

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2016年6月23日(23.06.2016)



(10) 国際公開番号  
WO 2016/098873 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12Q 1/68 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 31/4184 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)  
A61K 31/519 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)  
A61K 31/7088 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)  
A61K 45/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/085435
- (22) 国際出願日: 2015年12月18日(18.12.2015)
- (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 2014-257615 2014年12月19日(19.12.2014) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東京大学(THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP). 学校法人埼玉医科大学(SAITAMA MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 Saitama (JP). 学校法人杏林学園(KYORIN UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1818611 東京都三鷹市新川6丁目20番2号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 間野 博行(MANO Hiroyuki); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 上野 敏秀(UENO Toshihide); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3

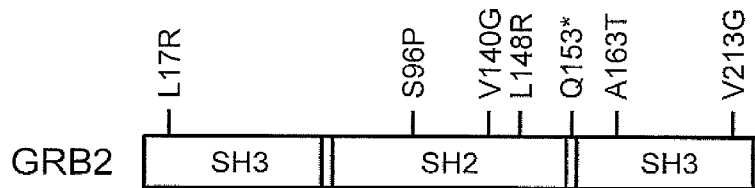
番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 福村 知隆(FUKUMURA Kazutaka); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 武笠 晃文(MUKASA Aki-take); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 西川 亮(NISHIKAWA Ryo); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP). 三島 一彦(MISHIMA Kazuhiko); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP). 白畑 充章(SHIRAHATA Mitsuaki); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP). 永根 基雄(NAGANE Motoo); 〒1818611 東京都三鷹市新川6丁目20番2号 学校法人杏林学園内 Tokyo (JP). 成田 善孝(NARITA Yoshitaka); 〒1040045 東京都中央区築地五丁目1番1号 国立研究開発法人国立がん研究センター内 Tokyo (JP). 市村 幸一(ICHIMURA Koichi); 〒1040045 東京都中央区築地五丁目1番1号 国立研究開発法人国立がん研究センター内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING RISK OF DEVELOPING PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM LYMPHOMA, AND COMPOSITION FOR TREATING PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM LYMPHOMA

(54) 発明の名称: 中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクを判定する方法及び中枢神経原発悪性リンパ腫の治療用組成物



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a method for easily determining the risk of developing primary central nervous system lymphoma, and a composition for treating primary central nervous system lymphoma. The present invention solves the above problem through: a method for determining the risk of a human subject developing primary central nervous system lymphoma, wherein the method includes a step for detecting mutant variants of GRB2 and/or MYD88, or nucleic acids that encode these mutant variants, from a sample derived from the subject, and a step for determining that there is a high risk of the subject developing primary central nervous system lymphoma when the abovementioned mutant variants or nucleic acids encoding the mutant variants are detected; and a composition for treating primary central nervous system lymphoma in a human subject, wherein the composition includes rituximab, or an agent for inhibiting the activity of GRB2 and/or a downstream signaling factor thereof, in the MAPK pathway, taking the abovementioned mutant variants to be the cause of primary central nervous system lymphoma.

(57) 要約: 本発明の目的は、中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクを簡便に判定する方法、及び中枢神経原発悪性リンパ腫の治療用組成物を提供することである。本発明は、ヒト被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクを判定する方法であって、被験体由来のサンプルから、GRB2及び/又はMYD88の突然変異体又はそれをコードする核酸を検出する工程、並びに前記突然変異体又はそれをコードする核酸が検出された場合に被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクが高いと判定する工程を含む、前記方法、並びにヒト被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫を治療するための組成物であって、MAPK経路におけるGRB2及び/若しくはその下流のシグナル伝達因子の活性阻害剤、又はリツキシマブを含み、中枢神経原発悪性リンパ腫が上記突然変異体を原因とする、組成物により上記課題を解決する。

WO 2016/098873 A1



- (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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW,

MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

## 明 細 書

発明の名称：

中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクを判定する方法及び中枢神経原発悪性リンパ腫の治療用組成物

### 技術分野

[0001] 本発明は、中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクを判定する方法及び中枢神経原発悪性リンパ腫の治療用組成物に関する。

### 背景技術

[0002] 中枢神経原発悪性リンパ腫（PCNSL）は、脳等の中枢神経系で最初に発生する悪性のリンパ腫である。中枢神経原発悪性リンパ腫が全身に転移することは少ないが、罹患した患者の予後は一般に不良であり、その生存期間中央値は2～4年である（非特許文献1）。このように深刻な症状をもたらす疾患であるにもかかわらず、中枢神経原発悪性リンパ腫の病原性に関与する遺伝子変異についての知見は少なく、その早期発見を可能にする遺伝子マーカーは知られていない。

[0003] また、中枢神経原発悪性リンパ腫の治療法は限られており、全身性のびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫（DLBCL）に対する現在の標準的な化学療法は、中枢神経原発悪性リンパ腫の患者には効果がないことが知られている（非特許文献2）。

### 先行技術文献

#### 非特許文献

[0004] 非特許文献1：Agnieszka Korfel et al, Nature Reviews Neurology 9, pp. 317-327

非特許文献2：Mead, G.M. et al, Cancer, 2000, 89, pp. 1359-70

### 発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクを簡便に判定する方法を提供することを目的とする。また、本発明は、中枢神経原発悪性リンパ腫の治療用組成物を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0006] 上記課題を解決するために鋭意検討した結果、本発明者は、中枢神経原発悪性リンパ腫を有する被験体由来のサンプルにおいてGRB2及び／又はMYD88遺伝子の突然変異体が見出されること、並びに該遺伝子突然変異体を有する被験体において、MAPK経路におけるGRB2及び／又はその下流のシグナル伝達因子の活性阻害剤又はリツキシマブ等のB細胞枯渇剤が中枢神経原発悪性リンパ腫の治療剤となり得ることを見出し、本発明を完成させた。

[0007] すなわち、本発明は以下の態様を包含する。

(1) ヒト被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクを判定する方法であって、被験体由来のサンプルから、配列番号2及び／又は配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質の突然変異体又はそれをコードする核酸を検出する工程、並びに前記突然変異体又はそれをコードする核酸が検出された場合に被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクが高いと判定する工程を含む、前記方法。

(2) 前記突然変異体が、恒常活性型突然変異体である、上記1に記載の方法。

(3) 前記突然変異体が、配列番号2において開始メチオニンを1位としたときに、17位のロイシンのアルギニンへの置換(L17R)、96位のセリンのプロリンへの置換(S96P)、140位のバリンのグリシンへの置換(V140G)、148位のロイシンのアルギニンへの置換(L148R)、153位のグルタミンの終止コードンへの置換(Q153\*)、163位のアラニンのトレオニンへの置換(A163T)、及び／又は213位のバリンのグリシンへの置換(V213G)を有する、上記1又は2に記載の方法。

(4) 前記突然変異体が、L17R、V140G、L148R、及び／又はA163Tを有する、上記3に記載の方法。

(5) ヒト被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫を治療するための組成物であって、MAPK経路における配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質及び／又はその下流のシグナル伝達因子の活性阻害剤を含み、前記中枢神経原発悪性リンパ腫が配列番号2のアミノ酸配列におけるL17R、S96P、V140G、L148R、Q153\*、A163T、及び／又はV213Gを原因とする、前記組成物。

(6) 前記活性阻害剤が、低分子化合物又はアプタマーである、上記5に記載の組成物。

(7) 前記シグナル伝達因子が、Sos、Ras、Raf、MAP2K、及び／又はERKである、上記5又は6に記載の組成物。

(8) 前記シグナル伝達因子が、MAP2Kである、上記7に記載の組成物。

(9) 前記活性阻害剤が、トラメチニブ (GSK1120212)、ピマセルチブ (AST 03026)、セルメチニブ (AZD6244)、PD-0325901、レファメチニブ (REDA119)、TAK733、MEK162、R05126766、WX-544、R04987655、GDC-0973、AZD8330、コビメチニブ又はCI-1040である、上記8に記載の組成物。

(10) 前記突然変異体が、配列番号4において開始メチオニンを1位としたときに、133位のグルタミンのアルギニンへの置換 (Q133R)、159位のグリシンのアラニンへの置換 (G159A)、233位のメチオニンのトレオニンへの置換 (M233T)、及び／又は265位のロイシンのプロリンへの置換 (L265P) を有する、上記1又は2に記載の方法。

(11) 前記突然変異体が、配列番号4におけるL265Pを有する、上記10に記載の方法。

(12) サンプルが末梢血単核細胞である上記10又は11に記載の方法。

(13) 被験体が全身性リンパ腫の既往歴のない、上記10～12のいずれかに記載の方法。

(14) ヒト被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫を治療するための組成物であって、リツキシマブを含み、前記中枢神経原発悪性リンパ腫が配列番号4のアミノ酸配列におけるQ133R、G159A、M233T、及び／又はL265Pを原因とする、前記組成物。

(15) ヒト被験体由来のサンプルから、配列番号2及び／又は配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質の突然変異体又はそれをコードする核酸を検出するための手段を含む、被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクを判定するためのキット。

(16) ヒト被験体における中枢神経原発悪性リンパ腫に対する薬剤の有効性を判定する方法であって、被験体由来のサンプルから、配列番号2及び／又は配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質の突然変異体又はそれをコードする核酸を検出する工程、並びに前記突然変異体又はそれをコードする核酸が検出された場合に被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫に対する薬剤の有効性が高いと判定する工程を含む、前記方法。

(17) 前記突然変異体が、恒常活性型突然変異体である、上記16に記載の方法。

(18) 前記突然変異体が、配列番号2において開始メチオニンを1位としたときに、17位のロイシンのアルギニンへの置換(L17R)、96位のセリンのプロリンへの置換(S96P)、140位のバリンのグリシンへの置換(V140G)、148位のロイシンのアルギニンへの置換(L148R)、153位のグルタミンの終止コドンへの置換(Q153\*)、163位のアラニンのトレオニンへの置換(A163T)、及び／又は213位のバリンのグリシンへの置換(V213G)を有する、上記16又は17に記載の方法。

(19) 前記突然変異体が、L17R、V140G、L148R、及び／又はA163Tを有する、上記18に記載の方法。

(20) 薬剤が、MAPK経路における配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質及び／又はその下流のシグナル伝達因子の活性阻害剤である、上記16～19のいずれかに記載の方法。

(21) 前記活性阻害剤が、低分子化合物又はアプタマーである、上記20に記載の方法。

(22) 前記シグナル伝達因子が、Sos、Ras、Raf、MAP2K、及び／又はERKである、上記20又は21に記載の方法。

(23) 前記シグナル伝達因子が、MAP2Kである、上記22に記載の方法。

(24) 前記活性阻害剤が、トラメチニブ (GSK1120212)、ピマセルチブ (AST03026)、セルメチニブ (AZD6244)、PD-0325901、レファメチニブ (REDA119)、TAK733、MEK162、R05126766、WX-544、R04987655、GDC-0973、AZD8330、コビメチニブ又はCI-1040である、上記23に記載の方法。

(25) 前記突然変異体が、配列番号4において開始メチオニンを1位としたときに、133位のグルタミンのアルギニンへの置換 (Q133R)、159位のグリシンのアラニンへの置換 (G159A)、233位のメチオニンのトレオニンへの置換 (M233T)、及び/又は265位のロイシンのプロリンへの置換 (L265P) を有する、上記16又は17に記載の方法。

(26) 前記突然変異体が、配列番号4におけるL265Pを有する、上記25に記載の方法。

(27) サンプルが末梢血単核細胞である上記25又は26に記載の方法。

(28) 被験体が全身性リンパ腫の既往歴のない、上記25～27のいずれかに記載の方法。

(29) 薬剤が、リツキシマブである、上記25～28のいずれかに記載の方法。

[0008] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2014-257615号の開示内容を包含する。

## 発明の効果

[0009] 本発明により、簡便に中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクを判定することが可能になる。また、本発明により、中枢神経原発悪性リンパ腫を効果的に治療することが可能になる。

## 図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、中枢神経原発悪性リンパ腫を有する被験体において見出されたGRB2の突然変異の部位と種類を示す。図中、SH2はSrcホモロジー2ドメインを、SH3はSrcホモロジー3ドメインを表す。

[図2]図2は、野生型又は変異型GRB2をコードするレトロウイルス、又は対照

用として空のレトロウイルス (Mock) を感染させた3T3細胞の増殖アッセイを示す。各図中のスケールバーは0.4mmである。図中の破線部は、重層化した細胞塊が顕著に認められた部分を示す。正常な細胞はコンフルエントになれば増殖が止まるが、異常な増殖活性を有する細胞は、コンフルエントになっても重層になって増殖を続ける。V140G及びL148Rの2つが、顕著な増殖活性（発がん活性）に寄与しており、L17R及びA163Tの2つも増殖活性（発がん活性）に寄与していることが示された。

[図3]図3 Aは、野生型又は変異型GRB2をコードするレトロウイルス、又は対照用として空のレトロウイルス (Mock) に感染させた3T3細胞の、免疫ブロット図を示す。この図では、古典的RAS/MAPKシグナルカスケードにおいてGRB2の下流に位置する各シグナル分子の活性化状態を示している。リン酸化MAP2K1/2 (p-MAP2K1/2) 及びリン酸化ERK (p-ERK) に特異的な抗体のレーンで示されるように、GRB2変異体の多くでMAP2K1/2及びERKがリン酸化・活性化されていることが示された。図3 Bは、古典的RAS/MAPKシグナルカスケードのGRB2の下流の概略図を示す。GRB2に結合しているGDP-GTP交換反応促進因子であるSosがRasの活性化を誘導する。活性化したRasはRafを活性化し、それによりMAP2K及びERKが活性化される。

[図4]図4は、野生型GRB2又はGRB2変異体 (V140G) をコードするレトロウイルスに感染させた3T3細胞を、感染2日後から、図示した濃度のMAP2K阻害剤トラメチニブ若しくはセルメチニブ、又は前記阻害剤の溶剤で対照用のジメチルスルホキシド (DMSO) ビヒクルの存在下で培養し、その後クリスタルバイオレットで染色した結果を示す。培地の色が濃いほど、細胞が過剰に増殖したことを表す。GRB2突然変異体 (V140G) による細胞の過剰な増殖が、トラメチニブ及びセルメチニブによって、濃度依存的に抑制されたことが示された。

[図5]中枢神経原発悪性リンパ腫を有する被験体において見出された、MYD88の突然変異の部位と種類を示す。図中、DeathはDeathドメインを、TIRは、Toll/インターロイキン1受容体ホモロジードメインを表す。



## 発明を実施するための形態

### [0011] <中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクの判定方法>

一態様において、本発明は、被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクを判定する方法であって、被験体由来のサンプルから、配列番号2及び／又は配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質の突然変異体又はそれをコードする核酸を検出する工程、並びに前記突然変異体が発見された場合に被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクが高いと判定する工程を含む、前記方法に関する。

[0012] 本明細書において、「中枢神経原発悪性リンパ腫 (primary central nervous system lymphoma ; PCNSL)」という用語は、中枢神経で最初に発生する悪性リンパ腫を意味する。中枢神経には脳及び脊髄の他、眼神経及び嗅神経が含まれるが、本発明における中枢神経原発悪性リンパ腫は、特に脳原発の悪性リンパ腫である。

[0013] 本明細書において、「発症リスク」という用語は、被験体が疾患、特に中枢神経原発悪性リンパ腫を発症する確率を意味する。本明細書において、「中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクが高い」とは、GRB2及び／又はMYD88の突然変異を有する被験体集団における中枢神経原発悪性リンパ腫の発症頻度が、GRB2及び／又はMYD88の突然変異を有さない集団における中枢神経原発悪性リンパ腫の発症頻度よりも高いことを意味する。本発明の方法を用いて中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクを判定することによって、被験体において中枢神経原発悪性リンパ腫を早期に発見し、又は該疾患に罹患した被験体の外科的手術後における該疾患の再発の可能性を予測することができる。

[0014] 本明細書において、「被験体」という用語は、本方法に供される個体を意味する。本方法に供される個体の例として、例えば動物、特に哺乳動物、例えばヒト及びチンパンジーなどの霊長類、ラット及びマウス等の実験動物、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、及びヤギ等の家畜動物、並びにイヌ及びネコ等の愛玩動物、好ましくはヒトが挙げられる。

[0015] 本明細書において、「サンプル」とは、本発明の判定方法に供される生体試料を意味する。本発明において使用可能なサンプルとしては、限定するものではないが、リンパ組織の生検サンプル、特に脳から外科的に切除したリンパ腫組織、又は末梢血単核細胞が挙げられる。「末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells ; PBMC)」とは、一つの核を有する血流内の細胞を意味し、その例として、例えばリンパ球及びマクロファージが挙げられる。末梢血単核細胞は、フィコール・ハイパック (Ficoll-Hypaque) やフィコール・コンレイ (Ficoll-Conray) を比重液とした密度勾配遠心法を用いて、末梢全血又は血漿分離後の血球成分から得ることができる。これらの比重液は、市販の分離液等を利用すると便利である。例えば、Ficoll-Paque PLUS (GE healthcare) やLYMPHOPREP (AXIS-SHIELD) 等が利用できる。PBMCsの分離方法については、キット添付のプロトコルに従えばよい。本発明では、末梢血単核細胞を単離して用いてもよいし、末梢血単核細胞を含むサンプルを用いてもよい。

[0016] <突然変異>

本明細書において、「突然変異」という用語は、集団の大多数 (野生型) と異なる形質をもつことを意味し、「突然変異体」という用語は、そのような形質を有する核酸及びタンパク質等の物質を意味する。一般に、突然変異は、被験体における遺伝子の塩基配列又はタンパク質のアミノ酸配列を、野生型である健常体におけるそれらの配列と比較することにより同定される。

[0017] 本発明における突然変異は、中枢神経原発悪性リンパ腫に罹患した被験体と健常体における遺伝子又はタンパク質の比較によって同定してもよいし、中枢神経原発悪性リンパ腫に罹患した被験体においてリンパ腫組織と正常組織における遺伝子又はタンパク質の比較によって同定してもよい。

[0018] 遺伝子レベルでの突然変異、すなわち塩基配列上の変異の例として、アミノ酸のコドンが終止コドンに変わるナンセンス突然変異、コドン内の塩基の変化又は置換によりアミノ酸の置換が生じるミスセンス突然変異等、及び塩基の挿入又は欠失等によりコドンの読み枠がずれるフレームシフト突然変異

等が挙げられる。塩基配列に突然変異が生じるが、アミノ酸に変化が生じないサイレント突然変異もまた、本明細書の突然変異に含まれる。本発明の遺伝子突然変異体は、上記突然変異のいずれかを有してもよいし、上記突然変異の複数を有してもよい。

[0019] タンパク質レベルでの突然変異、すなわちアミノ酸配列上の変異の例として、アミノ酸が他のアミノ酸に置き換わる置換、アミノ酸が追加される付加又は挿入、及びアミノ酸が削除される欠失が挙げられる。本発明のタンパク質突然変異体は、上記突然変異のいずれかを有してもよいし、上記突然変異の複数を有してもよい。

[0020] 上記突然変異の検出は、当業者に知られる任意の方法により行うことができる。例えば、遺伝子レベルでの突然変異の検出は、PCR法、ノーザンハイブリダイゼーション法、定量的PCR法、RT-PCR法、in situ ハイブリダイゼーション法、FISH法、又はデジタルPCR法等により、突然変異を有する目的遺伝子のDNA又はRNAの各組織における存在を定性的に又は定量的に測定することにより検出することができる。突然変異の定量を正確に行うには、デジタルPCRが便利である。デジタルPCRとは、核酸を極限まで希釈して多数の区画に分け、各区画内でそれぞれPCRを行うことにより、単一の核酸分子から増幅産物又はシグナルを提供するように構成されるPCR法を指す。デジタルPCR法は、相対的に低いレベルで存在する変異をも検出し得る。デジタルPCRの詳細については、例えばVogelstein B. and Kinzler K. W., (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 96, pp. 9236-9241、及びZhi Zhu et al., Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 403, 8, pp.2127-2143を参照されたい。また、アミノ酸レベルでの突然変異の検出は、例えば（ポリ）ペプチドの分子量の測定及びアミノ酸変異を認識し得る抗体を用いることにより行うことができる。

[0021] 本発明によって検出される突然変異は、特にGRB2又はMYD88又はその遺伝子（GRB2遺伝子又はMYD88遺伝子）の突然変異である。

[0022] GRB2（GRB2タンパク質）はアダプタータンパク質の一種であり、Srcホモロ

ジー2ドメインを介してチロシンキナーゼ及び他のドッキングタンパク質と結合し、それによってMAPK経路におけるRAS等の下流のシグナル伝達因子を活性化する (Downward, J. FEBS Lett. 1994, 338, pp. 113-117、及びCully, M., You, H., Levine, A.J. & Mak, T.W, Nat. Rev. Cancer, 2006, 6, pp. 184-92を参照されたい)。ヒトGRB2遺伝子は配列番号1で示す塩基配列からなり、またヒトGRB2タンパク質は配列番号2で示すアミノ酸配列からなる。

[0023] MYD88 (MYD88タンパク質) は、自然免疫系及び獲得免疫系において中心的な役割を果たすアダプタータンパク質であり、インターロイキン1受容体シグナリング経路における重要なシグナル伝達因子として働くことが知られている (Warner N. and Nunez G., J. Immunol. 2013, 190, pp.3-4)。ヒトMYD88遺伝子は配列番号3で示す塩基配列からなり、またヒトMYD88タンパク質は配列番号4で示すアミノ酸配列からなる。

[0024] 本発明の突然変異は、好ましくは、恒常活性型 (構成的活性型) 突然変異である。「恒常活性型突然変異」という用語は、タンパク質を恒常的 (構成的) に活性化状態にする機能獲得型変異をいう。本明細書では、特に上流からのシグナルの有無に関わらず下流のシグナルを活性化する突然変異を意味する。例えばGRB2の恒常活性型突然変異はMAPK経路におけるGRB2の下流のシグナル伝達因子を恒常的に活性化する。MAPK経路におけるGRB2の下流のシグナル伝達因子として、Sos、Ras、Raf、MAP2K (MAPKK、MEK)、及びERKが挙げられる。

[0025] ヒトSos遺伝子は配列番号5で示す塩基配列からなり、ヒトSosは配列番号6で示すアミノ酸配列からなる。

[0026] また、Rasとしては、Kras、Hras、及びNrasが挙げられる。ヒトKras遺伝子は配列番号7で示す塩基配列からなり、ヒトKrasは配列番号8で示すアミノ酸配列からなり、ヒトHras遺伝子は配列番号9で示す塩基配列からなり、ヒトHrasは配列番号10で示すアミノ酸配列からなり、ヒトNras遺伝子は配列番号11で示す塩基配列からなり、ヒトNrasは配列番号12で示すアミノ酸配列からなる。

- [0027] さらに、Rafとしては、RAF1、ARAF1、及びBRAFが挙げられる。ヒトRAF1遺伝子は配列番号13で示す塩基配列からなり、ヒトRAF1は配列番号14で示すアミノ酸配列からなり、ヒトARAF1遺伝子は配列番号15で示す塩基配列からなり、ヒトARAF1は配列番号16で示すアミノ酸配列からなり、ヒトBRAF遺伝子は配列番号17で示す塩基配列からなり、ヒトBRAFは配列番号18で示すアミノ酸配列からなる。
- [0028] また、MAP2Kとしては、MAP2K1、MAP2K2、MAP2K3、MAP2K4、MAP2K5、MAP2K6、及びMAP2K7が挙げられる。ヒトMAP2K1遺伝子は配列番号19で示す塩基配列からなり、ヒトMAP2K1は配列番号20で示すアミノ酸配列からなり、ヒトMAP2K2遺伝子は配列番号21で示す塩基配列からなり、ヒトMAP2K2は配列番号22で示すアミノ酸配列からなり、ヒトMAP2K3遺伝子は配列番号23で示す塩基配列からなり、ヒトMAP2K3は配列番号24で示すアミノ酸配列からなり、ヒトMAP2K4遺伝子は配列番号25で示す塩基配列からなり、ヒトMAP2K4は配列番号26で示すアミノ酸配列からなり、ヒトMAP2K5遺伝子は配列番号27で示す塩基配列からなり、ヒトMAP2K5は配列番号28で示すアミノ酸配列からなり、ヒトMAP2K6遺伝子は配列番号29で示す塩基配列からなり、ヒトMAP2K6は配列番号30で示すアミノ酸配列からなり、ヒトMAP2K7遺伝子は配列番号31で示す塩基配列からなり、ヒトMAP2K7は配列番号32で示すアミノ酸配列からなる。
- [0029] そして、ERKとしては、ERK1 (MAPK3)、及びERK2 (MAPK1) が挙げられる。ヒトERK1遺伝子は配列番号33で示す塩基配列からなり、ヒトERK1は配列番号34で示すアミノ酸配列からなり、ヒトERK2遺伝子は配列番号35で示す塩基配列からなり、ヒトERK2は配列番号36で示すアミノ酸配列からなる。シグナル伝達因子は、上記配列を有するものに限定されず、これらの遺伝子の転写バリエーション等も含む。
- [0030] MYD88の恒常活性型突然変異はNF- $\kappa$ B経路におけるMYD88の下流のシグナル伝達因子を恒常的に活性化する。また、インターロイキン1受容体シグナリング経路におけるMYD88の下流のシグナル伝達因子として、IRAK、TRAF6、TAB1、TAK1、IKK  $\alpha$ 、IKK  $\beta$ 、Ik  $\beta$ 、及びNF- $\kappa$ B等が挙げられる。

## [0031] &lt;GRB2の突然変異&gt;

GRB2の突然変異としては、限定するものではないが、配列番号2で示すアミノ酸配列において開始メチオニンを1位としたときの、17位のロイシンのアルギニンへの置換（L17R）、96位のセリンのプロリンへの置換（S96P）、140位のバリンのグリシンへの置換（V140G）、148位のロイシンのアルギニンへの置換（L148R）、153位のグルタミンの終止コドンへの置換（Q153\*）、163位のアラニンのトレオニンへの置換（A163T）、及び213位のバリンのグリシンへの置換（V213G）が挙げられる。好ましい突然変異として、L17R、V140G、L148R、及びA163Tが挙げられる。本発明では、上記突然変異を単独で検出してもよいし、複数を同時に検出してもよい。

[0032] GRB2遺伝子の突然変異としては、限定するものではないが、上記アミノ酸置換に相当するGRB2遺伝子の置換が挙げられる。例えば、L17Rに相当する遺伝子置換として、配列番号1の塩基配列の50位のチミン（t）のグアニン（g）への置換（t50g）が挙げられる。

## [0033] &lt;GRB2の突然変異を有する被験体における中枢神経原発悪性リンパ腫の治療用組成物&gt;

後述する実施例で、GRB2の上記突然変異が中枢神経原発悪性リンパ腫の病因となり得ることを示すと共に、上記突然変異を有する被験体において、MAPK経路におけるGRB2に対する活性阻害剤及び／又はその下流のシグナル伝達因子の活性阻害剤が、有効な治療剤となり得ることを示した。したがって、一態様において、本発明は、GRB2におけるL17R、S96P、V140G、L148R、Q153\*、A163T、及び／又はV213Gを原因とするヒト被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫を治療するための、MAPK経路におけるGRB2及び／又はその下流のシグナル伝達因子の活性阻害剤を有効成分として含む組成物に関する。また、本発明は、ヒト被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫を治療するための方法に関する。この方法は、MAPK経路におけるGRB2及び／又はその下流のシグナル伝達因子の活性阻害剤を被験体に投与する工程を含む。前記中枢神経原発悪性リンパ腫はGRB2におけるL17R、S96P、V140G、L148R、Q153\*、A163T、及び／又はV

213Gを原因とする。

[0034] 本発明において、シグナル伝達因子の活性阻害剤は、シグナル伝達因子の活性を阻害するものであれば特に限定するものではないが、この阻害剤が特に脳の中樞神経原発悪性リンパ腫の治療のために用いられ得ることから、血液脳関門を通過し得る低分子化合物又はアプタマー等であることが好ましい。

[0035] 「脳関門を通過し得る低分子化合物」とは、例えば分子量10000以下、好ましくは分子量1000以下、特に好ましくは分子量500以下の天然の又は化学合成された化合物を意味する。例えば、トラメチニブ (GSK1120212)、ピマセルチブ (AST03026)、セルメチニブ (AZD6244)、PD-0325901、レファメチニブ (REDA119)、TAK733、MEK162、R05126766、WX-544、R04987655、GDC-0973、AZD8330、コビメチニブ、及びCI-1040等（各化合物の詳細については、例えばAkinleye et al., Journal of Hematology & Oncology 6:27, 2013を参照されたい）が挙げられる。

[0036] 「脳関門を通過し得るアプタマー」とは、主として核酸アプタマーが該当する。「核酸アプタマー」とは、核酸で構成されるアプタマーであって、水素結合等を介した一本鎖核酸分子の二次構造及び三次構造に基づいて形成される立体構造によって標的物質と強固、かつ特異的に結合し、標的物質の生理活性等の機能を特異的に阻害又は抑制する能力を持つリガンド分子をいう。核酸アプタマーは、一般に、RNAのみで構成されるRNAアプタマーとDNAのみで構成されるDNAアプタマーが知られているが、本明細書では、特に限定はしない。

[0037] 本発明における上記シグナル伝達因子の活性阻害剤は、上記シグナル伝達因子のいずれかを阻害するものであれば特に限定するものではないが、MAP2K、特にMAP2K1/2の阻害剤であることが好ましい。MAP2K阻害剤の例としては、例えば、前述のトラメチニブ (GSK1120212)、ピマセルチブ (AST03026)、セルメチニブ (AZD6244)、PD-0325901、レファメチニブ (REDA119)、TAK733、MEK162、R05126766、WX-544、R04987655、GDC-0973、AZD8330、コビメチ

ニブ、及びCI-1040等が挙げられ、好ましいMAP2K阻害剤としてトラメチニブ及びセルメチニブが挙げられる。

[0038] 本発明の組成物は、上記有効成分の他に、他の有効成分、特にメトトレキサート等の抗がん剤を含んでもよい。

[0039] 本発明の組成物は、原則として当該分野で公知の方法で製剤化することが可能である。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Merck Publishing Co., Easton, Pa.) に記載の方法を用いればよい。具体的な製剤化の方法は、投与方法によって異なる。投与方法は、経口投与と非経口投与に大別されるが、本発明の組成物の場合、非経口投与がより好ましい。

[0040] 本発明の組成物を非経口投与する場合、その具体例としては、注射による投与が挙げられる。本発明の組成物を注射で投与する場合、製薬上許容可能な溶媒と混合し、必要に応じて製薬上許容可能な担体を加えた懸濁液剤として調製することができる。

[0041] 「製薬上許容可能な溶媒」は、水若しくはそれ以外の薬学的に許容し得る水溶液、又は油性液のいずれであってもよい。水溶液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助剤を含む等張液が挙げられる。補助剤としては、例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム、その他にも低濃度の非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80 (TM)、HCO-60）、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等が挙げられる。油性液としては、ゴマ油、大豆油が挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル又はベンジルアルコールと併用することもできる。また、緩衝剤、例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えば、ベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。

[0042] 注射剤は、製薬上許容される賦形剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、pH調節剤等と適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化すればよい。

[0043] 注射は、例えば、血管内注射、リンパ管内注射、筋肉内注射、腹腔内注射



、皮下注射等が挙げられ、全身投与である血管内注射又はリンパ管内注射等の循環器内投与が好ましいが、リンパ腫へ直接的に投与する局所投与であってもよい。

[0044] 本発明の組成物を経口投与する場合については、製薬上許容可能な担体を添加してもよい。

[0045] 「製薬上許容可能な担体」とは、薬剤の製剤化や生体への適用を容易にし、その有効成分の作用を阻害又は抑制しない範囲で添加される物質をいう。例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、充填剤、乳化剤、流動添加調節剤又は潤滑剤が挙げられる。

[0046] 「賦形剤」としては、例えば、単糖、二糖類、シクロデキストリン及び多糖類のような糖（具体的には、限定はしないが、グルコース、スクロース、ラクトース、ラフィノース、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、デキストリン、マルトデキストリン、デンプン及びセルロースを含む）、金属塩（例えば、リン酸ナトリウム若しくはリン酸カルシウム、硫酸カルシウム、硫酸マグネシウム）、クエン酸、酒石酸、グリシン、低、中、高分子量のポリエチレングリコール（PEG）、プルロニック、あるいはそれらの組み合わせが挙げられる。

[0047] 「結合剤」としては、例えば、トウモロコシ、コムギ、コメ、若しくはジャガイモのデンプンを用いたデンプン糊、ゼラチン、トラガカント、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム及び／又はポリビニルピロリドン等が挙げられる。

[0048] 「崩壊剤」としては、例えば、前記デンプンや、カルボキシメチルデンプン、架橋ポリビニルピロリドン、アガー、アルギン酸若しくはアルギン酸ナトリウム又はそれらの塩が挙げられる。

[0049] 「充填剤」としては、例えば、前記糖及び／又はリン酸カルシウム（例えば、リン酸三カルシウム、若しくはリン酸水素カルシウム）が挙げられる。

[0050] 「乳化剤」としては、例えば、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステ

ルが挙げられる。

- [0051] 「流動添加調節剤」及び「滑沢剤」としては、例えば、ケイ酸塩、タルク、ステアリン酸塩又はポリエチレングリコールが挙げられる。
- [0052] 経口剤の剤形としては、例えば、固形剤（錠剤、丸剤、舌下剤、カプセル剤、ドロップ剤を含む）、顆粒剤、粉剤、散剤、液剤等を挙げることができる。さらに固形剤は、必要に応じ、当該分野で公知の剤皮を施した剤形、例えば、糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶錠、フィルムコーティング錠、二重錠、多層錠とすることができる。剤形の具体的な形状、大きさについては、いずれもそれぞれの剤形において当該分野で公知の剤形の範囲内であればよく、特に限定はしない。
- [0053] 本発明の組成物における有効成分の含有量は、原則1回の投与でその有効成分がリンパ腫に達し得る量、かつそれを適用する被検体に対して有害な副作用をほとんど又は全く付与しない量であればよい。このような含有量は、抗がん剤の種類、リンパ腫の進行度、リンパ腫の大きさ、組成物の剤形及び投与方法によって異なるが、当業者によって適宜定められる。
- [0054] <MYD88の突然変異>
- MYD88の突然変異としては、限定するものではないが、配列番号4において開始メチオニンを1位としたときに、133位のグルタミンのアルギニンへの置換（Q133R）、159位のグリシンのアラニンへの置換（G159A）、233位のメチオニンのトレオニンへの置換（M233T）、及び265位のロイシンのプロリンへの置換（L265P）が挙げられ、好ましい突然変異として、特にL265Pが挙げられる。本発明では、上記突然変異を単独で検出してもよいし、複数を同時に検出してもよい。
- [0055] 上記突然変異、特にL265Pは、中枢神経原発悪性リンパ腫を有する被験体の末梢血単核細胞においても検出され得ることが本発明者により初めて見出された。理論により拘束されるものではないが、後の実施例で述べる様に、L265Pを有するリンパ球が最初に末梢血等で生じ、その後この細胞が脳等の中枢神経に移行し、それによって中枢神経原発悪性リンパ腫が引き起こされる可

能性が示唆される。したがって、サンプルとして末梢血単核細胞として用いることで、簡便に中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクを判断できるだけでなく、中枢神経原発悪性リンパ腫の早期発見が可能となると考えられる。MYD88のL265Pを中枢神経原発悪性リンパ腫の早期発見に利用する際は、特に、被験体が全身性リンパ腫の既往歴のないこと、特に被験体が現在全身性リンパ腫に罹患していないことが好ましい。全身性リンパ腫に罹患しているか否かは、例えば核磁気共鳴法（MRI）等を利用することにより、当業者であれば容易に判断することができる。

[0056] MYD88遺伝子の突然変異としては、限定するものではないが、上記アミノ酸置換に相当するMYD88遺伝子の置換が挙げられる。例えば、Q133Rに相当する遺伝子置換として、配列番号3の塩基配列の398位のアデニン（a）のグアニン（g）への置換（a398g）が挙げられる。

[0057] <MYD88の突然変異を有する被験体における中枢神経原発悪性リンパ腫の治療用組成物>

後述する実施例で、L265Pを有するリンパ球が最初に末梢血等で生じ、この細胞が中枢神経原発悪性リンパ腫の病因となる可能性が示唆されたことから、MYD88の上記突然変異が末梢血単核細胞において検出された場合、B細胞枯渇剤によってB細胞を枯渇させることで、中枢神経原発悪性リンパ腫の発症を抑制できると考えられる。

[0058] したがって、一態様において、本発明は、MYD88におけるQ133R、G159A、M233T、及び／又はL265Pからなる群より選択される突然変異を原因とするヒト被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫を治療するための、有効成分としてB細胞枯渇剤を含む組成物に関する。また、本発明は、ヒト被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫を治療するための方法であって、B細胞枯渇剤を被験体に投与することを含み、前記中枢神経原発悪性リンパ腫がMYD88におけるQ133R、G159A、M233T、及びL265Pからなる群より選択される突然変異を原因とする、前記方法にも関する。

[0059] 本発明において、B細胞枯渇剤は、B細胞を殺傷しB細胞を部分的又は全体的

に枯渇させ得るものであれば限定するものではないが、特にB細胞を全体的に枯渇させ得る薬剤、例えばリツキシマブ（リツキサン（登録商標））が好ましい。

[0060] 本発明の組成物は、上記有効成分以外に、他の有効成分、特にメトトレキサート等の抗がん剤を含んでもよい。

[0061] MYD88の突然変異を有する被験体における中枢神経原発悪性リンパ腫の治療用組成物は、有効成分以外は上記「GRB2の突然変異を有する被験体における中枢神経原発悪性リンパ腫の治療用組成物」と同様である。したがって、例えば、MYD88の突然変異を有する被験体における中枢神経原発悪性リンパ腫の治療用組成物は、上記項目で述べた補助成分、例えば製薬上許容可能な溶媒、製薬上許容可能な担体、賦形剤、結合剤、崩壊剤、充填剤、乳化剤及び充填剤等を含んでもよい。

[0062] <薬剤の有効性の判定方法>

一態様において、本発明は、ヒト被験体における中枢神経原発悪性リンパ腫に対する薬剤の有効性を判定する方法であって、被験体由来のサンプルから、GRB2及び／又はMYD88の突然変異体又はそれをコードする核酸を検出する工程、並びに前記突然変異が検出された場合に被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫に対する薬剤の有効性が高いと判定する工程を含む、前記方法に関する。GRB2及び／又はMYD88の突然変異体又はそれをコードする核酸、並びにこれらを検出する工程については、上記の通りであるからここでは記載を省略する。

[0063] 本方法により、中枢神経原発悪性リンパ腫に対して高い有効性を有する薬剤を選択又は同定することが可能となる。また、本方法により、薬剤が高い有効性を有する被験体群を選択又は同定することが可能となる。中枢神経原発悪性リンパ腫に対する「薬剤の有効性が高い」とは、薬剤が被験者の中枢神経原発悪性リンパ腫の治療及び／又は予防に対して有効であることを示す。

[0064] 本明細書において、「薬剤」は、特に限定するものではないが、抗がん剤

、例えばMAP2K阻害剤等のMAPK経路におけるGRB2及び／又はその下流のシグナル伝達因子の活性を阻害する薬剤、並びにリツキシマブ等のB細胞枯渇剤が挙げられる。例えば、被験体においてGRB2の突然変異体又はそれをコードする核酸を検出することで、MAPK経路におけるGRB2及び／又はその下流のシグナル伝達因子の活性を阻害する薬剤の有効性を判定することができ、MYD88の突然変異体又はそれをコードする核酸を検出することで、リツキシマブ等のB細胞枯渇剤の薬剤の有効性を判定することができる。MAPK経路におけるGRB2及び／又はその下流のシグナル伝達因子の活性を阻害する薬剤、並びにB細胞枯渇剤については上記の通りであるからここでは記載を省略する。

[0065] <キット>

一態様において、本発明は、ヒト被験体由来のサンプルから、GRB2及び／又はMYD88の突然変異体又はそれをコードする核酸を検出するための手段を含む、被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクを判定するためのキットに関する。

[0066] 本発明のキットは、必須の構成成分としてGRB2及び／又はMYD88の突然変異体又はそれをコードする核酸を検出するための手段を含む。本発明のキットは、上記手段に加えて、バッファー、酵素、及び使用説明書等を含んでもよい。

[0067] GRB2及び／又はMYD88の突然変異体又はそれをコードする核酸を検出するための手段は、上記タンパク質の突然変異体又はそれをコードする遺伝子を検出できるものであれば特に限定しない。タンパク質の突然変異を検出するための手段としては、例えばアミノ酸変異を認識し得る抗体が挙げられ、遺伝子の突然変異を検出するための手段としては、例えば遺伝子突然変異を検出し得るプライマーセットが挙げられる。

## 実施例

[0068] <実施例1 PCNSLを有する被験体における突然変異の検出>

中枢神経原発悪性リンパ腫に罹患した44人の被験体からインフォームドコンセントを得て、外科的に切除した脳リンパ腫組織及び末梢血単核細胞を採

取した。ゲノムDNAを各サンプルから抽出し、Genome Biology 12:R94, 2011に記載された手順に従ってSureSelect Human All Exon Kit (Agilent) を用いてエキソン配列の濃縮を行い、HiSeq2000 (Illumina) 次世代シーケンサー (NGS) により遺伝子配列の解析を行った。具体的な方法は、キットに添付のプロトコル及びシーケンサーの説明書に従った。その結果、リンパ腫組織において高頻度に検出される突然変異として、GRB2において、6人の被験体で図1に示す7種 (L17R、S96P、V140G、L148R、Q153\*、A163T、及びV213G) の突然変異を同定した。これら突然変異はGDB遺伝子上の6つのミスセンス突然変異と1つのナンセンス突然変異に基づく。またMYD88において、32人の被験体で図5に示す4種 (Q133R、G159A、M233T、及びL265P) の突然変異を同定した。これらの突然変異は、MYD88遺伝子における4つのミスセンス突然変異に基づく。

[0069] <実施例2 GRB2突然変異の機能研究>

方法

1) 発現ベクター及びウイルスの作成

Glioblastoma cell line LN-18細胞株 (American Type Culture Collection: ATCC) 由来のcDNAを鋳型として、センスプライマー: aggaggtattgctgcttcggc (配列番号69) 及びアンチセンスプライマー: caaccaaagtgagagggtcac (配列番号70) を用いてPCRにより野生型のGRB2 (NM\_002086) 遺伝子 (35番目の塩基から1155番目の塩基まで) を増幅した。増幅配列をpT7Blue-2 T-Vector (Novagen) に挿入した後、キャピラリーシーケンサー (Life Technologies) を用いて配列を確認した。その後、BamHIとNotI (ともにNew England Biolabs) を用いてGRB2遺伝子配列を取り出し、pMXSレトロウイルスベクターに組み込んだ。このレトロウイルスベクターを鋳型としてセンス鎖にEcoRI制限酵素サイト、アンチセンス鎖にXhoI制限酵素サイトを付加するプライマー (センスプライマー: TTTGAATTCgaagccatcgccaaatgatgac (配列番号71)、アンチセンスプライマー: TTTCTCGAGcaaccaaagtgagagggtcac (配列番号72) を用いてPCRを行って野生型GRB2遺伝子の361番目の塩基から1155番目の塩基までを

増幅し、制限酵素EcoRIとXhoI（ともにNew England Biolabs）で処理後、pcDNA3-N-FLAGベクターに組み込んだ。pcDNA3-N-FLAGベクターはpcDNA3（Addgene）のBamHIとEcoRI制限酵素サイト間にTTTCTCGAGcaaccaaagtgagagggtcac（配列番号73）（大文字はFLAG配列を表す）を組み込むことにより作成した。

[0070] 各変異型のGRB2遺伝子を含むpMXSレトロウイルスベクター及びpcDNA3-N-FLAGベクターは、野生型GRB2遺伝子を組み込んだ上記pMXSレトロウイルスベクター又は上記pcDNA3-N-FLAGベクターをそれぞれ鋳型とし、QuickChange部位特異的突然変異誘発キット（Agilent Technologies）により製造業者のインストラクションに従って作成し、キャピラリーシーケンスにより塩基配列を確認した。使用したプライマーを以下に示す（S；センスプライマー、AS；アンチセンスプライマー）。

L17R: S; ccccttttgaagctccgctcgtcgtctgcag（配列番号74）, AS; ctgcagacgacgagcggagcttcaaaagggg（配列番号75）

S96P: S; ctctggggacttccccctctctgtcaag（配列番号76）, AS; cttgacagagagggggaagtccccaggag（配列番号77）

V140G: S; tcacagatctacatctggctccagaaaccagcaga（配列番号78）, AS; tctgctggtttctggagccagatgtagatctgtga（配列番号79）

L148R: S; gaaaccagcagatattccggcgggacatagaacag（配列番号80）, AS; ctgttctatgtcccgccgaatatctgctggtttc（配列番号81）

Q153\*: S; attcctgcgggacatagaataggtgccacagc（配列番号82）, gctgtggcaccatttctatgtcccgcaggaat（配列番号83）

A163T: S; gccgacatacgtccagaccctctttgactttga（配列番号84）, AS; tcaaagtcaaagaggggtctggacgtatgtcggc（配列番号85）

V213G: S; caattatgtcacccccgggaaccggaacgtctaag（配列番号86）, AS; cttagacgttccggttcccgggggtgacataattg（配列番号87）

[0071] 組換えレトロウイルスの作成は、以下の手順に従って行った。pGP、pE-ecoパッケージングプラスミド（いずれもTakara Bio）、及び上記の通り作成した野生型または変異型のGRB2遺伝子を組み込んだpMXSレトロウイルスベクター

— (Cell Biolabs) を、リポフェクタミン (Life Technologies) により293T細胞 (ATCC) にトランスフェクションした。48時間後、レトロウイルスを含む上清を回収した。

[0072] 2) 細胞増殖アッセイ

6ウェルプレート (Falcon) に $1 \times 10^5$ 細胞でマウス3T3細胞を播種し、その翌日、培地を、上記1) に従って回収したレトロウイルスを含んでいる上清600  $\mu$ Lと交換した。4時間後、1.4mLの10%ウシ胎児血清を補充したDMEM-F12培地 (いずれもInvitrogen) を加えて総量2mLとし、2日間培養した。その後、培地を5%ウシ胎児血清を補充したDMEM-F12培地に交換し、3日ごとに培地を交換しながら12日間培養した後に、光学顕微鏡により細胞を観察した。

[0073] 3) 免疫ブロット

上記1) に従って作成した、アミノ末端にFLAGエピトープタグをつけた野生型又は変異型のGRB2遺伝子を組み込んだpcDNA3ベクターを、Neon Transfection System (Life Technologies) を用いて、製造業者のインストラクションに従ってマウス3T3線維芽細胞にトランスフェクションした。細胞を、Active Ras pull-down and detection kit (Thermo Scientific) に添付のLysis/Binding/Wash Bufferを用いて、製造業者のインストラクションに従って可溶化した後、GTP結合型の活性化RASをActive Ras pull-down and detection kit (Thermo Scientific) を用いて純化した。具体的な方法は、キットに添付のプロトコルに従った。さらにそれを、汎RAS抗体を用いて免疫ブロッティングした。同じ細胞から得た細胞可溶画分 (total cell lysate: TCL) をSDS-PAGEにより (抗RAS抗体及び抗FLAG抗体使用時は13%ゲル、その他の抗体を使用する場合は10%ゲルを用いて) 泳動した後、RAS、リン酸化MAP2K1/2、MAP2K1/2、リン酸化ERK、ERK、 $\beta$ アクチン及びFLAGタグそれぞれに対する抗体で免疫ブロッティングした。免疫ブロッティングの基本的な方法は、Green, M.R. and Sambrook, J., 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Fourth Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkに記載の方法に従った。



[0074] 一次抗体として、抗IKKB抗体にはsc-8014、抗LMNB1/2抗体にはsc-6216（いずれもSanta Cruz Biotechnology）、抗MAP2K1/2抗体には#4694、抗リン酸化MAP2K1/2抗体には#9154、抗ERK1/2抗体には#4695、抗リン酸化ERK1/2抗体には#4370、抗AKT抗体には#4691、抗リン酸化AKT抗体には#4060、抗NFKBIA抗体には#9242、抗リン酸化NFKBIA抗体には#9246、抗RELA抗体には#8242、抗リン酸化RELA抗体には#3036、抗RPS6抗体には#2217、抗リン酸化RPS6抗体には#4858、及び抗ACTB抗体には#4970（全てCell Signaling Technology）、抗FLAG抗体にはM2（Sigma-Aldrich）を用いた。

[0075] マウス抗体に対する二次抗体として#7076、ウサギ抗体に対する二次抗体として#7074（いずれもCell Signaling Technology）を用いた。

[0076] 4) MAP2K阻害剤の効果確認試験

6ウェルプレート（Falcon）に $1 \times 10^5$ 細胞でマウス3T3細胞を播種し、その翌日、培地を、上記1）に従って回収した野生型GRB2又はGRB2（V140G）変異体をコードする遺伝子を含むレトロウイルスを含んでいる上清600  $\mu$ Lと交換した。4時間後、1.4mLの10%ウシ胎児血清を補充したDMEM-F12培地（いずれもInvitrogen）を加えて総量2mLとし、2日間培養した。その後、MAP2K1/2の阻害剤であるトラメチニブ（Selleck Chemicals）0.1nM、1nM、若しくは10nM、セルメチニブ（Selleck Chemicals）1nM、10nM、及若しくは100nM、又は前記阻害剤の溶剤で対照用のジメチルスルホキシド（DMSO）ビヒクルを加えた、5%ウシ胎児血清を補充したDMEM-F12培地に交換し、3日ごとに培地を交換しながら12日間培養した。その後、細胞をギムザ液で染色し、細胞数を評価した。培地の色が濃いほど、細胞が過剰に増殖したことを表す。

[0077] 結果と考察

3T3細胞形質転換アッセイでは、上記アミノ酸突然変異のうち、V140G及びL148Rの2つが、顕著な増殖活性（発がん活性）に寄与しており、またL17R及びA163Tも増殖活性（発がん活性）に寄与していた（図2）。

[0078] さらに、GRB2の下流のシグナル分子の活性化状態では、S96PやV140G変異体でもGTP結合型RASの増加が認められた（図3、「GTP-RAS」のレーン）。また

、L148R及びV213G変異体はMAP2K及びERK1/2の強いリン酸化を誘導し、他の突然変異体も同様の効果を有していた（図3）。

[0079] GRB2突然変異によってRAS-ERK経路が活性化されたことから、MAP2K1/2活性の阻害が治療効果を奏するかどうかを調べた。その結果、GRB2変異体（V140G）による3T3細胞の過剰な増殖は、MAP2K1/2阻害剤であるトラメチニブ（0.1nM~10nM）及びセルメチニブ（1nM~100nM）によって、濃度依存的に抑制された（図4）。

[0080] <実施例3 MYD88突然変異の末梢血における検出>

体細胞変異を見出すアルゴリズムであるMuTectアルゴリズム（詳細は、Cibulskis, K. et al, 2013, Nat. Biotechnol. 31, pp.213-219を参照されたい）によって、上記の通り32人（72.7%）のPCNSL患者が体細胞変異陽性であり、そのうちL265Pの置換が31人において検出される最も高頻度に検出される置換であることを見出した（図5）。MYD88遺伝子突然変異陰性の被験体について、データを精査したところ、さらに4人の患者において突然変異が見出され、その全てをサンガーシーケンス法により確かめた。その結果、PCNSLにおけるMYD88遺伝子の突然変異の頻度は81.8%に達した。

[0081] 腫瘍生検においてMYD88遺伝子突然変異（L265P）陽性であった被験体5人において、MYD88遺伝子突然変異（L265P）に対応するNGSデータは、末梢血単核細胞（PBMNC）においても同様に検出された。より正確に遺伝子変異の頻度を確かめるため、腫瘍組織においてMYD88遺伝子突然変異（L265P）が検出された被験体のPBMNCに関して、MYD88突然変異（L265P）及び野生型のMYD88をコードするDNAの量を、デジタルPCRによって調べた。すなわち、（各サンプルにつき25ngの）ゲノムDNAをQX200システム（Bio-Rad）に供し、PCRを行った。用いたプライマーを以下の表1に示す。

[0082]

[表1]

遺伝子	point mutation	forward primer	reverse primer	配列番号	配列番号
MYD88	点突然変異検出用	5'-CCTTGGCTTGCAGGT-3'	5'-TCITTCCTTTCATTGCCTTGT-3'	37	38
		5'-TGGGGATCAGTCGCTT-3'	5'-TGGGGATCGGTGCG-3'	39	40
MTMR8	点突然変異検出用	5'-CGGAGGGTCAGGGG-3'	5'-TCCATCACATTGCCACT-3'	41	42
		5'-AAGTTACCCATCACTAGCC-3'	5'-TCACGAGCCTGGGT-3'	43	44
COL4A6	点突然変異検出用	5'-TCGGTGTCTAGGTATG-3'	5'-GAGGTGAGACAAGGAGAG-3'	45	46
		5'-TGGGATTCCTGACTGAACA-3'	5'-TGGGATTCCTGACTTAACATC-3'	47	48
BEND2	点突然変異検出用	5'-AACATTTTGCAGTGTGA-3'	5'-CTGAAGGATAGTTTCACTG-3'	49	50
		5'-ACAAGAAATCTCAACCATGTT-3'	5'-ACAAGAAATCTCAAGCATGTT-3'	51	52
OGT	点突然変異検出用	5'-TGGTCAGAGAAGGAATAATG-3'	5'-ATAACATGCCTTAGGAGGG-3'	53	54
		5'-AAGGGAAAAAAGATTGGG-3'	5'-AAAGGGGAAAAAAGATTGG-3'	55	56
ARSE	点突然変異検出用	5'-GCCAATGTCCCAATG-3'	5'-TTTCGGCCTCCCGA-3'	57	58
		5'-TCGTCCGGCATCAGA-3'	5'-AGGTCGTCACCATCA-3'	59	60
TBC1D8B	点突然変異検出用	5'-AGGATTGATATTAAGGTAATTAAC-3'	5'-ATGTTAAGCAACCAGTCTTA-3'	61	62
		5'-ATAAAAAGTTATTTCACTAGGGAA-3'	5'-ACAATAAAAAATTTATTCATCTAGGG-3'	63	64
CCR9	点突然変異検出用	5'-GAGAGCACCAACTGAAG-3'	5'-CCACGGAAGGGAAGGAA-3'	65	66
		5'-TGACCCCTGAAGGTCATTC-3'	5'-TGACCCCTGAAGTTCATTC-3'	67	68

[0083] デジタルPCRの結果、上記5人の被験体に加えて、さらに7人の被験体のPBMCにおいて、MYD88遺伝子突然変異（L265P）が検出された。12人の被験体においてMYD88遺伝子突然変異（L265P）がPBMCで検出されたことは、この遺伝子変異を有するB細胞が末梢血においてクローン増殖していることを示唆している。

[0084] さらにこの遺伝子変異を評価するために、MYD88遺伝子突然変異（L265P）、及び腫瘍において高頻度で突然変異が検出された遺伝子を、デジタルPCR分析によって三連で試験し、MYD88遺伝子の突然変異の出現頻度の平均値を求めた。その結果を表2に示す。

[0085]

[表2]

PBMNCのデジタルPCR分析		NGSデータ				デジタルPCRデータ				
被験体	遺伝子	位置	ヌクレオチド置換	腫瘍		PBMNC		PBMNCにおける変異頻度 (%) (平均 ± s.d.)		
				総数	変異体数	変異頻度 (%)	変異体数		変異頻度 (%)	
#2	MYD88	3:38,182,641	T>C	347	228	65.7	172	4	2.3	1.39 ± 0.26
	MTMR8	X:63,576,174	A>C	268	216	80.6	68	0	0.0	0.02 ± 0.03
	MYD88	3:38,182,641	T>C	370	122	33.0	228	0	0.0	0.20 ± 0.12
#4	COL4A6	X:107,423,920	C>A	120	111	92.5	42	0	0.0	0.00 ± 0.00
	BEND2	X:18,209,292	C>G	49	41	83.7	23	0	0.0	0.00 ± 0.00
	MYD88	3:38,182,641	T>C	340	184	54.1	157	1	0.6	0.13 ± 0.04
#14	OGT	X:70,767,686	T>C	85	58	68.2	45	0	0.0	0.00 ± 0.00
	ARSE	X:2,876,366	G>A	84	57	67.9	60	0	0.0	0.00 ± 0.00
	MYD88	3:38,182,641	T>C	447	147	32.9	196	4	2.0	1.50 ± 0.19
#20	TBC1D8B	X:106,065,558	G>A	48	23	47.9	26	0	0.0	0.00 ± 0.00
	CCR9	3:45,942,935	G>T	500	180	36.0	258	0	0.0	0.00 ± 0.00

[0086] MYD88遺伝子突然変異（L265P）がPBMNCで検出されたにもかかわらず、腫瘍ではMYD88遺伝子突然変異（L265P）よりも高頻度で検出された遺伝子変異（例えば、MTMR8、COL4A6、及びBEND2等）がPBMNCでは、全く検出されなかった。これは、MYD88遺伝子突然変異（L265P）陽性のB細胞が中枢神経から全身循環へ浸潤してきたものではなく、MYD88遺伝子突然変異陽性の「前リンパ腫」細胞は、中枢神経系外部で発生し、その後、末梢血及びリンパ管に循環することを示唆している。これらの細胞は、その後、中枢神経に侵入し、増殖に有利な遺伝的及びエピジェネティックな突然変異をさらに蓄積すると考えられる。

### 産業上の利用可能性

[0087] 本発明により、簡便に中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクを判定することが可能になる。また、本発明により、中枢神経原発悪性リンパ腫を効果的に治療するための組成物を提供することが可能になる。

### 配列表フリーテキスト

[0088] 配列番号37～87：プライマー

[0089] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

## 請求の範囲

- [請求項1] ヒト被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクを判定する方法であって、
- 被験体由来のサンプルから、配列番号2及び／又は配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質の突然変異体又はそれをコードする核酸を検出する工程、並びに
- 前記突然変異体又はそれをコードする核酸が検出された場合に被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクが高いと判定する工程を含む、前記方法。
- [請求項2] 前記突然変異体が、恒常活性型突然変異体である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記突然変異体が、配列番号2において開始メチオニンを1位としたときに、17位のロイシンのアルギニンへの置換（L17R）、96位のセリンのプロリンへの置換（S96P）、140位のバリンのグリシンへの置換（V140G）、148位のロイシンのアルギニンへの置換（L148R）、153位のグルタミンの終止コドンへの置換（Q153\*）、163位のアラニンのトレオニンへの置換（A163T）、及び213位のバリンのグリシンへの置換（V213G）からなる群から選択される少なくとも1つの置換を有する、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 前記突然変異体が、L17R、V140G、L148R、及びA163Tからなる群から選択される少なくとも1つの置換を有する、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] ヒト被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫を治療するための組成物であって、MAPK経路における配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質及び／又はその下流のシグナル伝達因子の活性阻害剤を含み、前記中枢神経原発悪性リンパ腫が配列番号2のアミノ酸配列におけるL17R、S96P、V140G、L148R、Q153\*、A163T、及びV213Gからなる群から選択される少なくとも1つの置換を原因とする、前記組成物。

- [請求項6] 前記活性阻害剤が、低分子化合物又はアプタマーである、請求項5に記載の組成物。
- [請求項7] 前記シグナル伝達因子が、Sos、Ras、Raf、MAP2K、及びERKからなる群から選択される、請求項5又は6に記載の組成物。
- [請求項8] 前記シグナル伝達因子が、MAP2Kである、請求項7に記載の組成物。
- [請求項9] 前記活性阻害剤が、トラメチニブ (GSK1120212)、ピマセルチブ (AST03026)、セルメチニブ (AZD6244)、PD-0325901、レファメチニブ (REDA119)、TAK733、MEK162、R05126766、WX-544、R04987655、GDC-0973、AZD8330、コビメチニブ、又はCI-1040である、請求項8に記載の組成物。
- [請求項10] 前記突然変異体が、配列番号4において開始メチオニンを1位としたときに、133位のグルタミンのアルギニンへの置換 (Q133R)、159位のグリシンのアラニンへの置換 (G159A)、233位のメチオニンのトレオニンへの置換 (M233T)、及び265位のロイシンのプロリンへの置換 (L265P) からなる群から選択される少なくとも1つの置換を有する、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項11] 前記突然変異体が、配列番号4におけるL265Pを有する、請求項10に記載の方法。
- [請求項12] サンプルが末梢血単核細胞である請求項10又は11に記載の方法。
- [請求項13] 被験体が全身性リンパ腫の既往歴のない、請求項10～12のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項14] ヒト被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫を治療するための組成物であって、リツキシマブを含み、前記中枢神経原発悪性リンパ腫が配列番号4のアミノ酸配列におけるQ133R、G159A、M233T、及びL265Pからなる群から選択される少なくとも1つの置換を原因とする、前記組成物。



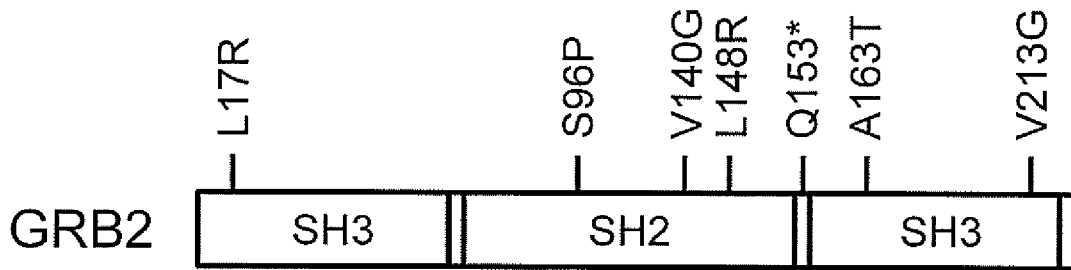
[請求項15] ヒト被験体由来のサンプルから、配列番号2及び／又は配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質の突然変異体又はそれをコードする核酸を検出するための手段を含む、被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫の発症リスクを判定するためのキット。

[請求項16] ヒト被験体における中枢神経原発悪性リンパ腫に対する薬剤の有効性を判定する方法であって、

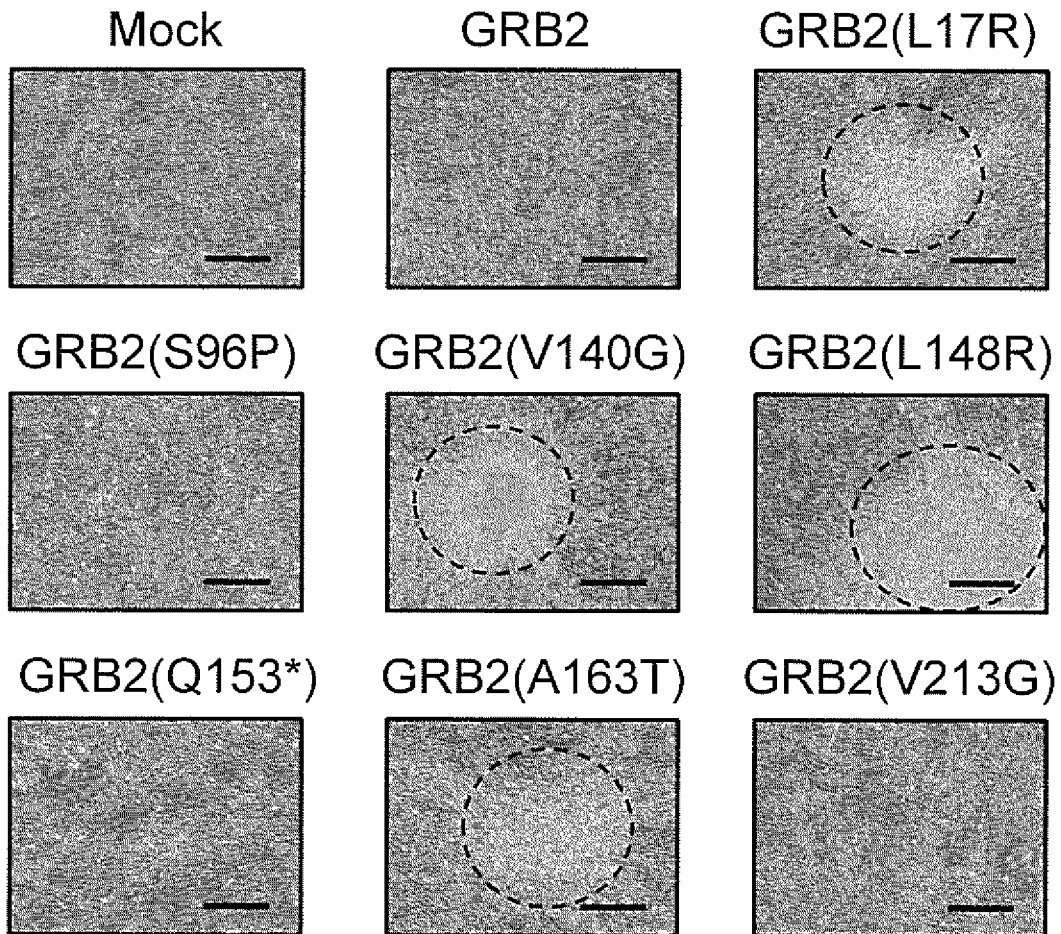
被験体由来のサンプルから、配列番号2及び／又は配列番号4のアミノ酸配列からなるタンパク質の突然変異体又はそれをコードする核酸を検出する工程、並びに

前記突然変異体又はそれをコードする核酸が検出された場合に被験体の中枢神経原発悪性リンパ腫に対する薬剤の有効性が高いと判定する工程を含む、前記方法。

[図1]

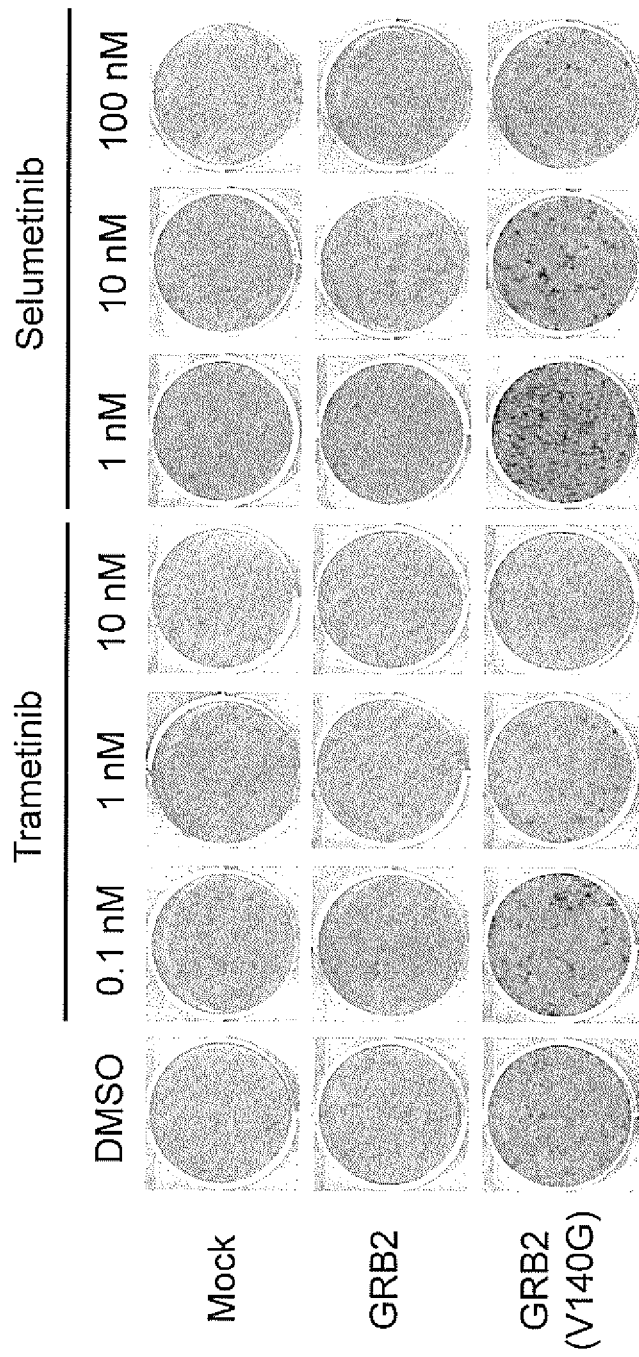


[図2]

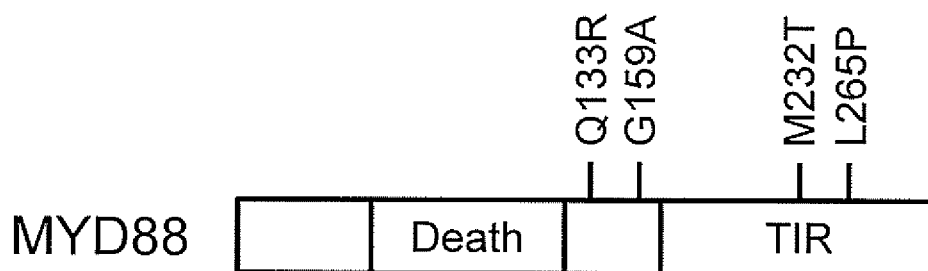




[図4]



[図5]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/085435

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <i>C12Q1/68(2006.01)i, A61K31/4184(2006.01)i, A61K31/519(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)n,</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C12Q1/68, A61K31/4184, A61K31/519, A61K31/7088, A61K45/00, A61P35/00, G01N33/50, G01N33/68, C07K14/47, C12N15/09</i>		
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 1996-2016          Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016</i>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),          CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)</i>		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	BRAGGIO E., et al., The Genomic Landscape of Primary Central Nervous System Lymphoma, Hematol Oncol, 2013, Vol.31 (Suppl.1), P.153, 168, ISSN 0278-0232, particularly, lines 1 to 15	1, 2, 10-13, 15, 16/14/3, 4
X/Y/A	Taishi NAKAMURA et al., "Chusu Shinkeikei Genpatsu Akusei Rinpa-shu wa CD79B to MYD88 ni Okeru Idenshi Hen'i o sono Tokucho to suru", The Japan Society for Neuro-Oncology Program · Shorokushu, 2014.11, vol.32, page 145, O-36, particularly, lines 3 to 11	1, 2, 10-13, 15, 16/14/3, 4
<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 24 February 2016 (24.02.16)		Date of mailing of the international search report 08 March 2016 (08.03.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2015/085435

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GAUDIO E., et al., The MEK-inhibitor pimasertib in B-cell lymphomas: Evaluation of the pre-clinical activity as single agent or in combination and identification of biomarkers of response., Proceedings of the American Association for Cancer Research, 2014.04, Part1, Vol.55, p.176, #739, ISSN 0197-016X	5-9
Y	Koji IZUTSU, "Rituximab - B Saibo Lymph-shu Chiryō ni Motarashita Impact", separate volume Journal of Clinical and Experimental Medicine Zoketsuki Shuyo no Bunshi Hyoteki Ryoho, 25 January 2008 (25.01.2008), first edition, pages 29 to 35, particularly, page 30	14

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2015/085435

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
(International Patent Classification (IPC))

C12N15/09(2006.01)n

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, A61K31/4184(2006.01)i, A61K31/519(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n</p>															
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12Q1/68, A61K31/4184, A61K31/519, A61K31/7088, A61K45/00, A61P35/00, G01N33/50, G01N33/68, C07K14/47, C12N15/09</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>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016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	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2016年														
日本国実用新案登録公報	1996-2016年														
日本国登録実用新案公報	1994-2016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>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)</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 colspan="2">関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X/Y/A</td> <td>BRAGGIO E., et al., The Genomic Landscape of Primary Central Nervous System Lymphoma, Hematol Oncol, 2013, Vol. 31 (Suppl. 1), P. 153, 168, ISSN 0278-0232, 特に、第1行~第15行</td> <td>1, 2, 10-13, 15, 16/14 /3, 4</td> <td></td> </tr> <tr> <td>X/Y/A</td> <td>中村 大志 他, 中枢神経系原発悪性リンパ腫は CD79B と MYD88 に おける遺伝子変異をその特徴とする, 日本脳腫瘍学会プログラム・ 抄録集, 2014. 11, Vol. 32, p. 145, 0-36, 特に、第3行~第11行</td> <td>1, 2, 10-13, 15, 16/14 /3, 4</td> <td></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 請求項の番号		X/Y/A	BRAGGIO E., et al., The Genomic Landscape of Primary Central Nervous System Lymphoma, Hematol Oncol, 2013, Vol. 31 (Suppl. 1), P. 153, 168, ISSN 0278-0232, 特に、第1行~第15行	1, 2, 10-13, 15, 16/14 /3, 4		X/Y/A	中村 大志 他, 中枢神経系原発悪性リンパ腫は CD79B と MYD88 に おける遺伝子変異をその特徴とする, 日本脳腫瘍学会プログラム・ 抄録集, 2014. 11, Vol. 32, p. 145, 0-36, 特に、第3行~第11行	1, 2, 10-13, 15, 16/14 /3, 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 請求項の番号													
X/Y/A	BRAGGIO E., et al., The Genomic Landscape of Primary Central Nervous System Lymphoma, Hematol Oncol, 2013, Vol. 31 (Suppl. 1), P. 153, 168, ISSN 0278-0232, 特に、第1行~第15行	1, 2, 10-13, 15, 16/14 /3, 4													
X/Y/A	中村 大志 他, 中枢神経系原発悪性リンパ腫は CD79B と MYD88 に おける遺伝子変異をその特徴とする, 日本脳腫瘍学会プログラム・ 抄録集, 2014. 11, Vol. 32, p. 145, 0-36, 特に、第3行~第11行	1, 2, 10-13, 15, 16/14 /3, 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>「&amp;」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</p> <p>24.02.2016</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p>08.03.2016</p>													
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p>郵便番号 100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<table border="1"> <tr> <td>特許庁審査官 (権限のある職員)</td> <td>4 B</td> <td>3 6 4 6</td> </tr> <tr> <td>吉岡 沙織</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>電話番号 03-3581-1101 内線</td> <td colspan="2">3 4 4 8</td> </tr> </table>		特許庁審査官 (権限のある職員)	4 B	3 6 4 6	吉岡 沙織			電話番号 03-3581-1101 内線	3 4 4 8				
特許庁審査官 (権限のある職員)	4 B	3 6 4 6													
吉岡 沙織															
電話番号 03-3581-1101 内線	3 4 4 8														



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 請求項の番号
X	GAUDIO E., et al., The MEK-inhibitor pimasertib in B-cell lymphomas: Evaluation of the pre-clinical activity as single agent or in combination and identification of biomarkers of response., Proceedings of the American Association for Cancer Research, 2014.04, Part1, Vol.55, p.176, #739, ISSN 0197-016X	5-9
Y	伊豆津 宏二, リツキシマブーB細胞リンパ腫治療にもたらしたインパクト, 別冊・医学のあゆみ 造血器腫瘍の分子標的療法, 2008.01.25, 第1版, p.29-35, 特に、p.30	14