

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年3月6日 (06.03.2008)

PCT

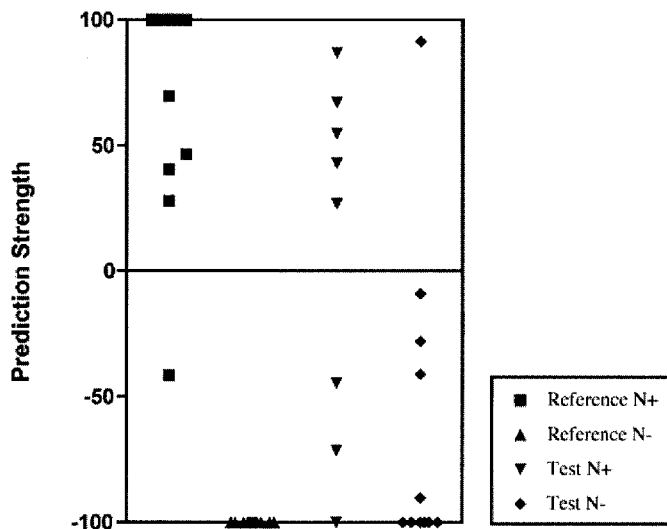
(10) 国際公開番号
WO 2008/026340 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/057151
- (22) 国際出願日: 2007年3月30日 (30.03.2007)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2006-237793 2006年9月1日 (01.09.2006) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人放射線医学総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF RADIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 Chiba (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 今井 高志 (IMAI, Takashi) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内 Chiba (JP). 岩川 真由美 (IWAKAWA, Mayumi) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内 Chiba (JP). 澁谷 均 (SHIBUYA, Hitoshi) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内 Chiba (JP). 三浦 雅彦 (MIURA, Masahiko) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内 Chiba (JP). 吉村 亮一 (YOSHIMURA, Ryoichi) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内 Chiba (JP). 渡邊 裕 (WATANABE, Hiroshi) [JP/JP];

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF PREDICTING METASTASIS OF ORAL CAVITY CANCER INTO CERVICAL LYMPH NODE AND DIAGNOSIS KIT TO BE USED IN THE PREDICTION

(54) 発明の名称: 口腔癌の頸部リンパ節転移予測方法およびその予測に用いる診断キット



(57) Abstract: In individual cases diagnosed as oral cavity cancer, the possibility of the metastasis into the cervical lymph node is objectively predicted in the early stage. A method of predicting the metastasis of oral cavity cancer into the cervical lymph node which comprises the step of collecting a sample from a primary lesion of oral cancer cavity and measuring the expression amounts of metastasis prediction genes, which show different expression amounts between the metastasis group comprising cases showing the metastasis of oral cavity cancer into the cervical lymph node and the non-metastasis group comprising cases showing no metastasis, and the step of comparing the expression amounts of the metastasis prediction genes thus measured with the expression amounts of the metastasis group and/or the non-metastasis group to thereby predict the possibility of the metastasis of oral cavity cancer into the cervical lymph node, characterized in that the metastasis prediction genes include two genes MSR1 (NM_138716.1) and RET (M31213.1).

(57) 要約: 口腔癌と診断された個々の症例について、頸部リンパ節転移の可能性を早期かつ客観的に予測する。口腔癌の原発病変から採取された試料について、

[続葉有]



WO 2008/026340 A1



〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号
独立行政法人放射線医学総合研究所内 Chiba (JP).

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

(74) 代理人: 磯野 道造 (ISONO, Michizo); 〒1020093 東京都千代田区平河町2丁目7番4号 砂防会館別館内
磯野国際特許商標事務所気付 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

口腔癌が頸部リンパ節に転移する症例からなる転移群と、転移しない症例からなる非転移群との間で発現量が変化する転移予測遺伝子群の発現量を測定する工程と、転移予測遺伝子群の発現量を、転移群および/または非転移群における転移予測遺伝子の発現量と比較することにより、口腔癌が頸部リンパ節に転移する可能性を予測する工程と、を含み、転移予測遺伝子群は、MSR1 (NM_138716.1) およびRET (M31213.1) の2つの遺伝子を含むことを特徴とする口腔癌の頸部リンパ節転移予測方法である。

明 細 書

口腔癌の頸部リンパ節転移予測方法およびその予測に用いる診断キット
技術分野

[0001] 本発明は、口腔癌の頸部リンパ節転移予測方法およびその予測に用いる診断キットに関する。

背景技術

[0002] 口腔癌は、口腔内に発生する悪性腫瘍であって、その90%以上は口腔粘膜より発生する扁平上皮癌である。口腔癌は、根治治療として外科療法や放射線療法があり、UICC (Union International Contre Cancer) 分類(2002年)におけるI期、II期での局所制御率が80~90%程度と、比較的高く治癒が望める癌である。

[0003] 口腔癌が治療後にどのような経過をたどるのかを予測するための重要な予後因子として、頸部リンパ節転移が挙げられる。

頸部リンパ節は、口腔原発巣からのリンパ液を流れてくる癌細胞が身体全体に播種しないような、いわば関所の役割を担っており、癌細胞を捉えるとそこで腫大する性質をもっている。腫大した頸部リンパ節は、手術により外科的に摘出される場合が多いが、術後に病理学的に明らかとなる転移リンパ節の数およびリンパ節皮膜外への癌細胞の進展の有無は、予後に直結すると言われている。

[0004] 従って、口腔癌患者の頸部リンパ節への転移を早期に知ることができれば、口腔癌の予後の改善が期待できる。そのために、従来、治療前に頸部リンパ節転移を予測する方法が試みられてきた。以下、従来行われていた2つの頸部リンパ節転移の予測方法について説明する。

[0005] 1つ目の予測方法は、その臨床上的分類により転移予測を行うものである。例えば、舌癌(口腔癌に含まれる)は、臨床上的分類により、腫瘍の形態が3種類(表在性、外向性、内向性)に分類される。このとき、内向性の腫瘍は表在性のものより転移しやすいことが知られている(例えば、下記の非特許文献1~3参照。参照して説明に代える。)。すなわち、1つ目の予測方法によれば、臨床上的分類により、頸部リンパ節への転移発生率を推定することができる。

[0006] 2つ目の予測方法は、分子病理学的な検索により転移予測を行うものである。癌遺伝子や癌抑制遺伝子、シグナル伝達因子、細胞接着に関わる遺伝子の発現状態を解析することによって、転移するか否かが未知の症例に対して転移予測する試みが行われている。最近では、ポストゲノム時代を迎えて網羅的に発現解析を行うことが可能となり、マイクロアレイ技術を用いた研究も行われつつある(例えば、下記の非特許文献4~8参照。参照して説明に代える。)

[0007] しかしながら、前記した1つ目の予測方法は、頸部リンパ節への転移発生率が集団を対象として確率的に示されたものに過ぎず、個々の症例について頸部リンパ節転移の可能性が予測されていないという問題があった。

[0008] また、前記した2つ目の予測方法は、個々の症例について頸部リンパ節転移の可能性の予測が期待されるものの、現在において臨床応用されるまでには至っていない。

具体的には、非特許文献4のように、タンパク発現を免疫組織学的方法により判定する場合には、その定量性が主観的であり、再現性ある定量化が難しいため臨床応用は困難である。

[0009] また非特許文献5は、従来より指摘されていた、cyclin D1のタンパク、mRNAの発現と転移あるいは予後との相関について、遺伝子増幅に感度の高いFISH法を用いて解析した論文であり、正診率が80%程度と高い結果が得られている。しかしながら、FISH法自体が技術を要求する上に、遺伝子増幅の有無の判定も煩雑(200個の間期細胞において20%以上の核に3個以上のsignalが認められることがCCND1の増幅有りと判定する条件である)で、時間や人件費等コストがかかるとの指摘がある。すなわち、判定に至る過程が煩雑でコストが高いため普及していないものと考えられる。

[0010] 非特許文献6、非特許文献7、非特許文献8は、マイクロアレイを用いた論文である。

非特許文献7は、test groupが4例と少なく検証が十分とはいえない。また、原発巣と転移巣の対比について基礎的な解析を行っており、対象患者についての臨床データを提供しておらず、臨床応用するのは困難である。

[0011] また、非特許文献6、非特許文献8では、原発巣を治療する際に、頸部に対して予

防的頸部郭清術や化学療法や/あるいは術後放射線治療を行っている。リンパ節転移発現の有無を調べるためには頸部に対してwait and see policyをとることが望ましいが、それがなされてはいない。スコア化の方法も不明瞭である。

[0012] したがって、口腔癌と診断された個々の症例について、頸部リンパ節転移の可能性を早期かつ客観的に予測することが望まれている。

[0013] 参照する文献は以下の通りである。

(非特許文献1) Shibuya H., Hoshina M., Takeda M., Matsumoto S., Suzuki S., Okada N. "Brachytherapy for stage I and II oral tongue cancer: An analysis of past cases focusing on control and complications." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 26: 51-8.

(非特許文献2) Nakagawa, T., Shibuya H., Yoshimura R., Miura M., Okada N., Kishimoto S., Amagasa M., Omura K. "Neck node metastasis after successful brachytherapy for early stage tongue carcinoma." *Radiotherapy and Oncology* 2003; 68, 129-135.

(非特許文献3) 日本口腔腫瘍学会学術委員会編 舌癌取扱い指針 口腔腫瘍, 2005; 17(1), 13-85.

(非特許文献4) Katayama A., Bandoh N., Kishibe K., Takahara M., Ogino T., Nonaka S., Harabuchi Y. "Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis." *Clinical Cancer Res* 2004; 10, 634-640.

(非特許文献5) Myo K., Uzawa N., Miyamoto R., Sonoda I., Yuki Y., Amagasa T. "Cyclin D1 gene numerical aberration is a predictive marker for occult cervical lymph node metastasis in TNM stage I and II squamous cell carcinoma of the oral cavity." *Cancer* 2005; 2709-2716.

(非特許文献6) Chung C., Parker J., Karaca G., Wu J., Funkhouser W., Moore D., Butterfoss D., Xiang D., Zanation A., Yin X., Shockley W., Weisser M., Dressler L., Shores C., Yarbrough W., Perou C. "Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression." *Cancer Cell* 2004; 5, 4

89-500.

(非特許文献7) O'Donnell R., Kupferman M., Wei S., Singhal S., Weber R., O'Malley B., Cheng Y., Putt M., Feidman M., Ziober B., Muschel R. "Gene expression signature predicts lymphatic metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity." *Oncogene* 2005; 24, 1244-1251.

(非特許文献8) Roepman P., Wessels F., Kettelarij N., Kemmeren P., Miles A., Lijnzaad P., Tilanus M., Koole R., Hordijk G., Vliet P., Reinders M., Slootweg P., Holstege F. "An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas." *Nature Genetics* 2005; 37, 182-186.

発明の開示

- [0014] すなわち、本発明の諸側面として次のような口腔癌の頸部リンパ節転移予測方法および口腔癌の頸部リンパ節転移予測用診断キットを提供する。
- [0015] [1] 本発明の口腔癌の頸部リンパ節転移予測方法は、口腔癌の原発病変から採取された試料について、口腔癌が頸部リンパ節に転移する症例からなる転移群と、転移しない症例からなる非転移群との間で発現量が変化する転移予測遺伝子群の発現量を測定する工程と、前記転移予測遺伝子群の発現量を、前記転移群および／または前記非転移群における前記転移予測遺伝子の発現量と比較することにより、口腔癌が頸部リンパ節に転移する可能性を予測する工程と、を含み、前記転移予測遺伝子群は、MSR1 (NM_138716.1) およびRET (M31213.1) の2つの遺伝子を含むことを特徴とする。
- [0016] [2] 前記転移予測遺伝子群は、さらに、FARP1 (CD675885.1) の遺伝子を含む構成としてもよい。
- [0017] [3] 前記転移予測遺伝子群は、さらに、ARG1 (NM_000045.2)、FARP1 (NM_005766.2)、H19 (R83431.1)、NULL (BC019018.2)、NULL (AW820586.1)、HHLA2 (NM_007072.2)、SGCD (NM_172244.2)、SFRP4 (NM_003014.2)、ALOX12 (NM_000697.1)、LOC146429 (AL137382.1)、PDZRN3 (AL137307.1)、NCAM1 (AV702977.1)、WNT11 (NM_004626.2)、および、SORCS2 (NM_020777.1) の16の遺伝子のうち少なくとも1つを含む構成としてもよい。

- [0018] [4] 前記転移予測遺伝子群は、さらに、ARG1 (NM_000045.2)、FARP1 (NM_005766.2)、H19 (R83431.1)、NULL (BC019018.2)、NULL (AW820586.1)、HHLA2 (NM_007072.2)、SGCD (NM_172244.2)、SFRP4 (NM_003014.2)、ALOX12 (NM_000697.1)、LOC146429 (AL137382.1)、PDZRN3 (AL137307.1)、NCAM1 (AV702977.1)、WNT11 (NM_004626.2)、および、SORCS2 (NM_020777.1) の16の遺伝子を全て含む構成としてもよい。
- [0019] [5] 本発明の口腔癌の頸部リンパ節転移予測用診断キットは、MSR1 (NM_138716.1) およびRET (M31213.1) の2つの遺伝子配列にそれぞれ特異的にハイブリダイズ可能な2種類のオリゴヌクレオチドを含むことを特徴とする。
- [0020] [6] 前記口腔癌の頸部リンパ節転移予測用診断キットは、さらに、FARP1 (CD675885.1) の遺伝子配列に特異的にハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドを含む構成としてもよい。
- [0021] [7] 前記口腔癌の頸部リンパ節転移予測用診断キットは、さらに、ARG1 (NM_000045.2)、FARP1 (NM_005766.2)、H19 (R83431.1)、NULL (BC019018.2)、NULL (AW820586.1)、HHLA2 (NM_007072.2)、SGCD (NM_172244.2)、SFRP4 (NM_003014.2)、ALOX12 (NM_000697.1)、LOC146429 (AL137382.1)、PDZRN3 (AL137307.1)、NCAM1 (AV702977.1)、WNT11 (NM_004626.2)、および、SORCS2 (NM_020777.1) の16の遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子配列に特異的にハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドを含む構成としてもよい。
- [0022] [8] 前記口腔癌の頸部リンパ節転移予測用診断キットは、さらに、ARG1 (NM_000045.2)、FARP1 (NM_005766.2)、H19 (R83431.1)、NULL (BC019018.2)、NULL (AW820586.1)、HHLA2 (NM_007072.2)、SGCD (NM_172244.2)、SFRP4 (NM_003014.2)、ALOX12 (NM_000697.1)、LOC146429 (AL137382.1)、PDZRN3 (AL137307.1)、NCAM1 (AV702977.1)、WNT11 (NM_004626.2)、および、SORCS2 (NM_020777.1) の16の遺伝子の全ての遺伝子配列にそれぞれ特異的にハイブリダイズ可能な16種類のオリゴヌクレオチドを含む構成としてもよい。
- [0023] 本発明によれば、次のような効果を得ることができる。
本発明の口腔癌の頸部リンパ節転移予測方法によれば、口腔癌と診断された個々

の症例について、頸部リンパ節転移の可能性を早期かつ客観的に予測することができる。

また、本発明の口腔癌の頸部リンパ節転移予測用診断キットによれば、口腔癌と診断された個々の症例について、頸部リンパ節転移の可能性を早期かつ客観的に予測することができる。

[0024] 前記した本発明の諸側面及び効果、並びに、他の効果および更なる特徴は、添付の図面を参照して後述する本発明の例示的かつ非制限的な実施の形態の詳細な説明により、一層明らかとなるであろう。

図面の簡単な説明

[0025] [図1]転移予測遺伝子群の19遺伝子の全てを用いてテストグループの転移予測を行った結果を示す図である。

[図2]転移予測遺伝子群のなかで、モデル1～4において共通して選択された2つの遺伝子(MSR1、RET)を用いてテストグループの転移予測を行った結果を示す図である。

[図3]転移予測遺伝子群のなかで、モデル1、3において共通して選択された3つの遺伝子(MSR1、RET、ARG1)を用いてテストグループの転移予測を行った結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0026] 以下、本発明を実施するための最良の形態(以下「実施形態」という)について、適宜図面を参照しながら詳細に説明する。

[0027] (転移予測遺伝子群)

本発明は、口腔癌の原発病変から採取された試料について、口腔癌が頸部リンパ節に転移する症例からなる転移群と、転移しない症例からなる非転移群との間で、下記の表1に示された19種の遺伝子(転移予測遺伝子)の発現量、つまり前記遺伝子から転写されるmRNAの発現量が、統計学的に有意に変化しているという本発明者らの発見に基づいてなされたものである。

なお、本実施形態において、「転移予測遺伝子群」とは、表1に示す19の遺伝子(転移予測遺伝子)のうち複数の遺伝子からなる群である。

[0028] [表1]

List of 19 candidate genes for predicting N status.

Rank order	NCBI accession no.	Symbol	Gene description	Permutational p-value	Mean ratio (N+ class)/(N- class)
1	NM_138716.1	MSR1	macrophage scavenger receptor 1 (MSR1), transcript variant SR-AIII	0.0003	2.2
2	M31213.1	RET	papillary thyroid carcinoma-encoded protein mRNA	0.0004	3.2
3	CD675885.1	FARP1	fs29d06y1 Human Lens cDNA (Normalized): fs cDNA clone fs29d06 5'	0.0007	2.1
4	NM_000045.2	ARG1	arginase, liver (ARG1)	0.0010	0.4
5	NM_005766.2	FARP1	FERM, RhoGEF (ARHGEF) and pleckstrin domain protein 1 (chondrocyte-derived) (FARP1), transcript variant 1	0.0016	2.0
6	R83431.1	H19	yp82g02r1 Soares fetal liver spleen INFLS cDNA clone IMAGE:193970 5'	0.0037	2.1
7	BC019018.2	NULL	cDNA clone IMAGE:3941904	0.0045	2.0
8	AW820586.1	NULL	QV2-ST0298-240200-063-d06 ST0298 Homo sapiens cDNA	0.0054	2.1
9	NM_007072.2	HHLA2	HERV-H LTR-associating 2 (HHLA2)	0.0056	0.5
10	NM_172244.2	SGCD	sarcoglycan, delta (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)(SGCD), transcript variant 2	0.0057	2.4
11	NM_003014.2	SFRP4	secreted frizzled-related protein 4 (SFRP4)	0.0065	3.1
12	NM_000697.1	ALOX12	arachidonate 12-lipoxygenase (ALOX12)	0.0078	0.4
13	AL137382.1	LOC146429	mRNA; cDNA DKFZp434L1226 (from clone DKFZp434L1226)	0.0079	0.5
14	AL137307.1	PDZRN3	mRNA; cDNA DKFZp586L2217 (from clone DKFZp586L2217)	0.0082	0.3
15	AV702977.1	NCAM1	ADB cDNA clone ADBCVD08 5'	0.0083	2.2
16	NM_004626.2	WNT11	wingless-type MMTV integration site family, member 11 (WNT11)	0.0085	2.5
17	NM_020777.1	SORCS2	sortilin-related VPS10 domain containing receptor 2 (SORCS2)	0.0086	3.2
18	NM_145650.2	MUC15	mucin 15 (MUC15)	0.0091	0.4
19	H08012.1	NULL	y191b08r1 Soares infant brain INIB cDNA clone IMAGE:45474 5'	0.0092	6.9

The top 19 gene sets were listed as the rank-order of permutational p-values that were <0.01.

[0029] 表1において、「Rank order」とは、19種の転移予測遺伝子について、口腔癌の転移予測に好適な順に並べたものである。また、後記するように、口腔癌の転移予測に

対し、より好ましくはRank orderが1～3の遺伝子(MSR1、RET、FARP1)であり、さらに好ましくは、Rank orderが1、2の遺伝子(MSR1、RET)が用いられる。

[0030] また、「NCBI accession no.」とは、各転移予測遺伝子が登録および公開されている米国国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)のデータベースにおいて、各転移予測遺伝子に対して付されている番号である。また、「Symbol」とは、各転移予測遺伝子の名称である。また、「Gene discription」とは、各転移予測遺伝子の概略を説明するためのものである。また、「Permuatational p-value」とは、後記する実施例で示すように、19遺伝子を選定するために行った並べ替え検定におけるp値である。また、「Mean ratio (N+ class) / (N- class)」とは、各転移予測遺伝子において、転移群(N+ class)と非転移群(N- class)との間での発現量の比を示すものである。

[0031] (口腔癌の頸部リンパ節転移予測方法)

本実施形態に係る転移予測方法は、前記した転移予測遺伝子群の発現量を測定する工程と、前記転移予測遺伝子群の発現量を、前記転移群および／または前記非転移群における前記転移予測遺伝子の発現量と統計学的に比較することにより、口腔癌が頸部リンパ節に転移する可能性を予測する工程と、を含んでいる。

[0032] まず、転移予測遺伝子群の発現量を測定する工程について説明する。

[0033] 転移予測遺伝子群の発現量の測定対象となる試料は、口腔癌と診断された被検体の原発病変から採取されるものであって、例えば小線源治療等の治療前に原発病変から採取された試料である。なお、本実施形態においては、試料が採取される被検体としてヒトを想定して説明するが、例えば、マウス、イヌ、サル等の非ヒト動物も被検体に含まれる。

[0034] また、採取された試料の保存方法は、mRNAが安定に保存されていればよく、特に限定されるものではない。例えば、生検組織を直接以下に示す工程に適用してもよく、また、採取された生検組織を一度パラフィンに包埋して保存されていたものを以下に示す工程に適用してもよい。

[0035] 採取された組織からmRNAを抽出する手法は、当業者が一般に生体成分(組織や細胞)からmRNAを抽出する手法を好適に利用することができる。生体成分(組織や細胞)からmRNAを抽出する手法としては、例えば、フェノール抽出、エタノール沈殿

、オリゴdTカラム等が挙げられる。その他、各社から販売されているRNA抽出キット等も好適に利用することができる。

[0036] 転移予測遺伝子群の発現量を測定する手法は、当業者が一般に遺伝子の発現量を測定する手法を好適に利用することができる。遺伝子の発現量を測定する手法としては、例えば、マイクロアレイやノーザンブロット等のハイブリダイゼーションに基づく手法や、RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 法等のプライマー伸長に基づく手法が挙げられる。

なお、転移予測遺伝子群の発現量を測定することができれば、各遺伝子におけるどの部分の発現量を測定してもよい。例えば、当該遺伝子の全長に対応するmRNAの発現量を測定してもよく、その一部分の発現量を測定してもよい。また、例えば、hnRNAの発現量を測定してもよく、スプライシングされて成熟したmRNAの発現量を測定してもよい。

[0037] 前記の測定手法に用いるプライマーまたはプローブに用いられる塩基配列は、採取された試料中に含まれる転移予測遺伝子群のmRNAとそれぞれ特異的にハイブリダイズ可能であればよい。例えば、前記した転移予測遺伝子の全長にハイブリダイズしてもよく、その一部にハイブリダイズしてもよい。また、キャップ配列やポリアデニル配列を含んでハイブリダイズしてもよく、含んでいなくてもよい。言い換えると、発現量の測定手法に応じて適宜適切な塩基配列が、プライマーまたはプローブとして選択される。そして、このようなプライマーやプローブは、特定の塩基配列を有していることは必要ではなく、その遺伝子が発現しているか否かを確認することができればよい。

[0038] なお、このような転移予測遺伝子群のmRNAとそれぞれ特異的にハイブリダイズ可能なプライマーまたはプローブ (オリゴヌクレオチド) を含んだ診断キットを用いれば、容易に本願発明の口腔癌の頸部リンパ節転移予測方法を実施することができる。ここで、「オリゴヌクレオチド」とは、前記した条件を満たすプライマーまたはプローブを意味するものであって、特にその塩基数を規定するものではない。診断キットについての詳細な説明は後記する。

[0039] 次に、転移予測遺伝子群の発現量を、前記転移群および／または前記非転移群における前記転移予測遺伝子の発現量と統計学的に比較することにより、口腔癌が

頸部リンパ節に転移する可能性を予測する工程について説明する。

[0040] この工程において用いられる統計学的手法としては、例えば、The nearest mean classifier(NMC)法、Diagonal linear discriminant classifier (DLDC)法、k-Nearest neighbor predictor (k-NN)法、Linear support vector machine (linSVC)法(参考文献: We sels LA, Reinders MJ, Hart AM, et al: A protocol for building and evaluating predictors of disease state based on microarray data. Bioinformatics 21, 3755-3762, 2005.)等の、当業者が一般に2群の差を評価するための統計学的手法を好適に利用することができるが、特にこれらの手法に限定されるものではない。

少なくとも、転移予測遺伝子群の発現量を指標とし、測定された発現量を、前記転移群および／または前記非転移群の発現量と比較することにより、いずれに近いかを評価して、測定対象の口腔癌が頸部リンパ節に転移するか否か判別する工程を含むものである。このとき、所定の閾値を設定し、測定された転移予測遺伝子の発現量が当該閾値を上回っているか下回っているかにより、測定対象の口腔癌が頸部リンパ節に転移するか否か判別する構成としてもよい。

[0041] (口腔癌の頸部リンパ節転移予測用診断キット)

前記したように、本実施形態の口腔癌の頸部リンパ節転移予測用診断キットは、表1に記載の転移予測遺伝子群に示される遺伝子にそれぞれ特異的にハイブリダイズ可能なプライマーやプローブ(オリゴヌクレオチド)を含むものである。

[0042] 例えば、前記診断キットは、MSR1(NM_138716.1)およびRET(M31213.1)の2つの遺伝子配列にそれぞれ特異的にハイブリダイズ可能な2種類のオリゴヌクレオチドを含む構成である。

[0043] また、例えば、前記診断キットは、前記2種類のオリゴヌクレオチドが含まれる構成に、FARP1(CD675885.1)の遺伝子配列に特異的にハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドを含む構成である。

[0044] また、例えば、前記診断キットは、前記3種類のオリゴヌクレオチドが含まれる構成に、さらに、ARG1(NM_000045.2)、FARP1(NM_005766.2)、H19(R83431.1)、NULL(B C019018.2)、NULL(AW820586.1)、HHLA2(NM_007072.2)、SGCD(NM_172244.2)、SFRP4(NM_003014.2)、ALOX12(NM_000697.1)、LOC146429(AL137382.1)、PD

ZRN3 (AL137307.1)、NCAM1 (AV702977.1)、WNT11 (NM_004626.2)、および、SORCS2 (NM_020777.1)の16の遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子配列に特異的にハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドを含む構成である。

[0045] また、例えば、前記診断キットは、前記3種類のオリゴヌクレオチドが含まれる構成に、さらに、ARG1 (NM_000045.2)、FARP1 (NM_005766.2)、H19 (R83431.1)、NULL (BC019018.2)、NULL (AW820586.1)、HHLA2 (NM_007072.2)、SGCD (NM_172244.2)、SFRP4 (NM_003014.2)、ALOX12 (NM_000697.1)、LOC146429 (AL137382.1)、PDZRN3 (AL137307.1)、NCAM1 (AV702977.1)、WNT11 (NM_004626.2)、および、SORCS2 (NM_020777.1)の16の遺伝子の全ての遺伝子配列にそれぞれ特異的にハイブリダイズ可能な16種類のオリゴヌクレオチドを含む構成である。

[0046] なお、前記診断キットに、複数種類のオリゴヌクレオチドが含まれる形態は、例えば、1本のチューブに一括して含まれていてもよく、複数本のチューブに別々に含まれていてもよい。また、診断キットにおけるオリゴヌクレオチドの保存形態は、例えば、TE buffer等の所定の溶液に溶解されていてもよく、所定の担体に結合していてもよく、凍結乾燥されて粉末状となってもよい。

[0047] なお、本発明は前記実施形態に限定されるものではなく、その技術思想のおよぶ範囲で種々の変更実施を行うことができる。

例えば、本実施形態においては、転移予測遺伝子群の発現量の測定として、転移予測遺伝子群のmRNAの発現量を測定するものとして説明したが、転移予測遺伝子群の発現量を測定することができれば、例えば、cDNA等の他の形態のポリヌクレオチドの発現量を測定することとしてもよい。また、転移予測遺伝子群のmRNAから翻訳されたタンパク質の発現量を測定する構成としてもよい。

[0048] また、本実施形態においては、遺伝子を取り扱う一般的な操作の概略を例示したに過ぎないので、前記方法の変法や全く異なる方法も使用できる。

現在、電気泳動装置やPCR装置等を組み合わせて、核酸の抽出、増幅、分離、定量を全自動で行う装置が市販されているので、このような装置を用いることも好ましい。

[0049] また、本実施形態においては、19種類の転移予測遺伝子のうち、常にMSR1 (NM_1

38716.1) RET (M31213.1) の2つの遺伝子を含む構成の方法および診断キットとして説明したが、本発明の技術思想は、19種類の転移予測遺伝子のうち1種類の転移予測遺伝子を含む構成の方法および診断キット、あるいは、19種類の転移予測遺伝子のうち、任意の2種類以上の遺伝子の組み合わせからなる転移予測遺伝子群を含む構成の方法および診断キットにも及ぶものである。

実施例

[0050] 次に、本発明のより具体的な例を実施例によって説明する。

[0051] <材料および方法>

[マイクロアレイ解析]

本実施例では、まず、口腔癌と診断された患者41例よりインフォームドコンセントを得て、小線源治療前の舌癌組織を生検により採取し、採取された組織についてマイクロアレイ解析を行った。

[0052] マイクロアレイ解析の詳細は以下の通りである。

採取された組織を直ちにRNAlater (Ambion Inc., Austin, TX)に浸漬した。この浸漬された組織から、ISOGEN (Nippon gene)を用いてtotal RNAを抽出し、さらに、RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany)を用いてtotal RNAを精製した。この精製されたtotal RNAに対して、Codelink Expression Assay Reagent Kit (GE Healthcare, Chandler, AZ)を用いてビオチン標識cRNAを合成した。ビオチン標識cRNAを合成するに際してはtotal RNAに対してcDNAを一旦合成する工程を経ている。

[0053] 合成されたビオチン標識cRNAをCodelink Uniset Human 20K I Bioarray (GE Healthcare, Chandler, AZ)にハイブリダイゼーションさせた後、Cy5-Streptavidinで染色し、所定の洗浄操作を行った。

[0054] なお、Codelink Uniset Human 20K I Bioarrayは、搭載されている遺伝子リストが製造元により開示されているように、UniGeneやRefseq等の公共データベースに登録されている遺伝子から、基礎研究やバイオテクノロジー、ゲノム創薬の研究分野において有用な約20,000種のヒトの遺伝子が、オリゴプローブとしてスポットされているものである。

[0055] そして、Agilent scanner G2505A (Agilent technologies)を用いてイメージ画像を取

得し、このイメージ画像からCodelink Expression 4.0 ソフトウェア(GE Healthcare, Chandler, AZ)を用いて各スポットにおけるCy5の蛍光強度を数値化した。

[0056] このようなマイクロアレイ解析は、1症例につき2枚のアレイを用いて行った。このとき、ハイブリダイゼーションによるアレイ間の違いを吸収するため、それぞれのアレイにおいて、全てのスポットの蛍光強度の中央値により各スポットの各蛍光強度の除算を行うmedian normalization法を用いて標準化した。そして、標準化された各スポットの蛍光強度の、2枚のアレイ間の平均値を算出した。この平均値を発現強度データ(発現量)として以降のデータ解析に用いた。すなわち、口腔癌患者41例について、1症例につき約20,000種の遺伝子の発現強度データが取得された。

[0057] [転移予測遺伝子の選定、および、転移予測遺伝子を用いた転移判別モデルの作成]

このようにマイクロアレイ解析により発現強度データが取得された口腔癌患者41例のうち、転移あり11例(転移群)および転移なし11例(非転移群)からなるグループ(以下、「リファレンスグループ」という)を用いて、口腔癌の頸部リンパ節への転移を予測する転移予測遺伝子の選定を行った。また、転移予測遺伝子を用いた転移判別モデルの作成を行った。

[0058] なお、転移の有無(それぞれの症例が転移群または非転移群のどちらに属するか)の判断は、小線源治療を行ってから平均29ヶ月(範囲11~31ヶ月)経過後に、臨床的に診断することにより判断した。一般に、口腔癌の頸部リンパ節への転移は、90%が1年5ヶ月以内に起こるとされているため、本実施例の経過期間(平均29ヶ月)は、転移を判断するのに充分である。特に、リファレンスグループの転移なし11例(非転移群)は、最短の症例でも組織を採取してから32ヶ月経過後に転移がないと判断しているため、非転移群と判断した後に転移群へと転じる可能性は極めて低い。

[0059] まず始めに、リファレンスグループの転移群と非転移群とを比較して、発現量の比が2倍あるいは1/2倍より小さい413遺伝子を抽出した。発現量の比は、前記した表1においては、「Mean ratio (N+ class) / (N- class)」の項目に該当する。発現量の比が2倍より大きい場合には、この値が、2以上または0.5以下となる。

[0060] 次に、抽出された413遺伝子について、並べ替え検定(permutation test)を行い、

転移群および非転移群の間の発現量の比について、統計的に有意性を検討した。なお、並べ替え検定の検定量としては、2群の平均値の差 $\mu_m - \mu_n$ (μ_m 、 μ_n はそれぞれ転移あり群、転移なし群の平均) を使用した。

[0061] 並べ替え検定では、まず、転移の有無についての正しいラベルを用い、前記の検定量を求めた。

次に、転移の有無についてのラベルの総数を保ったまま(転移あり11例と転移なし11例)、各サンプルに対してランダムにラベルをつけ、これらの検定量を計算した。一般的な並べ替え検定では、ランダムラベル付けは、1,000回から10,000回程度を用いることが多い。しかしその場合には、確率的な揺らぎの影響が避けられず、計算の度にp値が変動する欠点があるため、本実施例では取りうるすべてのラベル化の組み合わせである C_{22}^{11} = 705,432通りを試行した。

p値は、正しいラベルの検定量が正の場合にはそれを上回るものの割合、逆に正しいラベルの検定量が負の場合にはそれを下回るものの割合として求めた。

[0062] このように、並べ替え検定によりp値<0.01の統計学的有意性を満たす遺伝子を選定すると、表1に示す19遺伝子となった。表1においては、並べ替え検定により求められたp値が、「Permuatational p-value」の項目で示されている。

[0063] そして、この19遺伝子に関して、leave-one-outクロスバリデーション(LOOCV)を行うことにより、さらなる遺伝子の選定を行った。本実施例におけるLOOCVは、転移群または非転移群から1症例を取り除き、残りの症例で転移判別モデルを構築したときに、初めに除いた症例が転移群または非転移群のどちらに属するかを正確に予測されるかどうかを検定するものである。

[0064] なお、転移判別モデルの作成にあたり、遺伝子の発現量の絶対量による影響を取り除くため、z-scoreへの変換を行った。z-scoreへの変換は、リファレンスグループの各症例毎に、各遺伝子の発現量から平均発現量を引いたものを、前記各遺伝子の発現量の標準偏差で割ることによって行うことができる。

[0065] 転移判別モデルとしては、重み付け多数決法(Weighted Vote Analysis)を使用した。

本実施例の重み付け多数決法は、リファレンスグループを用いて選定された19遺

伝子を用いて予測能 (prediction strength: PS) を算出するモデルを作成することで、転移群または非転移群のどちらに所属するか未知の症例 y が、どちらに所属するかを予測するものである。

[0066] 重み付け多数決法においては、まず、 i 番目遺伝子についての重み $w(i)$ を算出した。重み $w(i)$ は、次の (1) 式により求めることができる。

[0067] [数1]

$$w(i) = \frac{\mu_m(i) - \mu_n(i)}{\sigma_m(i) + \sigma_n(i)}$$

[0068] ここで、 μ_m 、 μ_n は、それぞれ転移群、非転移群の平均であって、 σ_m 、 σ_n は、それぞれ転移群、非転移群の標準偏差である。

次に、重み付け多数決法において、 j 番目の症例の発現パターンを $x(i, j)$ と示し、それぞれの遺伝子を用いて重み付け多数決を行うことによって $PS(j)$ を算出した。 $PS(j)$ は、次の (2) 式により求めることができる。

[0069] [数2]

$$PS(j) = \frac{\sum_i w_i \left(x(i, j) - \frac{\mu_m(i) + \mu_n(i)}{2} \right)}{\sum_i \left| w_i \left(x(i, j) - \frac{\mu_m(i) + \mu_n(i)}{2} \right) \right|} \cdot 100$$

[0070] また、LOOCV を用いた遺伝子の選定には、各 LOOCV のリファレンスグループの結果から得られた、転移群と非転移群との PS の差を評価し、転移判別モデルの性能の指標とした。

遺伝子選定の手順としては、次の4つのモデルを用いた。

[0071] モデル1: 並べ替え検定で最も p 値が小さい遺伝子から順次追加する。2群の差は t 検定で評価した。

[0072] モデル2: 並べ替え検定で最も p 値が小さい遺伝子から順次追加する。2群の差は Wilcoxon 検定で評価した。

[0073] モデル3: 並べ替え検定で最もp値が小さい遺伝子を最初のモデルとし、最も改善の度合いが高い遺伝子をひとつずつモデルに追加していく。2群の差はt検定で評価した。

[0074] モデル4: 並べ替え検定で最もp値が小さい遺伝子を最初のモデルとし、最も改善の度合いが高い遺伝子をひとつずつモデルに追加していく。2群の差はWilcoxon検定で評価した。

[0075] [選定された転移予測遺伝子を用いた転移判別モデルの検証]

マイクロアレイ解析が行われた前記口腔癌患者41例のうち、転移あり8例(転移群)および転移なし11例(非転移群)からなる前記リファレンスグループとは独立した群(以下、「テストグループ」という)を用いて、選定された転移予測遺伝子を用いた転移判別モデルの予測能について検証を行った。

[0076] テストグループのデータを重み付け多数決法(Weighted Vote Analysis, WVA)に適用するにあたり、遺伝子の発現量の絶対量による影響を取り除くため、z-scoreへの変換を行った。z-scoreへの変換は、テストグループの各症例毎に、各遺伝子の発現量から平均発現量を引いたものを、前記各遺伝子の発現量の標準偏差で割ることによって行うことができる。なお、このときの平均発現量および標準偏差は、前記したリファレンスグループにおけるz-scoreへの変換と同じ値を用いた。

[0077] <結果>

表2は、転移予測遺伝子群の19遺伝子の全てを用いた転移判別モデルによって、テストグループの転移予測を行った結果を示している。

[0078] [表2]

転移	症例番号	MSR1	ARG1	NULL	MUC15	SGCD	ALOX12	SFRP4	WNT11	FARP1	HHLA2	RET	PDZRN3	NCAM1	H19	NULL	NULL	SORCS2	LOC146429	FARP1	予測能	判定	
		GES7055	GF59705	GF62837	GF80513	GE80907	GF80938	GE81222	GE81421	GF81559	GE81723	GE82572	GE84465	GE85957	GE87260	GE87320	GE87326	SORCS2	LOC146429	FARP1	予測能	判定	
		NM_138761	NM_000652	BC019182	NM_149502	NM_172442	NM_006971	NM_000142	NM_046562	NM_005762	NM_007072	M12131	AL137971	AV029771	R83931	FH0121	AW020861	NM_020771	AL137981	GE88809	GE88809		
		936	-0.14481	-0.65758	-1.27537	-0.85083	-0.22555	-0.82793	13.80075	-0.13839	-0.84432	1.999425	-1.02822	-0.85357	-0.64701	-0.34729	0.276782	-0.61211	-0.64704	0.287502	63.92	+	
		1479	-0.51029	0.187536	-0.93823	-0.7226	-0.52149	-0.2182	0.274807	-0.1715	-0.24825	-0.53831	-0.083971	-0.86798	-0.63902	-0.33205	-0.6687	0.496866	0.758973	-0.41734	-38.70	-	
		1572	-0.57473	18.46256	-0.91051	5.144646	-0.69416	-0.35647	8.467114	-0.65544	1.13596	-0.48415	-0.76208	-0.88159	-0.25154	-0.31488	-0.32663	0.138218	-0.5075	-0.4019	-58.39	-	
		1578	0.830464	0.624915	-0.93287	0.37735	-0.29583	0.306057	13.3507	-0.75562	-0.05099	-0.32121	-0.31255	-0.32426	-0.66088	-0.28843	-0.25766	-0.35786	0.147065	-0.91524	36.01	+	
		1665	1.645579	-0.58888	-0.09776	-0.37019	1.690488	-0.74029	1.952336	2.379148	0.722219	-0.1419	-0.67063	0.694457	-0.38226	-0.19857	1.21567	0.015349	-0.72255	1.235589	87.46	+	
		1668	2.158406	-0.69395	-0.29994	-0.64121	-0.74094	-0.82815	-0.33048	-0.00739	1.12547	-0.16178	-0.61258	-0.33452	-0.82573	-0.51033	-0.33081	1.146486	-0.36983	-0.90605	0.587006	42.88	+
		1670	1.262855	-0.54947	-1.18363	1.954689	0.057216	-0.80119	-0.29344	3.267987	-2.6927	-0.87459	-0.70626	-0.87264	-0.71379	0.558495	-0.26403	-0.42778	-0.33905	-0.53823	0.253499	19.49	+
		1671	0.102372	-0.58148	-1.23633	-0.55712	0.587086	-0.86513	1.486125	1.320516	-0.12749	-0.84225	-0.26816	0.477614	-0.67149	0.620295	-0.20739	1.114021	0.245871	-0.67406	0.34455	51.30	+
		1477	-0.44874	-0.05842	-1.08939	0.12708	-0.99262	0.188404	-0.6138	-0.47823	-1.3386	-0.20985	-0.40535	-0.48478	-0.8123	-0.73545	-0.33424	-1.17684	0.044896	0.032756	-1.15711	-86.62	-
		1478	0.604981	0.604615	-0.70681	0.475917	-0.83923	0.581885	-0.89391	-0.23921	-1.19729	-0.52622	-0.70218	0.541547	0.11151	-0.91611	-0.2896	-1.28688	-0.61671	4.72451	-1.22599	-82.18	-
		1480	0.037288	0.502834	-0.3576	-0.19539	-0.20245	-0.03487	-0.48056	-0.05105	1.108847	-0.69893	-0.66888	-0.4388	0.431949	-0.25323	-0.32979	-0.46019	-0.66296	0.266765	-25.98	-	
		1482	-0.4574	1.398225	-0.76785	0.152922	0.186635	2.465553	0.277609	0.982445	-0.02535	-0.94279	1.248072	-0.90521	-0.49165	-0.26697	-0.09836	-0.47085	-0.35954	0.782629	-60.13	-	
		1571	0.253298	3.094357	-0.80596	0.84707	-0.68926	-0.49288	-0.72826	-0.04763	0.371817	-0.29635	-0.58552	-0.88779	-0.42944	-0.33652	-0.88168	0.135983	-0.64975	0.765277	-42.36	-	
		1573	-0.60097	-0.48827	-1.19223	0.560073	-0.93251	-0.35356	-0.68826	-0.52736	-1.25502	1.430914	-0.47942	-0.14286	-0.76985	-0.40828	-0.32223	-1.02888	-0.82741	-0.15807	-1.44648	-83.84	-
		1576	-0.18905	-0.6211	-0.94044	-0.9911	0.18588	-0.62974	0.316702	-0.50465	0.304088	-0.31539	4.06682	1.420971	1.73796	-0.46766	-0.18942	1.028469	0.139695	-0.54472	0.225746	55.70	+
		1666	-0.308	-0.57666	-1.08006	0.367222	-0.38184	-0.26624	-0.57599	-0.43623	-0.7322	0.453701	-0.62474	-0.07358	-0.35606	-0.37356	-0.28201	-0.7195	-0.50939	-0.38067	-0.98753	-73.40	-
		1667	0.354305	-0.68375	0.817811	-0.62704	-0.76608	-0.44953	-0.3708	0.6579	0.166925	-0.60817	0.371122	-0.67729	-0.64971	-0.36348	0.340667	-0.24903	-0.65023	0.100796	6.45	+	
		1672	-0.34577	-0.49804	-1.17714	2.484135	-0.90455	1.603443	-0.7745	-0.13126	-1.27799	-0.84511	-0.709	0.361109	-0.89299	-0.56364	-0.32633	-1.2068	-0.4982	0.816163	-1.23216	-83.01	-
		1673	-0.101533	2.130662	-1.34803	1.660635	-0.0688	-0.82633	0.226504	-0.88492	-0.69102	-0.48995	-1.05461	-1.17586	-0.96318	-0.48854	-0.43321	-0.47978	0.82471	-0.67964	-0.56587	-63.82	-

test

[0079] 表2において、各症例(症例番号)の各転移予測遺伝子毎に、算出された重み付け多数決値(the weighted votes)が記載されており、これらの値に基づいて「予測能」の

欄には各症例毎の予測能(PS)が記載されている。ここで、PSが+となった症例は、口腔癌が頸部リンパ節転移すると予測された症例であって、PSが-となった症例は、口腔癌が頸部リンパ節転移しないと予測された症例である。また、その絶対値が大きいほど、予測される転移または非転移の蓋然性が高まる。

[0080] そして、表2において、前記したPSによる予測結果と、実際に各症例が転移群(「転移」の欄において+)または非転移群(「転移」の欄において-)のどちらに所属しているかとを照合した結果を、「判定」の欄に示す。「判定」が+の場合は、正しく予測された症例であり、「判定」が-の場合は、正しく予測されなかった症例である。

[0081] このように、19遺伝子を用いた場合には、転移群8例のうち6例、非転移群11例のうち9例を正しく予測することができ(正答率は79%(15/19))、このときの感度および特異度はそれぞれ0.750、0.818となった。

[0082] また、モデル1による遺伝子選択では、4遺伝子(MSR1、RET、FARP1、ARG1)が選択された。また、この4遺伝子を用いた転移判別モデルによってテストグループの転移予測を行った結果、転移群8例のうち6例、非転移群11例のうち9例を正しく予測することができ(正答率は79%(15/19))、感度0.750、特異度0.818となった。

[0083] モデル2による遺伝子選択では、2遺伝子(MSR1、RET)が選択された。また、この2遺伝子を用いた転移判別モデルによってテストグループの転移予測を行った結果、転移群8例のうち5例、非転移群11例のうち10例を正しく予測することができ(正答率は79%(15/19))、感度0.625と特異度0.909となった。

[0084] モデル3による遺伝子選択では、3遺伝子(MSR1、RET、ARG1)が選択された。また、この3遺伝子を用いた転移判別モデルによってテストグループの転移予測を行った結果、転移群8例のうち6例、非転移群11例のうち9例を正しく予測することができ(正答率は79%(15/19))、感度0.750、特異度0.818となった。

[0085] モデル4による遺伝子選択では、モデル2と同様に、2遺伝子(MSR1、RET)が選択された。また、この2遺伝子を用いた転移判別モデルによってテストグループの転移予測を行った結果、転移群8例のうち5例、非転移群11例のうち10例を正しく予測することができ(正答率は79%(15/19))、感度0.625と特異度0.909となった。

[0086] 以上の結果を、図1ないし図3を参照して視覚的に理解しやすいように説明する。な

お、図1ないし図3において、前記した結果と症例の数が一致していないプロットは、近接するプロット同士が重畳されているものである。

図1は、転移予測遺伝子群の19遺伝子の全てを用いてテストグループの転移予測を行った結果を示す図である。図1において、横軸の左から3列目のTest N+ (▼) は、テストグループの転移群であって、左から4列目のTest N- (◆) は、テストグループの非転移群である。横軸の左から1列目と2列目は、参考としてリファレンスグループを示すものであって、1列目のReference N+ (■) が転移群、2列目のReference N- (▲) が非転移群である。また、縦軸は、各症例における予測能である。図1に示すように、テストグループにおいて算出された予測能が高い症例は転移群と対応し、予測能が低い症例は非転移群と対応していた。正答率は、前記したように、79% (15/19) であった。

[0087] 図2は、転移予測遺伝子群のなかで、モデル1～4において共通して選択された2つの遺伝子(MSR1、RET)を用いてテストグループの転移予測を行った結果を示す図である。図2における横軸と縦軸とは、図1と同様である。図2に示すように、テストグループにおいて算出された予測能が高い症例は転移群と対応し、予測能が低い症例は非転移群と対応していた。正答率は、前記したように、79% (15/19) であった。

[0088] 図3は、転移予測遺伝子群のなかで、モデル1、3において共通して選択された3つの遺伝子(MSR1、RET、ARG1)を用いてテストグループの転移予測を行った結果を示す図である。図3における横軸と縦軸とは、図1と同様である。図3に示すように、テストグループにおいて算出された予測能が高い症例は転移群と対応し、予測能が低い症例は非転移群と対応していた。正答率は、前記したように、79% (15/19) であった。

[0089] 以上のように、本実施例によれば、19遺伝子全てを用いた転移予測結果と、モデル1～4を用いた転移予測結果とはほぼ変わらず、また、いずれのケースにおいても高い確率で転移予測を行うことができた。従って、これらの2遺伝子群(MSR1、RET)、3遺伝子群(MSR1、RET、ARG1)、4遺伝子群(MSR1、RET、FARP1、ARG1)、19遺伝子群はいずれも、口腔癌の転移の有無に関する予測に有用であると判断できる。

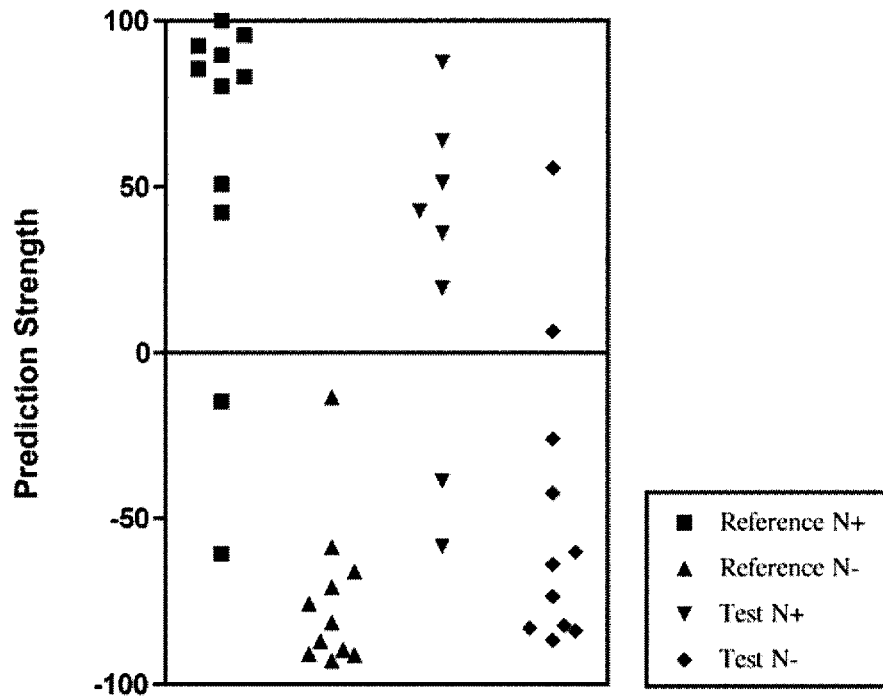
請求の範囲

- [1] 口腔癌の原発病変から採取された試料について、口腔癌が頸部リンパ節に転移する症例からなる転移群と、転移しない症例からなる非転移群との間で発現量が変化する転移予測遺伝子群の発現量を測定する工程と、
- 前記転移予測遺伝子群の発現量を、前記転移群および／または前記非転移群における前記転移予測遺伝子の発現量と比較することにより、口腔癌が頸部リンパ節に転移する可能性を予測する工程と、を含み、
- 前記転移予測遺伝子群は、MSR1 (NM_138716.1) およびRET (M31213.1) の2つの遺伝子を含むことを特徴とする口腔癌の頸部リンパ節転移予測方法。
- [2] 前記転移予測遺伝子群は、さらに、FARP1 (CD675885.1) の遺伝子を含むことを特徴とする請求の範囲第1項に記載の口腔癌の頸部リンパ節転移予測方法。
- [3] 前記転移予測遺伝子群は、さらに、ARG1 (NM_000045.2)、FARP1 (NM_005766.2)、H19 (R83431.1)、NULL (BC019018.2)、NULL (AW820586.1)、HLA2 (NM_007072.2)、SGCD (NM_172244.2)、SFRP4 (NM_003014.2)、ALOX12 (NM_000697.1)、LOC146429 (AL137382.1)、PDZRN3 (AL137307.1)、NCAM1 (AV702977.1)、WNT11 (NM_004626.2)、および、SORCS2 (NM_020777.1) の16の遺伝子のうち少なくとも1つを含むことを特徴とする請求の範囲第2項に記載の口腔癌の頸部リンパ節転移予測方法。
- [4] 前記転移予測遺伝子群は、さらに、ARG1 (NM_000045.2)、FARP1 (NM_005766.2)、H19 (R83431.1)、NULL (BC019018.2)、NULL (AW820586.1)、HLA2 (NM_007072.2)、SGCD (NM_172244.2)、SFRP4 (NM_003014.2)、ALOX12 (NM_000697.1)、LOC146429 (AL137382.1)、PDZRN3 (AL137307.1)、NCAM1 (AV702977.1)、WNT11 (NM_004626.2)、および、SORCS2 (NM_020777.1) の16の遺伝子を全て含むことを特徴とする請求の範囲第2項に記載の口腔癌の頸部リンパ節転移予測方法。
- [5] MSR1 (NM_138716.1) およびRET (M31213.1) の2つの遺伝子配列にそれぞれ特異的にハイブリダイズ可能な2種類のオリゴヌクレオチドを含むことを特徴とする口腔癌の頸部リンパ節転移予測用診断キット。
- [6] さらに、FARP1 (CD675885.1) の遺伝子配列に特異的にハイブリダイズ可能なオリ

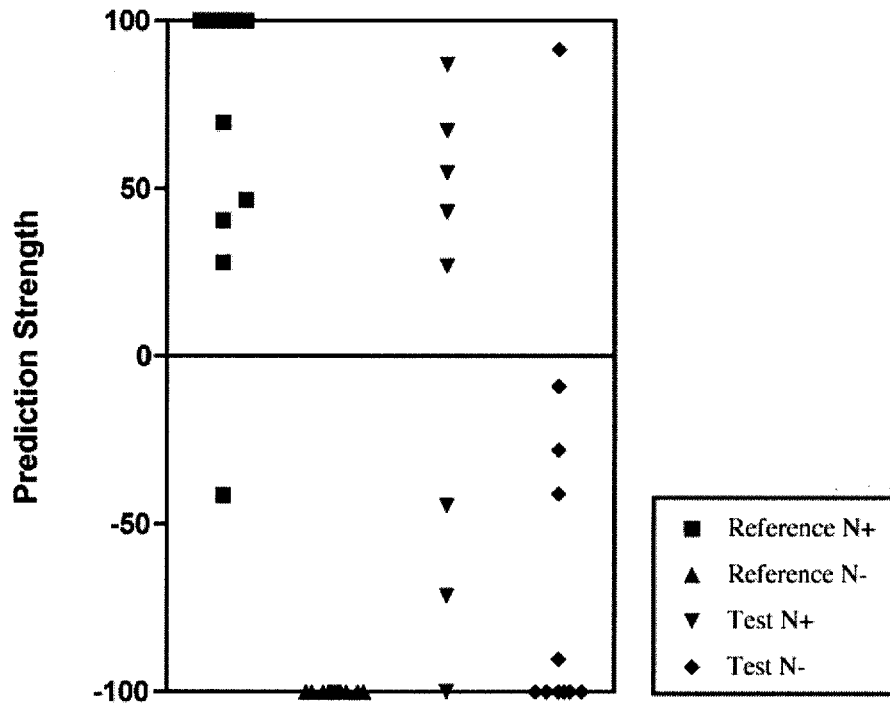
ゴヌクレオチドを含むことを特徴とする請求の範囲第5項に記載の口腔癌の頸部リンパ節転移予測用診断キット。

- [7] さらに、ARG1 (NM_000045.2)、FARP1 (NM_005766.2)、H19 (R83431.1)、NULL (BC019018.2)、NULL (AW820586.1)、HHLA2 (NM_007072.2)、SGCD (NM_172244.2)、SFRP4 (NM_003014.2)、ALOX12 (NM_000697.1)、LOC146429 (AL137382.1)、PDZRN3 (AL137307.1)、NCAM1 (AV702977.1)、WNT11 (NM_004626.2)、および、SORCS2 (NM_020777.1) の16の遺伝子のうち少なくとも1つの遺伝子配列に特異的にハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドを含むことを特徴とする請求の範囲第6項に記載の口腔癌の頸部リンパ節転移予測用診断キット。
- [8] さらに、ARG1 (NM_000045.2)、FARP1 (NM_005766.2)、H19 (R83431.1)、NULL (BC019018.2)、NULL (AW820586.1)、HHLA2 (NM_007072.2)、SGCD (NM_172244.2)、SFRP4 (NM_003014.2)、ALOX12 (NM_000697.1)、LOC146429 (AL137382.1)、PDZRN3 (AL137307.1)、NCAM1 (AV702977.1)、WNT11 (NM_004626.2)、および、SORCS2 (NM_020777.1) の16の遺伝子の全ての遺伝子配列にそれぞれ特異的にハイブリダイズ可能な16種類のオリゴヌクレオチドを含むことを特徴とする請求の範囲第6項に記載の口腔癌の頸部リンパ節転移予測用診断キット。

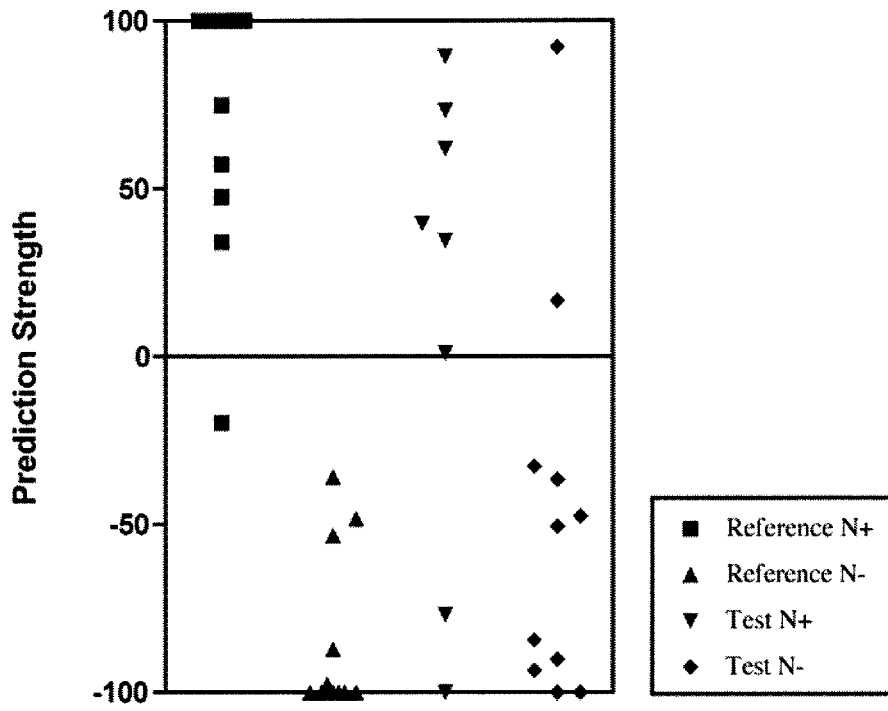
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/057151

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01) i, C12Q1/02(2006.01) i, C12Q1/68(2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, C12Q1/02, C12Q1/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CAPlus (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2),		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Nagata M. et.al., Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis, International Journal of Cancer, 2003, Vol.106, No.5, p.683-689	1-8
X	Schmalbach C.E. et.al., Molecular profiling and identification of genes associated with metastatic oral cavity/pharynx squamous cell carcinoma, Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery, 2004, Vol.130, No.3, p.295-302	1-8
X	Chung C.H. et.al., Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression, Cancer Cell, 2004, Vol.5, p.489-500	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 June, 2007 (19.06.07)		Date of mailing of the international search report 03 July, 2007 (03.07.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/057151

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Roepman P. et.al., An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas, Nature Genetics, 2005, Vol.37, No.2, p.182-186	1-8
X	O'Donnell R.K. et.al., Gene expression signature predicts lymphatic metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity, Oncogene, 2005, Vol.24, No.7, p.1244-1251	1-8
X	Yoshikuni KATO et al., "Micro Array Kaiseki ni yoru Koku Henpei Johigan Keibu Lymph Node Ten'i Kanren Idenshi no Yosoku", Chiba Medical Journal, 2006.Aug., Vol.82, No.4, page 225	1-8
P,X	Kato Y. et.al., Gene expression pattern in oral cancer cervical lymph node metastasis, Oncology Reports, 2006.Nov., Vol.16, No.5, p.1009-1014	1-8
P,X	Zhou X. et.al., Global Expressiom-Based Classification of lymph node metastasis and extracapsular spread of oral tongue squamous cell carcinoma, Neoplasia, 2006.Nov., Vol.8, No.11, p.925-932	1-8
A	Hirofumi TOMIOKA et al., "Koku Henpei Johigan no cDNA Micro Array ni yoru Idenshi Hatsugen Kaiseki", Japanese Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2004, Vol.50, No.13, page 856	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/057151

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Electronic data base consulted during the international search
(name of data base and, where practicable, search terms used)

Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i</p>												
<p>B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, C12Q1/02, C12Q1/68</p>												
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2007年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2007年	日本国実用新案登録公報	1996-2007年	日本国登録実用新案公報	1994-2007年	
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2007年											
日本国実用新案登録公報	1996-2007年											
日本国登録実用新案公報	1994-2007年											
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), Cplus (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, JMEDplus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTplus (JDream2), 医学・薬学予稿集全文データベース</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>Nagata M. et.al., Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis, International Journal of Cancer, 2003, Vol.106, No.5, p.683-689</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>Schmalbach C.E. et.al., Molecular profiling and identification of genes associated with metastatic oral cavity/pharynx squamous cell carcinoma, Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery, 2004, Vol.130, No.3, p.295-302</td> <td>1-8</td> </tr> </tbody> </table>				引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	X	Nagata M. et.al., Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis, International Journal of Cancer, 2003, Vol.106, No.5, p.683-689	1-8	X	Schmalbach C.E. et.al., Molecular profiling and identification of genes associated with metastatic oral cavity/pharynx squamous cell carcinoma, Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery, 2004, Vol.130, No.3, p.295-302	1-8
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号										
X	Nagata M. et.al., Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis, International Journal of Cancer, 2003, Vol.106, No.5, p.683-689	1-8										
X	Schmalbach C.E. et.al., Molecular profiling and identification of genes associated with metastatic oral cavity/pharynx squamous cell carcinoma, Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery, 2004, Vol.130, No.3, p.295-302	1-8										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。</p>		<p><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>		<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」同一パテントファミリー文献</p>										
<p>国際調査を完了した日 19.06.2007</p>		<p>国際調査報告の発送日 03.07.2007</p>										
<p>国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員) 渡邊 潤也 電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p>										

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Chung C.H. et.al., Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression, Cancer Cell, 2004, Vol.5, p.489-500	1-8
X	Roepman P. et.al., An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas, Nature Genetics, 2005, Vol.37, No.2, p.182-186	1-8
X	O' Donnell R.K. et.al., Gene expression signature predicts lymphatic metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity, Oncogene, 2005, Vol.24, No.7, p.1244-1251	1-8
X	加藤義国他2名, マイクロアレイ解析による口腔扁平上皮癌頸部リンパ節転移関連遺伝子の予測, 千葉医学雑誌, 2006. Aug., 第82巻, 4号, p.225	1-8
P, X	Kato Y. et.al., Gene expression pattern in oral cancer cervical lymph node metastasis, Oncology Reports, 2006.Nov., Vol.16, No.5, p.1009-1014	1-8
P, X	Zhou X. et.al., Global Expression-Based Classification of lymph node metastasis and extracapsular spread of oral tongue squamous cell carcinoma, Neoplasia, 2006.Nov., Vol.8, No.11, p.925-932	1-8
A	富岡寛文他2名, 口腔扁平上皮癌のcDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析, 日本口腔外科学会雑誌, 2004, 第50巻, 第13号, p.856	1-8