

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-48561
(P2013-48561A)

(43) 公開日 平成25年3月14日(2013.3.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2011-186698 (P2011-186698)	(71) 出願人	504409543 国立大学法人秋田大学 秋田県秋田市手形学園町1番1号
(22) 出願日	平成23年8月30日 (2011.8.30)	(74) 代理人	100088546 弁理士 谷川 英次郎
		(72) 発明者	羽瀨 友則 秋田県秋田市本道一丁目1の1 国立大学 法人秋田大学本道キャンパス内
		(72) 発明者	土谷 順彦 秋田県秋田市本道一丁目1の1 国立大学 法人秋田大学本道キャンパス内
		Fターム(参考)	4B024 AA12 CA01 CA09 CA11 CA20 H A 1 1 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ03 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR62 QS25 QX01

(54) 【発明の名称】 前立腺癌の予後の予測方法

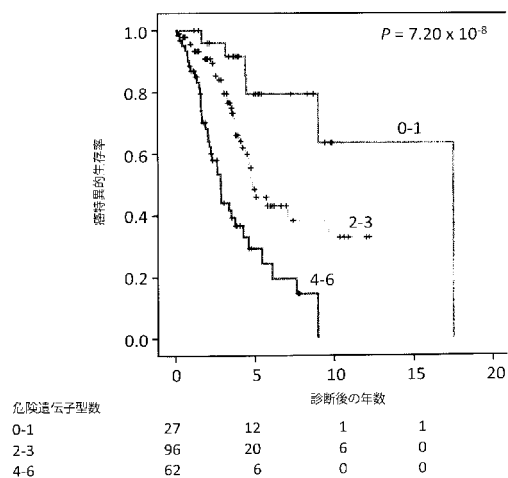
(57) 【要約】

【課題】高い精度で前立腺癌の予後を予測する方法を提供すること。

【解決手段】前立腺癌の予後の予測方法は、前立腺癌患者から採取したゲノミックDNAについて、rs2891980、rs1805377、rs256550、rs256552、rs256564、rs256563、rs256567、rs1295686、rs20541、rs2162679、rs570730、rs10752126、rs569421及びrs2293554から成る群より選ばれる少なくとも1つSNPを調べることを含む。

【効果】本発明により、前立腺癌の予後を高精度に予測できる方法が初めて提供された。特に、好ましい態様では、上記14種類のSNPsを適切に組み合わせることにより、各SNP単独に基づくよりも遙かに高精度に前立腺癌の予後を予測することが可能である。また、血液検体を用いて行うことができるので、検査のための患者の負担はほとんどない。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

前立腺癌患者から採取したゲノミックDNAについて、

- (1) XRCC4遺伝子中のSNPであるrs2891980が(i)ggであるか(ii)ag又はaaであるか、
 - (2) XRCC4遺伝子中のSNPであるrs1805377が(i)aaであるか(ii)ag又はggであるか、
 - (3) PMS1遺伝子中のSNPであるrs256550が(i)gg又はagであるか(ii)aaであるか、
 - (4) PMS1遺伝子中のSNPであるrs256552が(i)gg又はagであるか(ii)aaであるか、
 - (5) PMS1遺伝子中のSNPであるrs256564が(i)aa又はagであるか(ii)ggであるか、
 - (6) PMS1遺伝子中のSNPであるrs256563が(i)gg又はagであるか(ii)aaであるか、
 - (7) PMS1遺伝子中のSNPであるrs256567が(i)aa又はagであるか(ii)ggであるか、
 - (8) IL13遺伝子中のSNPであるrs1295686が(i)aa又はagであるか(ii)ggであるか、
 - (9) IL13遺伝子中のSNPであるrs20541が(i)aa又はagであるか(ii)ggであるか、
 - (10) IGF1遺伝子中のSNPであるrs2162679が(i)gg又はagであるか(ii)aaであるか、
 - (11) GATA3遺伝子中のSNPであるrs570730が(i)gg又はagであるか(ii)aaであるか、
 - (12) GATA3遺伝子中のSNPであるrs10752126が(i)gg又はcgであるか(ii)ccであるか、
 - (13) GATA3遺伝子中のSNPであるrs569421が(i)gg又はagであるか(ii)aaであるか、及び
 - (14) CASP8遺伝子中のSNPであるrs2293554が(i)aaであるか(ii)ac又はccであるか、
- から成る群より選ばれる少なくとも1つを調べることを含み、上記(1)～(14)のそれぞれにおいて、(i)の場合に予後が不良であることを示す、前立腺癌の予後の予測方法(ただし、上記(10)のみを調べる場合を除く)。

10

20

【請求項 2】

- (1) XRCC4遺伝子中の前記2種類のSNPの少なくともいずれか一方、
- (2) PMS1遺伝子中の前記5種類のSNPの少なくとも1つ、
- (3) IL13遺伝子中の前記2種類のSNPの少なくともいずれか一方、
- (4) IGF1遺伝子中の前記SNP、
- (5) GATA3遺伝子中の前記3種類のSNPの少なくとも1つ、及び
- (6) CASP8遺伝子中の前記SNP

である少なくとも6種類のSNPを調べることを含み、予後不良なSNPの数が多いほど予後が不良であることを示す、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

- (1) XRCC4遺伝子中の前記2種類のSNPのいずれか一方、
- (2) PMS1遺伝子中の前記5種類のSNPのうちの1つ、
- (3) IL13遺伝子中の前記2種類のSNPのいずれか一方、
- (4) IGF1遺伝子中の前記SNP、
- (5) GATA3遺伝子中の前記3種類のSNPのうちの1つ、及び
- (6) CASP8遺伝子中の前記SNP

である6種類のSNPを調べることを含み、予後不良なSNPの数が多いほど予後が不良であることを示す、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

XRCC4遺伝子中のSNPがrs2891980、PMS1遺伝子中のSNPがrs256550、GATA3遺伝子中のSNPがrs570730である請求項3記載の方法。

30

40

【請求項 5】

前記6種類のSNPのうち、予後不良なSNPの数が(1)0個又は1個、(2)2個又は3個、(3)4個～6個の3群に分け、どの群に属するかに基づいて予後を予測する請求項3又は4記載の方法。

【請求項 6】

- (1) XRCC4遺伝子中の前記2種類のSNPのいずれか一方、
- (2) PMS1遺伝子中の前記5種類のSNPのうちの1つ、及び
- (3) GATA3遺伝子中の前記3種類のSNPのうちの1つ

である3種類のSNPを調べることを含み、予後不良なSNPの数が多いほど予後が不良である

50

ことを示す、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

前記 3 種類の SNP が rs2891980、rs256550 及び rs570730 である請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

前記予後は、生命予後である請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記前立腺癌患者は、前立腺癌が骨転移している患者である請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記ゲノミックDNAは、血液から採取されたものである請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、前立腺癌の予後の予測方法に関する。

【背景技術】

【0002】

この数十年来、前立腺癌に關与する遺伝子を同定するために多大な努力が行われてきた。最初のヒトゲノム配列の発表により、癌関連遺伝子の探索の標的として、一塩基多型(SNP、複数形はSNPs)が脚光を浴びた。多数のSNPsが前立腺癌のリスクに關与することが報告されたが、このような仮説 - 検証研究を用いて同定された原因遺伝子はほとんどない。最近開発されたDNAマイクロアレイ技術により、数千から数百万個のSNPsを同時に検出することが可能となり、探索的手法により新規な癌関連遺伝子が明らかになるものと期待されている。この数年、アレイ技術を用いたゲノムワイド関連研究により前立腺癌リスクに關与する数十の有望な候補遺伝子が同定された(非特許文献1~5)。

20

【0003】

過去の研究のほとんどは、前立腺癌の発症に關与する遺伝子を同定しようとするものであったが、より最近の研究により、予測又は予後マーカーとしてSNPsの臨床的意義を考慮するようになった(非特許文献6)。SNPsに起因する個体間の遺伝的変異により、内分泌療法や化学療法に対する感受性、前立腺癌の予後に部分的に影響を与える、癌細胞周辺の微細環境、及び癌自体の生物学的特徴が変化すると考えられる(非特許文献6)。このようなSNPsを同定することは、個別治療計画の将来的な最適化のために臨床的に重要である。13種類のSNPsについて先に行った解析において、本願発明者らは、前立腺癌の発症との関連が示唆されていた(非特許文献7、8)インシュリン様成長因子1(IGF1)及びチトクロムP450(CYP)19のSNPsが、転移性前立腺癌の不良予後のマーカーになるかもしれないことを示した(非特許文献9)。しかしながら、過去の研究のほとんどでは、大きな症例 - 対照研究の支持的解析として少数の遺伝子のみが生存率との関連を評価されており、この概念に基づく網羅的なSNP研究はほとんどない。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

40

【0004】

【非特許文献 1】Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, et al. Nat Genet. 2009; 41(10):1122-1126.

【非特許文献 2】Eeles RA, Kote-Jarai Z, Al Olama AA, et al., Nat Genet. 2009;41(10):1116-1121.

【非特許文献 3】Takata R, Akamatsu S, Kubo M, et al., Nat Genet. 2010;42(9):751-754.

【非特許文献 4】Yeager M, Chatterjee N, Ciampa J, et al., Nat Genet.2009;41(10):1055-1057.

【非特許文献 5】Eeles RA, Kote-Jarai Z, Giles GG, et al., Nat Genet.2008;40(3):3

50

16-321.

【非特許文献6】Habuchi T., Future Oncol. 2006;2(2):233-245.

【非特許文献7】Tsuchiya N, Wang L, Horikawa Y, et al., Int J Oncol.2005;26(1):225-231.

【非特許文献8】Suzuki K, Nakazato H, Matsui H, et al., Anticancer Res.2003;23(6D):4941-4946.

【非特許文献9】Tsuchiya N, Wang L, Suzuki H, et al., J Clin Oncol. 2006;24(13):1982-1989.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

転移を伴う例や局所進展の著しい進行性前立腺癌患者の生命予後は不良でかつ癌関連症状の多大なる苦痛を伴う。一方、内分泌療法、化学療法などで長期生存が可能な患者も存在する。化学療法や開発中の分子標的薬などの副作用の大きな治療法を早期に施行すべきか否かを治療前に予測できることは、進行前立腺癌患者の治療方針の改善に大きな貢献をもたらす。

【0006】

従って、本発明の目的は、高い精度で前立腺癌の予後を予測する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本願発明者らは、下記実施例に具体的に記載する通り、前立腺癌の予後に影響を与える14種類のSNPsを同定することに成功し、それらに基づいて前立腺癌の予後を高精度に予測する方法を発明した。

【0008】

すなわち、本発明は、前立腺癌患者から採取したゲノミックDNAについて、

(1) XRCC4遺伝子中のSNPであるrs2891980が(i)ggであるか(ii)ag又はaaであるか、

(2) XRCC4遺伝子中のSNPであるrs1805377が(i)aaであるか(ii)ag又はggであるか、

(3) PMS1遺伝子中のSNPであるrs256550が(i)gg又はagであるか(ii)aaであるか、

(4) PMS1遺伝子中のSNPであるrs256552が(i)gg又はagであるか(ii)aaであるか、

(5) PMS1遺伝子中のSNPであるrs256564が(i)aa又はagであるか(ii)ggであるか、

(6) PMS1遺伝子中のSNPであるrs256563が(i)gg又はagであるか(ii)aaであるか、

(7) PMS1遺伝子中のSNPであるrs256567が(i)aa又はagであるか(ii)ggであるか、

(8) IL13遺伝子中のSNPであるrs1295686が(i)aa又はagであるか(ii)ggであるか、

(9) IL13遺伝子中のSNPであるrs20541が(i)aa又はagであるか(ii)ggであるか、

(10) IGF1遺伝子中のSNPであるrs2162679が(i)gg又はagであるか(ii)aaであるか、

(11) GATA3遺伝子中のSNPであるrs570730が(i)gg又はagであるか(ii)aaであるか、

(12) GATA3遺伝子中のSNPであるrs10752126が(i)gg又はcgであるか(ii)ccであるか、

(13) GATA3遺伝子中のSNPであるrs569421が(i)gg又はagであるか(ii)aaであるか、及び

(14) CASP8遺伝子中のSNPであるrs2293554が(i)aaであるか(ii)ac又はccであるか、

から成る群より選ばれる少なくとも1つを調べることを含み、上記(1)～(14)のそれぞれにおいて、(i)の場合に予後が不良であることを示す、前立腺癌の予後の予測方法(ただし、上記(10)のみを調べる場合を除く)を提供する。

【発明の効果】

【0009】

本発明により、前立腺癌の予後を高精度に予測できる方法が初めて提供された。特に、好ましい態様では、上記14種類のSNPsを適切に組み合わせることにより、各SNP単独に基づくよりも遙かに高精度に前立腺癌の予後を予測することが可能である。さらに、本発明は、予後が不良な場合が多い、既に骨転移している転移性の前立腺癌の予後を予測することができるので、患者の治療方針の決定に大いに役立つ。さらに、本発明は、血液検体を

10

20

30

40

50

用いて行うことができるので、検査のための患者の負担はほとんどない。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】下記実施例において行った、アレイ分析により同定された候補SNPsを用いたりスク分類に従った患者の癌特異的生存を示す図である。スクリーニング後に選択された14個のSNPsを用い、効果の大きさの差を組み入れて高リスク群と低リスク群に分類することにより予後スコア指数を開発した。その予測の精度を、全モデル構築過程に対して、1つ取って置き交差検証 (leave-one-out cross validation) により検証した。高リスク群の癌特異的生存は、低リスク群患者よりも有意に短かった ($P=0.0050$)

【図2】6個の候補遺伝子から選択した6個の代表SNPsの危険遺伝子型の数に基づく、患者の癌特異的生存を示す図である。各患者は6個の代表SNPsの危険遺伝子型の数が、(1) 0個又は1個、(2) 2個又は3個、(3) 4個～6個の3群のうちの1つに割り当てた。3群間の癌特異的生存は有意に異なっていた ($P=7.20 \times 10^{-8}$)。

【図3】3個の候補遺伝子から選択した3個の代表SNPsの危険遺伝子型の数に基づく、患者の癌特異的生存を示す図である。各患者は3個の代表SNPsの危険遺伝子型の数が、(1) 0個又は1個、(2) 2個又は3個の2群のうちの1つに割り当てた。2群間の癌特異的生存は有意に異なっていた ($P=9.55 \times 10^{-4}$)。

【発明を実施するための形態】

【0011】

下記実施例に具体的に記載する通り、DNAアレイを用いて408個の癌関連遺伝子の1421個のSNPsを転移性前立腺癌患者でタイピングし、その予後との関係を解析した。その解析結果に基づき、14種類のSNPsを同定した。これらのSNPsが存在する遺伝子名、染色体中の存在位置、db SNP ID (rs#)及び各SNPについて予後が不良となる塩基配列と予後が比較的良好となる塩基配列、並びに各SNPの周辺部分の塩基配列を記載した配列番号をまとめて下記表1に示す。

【0012】

【表1】

	遺伝子名	存在位置	rs#	塩基配列		配列番号
				予後不良	予後良好	
(1)	XRCC4	5p14	rs2891980	gg	ag又はaa	1
(2)	XRCC4	5p14	rs1805377	aa	ag又はgg	2
(3)	PMS1	2q31	rs256550	gg又はag	aa	3
(4)	PMS1	2q31	rs256552	gg又はag	aa	4
(5)	PMS1	2q31	rs256564	aa又はag	gg	5
(6)	PMS1	2q31	rs256563	gg又はag	aa	6
(7)	PMS1	2q31	rs256567	aa又はag	gg	7
(8)	IL13	5q31	rs1295686	aa又はag	gg	8
(9)	IL13	5q31	rs20541	aa又はag	gg	9
(10)	IGF1	12q23	rs2162679	gg又はag	aa	10
(11)	GATA3	10p14	rs570730	gg又はag	aa	11
(12)	GATA3	10p14	rs10752126	gg又はcg	cc	12
(13)	GATA3	10p14	rs569421	gg又はag	aa	13
(14)	CASP8	2q33	rs2293554	aa	ac又はcc	14

【0013】

表1に示すSNPsは、db SNP ID (rs#)で特定されていることから明らかな通り、全て公知であり、NCBIのデータベースに登録されている。遺伝子名及び染色体中の位置も当然公知であるが念のために表1に示す。また、ゲノミックDNAの各SNP周辺の塩基配列も当然公知であるが、念のためにそれぞれ配列番号1～14に示す。配列番号1～14に示す塩

基配列中、r(g若しくは a)、s(g若しくはc)、又はm(a若しくはc)になっている部分がSNPの部分であり、アレル(対立遺伝子)においてこの塩基が表1に示す各塩基である場合に、表1に示すそれぞれの予後(すなわち、予後不良か予後良好か)になる可能性が高いと予測される。なお、各SNPの周辺の塩基配列は典型的なものを示している。

【0014】

本発明の方法では、表1に示す上記(1)~(14)から選ばれる少なくとも1種のSNPの塩基配列が、表1に示す「予後」のどちらに属するかに基づいて前立腺癌の予後を予測する。各単一のSNPを用いて予測することも可能である(ただし、上記(10)のSNPと前立腺癌の予後との関連は、非特許文献9に記載されているので、上記(10)のSNPのみを調べる場合は本願発明の範囲から除外される)が、下記実施例において具体的に記載するように、複数のSNPsを調べることにより、予測精度が格段に向上するので複数のSNPsを調べるのが好ましい。

10

【0015】

複数のSNPsを調べる場合、予測の精度を高めるためには、表1に示す6種類の遺伝子のそれぞれから少なくとも1種のSNPを選択して調べるのが好ましい。すなわち、

- (1) XRCC4遺伝子中の前記2種類のSNPの少なくともいずれか一方、
- (2) PMS1遺伝子中の前記5種類のSNPの少なくとも1つ、
- (3) IL13遺伝子中の前記2種類のSNPの少なくともいずれか一方、
- (4) IGF1遺伝子中の前記SNP、
- (5) GATA3遺伝子中の前記3種類のSNPの少なくとも1つ、及び
- (6) CASP8遺伝子中の前記SNP

20

である少なくとも6種類のSNPを調べるのが好ましい。この場合、予後不良なSNPの数が多いほど予後が不良であることを示す。例えば、予後不良なSNPの数に基づいて、2群又は3群に分け、どの群に属するかで予後が不良か良好か(2群の場合)、又は、不良か、普通か、良好か(3群の場合)の予測を行うことができる。2群又は3群に分ける場合、調べたSNPの数に1を加え(予後不良なSNPが0個の場合を加える)、これを2等分又は3等分して群を分けることができる。割り切れない場合には、1つ又は2つの群について1個だけ増やしてほぼ等分することができる。なお、グループ分けは、2群又は3群に限定されるものではなく、調べたSNPの数を上限として、より多数の群に分けることもできる。

【0016】

30

特に、下記実施例に具体的に示すように、

- (1) XRCC4遺伝子中の前記2種類のSNPのいずれか一方、
- (2) PMS1遺伝子中の前記5種類のSNPのうちの1つ、
- (3) IL13遺伝子中の前記2種類のSNPのいずれか一方、
- (4) IGF1遺伝子中の前記SNP、
- (5) GATA3遺伝子中の前記3種類のSNPのうちの1つ、及び
- (6) CASP8遺伝子中の前記SNP

である6種類のSNPを調べるのが好ましい。この場合、下記実施例に具体的に記載する通り、予後不良なSNPの数が(1)0個又は1個、(2)2個又は3個、(3)4個~6個の3群に分け、どの群に属するかに基づいて予後を予測することにより、高精度に予後を予測することが可能である。

40

【0017】

あるいは、上記6種類のSNPを調べる場合よりも検査を簡略化したい場合には、上記6種類の遺伝子のうち、影響が大きい3種類の遺伝子のSNPを調べてもよい。すなわち、この場合、

- (1) XRCC4遺伝子中の前記2種類のSNPのいずれか一方、
- (2) PMS1遺伝子中の前記5種類のSNPのうちの1つ、及び
- (3) GATA3遺伝子中の前記3種類のSNPのうちの1つ

である3種類のSNPを調べる。予後不良なSNPの数が多いほど予後が不良であり、上記の通り、予後不良なSNPの数を2群又は3群に分けて評価することができる。

50

【0018】

上記の通り、本発明で用いられるSNPは公知であり、その周辺部分の塩基配列も公知であるので、各SNPの塩基配列は、周知の種々の方法により決定することができる。例えば、下記実施例で用いられているような、SNPの各塩基配列と相補的な塩基配列を有するオリゴプローブDNAをチップ上にスポットしたDNAマイクロアレイを用い、被検DNAがどのオリゴプローブDNAとハイブリダイズするかに基づいて被検DNA中のSNPの塩基配列を決定することができる。あるいは、SNPの周辺部分の塩基配列がわかっているので、SNPを含む領域のDNAをPCR等の核酸増幅法により増幅し、増幅断片の塩基配列を決定することによっても被検DNA中のSNPの塩基配列を決定することができる。塩基配列の決定は、自動シーケンサーにより容易、迅速に行うことができる。さらには、SNPの部分に3'末端が来るようにフォワード側のプライマーを設定してPCRを行い、増幅が起きるか否かに基づいてSNPの塩基配列を決定することも可能である。さらには、SNPを含む領域をPCR等の核酸増幅法で増幅すると共に、SNPの塩基がどちらになるかで切断が起きたり起きなかったりする制限酵素で増幅断片を消化し、電気泳動にかけてどの制限酵素による切断が起きたか否かに基づいてSNPの塩基配列を決定することも可能である(PCR-RFLP法)。これらの手法はいずれも周知であり、また、必要な試薬や装置類も市販されているので、SNPを含む周辺部分の塩基配列がわかっていれば容易に実施可能である。

10

【0019】

本発明の方法により、前立腺癌の予後、特に生命予後(余命)を予測することができる。特に、下記実施例に具体的に記載するように、前立腺癌が骨転移している転移性前立腺癌の予後を予測することができる。また、下記実施例に具体的に記載するように、本発明の方法は、血液検体を用いて実施することが可能であるので、簡便に検査を行うことができ、また、検査のための患者の負担はほとんどないという有利な特徴を有する。

20

【0020】

転移性前立腺癌の場合、ほぼ全例内分泌療法から開始され、治療が無効と判断されるまで継続される。この治療はさほど大きな副作用もなく侵襲性は低い治療であるが、治療が長期化すると骨折や心血管系への影響が出てくる。本発明の方法で予後を予測することにより、予後が不良と判断されるような患者には、治療初期から侵襲性が高いもののより積極的な治療(抗癌剤など)によって予後が改善される可能性がある。また、予後が良いことが予測される患者には、敢えて侵襲の高い治療を行うことはない。逆に、予後が良好と判断される患者には、同じ内分泌療法でも薬剤の種類を変えたり、数や量を減らした投与スケジュールを採用することで、副作用の出現を抑えることができる可能性がある。また、予後不良な患者に対して十分な内分泌療法を行わない場合は生存期間が短くなるのが、予想されるので、十分な内分泌療法を行う等の対策を採ることができる。従って、本発明の方法は、前立腺癌の治療において有用な情報をもたらすものである。

30

【0021】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0022】

実施例 1

40

材料と方法

患者

1980年7月から2008年9月まで間に、初診時に骨転移を有した前立腺癌の日本人患者191例を本試験の対象とした。患者らは、秋田大学医学部附属病院とその関連施設、京都大学、東北大学、及び弘前大学医学部附属病院で診断され、また、それまでには治療を受けていなかった。病理学的診断は前立腺針生検によって行い、転移はX線、CTスキャン又は骨シンチグラフィによって診断した。全ての患者に初期治療として内分泌療法を施行した。初期治療が効果を示さなかった場合にはその後、その他の抗アンドロゲン、エストロゲン、ステロイド、化学療法剤又は緩和的放射線療法を含む任意選択の治療をそれまでの治療に加え、又はそれまでの治療と置き換えた。

50

【 0 0 2 3 】

針生検試料の病理学的評価は地域の病理学者によって行われた。グリーンスコアの代わりに細胞分化の状態のみが使用可能だった11の生検試料においては、良い、普通、及び悪い分化をグリーンスコアの<6、7~8、及び9~10にそれぞれ置き換えた。前立腺癌の初期治療開始前のヘモグロビン(HGB)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、乳酸脱水粗酵素(LDH)、及び前立腺特異的抗体(PSA)の前治療のレベルはカルテから得た。それぞれの患者の遺伝子型データの提供を受けることなく、それぞれの施設における独立したエンドポイントのレビューが患者のカルテからの標準化された抽出に基づいて死因を特定した。

【 0 0 2 4 】

本試験の対象となった全ての患者から、DNA及び臨床情報の使用についての書面における同意書を得た。本試験は、それぞれの施設における組織の審査委員会(及び/又は倫理委員会)による承認を受けた。

【 0 0 2 5 】

遺伝子多型解析

QIAamp Blood Kit(QIAGEN、ヒルデン、ドイツ)又は標準的なフェノールクロロホルム法を用いて、それぞれの患者の末梢血試料から約2µgのゲノムDNAを調製した。SNP500 Cancer Database(Packer BR, Yeager M, Staats B, et al. Nucleic Acids Res. 2004;32(Database issue): D528-532.)から選択された408の癌関連遺伝子に含まれる1421のSNPを含むCancer SNP Panel(Illumina Inc.、サンディエゴ、カリフォルニア)を用いて遺伝子多型の解析を行った。このパネルには、アンドロゲン及びステロイドホルモンの合成又は代謝に関連する複数の遺伝子が含まれた。191の試料のうち、遺伝子多型解析がうまくいかなかった6つの試料(コールレート:96.9%)を本試験から除き、全185患者について統計学的解析を行った。遺伝子座における成功率及び解析のコールレートはそれぞれ、98.2%及び95.5%であった。

【 0 0 2 6 】

統計学的解析

本試験のエンドポイントは全死因死亡及び前立腺癌特異的死亡であり、並びに生存期間は診断から死亡までの日時から算出した。それぞれのSNPの変異型アレルにおける優性、劣性、又はアディティブ全てのモデルについて、生存との関連を評価するためにロジック検定を行い、最も低いP値を有する最も好適なモデルをそれぞれのSNPに採択した。最小遺伝子型頻度(MGF)は、それぞれのSNPについて二分した遺伝子型群におけるより低い頻度として定義した。一般的な高頻度遺伝的異常を検出するための手法を含むMGFにおけるカットオフ値は0.40であった。

【 0 0 2 7 】

多重検定における多施設共同試験に関する問題を修正するために置換法によって予測したFDR(false discovery rate)に対するカットオフ値は0.30であった。我々は1つ取って置き交差検証(leave-one-out cross validation、LOOCV)解析を行った。特にLOOCVのそれぞれのフォールドにおいては、スクラッチ法からの多重検定によってSNPを選択し、訓練例に対する化合物の共変数の予測スコア(Matsui S. BMC Bioinformatics. 2006; 7:156.)を作成し、試験サンプルのスコアが訓練例の予測スコアの中央値よりも大きいかどうかによって、試験サンプルを高又は低リスク群に分類した。LOOCV解析の終了後、全例における2群間での生存を比較した。生存に差のない統計値を示したロジック検定の統計的有意性を評価するために、生存期間をランダム置換した後(Radmacher MD, McShane LM, Simon R. J Comput Biol. 2002;9(3):505-511.)、LOOCV解析の全行程を2000回反復する置換法を行った。

【 0 0 2 8 】

生存を臨床病理学的因子によって比較するために、年齢及びPSAの中央値、HGB、ALP及びLDHレベルの正常範囲並びにグリーンスコアが9未満又は9以上かによって患者を2分した。SNP及び臨床病理学的因子の生存への影響をCox比例バザード回帰解析によって評価し

10

20

30

40

50

た。LOOCV解析の後には、多変数Coxモデルを、遺伝的変数（すなわち予測した高及び低リスク群）並びに臨床病理学的因子を共変数として予測したリスク分類の両方ともまた比較した。臨床因子を調節した後の予測したリスク分類において、いずれの効果もない統計値を示したワルド検定の統計的有意性を評価するために、生存転帰と臨床因子との間の相関を乱すことなく試料間のSNPセットをランダム置換した置換法(Boulesteix AL, Hothorn T . BMC Bioinformatics. 2010;11:78.)を行った。全生存及び癌特異的生存をカプラン・マイヤー法を用いて予測した。生存解析にはSPSS software version 16.0 (SPSS Japan Inc.、東京、日本)及びSAS 9.2 (SAS Institute Inc.、カリー、ノースカロライナ、米国)を用い、0.05未満の両側P値が統計的な有意差を示すと判断した。

【0029】

結果

患者の臨床病理学的背景因子

患者の個体群統計及び臨床的特徴を表2に示した(表2)。死亡までの追跡期間中、18人の患者が少なくとも1回のドセタキセル又はドセタキセルを含む化学療法を受けた。全例群における全生存及び癌特異的生存の中央値はそれぞれ4.62及び4.77年であった。

【0030】

【表2】

表2 患者人口統計及び臨床特徴

	平均± 標準偏差	(中央値)	範囲
年齢	69.4 ± 8.8	(70)	45 - 89
経過観察期間 (月)	43.8 ± 33.4	(37)	1 - 210
PSA (ng/mL)	1,088 ± 1,980	(313)	0.2 - 12,490
HGB (g/dL)	13.3 ± 2.0 (13.5)	6.2 - 17.4	
ALP (IU/L)	654 ± 902	(306)	7 - 5,870
LDH (IU/L)	299 ± 184	(232)	97 - 956
グリーソンスコア		n	(%)
≤ 6		15	(8.1)
7		26	(14.1)
8		39	(21.1)
9		81	(43.8)
10		13	(7.0)
不明		11	(5.9)
転移部位			
骨のみ		95	(51.3)
骨+リンパ節		89	(48.1)
骨+内臓		13	(7.0)
初期治療			
外科的性腺摘除のみ		22	(11.9)
LH-RH類似体のみ		47	(25.4)
CAB		116	(62.7)

略号: CAB, 複合アンドロゲン遮断

【0031】

生存解析

MGFを用いた最初のスクリーニングにおいてSNPの数を176までに狭め、その後FDR基準に基づく2回目スクリーニングにおいて、最終的に上位14のSNPを選択した(表3)。全てのSNPについてハーディ・ワインベルグ平衡を前提とした。選択したSNPは6つの遺伝子、す

10

20

30

40

50

なわちXRCC4 (X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4)、PSM1 (postmeiotic segregation increased 1)、GATA結合タンパク質3 (GATA3)、インターロイキン13 (IL13)、カスパーゼ8 (CASP8)、及びIGF1に局在した (表3)。6つ中4つの複数の候補SNPを含む遺伝子においては、SNPは互いに高いLDを示した (XRCC4及びIL13におけるD'は1.000、PMS1においては0.985~1.000、並びにGATA3においては0.9862~1.000であった)。

【0032】

【表3】

表3 骨転移を有する前立腺癌特異的生存率と関連する、選択されたSNPs

遺伝子 (位置、機能), SNP	遺伝子型	MGF	ログランク χ^2	P
XRCC4 (5p14, DNA鎖切断修復)				
rs2891980	gg 対 ag, aa	45	9.49	0.0021
rs1805377	aa 対 ag, gg	46	9.10	0.0026
PMS1 (2g31, DNAミスマッチ修復)				
rs256550	gg, ag 対 aa	46	8.39	0.0038
rs256552	gg, ag 対 aa	46	7.82	0.0052
rs256564	aa, ag 対 gg	46	7.27	0.0070
rs256563	gg, ag 対 aa	46	6.84	0.0089
rs256567	aa, ag 対 gg	44	6.04	0.0140
IL13 (5q31, サイトカイン)				
rs1295686	aa, ag 対 gg	50	6.22	0.0126
rs20541	aa, ag 対 gg	48	6.06	0.0138
IGF1 (12q23, 成長因子)				
rs2162679	gg, ag 対 aa	45	5.45	0.0196
GATA3 (10p14, 転写因子)				
rs570730	gg, ag 対 aa	50	6.86	0.0088
rs10752126	gg, cg 対 cc	49	6.85	0.0089
rs569421	gg, ag 対 aa	49	5.21	0.0225
CASP8 (2q33, アポトーシス)				
rs2293554	aa 対 ac, cc	48	5.46	0.0195

略号; MGF, 各SNPにおいて二分された2つの遺伝子型のより低頻度のものとして定義された少数遺伝子型頻度

【0033】

癌特異的生存を予測するためのLOOCV解析においては、20人の患者における少なくとも1つのSNP遺伝子座の欠測値によって、全165患者を高及び低リスク群に分類した。高リスク群の癌特異的生存の中央値は、低リスク患者の中央値よりも有意に短かった (4.29対7.09年、ログランク検定値に対する置換法によるログランクP=0.0050; 図1)。

【0034】

癌特異的生存と臨床病理学的因子変数との間の関連における一変数のCox比例ハザード解析においては、より高いALPレベル (HR2.92、95%CI 1.79~4.77、P=2.05x10⁻⁵)、より高いLDHレベル (HR2.72、95%CI 1.47~4.95、P=1.34x10⁻³)、及び9以上のグリーソンスコア (HR2.44、95%CI 1.52~3.90、P=2.01x10⁻⁴) がより短い癌特異的生存と有意に関連していた (表4)。ドセタキセル又はドセタキセルを含む化学療法剤の投与は、癌特異的生存に有意な影響を及ぼさなかった (P=0.369)。LOOCV解析においては、遺伝的変数に基づいて予測したリスク分類の効果は、臨床病理学的因子変数の調節を行った後には統計学的に有意であった (置換法によって評価した多変数Cox回帰モデルにおけるワルド検定値P=0.0060)。これらの結果は、遺伝的な分類が臨床的な予後変数とは独立し

ていることを示唆している。

【 0 0 3 5 】

【 表 4 】

変数	単変量解析		多変量解析 (モデル1)		多変量解析 (モデル2)	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
年齢 (≥ 70 vs < 70歳)	1.34 (0.85-2.11)	0.204				
PSA (≥ 315 vs < 315 ng/mL)	1.42 (0.90-2.24)	0.137				
HGB (≤ 13.5 vs < 13.5 g/dL)	1.14 (0.71-1.83)	0.589				
ALP (≥ 350 vs < 350 IU/L)	2.92 (1.79-4.77)	2.05×10 ⁻⁵	2.64 (1.51-4.62)	6.93×10 ⁻⁴	2.22 (1.32-3.73)	2.63×10 ⁻³
LDH (≥ 500 vs < 500 IU/L)	2.70 (1.47-4.95)	1.34×10 ⁻³	1.55 (0.78-3.10)	0.215	1.22 (0.62-2.40)	0.570
グリーソンスコア (≥ 9 vs < 9)	2.44 (1.52-3.90)	2.01×10 ⁻⁴	2.10 (1.20-3.67)	8.95×10 ⁻³	2.16 (1.31 ⁻³ .56)	2.69×10 ⁻³
リスク群 ^a (高対低)	2.13 (1.28-3.52)	3.43×10 ⁻³	2.07 (1.18 ⁻³ .62)	1.13×10 ⁻²		
危険遺伝子型数 ^b (4-6対0-3)	3.21 (2.04-5.05)	4.70×10 ⁻⁷			3.06 (1.80-5.19)	3.58×10 ⁻⁵

略号: HR, 危険率, CI: 信頼区間
^aリスクは、1つ取って置き交差検証法により分類した。
^bリスクは、各候補遺伝子から選択した6個の代表SNPsにおける危険遺伝子型の数により分類した。

10

【 0 0 3 6 】

次に、6つの候補遺伝子に含まれる危険遺伝子型の数に基づく生存解析を行った。同じ遺伝子に含まれる全てのSNPが互いに強いLDにあるため、それぞれの遺伝子の代表としてロジック検定で最も小さいP値を示したSNPを選択した（すなわち、XRCC4においては2891980、PMS1においてはrs256550、GATA3においてはrs570730、IL13においてはrs1295686、CASP8においてはrs2293554、及びIGF1においてはrs2162679を選択した）。代表としたSNPにおける危険遺伝子型のハザード比が1.71~2.00の範囲内であったため、それぞれのSNPに同じ重さを与えた。再度選択した6つのSNPのセットに基づいて作成したスコアと、14のSNPに基づいて作成した元のスコアとの間には高い相関が認められた（スピアマンの相関は0.88）。

20

【 0 0 3 7 】

最後に全患者のセットを用いて、今後の試験のための独立した外部検証のための方法を構築する代わりに、遺伝的スコア及び臨床的予後因子の両方を用いて予後予測のための多変数モデルを開発した。6つのSNPを用いた遺伝的スコアに基づいた、0~1つの危険遺伝子型を有する低リスク群、2~3つの危険遺伝子型を有する中等度リスク群、及び4~6つの危険遺伝子型を有する高リスク群の3群のうち1つにそれぞれの患者を割り付けた。3群における癌特異的生存は有意に異なり、低リスク、中等度、高リスク群の中央値はそれぞれ、13.3、7.0、及び3.8年であった（ロジックP=7.20×10⁻⁸；図2）。このモデルを用いた多変数Cox比例ハザード解析においては、リスク分類（高リスク対低又は中等度リスク）（HR3.06、95%CI 1.80~5.19、P=3.58×10⁻⁵）は、ALPレベル（HR2.22、95%CI 1.32~3.73、P=2.63×10⁻³）及びグリーソンスコア（HR2.16、95%CI 1.31~3.56、P=2.69×10⁻³；表4）に付随して癌特異的生存を予測する独立した変数として再度示された。

30

【 0 0 3 8 】

全生存と関連するSNPを選択するために同様の診査手法を実施した。しかしながら、本試験で用いたMGF及びFDRによるスクリーニング基準に適合するSNPは検出されなかった。

40

【 0 0 3 9 】

実施例 2

さらに、上記6個の候補遺伝子から1個ずつ選択した6個の代表SNPから、癌特異的生存(CSS)への関与がより大きい3個のSNP（XRCC4：2891980、PMS1：rs256550、GATA3：rs570730）に絞り込んで、同様の解析を行った。これらのSNPにおける危険遺伝子型の個数によって患者を2群、すなわち0-1個と2-3個に分けて比較した結果、CSSの中央値は7.6年と3.7年と2-3個の危険遺伝子型を有する患者群において有意に生存期間が短縮していた（P=0.000955）（図3）。5年CSSは、それぞれ59.0%、35.0%であった。

50

【 0 0 4 0 】

6個のSNP単独、6個または3個のSNPにおける危険遺伝子型の保有数によるCSSの予測精度を表5にまとめて示した。1個のSNP単独での予後解析におけるlogrank P値は0.0021から0.0196であったのに対して、6個のSNPによる3段階ならびに2段階のリスク分類におけるP値はそれぞれ 7.20×10^{-8} 、 1.11×10^{-7} であり、6個のSNPによる2段階のリスク分類におけるP値は0.000955と、単一のSNPによる予後予測と比較して3個または6個のSNPを用いた予測の方が優れていると考えられた。

【 0 0 4 1 】

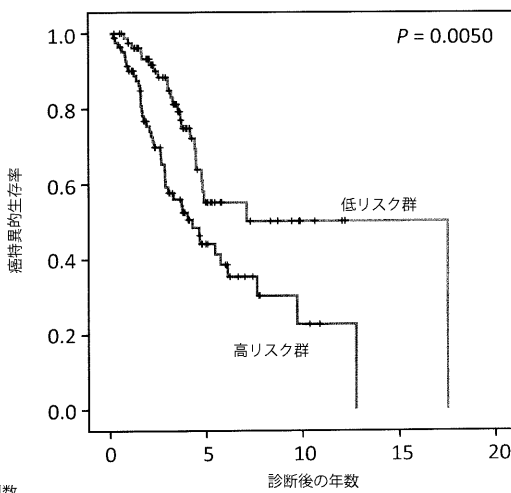
【表5】

遺伝子, SNP	遺伝子型	ログランク χ^2	P
1. XRCC4, rs2891980	gg 対 ag, aa	9.49	0.0021
2. PMS1, rs256550	gg, ag 対 aa	8.3	0.0030
3. GATA3, rs570730	gg, ag 対 aa	6.86	0.0088
4. IL13, rs1295686	aa, ag 対 gg	6.22	0.0126
5. IGF1, rs2162679	gg, ag 対 aa	5.45	0.0196
6. CASP8, rs2293554	aa 対 ac, cc	5.46	0.0195
組合せ	危険遺伝子型数		
1+2+3	2-3 対 0-1	10.91	0.000955
1+2+3+4+5+6	4-6 対 2-3 対 0-1	32.90	7.20×10^{-8}
	4-6 対 0-3	28.18	1.11×10^{-7}

10

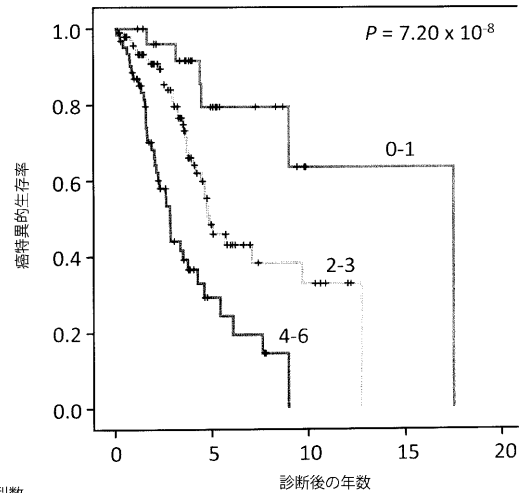
20

【 図 1 】



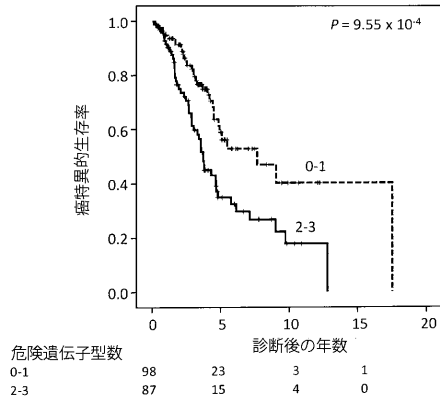
危険遺伝子型数	診断後の年数			
低リスク群	81	18	4	1
高リスク群	84	17	3	0

【 図 2 】



危険遺伝子型数	診断後の年数			
0-1	27	12	1	1
2-3	96	20	6	0
4-6	62	6	0	0

【 図 3 】



【 配 列 表 】

2013048561000001.app