

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007年8月9日 (09.08.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/088971 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/051800
- (22) 国際出願日: 2007年2月2日 (02.02.2007)
- (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2006-027735 2006年2月3日 (03.02.2006) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): メッセンジャー・スケープ株式会社 (MESSENGERSCAPE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷三丁目20番2-101号 Tokyo (JP). オリエンタル酵母工業株式会社 (ORIENTAL YEAST CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1748505 東京都板橋区小豆沢三丁目6番10号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 齋藤 俊行 (SAITO, Toshiyuki) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷三丁目20番2-101号 メッセンジャー・スケープ株式会社内 Tokyo (JP). 三上 陽司 (MIKAMI, Yoji) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷三丁目20番2-101号 メッセンジャー・スケープ株式会社内 Tokyo (JP). 衣笠 公博 (KINUGASA, Masahiro) [JP/JP]; 〒5260804 滋賀県長浜市加納町50番地 オリエンタル酵母工業株式会社内 Shiga (JP). 森 和也 (MORI, Kazuya) [JP/JP]; 〒5260804 滋賀県長浜市加納町50番地 オリエンタル酵母工業株式会社内 Shiga (JP). 杉本 通代 (SUGIMOTO, Michiyo) [JP/JP]; 〒5260804 滋賀県長浜市加納町50番地 オリエンタル酵母工業株式会社内 Shiga (JP). 内田 浩二 (UCHIDA, Koji) [JP/JP]; 〒5260804 滋賀県長浜市加納町50番地 オリエンタル酵母工業株式会社内 Shiga (JP).
- (74) 代理人: 廣田 浩一, 外 (HIROTA, Koichi et al.); 〒1510053 東京都渋谷区代々木2-2-13 新宿TRビル4階山の手合同国際特許事務所 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, 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, JP, KE, KG, KM, KN, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, 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, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (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, 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
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GENE GROUP APPLICABLE TO CANCER PROGNOSTICATION

(54) 発明の名称: がん予後判定に利用できる遺伝子群

(57) Abstract: It is intended to provide a novel method for determining the possibility of lymph node metastasis of breast cancer using a difference of expression level of a specific gene between a human metastatic breast cancer tissue (or cell) and a nonmetastatic breast cancer tissue (or cell) as an index. For this purpose, the method characterized by: (1) measuring the expression level of a gene having a specific base sequence in a human metastatic breast cancer tissue (or cell); (2) measuring the expression level of the gene in a human nonmetastatic breast cancer tissue (or cell); and (3) comparing the measured values of (1) and (2) and determining the possibility of lymph node metastasis of breast cancer based on the difference is provided.

(57) 要約: ヒトの転移性乳癌組織 (または細胞) と非転移性乳癌組織 (又は細胞) との特定遺伝子の発現レベルの差を指標とした、新規な乳癌のリンパ節転移可能性の判定方法を提供することを目的とする。このため、(1) ヒトの転移性乳癌組織 (または細胞) における特定の塩基配列を有する遺伝子の発現レベルを測定し、(2) ヒトの非転移性乳癌組織 (または細胞) における上記遺伝子の発現レベルを測定し、(3) 上記(1)及び(2)の測定値を比較し、その差異に基づいて乳癌のリンパ節転移可能性を判定することを特徴とする方法を提供する。

WO 2007/088971 A1

明 細 書

がん予後判定に利用できる遺伝子群

技術分野

[0001] 本発明は、新規な乳癌のリンパ節転移可能性の判定方法に関する。より詳細には、特定の塩基配列を有するマーカー遺伝子の発現レベルを転移性乳癌細胞と非転移性乳癌細胞とで比較することに基づく、乳癌のリンパ節転移可能性の判定方法に関する。

背景技術

[0002] 日本では乳癌が急激に増加しており、特に女性罹患者の第1位となっている。乳癌は、女性ホルモン(エストロゲン)が関与している癌で、初潮が早い、閉経が遅い、初産年齢が遅いまたは高齢で未産、など、エストロゲンにさらされる期間が長いことが乳癌にかかりやすい条件として考えられている。また、食生活の欧米化による高脂肪食、肥満なども関与していると考えられ、これは特に閉経後の女性で、脂肪組織でエストロゲンが作られているためであると考えられる。また、女性の社会進出などのライフスタイルも日本における乳癌罹患者率の上昇に関係していると考えられる。

[0003] 乳癌は、非浸潤癌、浸潤癌、パジェット病の大きく3つに分けられるが、しこりを生じるような乳癌のほとんどが浸潤癌であり、硬癌、乳頭腺管癌、充実腺管癌などの一般的な癌と、粘液癌などの特殊型とがある。

[0004] 早期乳癌の検診としては乳癌特異的な血液検査法がなく、触診およびX線像診断が行われている。しかし併用した場合でも見落とし率は20%と高く、X線像診断には専門医の判定が必要となる等の問題がある。また、術前、術中の乳癌細胞診断では病理医による鑑別が必須であるが、病理医不足や鑑別基準のばらつき等の問題があり、検診から鑑別の間を埋めるべき客観的かつ簡便な検出/診断法が存在しない。近年、直径1mm以下の癌組織を検出できるPET診断が行われつつあるが、大規模な設備が必要であり、簡便に検診に利用することは極めて難しい。

[0005] 近年の研究から、癌が遺伝子の異常を原因とする疾病であることが明らかになりつつあり、例えば癌組織と正常組織での、特定の遺伝子の発現レベルが異なるという現

象を利用し、癌細胞を検出する方法が提案されている(特許文献1、2)。

[0006] 特許文献1:特開2003-284594号公報

特許文献2:特開2003-284596号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] リンパ節転移性乳癌の場合、乳癌術後において、腫瘍サイズ、切除癌細胞の核異型度、ホルモン受容体量等の指標を用いて経過を予測し、必要に応じてリンパ節等への転移や再発の抑制を目的とする術後補助療法(アジュバント療法)を行う。しかしながら、現在のところ、これら指標の予測精度は十分ではなく、再発リスク低減、適切な投薬による患者QOL向上の観点から精度の高い予後指標が必要とされている。

課題を解決するための手段

[0008] 上記課題に鑑み、本発明者らが鋭意研究を実施し、転移性乳癌細胞又は組織において、特定のマーカー遺伝子の発現レベルが非転移性乳癌細胞又は組織とは異なり、それが乳癌のリンパ節転移可能性の判定に応用しうることを見出し、本発明を完成させるに至った。すなわち、課題を解決するための手段は以下のとおりである。

[0009] (1)ヒトの転移性乳癌組織(または細胞)と非転移性乳癌組織(または細胞)における、マーカー遺伝子の発現レベルの差を指標にすることを特徴とする、乳癌のリンパ節転移可能性の判定方法。

(2)マーカー遺伝子の発現レベルが、その遺伝子のmRNA量で表されることを特徴とする、前記(1)に記載の判定方法。

(3)マーカー遺伝子が、GenBank登録番号NM000903、NM006804、NM033547、CR611676、NM177967、NM152558、NM178167、NM003752、AK131568、CR592336、NM178507、NM002862、NM006913、NM005794、NM014164、NM000853および3番染色体178882962bpから178883181bpの塩基配列を有する遺伝子またはそのホモログからなる群のうちの、1または2以上より選択されることを特徴とする、前記(1)または(2)に記載の判定方法。

(4)ヒトの転移性乳癌組織(または細胞)と非転移性乳癌組織(または細胞)におけるマーカー遺伝子の発現レベルの差が、2倍以上または1/2以下である、前記(1)か

ら(3)のいずれかに記載の判定方法。

発明の効果

[0010] 本発明の判定方法により、遺伝子レベルにて乳癌のリンパ節転移可能性の判定を迅速かつ簡便に行うことが可能となり、乳癌の転移防止につなげることができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]HiCEP法によるマーカー遺伝子転写物(転写物番号#1)の発現量の比較を示す図。

[図2]HiCEP法によるマーカー遺伝子転写物(転写物番号#2)の発現量の比較を示す図。

[図3]HiCEP法によるマーカー遺伝子転写物(転写物番号#3)の発現量の比較を示す図。

[図4]HiCEP法によるマーカー遺伝子転写物(転写物番号#4)の発現量の比較を示す図。

[図5]HiCEP法によるマーカー遺伝子転写物(転写物番号#5)の発現量の比較を示す図。

[図6]HiCEP法によるマーカー遺伝子転写物(転写物番号#6)の発現量の比較を示す図。

[図7]HiCEP法によるマーカー遺伝子転写物(転写物番号#7)の発現量の比較を示す図。

[図8]HiCEP法によるマーカー遺伝子転写物(転写物番号#8)の発現量の比較を示す図。

[図9]HiCEP法によるマーカー遺伝子転写物(転写物番号#9)の発現量の比較を示す図。

[図10]HiCEP法によるマーカー遺伝子転写物(転写物番号#10)の発現量の比較を示す図。

[図11]HiCEP法によるマーカー遺伝子転写物(転写物番号#11)の発現量の比較を示す図。

[図12]HiCEP法によるマーカー遺伝子転写物(転写物番号#12)の発現量の比較を

示す図。

[図13]HiCEP法によるマーカー遺伝子転写物(転写物番号#13)の発現量の比較を示す図。

[図14]HiCEP法によるマーカー遺伝子転写物(転写物番号#14)の発現量の比較を示す図。

[図15]HiCEP法によるマーカー遺伝子転写物(転写物番号#15)の発現量の比較を示す図。

[図16]HiCEP法によるマーカー遺伝子転写物(転写物番号#16)の発現量の比較を示す図。

[図17]HiCEP法によるマーカー遺伝子転写物(転写物番号#17)の発現量の比較を示す図。

発明を実施するための最良の形態

- [0012] 本発明は、転移性乳癌細胞又は組織と非転移性乳癌細胞又は組織における、特定のマーカー遺伝子の発現レベル差を指標にすることを特徴とする、乳癌のリンパ節転移可能性の判定方法である。本発明におけるマーカー遺伝子とは、その発現レベルを転移性乳癌細胞又は組織と非転移性乳癌細胞又は組織とで比較することにより、該乳癌細胞の転移性の可能性を判定することを可能にする遺伝子のことである。
- [0013] 本発明は、先記マーカー遺伝子の発現レベルが、その遺伝子のmRNA量で表されることを特徴とする、乳癌のリンパ節転移可能性の判定方法である。より詳細には、転移性乳癌組織由来の細胞と非転移性乳癌組織由来の細胞からトータルRNAを抽出し、その中に含まれる先記マーカー遺伝子から転写されるmRNA量を比較することを特徴とする、乳癌のリンパ節転移可能性の判定方法である。遺伝子のmRNA量を測定する遺伝子発現解析法としては、包括的転写産物プロファイル解析法(HiCEP法)、DNAマイクロアレイ法、定量的逆転写PCR法(定量RT-PCR法)、ノザンハイブリダイゼーション法などが適用可能である。また、in situハイブリダイゼーション法のように、細胞からトータルRNAを抽出せずにmRNA量を測定する遺伝子発現解析法も、本発明に適用可能である。また、検出精度を向上させるため、上記方法を2つ以上組み合わせることも可能である。さらに本遺伝子の翻訳産物量を測定するには、一例とし

て、本遺伝子にコードされる蛋白質の量を測定する方法がある。特定蛋白質の量の測定は、具体的には例えば、該蛋白質に対する特異抗体を用いた免疫学的測定法（例えば、ELISA、ウェスタンブロット、RIA等）、二次元電気泳動法、高速液体クロマトグラフィーなどにより実施することができる。本遺伝子にコードされる蛋白質に対する特異抗体は、常法に準じて、本遺伝子にコードされる蛋白質を免疫抗原として調製することができる。

- [0014] なお、HiCEP法とは、包括的かつ高検出な感度を特徴とする転写物プロファイル解析手法の一つである。以下、その方法について簡単に記載する（詳細はNucleic Acids Res., 2003, Vol.31, No.16 e94を参考のこと）。組織・細胞サンプルから、常法によりTotal RNAを抽出・精製する。5'ビオチンオリゴdTを用いて二本鎖cDNAを合成する。制限酵素MspIを用いcDNAを切断する。アビジンビーズでポリA側断片を回収した後、MspI切断サイトへ3'-アダプターを連結する。制限酵素MseIにより断片を切断する。MseI切断サイトへ3'-アダプターを連結する。5'および3'末端に連結されたアダプター配列に選択的2塩基を追加したPCRプライマー（5'側16本、3'側16本、5'側プライマーには蛍光標識を施す）を作成し、これらの組み合わせである256通りの定量的PCRを行う。PCR産物をプライマー組み合わせごとにFragment Analyzerに掛け、複数の蛍光ピークからなる電気泳動像（遺伝子発現プロファイル）を、サンプルに付き256個取得する。こうして得た蛍光ピークを異なるサンプル間で比較することにより、転写物の発現量比較が可能となる。
- [0015] 本発明におけるマーカー遺伝子としては、転移性乳癌細胞又は組織と非転移性乳癌細胞又は組織においてその発現量に顕著な差が見られるものであれば特に限定されず、例えばGenBank登録番号NM000903、NM006804、NM033547、CR611676、NM177967、NM152558、NM178167、NM003752、AK131568、CR592336、NM178507、NM002862、NM006913、NM005794、NM014164、NM000853および3番染色体17882962bpから178883181bpの塩基配列を有する遺伝子またはそのホモログからなる群のうちの、1または2以上より選択されるものが適用可能である。
- [0016] なお、GenBank登録データにおいては、同一遺伝子を異なる研究者が異なる時期、分野、名称で登録している場合や、遺伝子多型やスプライシングバリエントがあるもの

を新規なものとして登録している場合があるため、本来同一遺伝子とみなしてよい塩基配列データが異なる登録番号として重複して存在する。通常それらを総称してホモログと称し、本発明においても同様の意味に用いる。

[0017] 本発明の乳癌のリンパ節転移可能性の判定方法は、転移性乳癌細胞又は組織と非転移性乳癌細胞又は組織との、遺伝子の発現レベルの差が顕著なものをマーカー遺伝子とすることを特徴とする。ここで、前記「発現レベル」とは、マーカー遺伝子から転写されるmRNAの発現量であってもよく、前記mRNAから翻訳されるタンパク質の発現量であってもよい。遺伝子発現レベルの差としては、転移性乳癌細胞又は組織の発現レベルを1とした場合、非転移性乳癌細胞又は組織のそれが望ましくは1.5以上または2/3以下、より望ましくは2以上または1/2以下である。一方、転移性乳癌細胞又は組織と比較した非転移性乳癌細胞又は組織の上記マーカー遺伝子の発現レベルが上記範囲外では、乳癌のリンパ節転移可能性の判定をすることが困難であるため、望ましくない。

[0018] 対象となる乳癌は、乳管癌(乳頭腺管癌、充実腺管癌、硬癌など)、小葉癌、特殊型(粘液癌・髓様癌・管状癌)、パジェット病等、いずれの種類乳癌でも適用可能であるが、望ましくは硬癌、小葉癌または充実腺管癌である。

実施例

[0019] 以下に実施例を記載するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。本実施例においては、ヒト転移性乳癌組織と非転移性組織の遺伝子発現レベル(RNA転写レベル)を、遺伝子発現解析法の一技術として公知の包括的高感度転写産物プロファイル解析技術(HiCEP技術)(Nucleic Acids Res., 2003, vol.31(16), e94)を用い測定し、各遺伝子に関しその発現レベルをヒト転移性乳癌組織と非転移性組織で比較した。

[0020] 本実施例では、表1に示すステージIIの乳癌患者(Caucasian)5名(原発性ガン。リンパ節転移有り2名、無し3名。全てTNM分類ステージII。)より採材された乳癌組織(市販品)を使用した。

[表1]

検体	転移	腫瘍のサイズ	年齢
# A	+	12cm	57
# B	+	2cm×1.5cm×1.5cm	69
# C	—	2.5cm	50
# D	—	4cm×2cm×1.7cm	61
# E	—	6cm×5.5cm×4.5cm	68

- [0021] 上記検体から、RNeasyキット(キアゲン社製)を用いてキット常法によりトータルRNAを抽出した。各試料由来の0.1 μ gのトータルRNAを鋳型としてSuper Script First Strand Synthesis System for RT-PCR(インビトロゲン社製)で逆転写反応を行い、得られた逆転写反応産物を80ユニットのDNAポリメラーゼI(インビトロゲン社製)、4ユニットのRNaseH(インビトロゲン社製)および40ユニットの大腸菌DNAリガーゼ(インビトロゲン社製)で16°C、2時間反応した。得られた二本鎖cDNAを40ユニットの制限酵素MseI(ニューイングランド・バイオラボ社製)および50ユニットの制限酵素MspI(タカラバイオ社製)で37°C、4時間反応し、得られたDNA断片の両端にアダプター配列を接続した。こうして得られたアダプター配列付きDNA断片を鋳型に用いて選択的PCRを行い、その反応産物についてキャピラリー電気泳動による分析を行った。得られた波形データを用い、遺伝子発現レベルの測定と試料間の遺伝子発現レベル比較、発現遺伝子のパターン分類を行い、クラスタリングデータ(発現変動ピーク)を得た。
- [0022] 解析の結果、表2及び図1から図17に示すように、サンプルに供した患者のリンパ節転移有無に応じて、マーカー遺伝子転写物17種の蛍光ピーク強度が明瞭な差を示すことが分かる。なお、この解析においては1検体につき2回の測定をおこない、その結果得られる蛍光ピークを重ねた。マーカー遺伝子転写物に対応するピークを矢印で示す。
- [0023] 転写物番号1から11(転写物番号は表1のもの)については転移“有り”サンプルにおいて蛍光ピークが認められるのに対し、転移“無し”サンプルではピークがゼロもしくは転移“有り”サンプルの半分以下の発現強度となっている。逆に、転写物12から17については転移“無し”サンプルに明瞭な蛍光ピークが認められるのに対し、転移“有り”サンプルではピークがゼロもしくは転移“無し”サンプルの半分以下の発現強度となっている。このことから、この17遺伝子は、その発現強度に応じて乳癌転移性を

区別する指標となっていることが分かる。

[0024] [表2]

乳癌転移マーカーとなる転写物

転写物番号	配列	GenBank登録番号	アノテーション	発現様式	
# 1	第16番染色体マイナス鎖 68302490bp から 68317861bp の塩基配列を含む転写物配列	NM_000903	NAD(P)H menadione oxidoreductase 1	転移性乳癌で 発現亢進する	
# 2	第3番染色体プラス鎖 178882962bp から 178883181bp の塩基配列を含む転写物配列	なし	なし		
# 3	第17番染色体プラス鎖 35050592bp から 35050643bp の塩基配列を含む転写物配列	NM_006804	steroidogenic acute regulatory protein related		
# 4	第11番染色体マイナス鎖 77267542bp から 77272569bp の塩基配列を含む転写物配列	NM_033547	Homo sapiens hypothetical gene MGC16733 similar to CG12113 (MGC16733), mRNA.		
# 5	第5番染色体プラス鎖 176665540bp から 176666255bp の塩基配列を含む転写物配列	CR611676	Similar to P α 19-like protein (25 kDa protein of relevant evolutionary and lymphoid interest) (PRELI) (CGI-106) (SBB112)		
# 6	第13番染色体プラス鎖 98835662bp から 98835862bp の塩基配列を含む転写物配列	NM_177967	Phosphoglycerate dehydrogenase like 1		
# 7	第7番染色体プラス鎖 2426581bp から 2426860bp の塩基配列を含む転写物配列	NM_152558	IQ motif containing E (IQCE)		
# 8	第16番染色体マイナス鎖 1987788 bp から 1987865 bp の塩基配列を含む転写物配列	NM_178167	Zinc finger protein 598		
# 9	第16番染色体マイナス鎖 228320033 bp から 28320077 bp の塩基配列を含む転写物配列	NM_003752	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa		
# 10	第17番染色体プラス鎖 35135544 bp から 35135831 bp の塩基配列を含む転写物配列	AK131568	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)		
# 11	第17番染色体プラス鎖 35126382 bp から 35127393 bp の塩基配列を含む転写物配列	CR592336	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)		
# 12	第11番染色体プラス鎖 119605680 bp から 119605847 bp の塩基配列を含む転写物配列	NM_178507	NS5ATP13TP2 protein		転移性乳癌で 発現低下する
# 13	第20番染色体プラス鎖 25226174 bp から 25226624 bp の塩基配列を含む転写物配列	NM_002862	Phosphorylase, glycogen; brain		
# 14	第6番染色体プラス鎖 32256007 bp から 32256297 bp の塩基配列を含む転写物配列	NM_006913	Ring finger protein 5		
# 15	第14番染色体マイナス鎖 23183541 bp から 23184510 bp の塩基配列を含む転写物配列	NM_005794	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2		
# 16	第19番染色体プラス鎖 40352503 bp から 40352595 bp の塩基配列を含む転写物配列	NM_014164	FXYD domain containing ion transport regulator 5		
# 17	第22番染色体プラス鎖 22700873 bp から 22700983 bp の塩基配列を含む転写物配列	NM_000853	Glutathione S-transferase theta 1		

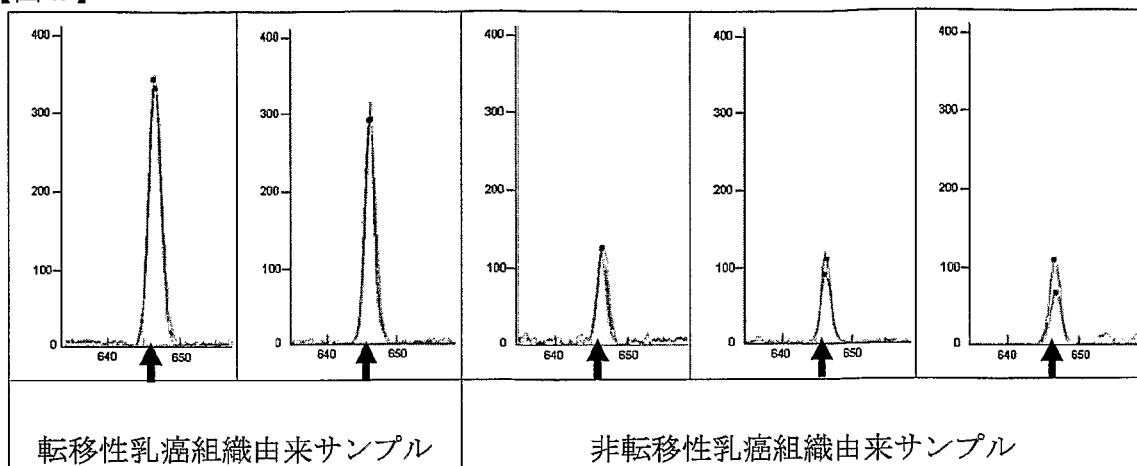
産業上の利用可能性

[0025] 本発明を構成する遺伝子群を利用することにより、従来の課題であった高感度で客観的、簡便、迅速な乳癌のリンパ節転移可能性の判定が可能となり、乳癌の予後予測用マーカーとして利用可能である。

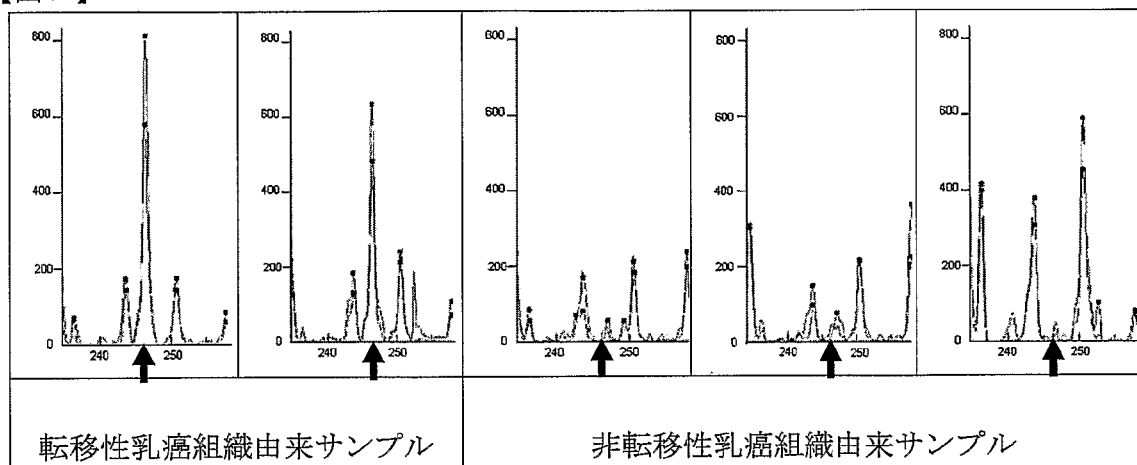
請求の範囲

- [1] ヒトの転移性乳癌組織(または細胞)と非転移性乳癌組織(または細胞)における、マーカー遺伝子の発現レベルの差を指標にすることを特徴とする、乳癌のリンパ節転移可能性の判定方法。
- [2] マーカー遺伝子の発現レベルが、その遺伝子のmRNA量で表されることを特徴とする、請求項1に記載の判定方法。
- [3] マーカー遺伝子が、GenBank登録番号NM000903、NM006804、NM033547、CR611676、NM177967、NM152558、NM178167、NM003752、AK131568、CR592336、NM178507、NM002862、NM006913、NM005794、NM014164、NM000853および3番染色体178882962bpから178883181bpの塩基配列を有する遺伝子またはそのホモログからなる群のうちの、1または2以上より選択されることを特徴とする、請求項1または2に記載の判定方法。
- [4] ヒトの転移性乳癌組織(または細胞)と非転移性乳癌組織(または細胞)におけるマーカー遺伝子の発現レベルの差が、2倍以上または1/2以下である、請求項1から3のいずれかに記載の判定方法。

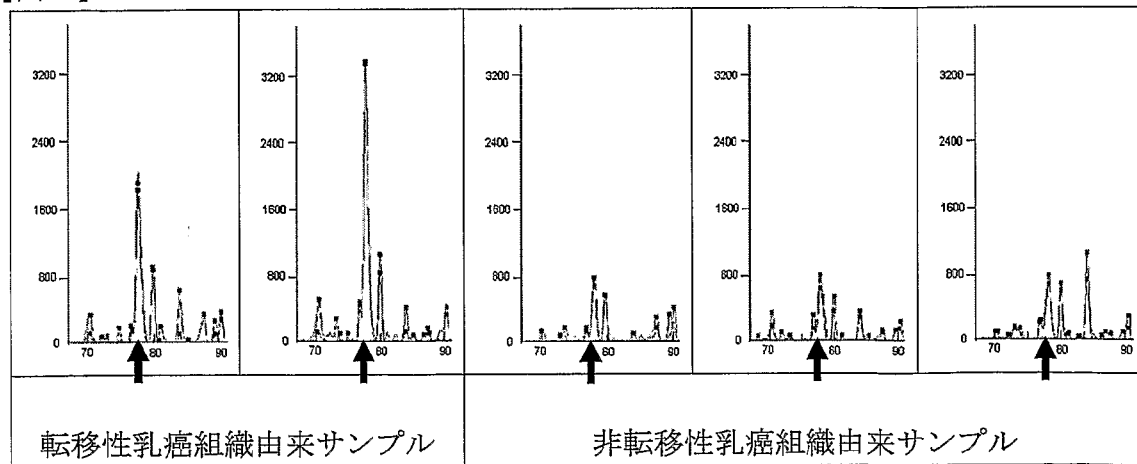
【図 1】



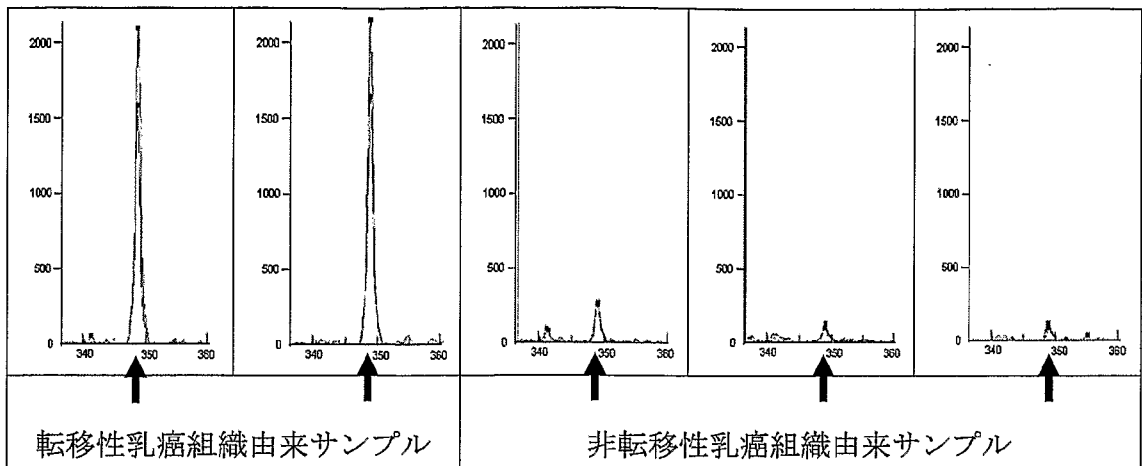
【図 2】



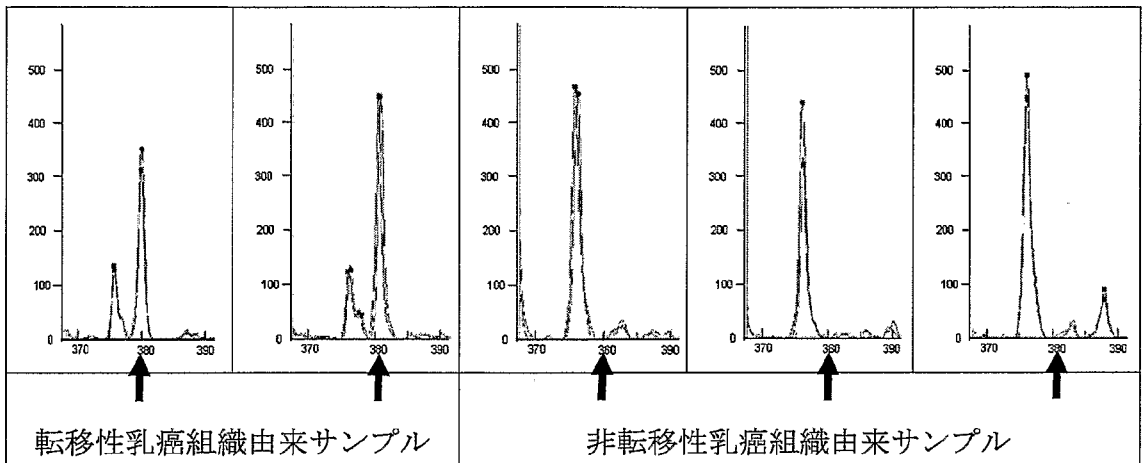
【図 3】



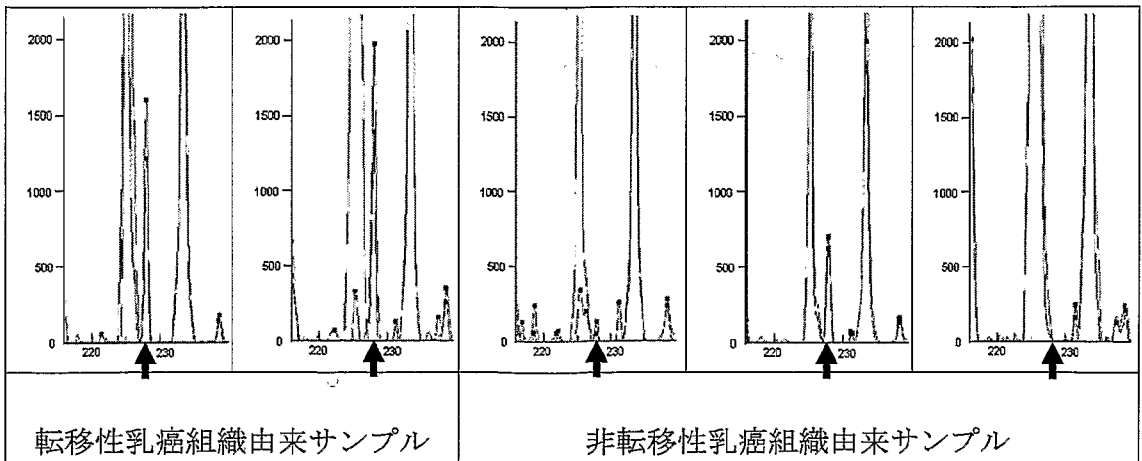
【図4】



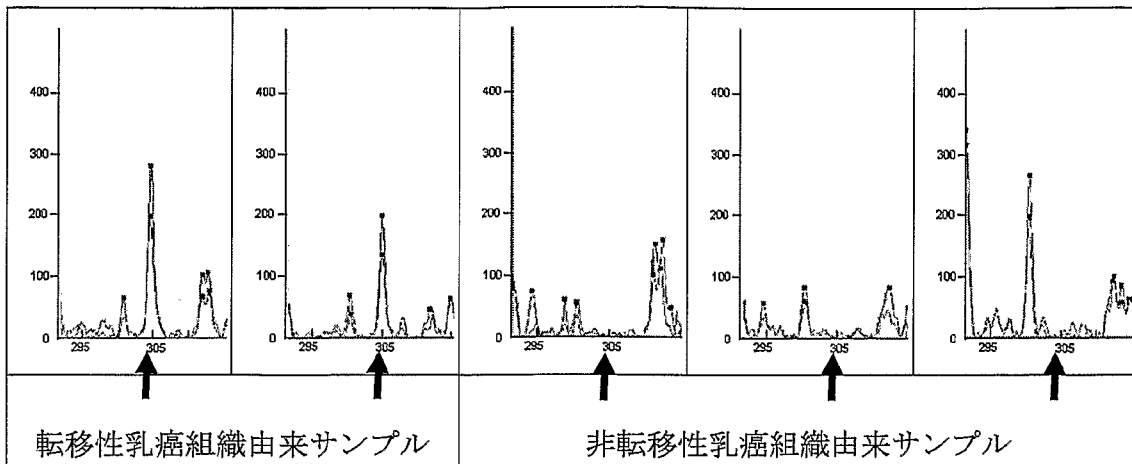
【図5】



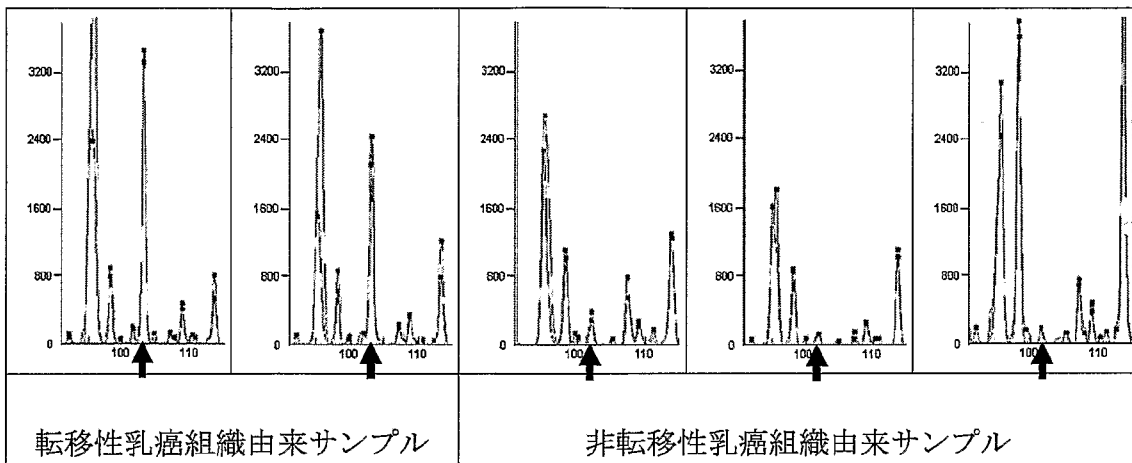
【図6】



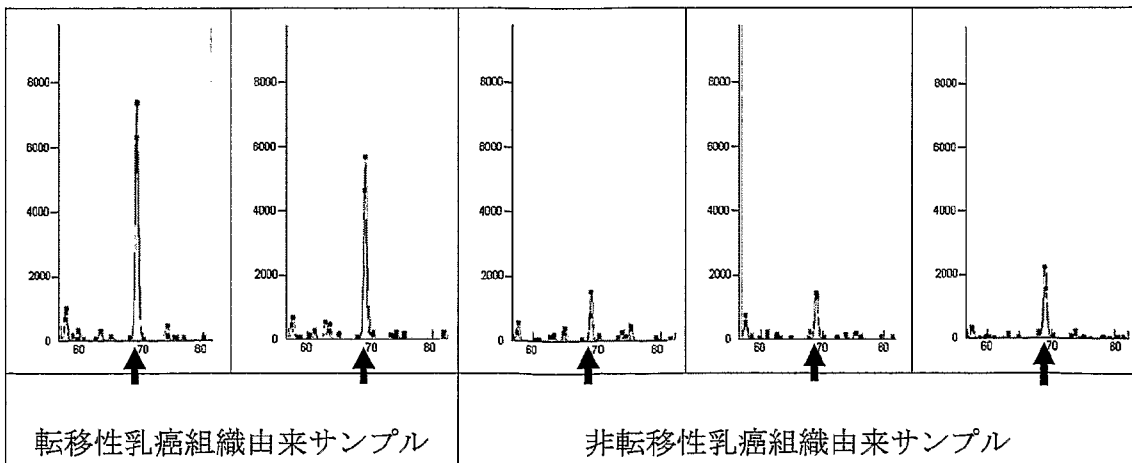
【図 7】



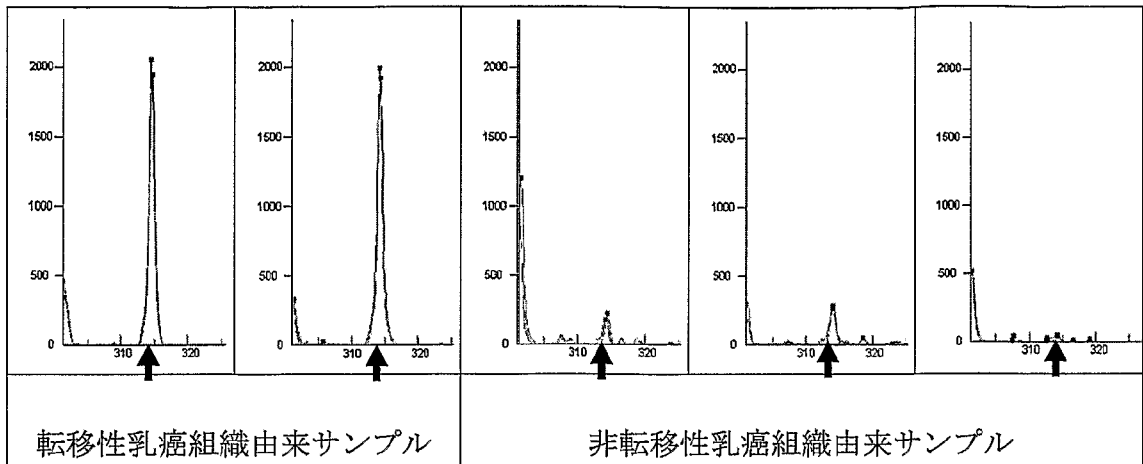
【図 8】



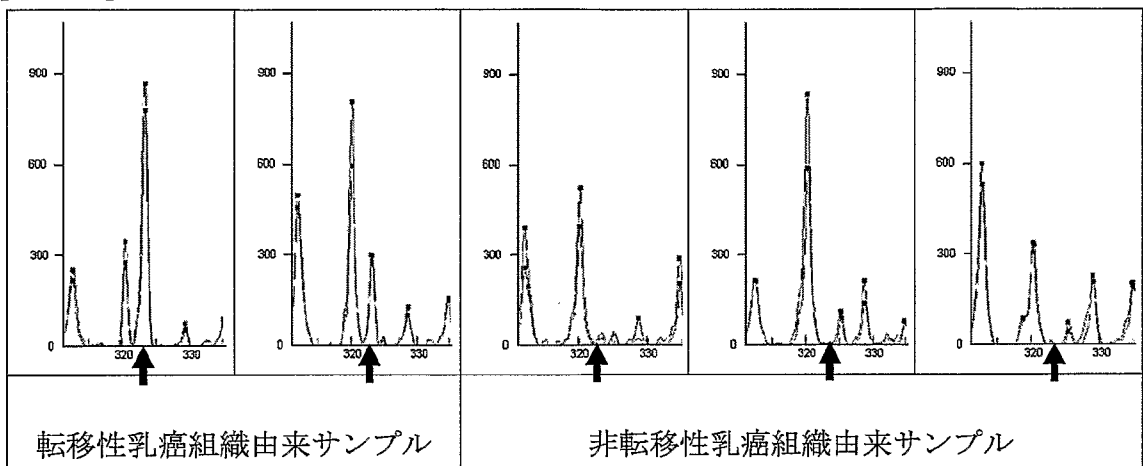
【図 9】



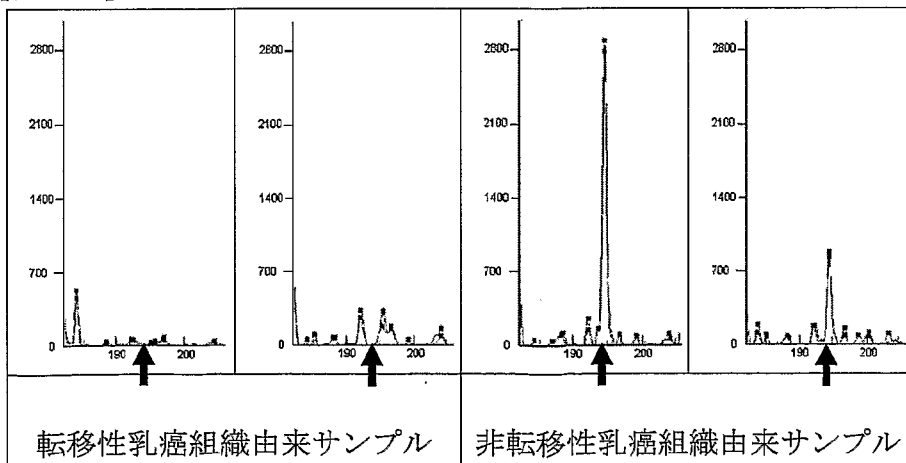
【図10】



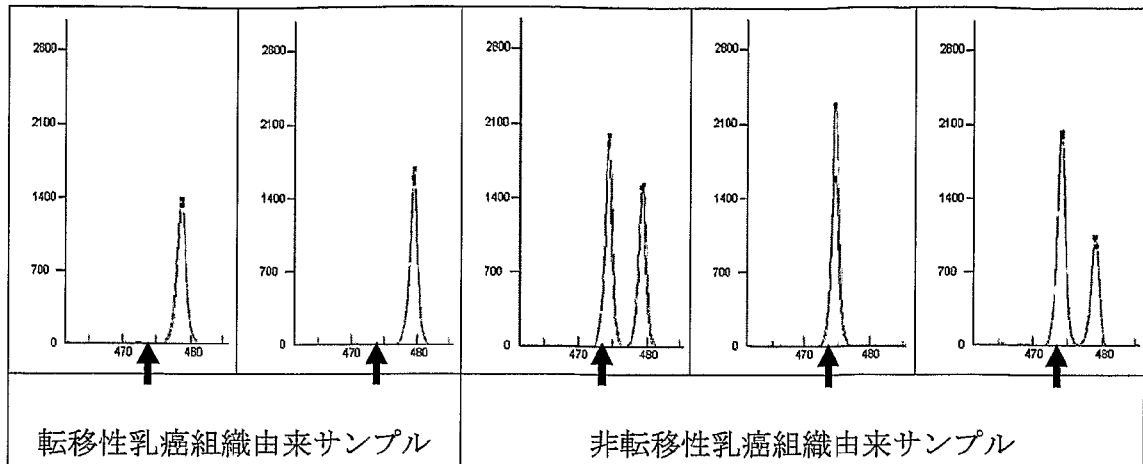
【図11】



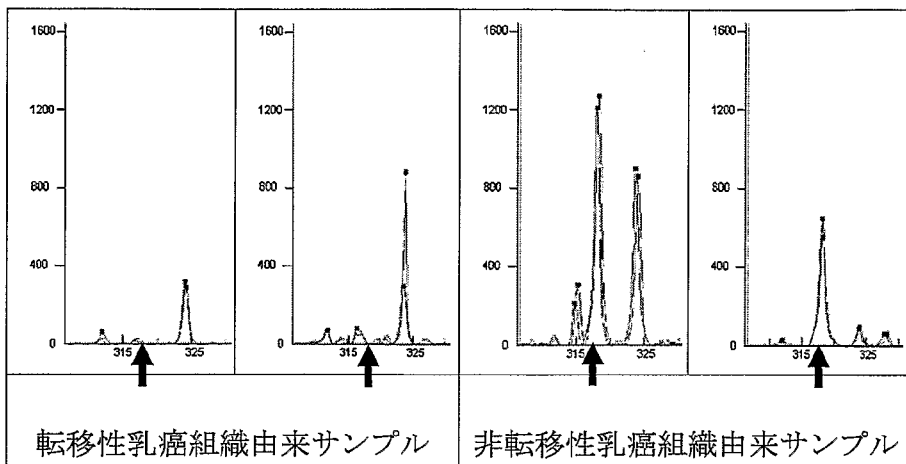
【図12】



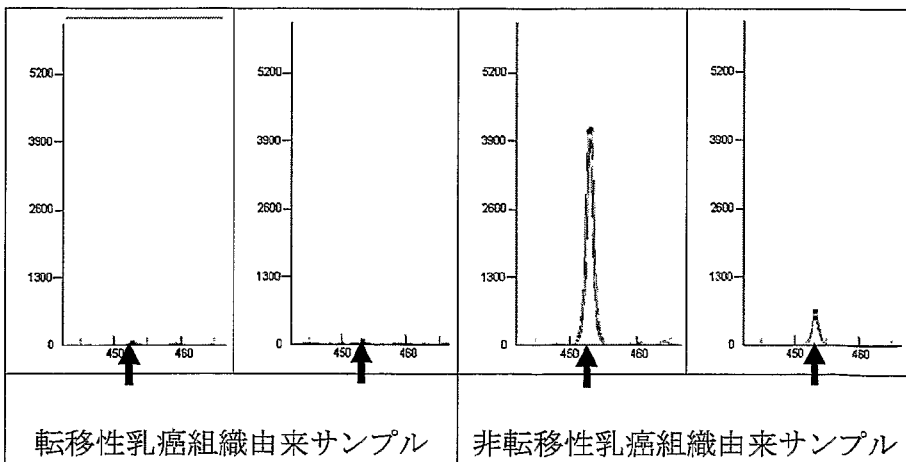
【図 1 3】



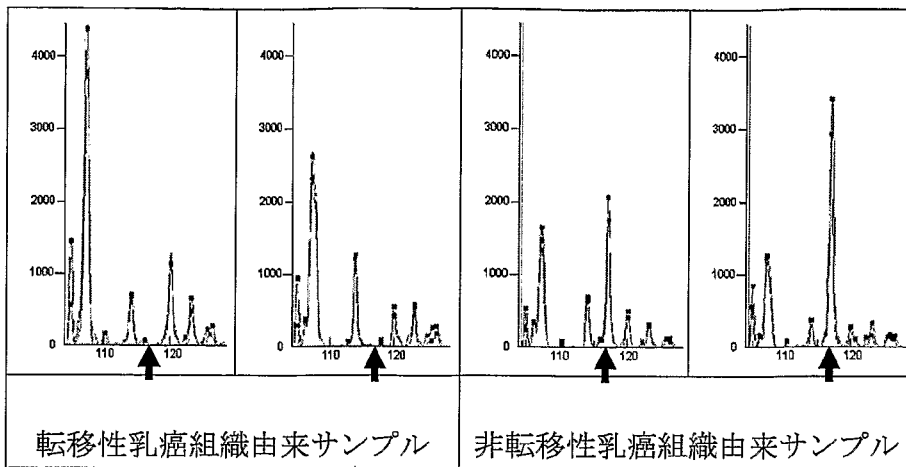
【図 1 4】



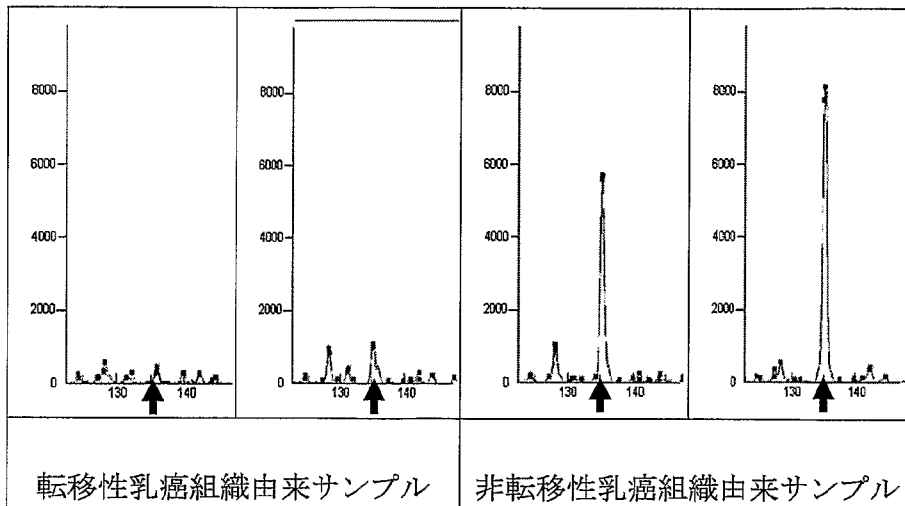
【図 1 5】



【図16】



【図17】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/051800

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N15/00(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) i, C12Q1/68(2006.01) i</i></p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>														
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C12N15/00, C12N15/09, C12Q1/68</i></p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <i>Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007</i></p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>PubMed, JMEDPlus (JDream2), JSTPlus (JDream2)</i></p>														
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>Yoji MIKAMI et al., "Hokatsuteki Kokando Tensha Sanbutsu Profile Kaiseki Gijutsu (HiCEP Gijutsu) o Shiyo shita Gan Maker Tansaku", The Japanese Journal of Clinical Pathology, Vol.53 Hosatsu, 2005, p.363</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 2003-325192 A (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.), 18 November, 2003 (18.11.03), All pages (particularly, example 3) & EP 1367138 A2 & US 2003/0190656 A1</td> <td>1, 2, 4</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 2004-151003 A (Yuko NOGI), 27 May, 2004 (27.05.04), All pages (particularly, Claims 3, 7; referential example 2; Fig. 1) (Family: none)</td> <td>1, 2, 4</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	Yoji MIKAMI et al., "Hokatsuteki Kokando Tensha Sanbutsu Profile Kaiseki Gijutsu (HiCEP Gijutsu) o Shiyo shita Gan Maker Tansaku", The Japanese Journal of Clinical Pathology, Vol.53 Hosatsu, 2005, p.363	1-4	X	JP 2003-325192 A (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.), 18 November, 2003 (18.11.03), All pages (particularly, example 3) & EP 1367138 A2 & US 2003/0190656 A1	1, 2, 4	X	JP 2004-151003 A (Yuko NOGI), 27 May, 2004 (27.05.04), All pages (particularly, Claims 3, 7; referential example 2; Fig. 1) (Family: none)	1, 2, 4
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	Yoji MIKAMI et al., "Hokatsuteki Kokando Tensha Sanbutsu Profile Kaiseki Gijutsu (HiCEP Gijutsu) o Shiyo shita Gan Maker Tansaku", The Japanese Journal of Clinical Pathology, Vol.53 Hosatsu, 2005, p.363	1-4												
X	JP 2003-325192 A (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.), 18 November, 2003 (18.11.03), All pages (particularly, example 3) & EP 1367138 A2 & US 2003/0190656 A1	1, 2, 4												
X	JP 2004-151003 A (Yuko NOGI), 27 May, 2004 (27.05.04), All pages (particularly, Claims 3, 7; referential example 2; Fig. 1) (Family: none)	1, 2, 4												
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>														
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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													
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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													
"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)	"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													
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family													
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
<p>Date of the actual completion of the international search 20 February, 2007 (20.02.07)</p>		<p>Date of mailing of the international search report 27 February, 2007 (27.02.07)</p>												
<p>Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office</p>		<p>Authorized officer</p>												
<p>Facsimile No.</p>		<p>Telephone No.</p>												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/051800

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FUKUMURA, R., et al., A sensitive transcriptome analysis method that can detect unknown transcripts, Nucleic Acids Res., Vol.31, No.16, 2003, e94, [on line]. Retrieved from the Internet:<URL:http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=169986&blobtype=pdf>.	1-4
A	JP 2003-043046 A (The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute), 13 February, 2003 (13.02.03), All pages (Family: none)	1-4
A	WO 2001/069260 A2 (RESEARCH FOUNDATION FOR MENTALHYGIENE, INC.), 20 September, 2001 (20.09.01), All pages & JP 2003-527607 A & EP 1269193 A1 & US 2003/0211554 A1	1-4
P,X	Yoji MIKAMI et al., "HiCEP ni yoru Nyugan Ten'isei Kanren Idenshi no Morateki Hatsugen Kaiseki", The Japan Radiation Research Society Taikai Koen Yoshishu, Vol.49, 2006.09.06, p.107	1-4
P,X	Yoji MIKAMI et al., "Ten'isei Nyugan to erbB2 Variant Idenshi Hatsugen no Kankei", Nyugan Kiso Kenkyu, Vol.15, 2006.04.01, p.7-11	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/051800

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

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

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

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

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The invention of claim 3 relates to a method for determining the possibility of lymph node metastasis of breast cancer by selecting one gene from 17 genes represented by GenBank Accession No. NM000903 and the like. However, the method for determining breast cancer metastasis (lymph node metastasis) using a specific gene as a marker is known as described in the documents 1-3 cited in the International Search Report. Therefore, a special technical feature, i.e., a technical feature (PCT Rule 13.2) that defines a contribution which each of the inventions, considered as a whole, makes over the prior art, does not exist in the method for determining the possibility of lymph node metastasis of breast cancer by selecting any gene from 17 (continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/051800

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

genes described in claim 3.

Thus, claim 3 includes 17 different inventions.

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, C12N15/09(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. C12N15/00, C12N15/09, 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) PubMed, JMEDPlus(JDream2), JSTPlus(JDream2)</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>三上陽司、他、包括的高感度転写産物プロファイル解析技術(HiCEP 技術)を使用した癌マーカー探索、臨床病理, Vol.53 補冊, 2005, p.363</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 2003-325192 A (オルソークリニカル ダイアグノスティクス, インコーポレイティド) 2003.11.18, 全頁 (特に、例 3 参照) & EP 1367138 A2 & US 2003/0190656 A1</td> <td>1, 2, 4</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	三上陽司、他、包括的高感度転写産物プロファイル解析技術(HiCEP 技術)を使用した癌マーカー探索、臨床病理, Vol.53 補冊, 2005, p.363	1-4	X	JP 2003-325192 A (オルソークリニカル ダイアグノスティクス, インコーポレイティド) 2003.11.18, 全頁 (特に、例 3 参照) & EP 1367138 A2 & US 2003/0190656 A1	1, 2, 4
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	三上陽司、他、包括的高感度転写産物プロファイル解析技術(HiCEP 技術)を使用した癌マーカー探索、臨床病理, Vol.53 補冊, 2005, p.363	1-4										
X	JP 2003-325192 A (オルソークリニカル ダイアグノスティクス, インコーポレイティド) 2003.11.18, 全頁 (特に、例 3 参照) & EP 1367138 A2 & US 2003/0190656 A1	1, 2, 4										
<input checked="" type="checkbox"/> C 欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。										
<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 20.02.2007</p>		<p>国際調査報告の発送日 27.02.2007</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) 西 剛志 電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>										
		4B	3538									

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	JP 2004-151003 A (野木 祐子) 2004.05.27, 全頁 (特に、請求項 3,7、参考例 2、および図 1 参照) (ファミリーなし)	1, 2, 4
A	FUKUMURA, R., et al., A sensitive transcriptome analysis method that can detect unknown transcripts, Nucleic Acids Res., Vol.31, No.16, 2003, e94, [on line]. Retrieved from the Internet:<URL:http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=169986&blobtype=pdf>.	1-4
A	JP 2003-043046 A (財団法人化学及血清療法研究所) 2003.02.13, 全頁 (ファミリーなし)	1-4
A	WO 2001/069260 A2 (RESEARCH FOUNDATION FOR MENTAL HYGIENE, INC.) 2001.09.20, 全頁 & JP 2003-527607 A & EP 1269193 A1 & US 2003/0211554 A1	1-4
P, X	三上陽司、他、HiCEP による乳癌転移性関連遺伝子の網羅的発現解析, 日本放射線影響学会大会講演要旨集, Vol.49, 2006.09.06, p.107	1-4
P, X	三上陽司、他、転移性乳癌と erbB2 バリエント遺伝子発現の関係, 乳癌基礎研究, Vol.15, 2006.04.01, p.7-11	1-4

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲3に記載の発明は、GenBank登録番号NM000903等に表示される17種類の遺伝子の1つを選択して、乳癌のリンパ節転移可能性を判定する方法に係るものである。しかしながら、特定遺伝子をマーカーとして利用する乳癌転移（リンパ節転移）の判定方法は、国際調査報告で引用した文献1-3に記載されているように公知であるから、請求の範囲3に記載の17種類の遺伝子のいずれかを選択する乳癌のリンパ節転移可能性の判定方法の間に特別な技術的特徴、すなわち、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴（PCT規則13.2）は存在しない。

よって、請求の範囲3は、異なる17の発明を包含する。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。