 4	
210198_s_at	proteolipid protein 1 (Pelizaeus-Merzbacher disease, spastic paraplegia 2, uncomplicated)	
202370_s_at	core-binding factor, beta subunit	
209058_at	endothelial differentiation-related factor 1	
211755_s_at	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1 ; ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1	
229713_at	CDNA FLJ13267 fis, clone OVARC1000964	
209514_s_at	RAB27A, member RAS oncogene family	
201299_s_at	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 1B (yeast)	
211909_x_at	prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3) ; prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)	30
209234_at	kinesin family member 1B	
207622_s_at	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 2	
212421_at	chromosome 22 open reading frame 9	
219636_s_at	armadillo repeat containing 9	
223407_at	chromosome 16 open reading frame 48	
200645_at	GABA(A) receptor-associated protein	
242049_s_at	neuroblastoma-amplified protein	
230793_at	Leucine rich repeat containing 16	
215409_at	PLSC domain containing protein	
202984_s_at	BCL2-associated athanogene 5	
201864_at	GDP dissociation inhibitor 1	
209780_at	putative homeodomain transcription factor 2	40
218143_s_at	secretory carrier membrane protein 2	
228919_at		
228095_at	PHD finger protein 14	
213736_at	Cytochrome c oxidase subunit Vb	
213655_at	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	
218419_s_at	hypothetical protein MGC3123	
200755_s_at	calumenin	

223220_s_at	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9
237464_at	LAT1-3TM protein 2
229679_at	FLJ40142 protein
	IL-1 RI (Interleukin-1 RI)
	EDN2 (endothelin-2)
	EFNA5 (ephrin-A5)
	IGFBP7 (IGF Binding Protein 7)
	HLA-A0202 heavy chain (Human Leukocyte Antigen-A0202 heavy chain)
	Activin A (β A subunit)
	TNF RII (tumor necrosis factor receptor II)
	SPC4 (Subtilisin-Like Proprotein Convertase, PACE4)
	CNTF R α (Ciliary neurotrophic factor receptor α)

10

【 0 1 4 0 】

(表 8)

遺伝子	説明
204271_s_at	endothelin receptor type B
244829_at	Hypothetical protein MGC40222
208073_x_at	tetratricopeptide repeat domain 3
213037_x_at	staufen, RNA binding protein (Drosophila)
200601_at	actinin, alpha 4
219387_at	KIAA1212
209168_at	glycoprotein M6B
205051_s_at	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
224991_at	c-Maf-inducing protein
200613_at	adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit
203330_s_at	syntaxin 5A
225009_at	chemokine-like factor superfamily 4
221485_at	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 5
218255_s_at	fibrosin 1
227870_at	likely ortholog of mouse neighbor of Punc E11
226988_s_at	myosin, heavy polypeptide 14
204086_at	preferentially expressed antigen in melanoma
213146_at	jumonji domain containing 3
205681_at	BCL2-related protein A1
213940_s_at	formin binding protein 1

20

30

【 0 1 4 1 】

(表 1 0)

遺伝子	説明
221750_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)
225283_at	arrestin domain containing 4
212952_at	Calreticulin
226920_at	Casein kinase 1, alpha 1
201533_at	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
225551_at	chromosome 1 open reading frame 71
227736_at	chromosome 10 open reading frame 99
217883_at	chromosome 2 open reading frame 25
226614_s_at	chromosome 8 open reading frame 13
214073_at	cortactin
233929_x_at	CXYorf1-related protein
225035_x_at	CXYorf1-related protein ; CXYorf1-related protein ; CXYorf1-related protein
200953_s_at	cyclin D2
206595_at	cystatin E/M
224831_at	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4

40

201211 s at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	
200762 at	dihydropyrimidinase-like 2	
219648 at	dilute suppressor	
202572 s at	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 4	
200664 s at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	
208811 s at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6	
208370 s at	Down syndrome critical region gene 1	
214445 at	elongation factor, RNA polymerase II, 2	
214446 at	elongation factor, RNA polymerase II, 2	
201436 at	eukaryotic translation initiation factor 4E	
208290 s at	eukaryotic translation initiation factor 5	
200748 s at	ferritin, heavy polypeptide 1	10
211628 x at	ferritin, heavy polypeptide pseudogene 1 ; ferritin, heavy polypeptide pseudogene 1	
205409 at	FOS-like antigen 2	
200959 at	fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma)	
201065 s at	general transcription factor II, i ; general transcription factor II, i, pseudogene 1	
218238 at	GTP binding protein 4	
201841 s at	heat shock 27kDa protein 1	
225988 at	hect domain and RLD 4	
241683 at	HECT domain containing 1	
201944 at	hexosaminidase B (beta polypeptide)	
219976 at	hook homolog 1 (Drosophila)	
213079 at	hypothetical protein DT1P1A10	
215434 x at	hypothetical protein FLJ20719 ; AG1 protein	20
1569157 s at	hypothetical protein LOC162993	
227052 at	Hypothetical protein LOC201895	
225065 x at	hypothetical protein MGC40157	
231733 at	ICEBERG caspase-1 inhibitor	
240941 at	Intersectin 2	
208881 x at	isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	
204615 x at	isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	
213507 s at	karyopherin (importin) beta 1	
203068 at	kelch-like 21 (Drosophila)	
225142 at	KIAA1718 protein	
220368 s at	KIAA2010	
1559226 x at	late cornified envelope 1E	30
1559224 at	late cornified envelope 1E	
200673 at	lysosomal-associated protein transmembrane 4 alpha	
223480 s at	mitochondrial ribosomal protein L47	
207121 s at	mitogen-activated protein kinase 6	
214939 x at	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 4	
203315 at	NCK adaptor protein 2	
230291 s at	Nuclear factor I/B	
211467 s at	nuclear factor I/B	
213032 at	Nuclear factor I/B	
223650 s at	nuclear receptor binding factor 2	
222878 s at	OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 2	40
217608 at	p18 splicing regulatory protein	
200907 s at	palladin	
202290 at	PDGFA associated protein 1	
218942 at	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type II, gamma	
225147 at	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 3	
216515 x at	prothymosin, alpha (gene sequence 28) ; hypothetical gene supported by BC013859 ; hypothetical gene supported by BC013859; BC070480	

200773_x_at	prothymosin, alpha (gene sequence 28) ; similar to prothymosin alpha ; hypothetical gene supported by BC013859 ; hypothetical gene supported by BC013859; BC070480	
212099_at	ras homolog gene family, member B	
212124_at	retinoic acid induced 17	
200022_at	ribosomal protein L18 ; ribosomal protein L18	
201909_at	ribosomal protein S4, Y-linked 1	
215127_s_at	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	
218143_s_at	secretory carrier membrane protein 2	
205185_at	serine peptidase inhibitor, Kazal type 5	
1554089_s_at	Shwachman-Bodian-Diamond syndrome ; Shwachman-Bodian-Diamond syndrome pseudogene	
208991_at	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	10
224573_at	similar to DNA segment, Chr 11, Brigham & Womens Genetics 0434 expressed	
242687_at	Similar to RIKEN cDNA 9930021J17	
206675_s_at	SKI-like	
1553602_at	small breast epithelial mucin	
213879_at	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2 (yeast)	
208738_x_at	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2 (yeast) ; similar to SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2	
1556839_s_at	Spectrin, beta, non-erythrocytic 5	
220983_s_at	sprouty homolog 4 (Drosophila) ; sprouty homolog 4 (Drosophila)	
205966_at	TAF13 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 18kDa	
217733_s_at	thymosin, beta 10	
216438_s_at	thymosin, beta 4, X-linked ; thymosin-like 3	20
226835_s_at	transaldolase 1 ; similar to RPE-spondin	
224680_at	transmembrane emp24 protein transport domain containing 4	
210987_x_at	tropomyosin 1 (alpha)	
211702_s_at	ubiquitin specific peptidase 32 ; ubiquitin specific peptidase 32	
203798_s_at	visinin-like 1	
210935_s_at	WD repeat domain 1	
224905_at	WD repeat domain 26	
215150_at	YOD1 OTU deubiquinating enzyme 1 homolog (yeast)	
227309_at	YOD1 OTU deubiquinating enzyme 1 homolog (yeast)	
204180_s_at	zinc finger protein 297B	
219163_at	zinc finger protein 562	
220854_at		30
224051_at		
224050_s_at		

【 0 1 4 2 】

(表 1 1)

遺伝子	説明	
225519_at	protein phosphatase 4, regulatory subunit 2	
219199_at	AF4/FMR2 family, member 4	
203450_at	PKD2 interactor, golgi and endoplasmic reticulum associated 1	
213729_at	formin binding protein 3	
220748_s_at	zinc finger protein 580	
216480_x_at	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 10	40
200043_at	enhancer of rudimentary homolog (Drosophila) ; enhancer of rudimentary homolog (Drosophila)	
211075_s_at	CD47 antigen (Rh-related antigen, integrin-associated signal transducer) ; CD47 antigen (Rh-related antigen, integrin-associated signal transducer)	
1555945_s_at	chromosome 9 open reading frame 10	
212295_s_at	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	
212687_at	LIM and senescent cell antigen-like domains 1	

224714_at	MKI67 (FHA domain) interacting nucleolar phosphoprotein	
218768_at	nucleoporin 107kDa	
228196_s_at	La ribonucleoprotein domain family, member 5	
217836_s_at	YY1 associated protein 1	
212620_at	zinc finger protein 609	
226845_s_at	myeloma overexpressed 2	
200747_s_at	nuclear mitotic apparatus protein 1	
242304_at	within bgcn homolog (Drosophila)	
204767_s_at	flap structure-specific endonuclease 1	
217869_at	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	
222729_at	F-box and WD-40 domain protein 7 (archipelago homolog, Drosophila)	10
201776_s_at	KIAA0494	
1552658_a_at	neuron navigator 3	
1555972_s_at	F-box protein 28	
216242_x_at	DNA directed RNA polymerase II polypeptide J-related gene	
231505_s_at	Sideroflexin 4	
228738_at	hypothetical protein MGC25181	
228942_s_at	DAB2 interacting protein	
208959_s_at	thioredoxin domain containing 4 (endoplasmic reticulum)	
223407_at	chromosome 16 open reading frame 48	
1555278_a_at	cytoskeleton associated protein 5	20
219375_at	choline/ethanolamine phosphotransferase 1	
208728_s_at	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	
50376_at	zinc finger protein 444	
243108_at	RAN binding protein 9	
212884_x_at	Apolipoprotein E	
65630_at	transmembrane protein 80	
214953_s_at	amyloid beta (A4) precursor protein (peptidase nexin-II, Alzheimer disease)	
223946_at	cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 3, 130kDa	
232926_x_at	ankyrin repeat domain 19	
203597_s_at	WW domain binding protein 4 (formin binding protein 21)	
223601_at	olfactomedin 2	30
212365_at	myosin IB	
203297_s_at	Jumonji, AT rich interactive domain 2	
231019_x_at	Serine/threonine kinase 11 (Peutz-Jeghers syndrome)	
201291_s_at	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	
211846_s_at	poliovirus receptor-related 1 (herpesvirus entry mediator C; nectin)	
226843_s_at	PAP associated domain containing 5	
225243_s_at	sarcolemma associated protein	
236651_at	kalirin, RhoGEF kinase	
214792_x_at	vesicle-associated membrane protein 2 (synaptobrevin 2)	
228922_at	Src homology 2 domain containing F	
225537_at	trafficking protein particle complex 6B	40
46665_at	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4C	
209702_at	fatso	
203358_s_at	enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)	
211310_at	enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila)	
242767_at	LIM and cysteine-rich domains 1	
1555575_a_at	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 1	

223151_at	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 5 (S. cerevisiae)
204170_s at	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2
229420_at	Luminal binding protein 1 (BiP-1) (BP1)
202355_s at	general transcription factor IIF, polypeptide 1, 74kDa
206061_s at	Dicer1, Dcr-1 homolog (Drosophila)
224597_at	Transcribed locus, strongly similar to XP_523650.1 PREDICTED: similar to keratin 17 [Pan troglodytes]
217739_s at	pre-B-cell colony enhancing factor 1
218943_s at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58
211087_x at	mitogen-activated protein kinase 14 ; mitogen-activated protein kinase 14
220193_at	chromosome 1 open reading frame 113
229410_at	progesterone-associated endometrial protein (placental protein 14, pregnancy-associated endometrial alpha-2-globulin, alpha uterine protein)
221844_x at	CDNA clone IMAGE:6208446
227683_x at	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4 pseudogene 2
233621_s at	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12
214270_s at	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 3
217762_s at	RAB31, member RAS oncogene family
231271_x at	HSCARG protein
227330_x at	similar to hypothetical protein MGC27019
209773_s at	ribonucleotide reductase M2 polypeptide
225227_at	SKI-like
218428_s at	REV1-like (yeast)
201556_s at	vesicle-associated membrane protein 2 (synaptobrevin 2)

10

20

【 0 1 4 3 】

(表 1 2)

遺伝子	説明
1552477_a_at	interferon regulatory factor 6
228707_at	claudin 23
206427_s_at	melan-A
218196_at	osteopetrosis associated transmembrane protein 1
219142_at	RAS-like, family 11, member B
200601_at	actinin, alpha 4
226483_at	transmembrane protein 68
243568_at	Glycine-rich protein (GRP3S)
212382_at	Transcription factor 4
218417_s_at	hypothetical protein FLJ20489
208905_at	cytochrome c, somatic
203753_at	transcription factor 4
244535_at	Forkhead box P1
222243_s_at	transducer of ERBB2, 2
205174_s_at	glutaminyl-peptide cyclotransferase (glutaminyl cyclase)
231851_at	hypothetical protein FLJ10770
200961_at	selenophosphate synthetase 2
210880_s_at	embryonal Fyn-associated substrate
230986_at	Kruppel-like factor 8
229689_s_at	Discs, large homolog 5 (Drosophila)
204319_s_at	regulator of G-protein signalling 10
219842_at	ADP-ribosylation factor related protein 2
224560_at	TIMP metalloproteinase inhibitor 2
208758_at	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase
238662_at	similar to RIKEN cDNA 5730421E18 gene
214000_s_at	Regulator of G-protein signalling 10
1559360_at	Nuclear RNA-binding protein, putative
205694_at	tyrosinase-related protein 1
231579_s_at	TIMP metalloproteinase inhibitor 2
238967_at	Claudin 1
222146_s_at	transcription factor 4
230748_at	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 6 ; similar to solute carrier family 16, member 6; monocarboxylate transporter 6

10

20

30

【 0 1 4 4 】

(表 1 3)

遺伝子	説明	黒色腫	黒色腫	黒色腫	黒色腫	黒色腫	黒色腫	黒色腫	黒色腫	黒色腫	黒色腫	黒色腫	黒色腫	黒色腫	黒色腫	
244829 at	C6orf218	DT357-M	DT330-M	DT359-M	DT419-M	DT407-M	DT412-M	DT403-M	DT406-M	DT356-M	DT405-M	DT406-M	DT403-M	DT406-M	DT356-M	DT405-M
204271 s at	EDNRB	225.972	151.1671	18.89588	16.67945	754.8258	17.26765	81.00842	45073.75	63.11889	11828.67	45073.75	81.00842	45073.75	63.11889	11828.67
200601 at	ACTN4	30.90996	23.10287	10.05611	1.484524	60.96883	5.241574	38.85424	4269.94	9.000468	13682.08	4269.94	38.85424	4269.94	9.000468	13682.08
226988 s at	MYH14	0.192109	0.343885	0.032804	0.140632	0.009486	0.554785	0.004613	1	0.164938	1045.516	1	0.004613	1	0.164938	1045.516
202478 at	TRIB2	99.73307	75.58353	28.84001	12.72858	464.6498	15.67072	19.42712	1	24.93327	14972.21	1	19.42712	1	24.93327	14972.21
1557292 a at	MCOLN3	28.05138	8.282119	5.464161	4.084049	64.89341	3.555371	3.24901	1067.485	4.756828	1082.386	1067.485	3.24901	1067.485	4.756828	1082.386
224991 at	CMIP	0.615572	0.208772	0.214641	0.205898	0.115023	1.741101	1.148698	1	0.122428	1351.176	1	1.148698	1	0.122428	1351.176
1555505 a at	TYR	21.25897	23.26356	9.849155	0.952638	150.1229	5.426417	2.928171	4870.992	2.732081	3468.269	4870.992	2.928171	4870.992	2.732081	3468.269
201908 at	DVL3	0.339151	0.088388	0.239816	8.111676	5.502167	4.924578	1.292353	32.89964	4.169863	7281.399	32.89964	1.292353	32.89964	4.169863	7281.399
222670 s at	MAFB	0.070316	0.069348	0.005263	0.00146	0.532185	0.164938	0.145592	1	0.000816	103.9683	1	0.145592	1	0.000816	103.9683
201605 x at	CNN2	150.1229	58.48521	15.13692	13.54793	324.0337	17.5087	28.44297	22226.61	32.67239	46340.95	22226.61	28.44297	22226.61	32.67239	46340.95
213146 at	JMJD3	0.005048	0.003879	0.02683	0.00198	0.009486	0.001211	0.018326	37.01402	0.078563	50.91433	37.01402	0.018326	37.01402	0.078563	50.91433
201603 at	PPP1R12A	2.188587	4.69134	0.817902	0.281265	7.361501	0.05954	0.926588	481.0356	0.103665	205.0739	481.0356	0.926588	481.0356	0.103665	205.0739
209953 s at	CDC37	12.72858	34.05985	4.756828	0.615572	13.73705	2.732081	21.70567	1226.218	7.310652	9410.137	1226.218	21.70567	1226.218	7.310652	9410.137
201245 s at	OTUB1	9.063071	6.233317	5.464161	1.905276	10.77787	1.580083	11.87619	3691.522	1.840375	4182.066	3691.522	11.87619	3691.522	1.840375	4182.066
208073 x at	TTC3	15.34823	12.72858	8.168097	8.224911	36.50444	6.916298	7.674113	4973.342	1.741101	4299.64	4973.342	7.674113	4973.342	1.741101	4299.64
200958 s at	SDCBP	3.07375	1.197479	0.336808	0.078021	6.916298	0.065154	0.389582	261.3791	0.5	247.2797	261.3791	0.389582	261.3791	0.5	247.2797
205051 s at	KIT	86.82268	54.1917	2.713209	8.815241	55.71524	4.055838	0.435275	3082.745	12.81712	689.7836	3082.745	0.435275	3082.745	12.81712	689.7836
200819 s at	RPS15	1584.707	1640.591	491.1432	182.2784	3795.305	377.4129	1884.544	389158.9	484.3815	668236.8	389158.9	1884.544	389158.9	484.3815	668236.8

【 0 1 4 5 】

(表 1 4)

10

20

30

40

遺伝子	試料		母班	母班	母班	母班	母班	母班	母班	母班	母班	母班	母班	母班	母班							
	説明	DF543	DF544	DT343	DT342	DT344	DT345	DT427	DT337	DT340	DT338	DF543	DF544	DT343	DT342	DT344	DT345	DT427	DT337	DT340	DT338	
244829 at	C6orf218	0.094732	0.80107	0.297302	0.00849	0.000905	1	0.550953	0.939523	0.001236	0.479632	0.094732	0.80107	0.297302	0.00849	0.000905	1	0.550953	0.939523	0.001236	0.479632	
204271 s at	EDNRB	393.44	16	401.7071	0.135842	0.010598	225.972	1136.199	0.20733	0.001236	393.44	0.289172	44.3235	5712.87	65.79928	12.21007	14462.21	3350.127	127.1158	64.44516	3236.009	
200601 at	ACTN4	0.289172	44.3235	5712.87	65.79928	12.21007	14462.21	3350.127	127.1158	64.44516	3236.009	0.094732	1.404445	430.539	48.50293	0.109576	2304.12	867.0672	2.907945	1.265757	410.1478	
226988 s at	MYH14	0.094732	1.404445	430.539	48.50293	0.109576	2304.12	867.0672	2.907945	1.265757	410.1478	23.26356	6.868523	797.8645	0.00849	0.005601	1	8422.308	4.287094	3.434262	12.46663	
202478 at	TRIB2	23.26356	6.868523	797.8645	0.00849	0.005601	1	8422.308	4.287094	3.434262	12.46663	0.25	0.882703	0.297302	0.00849	0.000905	1	116.9704	14.12325	0.001236	0.479632	
1557292 a at	MCOLN3	0.25	0.882703	0.297302	0.00849	0.000905	1	116.9704	14.12325	0.001236	0.479632	3.944931	0.664343	132.5139	7.727491	0.61132	1686.714	369.6459	1.021012	1.918528	433.5336	
224991 at	CMIP	3.944931	0.664343	132.5139	7.727491	0.61132	1686.714	369.6459	1.021012	1.918528	433.5336	2.297397	9.189587	0.297302	0.00849	0.010167	63.55792	10.33882	1.94531	0.001236	39.67065	
1555505 a at	TYR	2.297397	9.189587	0.297302	0.00849	0.010167	63.55792	10.33882	1.94531	0.001236	39.67065	0.094732	2.219139	139.1021	0.993092	0.248273	404.5012	1097.496	6.588728	1.580083	9.38268	
201908 at	DVL3	0.094732	2.219139	139.1021	0.993092	0.248273	404.5012	1097.496	6.588728	1.580083	9.38268	0.233258	1.006956	41.93259	1.879045	0.112656	418.7659	12.64066	0.946058	0.002577	51.98415	
222670 s at	MAFB	0.233258	1.006956	41.93259	1.879045	0.112656	418.7659	12.64066	0.946058	0.002577	51.98415	41.93259	183.5463	21027.65	855.13	50.91433	3615.551	10015.87	181.0193	58.48521	3821.703	
201605 x at	CNN2	41.93259	183.5463	21027.65	855.13	50.91433	3615.551	10015.87	181.0193	58.48521	3821.703	0.094732	0.496546	4.69134	0.07911	0.000905	1.580083	0.550953	0.628507	0.001236	0.479632	
213146 at	JMJD3	0.094732	0.496546	4.69134	0.07911	0.000905	1.580083	0.550953	0.628507	0.001236	0.479632	0.094732	3.680751	85.03589	19.02731	0.543367	16.22335	202.2506	3.160165	0.008373	942.2722	
201603 at	PPP1R12A	0.094732	3.680751	85.03589	19.02731	0.543367	16.22335	202.2506	3.160165	0.008373	942.2722	1.918528	8.815241	699.4126	34.5353	0.959264	2957.167	94.35323	60.54769	7.110741	3929.146	
209953 s at	CDC37	1.918528	8.815241	699.4126	34.5353	0.959264	2957.167	94.35323	60.54769	7.110741	3929.146	0.094732	11.87619	1663.493	45.25483	11.08088	9026.807	10297.45	47.50475	9.063071	2179.83	
201245 s at	OTUB1	0.094732	11.87619	1663.493	45.25483	11.08088	9026.807	10297.45	47.50475	9.063071	2179.83	0.882703	58.08123	1478.583	12.295	0.132127	6472.018	1937.526	50.56264	0.314253	2836.704	
208073 x at	TTC3	0.882703	58.08123	1478.583	12.295	0.132127	6472.018	1937.526	50.56264	0.314253	2836.704	0.094732	0.188156	3.317278	0.986233	0.016402	7.568461	0.550953	0.346277	0.001236	1.049717	
200958 s at	SDCBP	0.094732	0.188156	3.317278	0.986233	0.016402	7.568461	0.550953	0.346277	0.001236	1.049717	0.094732	0.239816	34.5353	2.602684	0.011203	1	37.01402	1.22264	0.001236	0.479632	
205051 s at	KIT	0.094732	0.239816	34.5353	2.602684	0.011203	1	37.01402	1.22264	0.001236	0.479632	13124.73	4299.64	205674	11346.82	584.071	736333.6	137588.5	7967.989	600.4915	269513.9	
200819 s at	RPS15	13124.73	4299.64	205674	11346.82	584.071	736333.6	137588.5	7967.989	600.4915	269513.9											

【 0 1 4 6 】

(非 1 5)

10

20

30

40

	悪性黒子	日光黒子	(悪性黒子) /(日光黒子) 変化倍率	説明
遺伝子	平均発現	平均発現		
200961_at	455.88	223.03	2.04	selenophosphate synthetase 2
200782_at	379.88	70.68	5.37	annexin A5
206427_s_at	1899.38	165.82	11.45	melan-A
217998_at	416.81	99.94	4.17	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
226602_s_at	117.73	209.24	0.56	breakpoint cluster region; similar to breakpoint cluster region isoform 1
240366_at	70.62	6.65	10.62	Lipoma HMGIC fusion partner-like 3
208325_s_at	760.50	1233.35	0.62	A kinase (PRKA) anchor protein 13
225202_at	196.73	24.59	8.00	Rho-related BTB domain containing 3
225946_at	46.81	5.74	8.16	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 8
1553603_s_at	37.15	61.18	0.61	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 2
220625_s_at	125.23	75.62	1.66	E74-like factor 5 (ets domain transcription factor)
229982_at	28.00	20.79	1.35	hypothetical protein FLJ21924
1552283_s_at	17.50	35.56	0.49	zinc finger, DHHC-type containing 11
200723_s_at	203.23	113.68	1.79	membrane component, chromosome 11, surface marker 1
209174_s_at	57.35	106.44	0.54	FLJ20259 protein
233599_at	244.31	403.97	0.60	Chromosome 9 open reading frame 3
201739_at	4791.23	2597.32	1.84	serum/glucocorticoid regulated kinase
209392_at	403.54	12.79	31.54	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)
209487_at	185.54	46.44	4.00	RNA binding protein with multiple splicing
221653_x_at	882.08	458.24	1.92	apolipoprotein L, 2
209185_s_at	349.73	118.85	2.94	insulin receptor substrate 2
222809_x_at	227.73	336.12	0.68	chromosome 14 open reading frame 65
223363_at	150.69	280.06	0.54	hypothetical protein MGC10911
208456_s_at	56.19	122.65	0.46	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2
221449_s_at	69.81	41.09	1.70	T-cell immunomodulatory protein ; T-cell immunomodulatory protein
215268_at	24.12	46.74	0.52	KIAA0754 protein
217188_s_at	146.88	397.50	0.37	chromosome 14 open reading frame 1
236972_at	302.00	27.09	11.15	tripartite motif-containing 63

10

20

30

40

50

	日光黒子	日光黒子	日光黒子	日光黒子	日光黒子	日光黒子	日光黒子	日光黒子	日光黒子	日光黒子	日光黒子	日光黒子	日光黒子	日光黒子	日光黒子	日光黒子	日光黒子	日光黒子	日光黒子	日光黒子
	DF643-S	DT024-S	DT055-S	DT069-S	DT079-S	DT123-S	DT146-S	DT187-S	DT306-S	DT365-S	DT367-S	DT368-S								
遺伝子	223	149	159	8	113	202	2155	152	177	56	76	180								
200961 at	17	79	6	84	136	8	5	95	65	34	29	11								
200782 at	9	444	5	13	29	7	11	500	672	5	6	20								
206427 s at	15	178	8	104	181	64	6	62	31	205	42	16								
217998 at	286	212	327	97	368	456	57	84	154	301	50	24								
226602 s at	6	6	6	7	6	6	6	6	6	6	6	6								
240366 at	1565	923	877	30	973	1508	1981	1326	1289	863	354	3194								
208325 s at	49	40	8	9	21	101	8	47	22	12	31	8								
225202 at	5	6	5	6	6	5	5	5	9	5	5	6								
225946 at	54	72	76	21	84	84	44	71	80	71	100	168								
1553603 s at	118	5	6	5	5	14	865	17	5	5	6	6								
220625 s at	8	8	13	8	33	6	16	18	22	13	13	18								
229982 at	10	23	9	11	12	9	13	155	122	10	13	67								
1552283 s at	32	21	21	7	179	50	220	171	93	92	17	83								
200723 s at	172	38	48	85	256	115	110	147	109	141	27	96								
209174 s at	594	125	489	243	695	36	931	591	623	1648	346	1044								
233599 at	3963	4104	8062	2767	2729	2760	378	2524	1236	3566	2237	785								
201739 at	8	8	7	10	10	7	7	35	14	7	9	7								
209392 at	39	139	6	7	84	12	201	44	8	19	6	6								
209487 at	330	198	139	243	341	331	301	382	511	137	564	306								
221653 x at	53	83	133	7	201	137	170	91	84	78	32	86								
209185 s at	323	478	622	65	190	729	938	438	211	284	180	249								
222809 x at	196	291	109	85	163	290	331	165	279	161	145	234								
223363 at	43	211	509	472	81	24	298	32	69	19	75	231								
208456 s at	121	78	31	6	39	10	46	74	56	60	6	31								
221449 s at	36	19	18	8	102	119	104	133	24	14	108	27								
215268 at	692	225	228	11	480	1467	195	178	306	423	29	189								
217188 s at	6	34	6	17	5	6	6	6	6	6	7	6								
236972 at																				

10

20

30

40

【 0 1 4 9 】

(表 1 8)

	悪性黒子 DF569- LM	悪性黒子 DF557- LM	悪性黒子 DF579- LM	悪性黒子 DF580- LM	悪性黒子 DF582- LM	悪性黒子 DF596- LM	悪性黒子 DF623- LM	悪性黒子 DF624- LM	悪性黒子 DF625- LM	悪性黒子 DF626- LM	悪性黒子 DF627- LM
遺伝子											
200961 at	847	567	158	531	234	359	357	330	347	518	1667
200782 at	154	500	157	193	764	1310	331	27	157	161	16
206427 s at	1833	2805	95	1327	2219	6320	3253	49	274	193	121
217998 at	185	1245	726	88	907	773	789	182	340	114	10
226602 s at	49	47	59	51	71	36	50	51	137	91	579
240366 at	139	251	6	43	122	35	15	6	12	25	6
208325 s at	20	1362	725	408	882	430	568	1583	1867	1460	699
225202 at	25	16	44	312	237	1183	170	33	26	83	8
225946 at	48	57	9	76	12	7	35	5	5	6	28
1553603 s at	8	21	43	67	45	21	37	38	50	23	10
220625 s at	5	5	5	288	29	5	132	154	126	206	1427
229982 at	8	8	19	8	28	21	13	44	35	28	93
1552283 s at	11	14	12	16	5	13	68	10	35	13	13
200723 s at	159	480	276	85	369	112	349	90	319	242	134
209174 s at	135	24	48	68	87	130	40	58	85	110	60
233599 at	158	60	524	126	283	385	298	183	228	276	165
201739 at	6073	10285	3008	5935	4757	3159	3792	3462	3128	2916	826
209392 at	772	235	14	1088	210	243	912	9	8	8	7
209487 at	291	148	21	315	280	1146	521	31	16	71	61
221653 x at	433	203	613	743	1224	5336	983	425	227	141	43
209185 s at	1935	1458	124	482	85	535	182	98	169	308	154
222809 x at	33	32	55	45	161	31	36	437	163	170	1483
223363 at	161	136	139	92	156	129	114	241	122	147	105
208456 s at	20	27	27	21	49	57	8	33	39	210	46
221449 s at	7	7	28	54	30	50	199	185	57	24	156
215268 at	9	11	157	41	17	11	42	11	27	9	9
217188 s at	8	8	94	11	148	39	8	1146	455	62	107
236972 at	1318	1977	6	137	77	247	51	8	31	6	13

【 0 1 5 1 】
 (排 2 0)

	悪性黒子	悪性黒子	悪性黒子	悪性黒子	悪性黒子	悪性黒子	悪性黒子	悪性黒子	悪性黒子	悪性黒子	悪性黒子	悪性黒子	悪性黒子	悪性黒子	悪性黒子	悪性黒子	悪性黒子	悪性黒子	悪性黒子	
	DF629- LM	DF630- LM	DF631- LM	DF632- LM	DT017- LM	DT266- LM	DT268- LM	DT269- LM	DT270- LM	DT331- LM	DT355- LM	DT423- LM								
遺伝子																				
200961 at	350	139	465	196	510	439	435	383	744	306	398	420								
200782 at	291	156	265	8	551	52	255	33	825	469	1914	308								
206427 s at	2834	317	1121	5	4173	290	1952	181	3873	3913	9382	990								
217998 at	307	241	427	38	521	285	328	48	1470	344	879	184								
226602 s at	114	46	230	74	48	184	81	280	13	46	30	107								
240366 at	6	6	6	6	6	43	8	8	115	262	642	47								
208325 s at	529	101	448	1404	956	506	782	632	608	2658	396	642								
225202 at	139	152	36	66	143	121	83	46	1987	65	23	31								
225946 at	6	6	81	6	28	14	32	9	415	46	202	67								
1553603 s at	34	40	21	32	52	13	37	37	22	56	11	37								
220625 s at	5	6	69	95	11	23	33	90	5	6	6	239								
229982 at	36	14	56	47	29	13	21	13	12	13	12	12								
1552283 s at	13	12	10	10	16	10	13	9	38	26	34	13								
200723 s at	321	300	70	118	138	68	21	54	80	97	67	113								
209174 s at	84	52	12	40	38	26	84	70	28	47	63	29								
233599 at	296	32	96	80	1338	115	314	86	131	497	62	235								
201739 at	2421	3869	4568	3885	2679	4995	4927	4514	12929	5385	9033	5005								
209392 at	273	223	464	11	656	26	498	7	1581	287	2683	238								
209487 at	101	6	338	6	661	19	36	6	366	33	243	90								
221653 x at	626	873	983	336	1599	265	780	493	516	1548	1540	437								
209185 s at	389	115	164	214	105	201	102	255	1272	161	139	160								
222809 x at	166	105	461	83	125	527	435	453	22	186	56	322								
223363 at	314	122	132	90	191	105	206	373	167	113	167	104								
208456 s at	17	26	122	27	44	203	61	36	71	22	27	196								
221449 s at	36	171	107	142	39	74	48	83	11	10	40	162								
215268 at	11	7	9	9	43	11	24	16	8	11	11	98								
217188 s at	175	638	24	79	138	166	95	50	8	144	25	84								
236972 at	33	34	328	7	365	41	51	9	1766	698	421	200								

【 0 1 5 2 】

(表 2 1)

	悪性黒子	悪性黒子	悪性黒子
遺伝子	DT425-LM	DT461-LM	DF523-LM
200961 at	798	348	7
200782 at	150	328	502
206427 s at	177	778	909
217998 at	38	233	135
226602 s at	492	49	46
240366 at	6	9	6
208325 s at	20	38	49
225202 at	68	9	9
225946 at	5	6	6
1553603 s at	168	21	22
220625 s at	204	6	76
229982 at	58	62	25
1552283 s at	13	18	10
200723 s at	863	24	335
209174 s at	49	12	12
233599 at	93	53	238
201739 at	2997	4238	5786
209392 at	20	9	10
209487 at	6	6	6
221653 x at	750	1089	728
209185 s at	273	7	6
222809 x at	111	35	188
223363 at	107	83	102
208456 s at	22	10	40
221449 s at	22	22	51
215268 at	6	6	13
217188 s at	38	6	63
236972 at	8	7	13

10

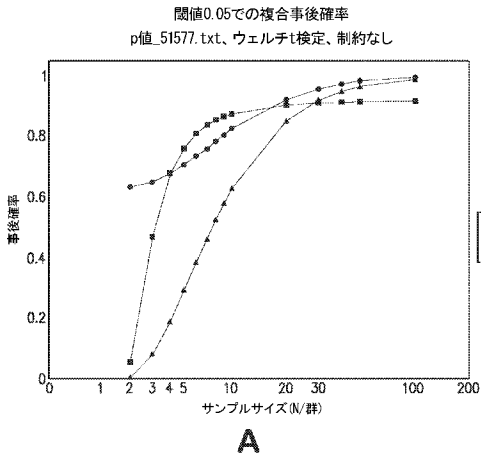
20

30

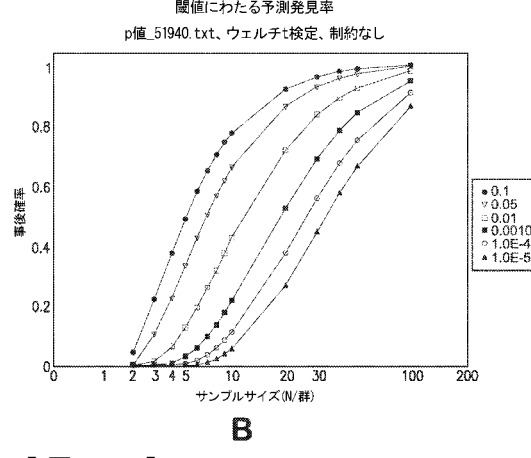
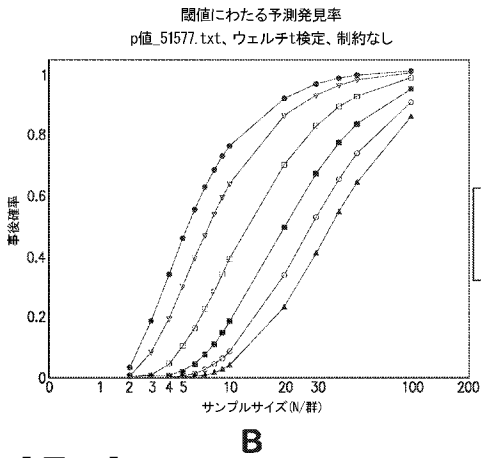
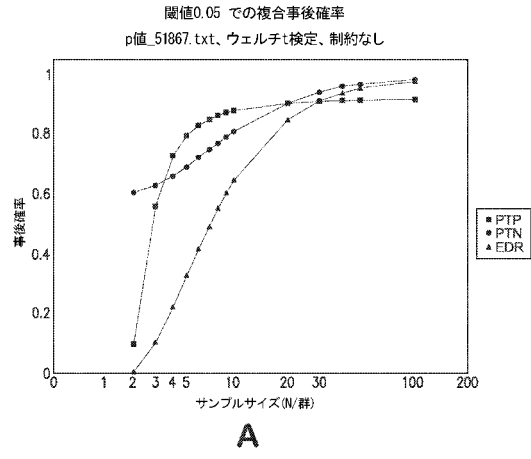
【 0 1 5 3 】

本発明を上記の実施例を参照して説明してきたが、修正および変更が本発明の精神および範囲の範囲内に包含されることが理解されよう。したがって、本発明は以下の特許請求の範囲によってのみ制限される。

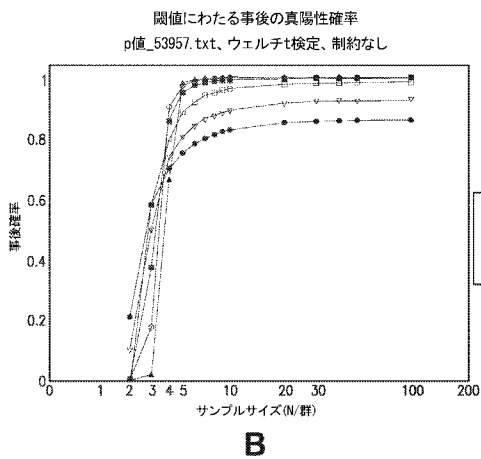
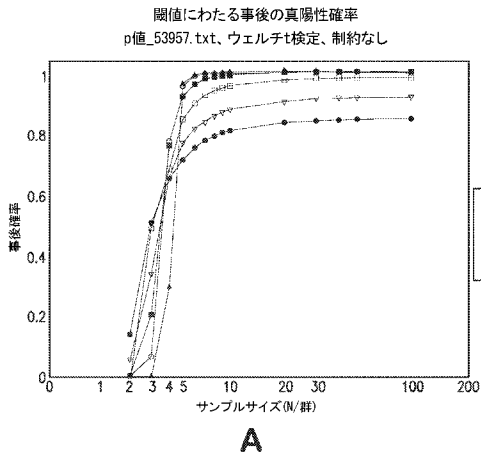
【 図 1 】



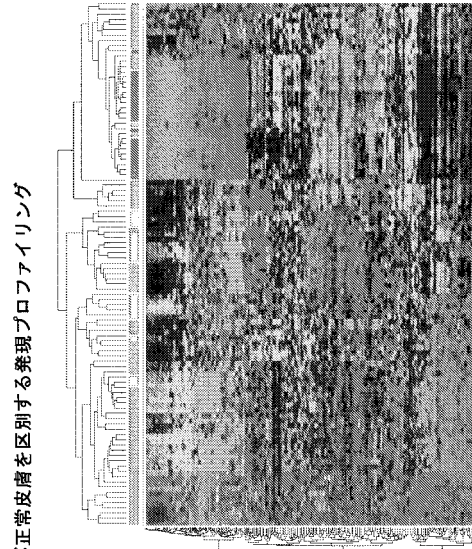
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 A 】



黒色腫と異型母斑および正常皮膚を区別する発現プロファイリング

標本のH133 Plus 2.0 GeneChipアッセイ

- GCRMA正規化
- バックグラウンド減算: 50
- 黒色腫と母斑の間のt検定 (p<0.01)
- 多重検定補正
- Westfall & Young順列
- 偽発見率 (q=0.05)
- 差次的発現遺伝子317個の選択

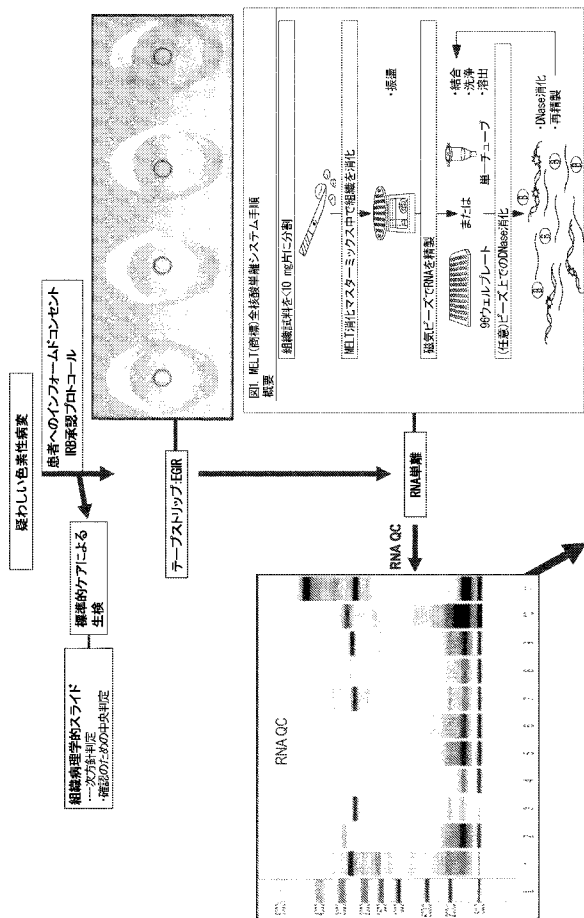
階層的クラスタリング解析

- アレイおよび遺伝子のlog2変換、中央平均化
- 完全連鎖測定資料によるクラスタターヒ
- 黒色腫 (N=20)
- 異型母斑 (N=62)
- 正常皮膚 (N=17)

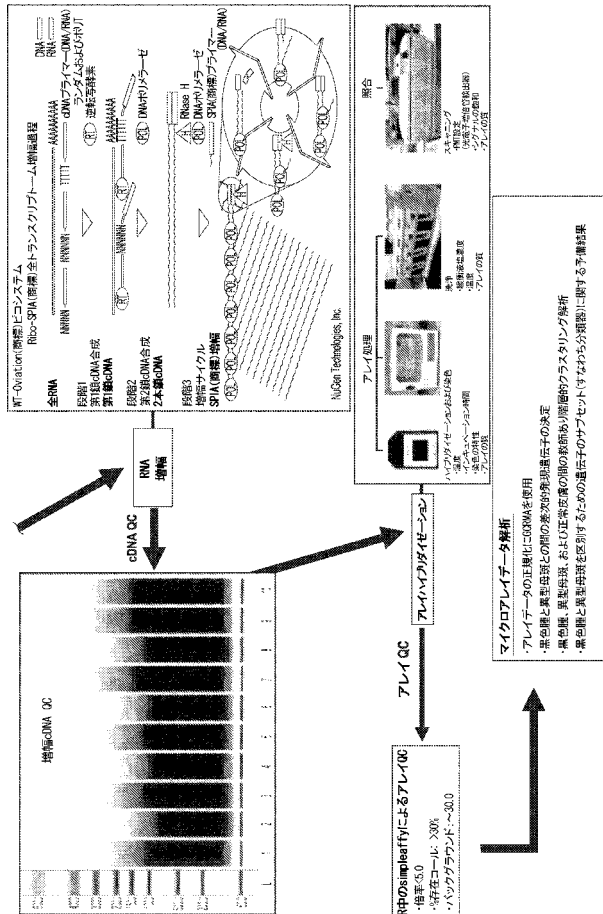
結果:

- 黒色腫は正常皮膚および異型母斑と区別された

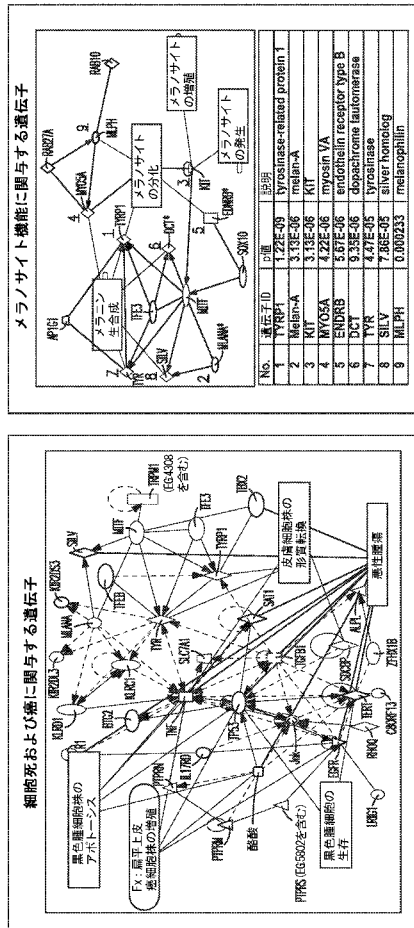
【 図 4 B - 1 】



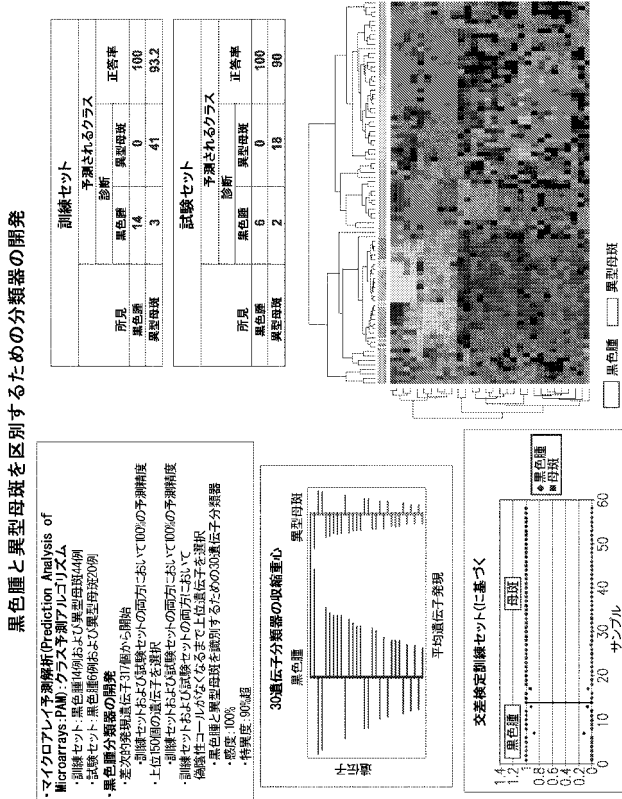
【 図 4 B - 2 】



【 図 4 C 】



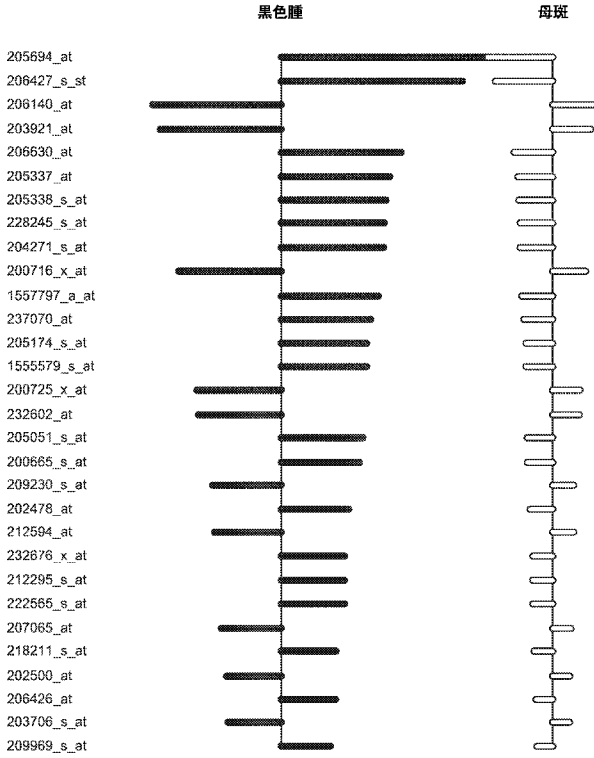
【 図 4 D 】



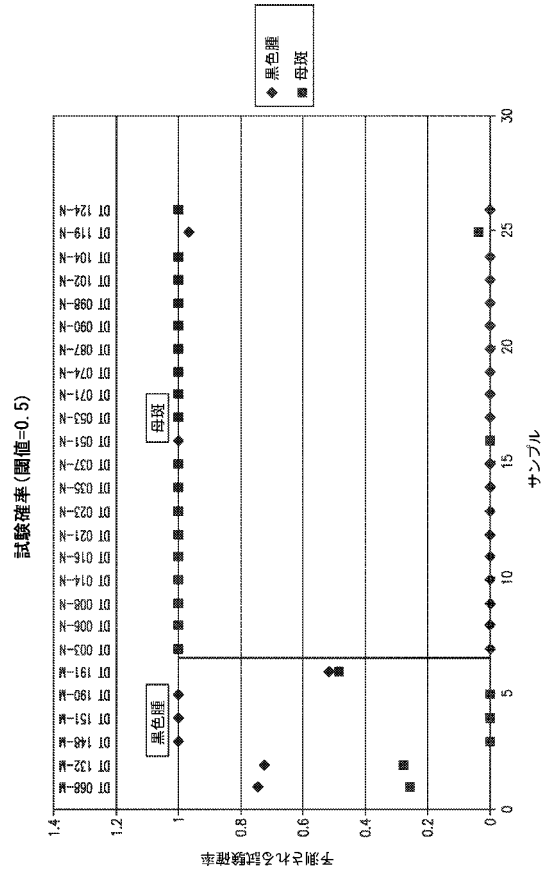
黒色腫と母斑との間で差次的に発現する遺伝子の生物学的機能

黒色腫と異型母斑を区別するための分類器の開発

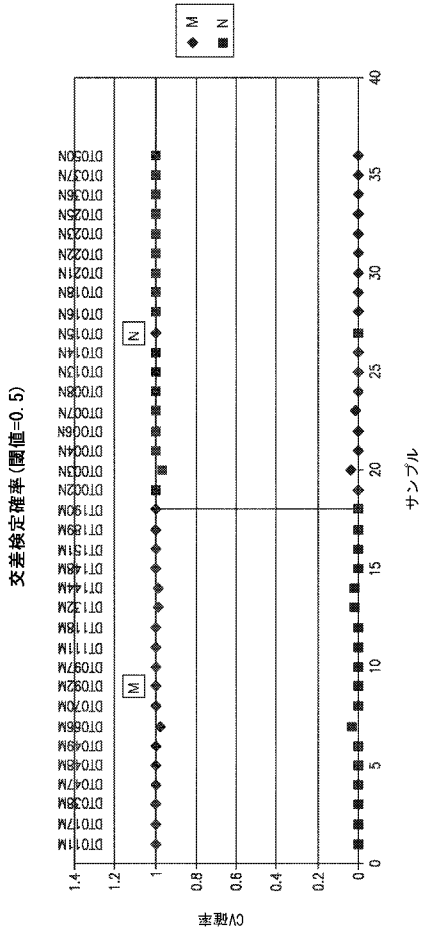
【 図 5 A 】



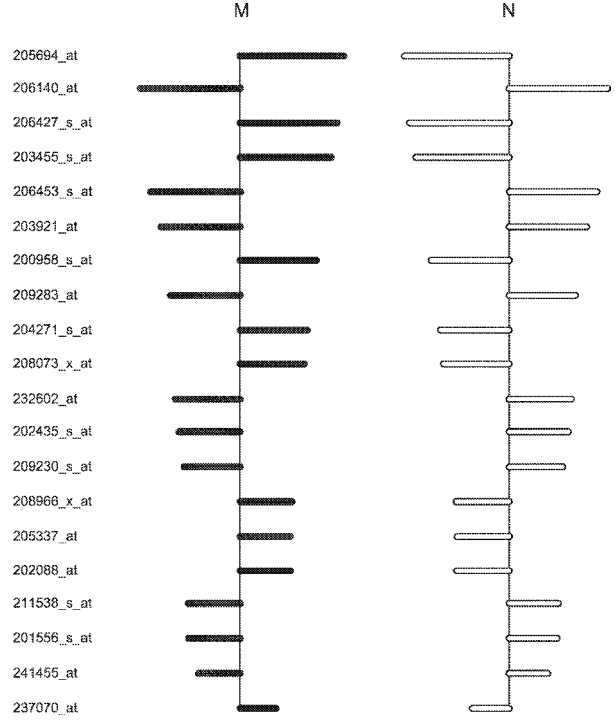
【 図 5 B 】



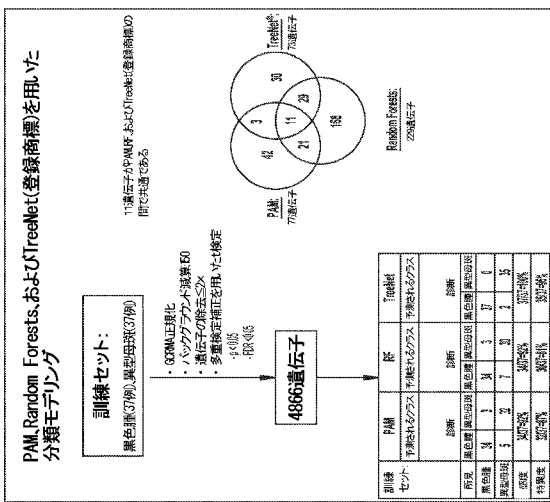
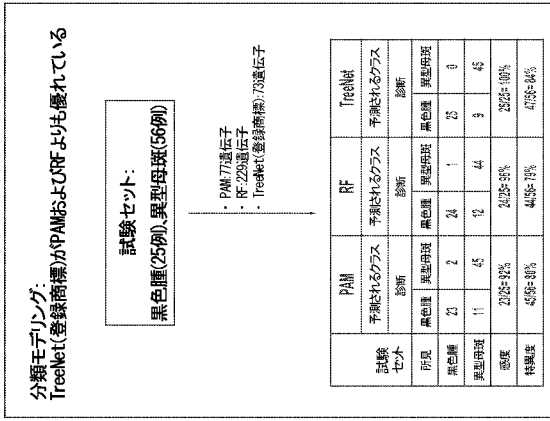
【 図 6 A 】



【 図 6 B 】



【図 10 - 3】



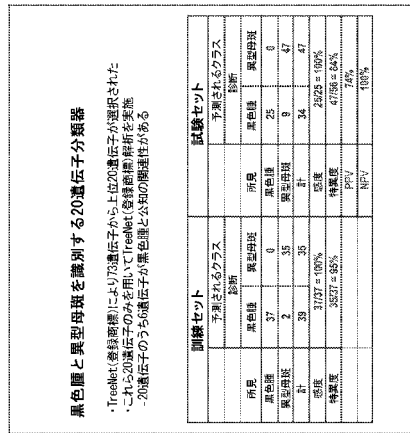
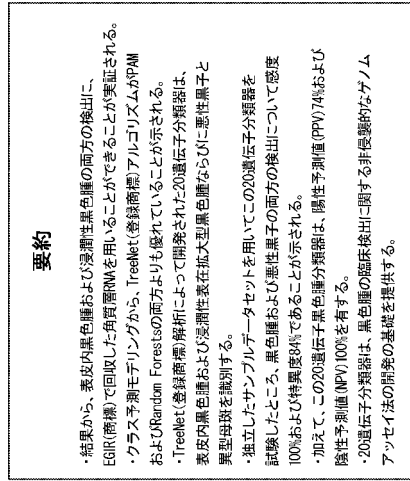
【図 11】

黒色腫と異型母斑を正確に識別する19遺伝子分類器の開発

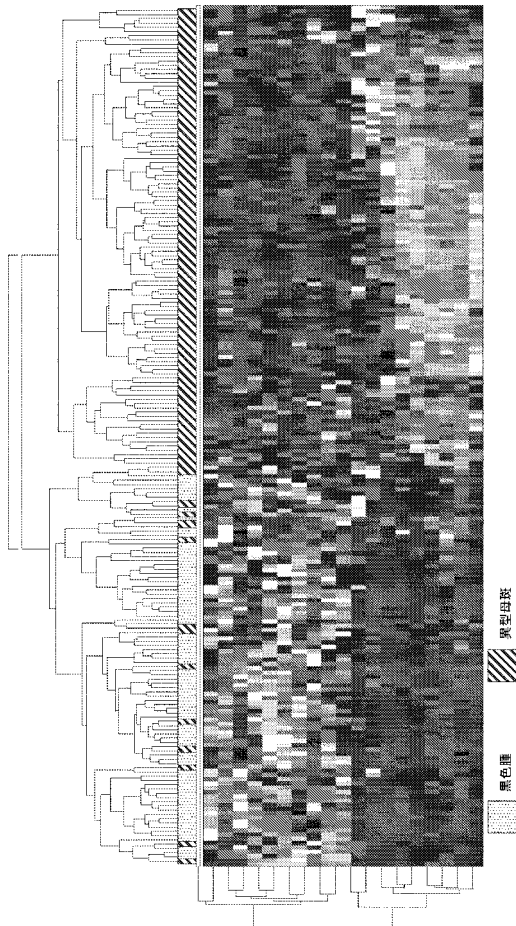
- GeneChipデータの教師あり解析
- 訓練セット: 黒色腫37例および異型母斑37例
 - 多重検定補正を用いた検定により、7,199個の差次的発現遺伝子が同定された($p < 0.05$; FDR < 0.05)
 - 差次的発現遺伝子のTreeNet解析により、19遺伝子分類器が同定された
 - 感度: 100%、特異度95%
- 試験セット: 黒色腫39例および異型母斑89例
 - PPV: 39/50=78%、NPV: 78/78=100%
 - 感度100%、特異度88%

	訓練セット		試験セット		
	予測されるクラス		予測されるクラス		
所見	黒色腫	異型母斑	所見	黒色腫	異型母斑
黒色腫	37	0	39	39	0
異型母斑	2	35	11	78	78
(計)	39	35	(計)	50	78

【図 10 - 4】

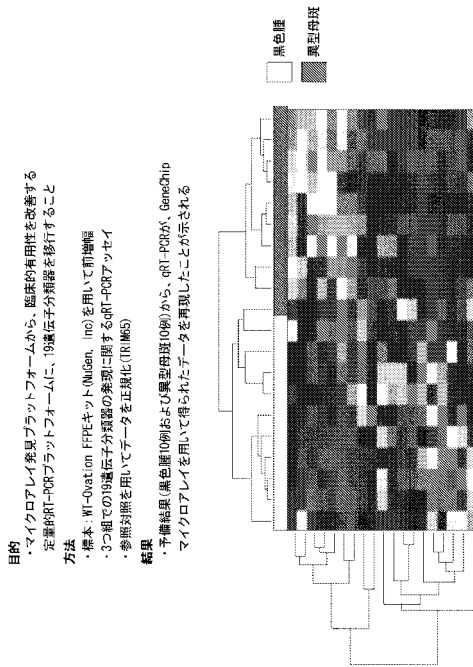


【図 12】



【 図 1 3 】

マイクロアレイからqRT-PCRプラットフォームへのアッセイの変換



目的
 ・マイクロアレイ発見プラットフォームから、臨床的有用性を改善する
 定量的qRT-PCRプラットフォームに、19遺伝子分類器を移行すること

方法
 ・標本: WT-Ovation FPKキット (Miden, Inc) を用いて前増幅
 ・3つ組での19遺伝子分類器の発現に関するqRT-PCRアッセイ
 ・参照対照を用いてデータを正規化 (RINMS)

結果
 ・予備結果: 黒色腫10例および黒型母斑(0例)から、qRT-PCRが、GeneChip
 マイクロアレイを用いて得られたデータを再現したことが示される

【 図 1 4 】

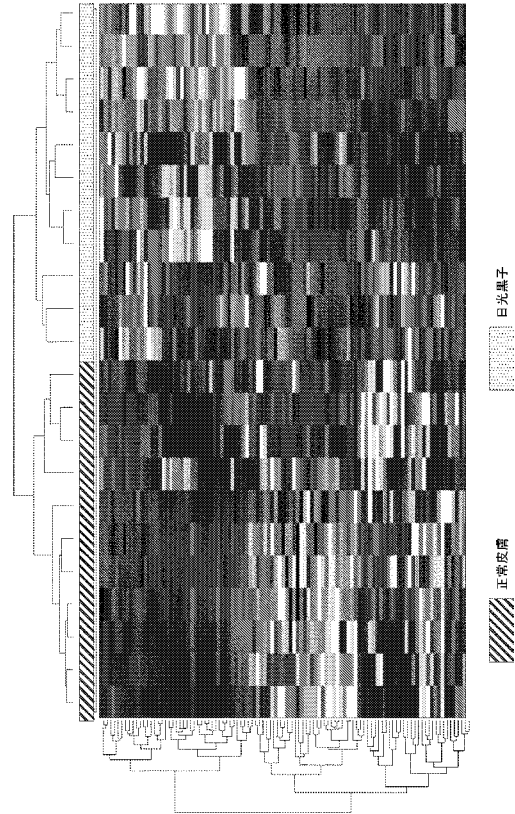
日光黒子と正常皮膚を区別するための多遺伝子分類器の発見

- ・訓練セット: 日光黒子8例および正常皮膚対照8例
 - ・差次的発現遺伝子1600個の選択
 - ・T検定、 $P < 0.05$
 - ・100遺伝子分類器の発見
- ・試験セット: 日光黒子3例および正常皮膚対照3例
 - ・感度: 100%
 - ・特異度: 100%

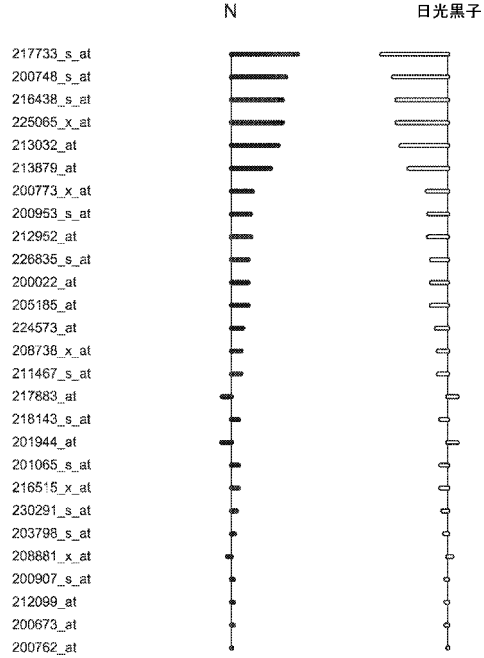
所見	訓練セット		試験セット	
	予測されるクラス		予測されるクラス	
	診断		診断	
	日光黒子	正常皮膚	日光黒子	正常皮膚
日光黒子	8	0	3	0
正常皮膚	0	8	0	3
計	8	8	3	3

【 図 1 5 】

100遺伝子分類器のクラスター解析

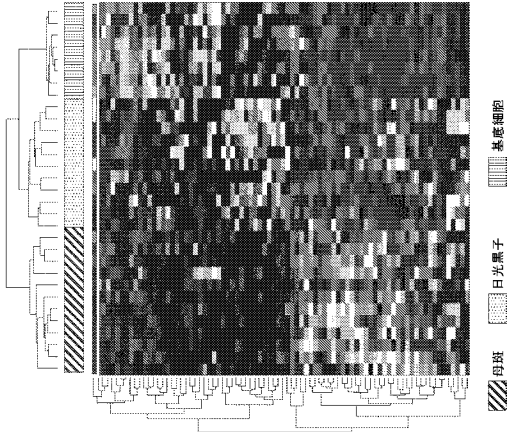


【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

遺伝子発現プロファイル：日光黒子は異型母斑および基底細胞癌と区別される



GeneChipデータ解析：

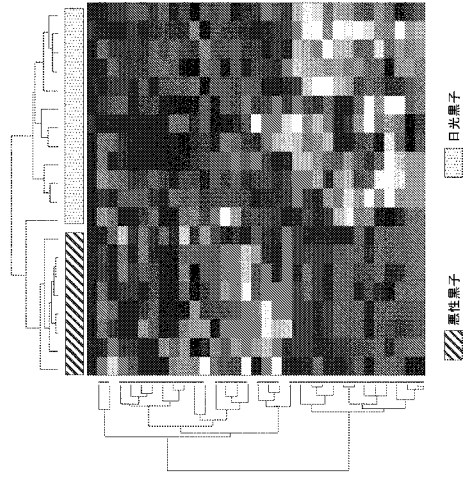
- GCRMA正規化
- バックグラウンド減算：100
- 日光黒子、異型母斑、および基底細胞癌の間のANOVA ($p < 0.05$)
- 多重検定補正
 - Benjamini and Hochberg
 - 偽発見率 ($q < 0.05$)
- 差次的発現遺伝子82個の選択
 - 階層的クラスタリング解析
 - 日光黒子 (N=11)
 - 異型母斑 (N=12)
 - 基底細胞癌 (N=8)

結論：

- 日光黒子は異型母斑および基底細胞癌と区別される

【 図 1 8 】

遺伝子発現プロファイル：日光黒子は悪性黒子と区別される



GeneChipデータ解析：

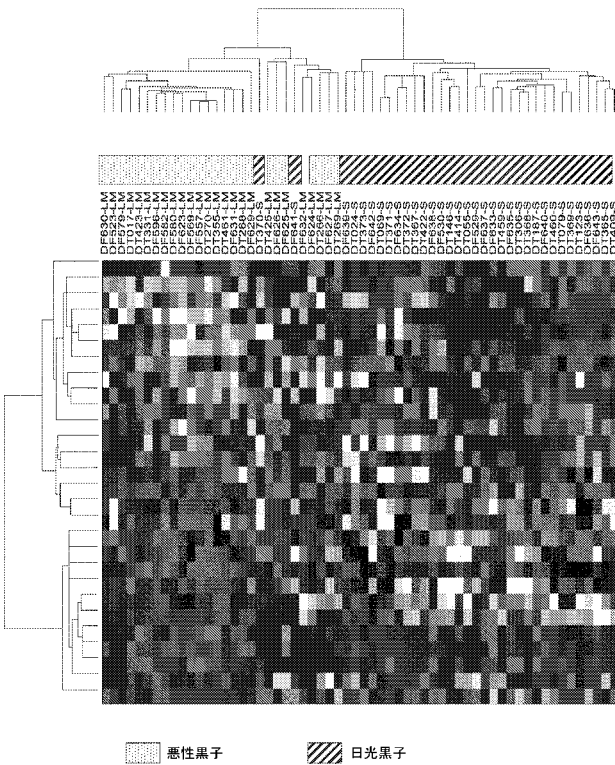
- GCRMA正規化
- バックグラウンド減算：100
- 日光黒子と悪性黒子の間のt検定 ($p < 0.01$)
- 多重検定補正
 - Benjamini and Hochberg
 - 偽発見率 ($q < 0.05$)
- 差次的発現遺伝子32個の選択
 - 階層的クラスタリング解析
 - 日光黒子 (N=11)
 - 悪性黒子 (N=7)

結論：

- 日光黒子は悪性黒子と区別される

【 図 1 9 】

日光黒子と悪性黒子を区別する28遺伝子分類器



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 09/44035
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) IPC(8) - C12Q 1/68 (2009.01) USPC - 435/6 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched 702/20 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST - DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; PLUR=YES; OP=ADJ; Google scholar Search terms: diagnos\$, marker, biomarker, endothelin receptor type B, EDNRB, ubiquitin aldehyde binding, OTUB1, melanom\$, skin, lentigo, lentigna, liver spot, age spot, sunspot, sun spot, lesion, mole, malignant, malignancy, epidermus, epidermal, melanocy		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	US 2003/0152923 A1 (YAKHINI et al.) 14 August 2003 (14.08.2003) para [0004]; para [0005]; para [0008]; para [0009]; para [0013]; para [0017]; para [0018]; para [0020]; para [0021]; para [0031]; para [0038]; para [0039]; para [0060]; para [0054]; para [0070]; para [0072]; para [0084]; para [0085]; para [0105].	1-5, 7-10, 16, 17, 19-22, 24-28, 32, 40, 49, 56-60, 82, 77, 78, 80, 81, 98, 99 6, 11-15, 18, 23, 27-31, 50-57, 61, 79
Y	2007/0281314 A1 (BENSON N.) 06 December 2007 (06.12.2007) para [0008]; para [0010]; para [0011]; para [0014]; para [0035]; para [0045]; para [0051].	6, 11-15, 23, 27-31, 51-57, 61
Y	US 2006/0040335 A1 (BUTT et al.) 23 February 2006 (23.02.2006) para [0040]; para [0041]; para [0046]; para [0048]; para [0070].	18, 50, 79
<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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 August 2009 (19.08.2009)		Date of mailing of the international search report 09 SEP 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 PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/44035

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

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

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
 Group I+: Claims 1-99 are drawn to methods for characterizing a skin lesions and kits there for, where the first named invention will be searched for free and includes the first named marker of table 8 - endothelin receptor type B (first named invention includes claims 1 -32, 40, 49-62, 77-81, 98, and 99). Applicant may have additional markers searched for an additional search fee per marker.
 The inventions listed above 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.
 The technical feature that links the inventions of Group I+ is a method for characterizing a skin lesions, such as a method of diagnosing a skin cancer or method of distinguishing between cancer and non-cancer skin conditions by detecting skin markers. However, this does not represent an improvement over the prior art US 2003/0108896 A1 to Vogt which teaches detecting skin markers for the diagnosis of skin cancer (abstract) including methods of distinguishing between benign nevi and melanoma (para [0032]).

Accordingly, unity of invention is lacking under PCT Rule 13.2 because the groups do not share a same or corresponding

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
in addition to the first gene of table 8 (endothelin receptor type B), Applicant paid additional fees for the sixth of table 6 (OTU domain). Accordingly, the international search report covers 1-32, 40, 49-62, 77-81, 98, and 99, limited to endothelin receptor type B or OTU domain
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

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, MK, 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, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 チャン シャーマン エイチ .

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンディエゴ ラムズデル コート 1 1 7 2 4

Fターム(参考) 4B024 AA12 CA04 CA09 HA14

4B063 QA01 QA07 QA19 QQ02 QQ52 QR35 QR40 QR55 QR62 QR72

QS25 QS34 QX02

专利名称(译)	核酸分析中黑素瘤和日光的诊断方法		
公开(公告)号	JP2011520451A	公开(公告)日	2011-07-21
申请号	JP2011509722	申请日	2009-05-14
申请(专利权)人(译)	真皮科技国际		
[标]发明人	チャンシャーマンエイチ		
发明人	チャン シャーマン エイチ.		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N37/00 G01N33/53 G01N33/574 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/158 C12Q2600/178 G16B35/00 G16C20/60 C12Q1/68 C12Q2600/16		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N37/00.102 G01N33/53.M G01N33/574.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA07 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ52 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/127731 2008-05-14 US 61/053988 2008-05-16 US 61/058149 2008-06-02 US		
其他公开文献	JP2011520451A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了通过分析从受试者获得的核酸分子来诊断受试者中的黑素瘤的方法。本发明还提供了用于区分黑素瘤与发育不良痣和/或正常色素沉着皮肤的方法。该方法包括分析一种或多种皮肤标记物的表皮样品中的表达。该方法可包括使用微阵列分析来自样品的基因或蛋白质谱。

7x1解析に基づいた結果	差別的に発現しない	真に差別的に発現する
有意でない遺伝子	A	B
有意な遺伝子	C	D