

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5969483号
(P5969483)

(45) 発行日 平成28年8月17日(2016.8.17)

(24) 登録日 平成28年7月15日(2016.7.15)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
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
A 6 1 K 31/4188 (2006.01)	A 6 1 K 31/4188
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00

請求項の数 8 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-529722 (P2013-529722)	(73) 特許権者	513072374
(86) (22) 出願日	平成23年9月22日 (2011.9.22)		カウンスル オブ サイエントイフィック
(65) 公表番号	特表2013-544497 (P2013-544497A)		アンド インダストリアル リサーチ
(43) 公表日	平成25年12月19日 (2013.12.19)		インド国, 110001 ニューデリー,
(86) 国際出願番号	PCT/IB2011/002205		ラフィ マーグ 2, アヌサンダン パワ
(87) 国際公開番号	W02012/038812		ン
(87) 国際公開日	平成24年3月29日 (2012.3.29)	(74) 代理人	100099759
審査請求日	平成26年7月23日 (2014.7.23)		弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	2270/DEL/2010	(74) 代理人	100077517
(32) 優先日	平成22年9月23日 (2010.9.23)		弁理士 石田 敬
(33) 優先権主張国	インド (IN)	(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 GBM患者の生存を予測するために有用なテモゾロミドによるTOP2A阻害

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

テモゾロミド治療を伴う放射線治療を受けることにより増加した生存率を有する膠芽細胞腫の患者を決定するためのインビトロ方法であって、以下のステップ：

前記膠芽細胞腫の患者由来の脳腫瘍組織細胞の試験サンプル中のTOP2A遺伝子の発現レベルを決定し、

公知の正常な脳組織細胞中の対照サンプル中のTOP2A遺伝子の発現レベルを決定し、

前記試験サンプル及び対照サンプル中の前記TOP2Aのレベルを比較し、そして

前記試験サンプル中の前記TOP2Aの発現レベルが、対照サンプル中の前記TOP2Aのレベルよりも高い場合、前記膠芽細胞腫の患者が、前記テモゾロミド治療を伴う放射線治療を受けることにより増加した生存率を有すると決定する

ことを含む、方法。

【請求項2】

前記膠芽細胞腫の患者が、さらに手術を受けている、請求項1に記載のインビトロ方法。

【請求項3】

前記遺伝子の発現レベルの決定が、インサイチュハイブリダイゼーション若しくはRTPCR分析などの核酸ベースの検出方法においてオリゴヌクレオチドを使用することにより前記遺伝子のmRNA転写産物のレベルを決定すること、又は任意により、免疫組織

化学、E L I S A若しくはウェスタンブロット分析などのタンパク質ベースの検出方法において抗体を使用することにより前記遺伝子のそれぞれのタンパク質のレベルを決定することを含む、請求項1に記載のインビトロ方法。

【請求項4】

膠芽細胞腫の患者におけるテモゾロミドの細胞毒性を検出するためのインビトロ方法であって、ここで、低濃度のT O P 2 Aタンパク質を有する細胞が、高濃度のT O P 2 Aを含む細胞よりもテモゾロミドに対してより低い感受性である、方法。

【請求項5】

テモゾロミド治療を受けるヒト対象における膠芽細胞腫の前記予後を決定するためのキットであって、前記キットが、以下：

- a) 付随及び循環アジュバントテモゾロミド治療を伴う放射線治療を受ける際に、T O P 2 A遺伝子の発現のレベルを特異的に検出することができる試薬；及び
- b) 付随及び循環アジュバントテモゾロミド治療を伴う放射線治療を受ける前記ヒト対象における膠芽細胞腫の予後を決定するための前記キットを使用するための説明書を含む、キット。

【請求項6】

前記試薬が、前記遺伝子のm R N Aと相補的な核酸プローブを含む、請求項5に記載のキット。

【請求項7】

前記試薬が、前記遺伝子によってコードされるタンパク質と特異的に結合する抗体を含む、請求項5に記載のキット。

【請求項8】

テモゾロミド治療を伴う放射線治療を受けることにより増加した生存率を有する請求項1で決定した膠芽細胞腫の患者を治療するためのテモゾロミドを含む、T O P 2 A阻害剤

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、膠芽細胞腫の患者の生存を予測するために有用な、テモゾロミドによるトポイソメラーゼIIアルファ(T O P 2 A)阻害に関する。

【0002】

より特に、本発明は、T O P 2 A転写産物(t r a n s c r i p t)レベルがテモゾロミド治療に対する膠芽細胞腫の化学療法感受性を決定することを示し、従って、非常に高いレベルのT O P 2 A転写産物が、テモゾロミド化学療法を受けるG B M患者において、良好な予後指標となることを説明する。

【背景技術】

【0003】

膠芽細胞腫(グレード4の星状細胞腫)は、最も悪性の及び最も一般的な原発性成人脳がんである(Furnariら、2007)。これらの腫瘍の極めて異種性の及び浸潤性の性質が完全切除を事実上不可能にし、従って術後の処置様式にかかわらず、生存期間の中央値は非常に悪い。術後の放射線治療単独では、非常にわずかな延命効果のみを与える一方で、放射線治療にニトロソウレアベースの化学療法の追加では、40%~46%などの6%の1年生存率の増加、及び生存期間の中央値の2月増加の軽度の利益を与えた(Stewart, 2002)。E O R T C N C I C試験の5年間の解析は、標準術後放射線治療に付随及び循環(c o n c o m i t a n t a n d c y c l i c a l)アジュバントテモゾロミド(D N Aアルキル化剤)の追加が、術後の放射線治療のみと比較して、生存期間の中央値及び2年生存率を有意に改善したことを示した(Stuppら、2009)。全体の生存率は、テモゾロミドありで、2年で27.2%、3年で16.0%、4年で12.1%、及び5年で9.8%であるのに対して、放射線治療のみでは、それぞれ10.9%、4.4%、3.0%、及び1.9%であった(Stuppら、2009)。さらに、生存期間の中央値は、12.1月

10

20

30

40

50

～14.6月に増加した(Stuppら、2009)。より重要なのは、MGMTプロモーターのメチル化が、テモゾロミド化学療法からの成果及び利益のための最も強い予測因子となることを見出したことである(Stuppら、2009)。無進行生存率の解析は、テモゾロミド及び放射線治療で処置された、メチル化されたMGMTプロモーターを有する腫瘍の患者についてのみ利益を示した。

【0004】

これらの知見は、より良好なテモゾロミド化学療法反応を有する患者のサブクラスを識別する特定の遺伝子特徴の存在を示唆する。

【0005】

本発明において、前向き研究は、患者を標準選択/除外基準で選択し、そして一定の治療プロトコルに供して実施され、そしてそれは、腫瘍の最大限安全な切除に続いて付随及び循環アジュバントテモゾロミド治療を伴う放射線治療を含む。患者の生存データは、発現特徴が生存を予測できる遺伝子を同定するための腫瘍の遺伝子発現プロファイルと関連する。本発明者等は、本明細書で、患者の生存に関してGBMにおける高いトポイソメラーゼIIアルファ(TOP2A)転写産物の影響に関する本発明者等の結果を報告する。本発明者等はさらに、テモゾロミドがインビトロでTOP2A活性を阻害し、そしてグリオーマ細胞におけるTOP2Aのサイレンシングがテモゾロミド耐性をそれらに与えることを機能性試験により示す。星状細胞腫のグレードにわたってTOP2A及びトポイソメラーゼの他のアイソフォームの評価をまた、グリオーマにおけるそれらの役割を明らかにするために行った。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の主な目的は、予後マーカー、TOP2Aを提供することであり、そしてそれは、膠芽細胞腫の患者に与えられる化学療法処置の種類を予測するために有用である。

【0007】

本発明の他の目的は、ヒト対象における膠芽細胞腫の予後決定方法を提供し、ここで前記方法は、手術を受けそしていつでも付随及び循環アジュバントテモゾロミド治療を伴う放射線治療を受けることができるヒト対象から得た脳腫瘍組織細胞の試験サンプルにおけるTOP2A遺伝子の発現レベルと、公知の正常な脳組織細胞の対照サンプルにおけるTOP2A遺伝子の発現レベルとを決定することを含み、ここで、対照サンプルと比べて試験サンプルにおけるTOP2Aのより高い発現レベルが、試験サンプルを得たヒト対象における膠芽細胞腫の良好な予後及びより良好な生存を示す。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、予後マーカー及びヒト対象における膠芽細胞腫の予後決定方法を提供し、ここで前記方法は、手術を受けそしていつでも付随及び循環アジュバントテモゾロミド治療を伴う放射線治療を受けることができるヒト対象から得た脳腫瘍組織細胞の試験サンプルにおけるTOP2A遺伝子の発現レベルと、公知の正常な脳組織細胞の対照サンプルにおけるTOP2A遺伝子の発現レベルとを決定することを含み、ここで、対照サンプルと比べて試験サンプルにおけるTOP2Aのより高い発現レベルが、試験サンプルを得たヒト対象における膠芽細胞腫の良好な予後及びより良好な生存を示す。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1Aは、TOP2Aの発現とGBMの患者の生存である。102人のGBM患者に関する Kaplan-Meier 生存推定値(Kaplan Meier survival estimate)を、TOP2A転写産物レベルについて計算する。単変量解析におけるTOP2Aについての陽性群(log2比(ratio) 9.25; n=34)及び陰性群(log2比(ratio) < 9.25; n=68)に関する生存曲線。TOP2Aについて陽性である場合(緑線)は、陰性である場合(青線)よりもより良い生存

10

20

30

40

50

を有する。図1Bは、異なるグレードの星状細胞腫におけるTOP2Aの転写産物レベルの散布図である。表示されたサンプルのRT-qPCR分析から得られた対数変換された遺伝子発現比を、TOP2Aについて示す。それぞれの群における水平線は、中央値を示す。

【図2】図2は、異なるグレードの星状細胞腫におけるトポイソメラーゼファミリーメンバーの転写産物レベルの散布図である。表示されたサンプルのRT-qPCR分析から得られた対数変換された遺伝子発現比を、TOP1(A)、TOP2B(B)、TOP3A(C)、TOP3B(D)及びTOPORS(E)について示す。それぞれの群における水平線は、中央値を示す。

【図3】図3Aは、エトポシドがTOP2Aによるプラスミド緩和活性を阻害することを示す。TOP2A酵素によるプラスミド緩和アッセイを、エトポシドの非存在下(レーン2)、又は高濃度のエトポシド(レーン3~5)、又はエタノール(溶媒対象)(レーン6)で実施した。図3Bは、テモゾロミドがTOP2Aによるプラスミド緩和活性を阻害することを示す。TOP2A酵素によるプラスミド緩和アッセイを、テモゾロミドの非存在下(レーン2)、又は高濃度のテモゾロミド(レーン3~4)、又はDMSO(溶媒対象)(レーン5)で実施した。図3Cは、TOP2AのsiRNAノックダウンを示す。細胞溶解物を、対照(シクロフィリン)及びTOP2AのsiRNA処理48時間後から調製し、そして等量のタンパク質を、表示された抗体で免疫プロットに供した。図3Dは、TOP2Aの下方制御がエトポシド化学療法に対するグリオーマ細胞耐性を与えることを示す。シクロフィリン(赤)又はTOP2A(青)いずれかのsiRNAで形質移入したU251細胞を、表示された濃度のエトポシドで処理し、そして生細胞の比率を48時間後にMTTアッセイにより定量した。対照及びTOP2AのsiRNA処理細胞の生存率(%)における差に関するt検定を評価し、そしてP値は、それぞれ2、4、8及び16µg/mL; p=0.0297、0.0336、<0.0001、及び0.042である。図3Eは、TOP2Aの下方制御がテモゾロミド化学療法に対するグリオーマ細胞耐性を与えることを示す。本実験を「D」と同じように実施したが、細胞はテモゾロミドで処理した。対照及びTOP2AのsiRNA処理細胞の生存率(%)における差に関するt検定を評価し、そしてP値は、それぞれ250、500、1000及び2000µM; p=0.0668、0.0097、0.0687、及び0.0134である。

【図4】図4は、グリオーマ細胞株におけるトポイソメラーゼファミリーメンバーの転写産物レベルを示す。グリオーマ細胞株由来のRNAのリアルタイム逆転写定量PCR分析から得られた対数変換された遺伝子発現比(淡いピンクバー、細胞株の左から右の順:LN18、LN229、U138、U251、U343、U373、U87)を、TOP1、TOP2A、TOP2B、TOP3A、TOP3B、及びTOPORSについて示す。それぞれのバーは、1つのサンプル由来のデータを示す。それぞれのサンプルにおいて、遺伝子発現における倍率変化を、正常な脳サンプル(濃ピンクバー)におけるその平均発現と比較して計算する。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明は、膠芽細胞腫の患者の生存を予測するために有用な、テモゾロミドによるTOP2A阻害を提供する。本発明は、テモゾロミド化学療法を受ける患者においてGBMに関する予後マーカーを識別するための方法に関する。

【0011】

従って、本発明は、膠芽細胞腫のインピトロにおける予後決定方法を提供し、ここで、前記方法は、試験サンプル及び対照サンプルにおけるTOP2A遺伝子の発現のレベルを決定することを含み、ここで、対照サンプルに比べて試験サンプルにおけるTOP2Aの発現のより高いレベルが、膠芽細胞腫の良好な予後を示す。

【0012】

本発明の一つの実施態様において、試験サンプルは、手術を受け、そしていつでも付随及び循環アジュバントテモゾロミド治療を伴う放射線治療を受けることができるヒト対象

10

20

30

40

50

から得た脳腫瘍組織細胞である。

【0013】

本発明の他の実施態様において、前記遺伝子の発現レベルの決定は、インサイチュハイブリダイゼーション若しくはRT-PCR分析などの核酸ベースの検出方法においてオリゴヌクレオチドを使用することにより前記遺伝子のmRNA転写産物のレベルを決定すること、又は任意により、免疫組織化学、ELISA若しくはウェスタンブロット分析などのタンパク質ベースの検出方法において抗体を使用することにより前記遺伝子の個別のタンパク質のレベルを決定することを含む。

【0014】

本発明のさらに他の実施態様において、膠芽細胞腫患者におけるテモゾロミドの細胞毒性の決定方法であり、ここで低濃度のTOP2Aタンパク質を有する細胞は、高濃度のTOP2Aを含む細胞よりもテモゾロミドに対してより少ない感受性である。

10

【0015】

本発明のさらに他の実施態様において、テモゾロミド治療を受けるヒト対象における膠芽細胞腫の予後を決定するためのキットであり、ここで前記キットは以下：

- a) 付随及び循環アジュバントテモゾロミド治療を伴う放射線治療を受ける際に、TOP2A遺伝子の発現のレベルを特異的に検出することができる試薬；及び
- b) 付随及び循環アジュバントテモゾロミド治療を伴う放射線治療を受ける前記ヒト対象における膠芽細胞腫の予後を決定するための前記キットを使用するための説明書

20

【0016】

本発明のさらに他の実施態様において、キット中の試薬は、前記遺伝子のmRNAに相補的な核酸プローブを含む。

【0017】

本発明のさらに他の実施態様において、キット中の試薬は、前記遺伝子によりコードされるタンパク質に特異的に結合する抗体を含む。

【0018】

前向き研究は、患者を標準選択/除外基準で選択し、そして一定の治療プロトコールに供して実施され、そしてそれは、腫瘍の最大限安全な切除に続いて付随及び循環アジュバントテモゾロミド治療を伴う放射線治療を含む。患者の生存データは、発現特徴が生存を予測できる遺伝子を同定するための腫瘍の遺伝子発現プロファイルと相関する。患者の生存に関してGBMにおける高いトポイソメラーゼIIアルファ(TOP2A)転写産物の影響に関する結果を、本明細書で報告する。テモゾロミドがインビトロでTOP2A活性を阻害し、そしてグリオーマ細胞におけるTOP2Aのサイレンシングがテモゾロミド耐性をそれらに与えることを機能性試験によりさらに示す。星状細胞腫のグレードにわたるTOP2A及びトポイソメラーゼの他のアイソフォームの評価をまた、グリオーマにおけるそれらの役割を明らかにするために行った。

30

【実施例】

【0019】

以下の実施例は、本発明の例示のために与えられ、従って本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

40

【0020】

実施例 1

腫瘍サンプルの採取

腫瘍サンプルを、インド バンガロールのSri Sathya Sai Institute of Higher Medical Sciences(SSSIHMS)とNational Institute of Mental Health and Neuroscience(NIMHANS)で手術した患者から採取した。難治性てんかんのための手術中に得られた正常な脳組織(前側頭葉)を、対照サンプルとして使用した。試験は、2つの臨床センターの倫理委員会により精査され及び承認され、そして患者の同意は、I

50

ECガイドライン及び承認の通りに試験の開始前に取得した。

【0021】

実施例2

細胞株、siRNA及び形質移入

U373、U138、LN18、LN229、U343、U87、K562、U251及びSVG細胞を、37、5%CO₂を有する加湿雰囲気、それぞれ10%ウシ胎児血清、ペニシリン及びストレプトマイシンを有するDMEM中で培養した。ヒトTOP2A及びシクロフィリンの二本鎖siRNAを設計し、Dharmacon Research (Lafayette, CO)により化学的に合成した。SMARTpool siRNAは、TOP2Aの違ったコード領域配列 (Genbank (商標) アクセション番号NM_001067) を標的とする4つの異なる二本鎖siRNAの混合物である。二本鎖siRNAを、1xユニバーサルRNAオリゴ緩衝液 (20mMのKCl、6mMのHEPES KOH (pH7.5)、0.2mMのMgCl₂) 中に溶解した。siRNA形質移入 (200nM) を、Dharmafect (Dharmacon Research) を使用してメーカーの説明通りに行った。

10

【0022】

実施例3

細胞生存能力アッセイ

化学療法感受性アッセイのために、細胞をプレートに蒔いた24時間後に、細胞を細胞毒性薬剤で処理し、そして37、5%CO₂で45時間インキュベートした。この時点で、MTT (20μL (5mg/mL)) を細胞に添加した。MTT添加3時間後、ホルマザン結晶をDMSO (200μL) に溶解し、そして550nmでの吸光度として測定した。対照細胞による吸光度を、100%であると考え、そしてすべてのサンプルを対照細胞に対して規格化した。すべてのアッセイを3連で行った。

20

【0023】

実施例4

RNAの単離及びRT-qPCR

全RNAをTRI Reagent (Sigma, USA) を使用して凍結組織から抽出した。RNAサンプルを、分光光度計を使用して吸光度を測定することにより定量し、そして品質保証のために、MOPSホルムアルデヒドゲル上で可視化した。選択した遺伝子の発現レベルの相対定量を、以下の2ステップ方法を使用して行った。第一ステップにおいて、cDNAを、cDNA Archive kit (ABI PRISM) を使用して、異なる組織サンプル由来のRNAから生成し; 続いて、リアルタイム定量PCRを、cDNAをテンプレートとして、遺伝子特異的プライマーセット及びSYBRグリーン色素を含むDynamo kit (Finnszyme, Finland) を使用して、ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems) 配列決定システムで行った。すべての測定を、3連で行った。GARS (グリシル tRNA合成酵素)、AGPAT1 (1-アシルグリセロール 3-リン酸 O-アシルトランスフェラーゼ1)、ATP5G1 (ATP合成酵素、H⁺輸送、ミトコンドリアF₀複合体、サブユニットC1 (サブユニット9)) 及びRPL35A (リボソームタンパク質L35a) 遺伝子を、それらの発現レベルがアレイ試験において不変であることを見出したので内部対照として使用した。てんかん患者からの正常な脳組織サンプルを、参照として使用した。デルタデルタCT法を、比率の計算のために使用した。使用するRT-PCRプライマーの配列及び条件を、要求に応じて提供する。図1B、並びに2A、B、C、D及びEにおけるそれぞれのドットは、内部参照遺伝子で規格化後、1つのサンプル由来の転写産物レベルの中央値を示す。すべての群 (正常、DA、AA及びGBM) のRNA発現レベル (log₂比) を、正規分布について試験し、そしてそれらが、正常に分布していないことを見出した。結果を、平均log₂比±SDの形式で表した。群間の比較を、クラスカルウォリス (Kruskal Wallis) の一元配置分散分析を使用して実施し、そしてさらにサブグループ内の比較を、SPSSバージョン16.0ソフトウェアを使用して、ボンフ

30

40

50

エローニ補正事後 (adjusted post hoc) 検定で実施した。

【0024】

実施例 5

ウェスタンブロットティング

細胞株由来のタンパク質溶解物を、RIPA緩衝液中で調製し、そして総タンパク質の等量を、ブラッドフォード試薬により定量後、イムノブロットティングのために使用した。次の抗体 (TOP2A (Dakocytomation; Cat#M7186; 1:250) 及びアクチン (Sigma; Cat#A3854; 1:25000)) を、本試験について使用した。

【0025】

実施例 6

TOP2A酵素アッセイ

TOP2A活性を、プラスミド緩和アッセイを使用してインビトロで測定した。簡単に言えば、緩和アッセイは、トポイソメラーゼII反応緩衝液 (50mM Tris Cl (pH8.0)、150mM KCl、10mM MgCl₂、5mM ATP、0.5mM DTT、30µg/ml BSA) の最終容量30µl中に、プラスミドDNA (pBR322; 200ng/反応物) 及び2ユニットのTOP2A (Topgen Cat#200H₂) を含む。反応物を37℃で30分間、インキュベートし、そして2.5µlのローディング色素 (30%グリセロール及び0.25%プロモフェノールブルー) の添加により反応を停止した。サンプルを1%ネイティブアガロースゲル (インターカレーターなし) 上で分析した。ゲルを、エチジウムブロマイドで10~15分間染色した。エトポシド又はテモゾロミドの効果を決定するために、反応混合物中に特定量を添加した。

【0026】

実施例 7

免疫組織化学 (IHC)

腫瘍組織及び対照サンプルからパラフィン切片 (4µm) を、シランコートスライド上に採取し、そしてTOP2Aのタンパク質発現を、127サンプル (16DA、21AA、77GBM、及び13対照サンプル) に関して、免疫組織化学 (IHC) により評価した。脱パラフィン切片の熱誘導抗原回復 (heat induced antigen retrieval) を、クエン酸緩衝液 (10mM、pH6.0) 中で、600Wで30~35分間、マイクロ波オープンで行った。最初のプロセッシングステップ後、切片を、TOP2A (Dakocytomation; Cat#M7186、1:60希釈) 一次抗体で、室温で一晩、インキュベートした。これは、次に超高感度非ビオチンHRP検出システム (QD440 XAK、Biogenex、USA) でのインキュベーションを行う。3,3'-ジアミノベンジジン (Sigma Aldrich、St. Louis、U.S.A.) を、発色物質として使用した。顕著に増加したTOP2AのmRNAレベルを示した腫瘍を、陽性対照として供給した。一次抗体を除いた陰性対照スライドを、染色のそれぞれのバッチと組み合わせた。核及び細胞質染色の両方を認めた。核及び細胞質の免疫組織化学染色を、0~2の3ポイントスケールに関して、半定量的にスコア化し、ここで腫瘍の中心部内で、0 = 非染色、1+ = 弱染色、及び2+ = 強染色である。2+の核及び細胞質陽性のみ、分析のために考慮した。免疫陽性を、それぞれの腫瘍標本由来の1000超の細胞で評価した。標識指数 (labeling index) (LI) を、カウントした全細胞のうち、2+染色を示した細胞のパーセンテージとして表す。

【0027】

実施例 8

IHCデータに関する統計分析

すべての連続変数を、正規分布について試験し、そしてそれらは、非正規であることを見出した。グレード特異的発現パターンを決定するために、非パラメトリック検定、クラスカルウォリスの順位の一元配置分散分析を、IHCによって評価したデータで実施した。4つの群すべての平均間の有意差を、一元配置分散分析の後に多重比較のためのボン

10

20

30

40

50

フェローニ補正事後検定により決定した。結果を、平均 $LI \pm SD$ の形式で表す。すべての分析を、SPSSバージョン15.0を使用して実施した。

【0028】

実施例9

腫瘍サンプル

腫瘍サンプルを、インド バンガロールの Sri Sathya Sai Institute of Higher Medical Sciences (SSSIHMS) と National Institute of Mental Health and Neuroscience (NIMHANS) で手術した患者から採取した。難治性てんかんのための手術中に得られた正常な脳組織(前側頭葉)を、対照サンプルとして使用した。試験は、2つの臨床センターの倫理委員会により精査され及び承認され、そして患者の同意は、IECガイドライン及び承認の通りに試験の開始前に取得した。組織を二等分し、そして半分を液体窒素中で瞬間凍結し、そしてRNAの単離まで-80で保存した。他の半分を、ホルマリンで固定し、そしてパラフィン切片に処理した。これらを、星状細胞腫及び免疫組織化学の病理組織学的グレーディングのために使用した。172の膠芽細胞腫(GBM)、54の悪性星状細胞腫(グレードIII(AA))、30のびまん性星状細胞腫(グレードII(DA))、及び20の正常対照を含む全部で276サンプルを、本試験で使用した。172のGBMサンプル中102が、標準化処置プロトコル(詳細は後述)を受けたGBM患者の前向き選択コホートに由来する。TOP2Aのタンパク質発現を、127サンプルでIHCにより腫瘍組織切片上で分析した。

【0029】

実施例10

生存とTOP2AのmRNAレベルとの相関関係

2つの臨床センター(NIMHANS/SSSIHMS)で手術を受けた新たに診断された膠芽細胞腫患者($n=102$)を、前向き試験に含んだ。倫理委員会による承認及び患者の同意を、試験を開始する前に取得した。患者を以下の組み入れ基準: 1) テント上大葉性腫瘍(supratentorial lobar tumor) 成人患者(年齢18~65歳の間)、2) 術後のMRIスキャン上で認められた最小限の残留物を有する、腫瘍の最大限安全な切除を受けた患者、3) 術後のカルノフスキーのパフォーマンススコア(KPS) 70を有する患者に基づいて採用した。

【0030】

すべての患者は、腫瘍の最大限安全な切除を受けた。すべての患者は、45日間毎日継続して100mg/日の用量で投与されるテモゾロミド(temozolamide)での付随する化学療法に加えて、33分割で総線量59.4Gyを照射する放射線治療からなる統一されたアジュバント治療を受けた。続いて、28日毎に5日間、150mg/m²(体表面積)の用量のテモゾロミド(temozolamide)で循環化学療法5サイクルを投与した。患者を臨床的及びMR画像で追跡調査した。最大の追跡調査期間は、34月であった。

【0031】

結果と考察

高いTOP2AレベルがGBM患者において良好な予後指標である

102のGBM患者のコホートを前向き試験に採用し、そして標準処置プロトコル(方法で説明した通り)により管理した。この群に関するすべての生存期間の中央値は、16月であると分かった(カプランマイヤー分析)。本コホートにおいて、予想通り、年齢は、コックス回帰分析($p=0.037$; $HR=1.023$; $B=0.022$)で認められたように、予後不良の重要な予測因子であった。興味深いことに、TOP2AのmRNAの発現が、GBM患者における予後と有意に相関したことを認め; より高いTOP2A転写産物レベルが、より良好な予後を予測した($P=0.043$; $HR=0.889$; $B=-0.117$; コックス回帰分析)。生存に関するTOP2A転写産物レベル及び年齢の影響を、コックス比例ハザードモデルによりさらに評価して、生存に関するTOP2A

10

20

30

40

50

の独立した影響を導き出した。年齢 ($p = 0.033$; $HR = 1.023$; $B = 0.023$) 及び TOP2A 転写産物レベル ($P = 0.035$; $HR = 0.888$; $B = -0.119$) の両方が、多変量解析による有意な予測因子であることを認めた。さらなる分析に関して、TOP2A の mRNA の発現を二分して、予後の予測についてカットオフを明らかにした。TOP2A の mRNA レベル $< 9.251 \log 2$ 比を有する患者は、mRNA レベル $9.251 \log 2$ 比を有する患者と比較した場合、有意により不良な予後を有することを報告する (それぞれ 13 月対 22 月の生存期間の中央値) (図 1A)。

【0032】

星状細胞腫における TOP2A 及び他のトポイソメラーゼファミリーメンバーの制御

膠芽細胞腫及び他のより低いグレードの星状細胞腫における、TOP2A 及びトポイソメラーゼファミリーの他のメンバーの発現の制御に関連するさらなる研究を行った。TOP2A の転写産物レベルが、DA、AA 及び正常な脳サンプルと比較して、GBM において非常に高いレベルに有意に上方制御されることを本明細書で報告する (図 1B; 表 1A)。星状細胞腫において悪性腫瘍のグレードの昇順とともに TOP2A の細胞質の発現の減少はあったが、TOP2A タンパク質の有意に増加した発現 (核) を、他のグレードと比較して膠芽細胞腫において観察した (表 1B)。同様に、TOP2B 転写産物レベルがまた、DA、AA 及び正常な脳サンプルと比較して、GBM において上方制御されることを見出した (図 2B、表 1A)。さらに TOP3A 転写産物レベルがまた、DA 及び AA と比較して GBM において上方制御されることを見出した (図 2C; 表 1A)。これらの遺伝子とは違って、TOPORS の転写産物レベルは、正常な脳サンプルと比較して悪性腫瘍の星状細胞腫 (AA 及び GBM) において有意に下方制御されることを見出した (図 2E; 表 1A)。他のトポイソメラーゼのメンバー、TOP1 及び TOP3B は、グリオーマの異なるグレードにわたって制御差異を示さなかった (図 2A 及び D)。同様に、良好な相関について、グリオーマ由来の確立された細胞におけるトポイソメラーゼファミリー遺伝子の同様の制御を見出した (図 4)。

【0033】

10

20

【 表 1 】

表 1 A : 異なるグレードのグリオマーにおけるTOP2A, TOP2B, TOP3A及びTOPORSの転写産物レベルの統計解析

バイオ マーカー	正常	DA (グレードII)	AA (グレードIII)	GBM (グレードIV)	*ボンフェローニ 補正事後検定		クラスカル -ウオリス検定	
					P値	P値	χ^2	P値
TOP2A	0.0005 ± 1.2871 (n=20)	5.1479 ± 1.7693 (n=28)	5.7798 ± 1.9201 (n=50)	7.9436 ± 2.2517 (n=156)	$\alpha < 0.0001$ $\beta < 0.0001$ $\gamma < 0.0001$ $\varepsilon < 0.0001$ $\eta < 0.0001$	107.4229	< 0.0001	
TOP2B	1.4999 × 10 ⁻⁸ ± 1.7343 (n=7)	-0.5126 ± 2.0461 (n=8)	1.6853 ± 1.3852 (n=26)	5.6108 ± 1.4358 (n=44)	$\gamma < 0.0001$ $\delta = 0.0166$ $\varepsilon < 0.0001$ $\eta < 0.0001$	60.7461	< 0.0001	
TOP3A	7.1485 × 10 ⁻⁷ ± 1.4654 (n=7)	-0.2967 ± 0.6329 (n=8)	-1.7894 ± 1.1239 (n=26)	0.5702 ± 1.2842 (n=44)	$\beta = 0.0394$ $\delta = 0.0070$ $\eta < 0.0001$	36.7250	< 0.0001	
TOPORS	-0.2286 ± 1.2823 (n=6)	-3.5518 ± 4.2444 (n=7)	-3.9898 ± 3.6838 (n=23)	-3.8809 ± 2.4994 (n=44)	$\beta < 0.0001$ $\gamma = 0.0010$	15.5610	0.0013	

* 有意なP値を示すボンフェローニ事後分析検定； α : 正常対DA； β : 正常対GBM； δ : 正常対GBM； ε : DA対GBM；
 η : AA対GBM； それぞれの群で使用されるサンプル数を「n」で示す。

【 0 0 3 4 】

10

20

30

40

【表 2】

表 1 B : TOP2Aの標識指数 I (IHC) における個々の群の差

バイオマーカー	正常 (n=13)	DA (グレードII) (n=16)	AA (グレードIII) (n=21)	GBM (グレードIV) (n=77)	クラスカル- ウォリス検定: χ^2 ; P値	事後P値*
	平均値±標準偏差 (0.0000)	平均値±標準偏差 (5.0000)	平均値±標準偏差 (5.0000)	平均値±標準偏差 (20.000)		
TOP2A2+核	0.0000±0.0000 (0.0000)	8.4375±8.107353 (5.0000)	6.66667± 8.416254 (5.0000)	17.07792± 10.52412 (20.000)	42.313; <0.0001	€<0.0001 &=0.0115 # =0.0009
TOP2A2+細胞質	0.0000±0.0000 (0.0000)	11.25±7.637626 (10.0000)	9.761905± 9.679384 (5.0000)	4.025974± 7.391272 (0.000)	32.322; <0.0001	€=0.2064 &=0.0001 # =0.0083

括弧内の値は中央値である；*太字で有意なP値を示すボンフェローニ補正事後検定；€=正常対GBM、&=DA対GBM、#=AA対GBM

10

20

30

40

【0035】

テモゾロミドはTOP2A活性を阻害する

高いTOP2Aレベルを有するがん細胞が、細胞増殖へのなんらかの影響なしにエトボシドなどのTOP2A阻害剤に対してより敏感であることが示されてきた(Haoら、2000; Asanoら、1996; Zhouら、2001)。本発明者等の結果が、高いレベルの腫瘍のTOP2Aを有するGBM患者が、テモゾロミド化学療法に対してより良好な反応を示すので、テモ

50

ゾロミドがTOP2A阻害剤かもしれないという仮説を立てた。この可能性を試験するために、本発明者等は、テモゾロミドの存在下でスーパーコイルプラスミドDNAを緩和するTOP2A酵素(170kDa)の能力を評価するTOP2A酵素アッセイを実施した。TOP2A酵素は、スーパーコイルプラスミドDNAを非常に効率的に緩和した(図3Aのレーン2と1との比較)。この反応への公知のTOP2阻害剤であるエトポシドの添加は、濃度依存的態様で非常に効率的にTOP2A緩和活性を阻害する(図3Aのレーン5, 4及び3と2との比較)。興味深いことに、テモゾロミドの添加はまた、TOP2A緩和活性を効率的に阻害する(図3Bのレーン3及び4と2との比較)。従って、これらの結果は、テモゾロミドがTOP2A阻害剤であることを示す。

【0036】

TOP2Aのノックダウンはグリオーマ細胞における化学療法耐性を与える

本発明者等の結果は、テモゾロミドが、TOP2A酵素活性を阻害し、そして高い腫瘍のTOP2Aを有するGBM患者が、テモゾロミド化学療法に対してより良好に反応することを示したので、TOP2Aの下方制御が、テモゾロミドに対する耐性をグリオーマ細胞に与えると仮説を立てた。TOP2A特異的siRNAの形質移入は、U251グリオーマ細胞において、TOP2Aタンパク質レベルを効率的に低減した(61%) (図3C)。TOP2A特異的siRNAで形質移入したU251細胞は、シクロフィリンsiRNAの形質移入と比較して、テモゾロミド処置に対して有意に耐性であることを見出した(図3E)。他で示したように、エトポシドは、シクロフィリンsiRNA形質移入細胞よりもTOP2AのsiRNA形質移入細胞を効率悪く阻害した(図3D)。従って、これらの結果は、テモゾロミドがTOP2A経路を通じて、その阻害をおそらく引き起こすことにより働き、そして高いTOP2Aレベルがテモゾロミド化学療法に対する感受性を提供することを示唆する。

【0037】

所定の治療様式についての利益を予測することは、がん生物学において困難な課題のままであり、そして個別化した抗がん治療のために非常に重要である。GBM患者の予後を改善するための、放射線治療計画及び線量、並びにニトロソウレアベースの化学療法などのさまざまな試みでは、最小限の成功のみしか得られなかった(Stewart, 2002)。付随及び循環アジュバント治療として放射線治療と組み合わせた場合、テモゾロミドは、GBM患者の生存期間を増加することが確立されている(Hartら、2008)。興味深いことに、腫瘍においてメチル化されたMGMTプロモーター遺伝子を有するGBM患者は、より良好な生存期間を有する(Stuppら、2009)。テモゾロミドの細胞毒性は、主にグアニンの6位の酸素原子のメチル化を通じて仲介する。このDNA損傷が、MGMTにより素早く修復されるため、MGMTの後成的な(epigenetic)サイレンシングは、テモゾロミドなどのアルキル化剤での化学療法からの利益を享受するための予測因子として提案されてきた。従って、MGMTプロモーターのメチル化は、テモゾロミド及び放射線治療での処置から最も利益を享受する患者の選択を可能にするGBM腫瘍における最初の予測バイオマーカーであると思われる(Stuppら、2009)。これらの結果から、化学療法に対する腫瘍の反応を予測するための分子マーカーの使用は、非常に重要であると思われる。

【0038】

付随及びアジュバントテモゾロミド化学療法で処置したGBM患者における遺伝子の発現の予後的意義の評価に関して、TOP2AのmRNAの発現が、より高いTOP2A転写産物レベルを有するGBM患者における予後と相関し、より良好な予後を予測することを見出した。特に、腫瘍のTOP2A転写産物レベル $9.25 \log_2$ 比を有するGBM患者は、腫瘍のTOP2A転写産物レベルが $9.25 \log_2$ 比未満のGBM患者よりもより良好な生存を有する。なぜ高いTOP2Aレベルを有する腫瘍が、テモゾロミド治療に対してより良好に反応するのかを研究することが、本発明者等の目的であった。TOP2Aは、転写、組み換え、複製及び細胞分裂の間の染色体の分離を含むDNA代謝のさまざまな重要なプロセスの間の、DNAのトポロジカルな状態を制御するDNAトポイソ

10

20

30

40

50

メラーゼ酵素をコードする (Jarvinen及びLiu, 2003)。真核性のトポイソメラーゼ I I (topo II) は、ヒト細胞中に2つのアイソフォーム (主要なものは、170 kdのトポイソメラーゼ I I アルファ (topo II) 及び180 kdのトポイソメラーゼ I I ベータ (I I) である) で存在するホモ二量体酵素である (Wang, 1996)。これらの2つの酵素はかなりの相同性 (72%) を共有する一方で、それらは、染色体 17 q 2 1 及び 3 p に位置する異なる遺伝子の産物である (Jarvinen及びLiu, 2003)。TOP 2 A が、複製された染色体の分離及び縮合の間に、重要な機能を行う一方で、TOP 2 B の正確な機能は、いまだほとんど不明である (Isaacsら、1998; Yangら、2000)。TOP 2 A の mRNA レベルが、AA 及び DA と比較して GBM で有意に高く、そしてそれは、IHC によって核のタンパク質発現にもまた反映したことに注目する。いままでの研究では、少数の場合についてのみ IHC によって同様の変化を示してきた。そのような変化の意義は、さらなる評価が必要である (Holden及びTownsend, 1999; Fariaら、2006)。興味深いことに、グレード I I / I I I において見られる相対的に高い TOP 2 A レベルは、そしてそれは、さらなる評価を必要とするが、TOP 2 A の mRNA 及び患者の生存の間の同様の相関関係を示唆するかもしれない。

10

【0039】

トポイソメラーゼファミリーの TOP 2 B 及び TOP 3 A の他のいくつかのメンバーが、膠芽細胞腫において上方制御されることが報告されているが、その意義は、現在明らかではない。興味深いことに、本発明者等は、TOPORS は、結合タンパク質であり、そして DNA 損傷により誘導される p 5 3 依存性細胞応答を仲介する際に結果として生じる役割を有する p 5 3 の活性化補助因子であるという報告 (Linら、2005) により説明される悪性グリオーマにおける TOPORS の下方制御を見出した。

20

【0040】

TOP 2 A 転写産物及びタンパク質の上昇レベルが、しばしば増加した細胞増殖と相関することは、乳がん、子宮頸がん、小細胞肺がん、胃がん、胃及び大腸がんを含む多くのがんにおいて示されている (Jarvinen及びLiu, 2003)。グリオーマにおいて、TOP 2 A の mRNA の高いレベルが、星状細胞腫のグレード I I 及び I I I と比較して、GBM において認められ、そしてまた、腫瘍の TOP 2 A タンパク質レベルと相関関係がある (Odaら、2005)。TOP 2 A 遺伝子は、染色体 17 q 1 2 q 2 1 で HER 2 がん遺伝子に非常に接近して位置し、そしてほぼ 90% の HER 2 増幅原発性乳がんにおいて増幅又は欠失する。より興味深いことに、TOP 2 A の増幅又は欠失は、相対的な化学療法感受性及びアントラサイクリン治療に対する耐性の両方を説明するかもしれない (Jarvinen及びLiuら、2003)。さらに、異なる実験方法を使用するインビトロ試験では、TOP 2 A 阻害剤に対する感受性が、がん細胞における TOP 2 A の発現レベルに依拠し、低濃度の TOP 2 A タンパク質を有する細胞が、高濃度の TOP 2 A を有する細胞よりも TOP 2 A 阻害薬に対してより感受性が低いことが以前に提供されている (Asanoら、1996; Jarvinenら、2000; Gudkovら、1993; Asanoら、1996; Vassetzkyら、1996; Withoffら、1996)。

30

【0041】

高い腫瘍の TOP 2 A レベルを有する GBM 患者が、テモゾロミド化学療法に対するより良好な生存を有する最初の知見に基づいて、テモゾロミドがまた、TOP 2 A 酵素活性に影響を及ぼすことにより作用するかもしれないと仮説を立てる。実際に、本発明者等は、テモゾロミドがインビトロにおいて TOP 2 A の阻害剤であることを示すことができた。さらに本発明者等は、テモゾロミド治療に対する高い TOP 2 A レベルを有する GBM 腫瘍のより良好な反応の理由が、高い TOP 2 A レベルを有する腫瘍が、それらの生存のために TOP 2 A に依拠しており、そしてテモゾロミドによって、その TOP 2 A 阻害活性を通じて非常に効率的に阻害されるためである可能性があることを提案する。本発明は、TOP 2 A の下方制御によりテモゾロミドに対して耐性になる細胞で、グリオーマ細胞の TOP 2 A レベルが、テモゾロミドに対するそれらの感受性を決定することを報告する。従って、本試験は、テモゾロミド化学療法に対する反応の予測因子として腫瘍の TOP

40

50

2 A 転写産物レベルを示す。

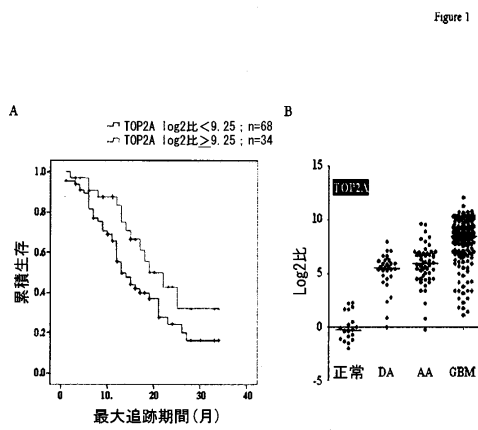
【 0 0 4 2 】

利点：

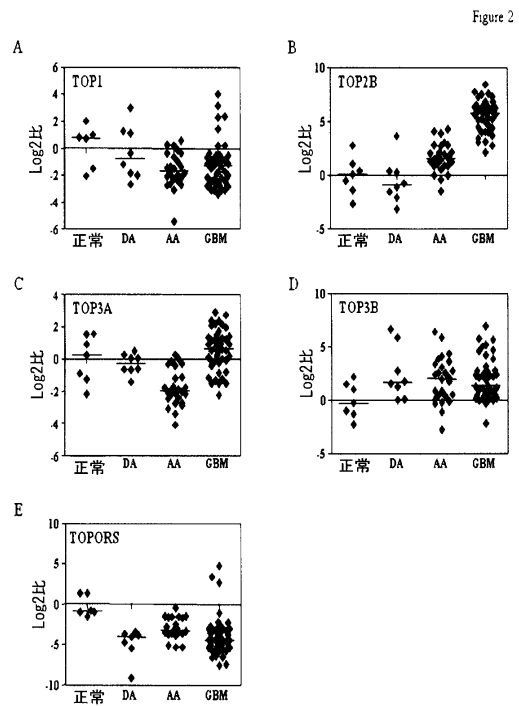
本発明の利点は、以下：

- 1 . 付随及び循環アジュバントテモゾロミド治療を伴う放射線治療を受ける G B M 患者のための有用な予後指標 T O P 2 A を提供し、
- 2 . 従って、最も適切な治療を決定することが可能であることである。

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

- (51) Int. Cl. F I
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 1 1
- (74)代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100150810
 弁理士 武居 良太郎
- (74)代理人 100179039
 弁理士 伊藤 洋介
- (72)発明者 ソマスンダラム クマラベル
 インド国, 5 6 0 0 1 2 バンガロール, インディアン インスティテュート オブ サイエンス
 , デパートメント オブ マイクロバイオロジー アンド セル バイオロジー
- (72)発明者 アリバザガン アリマバマガン
 インド国, 5 6 0 0 2 9 バンガロール, ホスール ロード, ナショナル インスティテュート
 オブ メンタル ヘルス アンド ニューロ サイエンシズ
- (72)発明者 カンダベル テンナラス
 インド国, 5 6 0 0 2 9 バンガロール, ホスール ロード, ナショナル インスティテュート
 オブ メンタル ヘルス アンド ニューロ サイエンシズ
- (72)発明者 アランガー サシャランジャンダス ヘッジ
 インド国, 5 6 0 0 6 6 バンガロール, ホワイトフィールド, イーピーアイピー エリア, スリ
 サッチャ サイ インスティテュート オブ ハイヤー メディカル サイエンシズ
- (72)発明者 アシュワスナラヤナ ラオ チャンドラモウリ
 インド国, 5 6 0 0 2 9 バンガロール, ホスール ロード, ナショナル インスティテュート
 オブ メンタル ヘルス アンド ニューロ サイエンシズ
- (72)発明者 サントシュ パニ
 インド国, 5 6 0 0 2 9 バンガロール, ホスール ロード, ナショナル インスティテュート
 オブ メンタル ヘルス アンド ニューロ サイエンシズ
- (72)発明者 パトゥル コンダイア
 インド国, 5 6 0 0 1 2 バンガロール, ディベロップメント アンド ジェネティックス, デパ
 ートメント オブ モルキュラー リプロダクション, インディアン インスティテュート オブ
 サイエンス
- (72)発明者 サチャナラヤナ ラオ マンチャナハリランガスワミー
 インド国, 5 6 0 0 6 4 バンガロール, ジャクール, サイエンティフィック リサーチ, ジャワ
 ハラル ネール センター フォー アドバンスド

審査官 松岡 徹

- (56)参考文献 Markus BREDEL, European Journal of Cancer, 2 0 0 2年, Vol.38, Pages 1343-1347
 Jorg van den BOOM, American Journal of Pathology, 2 0 0 3年, Vol.163, No.3, Pages 103
 3-1043
 E. FRANCESCHI, British Journal of Cancer, 2 0 0 4年, Vol.91, Pages 1038-1044
 Donald Ming-Tak HO, Anatomic Pathology, 2 0 0 3年, Vol.119, Pages 715-722

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 6 8

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	替莫唑胺对TOP2A的抑制作用可用于预测GBM患者的生存		
公开(公告)号	JP5969483B2	公开(公告)日	2016-08-17
申请号	JP2013529722	申请日	2011-09-22
[标]申请(专利权)人(译)	科学与工业研究理事会		
申请(专利权)人(译)	科学网络点击与工业研究理事会		
当前申请(专利权)人(译)	科学网络点击与工业研究理事会		
[标]发明人	ソマスンダラムクマラベル アリバザガンアリマパマガン カンダベルテンナラス アランガーサシャランジャンダスヘッジ アシュワスナラヤナラオチャンドラモウリ サントシュバニ パトゥルコンダイア サチャナラヤナラオマンチャナハリランガスワミー		
发明人	ソマスンダラム クマラベル アリバザガン アリマパマガン カンダベル テンナラス アランガー サシャランジャンダス ヘッジ アシュワスナラヤナ ラオ チャンドラモウリ サントシュ バニ パトゥル コンダイア サチャナラヤナ ラオ マンチャナハリランガスワミー		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/574 A61K31/4188 A61P35/00 A61P43/00		
CPC分类号	A61K31/495 C12Q2600/158 C12Q2600/178 G01N33/57407 G01N2333/99 G01N2800/52 A61K39/00 G01N33/00 G01N33/574 G01N33/68 C12Q1/533		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/574.A A61K31/4188 A61P35/00 A61P43/00.111		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 武井良太郎 伊藤洋介		
审查员(译)	松冈彻		
优先权	2270DEL2010 2010-09-23 IN		
其他公开文献	JP2013544497A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供替莫唑胺的TOP2A抑制，其可用于预测胶质母细胞瘤患者的存活。胶质母细胞瘤 (GBM) 是最常见的恶性原发性成人脑肿瘤。 GBM的常规治疗包括手术，放疗和化疗，其仅适度地改善患者存活。 GBM表达较高TOP2A转录水平的患者预后较好。更有趣的是，本发明报道替莫唑胺是体外TOP2A活性的抑制剂。本发明进一步显示siRNA敲低TOP2A使得对替莫唑胺化学疗法具有抗性的神经胶质瘤细胞系。因此，首次证明替莫唑胺是TOP2A抑制剂，并确定TOP2A转录物水平决定了胶质母细胞瘤对替莫唑

胺治疗的化学敏感性，因此解释了非常高水平的TOP2A转录物是接受替莫唑胺化疗的GBM患者的良好预后指标。

表 1A. 異なるグレードのグリオーマにおけるTOP2A、TOP2B、TOP2C及びTOP2Dの発現量物への相対的発現

バイオマーカー	正常	DM (グレードII)	IM (グレードIII)	GM (グレードIV)	コソフェロニ -オキサリプラチン 相対的発現	
					β	χ^2
TOP2A	0.0005 ± 1.281 (n=50)	5.149 ± 1.762 (n=28)	5.178 ± 1.920 (n=50)	7.945 ± 2.257 (n=155)	β = <0.0001 γ = <0.0001 ϵ = <0.0001 η = <0.0001	107.4229 <0.0001
TOP2B	1.465 × 10 ⁻⁴ ± 1.740 (n=7)	-0.576 ± 1.1461 (n=5)	1.835 ± 1.382 (n=5)	5.810 ± 1.639 (n=44)	γ = <0.0001 θ = 0.0165 ϵ = <0.0001 η = <0.0001	60.7341 <0.0001
TOP2C	7.465 × 10 ⁻⁷ ± 1.4554 (n=7)	-0.287 ± 0.620 (n=5)	-1.789 ± 1.128 (n=5)	0.570 ± 1.242 (n=44)	β = 0.0294 θ = 0.0010 η = <0.0001	55.7250 <0.0001
TOP2D	-0.228 ± 1.2021 (n=5)	-0.551 ± 1.1444 (n=7)	-0.389 ± 1.6201 (n=2)	-3.802 ± 2.494 (n=44)	β = <0.0001 γ = 0.0010	15.5810 0.0013

*有意な進捗を示すコソフェロニ-オキサリプラチン相対的発現量。 α : 正常対比; β : 正常対比; γ : 正常対比; δ : 正常対比; ϵ : DM対比;
 η : GM対比; その他発現の差で検定されるサブグループです。