

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6949315号
(P6949315)

(45) 発行日 令和3年10月13日(2021.10.13)

(24) 登録日 令和3年9月27日(2021.9.27)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/6886 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6886 Z N A
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48 P
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M
	G O 1 N 33/574 A
請求項の数 5 (全 27 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2016-507797 (P2016-507797)	(73) 特許権者 502285457 学校法人順天堂 東京都文京区本郷2-1-1
(86) (22) 出願日 平成27年3月11日(2015.3.11)	(73) 特許権者 503359821 国立研究開発法人理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
(86) 国際出願番号 PCT/JP2015/057176	(74) 代理人 110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(87) 国際公開番号 W02015/137406	(72) 発明者 高持 一矢 東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学 内
(87) 国際公開日 平成27年9月17日(2015.9.17)	(72) 発明者 鈴木 健司 東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学 内
審査請求日 平成30年1月11日(2018.1.11)	
審判番号 不服2020-472 (P2020-472/J1)	
審判請求日 令和2年1月14日(2020.1.14)	
(31) 優先権主張番号 特願2014-49186 (P2014-49186)	
(32) 優先日 平成26年3月12日(2014.3.12)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	最終頁に続く
(31) 優先権主張番号 特願2014-183418 (P2014-183418)	
(32) 優先日 平成26年9月9日(2014.9.9)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	

(54) 【発明の名称】 肺扁平上皮癌と肺腺癌の鑑別評価方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

肺癌患者の病変部から採取された生体試料について、下記1)~4)から選ばれる1又は2以上の工程を行うことを含む、当該病変が扁平上皮癌であるか腺癌であるかを鑑別評価する方法。

1) 配列番号2で示される塩基配列からなるDNAから転写されるRNAの発現レベルをCAGE法により測定し、前記発現レベルが0.50 counts per million (cpm)より高い場合には当該病変は腺癌であり、0.50 cpmより低い場合には当該病変は扁平上皮癌であるという基準と比較する工程

2) 配列番号3で示される塩基配列からなるDNAから転写されるRNAの発現レベルをCAGE法により測定し、前記発現レベルが2.00 cpmより高い場合には当該病変は腺癌であり、2.00 cpmより低い場合には当該病変は扁平上皮癌であるという基準と比較する工程

3) 配列番号5で示される塩基配列からなるDNAから転写されるRNAの発現レベルをCAGE法により測定し、前記発現レベルが5.00 cpmより高い場合には当該病変は腺癌であり、5.00 cpmより低い場合には当該病変は扁平上皮癌であるという基準と比較する工程

4) 配列番号7で示される塩基配列からなるDNAから転写されるRNAの発現レベルをCAGE法により測定し、前記発現レベルが9.00 cpmより高い場合には当該病変は扁平上皮癌であり、9.00 cpmより低い場合には当該病変は腺癌であるという基準

10

20

と比較する工程

【請求項 2】

扁平上皮癌が低分化扁平上皮癌である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

腺癌が B A C 成分を含まない腺癌である、請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

肺癌患者の病変部から採取された生体試料について、下記 1) ~ 9) のいずれかの工程を行うことを含む、当該病変が扁平上皮癌であるか腺癌であるかを鑑別評価する方法。

1) T T F - 1 タンパク質及び S T 6 G A L N A C 1 タンパク質を免疫組織染色法により検出し、T T F - 1 タンパク質の検出結果が陽性かつ S T 6 G A L N A C 1 タンパク質の検出結果が陽性である場合には当該病変は腺癌であり、T T F - 1 タンパク質の検出結果が陰性かつ S T 6 G A L N A C 1 タンパク質の検出結果が陰性である場合には当該病変は扁平上皮癌であるという基準と比較する工程

10

2) C K 5 タンパク質及び S T 6 G A L N A C 1 タンパク質を免疫組織染色法により検出し、C K 5 タンパク質の検出結果が陰性かつ S T 6 G A L N A C 1 タンパク質の検出結果が陽性である場合には当該病変は腺癌であり、C K 5 タンパク質の検出結果が陽性かつ S T 6 G A L N A C 1 タンパク質の検出結果が陰性である場合には当該病変は扁平上皮癌であるという基準と比較する工程

3) D S G 3 タンパク質及び S T 6 G A L N A C 1 タンパク質を免疫組織染色法により検出し、D S G 3 タンパク質の検出結果が陰性かつ S T 6 G A L N A C 1 タンパク質の検出結果が陽性である場合には当該病変は腺癌であり、D S G 3 タンパク質の検出結果が陽性かつ S T 6 G A L N A C 1 タンパク質の検出結果が陰性である場合には当該病変は扁平上皮癌であるという基準と比較する工程

20

4) C K 5 タンパク質及び S P A T S 2 タンパク質を免疫組織染色法により検出し、C K 5 タンパク質の検出結果が陰性かつ S P A T S 2 タンパク質の検出結果が陰性である場合には当該病変は腺癌であり、C K 5 タンパク質の検出結果が陽性かつ S P A T S 2 タンパク質の検出結果が陽性である場合には当該病変は扁平上皮癌であるという基準と比較する工程

5) D S G 3 タンパク質及び S P A T S 2 タンパク質を免疫組織染色法により検出し、D S G 3 タンパク質の検出結果が陰性かつ S P A T S 2 タンパク質の検出結果が陰性である場合には当該病変は腺癌であり、D S G 3 タンパク質の検出結果が陽性かつ S P A T S 2 タンパク質の検出結果が陽性である場合には当該病変は扁平上皮癌であるという基準と比較する工程

30

6) p 4 0 タンパク質及び S P A T S 2 タンパク質を免疫組織染色法により検出し、p 4 0 タンパク質の検出結果が陰性かつ S P A T S 2 タンパク質の検出結果が陰性である場合には当該病変は腺癌であり、p 4 0 タンパク質の検出結果が陽性かつ S P A T S 2 タンパク質の検出結果が陽性である場合には当該病変は扁平上皮癌であるという基準と比較する工程

7) S T 6 G A L N A C 1 タンパク質及び S P A T S 2 タンパク質を免疫組織染色法により検出し、S T 6 G A L N A C 1 タンパク質の検出結果が陽性かつ S P A T S 2 タンパク質の検出結果が陰性である場合には当該病変は腺癌であり、S T 6 G A L N A C 1 タンパク質の検出結果が陰性かつ S P A T S 2 タンパク質の検出結果が陽性である場合には当該病変は扁平上皮癌であるという基準と比較する工程

40

8) N a p s i n A タンパク質及び S T 6 G A L N A C 1 タンパク質を免疫組織染色法により検出し、N a p s i n A タンパク質の検出結果が陽性かつ S T 6 G A L N A C 1 タンパク質の検出結果が陽性である場合には当該病変は腺癌であり、N a p s i n A タンパク質の検出結果が陰性かつ S T 6 G A L N A C 1 タンパク質の検出結果が陰性である場合には当該病変は扁平上皮癌であるという基準と比較する工程

9) p 4 0 タンパク質及び S P A T S 2 タンパク質を免疫組織染色法により検出し、p 4 0 タンパク質の検出結果が陰性かつ S P A T S 2 タンパク質の検出結果が陰性である場

50

合には当該病変は腺癌であり、p40タンパク質の検出結果が陽性かつSPATS2タンパク質の検出結果が陽性である場合には当該病変は扁平上皮癌であるという基準と比較する工程

【請求項5】

肺癌患者の病変部から採取された生体試料について、下記1)～6)のいずれかの工程を行うことを含む、当該病変が扁平上皮癌であるか腺癌であるかを鑑別評価する方法。

1) ST6GALNAC1タンパク質、TTF-1タンパク質及びCK5タンパク質を免疫組織染色法により検出し、ST6GALNAC1タンパク質の検出結果が陽性かつTTF-1タンパク質の検出結果が陽性かつCK5タンパク質の検出結果が陰性である場合には当該病変は腺癌であり、ST6GALNAC1タンパク質の検出結果が陰性かつTTF-1タンパク質の検出結果が陰性かつCK5タンパク質の検出結果が陽性である場合には当該病変は扁平上皮癌であるという基準と比較する工程

10

2) ST6GALNAC1タンパク質、TTF-1タンパク質及びDSG3タンパク質を免疫組織染色法により検出し、ST6GALNAC1タンパク質の検出結果が陽性かつTTF-1タンパク質の検出結果が陽性かつDSG3タンパク質の検出結果が陰性である場合には当該病変は腺癌であり、ST6GALNAC1タンパク質の検出結果が陰性かつTTF-1タンパク質の検出結果が陰性かつDSG3タンパク質の検出結果が陽性である場合には当該病変は扁平上皮癌であるという基準と比較する工程

3) ST6GALNAC1タンパク質、TTF-1タンパク質及びp40タンパク質を免疫組織染色法により検出し、ST6GALNAC1タンパク質の検出結果が陽性かつTTF-1タンパク質の検出結果が陽性かつp40タンパク質の検出結果が陰性である場合には当該病変は腺癌であり、ST6GALNAC1タンパク質の検出結果が陰性かつTTF-1タンパク質の検出結果が陰性かつp40タンパク質の検出結果が陽性である場合には当該病変は扁平上皮癌であるという基準と比較する工程

20

4) ST6GALNAC1タンパク質、SPATS2タンパク質及びDSG3タンパク質を免疫組織染色法により検出し、ST6GALNAC1タンパク質の検出結果が陽性かつSPATS2タンパク質の検出結果が陰性かつDSG3タンパク質の検出結果が陰性である場合には当該病変は腺癌であり、ST6GALNAC1タンパク質の検出結果が陰性かつSPATS2タンパク質の検出結果が陽性かつDSG3タンパク質の検出結果が陽性である場合には当該病変は扁平上皮癌であるという基準と比較する工程

30

5) ST6GALNAC1タンパク質、SPATS2タンパク質及びCK5タンパク質を免疫組織染色法により検出し、ST6GALNAC1タンパク質の検出結果が陽性かつSPATS2タンパク質の検出結果が陰性かつCK5タンパク質の検出結果が陰性である場合には当該病変は腺癌であり、ST6GALNAC1タンパク質の検出結果が陰性かつSPATS2タンパク質の検出結果が陽性かつCK5タンパク質の検出結果が陽性である場合には当該病変は扁平上皮癌であるという基準と比較する工程

6) ST6GALNAC1タンパク質、SPATS2タンパク質及びp40タンパク質を免疫組織染色法により検出し、ST6GALNAC1タンパク質の検出結果が陽性かつSPATS2タンパク質の検出結果が陰性かつp40タンパク質の検出結果が陰性である場合には当該病変は腺癌であり、ST6GALNAC1タンパク質の検出結果が陰性かつSPATS2タンパク質の検出結果が陽性かつp40タンパク質の検出結果が陽性である場合には当該病変は扁平上皮癌であるという基準と比較する工程

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願及び参照による援用)

本出願は、2014年3月12日に出願した日本国特願2014-049186及び2014年9月9日に出願した日本国特願2014-183418の優先権を主張するものであり、その全内容は本明細書において参照として援用される。

また、本明細書に引用される全ての文献は、あらゆる目的から全体として参照により援

50

用される。いずれの文献の引用も、それが本発明に関する先行技術であることを認めるものと解釈されてはならない。

【0002】

本発明は、肺癌の組織型を生検検体等の微小组織検体においても、容易に鑑別可能にする新規マーカーに関し、より具体的には、扁平上皮癌と腺癌を分子レベルで鑑別評価する手法に関する。

【背景技術】

【0003】

日本で年間7万人の死亡原因となっている肺癌は、小細胞癌と非小細胞肺癌に大別され、さらに非小細胞肺癌は、腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌とそれ以外の稀な組織型に分類される。

10

近年、扁平上皮癌とそれ以外の非小細胞肺癌（非扁平上皮癌）で治療効果や副作用が大きく異なる抗癌剤（ペメトレキセド）や分子標的治療薬（ベバシズマブ）が登場し、治療方針決定にこれらを正確に鑑別することが必須になっている。ところが両者の鑑別は、生検検体などの微小検体では、病理組織学的に鑑別困難な場合がある。現在、病理組織診断の際には、細胞や組織形態のみではなく、扁平上皮癌や腺癌に特異的なマーカーを用いた免疫組織染色を用いて総合的に診断を行っているが、それでも微小検体では鑑別が難しい症例は多数存在し、特に分化度の低い癌の場合には鑑別が難しい。

【0004】

肺扁平上皮癌の組織学的な診断根拠は、癌組織内に細胞間橋もしくは角化が存在することである。肺扁平上皮癌の分化度は細胞間橋もしくは角化の多寡によって決定される。分化度の低い扁平上皮癌（低分化扁平上皮癌）は、細胞間橋と角化が癌組織全体のわずかな領域に認められる程度にとどまる。一方、肺腺癌は肺胞上皮置換型（Bronchioloalveolar type: B A C）の成分を含むものと含まないものに大別される。B A C成分を含む腺癌は形態学的にも診断が容易であるが、含まない場合には、低分化扁平上皮癌との鑑別が困難な場合がある。これまで、扁平上皮癌と腺癌の鑑別にはP40、CK5、CK6、DSG3、TTF-1、Napsin Aが免疫組織染色のマーカーとして用いられてきたが、精度等必ずしも十分ではなく、より高精度のマーカーが求められているのが現状である。

20

また、鑑別診断は病理医の主観に大きく依存することもあり、客観的かつ普遍的な判定方法が必要とされている。

30

【0005】

一方、近年、遺伝子の発現状態の比較によって、ある状態にある細胞で発現している遺伝子を網羅的に解析し、その種類や発現レベルを細胞間で比較する、遺伝子の発現解析(expression analysis)のための手法が開発されている。例えば、転写開始部位の遺伝子の発現状態をシーケンス情報として網羅的に解析するRNA-seq（非特許文献1）やCAGE（Cap Analysis Gene Expression：非特許文献2）等が知られている。このうち、CAGE法は、mRNA等の長いキャップ付RNAを選択し、その5'末端を無作為かつ大量に配列決定することで転写開始点の活性を網羅的に定量できるという特徴を有する。

40

【0006】

しかしながら、ヒトゲノムにおける転写開始領域の発現レベルと特定の疾患との関係についてはこれまでに全く報告されていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Nature Reviews Genetics 10 (1): 57-63

【非特許文献2】Genome Res. 2011 Jul;21(7):1150-9

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

50

本発明は、肺扁平上皮癌と肺腺癌を高い精度で、客観的かつ迅速に鑑別評価する手法を提供することに関する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、肺扁平上皮癌と肺腺癌の患者の病変部からRNAを抽出し、CAGE解析法を用いて転写開始領域(Transcript Start Site; TSS)付近の発現状態をシーケンス情報として網羅的に解析した結果、特定の転写開始領域を含むDNAの発現レベルが両者の間で有意に異なり、これを指標として、当該扁平上皮癌と腺癌を判別できることを見出した。

【0010】

すなわち、本発明は、以下の1~4)に係るものである。

1) 肺癌患者の病変部から採取された生体試料について、転写開始領域を含むDNAの1種又は2種以上の発現産物の発現レベルを測定する工程を含む、当該病変が扁平上皮癌であるか腺癌であるかを鑑別評価する方法であって、該DNAが配列番号1~213で示される塩基配列における、転写開始領域の任意の位置の塩基とその下流に連続する1塩基以上からなるDNAであり、

該転写開始領域が、配列番号1~213で示される塩基配列の1番目の塩基と3'末端から101番目の塩基によって両端が規定される領域である、評価方法。

2) 前記DNAの転写産物と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、又は前記DNAの翻訳産物を認識する抗体を含有する1)の方法に用いる、扁平上皮癌であるか腺癌であるかを鑑別評価するための検査用キット。

3) 転写開始領域を含むDNAの1種又は2種以上の発現産物の、肺癌患者の病変が扁平上皮癌であるか腺癌であるかを鑑別評価するためのマーカーとしての使用であって、該DNAが配列番号1~213で示される塩基配列における、転写開始領域の任意の位置の塩基とその下流に連続する1塩基以上からなるDNAであり、

該転写開始領域が、配列番号1~213で示される塩基配列の1番目の塩基と3'末端から101番目の塩基によって両端が規定される領域である、前記発現産物の使用。

4) 肺癌患者の病変部から採取された生体試料について、ST6GALNAc1及び/又はSPATS2のタンパク質の発現レベルを測定する工程を含む、当該病変が扁平上皮癌であるか腺癌であるかを鑑別評価する方法。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、肺癌患者の癌病変が、扁平上皮癌であるか腺癌であるかを鑑別すること、更には低分化扁平上皮癌であるか腺癌であるか、更には低分化扁平上皮癌であるかBAC成分を含まない腺癌であるかを鑑別することができ、これによって迅速な診断が可能となる。また、本発明を用いることで、扁平上皮癌と腺癌との鑑別をトレーニングを積んだ病理医や臨床検査技師のような専門家の主観によらなくても、同程度あるいはそれ以上の鑑別を客観的に行うことが可能になり、患者検体の採取から解析まで患者の傍らで医療従事者が行う検査(POCT: Point of Care Testing)にも好適に利用できる。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明において、「扁平上皮癌(肺扁平上皮癌)」とは、気管支の扁平上皮(扁平上皮化生した細胞)から発生する癌を意味する。

また、腺癌(肺腺癌)とは、肺の腺細胞(気管支の線毛円柱上皮、肺胞上皮、気管支の外分泌腺など)から発生する癌を意味し、肺胞上皮置換型(Bronchioloalveolar type: BAC)の成分を含むものと含まないものに大別される。

本発明において、評価とは、肺癌患者由来の癌病変が扁平上皮癌であるか腺癌であるかを鑑別評価又は測定することを意味する。

【0013】

本発明において用いられる生体試料としては、評価対象となる肺癌患者の病変部から採

10

20

30

40

50

取された生検検体、切除検体などが挙げられる。当該生体試料は、核酸レベルでの測定に供する場合はRNA抽出液が調製され、タンパク質レベルでの測定に供する場合はタンパク質抽出液が調製される。

生体試料からRNAを抽出する方法は、公知の任意の方法を用いることができる。具体的には、ライフテクノロジーズ社製Ambion Ribopureキット、キアゲン社製miRNeasy、同社製RNeasyが例示できるが、これらのうちキアゲン社製miRNeasyキットが好適に用いられる。

【0014】

本明細書において、「核酸」又は「ポリヌクレオチド」と云う用語は、DNA又はRNAを意味する。また、「DNA」とは、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖及びアンチセンス鎖という各1本鎖DNAを包含する。従って、DNAには、2本鎖のゲノムDNA、1本鎖のcDNAや該DNAと相補的な配列を有する1本鎖DNA等が包含される。また、「RNA」には、total RNA、mRNA、rRNA及び合成のRNAのいずれもが含まれる。

【0015】

本発明において、配列番号1~213で示される塩基配列からなるDNA（転写開始領域とその下流に連続する100塩基からなるヒトゲノムDNA）の転写産物は、実施例に示すとおり、扁平上皮癌（低分化肺扁平上皮癌）である検体と腺癌（BAC成分を含まない肺腺癌）である検体について、CAGE（Cap Analysis Gene Expression）解析法を用いて、ゲノム上の転写開始領域を含む下流100ベース以上のDNAの発現状態を網羅的に解析した結果、扁平上皮癌と腺癌では、その発現レベル（転写活性）に有意な差異が認められたものである。具体的には、RNAの転写活性について、「扁平上皮癌」から得られた臨床検体由来プロファイル群、「腺癌」から得られた臨床検体由来プロファイル群の間における差分解析をR/Bioconductor edgeRパッケージ（Bioinformatics, 2010 Jan 1;26(1):139-40）を用い、閾値としてFDR（false discovery rate）1%を設定し、抽出されたものである。

したがって、配列番号1~213で示される塩基配列における、転写開始領域の任意の位置（転写開始点）の塩基とその下流に連続する1塩基以上からなるDNA（以下、「配列番号1~213における転写開始点を含むDNA」と称する）の（又はそれによってコードされる）発現産物（「本発明の発現産物」と云う）は、肺扁平上皮癌と肺腺癌を鑑別評価するためのバイオマーカー、具体的には、肺癌についてそれが扁平上皮癌であるか腺癌であるか、更には低分化扁平上皮癌であるか腺癌であるか、更には低分化扁平上皮癌であるかBAC成分を含まない腺癌であるかを鑑別評価するためのバイオマーカーとなり得る。尚、配列番号1~5における転写開始点を含むDNAの発現産物は、肺腺癌で発現レベルが上がるマーカーであり、配列番号6~213における転写開始点を含むDNAの発現産物は肺腺癌で発現レベルが下がるマーカーである。

【0016】

本発明において、「転写開始領域」は、転写開始点を含む領域をいう。特定のプロモーターからの転写開始点は単一の塩基に限定されず、ゲノム上のプロモーターの下流の複数の位置に存在する塩基であり得る。これらの複数の転写開始点を含む領域を本明細書において転写開始領域と称する。より詳細には、転写開始領域は、複数の転写開始点のうち最も5'側に位置する転写開始点と最も3'側に位置する転写開始点との間の領域である。配列番号1~213で示される塩基配列の各々において転写開始領域は1位（5'末端）の塩基と3'末端から101番目の塩基とによって両端が規定される領域に相当する5'末端を形成する塩基領域である。換言すると、配列番号1~213で示される塩基配列の各々には、転写開始領域と、転写開始領域中の最も3'側に位置する転写開始点に続く100個の塩基が示されている。本明細書においては、斯かる転写開始領域を「配列番号1~213において示される転写開始領域」とも称する。

配列番号1~213において示される転写開始領域のゲノム上の位置、及びそれに関連する遺伝子情報等は後記表1-1~表1-9に示すとおりである。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

本発明において、発現産物の発現レベルが測定されるDNAは、配列番号1～213で示される塩基配列における、上記転写開始領域中の任意の位置（転写開始点）の塩基とその下流に続く1塩基以上の塩基配列からなるDNAである。

ここで、下流に続く塩基配列の塩基数は、発現産物を特定できる数であればよい。当該塩基数としては、例えば1塩基以上、5塩基以上、10塩基以上、15塩基以上、20塩基以上、25塩基以上、30塩基以上、40塩基以上、50塩基以上が挙げられる。また、当該塩基数としては、例えば10塩基以下、15塩基以下、20塩基以下、25塩基以下、30塩基以下、40塩基以下、50塩基以下、100塩基以下が挙げられる。

下流側の塩基数としては、CAGE法による測定の場合には特に必要ないが、ハイブリダイゼーションやPCRによる測定の際にはその精度を担保するために下流100塩基程度までの何れかの部分を対象とすることができ、転写開始領域とその下流100塩基からなるDNAのうち、少なくとも20塩基以上の長さのものであればゲノム全体を対象にした実験系であっても特定できる確率が高い。

10

【 0 0 1 8 】

また、当該DNAには、その発現産物が肺扁平上皮癌と肺腺癌を判別するためのバイオマーカーとなり得る限り、当該DNAの塩基配列と実質的に同一の塩基配列を有するDNAも包含される。ここで、実質的に同一の塩基配列とは、例えば、相同性計算アルゴリズムNCBI BLASTを用い、期待値 = 10 ; ギャップを許す ; フィルタリング = ON ; マッチスコア = 1 ; ミスマッチスコア = - 3 の条件にて検索をした場合、配列番号1～213に示される塩基配列と90%以上、好ましくは95%以上、さらにより好ましくは98%以上の同一性があることを意味する。

20

【 0 0 1 9 】

斯かる本発明の発現産物は、1種又は2種以上を組み合わせることでその発現レベルを把握することにより、肺扁平上皮癌と肺腺癌の判別が可能であるが、このうち、配列番号2、配列番号3、配列番号5及び配列番号7における転写開始点を含むDNAの発現産物は、表2に示す閾値を設定した場合に、特異度100%・感度100%で分類できるものである。すなわち、これらは、其々一つの発現レベルのみを以って確実な判別が可能なものである。

30

【 0 0 2 0 】

また、複数の発現産物を組み合わせることでその発現レベルを確認する場合、その数、組み合わせの内容は適宜選択できる。配列番号1～213における転写開始点を含むDNAのうち、任意の複数のDNAの発現産物を組み合わせてもよく、更には本発明の評価に寄与し得る範囲で、配列番号1～213における転写開始点を含む1種または2種以上のDNAに、それ以外の任意の塩基配列からなるDNAの発現産物を組み合わせてもよい。

【 0 0 2 1 】

本発明の発現産物としては、当該DNAから発現される転写産物及び翻訳産物が挙げられる。転写産物としては、具体的には、当該DNAから転写されて生じるRNA、好ましくはmRNAが挙げられる。また、翻訳産物としては、具体的には、当該RNAによってコードされるタンパク質が挙げられる。例えば、一つの発現レベルのみを以って確実な判別が可能なものとして挙げた配列番号2、配列番号3、配列番号5及び配列番号7における転写開始点を含むDNAの発現産物のうち、配列番号3における転写開始点を含むDNAから発現されるタンパク質は、「ST6GALNAC1」(alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1 ; UniProtKB/Swiss-Prot: SIA7A_HUMAN, Q9NSC7)、配列番号7における転写開始点を含むDNAから発現されるタンパク質は、「SPATS2」(spermatogenesis associated, serine-rich 2 ; UniProtKB/Swiss-Prot: SPAS2_HUMAN, Q86XZ4)として同定されている。

40

【 0 0 2 2 】

後記表1-1に示すとおり、配列番号3で示される塩基配列からなるDNAの転写産物

50

は腺癌で特定の発現されるものであり、配列番号7で示される塩基配列からなるDNAの転写産物は扁平上皮癌で特定の発現されるものであることから、ST6GALNAC1は腺癌マーカー、SPATS2は扁平上皮癌マーカーとなり、両者を組み合わせた場合には、腺癌と扁平上皮癌の鑑別に極めて有用である。また、これらと従来から扁平上皮癌や腺癌の鑑別に用いられている、P40、CK5、CK6、DSG3(Desmoglein-3)、TTF-1(Thyroid transcription factor-1)、Napsin A等のタンパク質マーカーを適宜組み合わせることにより、更にその鑑別精度の向上を図ることもできる。例えば、好適な組み合わせとして、TTF-1/ST6GALNAC1、CK5/ST6GALNAC1、DSG3/ST6GALNAC1、CK5/SPATS2、DSG3/SPATS2、p40/ST6GALNAC1、ST6GALNAC1/SPATS2、Napsin A/ST6GALNAC1、p40/SPATS2の2つのマーカーの組み合わせ、より好適にはTTF-1/ST6GALNAC1の2つのマーカーの組み合わせ、更に好適にはST6GALNAC1/TTF-1/CK5、ST6GALNAC1/TTF-1/DSG3、ST6GALNAC1/TTF-1/p40、ST6GALNAC1/SPATS2/DSG3、ST6GALNAC1/SPATS2/CK5、及びST6GALNAC1/SPATS2/p40の3つのマーカーの組み合わせが挙げられる。

10

【0023】

発現産物の測定又は検出の対象には、そのRNAから人工的に合成されたcDNA、そのRNAをエンコードするDNA、そのRNAからコードされるタンパク質、該タンパク質と相互作用をする分子、そのRNAと相互作用する分子、またはそのDNAと相互作用する分子等も包含される。ここで、RNA、DNA又はタンパク質と相互作用する分子としては、DNA、RNA、タンパク質、多糖、オリゴ糖、単糖、脂質、脂肪酸、及びこれらのリン酸化物、アルキル化物、糖付加物等、及び上記いずれかの複合体が挙げられる。

20

また、発現レベルとは、当該発現産物の発現量や活性を包括的に意味する。

【0024】

発現レベルを測定する方法は、RNA、cDNAまたはDNAを対象とする場合、これらにハイブリダイズするDNAをプライマーとしたPCR法、リアルタイムRT-PCR法、Smart Amp法、LAMP法等に代表される核酸増幅法、これらにハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション法(DNAチップ、DNAマイクロアレイ、ドットプロットハイブリダイゼーション、スロットプロットハイブリダイゼーション、ノーザンプロットハイブリダイゼーション等)、塩基配列を決定する方法、またはこれらを組み合わせた方法から選ぶことができる。

30

【0025】

ここで、測定に用いられるプローブ又はプライマー、すなわち、本発明の発現産物(転写産物)又はそれに由来する核酸を特異的に認識し増幅するためのプライマー、又は該RNA又はそれに由来する核酸を特異的に検出するためのプローブがこれに該当するが、これらは、配列番号1~213で示される塩基配列に基づいて設計することができる。ここで「特異的に認識する」とは、例えばノーザンプロット法において、実質的に本発明の発現産物(転写産物)又はそれに由来する核酸のみを検出できること、また例えばRT-PCR法において、実質的に当該核酸のみが生成される如く、当該検出物又は生成物が当該転写産物又はそれに由来する核酸であると判断できることを意味する。

40

具体的には、配列番号1~213で示される塩基配列からなるDNA又はその相補鎖に相補的な一定数のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを利用することができる。ここで「相補鎖」とは、A:T(RNAの場合はU)、G:Cの塩基対からなる2本鎖DNAの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、当該一定数の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の同一性を有すればよい。塩基配列の同一性は、前記BLAST等のアルゴリズムにより決定することができる。

斯かるオリゴヌクレオチドは、プライマーとして用いる場合には、特異的なアニーリング及び鎖伸長ができればよく、通常、例えば10塩基以上、好ましくは15塩基以上、よ

50

り好ましくは20塩基以上、かつ例えば100塩基以下、好ましくは50塩基以下、より好ましくは35塩基以下の鎖長を有するものが挙げられる。また、プローブとして用いる場合には、特異的なハイブリダイゼーションができればよく、配列番号1~213で示される塩基配列からなるDNA（又はその相補鎖）の少なくとも一部若しくは全部の配列を有し、例えば10塩基以上、好ましくは15塩基以上、かつ例えば100塩基以下、好ましくは50塩基以下、より好ましくは25塩基以下の鎖長のものが用いられる。

なお、ここで、「オリゴヌクレオチド」は、DNAあるいはRNAであることができ、合成されたものでも天然のものでもよい。また、ハイブリダイゼーションに用いるプローブは、通常標識したものが用いられる。

【0026】

例えば、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法を利用する場合は、まずプローブDNAを放射性同位元素、蛍光物質等で標識し、次いで、得られた標識DNAを、常法に従ってナイロンメンブレン等にトランスファーした生体試料由来のRNAとハイブリダイズさせる。その後、形成された標識DNAとRNAとの二重鎖を用いて、標識物に由来するシグナルを検出、測定することができる。

【0027】

また、RT-PCR法を利用する場合は、まず生体試料由来のRNAから常法に従ってcDNAを調製し、これを鋳型として標的の本発明の発現産物（この場合、転写産物）が増幅できるように調製した一对のプライマー（上記cDNA（-鎖）に結合する正鎖、+鎖に結合する逆鎖）をこれとハイブリダイズさせる。その後、常法に従ってPCRを行い、得られた増幅二本鎖DNAを検出する。増幅された二本鎖DNAの検出には、予めRI、蛍光物質等で標識しておいたプライマーを用いて上記PCRを行うことによって産生される標識二本鎖DNAを検出する方法等を用いることができる。

【0028】

また、DNAマイクロアレイを用いて検体中のmRNAの発現量を測定する場合、支持体に本発明の発現産物（この場合、転写産物）由来の核酸（cDNA又はDNA）の少なくとも1種を固定化したアレイを用い、mRNAから調製した標識化cDNAまたはcRNAをマイクロアレイ上に結合させ、マイクロアレイ上の標識を検出することによって、mRNA発現量を測定することができる。

前記アレイに固定化される核酸としては、ストリンジентな条件下に特異的（すなわち、実質的に目的の核酸のみに）にハイブリダイズする核酸であればよく、例えば、本発明の発現産物（転写産物）の全配列を有する核酸であってもよく、部分配列からなる核酸であってもよい。ここで、「部分配列」とは、少なくとも15~25塩基からなる核酸が挙げられる。

ここでストリンジентな条件は、通常「1×SSC、0.1%SDS、37℃」程度の洗浄条件を挙げることができ、より厳しいハイブリダイズ条件としては「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」程度、さらに厳しいハイブリダイズ条件としては「0.1×SSC、0.1%SDS、65℃」程度の条件を挙げることができる。ハイブリダイズ条件は、J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Thrd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)等に記載されている。

【0029】

また、塩基配列を決定する方法としては、CAGE法、TSS-seq法、RNA-seq法、DGE法、SAGE法等が挙げられるが、CAGE法が好適である。

CAGE法を用いて、発現レベルを測定する場合、後記実施例に記載した方法に準じて実施することができる。

【0030】

また、配列番号1~213における転写開始点を含むDNAからコードされるタンパク質（翻訳産物）、当該タンパク質と相互作用する分子、RNAと相互作用する分子、またはDNAと相互作用する分子を測定する場合は、プロテインチップ解析、免疫測定法（例えば、免疫組織化学分析法（免疫組織染色法）、ELISA等）、1-ハイブリッド法（

10

20

30

40

50

PNAS 100, 12271-12276(2003)) や 2 - ハイブリッド法 (Biol. Reprod. 58, 302-311 (1998)) のような方法を用いることができ、対象に応じて適宜選択できる。

例えば、測定対象としてタンパク質が用いられる場合は、本発明の発現産物 (この場合、翻訳産物) に対する抗体を生体試料と接触させ、当該抗体に結合した試料中のポリペプチドを検出し、そのレベルを測定することによって実施される。例えば、ウェスタンブロット法によれば、一次抗体として上記の抗体を用いた後、二次抗体として放射性同位元素、蛍光物質又は酵素等で標識した一次抗体に結合する抗体を用いて、その一次抗体を標識し、これら標識物質由来のシグナルを放射線測定器、蛍光検出器等で測定することが行われる。

尚、上記翻訳産物に対する抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。これらの抗体は、公知の方法に従って製造することができる。具体的には、ポリクローナル抗体は、常法に従って大腸菌等で発現し精製したタンパク質を用いて、あるいは常法に従って当該タンパク質の部分ポリペプチドを合成して、家兎等の非ヒト動物に免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。

一方、モノクローナル抗体は、常法に従って大腸菌等で発現し精製したタンパク質又は該タンパク質の部分ポリペプチドをマウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髄腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞から得ることができる。

また、免疫組織化学分析法を行う場合には、患者から分離した生体試料を常法によりホルマリン固定をした後、パラフィンに包埋して組織片に薄切し、スライドガラスに貼り付けたものを切片試料として使用するのが好ましい。二次抗体としては、アルカリホスファターゼやペルオキシダーゼ等の酵素標識抗体を用いることができるが、Vector社のABC法やDAKO社のEnVision検出システム等を用いて高感度な検出を行うのが好ましい。

【0031】

斯くして、肺癌患者の癌病変部から採取された生体試料中の本発明の発現産物の発現レベルが測定され、当該発現レベルに基づいて、当該病変部が扁平上皮癌であるか腺癌であるかが鑑別される。具体的には、検出された本発明の発現産物の発現レベルを対照レベルと比較することによって評価される。

ここで、「対照レベル」とは、例えば、腺癌患者から分離された病変組織若しくは肺癌患者から分離された正常組織における当該発現産物の発現レベル、又は肺癌を発症していない健常人群における当該発現産物の発現レベルが挙げられる。

例えば、対象患者の病変部の当該発現産物の発現レベルが、腺癌患者から分離された病変組織、正常組織或いは健常人由来の組織における発現レベルに近い、当該発現レベルの範囲内に属する、或いは当該発現レベルより有意に高い (又は低い) 場合には、当該患者の肺癌の病変は扁平上皮癌である可能性は低いと評価できる。

【0032】

また、本発明における肺癌の病変の評価は、本発明の発現産物の発現レベルの上昇 / 減少により行うこともできる。この場合は、対照レベルとして、例えば正常組織、腺癌患者から分離された病変組織或いは健常人の組織由来の当該発現産物の発現レベルに基づいて、標準値 (閾値レベル) を設定し、患者由来の生体試料における当該発現産物の発現レベルを標準値と比較する (例えば $\pm 2 S . D .$ の範囲を許容範囲とする) ことにより行うことができる。例えば、患者由来の生体試料における当該発現産物の発現レベルが閾値レベルより高い又は低い場合に、当該患者の病変は扁平上皮癌である可能性は低いと評価できる。

【0033】

本発明の方法に従い、生検検体などの微小検体でも肺癌の組織型が容易に評価される。病変が非扁平上皮癌である可能性がある判断された場合には、毒性の低い抗癌剤 (ペメトレキセド) の投与や、抗癌剤との併用で治療効果の上乗せが明らかになっている分子標的治療薬 (ベバシズマブ) などの投与を第一選択の治療として行うことができる。扁平上皮癌と診断された場合には、ペメトレキセドやベバシズマブ以外の抗癌剤治療を行ったり

10

20

30

40

50

、扁平上皮癌を対象にした抗体治療や分子標的治療の臨床試験の対象になる。

【0034】

本発明の肺癌の病変を評価するための検査用キットは、患者から分離した生体試料における本発明の発現産物の発現レベルを測定するための検査試薬を含有するものである。具体的には、本発明の発現産物（転写産物）等と特異的に結合（ハイブリダイズ）するオリゴヌクレオチドを含む、核酸増幅、ハイブリダイゼーションのための試薬、或いは、本発明の発現産物（翻訳産物）を認識する抗体を含む免疫学的測定のための試薬等が挙げられる。当該キットに包含されるオリゴヌクレオチド、抗体等は、上述したとおり公知の方法により得ることができる。

また、当該検査用キットには、上記抗体や核酸の他、標識試薬、緩衝液、発色基質、二次抗体、ブロッキング剤や、試験に必要な器具やコントロール等を含むことができる。

10

【実施例】

【0035】

実施例1 腺癌と扁平上皮癌の鑑別を可能にする転写開始領域の抽出と検証

(1) 検体試料の入手

検体（サンプル）は、肺癌病変部より、外科的切除や針生検法などによって入手した。使用したサンプルは、転写開始領域抽出用サンプルとして15検体（うち、腺癌（BAC成分を含まない腺癌）が3検体、低分化扁平上皮癌が12検体）、検証用サンプルとして20検体（うち、腺癌（BAC成分を含まない腺癌）が10検体、低分化扁平上皮癌が10検体）である。

20

【0036】

(2) 試料の保存・調製

摘出された組織片は、適宜冷凍処理されて-80℃で保存した。保存組織片は、2mLマイクロチューブに組織片を50mg以下になるように入れてキアゲン社製QIAzolを添加して、ジルコニアビーズを1個入れて密閉し、キアゲン社製TissueLysorを用いて浸透処理により破碎した。

【0037】

(3) RNAの調製

破碎・抽出処理を行った試料は、キアゲン社製miRNeasy mini kitにより、添付されたプロトコルに従ってRNA調製を行った。調製後のRNAは、分光光度計による紫外吸収（230、260、280nm）を測定して、260/230、260/280比を算出し、そのRNAの質を検定した。また、アジレント社製BioAnalyzer RNA nano chipにより電気泳動を行い、RNA分解度を示すRIN値を算出して、RNAの分解度合いを検定した。

30

【0038】

(4) CAGEライブラリー調製

精製RNAを5µg用意し、非増幅非タグ化CAGE法（「細胞工学別冊 次世代シーケンサー目的別アドバンストメソッド」、菅野純夫、鈴木穰監修、学研メディカル秀潤社、2012年09月19日発行）内、第3章3、“網羅的プロモーター解析（イルミナシーケンサーを用いた非増幅CAGE法）”参照）により、CAGEライブラリーを調製した。具体的には、精製RNAを逆転写反応に供して精製後、過ヨウ素酸ナトリウムによりリボースのジオールを参加してアルデヒド化し、ピオチンヒドラジドを添加してアルデヒド基にピオチンを付加した。RNase Iにより一本鎖RNA部分を消化・精製後、アビジン磁気ビーズによりピオチン化されたRNA/cDNA二本鎖のみをビーズ表面に結合させ、RNase H消化及び熱処理によりcDNAを遊離させて回収した。回収したcDNAの両端にシーケンスに必要なアダプターを連結させた後、イルミナ社製HiSeq2500によりシーケンスを行った。なお、本工程において精製・緩衝液置換等に用いるAMPure XP（ベックマン・コールター社製）の標準的な条件では、二本鎖の場合で100塩基以上の長さの核酸が回収される条件であり、これを採用した本工程により生産されるCAGEライブラリーは100塩基以上の鎖長をもつ二本鎖DNAからなる。

40

50

【 0 0 3 9 】

(5) R N A 発現解析

i) リファレンス転写開始領域の準備

ヒトの初代培養細胞や細胞株、さらに組織等を含め合計約 1 0 0 0 ものヒトサンプルについて転写開始点の活性がゲノムワイドに測定されたプロファイルするプロジェクトである「FANTOM5」(論文投稿中)において同定された転写開始領域のうち、ヒトリファレンスゲノムhg19上に定義された約18万の転写開始領域をリファレンス転写開始領域とした。

【 0 0 4 0 】

i i) 転写活性の定量

シーケンシングにより得られたリードとヒトのリファレンスゲノム(hg19)のアライメントをbwa(Bioinformatics. 2009 Jul 15;25(14):1754-60)を用いて行った。マッピングクオリティが20以上、かつアライメントの開始位置が、リファレンス転写開始領域内に位置するようなアライメントだけを選択し、各転写開始領域のリード数を数え上げた。各ライブラリーの総リード数と、RLE(Genome Biol. 2010;11(10):R106)法により推定されたライブラリサイズを用いて、カウントを100万あたりのリード数(counts per million)に変換する。

10

【 0 0 4 1 】

(6) 結果

(A) 活性の異なる転写開始領域の抽出

上記で定量された、転写開始領域抽出用各サンプルでの転写活性について、「腺癌(BAC成分を含まない腺癌)」から得られた臨床検体由来プロファイル群、「低分化扁平上皮癌」から得られた臨床検体由来プロファイル群の間における差分解析をR/Biocconductor edgeRパッケージ(Bioinformatics. 2010 Jan 1;26(1):139-40)を用いて行った。すなわち、二群間で発現量の平均が異なるかどうか(発現量の平均が等しいことを帰無仮説とし、この帰無仮説が真であることを仮定した場合、測定結果が偶然に起きる確率を計算する)を統計的に検定するものである。閾値としてFDR(false discovery rate)1%を設定したところ、これよりも小さな転写開始領域を含むDNAを213個同定した(表1-1~表1-9)。この基準は、該当する閾値により抽出される候補のうち99%は有意に発現差があると統計的に推定されたものであり、通常広く使われるP値(発現差が無いことを仮定した場合に偶然起きる確率)を5%とする場合よりも厳しい基準である。

20

30

【 0 0 4 2 】

【表 1 - 1】

配列番号	染色体番号	転写開始領域 (TSS)			転写開始領域 入 外	遺伝子名	発現比 (腺癌/ 扁平上皮癌)	全体の 発現平均	腺癌の 平均発現量	扁平上皮癌の 平均発現量	Pvalue	FDR
		開始位置	終了位置	外								
1	chr5	58883433	58883475	-		117.4456124	57.53260484	71.76299811	0.61108175	3.68E-05	0.006164349	
2	chr9	136130661	136130725	-		86.19474286	2.17782874	2.714414263	0.031491645	3.13E-05	0.007057936	
3	chr17	74639730	74639811	-	ST6GALNAC1	40.54692632	25.20981831	31.31916843	0.77241782	8.80E-06	0.002523928	
4	chr1	223853355	223853378	-	CAPN8	27.2525015	23.55940925	29.18156536	1.070784836	9.03E-06	0.002557071	
5	chr13	32519986	32520015	+		11.50999634	16.16428466	19.77582006	1.718143036	3.81E-05	0.008406514	
6	chr6	52529219	52529236	+	RP1-152L7.5	0.20312783	6.013946212	3.369909561	16.5900282	1.75E-05	0.004466275	
7	chr12	49761147	49761166	+	SPATS2	0.183840921	4.614891149	2.444461199	13.29661095	2.63E-05	0.006124957	
8	chr8	49833978	49833996	-	SNAI2	0.18030751	25.81533177	13.52142966	74.99094017	2.69E-05	0.006202132	
9	chr14	52535757	52535831	-	NID2	0.177747311	15.91094231	8.264596694	46.49632476	3.59E-06	0.001237687	
10	chr3	194406603	194406619	+	FAM43A	0.173665251	12.4294564	6.368721129	36.67239748	2.07E-05	0.005035605	
11	chr19	55919144	55919163	-	UBE2S	0.171752891	149.8412682	76.27591767	444.1026705	7.80E-06	0.002294397	
12	chr15	92396920	92396987	+	SLCO3A1	0.168147878	15.68697966	7.885165992	46.89429435	7.58E-06	0.002242786	
13	chr6	46293378	46293415	-	RCAN2	0.161953809	5.977935719	2.937676013	18.13897454	2.76E-05	0.006285548	
14	chr4	109090075	109090095	-	LEP1	0.154844698	3.598793037	1.720579593	11.111164681	1.47E-05	0.0038850812	
15	chr22	22764110	22764121	+	IGLV1-40	0.153315437	230.9741701	109.7525121	715.8608021	2.06E-05	0.005035605	
16	chr4	159091792	159091884	-	FAM198B	0.153048999	7.241616206	3.437305741	22.45885806	1.14E-05	0.003108766	
17	chr7	47576906	47576950	-		0.151309467	4.69804584	2.214185278	14.63348809	2.03E-05	0.005012873	
18	chr5	1008910	1008924	+	NKD2	0.147086399	13.43860406	6.222310459	42.30377847	7.89E-06	0.002304873	
19	chr2	152214098	152214115	+	TNFAIP6	0.145777736	24.54414747	11.30050381	77.5187221	4.18E-05	0.009145817	
20	chr2	89156823	89156840	-	IGKC	0.145549098	30.09656175	13.84318482	95.11006949	3.45E-05	0.007693988	
21	chr8	91997427	91997504	-	RP11-122A3.2	0.140796978	5.485439033	2.470378749	17.54568017	2.79E-06	0.001073502	
22	chr3	45267760	45267826	-	TMEM158	0.139328756	7.200919978	3.221234013	23.11966384	1.08E-05	0.002956243	
23	chr19	531713	531748	+	CDC34	0.138357923	10.71283356	4.770745333	34.48118646	1.90E-05	0.004758972	
24	chr3	170136642	170136663	+	CLDN11	0.12953024	2.434330802	1.038518871	8.017578527	2.29E-05	0.00542093	
25	chr14	52118694	52118708	+	FRMD6	0.126865016	0.681628217	0.256822772	2.260849996	2.17E-05	0.005226548	

【 0 0 4 3 】

10

20

30

40

【表 1 - 2】

配列番号	染色体番号	転写開始領域 (TSS)			発現出 [腺癌/ 扁平上皮癌]	全体の 発現平均	腺癌の 平均発現量	扁平上皮癌の 平均発現量	Pvalue	FDR
		開始位置	終了位置	遺伝子名						
26	chr15	76005170	76005197	-	CSPG4	8.364983684	3.492272899	27.85582682	2.66E-06	0.00104227
27	chr19	531750	531767	+	CDC34	4.710057695	1.936821893	15.8030009	2.26E-05	0.005369345
28	chr5	38258654	38258667	+	EGFLAM	2.432073251	0.989358583	8.202931922	9.68E-06	0.002708794
29	chr8	49833948	49833973	-	SNAI2	4.293574167	1.740476411	14.50596519	1.45E-06	0.000639836
30	chr11	19366758	19366812	+		2.738476802	1.10040734	9.290754647	9.61E-06	0.002704007
31	chr1	8483878	8483907	-	RERE	6.830907904	2.740355759	23.19311649	3.38E-06	0.001192707
32	chr2	89157015	89157033	-	IGKC	26.55036588	10.62519855	90.25103519	1.24E-05	0.003322381
33	chr22	38713428	38713446	-	CSNK1E	3.815319033	1.521797497	12.98940518	1.74E-05	0.004466275
34	chr5	168727941	168727995	-	SLIT3	1.593123081	0.634925526	5.425913299	4.58E-05	0.009957508
35	chr10	116164244	116164268	-	AFAP1L2	17.90924887	7.013479305	61.49232711	5.04E-07	0.000260903
36	chr14	106967526	106967551	-	IGHV1-46	407.9318873	158.6745109	1404.961893	8.78E-07	0.000417664
37	chr18	10454594	10454645	+	APCDD1	23.1192467	8.972719927	79.70535378	2.56E-05	0.006008152
38	chr17	39780819	39780835	-	KRT17	77.95071184	29.9979305	269.754387	2.99E-06	0.001123754
39	chr11	2292226	2292270	-	ASCL2	2.506071313	0.953598851	8.715961158	4.89E-06	0.001600963
40	chr5	42756913	42756963	+	CCDC152	2.087536303	0.780126493	7.317175543	1.46E-06	0.000639836
41	chr19	10121144	10121155	-	COL5A3	1.014058651	0.375995414	3.566311598	2.84E-05	0.006437771
42	chr3	101498269	101498341	+	NXPE3	1.803070531	0.662356134	6.365928117	5.04E-06	0.001638554
43	chr5	86180719	86180730	-	CTD-2161E19.1	3.828847736	1.396444033	13.55846255	1.29E-06	0.000578018
44	chr17	30813576	30813637	+	CDK5R1	1.284094573	0.465741495	4.557506887	8.71E-06	0.002512083
45	chr5	158527346	158527362	-	EBF1	1.177890362	0.420149577	4.208853501	2.27E-06	0.00091831
46	chr1	151032860	151032918	+		9.51171703	3.311805945	34.31136137	2.70E-06	0.001048738
47	chr2	101618965	101619066	+	RPL31	1.960657036	0.67834997	7.089895301	2.02E-06	0.000840353
48	chr3	154797428	154797450	+	MME	1.017365163	0.348941864	3.691058358	3.46E-06	0.001211401
49	chr14	106110903	106110942	-	IGHG2	9.804535328	3.334463031	35.68482452	1.73E-06	0.000747836
50	chr22	23054857	23054874	+	IGLV3-21	1730.814494	585.7618355	6311.02513	1.79E-06	0.000758421
51	chr1	67773527	67773577	+	IL12RB2	2.910680342	0.95378626	10.73825667	3.57E-07	0.000195936

【 0 0 4 4 】

10

20

30

40

【 表 1 - 3 】

配列番号	染色体番号	転写開始領域 (TSS)			転写開始領域 (TSS) 外	遺伝子名	発現比 [腺癌 / 扁平上皮癌]	全体の発現平均	腺癌の平均発現量	扁平上皮癌の平均発現量	Pvalue	FDR
		開始位置	終了位置	方向								
52	chr17	63556428	63556442	-	AXIN2	0.08789334	10.42261175	3.388932437	38.55732899	5.29E-06	0.001672132	
53	chr16	88449385	88449440	+		0.087642495	1.631021592	0.529209165	6.0382713	3.28E-06	0.001163907	
54	chr10	114154517	114154559	+		0.087186583	8.155129508	2.635847302	30.23225833	2.17E-05	0.005226548	
55	chr2	89156977	89156984	-	IGKC	0.084163379	2.330903976	0.733835477	8.71917797	1.04E-05	0.002896072	
56	chr20	49308048	49308084	-	FAM65C	0.083759351	0.756958839	0.237141751	2.891297189	2.25E-05	0.005369345	
57	chr16	88449358	88449372	+		0.083512551	1.150307337	0.360050543	4.311394515	1.56E-05	0.004037656	
58	chr10	116164538	116164562	-	AFAP1L2	0.082646743	0.916524273	0.284640341	3.444060001	3.57E-06	0.001237687	
59	chr7	103630096	103630116	-	RELN	0.08256297	1.55994825	0.484096143	6.863356677	2.72E-05	0.006218432	
60	chr3	87040003	87040018	-	VGLL3	0.081892001	2.029704034	0.626018871	7.64444469	2.43E-06	0.000975133	
61	chr14	106573756	106573760	-	IGHV3-11	0.080280409	19.15498618	5.819941466	72.49516505	1.98E-07	0.000121752	
62	chr2	207308276	207308295	+	ADAM23	0.079958479	0.799493189	0.242175392	3.028764379	1.22E-05	0.003296083	
63	chr18	7117813	7117843	-	LAMA1	0.079820368	1.87555629	0.567383068	7.108249175	4.12E-05	0.009063941	
64	chr22	23055620	23055631	+		0.07981464	11.5326354	3.488600232	43.70877606	5.23E-06	0.001666531	
65	chr1	53793705	53793719	-	LRP8	0.078463875	3.576930969	1.068077362	13.61234539	2.46E-05	0.005805863	
66	chr1	148928291	148928331	+	RP11-14N7.2	0.077063738	21.07308887	6.206630404	80.53892273	3.84E-06	0.001314289	
67	chr14	107170409	107170434	-	IGHV1-69	0.076710918	2932.856991	860.7844899	11221.147	7.66E-07	0.000372125	
68	chr4	109090054	109090073	-	LEF1	0.076667347	0.870358396	0.255336467	3.330446114	3.98E-06	0.001338574	
69	chr3	154798096	154798115	+	MME	0.076124034	4.956030766	1.446757181	18.9921251	1.05E-05	0.002910678	
70	chr4	109089966	109089977	-	LEF1	0.075977223	0.694578889	0.202361436	2.663448697	1.87E-05	0.004713437	
71	chr10	116164270	116164290	-	AFAP1L2	0.073701821	4.412075993	1.2556993931	17.03760424	8.10E-08	5.76E-05	
72	chr3	189507432	189507459	+	TF63	0.073564988	6.762954168	1.637814921	22.26351116	6.21E-06	0.001666531	
73	chr10	28966443	28966461	+	BAMBI	0.071989849	31.07096362	8.683480224	120.6208972	4.59E-07	0.00024346	
74	chr4	109089996	109090012	-	LEF1	0.071562822	1.55274279	0.432651914	6.045763735	4.16E-07	0.000223263	
75	chr16	86600426	86600441	+	FOXO2	0.071258884	1.766569708	0.489806631	6.873622019	2.19E-06	0.000893101	
76	chr2	70995307	70995339	-	ADD2	0.070232109	2.92281932	0.801277255	11.40898758	1.27E-06	0.000574498	
77	chr17	71161140	71161174	+	SSTR2	0.069347419	1.759393573	0.477573155	6.866675244	4.57E-08	3.52E-05	

【 0 0 4 5 】

10

20

30

40

【表 1 - 4】

配列番号	染色体番号	転写開始領域 (TSS)				発現比 [腺癌/ 扁平上皮癌]	全体の 発現平均	腺癌の 平均発現量	扁平上皮癌の 平均発現量	Pvalue	FDR
		開始位置	終了位置	スト ク	遺伝子名						
78	chr9	38424443	38424458	-	IGFBPL1	0.068605286	3.73725472	1.004979022	14.64871127	2.61E-06	0.001030727
79	chr2	70995350	70995375	-	ADD2	0.068841819	1.625876946	0.436687785	6.382633592	1.83E-06	0.000766785
80	chr19	4304585	4304627	+	FSD1	0.06834565	0.570594158	0.153126125	2.240466287	3.02E-06	0.001124453
81	chr14	106733624	106733650	-	IGHV1-24	0.068056168	447.0714092	119.5778051	1757.045826	1.72E-08	1.50E-05
82	chr11	8932828	8932841	+	AKIP1	0.067015744	1.026254009	0.27118202	4.046541963	5.32E-06	0.001672132
83	chr5	174151553	174151610	+	MSX2	0.062483344	5.214864767	1.303438223	20.86057094	1.06E-08	9.60E-06
84	chr5	150970816	150970899	-		0.062409217	4.50401589	1.124698026	18.02129885	1.97E-05	1.10E-06
85	chr4	109089901	109089930	-	LEF1	0.062164305	3.832428637	0.953985845	15.3461998	6.69E-10	0.004913813
86	chr3	128712906	128712928	-	KIAA1257	0.060145901	0.989340264	0.239825681	3.987398594	2.71E-05	0.006218432
87	chr14	107211459	107211478	-	IGHV3-73	0.059710662	313.8304148	75.63116168	1266.627427	7.78E-08	5.61E-05
88	chr6	123100853	123100874	+	FABP7	0.058590232	0.971503444	0.230567132	3.935248693	2.90E-06	0.001105647
89	chr3	139258521	139258589	-	RBP1	0.058208289	31.34819473	7.400534183	127.1388369	5.99E-12	1.84E-08
90	chr4	183065793	183065864	+	TENM3	0.057429732	2.892418765	0.675401631	11.7604873	3.79E-09	4.37E-06
91	chr6	54711471	54711486	+	FAM83B	0.056091849	0.441946036	0.101234199	1.804793387	4.59E-05	0.009957508
92	chr9	23821808	23821827	-	ELAVL2	0.05463255	0.798431489	0.178987554	3.276207228	6.44E-06	0.001947713
93	chr9	139964983	139964996	-	SAPCD2	0.053900282	4.374907424	0.969926473	17.99483123	4.12E-07	0.000223263
94	chr7	96654133	96654150	-	DLX5	0.052981944	0.974446891	0.212999865	4.020234997	4.00E-06	0.001338574
95	chr14	22918770	22918847	+	TRDJ1	0.051583758	3.464015094	0.740618949	14.35759968	7.60E-07	0.000372125
96	chr1	2461692	2461710	-	HES5	0.051086818	1.380304695	0.292753498	5.730509486	1.76E-06	0.000752412
97	chr15	83378614	83378634	-	AP3B2	0.050242839	0.582896397	0.121927845	2.426770605	1.30E-05	0.003457474
98	chr14	106092169	106092199	-	IGHG4	0.047564004	2.492537788	0.498023434	10.47059521	1.25E-07	7.98E-05
99	chrX	24665144	24665178	-	PCYT1B	0.047224957	0.329490476	0.065439381	1.385694859	1.57E-05	0.004042101
100	chr2	122660056	122660078	+		0.047121934	0.749217673	0.148527347	3.151978976	4.31E-06	0.001430757
101	chr7	19157248	19157268	-	TWIST1	0.047108441	6.850490686	1.357736305	28.82150821	5.51E-08	4.11E-05
102	chrX	153151586	153151644	-	L1CAM	0.046715283	2.023621466	0.398252362	8.525097883	4.11E-08	3.22E-05
103	chr17	79860107	79860120	+	NPB	0.045910156	4.07515518	0.790320161	17.21449525	9.14E-08	6.12E-05

【 0 0 4 6 】

10

20

30

40

【表 1 - 5】

配列番号	転写開始領域 (TSS)				発現比 [腫瘍/ 扁平上皮癌]	全体の 発現平均	腺癌の 平均発現量	扁平上皮癌の 平均発現量	Pvalue	FDR
	染色体 番号	開始位置	終了位置	転写 方向						
104	chr3	87040233	87040256	-	VGLL3	2.497224	0.481179332	10.56140267	5.02E-09	5.00E-06
105	chr1	151032782	151032801	+		1.115783464	0.207805558	4.747695086	7.81E-07	0.000375688
106	chr3	139258443	139258485	-	RBP1	57.97864917	10.64198991	247.3252862	9.88E-12	2.53E-08
107	chr2	89156940	89156955	-	IGKC	15.29799393	2.779521741	65.37188268	4.85E-09	4.97E-06
108	chr8	107460147	107460207	+	OXR1	0.887131085	0.160929408	3.791937793	8.18E-06	0.002374534
109	chr18	10454647	10454682	+	APCDD1	36.08307216	6.481654813	154.4887416	4.87E-07	0.00025548
110	chr11	61276214	61276227	+	LRRC10B	1.575713329	0.282665334	6.747905312	2.98E-06	0.001123754
111	chr2	239148671	239148686	-	HES6	16.41682735	2.845641353	70.70207134	5.79E-11	1.34E-07
112	chr8	37351344	37351394	-	RP11-150012.1	1.68490653	0.290436533	7.262786519	1.57E-06	0.00068423
113	chr22	43739340	43739385	-	SCUBE1	4.67831493	0.793291091	20.21841028	8.71E-08	6.09E-05
114	chr19	46580361	46580396	-	IGF14	0.403178392	0.068195267	1.743110893	8.96E-06	0.002553906
115	chr11	94439606	94439641	+	AMOTL1	0.4662192	0.075483313	2.029162747	1.12E-05	0.003046167
116	chr14	106091272	106091292	-		1.304251738	0.209073323	5.684865397	1.70E-07	0.00010622
117	chr4	4861385	4861398	+	MSX1	6.507791975	1.03690213	28.39135136	9.14E-08	6.12E-05
118	chr4	71384280	71384295	+	AMTN	0.735157305	0.116245867	3.210803056	5.94E-06	0.00182919
119	chr17	39742770	39742785	+		0.629198317	0.099406175	2.748366884	2.14E-07	0.000126509
120	chr20	62669277	62669301	+	LINC00176	0.828351684	0.129262116	3.624709959	2.08E-06	0.000855896
121	chr3	154798129	154798155	+	MME	3.424857018	0.52598841	15.02033145	3.61E-09	4.37E-06
122	chr5	174151612	174151633	+	MSX2	5.322497713	0.813378484	23.35897463	3.59E-10	6.63E-07
123	chr2	237076069	237076110	+	AC079135.1	1.813934213	0.275094462	7.969293219	5.25E-08	3.97E-05
124	chr3	12045814	12045834	+	SYN2	0.37043989	0.054315236	1.634938505	6.35E-06	0.001940697
125	chr8	17611447	17611490	-		0.333723081	0.04810898	1.476179483	1.45E-05	0.003814186
126	chr12	52914170	52914185	-	KRT5	2.011687196	0.287666505	8.907769961	5.09E-09	5.00E-06
127	chr13	100634130	100634143	+	ZIC2	0.654962152	0.090235639	2.913868203	5.66E-06	0.00176541
128	chr10	5567551	5567579	+	CALML3	0.330655058	0.043906528	1.477649177	7.19E-06	0.002140181
129	chr1	11751748	11751798	+	DRAXIN	1.571254161	0.207584556	7.025932581	1.60E-10	3.52E-07

【 0 0 4 7 】

10

20

30

40

【表 1 - 6】

配列番号	染色体番号	転写開始領域 (TSS)			発現比 (腺癌/ 扁平上皮癌)	全体の 発現平均	腺癌の 平均発現量	扁平上皮癌の 平均発現量	Pvalue	FDR
		開始位置	終了位置	遺伝子名						
130	chr12	79439461	79439490	SYT1	0.029241688	1.257522681	0.164606895	5.629185825	4.34E-06	0.001430811
131	chr2	233352531	233352550	ECEL1	0.028581804	3.6260617	0.465031202	16.27018389	1.06E-06	0.000490731
132	chr2	78769157	78769171		0.028577635	0.346982993	0.044491107	1.556850537	2.45E-06	0.000976179
133	chr12	85306494	85306558	SLC6A15	0.028516481	0.27405613	0.035074749	1.229981656	1.55E-05	0.004037656
134	chr12	131200810	131200859	RIMBP2	0.028417282	1.421852684	0.181405717	6.383640563	2.02E-07	0.000122366
135	chr2	173600565	173600592	RAPGEF4	0.027735565	1.404078263	0.175269703	6.319312504	2.97E-07	0.000168028
136	chr13	100622559	100622611		0.027174915	0.374070016	0.045843438	1.686976328	2.64E-05	0.006126006
137	chr1	4714656	4714675	AJAP1	0.027120366	2.052719199	0.251111529	9.259149877	6.03E-10	1.07E-06
138	chr6	56507679	56507695	DST	0.026730625	6.00941248	0.725594399	27.1446848	4.11E-09	4.58E-06
139	chr1	207070775	207070797	IL24	0.026053235	1.053184143	0.124246208	4.768936882	2.04E-07	0.000122366
140	chr3	147111198	147111225	ZIC1	0.024094167	1.498541185	0.164661025	6.894061827	1.06E-06	0.000490731
141	chr1	152140653	152140680	FLG-AS1	0.023960553	0.813589918	0.08894558	3.71216727	3.14E-06	0.001148945
142	chr6	26225354	26225378	HIST1H3E	0.023490556	1.006703991	0.109084331	4.601182328	2.44E-09	3.31E-06
143	chr17	27370022	27370051	PIPOX	0.022577856	0.210545002	0.021799527	0.965526902	1.30E-05	0.003457474
144	chr2	207308220	207308267	ADAM23	0.022160773	0.703021995	0.071554722	3.228891085	6.11E-09	5.76E-06
145	chrX	30233668	30233698	MAGEB2	0.021093495	4.931500774	0.479643508	22.73892984	5.55E-06	0.001732476
146	chrX	99665262	99665280	PCDH19	0.02048068	3.680973799	0.348402184	17.01126026	9.83E-12	2.53E-08
147	chr12	52912779	52912805	KRT5	0.020254728	0.488485176	0.045763002	2.259373872	1.59E-07	0.000100765
148	chr8	57359192	57359208	PENK	0.020125777	28.10695539	2.617550056	130.0595767	5.09E-07	0.000260903
149	chr12	28125659	28125672	PTHLH	0.017975332	0.920040008	0.07714341	4.291626399	1.57E-09	2.34E-06
150	chr7	96634850	96634874	DLX6	0.017763231	0.698975198	0.057961926	3.263028285	1.01E-07	6.63E-05
151	chr17	74864476	74864592	MGAT5B	0.017579449	1.435684251	0.117902075	6.706812957	1.32E-09	2.03E-06
152	chrX	148793714	148793733	MAGEA11	0.016099771	0.318313756	0.024073577	1.495274473	5.20E-06	0.001666531
153	chr6	43423785	43423800	DLK2	0.016097893	0.215982372	0.016332622	1.014581373	6.46E-06	0.001947713
154	chr1	152140624	152140650	FLG-AS1	0.015536642	0.95292039	0.069694633	4.48523418	9.02E-08	6.12E-05
155	chr3	147127142	147127168	ZIC1	0.015526007	0.366493163	0.026787279	1.725316699	3.24E-06	0.001160397

10

20

30

40

【表 1 - 7】

配列番号	転写開始領域 (TSS)				発現比 [腺癌/ 扁平上皮癌]	全体の 発現平均	腺癌の 平均発現量	扁平上皮癌の 平均発現量	Pvalue	FDR	
	染色体 番号	開始位置	終了位置	方向							遺伝子名
156	chr11	20049037	20049050	+	NAV2	0.01533676	0.241247086	0.017430437	1.136513681	3.22E-06	0.001160397
157	chr2	240196457	240196486	-		0.014861061	2.703806559	0.189634487	12.76049485	2.90E-09	3.72E-06
158	chr14	51955681	51955864	+	FRMD6	0.013622291	0.717073449	0.04631913	3.400090725	2.07E-08	1.77E-05
159	chr13	100632825	100632879	-		0.013567139	0.428463105	0.027566964	2.032039668	6.67E-07	0.000331155
160	chrX	151903207	151903234	+	CSAG1	0.013369208	2.419727989	0.153538478	11.48448603	3.14E-08	2.59E-05
161	chr3	189507460	189507471	+	TP63	0.013109268	0.180413703	0.011236342	0.857123147	1.81E-05	0.004602826
162	chr10	5566916	5566932	+	CALML3	0.012709747	8.643925313	0.522735182	41.12868584	8.04E-09	7.43E-06
163	chr7	139227355	139227349	+		0.012035041	0.602791243	0.034607096	2.875527832	6.01E-07	0.0003016
164	chr7	96634878	96634900	+	DLX6	0.011236326	0.926612686	0.049819459	4.433785595	1.36E-08	1.21E-05
165	chr11	46366799	46366832	+	DGKZ	0.011157181	0.330401647	0.017644312	1.581430988	2.98E-07	0.000168028
166	chr7	27208886	27208937	+	HOXA-AS4	0.0109222825	0.312120992	0.016332622	1.495274473	1.11E-06	0.000507317
167	chr3	139258382	139258393	-	RBP1	0.010605667	5.138592231	0.261401628	24.64735464	2.45E-14	1.41E-10
168	chr6	43423308	43423355	-	DLK2	0.010525117	0.352720862	0.017812238	1.692355559	3.07E-08	2.58E-05
169	chrX	151081351	151081390	+	MAGEA4	0.01044828	1.440219037	0.07222073	6.912212264	4.17E-09	4.58E-06
170	chr14	51955771	51955826	+	FRMD6	0.010368515	0.892098301	0.044406938	4.282863752	3.97E-08	3.16E-05
171	chr9	93405073	93405123	-	DIRAS2	0.010289968	4.349685565	0.214943576	20.88865352	2.97E-11	7.21E-08
172	chr17	39777431	39777463	-		0.009895791	0.187605723	0.008929093	0.902312244	6.55E-06	0.001964163
173	chr3	139258420	139258434	-	RBP1	0.009840673	51.223366919	2.424925354	246.4186446	1.07E-21	4.96E-17
174	chr6	31080343	31080359	-	C6orf15	0.009154419	0.606661509	0.026787279	2.926158428	4.67E-09	4.90E-06
175	chr3	120627034	120627102	+	STXBPL5	0.009098657	4.383173967	0.192402572	21.14625955	2.03E-10	4.18E-07
176	chr5	167247265	167247320	+		0.009066425	0.373440599	0.016332622	1.801872504	2.23E-07	0.000130564
177	chr11	68451973	68451986	+	GAL	0.00898837	0.601528569	0.026085579	2.903260532	3.69E-09	4.37E-06
178	chr7	96634908	96634923	+	DLX6	0.008957312	0.4130236408	0.017858136	1.993699297	2.60E-07	0.000150237
179	chr8	73449214	73449261	+	KCNB2	0.007785853	0.29762391	0.011236342	1.443174181	7.53E-08	5.52E-05
180	chr17	39743139	39743155	-	KRT14	0.007756847	31.53811824	1.18919011	152.9338308	2.52E-13	1.06E-09
181	chr7	26415877	26415903	-	AC004540.4	0.005514714	14.9665712	0.403774971	73.21775609	9.88E-17	1.14E-12

【 0 0 4 9 】

【 表 1 - 8 】

配列番号	転写開始領域 (TSS)				発現比 [腺癌/ 扁平上皮癌]	全体の 発現平均	腺癌の 平均発現量	扁平上皮癌の 平均発現量	Pvalue	FDR	
	染色体 番号	開始位置	終了位置	転写 方向							
182	chr11	68452002	68452019	+	GAL	0.005042784	16.63229422	0.411073552	81.51717687	1.43E-18	2.19E-14
183	chr7	139227292	139227325	+		0.004498147	2.349618856	0.051910644	11.5404517	2.08E-10	4.18E-07
184	chr8	24814118	24814133	-	NEFL	0.004122882	2.259428714	0.045820579	11.11386125	4.75E-14	2.44E-10
185	chr9	137764479	137764484	-		0.003709904	1.981595555	0.03622015	9.763097177	3.69E-12	1.22E-08
186	chr17	76533685	76533690	-		0.003525122	0.646490053	0.011236342	3.187504895	3.71E-09	4.37E-06
187	chr3	147111231	147111281	+	ZIC1	0.003262052	2.18934049	0.035161734	10.77902331	6.32E-15	5.83E-11
188	chr13	100623375	100623425	-	ZIC5	0.002873217	0.791132644	0.011236342	3.910717851	2.00E-09	2.80E-06
189	chr7	27213893	27213954	-	HOXA10	0.002791674	1.403488244	0.019374063	6.999944965	1.07E-13	4.95E-10
190	chr13	100633445	100633468	+	ZIC2	0.00271809	0.835771344	0.011236342	4.133911352	6.66E-10	1.10E-06
191	chr3	139258363	139258374	-	RBP1	0.002220398	29.9299817	0.329355987	148.3319846	9.27E-19	2.14E-14
192	chr7	12971296	12971310	+		0.00150773	3.679730527	0.027573906	18.28835701	2.00E-14	1.32E-10
193	chr12	52913553	52913601	+		0	0.103277583	0	0.516387916	2.05E-05	0.005035605
194	chr17	39742793	39742826	-	KRT14	0	0.271143374	0	1.35571687	5.56E-09	5.94E-06
195	chr19	35981358	35981374	-	KRTDAP	0	0.100920877	0	0.504604386	3.23E-05	0.007238234
196	chr3	109128858	109128884	+	RP11-702L6.4	0	0.425687097	0	2.129435486	4.50E-09	4.84E-06
197	chr11	66673490	66673527	-		0	0.117479158	0	0.587395792	2.03E-05	0.005012873
198	chr12	52908759	52908818	-		0	0.194428852	0	0.97214426	5.27E-07	0.000267397
199	chr12	89241151	89241168	-		0	0.188962365	0	0.944811826	1.04E-06	0.000490489
200	chr12	52913675	52913704	+		0	0.152529642	0	0.762648211	3.96E-06	0.001338574
201	chr13	99330012	99330023	+		0	0.700484269	0	3.502421347	2.61E-10	5.02E-07
202	chr13	100634031	100634045	+	ZIC2	0	1.173215355	0	5.866076777	6.38E-12	1.84E-08
203	chr3	95928689	95928701	-		0	0.667122457	0	3.335612285	8.78E-10	1.40E-06
204	chr7	107968952	107968990	-	NRCAM	0	1.541282918	0	7.706414589	5.31E-13	2.04E-09
205	chr9	138591319	138591340	-	SOHLH1	0	0.355727362	0	1.778636811	1.93E-09	2.79E-06
206	chrX	151307020	151307055	-	MAGEA10	0	0.269382598	0	1.341912988	3.03E-07	0.000168266
207	chrX	151080929	151080974	+	MAGEA4	0	0.176365707	0	0.891828535	3.22E-06	0.001160397

【 0 0 5 0 】

10

20

30

40

【表 1 - 9】

配列番号	転写開始領域 (TSS)				発現比 [腺癌/ 扁平上皮癌]	全体の 発現平均	腺癌の 平均発現量	扁平上皮癌の 平均発現量	P-value	FDR
	染色体 番号	開始位置	終了位置	転写 方向						
208	chrX	151081334	151081343	+	0	0.351361669	0	1.756808344	3.79E-08	3.07E-06
209	chr1	195691504	195691510	-	0	0.176363213	0	0.881766067	3.05E-06	0.001127751
210	chr12	28299014	28299023	+	0	2.393365038	0	11.96682519	1.78E-14	1.32E-10
211	chr13	99330043	99330058	+	0	1.297455784	0	6.487278918	3.16E-12	1.12E-08
212	chr5	167181917	167181979	+	0	0.585744601	0	2.928723007	2.58E-09	3.41E-06
213	chr7	137570475	137570486	-	0	0.321214781	0	1.606073907	1.15E-07	7.45E-05

10

20

30

40

【 0 0 5 1】

(B) 高発現の予測を行う転写開始領域の選択

上記(A)で同定された転写開始領域のうち、一つの発現レベルのみを用いて腺癌(B

50

A C成分を含まない腺癌)か扁平上皮癌(低分化肺扁平上皮癌)かを分類できるかどうかを考える。それぞれについて、何らかの閾値を設定することで、転写開始領域抽出用サンプル、検証用サンプル共に特異度100%・感度100%で分類できることを確認した。表2に、その閾値の例を示す(ある群における最大値の方が、その他の群における最小値よりも小さい場合、これらの平均を表2に示している)。

【0052】

【表2】

配列番号	閾値 (threshold_cpm)
No.2	0.50
No.3	2.00
No.5	5.00
No.7	9.00

10

【0053】

実施例2 タンパク質発現を指標とする腺癌と扁平上皮癌の鑑別

(1) 検体

20

肺腺癌には手術検体45例を用い、その内訳は細気管支肺胞上皮癌<bronchioloalveolar carcinoma (BAC)>が7例、肺胞上皮置換性増殖成分を伴う肺腺癌<Adenocarcinoma with BAC>が22例、肺胞上皮置換性増殖成分を伴わない肺腺癌<Adenocarcinoma without BAC>が16例であった。一方、肺扁平上皮癌として手術検体29例を用い、その内訳は高分化及び中分化扁平上皮癌<well and moderately differentiated squamous cell carcinoma (SCC)>が18例、低分化扁平上皮癌<poorly differentiated SCC>が11例であった。

【0054】

(2) 免疫染色によるタンパク質の検出

肺腺癌および肺扁平上皮癌の合計79例を対象に、腺癌マーカーとして、ST6GALNAc1、Napsin A及びTTF-1、扁平上皮癌マーカーとしてCK5、CK6、Desmoglein 3(DSG3)、p40、及びSPATS2の抗体を用いて免疫染色により各タンパクの発現を評価した。

30

i) 抗体

1) 抗TTF-1抗体(DAKO社)

2) 抗Napsin A抗体(Leica Biosystem社、「NCL-L-Napsin A」)

3) 抗p40抗体(Millipore Co.社、「PC373」)

4) 抗CK5抗体(Leica Biosystem社、「NCL-CK5」)

5) 抗CK6抗体(Gene Tex社、「GTX73556」)

6) 抗Desmoglein 3抗体(BIO CARE Medical社、「ACR419A, C」)

40

7) 抗ST6GALNAc1抗体(SIGMA Life science社、「HPA014975」)

8) 抗SPATS2抗体(SIGMA Life science社、「HPA038643」)

【0055】

ii) 免疫染色法

患者から分離した生体試料を常法によりホルマリン固定をした後、パラフィンに包埋して組織片に薄切し、スライドガラスに貼り付けたものを切片試料とした。次いで切片試料を、以下に示す条件で熱処理して抗原を賦活化した。次いで、各マーカータンパク質に対する抗体(一次抗体)を以下の条件で添加して反応させ、緩衝液にて十分な洗浄後、二次抗体としてEnvisionを用いて以下の条件で反応させ、緩衝液にて十分な洗浄後DABを用いて発色させた。その標本を光学顕微鏡下で陽性・陰性を観察した。

50

【 0 0 5 6 】

【 表 3 】

検出マーカ-	熱処理 緩衝液	温度/時間	一次抗体 希釈倍率	一次抗体 反応条件	二次抗体 反応時間
TTF-1	pH9 TE緩衝液	110°C/15分	X75	4°C O/N	Envision 50分
NapsinA	処理なし		X300	4°C O/N	Envision 45分
p40	pH6クエン酸緩衝液	120°C/10分	X2500	4°C O/N	Envision 45分
CK5	pH6クエン酸緩衝液	120°C/10分	X200	4°C O/N	Envision 45分
CK6	pH9 TE緩衝液	100°C/30分	X100	RT 2時間	Envision 45分
Desmoglein 3	pH9 TE緩衝液	105°C/30分	X50	RT1H後 4°C O/N	Envision 75分
ST6GALNAC-1	pH6クエン酸緩衝液	120°C/10分	X4000	RT90分	Envision 45分
SPATS-2	pH9 TE緩衝液	105°C/30分	X50	RT120分	Envision 50分

【 0 0 5 7 】

i i i) 判定

10

20

30

40

50

癌細胞の核もしくは細胞質に中等度以上の染色強度で染色性を認めた場合を陽性とした。各症例の代表切片において、陽性を示す癌細胞が認められない場合をScore 0、50%未満の癌細胞に陽性像を認める場合をScore 1、50%以上の癌細胞に陽性像を認める場合をScore 2とし、Score 0、1を陰性、Score 2を陽性と判定した。これらの評価は2人の病理医により行った。

【0058】

(3) 腺癌および扁平上皮癌のマーカーとしての有用性の評価

(a) 各マーカーの腺癌および扁平上皮癌のマーカーとしての有用性を評価した。すなわち、腺癌マーカーに対する感度・特異度を腺癌の鑑別に対して求め、同様に扁平上皮癌マーカーに対する感度・特異度を扁平上皮癌の鑑別能力に対して評価した。またp値はFisherの正確検定により算出した。

【0059】

【表4】

腺癌マーカー			扁平上皮癌マーカー		
	ST6GALNAC1(+)	ST6GALNAC1(-)		CK5(+)	CK5(-)
Ad	43	2	Ad	0	45
Sq	1	28	Sq	25	4
p = 6.13 x 10 ⁻¹⁷ / 感度 0.956 / 特異度 0.966			p = 6.77 x 10 ⁻¹⁶ / 感度 0.862 / 特異度 1.000		
Napsin A(+)			DSG3(+)		
	Napsin A(+)	Napsin A(-)		DSG3(+)	DSG3(-)
Ad	35	10	Ad	0	45
Sq	0	29	Sq	24	5
p = 2.88 x 10 ⁻¹² / 感度 0.778 / 特異度 1.000			p = 6.77 x 10 ⁻¹⁵ / 感度 0.828 / 特異度 1.000		
TTF-1(+)			p40(+)		
	TTF-1(+)	TTF-1(-)		p40(+)	p40(-)
Ad	33	12	Ad	1	44
Sq	0	29	Sq	25	4
p = 2.82 x 10 ⁻¹¹ / 感度 0.733 / 特異度 1.000			p = 1.62 x 10 ⁻¹⁴ / 感度 0.862 / 特異度 0.978		
			SPATS2(+)		
				SPATS2(+)	SPATS2(-)
Ad			Ad	3	42
Sq			Sq	20	9
			p = 1.78 x 10 ⁻⁸ / 感度 0.690 / 特異度 0.933		
			CK6(+)		
				CK6(+)	CK6(-)
Ad			Ad	20	25
Sq			Sq	23	6
			p = 3.80 x 10 ⁻³ / 感度 0.793 / 特異度 0.556		

Ad : 腺癌 (adenocarcinoma)、Sq : 扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma)

【0060】

その結果、腺癌マーカーについては、ST6GALNAC1は感度・特異度ともに高く、Napsin AとTTF-1の感度は低い。ST6GALNAC1(-)となる検体

で陽性になることがあることが分かった。一方、扁平上皮癌マーカーでは、CK5 / DSG3 / p40は感度・特異度ともに高いが、挙動が似ているため、一部の扁平上皮癌で共通して陰性となる傾向が認められた。また、SPATS2の感度は然程高くはないが、CK5 / DSG3 / p40が陰性となる扁平上皮癌でも陽性になる場合があることが分かった。CK6も、CK5 / DSG3 / p40が陰性となる扁平上皮癌で陽性になることがあるが、腺癌で陽性になりやすく特異度が低い傾向が見られた。これらの結果により、単独マーカーよりも複数のマーカーを組み合わせることで、より高精度な鑑別ができる可能性が示唆された。

【0061】

(4) 2つのマーカーを組み合わせた場合の評価

上記の腺癌3マーカー、扁平上皮癌5マーカーから任意の2つを組み合わせた24通りに対して、腺癌と扁平上皮癌の鑑別能力を検討した。その結果を表5に示す。

【0062】

【表5】

組み合わせ	Ad				Sq				p-value
	(+)/(+)	(+)/(-)	(-)/(+)	(-)/(-)	(+)/(+)	(+)/(-)	(-)/(+)	(-)/(-)	
TTF-1 / ST6GALNAC1	31	2	12	0	0	0	1	28	4.80E-20
CK5 / ST6GALNAC1	0	0	43	2	1	24	0	4	6.71E-20
DSG3 / ST6GALNAC1	0	0	43	2	1	23	0	5	8.95E-20
CK5 / SPATS2	0	0	3	42	16	9	4	0	1.12E-19
DSG3 / SPATS2	0	0	3	42	15	9	5	0	1.79E-19
p40 / ST6GALNAC1	1	0	42	2	1	24	0	4	2.56E-19
ST6GALNAC1 / SPATS2	3	40	0	2	1	0	19	9	7.99E-19
Napsin A / ST6GALNAC1	34	1	9	1	0	0	1	28	1.02E-18
p40 / SPATS2	0	1	3	41	16	9	4	0	1.90E-18
Napsin / CK5	0	35	0	10	0	0	25	4	3.20E-18
Napsin / p40	1	34	0	10	0	0	25	4	4.36E-18
TTF-1 / CK5	0	33	0	12	0	0	25	4	5.82E-18
TTF-1 / p40	1	32	0	12	0	0	25	4	7.61E-18
Napsin A / DSG3	0	35	0	10	0	0	24	5	9.60E-18
TTF-1 / DSG3	0	33	0	12	0	0	24	5	1.98E-17
TTF-1 / Napsin A	27	6	8	4	0	0	0	29	4.96E-16
CK5 / DSG3	0	0	0	45	24	1	0	4	6.77E-16
CK5 / p40	0	0	1	44	25	0	0	4	6.77E-16
CK5 / CK6	0	0	20	25	22	3	1	3	1.17E-15
DSG3 / p40	0	0	1	44	24	0	1	4	1.30E-15
CK6 / p40	0	20	1	24	22	1	3	3	6.49E-15
CK6 / DSG3	0	20	0	25	21	2	3	3	2.33E-14
Napsin A / CK6	13	22	7	3	0	0	23	6	1.60E-11
TTF-1 / CK6	14	19	6	6	0	0	23	6	6.46E-11

【0063】

表中、TTF-1とp40は病理診断の場でしばしば用いられるマーカーの組み合わせである。Fisherの正確検定により得られたp値を比較した場合、TTF-1とp40の組み合わせは13位である。一方、ST6GALNAC1もしくはSPATS2のいずれかをういた組み合わせは1位から9位までを占めており、従来のマーカーの組み合わせでは実現できない高精度な鑑別に、これら2つのタンパク質が必須であることが示された。特にTTF-1とST6GALNAC1は、腺癌の45例すべて、扁平上皮癌の29例中28例を正しく鑑別することが可能であった。

【0064】

(5) 3つのマーカーを組み合わせた場合の評価

上記の腺癌3マーカー、扁平上皮癌5マーカーから任意の3つを組み合わせる場合には、全56通りが存在する。その中でも、以下の6通りについては腺癌と扁平上皮癌を完全に鑑別可能であった。

1) ST6GALNAC1 / TTF-1 / CK5

- 2) ST6GALNAC1 / TTF - 1 / DSG3
- 3) ST6GALNAC1 / TTF - 1 / p40
- 4) ST6GALNAC1 / SPATS2 / DSG3
- 5) ST6GALNAC1 / SPATS2 / CK5
- 6) ST6GALNAC1 / SPATS2 / p40

この結果より、完全な鑑別にはST6GALNAC1が有用であることが示唆される。

【産業上の利用可能性】

【0065】

本発明によれば、患者の肺癌の病理組織型について、病理学的および組織学的に識別が困難な腺癌、とりわけ扁平上皮癌であるか腺癌であるかを鑑別すること、更には低分化扁平上皮癌であるか腺癌であるか、更には低分化扁平上皮癌であるかBAC成分を含まない腺癌であるかの鑑別を、トレーニングを積んだ病理医や臨床検査技師のような専門家の主観によらなくても、客観的かつ迅速に行うことができる。すなわち、患者検体の採取から解析まで、患者の傍らで医療従事者が行う検査(POCT: Point of Care Testing)に、好適に利用できる。

10

【配列表】

0006949315000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/574 D

- (72)発明者 齋藤 剛
東京都文京区本郷2 - 1 - 1 順天堂大学内
- (72)発明者 原 貴恵子
東京都文京区本郷2 - 1 - 1 順天堂大学内
- (72)発明者 三谷 恵子
東京都文京区本郷2 - 1 - 1 順天堂大学内
- (72)発明者 茂柳 薫
東京都文京区本郷2 - 1 - 1 順天堂大学内
- (72)発明者 林崎 良英
埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内
- (72)発明者 伊藤 昌可
埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内
- (72)発明者 川路 英哉
埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内
- (72)発明者 大宮 寛子
埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内
- (72)発明者 山中 康成
埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内

合議体

審判長 田村 聖子
審判官 森井 隆信
審判官 平林 由利子

- (56)参考文献 Systems Biomedicine, 2013年09月20日, Vol. 1, No. 4, pp. 278 - 287
Arch. Pathol. Lab. Med., 2013年1月4日, Vol. 137, No. 9, pp. 1274 - 1281
第29回日本糖質学会年会要旨集, 2009年8月10日, p. 142, P - 144
Am. J. Clin. Pathol., 2002年11月, Vol. 118, No. 5, pp. 749 - 755
第36回日本分子生物学会年会プログラム・要旨集, 2013年11月20日, 2P - 0044
Annal. Oncol., 2014年9月28日, Vol. 25, Suppl. 4, iv406 - iv408, 1172P
肺癌, 2014年10月5日, Vol. 54, No. 5, p. 388, PD - 31

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
G 0 1 N 3 3 / 5 7 4
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / E M B A S E / W P I D S (S T N)