

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-105876

(P2018-105876A)

(43) 公開日 平成30年7月5日(2018.7.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	4 B 0 6 3
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 B	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/536 C	
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	GO 1 N 33/53 Y	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	

審査請求 有 請求項の数 17 O L 外国語出願 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-19195 (P2018-19195)
 (22) 出願日 平成30年2月6日 (2018.2.6)
 (62) 分割の表示 特願2015-536020 (P2015-536020) の分割
 原出願日 平成25年10月14日 (2013.10.14)
 (31) 優先権主張番号 12007128.7
 (32) 優先日 平成24年10月12日 (2012.10.12)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 515098923
 ハイーシュテム ゲマインヌートツィヒェ
 ゲゼルシャフト ミット ベシュレンク
 テル ハフツング
 ドイツ連邦共和国, 69120 ハイデル
 ベルク, イム ノイエンハイマー フェル
 ト 280, イム ドイチェン クレプス
 フォルシュンツェントルム デーカーエフ
 ツェット
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100123582
 弁理士 三橋 真二
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膵管腺癌のサブタイピングのための新規バイオマーカー

(57) 【要約】

【課題】膵管腺癌 (PDAC) のサブタイプの同定及び層別化のための新規手法の提供。

【解決手段】腫瘍試料におけるPDAC細胞のサブタイプ特異的検出のためのインビトロの方法であって、サブタイプ特異的マーカーの発現を、タンパク質又はかかるタンパク質をコードするオリゴヌクレオチドのいずれかとして検出するステップによって特徴づけられ、ここで、ケラチン81は、間葉系様サブタイプのPDAC細胞のためのマーカーであり、HNF-1Aは、外分泌様サブタイプの細胞のためのマーカーであり、そして古典的サブタイプのPDAC細胞は、ケラチン81及びHNF-1Aの欠如によって特徴づけられる、前記方法。

【選択図】 図1

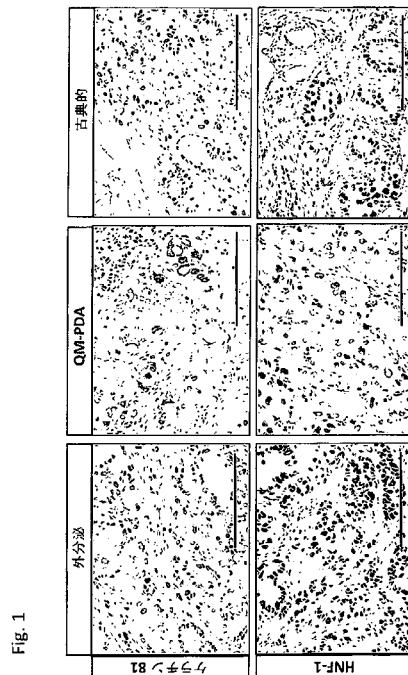


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腫瘍試料における P D A C 細胞のサブタイプ特異的検出のためのインビトロの方法であって、サブタイプ特異的マーカーの発現を、タンパク質又はかかるタンパク質をコードするオリゴヌクレオチドのいずれかとして検出するステップによって特徴づけられ、ここで、ケラチン 8 1 及びビメンチンは、間葉系様サブタイプの P D A C 細胞のためのマーカーとして検出され、

(i) H N F - 1 A、H N F - 1 B、F O X A 2 (H N F 3 B)、F O X A 3 (H N F 3 G)、H N F 4 G、及び O N E C U T 1 (H N F 6) から選択される 1 又は 2 以上の転写因子、(ii) H N F - 1 A によって制御される 1 又は 2 以上の標的遺伝子、特に表 2 に列挙されている 1 又は 2 以上の H N F - 1 A 標的遺伝子、及び(iii) カドヘリン 1 7 (C D H 1 7) は、外分泌様サブタイプの細胞のためのマーカーとして検出され、そして古典的サブタイプの P D A C 細胞は、(i) ケラチン 8 1 及び / 又はビメンチン、並びに(i) H N F - 1 A 及び / 又は H N F - 1 B の欠如によって特徴づけられる、前記方法。

10

【請求項 2】

腫瘍試料における P D A C 細胞のサブタイプ特異的検出のためのインビトロの方法であって、サブタイプ特異的マーカーの発現を、タンパク質又はかかるタンパク質をコードするオリゴヌクレオチドのいずれかとして検出するステップによって特徴づけられ、ここで、ケラチン 8 1 は、間葉系様サブタイプの P D A C 細胞のためのマーカーであり、(i) H N F - 1 A は、外分泌様サブタイプの細胞のためのマーカーであり、そして古典的サブタイプの P D A C 細胞は、ケラチン 8 1 及び H N F - 1 A の欠如によって特徴づけられる、前記方法。

20

【請求項 3】

古典的サブタイプの P D A C が、(i) H N F - 1 A、H N F - 1 B、F O X A 2 (H N F 3 B)、F O X A 3 (H N F 3 G)、H N F 4 G、及び O N E C U T 1 (H N F 6) から選択される転写因子、(ii) H N F - 1 A によって制御される 1 又は 2 以上の標的遺伝子、特に表 2 に列挙されている 1 又は 2 以上の H N F - 1 A 標的遺伝子、及び(iii) カドヘリン 1 7 (C D H 1 7) から選択される 1 又は 2 以上の追加のバイオマーカーの特異的発現の欠如を決定することによって同定される、請求項 1 又は 2 に記載のインビトロの方法。

30

【請求項 4】

前記検出が、前記サブタイプ特異的マーカーの 1 つのエピトープへの検出抗体の結合に基づく、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のインビトロの方法。

【請求項 5】

以下のステップ：

(a) 前記サブタイプ特異的マーカーの 1 つに特異的な検出抗体が前記エピトープと結合できる条件下にて、前記試料を前記検出抗体と接触させ；
 (b) 過剰の検出抗体分子を除去し；そして
 (c) 前記試料中で結合した検出抗体を検出すること
 を含む、請求項 4 に記載のインビトロの方法。

40

【請求項 6】

前記検出抗体は、モノクローナル抗体；ポリクローナル抗体；組み換えによって産生されたキメラ抗体又はヒト化抗体を含む、組み換えによって産生された抗体；完全合成抗体；又は、前記抗体の 1 つの機能的断片である、請求項 4 又は 5 に記載のインビトロの方法。

【請求項 7】

検出抗体の結合は、第二抗体との、特に標識化された第二抗体とのインキュベーションによって検出される、請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のインビトロの方法。

【請求項 8】

前記第二抗体は、マーカー分子で標識化される、請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の

50

インビトロの方法。

【請求項 9】

前記第二抗体は、蛍光染料、生物学的に活性な酵素標識、放射活性標識、核磁気共鳴に活性な標識、発光性標識又は発色団による標識を用いて標識化される、請求項 8 に記載のインビトロの方法。

【請求項 10】

前記放射活性標識が、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{188}Rh 、 ^{131}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 及び ^{111}In からなる群から選択される、請求項 9 に記載のインビトロの方法。

【請求項 11】

抗体の結合が、免疫組織化学染色によって検出される、請求項 10 に記載のインビトロの方法。

10

【請求項 12】

前記検出が、前記サブタイプ特異的マーカーの 1 つをコードする mRNA を測定することに基づき、特に定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) によって前記 mRNA を測定することに基づく、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のインビトロの方法。

【請求項 13】

腫瘍試料における PDAC 細胞のサブタイプ特異的検出のためのインビトロの方法であって、遺伝子発現プロファイルにおける Src 阻害剤感受性特性を分析するステップによって特徴づけられ、特に、前記遺伝子発現プロファイルは、表 1 に示された 30 個の遺伝子セットに基づく、前記方法。

20

【請求項 14】

前記試料は膵臓組織を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のインビトロの方法。

【請求項 15】

前記試料は、哺乳類から得られ、特にヒトから得られる、請求項 14 に記載のインビトロの方法。

【請求項 16】

PDAC 細胞のサブタイプ特異的検出のためのキットであって、

(i) ケラチン 81、

30

(ii) ビメンチン、

(iii) HNF-1A、HNF-1B、FOXA2 (HNF3B)、FOXA3 (HNF3G)、HNF4G、及び ONECUT1 (HNF6) から選択される 1 又は 2 以上の転写因子、

(iv) HNF-1A によって制御される 1 又は 2 以上の標的遺伝子、特に表 2 に列挙されている 1 又は 2 以上の HNF-1A 標的遺伝子、及び

(v) カドヘリン 17 (CDH17)

のリストから選択される、PDAC サブタイプ特異的マーカーに特異的な、少なくとも 2 つの試薬を含み、ここで前記試薬は、検出抗体及びオリゴヌクレオチドプローブのリストから選択され、

40

そして場合により、前記試薬の少なくとも 1 つの検出のための、少なくとも 1 つの試薬をさらに含む、前記キット。

【請求項 17】

(i) ケラチン 81 及びビメンチンのリストから選択される間葉系様に特異的な、特にケラチン 81 である間葉系様に特異的な、少なくとも 1 つの試薬、並びに

(ii) HNF-1A 及び HNF-1B のリストから選択される外分泌様 PDAC サブタイプに特異的な、特に HNF-1A である外分泌様 PDAC サブタイプに特異的な、少なくとも 1 つの試薬

を含む、請求項 16 に記載のキット。

50

【請求項 18】

S r c 阻害剤感受性の P D A C 細胞をサブタイプ特異的に検出するためのキットであって、S r c 阻害剤感受性特性の同定のためのオリゴヌクレオチドプローブを含み、特に、表 1 に示された 30 個の遺伝子を示すオリゴヌクレオチドプローブを含む、前記キット。

【請求項 19】

P D A C を患う患者を治療コホートへと層別化する方法であって、以下のステップ：
 (a) (i) ケラチン 8 1、(ii) ビメンチン、(iii) H N F - 1 A、H N F - 1 B、F O X A 2 (H N F 3 B)、F O X A 3 (H N F 3 G)、H N F 4 G、及び O N E C U T 1 (H N F 6) から選択される 1 又は 2 以上の転写因子、(iv) 1 又は 2 以上の H N F - 1 A 標的遺伝子、特に表 2 に列挙されている 1 又は 2 以上の H N F - 1 A 標的遺伝子、及び / 又は、(v) カドヘリン 1 7 (C D H 1 7) の発現及び / 又は存在をインビトロで決定し；
 (b) 前記選択されたタンパク質の発現及び / 又は存在に基づいて、P D A C サブタイプを同定し；
 (c) P D A C 患者が患う P D A C サブタイプに基づいて、前記患者を薬剤治療コホートへと層別化すること
 を含む、前記方法。

10

【請求項 20】

P D A C を患う患者を治療コホートへと層別化する方法であって、以下のステップ：
 (a) 膵臓組織を含む患者試料の細胞中における S r c 阻害剤感受性特性の決定のために、インビトロでの遺伝子発現プロファイルを確立し；
 (b) 前記遺伝子発現プロファイルに基づいて、P D A C サブタイプを同定し；
 (c) P D A C 患者が患う P D A C サブタイプに基づいて、前記患者を薬剤治療コホートへと層別化すること
 を含む、前記方法。

20

【請求項 21】

P D A C を患う患者の予後を評価する方法であって、以下のステップ：
 (a) (i) ケラチン 8 1、(ii) ビメンチン、(iii) H N F - 1 A、H N F - 1 B、F O X A 2 (H N F 3 B)、F O X A 3 (H N F 3 G)、H N F 4 G、及び O N E C U T 1 (H N F 6) から選択される 1 又は 2 以上の転写因子、(iv) 1 又は 2 以上の H N F - 1 A 標的遺伝子、特に表 2 に列挙されている 1 又は 2 以上の H N F - 1 A 標的遺伝子、及び / 又は、(v) カドヘリン 1 7 (C D H 1 7) の発現及び / 又は存在をインビトロで決定し；
 (b) 前記選択されたタンパク質の発現及び / 又は存在に基づいて、P D A C サブタイプを同定し；
 (c) P D A C 患者が患う P D A C サブタイプに基づいて、前記患者を予後コホートへと層別化すること
 を含む、前記方法。

30

【請求項 22】

P D A C を患う患者の予後を評価する方法であって、以下のステップ：
 (a) 膵臓組織を含む患者試料の細胞中における S r c 阻害剤感受性特性の決定のために、インビトロでの遺伝子発現プロファイルを確立し；
 (b) 前記遺伝子発現プロファイルに基づいて、P D A C サブタイプを同定し；
 (c) P D A C 患者が患う P D A C サブタイプに基づいて、前記患者を予後コホートへと層別化すること
 を含む、前記方法。

40

【請求項 23】

前記発現レベルが、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (q R T - P C R) によって、m R N A レベルで決定される、請求項 19 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記発現レベルが、前記選択されたタンパク質への抗体の結合の検出に基づいて、タンパク質レベルで決定される、請求項 19 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 25】

前記細胞が、前記患者試料から癌細胞を精製することによって得られ、特に前記精製ステップは、流動選別又はレーザー捕獲顕微解剖を含む、請求項 19 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

前記患者試料は、腫瘍生検である、請求項 19 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記腫瘍生検は、微細針吸引によって得られる、請求項 26 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

発明の技術分野

本発明は、膵管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma) (PDAC) のサブタイプの同定及び層別化のための新規手法に関する。本発明は特に、新規の PDAC サブタイプ特異的マーカーに関し、そして前記マーカーを検出するための試薬を含む診断キットに関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

個別化腫瘍学は、将来癌患者が治療される方法に革命をもたらす可能性を秘めている。実体の異なる癌は、治療応答と臨床的転帰をしばしば決定するシグナル伝達の特異的活性化を含む分子的差異に基づいて、サブクラスに分割することができる。乳癌、肺癌および結腸癌を含む種々の癌について、そのようなサブタイプの同定やコホートへの患者の層別化は、既にサブタイプ特異的な方法で患者を治療するために臨床診療に応用されている。

20

【0003】

PDAC は最も頻度の高い膵臓癌であり、米国および欧州における癌による死亡の第 4 の原因である。ほとんどの患者は 12 ヶ月以内に死亡し、予後後 5 年間の生存はわずか 2 % である。2000 年のゲムシタピンと 2005 年のエルロチニブの承認以来、PDAC の治療においてほとんど進展がなかった。さらに、標的化療法を用いる最近の治験は、ほとんど又は全く利益を示していない。

30

【0004】

PDAC はいまだに単一の癌として分類され、臨床的にそのように扱われる。しかし、最近 3 つの PDAC サブタイプ (古典的 (classical) サブタイプ、間葉系様 (quasi-mesenchymal) サブタイプ、外分泌様 (exocrine-like) サブタイプ) の存在が示唆された (Collisson, E. A., Sadanandam, A., Olson, P., Gibb, W. J., Truitt, M., Gu, S. D., Cooc, J., Weinkle, J., Kim, G. E., Jakkula, L., et al. (2011). Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med* 17, 500-U140)。これらのサブタイプの同定は、患者の検体からの微小解剖された上皮細胞中の比較遺伝子発現分析に基づいていた。

40

【0005】

PDAC のサブタイプの存在は、治療剤に対する感受性に関するサブタイプ間の特異的な差異の可能性を提起する。PDAC の個別化治療手法の確立の成功は、PDAC 標品の特異的 PDAC サブタイプへの信頼性ある且つ正確な帰属を可能とする新規バイオマーカーに依存する。かかる新規サブタイプ特異的バイオマーカーは、PDAC の個別化治療のための迅速且つ信頼性のある患者の層別化のために有用である。患者の層別化に基づく改善された PDAC 治療手法に対する大きな必要性は、いまだに満たされていない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

発明の課題

50

したがって、本発明の課題は、PDACの、具体的には古典的サブタイプ、間葉系様サブタイプ及び外分泌様サブタイプの新規バイオマーカーを提供することである。それは、PDAC標品の特異的PDACサブタイプへの信頼性ある且つ正確な帰属を可能とする。かかる新規PDACサブタイプ特異的バイオマーカーは、迅速且つ信頼性のある患者の層別化に関する大きな必要性を満たし得る。その結果、サブタイプ特異的な薬剤脆弱性を利用する新規PDAC治療手法の導入及び予後評価を大きく改善する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の概要

驚くべきことに、PDACのサブタイプに特異的な新規バイオマーカーが同定され得ることが明らかとなった。さらに、驚くべきことに、本発明の新規PDACサブタイプ特異的バイオマーカーは、PDAC標品の特異的PDACサブタイプへの信頼性ある且つ正確な帰属を可能とすることが明らかとなった。本発明の新規サブタイプ特異的バイオマーカーは、患者の予後評価を大きく改善するために、及び、サブタイプ特異的な薬剤脆弱性の利用によるPDAC治療手法を大きく改善するために有用であり得る。迅速且つ信頼性のあるPDAC患者層別化は、本発明の新規バイオマーカーを利用することによって初めて可能となった。

10

【0008】

したがって、一の態様において、本発明は、腫瘍試料におけるPDAC細胞のサブタイプ特異的検出のためのインビトロの方法であって、サブタイプ特異的マーカーの発現を、タンパク質又はかかるタンパク質をコードするオリゴヌクレオチドのいずれかとして検出するステップによって特徴づけられ、ここで、ケラチン81及びビメンチンは、間葉系様サブタイプのPDAC細胞のためのマーカーとして検出され、(i) HNF-1A、HNF-1B、FOXA2(HNF3B)、FOXA3(HNF3G)、HNF4G、及びONECUT1(HNF6)から選択される1又は2以上の転写因子、(ii) HNF-1Aによって制御される1又は2以上の標的遺伝子、特に表2に列挙されている1又は2以上のHNF-1A標的遺伝子、及び(iii) カドヘリン17(CDH17)は、外分泌様サブタイプの細胞のためのマーカーとして検出され、そして、古典的サブタイプのPDAC細胞は、(i) ケラチン81及び/又はビメンチン、並びに(ii) HNF-1A及び/又はHNF-1Bの欠如によって特徴づけられる、前記方法に関する。

20

30

【0009】

別の態様において、本発明は、腫瘍試料におけるPDAC細胞のサブタイプ特異的検出のためのインビトロの方法であって、遺伝子発現プロファイルにおけるSrc阻害剤感受性特性(Src inhibitor sensitivity signature)を分析するステップによって特徴づけられ、前記方法に関する。

【0010】

別の態様において、本発明は、PDAC細胞のサブタイプ特異的検出のためのキットであって、(i) ケラチン81、(ii) ビメンチン、(iii) HNF-1A、HNF-1B、FOXA2(HNF3B)、FOXA3(HNF3G)、HNF4G、及びONECUT1(HNF6)から選択される1又は2以上の転写因子、(iv) HNF-1Aによって制御される1又は2以上の標的遺伝子、特に表2に列挙されている1又は2以上のHNF-1A標的遺伝子、及び(v) カドヘリン17(CDH17)、のリストから選択される、PDACサブタイプ特異的マーカーに特異的な、少なくとも2つの試薬を含み、ここで前記試薬は、検出抗体及びオリゴヌクレオチドプローブのリストから選択され、そして場合により、前記試薬の少なくとも1つの検出のための、少なくとも1つの試薬をさらに含む、前記キットに関する。

40

【0011】

別の態様において、本発明は、Src阻害剤感受性のPDAC細胞をサブタイプ特異的に検出するためのキットであって、Src阻害剤感受性特性の同定のためのオリゴヌクレオチドプローブを含む、前記キットに関する。

50

【0012】

別の態様において、本発明は、PDACを患う患者をコホートへと層別化する方法であって、以下のステップ：(a) (i) ケラチン81、(ii) ビメンチン、(iii) HNF-1A、HNF-1B、FOXA2 (HNF3B)、FOXA3 (HNF3G)、HNF4G、及びONECUT1 (HNF6) から選択される1又は2以上の転写因子、(iv) 1又は2以上のHNF-1A標的遺伝子、特に表2に列挙されている1又は2以上のHNF-1A標的遺伝子、及び/又は、(v) カドヘリン17 (CDH17) の発現及び/又は存在をインビトロで決定し；(b) 前記選択されたタンパク質の発現及び/又は存在に基づいて、PDACサブタイプを同定し；(c) PDAC患者が患うPDACサブタイプに基づいて、前記患者を予後コホート及び/又は薬剤治療コホートへと層別化すること、を含む、前記方法に関する。

10

【0013】

別の態様において、本発明は、PDACを患う患者をコホートへと層別化する方法であって、以下のステップ：(a) 膵臓組織を含む患者試料の細胞中におけるSrc阻害剤感受性特性の決定のために、インビトロで遺伝子発現を分析し；(b) 前記遺伝子発現分析に基づいて、PDACサブタイプを同定し；(c) PDAC患者が患うPDACサブタイプに基づいて、前記患者を予後コホート及び/又は薬剤治療コホートへと層別化すること、を含む、前記方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、PDACサブタイプ特異的マーカーの同定を示す。ケラチン81 (上列) 及びHNF-1A (下列) に関する、異なるサブタイプの代表的腫瘍 (QM-PDAC - PACO 7 DT、外分泌様 - PACO 3 DT、古典的 - PACO 2 DT) の免疫組織化学染色 (スケールバー、200 µm)。

20

【図2】図2は、新たに同定されたマーカーによる患者の層別化を実証する。患者は、本発明の方法にしたがって層別化され、それらのサブタイプは、平均生存 (mean survival) と相関した。各々のサブタイプと患者の生存との間における有意に高い相関が明らかとなった。

【図3】図3は、調査されたケースの総数、それらのサブタイプの割り当て、及び3つのグループの平均生存の概略を示す。

30

【図4】図4は、組織マイクロアレイに含まれる、患者の特性の詳細を示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

発明の詳細な説明

本発明は、本明細書中の以下の発明の詳細な説明及び実施例を参照することによってより容易に理解され得る。

【0016】

一の態様において、本発明は、腫瘍試料におけるPDAC細胞のサブタイプ特異的検出のためのインビトロの方法であって、サブタイプ特異的マーカーの発現を、タンパク質又はかかるタンパク質をコードするオリゴヌクレオチドのいずれかとして検出するステップによって特徴づけられ、ここで、ケラチン81及びビメンチンは、間葉系様サブタイプのPDAC細胞のためのマーカーとして検出され、(i) HNF-1A、HNF-1B、FOXA2 (HNF3B)、FOXA3 (HNF3G)、HNF4G、及びONECUT1 (HNF6) から選択される1又は2以上の転写因子、(ii) HNF-1Aによって制御される1又は2以上の標的遺伝子、特に表2に列挙されている1又は2以上のHNF-1A標的遺伝子、及び(iii) カドヘリン17 (CDH17) は、外分泌様サブタイプの細胞のためのマーカーとして検出され、そして、古典的サブタイプのPDAC細胞は、(i) ケラチン81及び/又はビメンチン、並びに(ii) HNF-1A及び/又はHNF-1Bの欠如によって特徴づけられる、前記方法に関する。

40

【0017】

50

本明細書において、「P D A C」は、最も一般的なタイプの膵臓癌である膵管腺癌を指し、これは、これらの腫瘍の95%を占め、膵臓の外分泌成分内で発生する。これは典型的には、顕微鏡検査で適度に分化しているかあまり分化していない腺構造を特徴とする。

【0018】

本発明において、「膵臓癌」は、形質転換細胞に由来し、膵臓を形成する組織で発生する癌を指す。

【0019】

本発明において、用語「古典的 (classical)」、「間葉系様 (quasi-mesenchymal)」及び「外分泌様 (exocrine-like) サブタイプの P D A C」は、それらの遺伝子発現プロファイルに基づいて、Collisson et al. (上記引用)により同定された P D A C サブタイプを指す。この研究において、腫瘍試料を3つのサブタイプの1つへと分類することを可能にする62個の遺伝子パネルが考案された。

10

【0020】

間葉系様 P D A C サブタイプの腫瘍は、異常な紡錘体形成を伴う豊富な有糸分裂と、大細胞質及び異形性(すなわち異常形態の)から多形性(すなわち種々の形の)の核を有する細胞とを特徴とする、あまり分化していない腫瘍を生じさせる。

【0021】

古典的または外分泌様 P D A C サブタイプは、核の大きさとクロマチン構造の唯一の適度な変化を有する中程度のサイズの新生物管構造の、より分化した増殖パターンを有する腫瘍を生じさせる。

20

【0022】

本発明者らは、驚くべきことに、間葉系様サブタイプの P D A C 細胞が、II型ケラチン81及び/又はビメンチンの特異的発現を示すことを同定した。ケラチン81の発現は通常、正常な毛包に限定されるが、ケラチン81の発現と、(a)乳癌における肺転移、及び(b)肺癌の再発リスクとの間の相関が報告されている。ビメンチンの発現は、ストローマ細胞において見られ、その結果、本発明の任意のマーカー分析は、試験される細胞が腫瘍細胞であり、ストローマ細胞を含まないことを確保する。

【0023】

本発明において、用語「特異的発現」は、1つまたはそれ以上の比較試料と比較した、試料中のンパク質又は転写体の検出を指す。500個の分析された腫瘍細胞のうちで、少なくとも1つの腫瘍細胞が非特異的対照抗体で観察されたシグナルより高いシグナルを示し、比較試料中に、試験されたマーカーの陽性シグナルが検出されない場合は、試験されたマーカーの発現は試料に対して特異的であると見なされる。

30

【0024】

本発明において、分析のための用語「特異的発現」はまた、全試料中の特定のRNA転写体の量の検出を指すことができる。mRNAの相対量は、これを1つ又はそれ以上の適した標準物質(例えば、ハウスキーピング遺伝子ベータ-アクチンまたはGAPDH)と比較することによって、定量的(例えば定量RT-PCRによって)に行うことができる。あるいは、発現は、他の腫瘍試料または正常な非癌性組織と比較することによって決定することができる。転写体の相対発現が、すでに決定されたカットオフより大きい(例えば、1.5倍、2倍、5倍または10倍)場合、発現は、その試料に対して特異的であると見なされる。

40

【0025】

本発明において、用語「欠如 (absence)」は、(前々段落に記載のように測定される)試料中のマーカー陽性腫瘍細胞の割合を指す。試料の500個の分析された腫瘍細胞において、試験したマーカーのシグナルを有する細胞が検出されない場合、マーカーはその試料中で「欠如」しているから見なされる。あるいは、(前段落に記載のように測定される)転写体のレベルがあらかじめ決定されたカットオフより小さい場合、その転写体は試料から「欠如」しているから見なされる。

【0026】

50

さらに、本発明者らは驚くべきことに、(i) HNF - 1 A、HNF - 1 B、FOXA 2 (HNF 3 B)、FOXA 3 (HNF 3 G)、HNF 4 G、及びONECUT 1 (HNF 6) から選択される転写因子、(ii) HNF - 1 A 標的遺伝子、特に表 2 に列挙されている HNF - 1 A 標的遺伝子、及び(iii) カドヘリン 17 (CDH 17) が、外分泌様サブタイプの PDAC 細胞において特異的に発現していることを突き止めた。HNF - 1 A と HNF - 1 B は転写因子であり、肝臓で発現していて、増殖している膵臓の内分泌細胞と外分泌細胞の両方で以前に報告されているが、成人の正常な膵臓では発現していない。さらに、カドヘリン 17 (CDH 17) の発現も外分泌様サブタイプに特異的であることが見いだされている。

【0027】

最後に、本発明者らは、驚くべきことに、古典的な PDAC サブタイプの細胞が、(i) ケラチン 8 1 及び / 又はビメンチンと(ii) HNF - 1 A 及び / 又は HNF - 1 B の欠如と、場合により、HNF - 1 A、HNF - 1 B、FOXA 2 (HNF 3 B)、FOXA 3 (HNF 3 G)、HNF 4 G、及びONECUT 1 (HNF 6) という転写因子、HNF - 1 A 標的遺伝子、特に表 2 に列挙されている HNF - 1 A 標的遺伝子、及びカドヘリン 17 (CDH 17) のうちの 1 又は 2 以上のさらなる欠如を特徴とすることを突き止めた。

【0028】

特別な一実施態様では、古典的サブタイプの PDAC は、バイオマーカーであるケラチン 8 1 と HNF - 1 A の特異的発現の欠如を測定することによって同定される。

【0029】

特別な一実施態様では、古典的サブタイプの PDAC は、(i) HNF - 1 A、HNF - 1 B、FOXA 2 (HNF 3 B)、FOXA 3 (HNF 3 G)、HNF 4 G、及びONECUT 1 (HNF 6) から選択される転写因子、(ii) HNF - 1 A によって制御される 1 又は 2 以上の標的遺伝子、特に表 2 に列挙されている HNF - 1 A 標的遺伝子、及び(iii) カドヘリン 17 (CDH 17) から選択される 1 又は 2 以上の追加のバイオマーカーの特異的発現の不在を測定することによって同定される。

【0030】

特別な一の態様では、本発明は、腫瘍試料における PDAC 細胞のサブタイプ特異的検出のためのインビトロの方法であって、サブタイプ特異的マーカーの発現を、タンパク質又はかかるタンパク質をコードするオリゴヌクレオチドのいずれかとして検出するステップによって特徴づけられ、ここで、ケラチン 8 1 は、間葉系様サブタイプの PDAC 細胞のためのマーカーであり、(i) HNF - 1 A は、外分泌様サブタイプの細胞のためのマーカーであり、そして古典的サブタイプの PDAC 細胞は、ケラチン 8 1 及び HNF - 1 A の欠如によって特徴づけられる、前記方法に関する。

【0031】

特別な実施態様では、前記検出は、前記サブタイプ特異的マーカーの 1 つのエピトープへの検出抗体の結合に基づいている。

【0032】

本発明の文脈では、用語「エピトープ」は、抗原のうちで抗体によって認識される部分を意味する。

【0033】

特別な実施態様では、PDAC 細胞をサブタイプ特異的に検出するインビトロの方法は、以下のステップ：(a) 前記サブタイプ特異的マーカーの 1 つに特異的な検出抗体が前記エピトープと結合できる条件下にて、前記試料を前記検出抗体と接触させ；(b) 過剰の検出抗体分子を除去し；そして(c) 前記試料中で結合した検出抗体を検出することを含んでいる。

【0034】

本発明の文脈では、用語「含む (comprises)」又は「含んでいる (comprising)」は、「含有するが、それに限定されない (including, but not limited to)」ことを意味する

10

20

30

40

50

。この用語は、含むものを限定するのではなく、記載した何らかの特徴、要素、整数、ステップ、又は成分の存在を示すことを目的としており、他の特徴、要素、整数、ステップ、成分や、これらの群の1又は2以上がさらに存在することを排除することは意図していない。したがって用語「含んでいる」は、より限定的な用語である「からなる (consisting of)」と「主に...からなる (consisting essentially of)」を含有する。

【0035】

特別な実施態様では、検出抗体は、モノクローナル抗体；ポリクローナル抗体；組み換えによって産生されたキメラ抗体又はヒト化抗体を含む、組み換えによって産生された抗体；又は、完全合成抗体である。特別な実施態様では、抗体は、完全な免疫グロブリンであり、その中にはIg A、Ig D、Ig E、Ig G、及びIg M、特にIg A又はIg Gが含まれる。特別な実施態様では、抗体は、抗体の機能的断片であり、その中にはFabフラグメント、F(a b')フラグメント、Fvフラグメント、及び単鎖Fvフラグメント(scFv)が含まれる。

10

【0036】

本発明の文脈では、用語「モノクローナル抗体」は、不死化された唯一の親免疫細胞によって産生される単一特異性抗体を意味する。

【0037】

本発明の文脈では、用語「ポリクローナル抗体」は、さまざまなB細胞供給源から得られる抗体を意味する。ポリクローナル抗体は、特定の抗原に対して分泌される免疫グロブリン分子の組み合わせであり、異なるエピトープを同定する。

20

【0038】

本発明の文脈では、用語「キメラ抗体」は、非ヒト供給源からの遺伝子材料をヒト遺伝子材料と組み合わせることによって作られる抗体、特に非ヒト種の標的特異的抗体からの非ヒト可変領域をヒト抗体定常領域と組み合わせることによって作られる抗体を意味する。かかるキメラ抗体は、一般に約2/3がヒトであり、治療で用いるときに非ヒト動物からの外来抗体と反応するリスクを低下させる。

【0039】

本発明の文脈では、用語「ヒト化抗体」は、キメラ抗体の1つの特別な形態を意味し、ヒト化抗体では、非ヒト種の標的特異的抗体からのCDR領域がヒト抗体可変領域フレームワークに挿入されており、特に、ヒトフレームワークのいくつかの残基が復帰突然変異して非ヒト種に似た残基になり、結合しているCDRループの三次元配列のための適切な構造支持体を提供している。したがってかかるCDR接合抗体又はヒト化抗体は、上述のキメラ抗体よりもはるかに広い範囲がヒト配列で構成されている。

30

【0040】

本発明の文脈では、用語「抗体の機能的断片」は、抗体に基づくタンパク質で抗原に特異的に結合することのできる特性を保持しているものを意味する。いくつかの実施態様では、かかる断片は、可変重鎖(VH鎖)の少なくともCDR1領域とCDR2領域とCDR3領域を含んでいる。いくつかの実施態様では、かかる断片は、完全VH鎖(CDR1領域とCDR2領域とCDR3領域に加えてフレームワーク領域FR1、FR2、FR3、及びFR4)を含んでいる。いくつかの実施態様では、かかる断片は、可変軽鎖(VL鎖)の少なくともCDR1領域とCDR2領域とCDR3領域を含んでいる。いくつかの実施態様では、かかる断片は、完全VL鎖(CDR1領域とCDR2領域とCDR3領域に加えてフレームワーク領域FR1、FR2、FR3、及びFR4)を含んでいる。いくつかの実施態様では、かかる断片は、VH鎖とVL鎖両方(VH鎖)の少なくともCDR1領域とCDR2領域とCDR3領域を含んでいる。いくつかの実施態様では、かかる断片は、完全VH鎖と完全VL鎖の両方を含んでいる。

40

【0041】

本発明の文脈では、用語Fabフラグメントは、抗体の機能的断片で、重鎖と軽鎖それぞれの1つの定常領域と1つの可変領域からなるものに関する。これら2つの可変領域は、特異的抗原上の表面にあるエピトープに結合する。

50

【0042】

本発明の文脈では、用語 F (a b ') フラグメントは、ヒンジ領域を通じて結合された2つの同じ F a b フラグメントに関する。

【0043】

本発明の文脈では、用語「単鎖抗体」又は「単鎖可変フラグメント (s c F v) 」は、免疫グロブリンの重鎖 (V H 鎖) と軽鎖 (V L 鎖) の可変領域が 10 個 ~ 約 25 個のアミノ酸からなる短いリンカーペプチドで結合された融合タンパク質を意味する。リンカーは、通常は、可撓性を持たせるためのグリシンと、可溶性にするためのセリン又はトレオニンが豊富であり、VHのN末端をVLのC末端に接続するか、その逆が可能である。このタンパク質は、定常領域の除去とリンカーの導入にもかかわらず、元の免疫グロブリンの特異性を保持している。

10

【0044】

特別な実施態様では、検出抗体の結合は、二次抗体、特に標識化された二次抗体とのインキュベーションによって検出される。

【0045】

特別な実施態様では、二次抗体は、マーカー分子で標識化される。

【0046】

特別な実施態様では、二次抗体は、蛍光染料、生物学的に活性な酵素標識、放射活性標識、核磁気共鳴に活性な標識、発光性標識又は発色団による標識を用いて標識化される。

【0047】

特別な実施態様では、放射活性標識は、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{188}Rh 、 ^{131}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 及び ^{111}In からなる群から選択される。

20

【0048】

特別な一実施態様では、抗体の結合は、免疫組織化学染色によって検出される。

【0049】

特別な実施態様では、前記検出は、前記サブタイプ特異的マーカーの1つをコードする mRNA を測定することに基づき、特に定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (q R T - P C R) によって前記 mRNA を測定することに基づく。

【0050】

特別な一実施態様では、試験すべき試料は脾臓組織を含有している。

30

【0051】

特別な実施態様では、前記試料は、哺乳類、特にヒトから得られる。

【0052】

別の態様では、本発明は、腫瘍試料における P D A C 細胞のサブタイプ特異的検出のためのインピトロの方法であって、遺伝子発現プロファイルにおける S r c 阻害剤感受性特性を分析するステップによって特徴づけられる、前記方法に関する。

【0053】

本発明の文脈では、“ S r c ” は、癌原遺伝子 S R C によってコードされるチロシンキナーゼという1つのタンパク質 (“細胞性 (cellular) S r c ” に関しては c - S r c と呼ばれる) であり、悪性腫瘍では過剰発現して高度に活性化されていることがしばしばある。S r c はキナーゼファミリー (いわゆる “ S r c ファミリー ”) の一員である。このファミリーの追加のメンバーは、L y n、F y n、L c k、H c k、F g r、B l k、Y r k、及び c - Y e s である。

40

【0054】

驚くべきことに、本発明者らは、P D A C 細胞を S r c 阻害剤感受性予測因子陽性 P D A C サブタイプと S r c 阻害剤感受性予測因子陰性 P D A C サブタイプに分離できることを見いだした。

【0055】

本発明の文脈では、用語「S r c 阻害剤感受性特性」は、S r c 阻害剤に対して感受性のある細胞に特徴的な遺伝子発現特性を意味し、それは実施例 2 に従って確立される。

50

【0056】

本発明の文脈では、用語「Src 阻害剤感受性予測因子陽性PDACサブタイプ」は、GSEAアルゴリズム (Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., and Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 15545-15550) のための入力として遺伝子発現値のリストを用いた遺伝子発現分析における腫瘍細胞スコア陽性を特徴とするサブタイプを意味する。本発明の文脈では、用語「スコア陽性」は、偽発見率 (“FDR”) が0.200未満であることを意味する。逆に、用語「Src 阻害剤感受性予測因子陰性PDACサブタイプ」は、かかる遺伝子発現分析においてFDRが0.200以上である腫瘍細胞スコア陰性を特徴とするサブタイプを意味する。

10

【0057】

特別な一実施態様では、遺伝子発現プロファイルは、表1に示した30個の遺伝子のセットに基づいており、特にその遺伝子発現プロファイルは、実施例2に記載したようにして確立される。

【0058】

本発明者らは、古典的なPDACサブタイプの細胞と、間葉系様PDACサブタイプのいくつかの細胞が、Src 阻害剤感受性予測因子陽性PDACサブタイプに属することと、かかる細胞がSrc 阻害剤に対して感受性があることを見いだす一方で、間葉系様PDACサブタイプの残りの細胞と外分泌様サブタイプの細胞は、Src 阻害剤感受性予測因子陰性PDACサブタイプに属して、かかる細胞はSrc 阻害剤に抵抗性であることを見いだした。

20

【0059】

別の一の態様では、本発明は、PDAC細胞のサブタイプ特異的検出のためのキットであって、(i) ケラチン81、(ii) ビメンチン、(iii) HNF-1A、HNF-1B、FOX A2 (HNF3B)、FOX A3 (HNF3G)、HNF4G、及びONE CUT1 (HNF6) から選択される1又は2以上の転写因子、(iv) HNF-1Aによって制御される1又は2以上の標的遺伝子、特に表2に列挙されている1又は2以上のHNF-1A標的遺伝子、及び(v) カドヘリン17 (CDH17) のリストから選択される、PDACサブタイプ特異的マーカーに特異的な、少なくとも2つの試薬を含み、ここで前記試薬は、検出抗体及びオリゴヌクレオチドプローブのリストから選択され、そして場合により、前記試薬の少なくとも1つの検出のための、少なくとも1つの試薬をさらに含む、前記キットに関する。

30

【0060】

特別な一実施態様では、前記キットは、(i) ケラチン81及びビメンチンのリストから選択される間葉系様に特異的な、特にケラチン81である間葉系様に特異的な、少なくとも1つの試薬と、(ii) HNF-1A及びHNF-1Bのリストから選択される外分泌様PDACサブタイプに特異的な、特にHNF-1Aである外分泌様PDACサブタイプに特異的な、少なくとも1つの試薬を含んでいる。

40

【0061】

別の一の態様では、本発明は、Src 阻害剤感受性PDAC細胞をサブタイプ特異的に検出するためのキットであって、Src 阻害剤感受性特性の同定のためのオリゴヌクレオチドプローブを含む、前記キットに関する。

【0062】

特別な一実施態様では、このキットは、表1に示された30個の遺伝子を表わすオリゴヌクレオチドプローブを含んでいる。

【0063】

特別な一実施態様では、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドアレイの中に、特に遺伝子チップ上のアレイの中に存在している。

50

【0064】

別の一の態様では、本発明は、PDACを患う患者を治療コホートへと層別化する方法であって、以下のステップ：(a) (i) ケラチン81、(ii) ビメンチン、(iii) HNF-1A、HNF-1B、FOXA2 (HNF3B)、FOXA3 (HNF3G)、HNF4G、及びONECUT1 (HNF6) から選択される1又は2以上の転写因子、(iv) 1又は2以上のHNF-1A標的遺伝子、特に表2に列挙されている1又は2以上のHNF-1A標的遺伝子、及び(v) カドヘリン17 (CDH17) の発現及び/又は存在をインビトロで決定し；(b) 前記選択されたタンパク質の発現及び/又は存在に基づいて、PDACサブタイプを同定し；(c) PDAC患者が患うPDACサブタイプに基づいて、前記患者を薬剤治療コホートへと層別化することを含む、前記方法に関する。

10

【0065】

特別な実施態様では、この方法は、(i) ケラチン81又はビメンチン、特にケラチン81と、(ii) HNF-1A又はHNF-1B、特にHNF-1Aの発現及び/又は存在をインビトロで決定するステップを含んでいる。

【0066】

別の一の態様では、本発明は、PDACを患う患者をコホートへと層別化する方法であって、以下のステップ：(a) 膵臓組織を含む患者試料の細胞中におけるSrc阻害剤感受性特性の決定のために、インビトロでの遺伝子発現プロファイルを確立し；(b) 前記遺伝子発現プロファイルに基づいて、PDACサブタイプを同定し；(c) PDAC患者が患うPDACサブタイプに基づいて、前記患者を薬剤治療コホートへと層別化することを含む、前記方法に関する。

20

【0067】

別の一の態様では、本発明は、PDACを患う患者の予後を評価する方法であって、以下のステップ：(a) (i) ケラチン81、(ii) ビメンチン、(iii) HNF-1A、HNF-1B、FOXA2 (HNF3B)、FOXA3 (HNF3G)、HNF4G、及びONECUT1 (HNF6) から選択される1又は2以上の転写因子、(iv) 1又は2以上のHNF-1A標的遺伝子、特に表2に列挙されている1又は2以上のHNF-1A標的遺伝子、及び(v) カドヘリン17 (CDH17) の発現及び/又は存在をインビトロで決定し；(b) 前記選択されたタンパク質の発現及び/又は存在に基づいて、PDACサブタイプを同定し；(c) PDAC患者が患うPDACサブタイプに基づいて、前記患者を予後コホートへと層別化することを含む、前記方法に関する。

30

【0068】

特別な実施態様では、この方法は、(i) ケラチン81又はビメンチン、特にケラチン81と、(ii) HNF-1A又はHNF-1B、特にHNF-1Aの発現及び/又は存在をインビトロで決定するステップを含んでいる。

【0069】

別の一の態様では、本発明は、PDACを患う患者の予後を評価する方法であって、以下のステップ：(a) 膵臓組織を含む患者試料の細胞中におけるSrc阻害剤感受性特性の決定のために、インビトロでの遺伝子発現プロファイルを確立し；(b) 前記遺伝子発現プロファイルに基づいて、PDACサブタイプを同定し；(c) PDAC患者が患うPDACサブタイプに基づいて、前記患者を予後コホートへと層別化することを含む、前記方法に関する。

40

【0070】

本発明の文脈では、用語「層別化する」又は「層別化」は、患者の最適な管理法を選択するため分子診断試験と生化学的診断試験を利用して「生物学的」特徴を共有する患者の群を同定することに関する。

【0071】

特別な一実施態様では、発現レベルは、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) によって、mRNAレベルで決定される。

【0072】

50

別の一実施態様では、発現レベルは、前記選択されたタンパク質への抗体の結合の検出に基づいて、タンパク質レベルで決定される。

【0073】

特別な実施態様では、前記細胞は、前記患者試料から癌細胞を精製することによって得られ、特に前記精製ステップは、流動選別 (flow sorting) 又はレーザー捕獲顕微解剖 (laser capture microdissection) を含んでいる。

【0074】

特別な一実施態様では、前記患者試料は腫瘍生検である。

【0075】

特別な一実施態様では、前記腫瘍生検は、微細針吸引 (fine needle aspiration) によって得られる。

【0076】

特別な一実施態様では、患者試料は、血液、血清、及び血漿から選択される。特別な一実施態様では、患者試料は、特に患者の血液から単離された循環している腫瘍細胞 (CTC) を集めたものである。特別な実施態様では、CTCは血漿交換によって単離される。

【0077】

特別な実施態様では、患者試料は、切除可能なPDACに由来する。

【実施例】

【0078】

実施例1: PDACサブタイプ特異的マーカーの同定

一次異種移植片として、原初の腫瘍サブタイプに関連する遺伝子発現パターンを保持しているためサブタイプ特異的バイオマーカーの同定を目的として古典的PDACサブタイプと間葉系様PDACサブタイプと外分泌様PDACサブタイプの分子的特徴づけが可能な商品名付きの安定なPDAC細胞系と、細胞系由来の腫瘍を使用し、サブタイプ特異的遺伝子発現分析を実施した。この遺伝子発現分析においてサブタイプ特異的発現の大きな違い (5倍超) を示す遺伝子が、サブタイプ特異的バイオマーカータンパク質のためのスクリーンに含まれていた。臨床設定では免疫組織化学的マーカーが最も有用であるため、タンパク質地図データベースを使用してこの最初の候補リストを改良した。それに加え、GSEAモチーフモジュールを使用して転写因子のサブタイプ特異的発現の検索も実施した。これにより、外分泌様サブタイプにおいてだけ、転写因子HNF-1のための結合部位を含む遺伝子が豊富であることが明らかになった。したがって外分泌様サブタイプが最終候補リストに含まれた。細胞系由来異種移植片のパネル全体の切片について、あらゆる候補の発現を免疫組織化学法で試験した。腫瘍試料は10%ホルマリンの中で一晚固定し、パラフィンに包埋した。免疫組織化学法のため、スライドを脱パラフィン化し、再水化した。pH6 (Dako標的回収溶液、Dako、Glostrup) の蒸気釜中で15分間沸騰させて抗原を回収し、30分間放冷し、蒸留水で洗浄した。Linarisアビジン/ビオチンブロッキングキット (Vector Labs、Burlingame) を製造業者の説明書に従って使用して、非特異的結合をブロックした。スライドを一次抗体と30分間インキュベートし、PBS-T (0.5% トゥイーン-20を含むPBS) で洗浄し、Dako REAL Detection Systemを使用して適切な二次抗体と20分間インキュベートし、PBS-Tで洗浄した。内因性ペルオキシダーゼをブロックし、ストレプトアビジンHRPとインキュベーション (室温で20分間) した後、スライドをAEC (Dako) で発色させ、ヘマトキシリンで対染色した。個々の抗体がPDAC試料の特定のサブセットを染色し、したがって3種類のPDACサブタイプの識別と分類に役立つことがわかった場合には、候補マーカータンパク質だけを選択した。HNF-1Aに対する抗体は、外分泌様サブタイプの腫瘍細胞の核を特異的に染色した。それに対してケラチン81の発現は、間葉系様サブタイプの腫瘍においてだけ検出できた。古典的タイプでは、患者試料を分析するときに予測性があることが後に示される可能性のある特異的マーカーを同定することができなかった。したがって古典的サブタイプのPDACは、ケラチン81とHNF-1Aの発現不在を特徴とすることができる。

【0079】

10

20

30

40

50

選択されたマーカータンパク質に対する一次抗体を以下の希釈で使用した：HNF-1A (H-205、Santa Cruz) 1 : 50、ケラチン81 (36-Z、Santa Cruz) 1 : 100、及びビメンチン (Clone V9、DAKO)。すべての抗体をDako抗体希釈液の中に希釈した。

【0080】

実施例2：mRNAの発現を利用したSrc阻害剤感受性の予測

miRNAeasyキット (Qiagen、Hilden) を使用してPDAC細胞系又は腫瘍異種移植片から全RNAを単離した。Illumina BeadChip Technology (HumanHT-12) を利用して遺伝子発現分析を実施した。各試料について得られた規格化された遺伝子リストを検出されたシグナルに従って分類した。シグナルが最も強い遺伝子を最上位にし、残りは降順で分類した。ランク付けしたこの遺伝子リストをGSEA-アルゴリズム (Subramanian et al. 上記引用) のための入力として用いた。ランク付けした各リストを表1に記載した感度予測因子 (SRC-SP) と別々に比較し、FDRを計算した。0.200というFDRカットオフ値が、試料をSrc阻害剤感受性であるかSrc阻害剤抵抗性であるかに正確に分類するのに最適であると判断した。FDRが0.200未満になった試料は感受性であることが予測されるのに対し、FDRが0.200よりも大きいと抵抗性であることが予測される。

10

【0081】

実施例3：外分泌様サブタイプで過剰発現しているHNF-1標的遺伝子の同定

我々は、外分泌様サブタイプで過剰発現している転写因子HNF-1の標的遺伝子を同定した。これら遺伝子は、外分泌様サブタイプのためのさらなるマーカーとして用いることができる。

20

【0082】

miRNAeasyキット (Qiagen、Hilden) を使用し、継代の初期と後期 (80%集密) の異なるPACO系から、又は腫瘍組織 (30mg) から、全RNAを単離した。Illumina BeadChip Technology (HumanHT-12v4) を利用して遺伝子発現分析を実施した。遺伝子発現差分分析とクラスター化には、TM4マイクロアレイ・ソフトウェア・スイート (Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M. et al. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. BioTechniques 34, 374-378) を使用した。以前に報告されているようにして (Subramanian et al. 上記引用)、規格化されたデータで遺伝子セット豊富化分析を実施した。HNF-1Aのための仮想的結合部位を含む遺伝子のセットに対して試料を試験した。試験した遺伝子セットはMSigDatabase (<http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>) に含まれており、受け入れ番号M12675、M11442、M14593、M15429で入手できる。GSEAアルゴリズム (Saeed et al. 上記引用) によって求めたようにコアに豊富に含有されていた遺伝子は、外分泌様サブタイプで発現したHNF-1A標的遺伝子の特性に含まれており、表2に列挙されている。

30

【0083】

実施例4：免疫組織化学法による腫瘍サブタイプの測定

ホルマリン固定パラフィン包埋組織試料 (3µm ~ 5µmの切片) を脱パラフィン化し、そして再水和した。pH6 (Dako標的回収溶液、Dako, Glostrup) の蒸気釜中で15分間沸騰させて抗原を回収し、30分間放冷し、蒸留水で洗浄した。Linaris アビジン/ビオチンブロッキングキット (Vector Labs, Burlingame) を製造業者の説明書に従って使用して、非特異結合をブロックした。スライドを一次抗体と30分間インキュベートし、PBS-T (0.5%ツイーン20を有するPBS) で洗浄し、Dako REAL Detection Systemを使用して適切な二次抗体と20分間インキュベートし、PBS-Tで洗浄した。内因性ペルオキシダーゼをブロックし、ストレプトアビジンHRPとインキュベーション (室温で20分間) した後、スライドをAEC (Dako) で発色させ、ヘマトキシリンで対染色した。染色は、2つの別々の切片に、又は1つの切片上の2つの別々の領域に、それぞ

40

50

れ HNF - 1 A および ケラチン 8 1 について行った。

【 0 0 8 4 】

染色の評価：サブタイプの割り当てのための染色の評価では、腫瘍細胞のみが考慮される。各試料について 5 0 0 個の腫瘍細胞が評価される。観察されたシグナルが、比較可能な試料上でのアイソタイプ対照抗体で観察されるバックグランド染色と明確に区別できる場合には、シグナルは陽性となされる。少なくとも 1 つの腫瘍細胞が明らかに検出可能な細胞内シグナルを示す場合、試料はケラチン 8 1 について陽性となされる。腫瘍細胞の少なくとも 1 つが明らかに検出可能な核染色を示す場合、試料は HNF - 1 A について陽性となされる。サブタイプは以下のように測定される：

ケラチン 8 1 陽性 / HNF - 1 A 陰性：間葉系様サブタイプ

ケラチン 8 1 陰性 / HNF - 1 A 陽性：外分泌様サブタイプ

ケラチン 8 1 陰性 / HNF - 1 A 陰性：古典的サブタイプ

ケラチン 8 1 陽性 / HNF - 1 A 陽性：未定

10

【 0 0 8 5 】

実施例 5：組織マイクロアレイにおける、マーカー発現と患者生存の相関

サブタイプ特異的な治療手法と組合せた患者の層別化はますます重要になってきており、すでにいくつかのタイプの癌で治療の有効性を改善することが証明されている。しかしこれまで、P D A C 患者を臨床的に意味のある群に層別化する試みは、まちまちの結果を与えている (Stathis, A., and Moore, M. J. (2010). Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. Nat Rev Clin Oncol 7, 163-172)。これは、単一のマーカーによる手法を複雑にする、少なくとも 3 つのサブタイプの存在に一部起因しているかも知れない。2 つのマーカーのセットでは、P A C O モデルですべての 3 つの P D A C サブタイプを明確に特定することができる。2 5 8 人の P D A C 患者のコホートへのこれらのマーカーの適用は、非重複染色を確認しており、患者群に適用された時の我々の 2 つのマーカーセットの頑強性を示唆している。これは、我々が患者の大きなコホートを 3 つの群 [HNF 1 A 陽性 (外分泌様)、ケラチン 8 1 (K R T 8 1) 陽性 (Q M - P D A)、及び 2 重陰性 (古典的)] に層別化することを可能にした。我々は、3 群間で全体的生存率の有意差を見いだした。K R T 8 1 陽性患者は最悪の予後 (平均 O S = 1 6 . 5 ヶ月) を有し、HNF - 1 A 陽性患者は最良の結果 (平均 O S = 4 3 . 5 ヶ月) を有し、2 重陰性患者は中間の結果 (平均 O S = 2 6 . 3 ヶ月) を有していた。従って我々のマーカーは、P D A C 患者の臨床的に意味のある層別化を初めて可能にし、容易に日常的な診断に取り込むことができ、P D A C 患者の層別化が、現在の及び新規治療法の指針となる可能性を提供することができる。

20

30

【 0 0 8 6 】

Charite 大学病院ベルリンで 1 9 9 1 年 ~ 2 0 0 6 年の間に P D A C のための部分的な膵頭十二指腸切除術を受けた患者から、組織マイクロアレイを構築した。バイオマーカー解析のためのこの腫瘍コホートの使用は、Charite 大学倫理委員会 (E A 1 / 0 6 / 2 0 0 4) によって承認されている。患者の特徴は、図 4 に要約されている。

【 0 0 8 7 】

既に記載されている (Weichert, W., Roske, A., Gekeler, V., Beckers, T., Ebert, M. P., Pross, M., Dietel, M., Denkert, C., and Rocken, C. (2008). Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis. The Lancet Oncology 9, 139-148) ように、ホルマリン固定及びパラフィン包埋組織試料を使用して、組織マイクロアレイを作成した。簡単に説明すると、パラフィンの「ドナー」ブロックの 3 つの形態学的に代表的な領域が選択された。各組織から、これらの領域を代表する直径 0 . 6 m m の 3 つの組織円柱を打ち抜き、特注の機器 (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) を使用して、新しい「受容者」パラフィンブロックに正確に配列した。

40

【 0 0 8 8 】

【表 1】

表 1 : SRC-SP 予測因子に含まれる遺伝子のリスト

遺伝子記号 参照配列番号 定義

IFI44L	NM_006820.1	ホモサピエンス、インターフェロン誘導性タンパク質 44-様 (IFI44L), mRNA.
IFI6	NM_022872.2	ホモサピエンス、インターフェロン, アルファ-誘導性タンパク質 6 (IFI6), 転写体変種 2, mRNA.
MX1	NM_002462.2	ホモサピエンス、ミクソウイルス (インフルエンザウイルス) 耐性 1, インターフェロン誘導性タンパク質 p78 (マウス) (MX1), mRNA.
OAS2	NM_016817.2	ホモサピエンス、2'-5'-オリゴアデニレートシンセターゼ 2, 69/71kDa (OAS2), 転写体変種 1, mRNA.
RARRES3	NM_004585.3	ホモサピエンス、レチノイン酸受容体レスポナー(タザロテン誘導性)3 (RARRES3), mRNA.
IFI44	NM_006417.3	ホモサピエンス、インターフェロン誘導性タンパク質 44 (IFI44), mRNA.
IFIT1	NM_001548.3	ホモサピエンス、テトラトリコペプチドリピート 1 を有するインターフェロン誘導性タンパク質 (IFIT1), 転写体変種 2, mRNA.
IFIT3	NM_001031683.1	ホモサピエンス、テトラトリコペプチドリピート 3 を有するインターフェロン誘導性タンパク質 (IFIT3), mRNA.
IFIT3	NM_001549.2	ホモサピエンス、テトラトリコペプチドリピート 3 を有するインターフェロン誘導性タンパク質 (IFIT3), mRNA.
IFI6	NM_022873.2	ホモサピエンス、インターフェロン, アルファ-誘導性タンパク質 6 (IFI6), 転写体変種 3, mRNA.
ISG15	NM_005101.1	ホモサピエンス、ISG15 ユビキチン様修飾物質 (ISG15), mRNA.
IFIT2	NM_001547.4	ホモサピエンス、テトラトリコペプチドリピート 2 を有するインターフェロン誘導性タンパク質 (IFIT2), mRNA.
OASL	NM_198213.1	ホモサピエンス、2'-5'-オリゴアデニレートシンセターゼ様 (OASL), 転写体変種 2, mRNA.
IFI27	NM_005532.3	ホモサピエンス、インターフェロン, アルファ-誘導性タンパク質 27 (IFI27), 転写体変種 2, mRNA.

10

20

30

【表2】

遺伝子記号	参照配列番号	定義
EPST11	NM_033255.2	ホモサピエンス、上皮間質相互作用1 (胸部) (EPST11), 転写体変種 2, mRNA.
APOBEC3G	NM_021822.1	ホモサピエンス、アポリポタンパク質B mRNA エディッティング酵素, 触媒性ポリペプチド様3G (APOBEC3G), mRNA.
HERC5	NM_016323.2	ホモサピエンス、ヘクトドメイン及びRDL 5 (HERC5), mRNA.
BST2	NM_004335.2	ホモサピエンス、骨髄間質細胞抗原2 (BST2), mRNA.
OAS3	NM_006187.2	ホモサピエンス、2'-5'-オリゴアデニレートシンセターゼ3, 100kDa (OAS3), mRNA.
APOBEC3G	NM_021822.1	ホモサピエンス、アポリポタンパク質B mRNA エディッティング酵素, 触媒性ポリペプチド様3G (APOBEC3G), mRNA.
CXCL10	NM_001565.2	ホモサピエンス、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド10 (CXCL10), mRNA.
XAF1	NM_199139.1	ホモサピエンス、XIAP 関連因子1 (XAF1), 転写体変種2, mRNA.
HOXB2	NM_002145.3	ホモサピエンス、ホメオボックスB2 (HOXB2), mRNA.
UBE2L6	NM_004223.3	ホモサピエンス、ユビキチン結合酵素 E2L 6 (UBE2L6), 転写体変種 1, mRNA.
RSAD2	NM_080657.4	ホモサピエンス、ラジカルS-アデノシルメチオニドメイン含有2 (RSAD2), mRNA.
CDKN2B	NM_078487.2	ホモサピエンス、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤2B (p15, Cdk4を阻害する) (CDKN2B), 転写体変種 2, mRNA.
IRF7	NM_004029.2	ホモサピエンス、インターフェロン 制御因子7 (IRF7), 転写体変種 b, mRNA.
ITGB2	NM_000211.1	ホモサピエンス、インテグリン, ベータ2 (抗原CD18 (p95), リンパ球機能関連抗原1; マクロファージ抗原1 (mac-1) ベータサブユニット) (ITGB2), mRNA.
SAMD9L	NM_152703.2	ホモサピエンス、無菌アルファモチーフドメイン含有9-様 (SAMD9L), mRNA.
ERAP2	NM_022350.2	ホモサピエンス、小胞体 アミノペプチダーゼ2 (ERAP2), mRNA.

10

20

30

【表 3】

表 2 : 外分泌様PDAC中で発現されるHNF-1 標的遺伝子のリスト

SLC5A1	MSX2	TINAG
FGFR4	MMP11	USP3
ANXA13	TLE4	HABP2
C11ORF9	SFRS7	CREB5
TM4SF4	SGK2	CLDN10
KIF12	GUCA2A	PURA
RNASE4	SERPINA4	PRODH2
UGT1A1	ALB	GRB7
TCEA3	GJB1	AGT
CDH17	SLC37A4	TTR
SLC4A4	SPINK1	SERPING1
NR5A2	SLC12A2	MLL
LGALS2	TBL1X	THAP11
NR1H4	SLC1A1	
UGT1A6	RBP4	
GATA6	ARHGAP12	
NPAS2	NDST2	
NFE2L2	EML4	
FAM20C	NEO1	
TBXAS1	THRA	
IGFBP1	PRDM1	
CDAN1	LPP	
GUCA2B	PLS3	
SLC3A1	YES1	
FOXA2	AFM	
STAT5B	C14ORF138	
MSH5	BACE2	
APOM	UBE3A	
FXD2	LRR19	
HPN	AQP4	
SEMA4G	LRRFIP2	
ROB3	BPHL	
SLC39A14	C5	
SLC7A9	CYFIP2	
NFIX	SLC39A5	
PDGFRA	AXIN2	
RAB3IP	TMEM27	
GC	SULF2	
ANPEP	MIA2	
CRB3	STAG2	

10

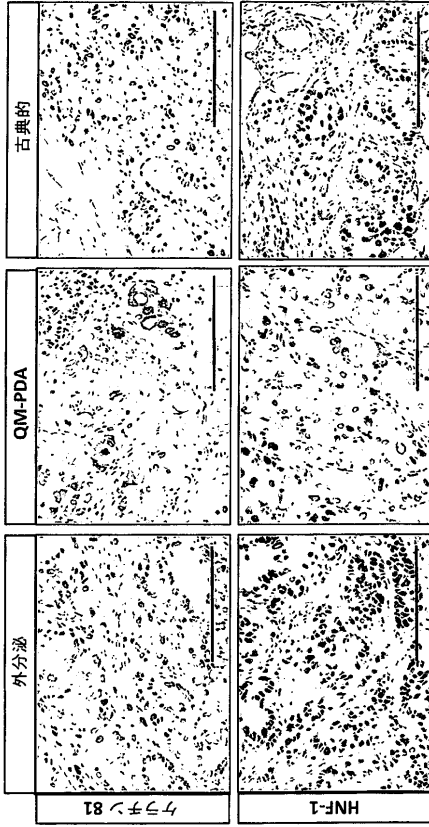
20

30

40

【 図 1 】

Fig. 1



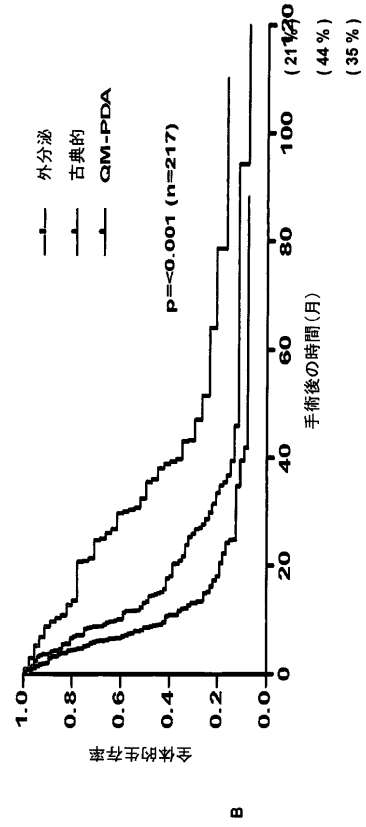
【 図 3 】

Fig. 3

マーカー	サブタイプ	ケース	全体の%	平均生存 (月)
HNF1A/B	外分泌様	46	21	43.5
KRT181	QM-PDA	79	36	16.5
DN	古典的	92	42	26.3
全体		217	100	15.6

【 図 2 】

Fig. 2



【 図 4 】

Fig. 4

年齢(平均)	64.7歳
性別	男性 78 (36) 女性 83 (38)
ステージ	T1 2 (0.9) T2 48 (22) T3 139 (63) T4 13 (6.2)
メタスタシス	N0 67 (30.8) N1 155 (71.4)
グレード	G1 6 (2.8) G2 15 (7.0) G3 133 (62.2)

【手続補正書】

【提出日】平成30年3月8日(2018.3.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

腫瘍試料におけるPDAC細胞のサブタイプ特異的検出のためのインビトロの方法であって、サブタイプ特異的マーカーの発現を、タンパク質又はかかるタンパク質をコードするオリゴヌクレオチドのいずれかとして検出するステップによって特徴づけられ、ここで、ケラチン81は、間葉系様サブタイプのPDAC細胞のためのマーカーであり、HNF-1Aは、外分泌様サブタイプの細胞のためのマーカーであり、そして古典的サブタイプのPDAC細胞は、ケラチン81及びHNF-1Aの欠如によって特徴づけられる、前記方法。

【請求項2】

古典的サブタイプのPDACが、(i) HNF-1A、HNF-1B、FOXA2 (HNF3B)、FOXA3 (HNF3G)、HNF4G、及びONECUT1 (HNF6) から選択される転写因子、(ii) HNF-1Aによって制御される1又は2以上の標的遺伝子、及び(iii) カドヘリン17 (CDH17) から選択される1又は2以上の追加のバイオマーカーの特異的発現の欠如を決定することによって同定される、請求項1に記載のインビトロの方法。

【請求項3】

HNF-1Aによって制御される1又は2以上の標的遺伝子が、SLC5A1、FGFR4、ANXA13、C11ORF9、TM4SF4、KIF12、RNASE4、UGT1A1、TCEA3、CDH17、SLC4A4、NR5A2、LGALS2、NR1H4、UGT1A6、GATA6、NPAS2、NFE2L2、FAM20C、TBXAS1、IGFBP1、CDAN1、GUCA2B、SLC3A1、FOXA2、STAT5B、MSH5、APOM、FXVD2、HPN、SEMA4G、ROBO3、SLC39A14、SLC7A9、NFIX、PDGFRA、RAB3IP、GC、ANPEP、CRB3、MSX2、MMP11、TLE4、SFRS7、SGK2、GUCA2A、SERPINA4、ALB、GJB1、SLC37A4、SPINK1、SLC12A2、TBL1X、SLC1A1、RBP4、ARHGAP12、NDST2、EML4、NEO1、THRA、PRDM1、LPP、PLS3、YES1、AFM、C14ORF138、BACE2、UBE3A、LRRRC19、AQP4、LRRFIP2、BPHL、C5、CYFIP2、SLC39A5、AXIN2、TMEM27、SULF2、MIA2、STAG2、TINAG、USP3、HABP2、CREB5、CLDN10、PURA、PRODH2、GRB7、AGT、TTR、SERPING1、MLL、及びTHAP11から選択される、1又は2以上のHNF-1A標的遺伝子である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記検出が、前記サブタイプ特異的マーカーの1つのエピトープへの検出抗体の結合に基づく、請求項1～3のいずれか1項に記載のインビトロの方法。

【請求項5】

以下のステップ：

- (a) 前記サブタイプ特異的マーカーの1つに特異的な検出抗体が前記エピトープと結合できる条件下にて、前記試料を前記検出抗体と接触させ；
- (b) 過剰の検出抗体分子を除去し；そして
- (c) 前記試料中で結合した検出抗体を検出すること

を含む、請求項 4 に記載のインビトロの方法。

【請求項 6】

前記検出抗体は、モノクローナル抗体；ポリクローナル抗体；組み換えによって産生されたキメラ抗体又はヒト化抗体を含む、組み換えによって産生された抗体；完全合成抗体；又は、前記抗体の 1 つの機能的断片である、請求項 4 又は 5 に記載のインビトロの方法。

【請求項 7】

検出抗体の結合は、第二抗体とのインキュベーションによって検出される、請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のインビトロの方法。

【請求項 8】

前記第二抗体は標識化された第二抗体である、請求項 7 に記載のインビトロの方法。

【請求項 9】

前記第二抗体は、マーカー分子で標識化される、請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のインビトロの方法。

【請求項 10】

前記第二抗体は、蛍光染料、生物学的に活性な酵素標識、放射活性標識、核磁気共鳴に活性な標識、発光性標識又は発色団による標識を用いて標識化される、請求項 9 に記載のインビトロの方法。

【請求項 11】

前記放射活性標識が、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{188}Rh 、 ^{131}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 及び ^{111}In からなる群から選択される、請求項 10 に記載のインビトロの方法。

【請求項 12】

抗体の結合が、免疫組織化学染色によって検出される、請求項 11 に記載のインビトロの方法。

【請求項 13】

前記検出が、前記サブタイプ特異的マーカーの 1 つをコードする mRNA を測定することに基づく、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のインビトロの方法。

【請求項 14】

前記検出が、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) によって前記サブタイプ特異的マーカーの 1 つをコードする mRNA を測定することに基づく、請求項 13 に記載のインビトロの方法。

【請求項 15】

前記試料は膵臓組織を含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のインビトロの方法。

【請求項 16】

前記試料は、哺乳類から得られる、請求項 15 に記載のインビトロの方法。

【請求項 17】

前記哺乳類がヒトである、請求項 16 に記載のインビトロの方法。

フロントページの続き

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

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100164563

弁理士 佐々木 貴英

(72)発明者 クリスティアン トーマス アイゼン

ドイツ連邦共和国, 6 9 1 2 0 ハイデルベルク, シュレーダー-シュトラッセ 2 8

(72)発明者 アンドレアス トルンプ

ドイツ連邦共和国, 6 9 1 1 5 ハイデルベルク, オーベラー ガイスベルクベーク 2 4

(72)発明者 マルティン ロナルト シュブリック

ドイツ連邦共和国, 6 9 1 3 1 ハイデルベルク, ラングゲバン 7 3

Fターム(参考) 4B063 QA13 QA19 QQ02 QQ08 QQ53 QQ79 QR36 QR48 QR62 QR72

QR77 QS02 QS07 QS25 QS33 QS34 QX01

【外国語明細書】

2018105876000001.pdf

专利名称(译)	用于胰腺导管腺癌亚型的新型生物标志物		
公开(公告)号	JP2018105876A	公开(公告)日	2018-07-05
申请号	JP2018019195	申请日	2018-02-06
[标]申请(专利权)人(译)	高帮鞋TEM杰玛酒店纽特粹惠GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tsongu		
申请(专利权)人(译)	高 - 干杰玛酒店纽特粹惠GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	クリスティアン トーマス アイゼン アンドレア ストルンプ マルティン ロナルト シュプリック		
发明人	クリスティアン トーマス アイゼン アンドレア ストルンプ マルティン ロナルト シュプリック		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/536 G01N33/53 C12Q1/68 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/158 G01N33/57438 G01N2800/52 G01N2800/56 C12Q1/6888 G01N2333/47 G01N2333/4742		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/536.B G01N33/536.C G01N33/53.Y C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00 C12Q1/68.ZNA C12Q1/68.AZN.A G01N33/48.M G01N33/50.P G01N33/68		
F-TERM分类号	4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS02 4B063/QS07 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01		
代理人(译)	青木 笃 渡边洋一 中岛胜 武井良太郎 隆英佐佐木		
优先权	2012007128 2012-10-12 EP		
其他公开文献	JP6683745B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

需要解决的问题：为胰腺导管腺癌 (PDAC) 亚型的鉴定和分层提供新方法。解决方案：提供肿瘤样本中PDAC细胞亚型特异性检测的体外方法，该方法以一步为特征检测亚型特异性标记物的表达，作为蛋白质或编码这种蛋白质的寡核苷酸，其中角蛋白81是准间充质亚型的PDAC细胞的标记物，HNF-1A是外分泌样亚型细胞的标记物。经典亚型的PDAC细胞的特征在于不存在角蛋白81和HNF-1A。图1：图1

