

(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
2014 年 3 月 27 日(27.03.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/046199 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/075336
- (22) 国際出願日: 2013 年 9 月 19 日(19.09.2013)
- (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 2012-205767 2012 年 9 月 19 日(19.09.2012) JP
- (71) 出願人 (コモロ, サウジアラビア, 米国を除く全ての指定国について): シスメックス株式会社 (SYSMEX CORPORATION) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 Hyogo (JP). 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).
- (72) 発明者; および
- (71) 出願人 (米国についてのみ): 酒井 綾子 (SAKAI, Ayako) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP). 永江 玄太 (NAGAE, Genta) [JP/JP]; 〒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). 梶田 昌裕 (KAJITA, Masahiro) [JP/JP]; 〒3700033 群馬県高崎市中大類町 60 学校法人高崎健康福祉大学内 Gunma (JP). 油谷 浩幸 (ABURATANI, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒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).
- (74) 代理人: 野河 信太郎, 外 (NOGAWA, Shintaro et al.); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満 5 丁目 1 6-3 西天満ファイビル 野河特許事務所 Osaka (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, 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, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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))

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING INFORMATION ABOUT BRAIN TUMOR AND MARKER AND KIT FOR OBTAINING INFORMATION ABOUT BRAIN TUMOR

(54) 発明の名称: 脳腫瘍に関する情報の取得方法、ならびに脳腫瘍に関する情報を取得するためのマーカーおよびキット

(57) Abstract: The present invention provides a method in which the methylation state of a CpG site in a promoter region of at least one gene selected from among CREM, VRK2, and MYL12A in DNA extracted from a biosample from a subject is analyzed and information about a brain tumor in said subject is obtained on the basis of the result of that analysis.

(57) 要約: 本発明は、被験者の生体試料から抽出した DNA に含まれる CREM、VRK2 および MYL12A から選択される少なくとも 1 つの遺伝子のプロモータ領域に存在する CpG 部位のメチル化の状態を解析し、その解析結果に基づいて被験者の脳腫瘍に関する情報を取得する方法を提供することにより、上記の課題を解決する。



WO 2014/046199 A1

明 細 書

発明の名称：

脳腫瘍に関する情報の取得方法、ならびに脳腫瘍に関する情報を取得するためのマーカーおよびキット

技術分野

[0001] 本発明は、被験者の脳腫瘍に関する情報の取得方法に関する。また、本発明は、その方法に用いられるマーカーおよびキットに関する。

背景技術

[0002] 脳腫瘍は、頭蓋内に発生する腫瘍の総称であり、脳およびその周辺組織から発生する原発性脳腫瘍と、別の臓器の癌が転移してきた転移性脳腫瘍とに分類される。原発性脳腫瘍には、悪性腫瘍および良性腫瘍を含めて様々な種類があるが、それらの中でも、悪性腫瘍である神経膠腫（グリオーマともいう）は脳腫瘍全体の約30%と高い発症頻度を示す。

[0003] 脳腫瘍の検査では、主にCTやMRIによる画像検査が行われている。また、血液中の腫瘍マーカーの検査としてAFP（ α -fetoprotein）およびHCG（human chorionic gonadotropin）の測定も行われている。しかし、これらの腫瘍マーカーの検査は、脳腫瘍が胚細胞腫である場合にしか適用されない。現時点では、胚細胞腫以外の脳腫瘍に有用な腫瘍マーカーは見出されておらず、脳腫瘍の簡便な検査法は確立されていない。

[0004] 他方で、近年、新たな癌の診断方法として、遺伝子情報に基づく方法が研究されている。そのような方法としては、例えば、DNAのメチル化に関する情報に基づく方法が挙げられる。この方法では、所定の遺伝子の塩基配列中のCpG部位（5'-(CG)-3'）をマーカーとして用いる。そして、該マーカーのメチル化状態の解析結果に基づいて癌細胞の存否などの情報を取得し、これを指標にして癌の診断が行われる。

[0005] 脳腫瘍においても、DNAのメチル化解析を利用した腫瘍の判定方法の研究・開発が行なわれている。例えば、Bello M.J.らの文献には、p16（「CDKN2A」

とも呼ばれる)などの遺伝子が正常な脳の試料ではメチル化されていないが、グリオーマの生検試料では高度にメチル化されていることが開示されている(非特許文献1参照)。また、Gomori E.らの文献には、DNMT1、MGMTおよびEGFRの3つの遺伝子がグリオーマにおいて高度にメチル化されていることが開示されている(非特許文献2参照)。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1: Bello M.J.ら、Cancer Therapy. vol. 2, p. 187-194 (2004)

非特許文献2: Gomori E.ら、Diagnostic Pathology. vol. 7: no. 8 (2012)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 上述のように、脳腫瘍(特にグリオーマ)において異常メチル化を示す遺伝子がいくつか報告されているが、それらの遺伝子の中には、脳腫瘍とは異なる種類の腫瘍においてもある程度メチル化されている遺伝子が含まれている。しかし、脳腫瘍を含む複数の種類の腫瘍においてメチル化されている遺伝子をマーカーとして用いてメチル化解析を行った場合、解析結果から得られた情報には、脳腫瘍に関する情報のみならず、他の種類の腫瘍に関する情報も含まれる可能性がある。例えば、解析結果に基づいて試料中に腫瘍細胞が存在するという情報を得たとしても、その腫瘍細胞が脳腫瘍に由来するのか、または、他の種類の腫瘍に由来するのかを判別することは困難である。

[0008] このように、マーカーのメチル化解析により脳腫瘍に関する情報を取得するためには、該マーカーの脳腫瘍への特異性が非常に重要な要素となる。それゆえ、脳腫瘍に由来する腫瘍細胞を特異的に検出することを可能にするような、脳腫瘍に特異的な新規マーカーの開発が望まれている。

[0009] そこで、本発明は、そのような新規マーカーを同定し、そのマーカーについてメチル化の状態を解析することにより、脳腫瘍に関する情報の取得方法を提供することを目的とする。また、本発明は、その方法に好適に用いられ

るキット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

[0010] 本発明者らは、脳腫瘍の癌部組織から得たDNAに特異的にメチル化が認められる遺伝子領域を、新規マーカーとして同定した。そして、本発明者らは、これらのマーカーについてメチル化状態を解析して得られた結果に基づいて、脳腫瘍に由来する腫瘍細胞と、その他の細胞（正常組織の細胞、および、脳腫瘍とは異なる種類の腫瘍に由来する腫瘍細胞）とを明確に区別できることを見出して、本発明を完成した。

[0011] すなわち、本発明によれば、

被験者から採取した生体試料からDNA試料を調製する工程と、

調製工程で得られたDNA試料に含まれるCREM (cAMP responsive element modulator)、VRK2 (Vaccinia related kinase 2) およびMYL12A (Myosin, light chain 12A, regulatory, non-sarcomeric) から選択される少なくとも1つの遺伝子のプロモータ領域に存在するCpG部位のメチル化の状態を解析する工程と、

解析工程で得られた解析結果に基づいて、上記の被験者の脳腫瘍に関する情報を取得する工程と

を含む、脳腫瘍に関する情報の取得方法が提供される。

[0012] また、本発明によれば、CREM、VRK2およびMYL12Aの各遺伝子のプロモータ領域に存在するCpG部位から選択される少なくとも1つである、メチル化解析により脳腫瘍に関する情報を取得するためのマーカーが提供される。

さらに、本発明によれば、CREM、VRK2およびMYL12Aの各遺伝子のプロモータ領域に存在するCpG部位から選択される少なくとも1つのメチル化の状態を解析するためのプライマーセットを含む、脳腫瘍に関する情報を取得するためのキットが提供される。

発明の効果

[0013] 本発明は、脳腫瘍に関する情報の取得を可能にする新規マーカーを提供することができる。また、本発明は、そのようなマーカーについてメチル化の

状態を解析することにより、被験者の脳腫瘍に関する情報を取得するための方法およびキットを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1A]脳腫瘍の癌部組織および正常脳組織のメチル化データから算出した、CREM遺伝子のプロモータ領域のメチル化陽性率を示すグラフである。

[図1B]脳腫瘍の癌部組織および正常脳組織のメチル化データから算出した、VRK2遺伝子のプロモータ領域のメチル化陽性率を示すグラフである。

[図1C]脳腫瘍の癌部組織および正常脳組織のメチル化データから算出した、MYL12A遺伝子のプロモータ領域のメチル化陽性率を示すグラフである。

[図2A]種々の臨床検体のメチル化データから算出した、CREM遺伝子のプロモータ領域のメチル化陽性率を示すグラフである。

[図2B]種々の臨床検体のメチル化データから算出した、VRK2遺伝子のプロモータ領域のメチル化陽性率を示すグラフである。

[図2C]種々の臨床検体のメチル化データから算出した、MYL12A遺伝子のプロモータ領域のメチル化陽性率を示すグラフである。

[図3A]種々の臨床検体のメチル化データから算出した、既知のマーカー遺伝子MGMTのプロモータ領域のメチル化陽性率を示すグラフである。

[図3B]種々の臨床検体のメチル化データから算出した、既知のマーカー遺伝子CDKN2Aのプロモータ領域のメチル化陽性率を示すグラフである。

[図4A]正常脳組織および脳腫瘍の癌部組織から抽出したDNAにおけるCREM遺伝子のプロモータ領域のメチル化スコアを示すグラフである。

[図4B]正常脳組織および脳腫瘍の癌部組織から抽出したDNAにおけるVRK2遺伝子のプロモータ領域のメチル化スコアを示すグラフである。

[図4C]正常脳組織および脳腫瘍の癌部組織から抽出したDNAにおけるMYL12A遺伝子のプロモータ領域のメチル化スコアを示すグラフである。

[図5]正常脳組織および脳腫瘍の癌部組織から抽出したDNAを、CREM、VRK2およびMYL12Aの各プライマーセットを用いてメチル化特異的PCR（MSP）法により増幅した結果を示す写真である。

[図6A]脳腫瘍患者および健常人の末梢血から抽出したDNAを、CREMのプライマーセット（配列番号12および13）を用いてMSP法により増幅して得られた増幅産物のバンド強度を示す棒グラフである。

[図6B]脳腫瘍患者および健常人の末梢血から抽出したDNAを、VRK2のプライマーセット（配列番号14および15）を用いてMSP法により増幅して得られた増幅産物のバンド強度を示す棒グラフである。

[図6C]脳腫瘍患者および健常人の末梢血から抽出したDNAを、精度管理用プライマーセット（配列番号21および22）を用いてMSP法により増幅して得られた増幅産物のバンド強度を示す棒グラフである。

[図7]被験者の脳腫瘍に関する情報を提供するための判定装置の一例を示した概略図である。

[図8]図7の判定装置の機能構成を示すブロック図である。

[図9]図7に示された判定装置のハードウェア構成を示すブロック図である。

[図10]図7に示された判定装置を用いた、被験者の脳腫瘍に関する情報を提供するための判定のフローチャートである。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明の脳腫瘍に関する情報の取得方法（以下、単に「方法」ともいう）では、まず、被験者から採取した生体試料からDNA試料を調製する。

[0016] 本発明が対象とする脳腫瘍は原発性脳腫瘍であれば特に限定されず、例えば、グリオーマ、髄膜腫、下垂体腺腫、神経鞘腫などが挙げられる。それらの中でもグリオーマが本発明の方法の対象として特に好適である。なお、グリオーマは、膠芽腫、星細胞腫、乏突起膠腫、上衣腫、髄芽腫などに分類されるが、本発明では特に限定されない。

[0017] 本実施形態において、生体試料は、被験者のDNAを含む生体由来の試料であれば特に制限されないが、好ましくはゲノムDNAを含む試料、例えば臨床検体である。臨床検体としては、例えば、体液、尿、手術または生検により採取した組織などが挙げられる。体液としては、血液、血清、血漿、リンパ液、腹水、脳脊髄液、骨髓液、乳頭分泌液などが挙げられる。また、被検者から

採取した細胞または組織を培養して得られた培養物を生体試料として用いることもできる。

[0018] DNA試料の調製は、生体試料からDNAを抽出することにより行うことができる。生体試料からのDNAの抽出方法は当該技術において公知である。例えば、生体試料と、細胞または組織を可溶化する界面活性剤（例えばコール酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウムなど）を含む処理液とを混合し、得られた混合液に物理的処理（攪拌、ホモジナイズ、超音波破砕など）を施して、生体試料に含まれるDNAを該混合液中に遊離させることによって、DNAを抽出することができる。この場合、混合液を遠心分離して細胞破片を沈殿させ、遊離したDNAを含む上清を後述の解析工程に用いることが好ましい。また、得られた上清を当該技術において公知の方法により精製してもよい。なお、生体試料からのDNAの抽出および精製は、市販のキットを用いて行うこともできる。

[0019] 上記の調製工程は、抽出したDNAを断片化する工程をさらに含むことが好ましい。DNAを適当な長さに断片化することにより、後述するメチル化DNA免疫沈降（MeDIP）法および非メチル化シトシン変換処理を効率よく行うことができる。

DNAの断片化は、超音波処理、アルカリ処理、制限酵素処理などにより行うことができる。例えば、アルカリ処理によりDNAの断片化を行なう場合は、DNA溶液に水酸化ナトリウム溶液を終濃度0.1～1.0 Nとなるよう添加し、10～40℃で5～15分間インキュベーションすることによりDNAが断片化される。また、制限酵素処理によりDNAの断片化を行なう場合、用いる制限酵素はDNAの塩基配列に基づいて適宜選択され、例えばMseIやBamHIなどが用いられる。

[0020] 本発明の方法では、上記の調製工程で得られたDNAに含まれるCREM、VRK2およびMYL12Aから選択される少なくとも1つの遺伝子のプロモータ領域に存在するCpG部位のメチル化の状態を解析する。

なお、本明細書において、「CpG部位」とは、塩基配列中のシトシン（C）とグアニン（G）とが5'から3'への方向にこの順序で隣り合った配列の部位を

意味する。なお、CpGの「p」の文字は、シトシンとグアニンとの間のホスホジエステル結合を表わす。

また、本明細書において、「メチル化の状態を解析する」とは、CREM、VRK2およびMYL12Aから選択される少なくとも1つの遺伝子のプロモータ領域に存在するCpG部位のメチル化の有無解析すること、または該プロモータ領域のメチル化の頻度を解析することを意味する。

[0021] 当該技術において、CREM、VRK2およびMYL12Aの各遺伝子のプロモータ領域の塩基配列自体は公知である。これらの塩基配列は、例えば米国国立医学図書館の国立生物情報センター（National Center for Biotechnology Information: NCBI）により提供されるデータベース（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）などの公知のデータベースから知ることができる。上記の遺伝子の各種ID番号を、表1に示す。また、各遺伝子のプロモータ領域の塩基配列を、それぞれ配列番号1、2および3の配列として示す（なお、配列番号1の塩基配列はマイナス鎖の配列であり、配列番号2および3の塩基配列はプラス鎖の配列である）。

[0022]

[表1]

遺伝子シンボル	Unigene ID	Entrez Gene ID	Transcript ID	配列番号
CREM	Hs.200250 Hs.686182	1390	NM_183013.2	1
			NM_001267563.1	
			NM_001267563.1	
			NM_001881.3	
			NM_181871.2	
			NM_183060.2	
			NM_183011.1	
			NM_183012.1	
			NM_001267564.1	
			NM_182771.1	
			NM_182772.1	
			NM_001267566.1	
			NM_182769.2	
			NM_182770.2	
			NM_001267567.1	
			NM_001267568.1	
			NM_182717.1	
			NM_182719.1	
			NM_182720.1	
			NM_182718.1	
			NM_001267569.1	
			NM_001267568.1	
			NM_182723.1	
			NM_001267570.1	
			NM_182721.1	
			NM_182724.1	
VRK2	Hs.728198	7444	NM_006296.6	2
			NM_001130483.2	
			NM_001130480.2	
			NM_001130482.2	
MYL12A	Hs.190086	10627	NM_001130481.2	3
			NM_006471.2	

[0023] 本発明の実施形態において、解析工程は、CREM、VRK2およびMYL12Aから選択される少なくとも1つの遺伝子のプロモータ領域に存在するCpG部位のうち

、少なくとも1つのCpG部位のメチル化の有無を解析する工程であってもよい。ここで、「メチル化の有無」とは、上記のプロモータ領域に存在するCpG部位のシトシンがメチル化されているか否かを意味する。この実施形態では、解析するCpG部位は1つであってもよいが、複数のCpG部位のメチル化の有無を解析することが好ましい。なお、複数のCpG部位は、1つの遺伝子のプロモータ領域から選択してもよいし、複数の遺伝子のプロモータ領域のそれぞれの中から選択してもよい。

[0024] 本発明の別の実施形態において、解析工程は、CREM、VRK2およびMYL12Aから選択される少なくとも1つの遺伝子のプロモータ領域におけるメチル化の頻度を解析する工程であってもよい。ここで、「メチル化の頻度」とは、上記のプロモータ領域に存在するCpG部位の数に対する、メチル化されたCpG部位の数の割合を意味する。この実施形態では、解析対象は、上記のプロモータ領域の全部であってもよいし、少なくとも1つのCpG部位を含む一部分であってもよい。なお、解析対象は、CpG部位を1つしか含んでいなくてもよいが、複数のCpG部位を含んでいることが好ましい。また、解析対象は、上記の遺伝子のうちのいずれか1つのプロモータ領域から決定してもよいし、複数の遺伝子のプロモータ領域から決定してもよい。

なお、CREM、VRK2およびMYL12Aの各遺伝子のプロモータ領域に存在するCpG部位の位置および数は既知であるので、本発明の実施形態においては、該プロモータ領域におけるメチル化されたCpG部位の数自体をメチル化の頻度として利用できる。

[0025] 上記のメチル化の頻度は、DNA中のCpG部位のメチル化状態を、後述するMassARRAY（登録商標）などの質量分析法で解析することにより得られる「メチル化スコア」であってもよい。MassARRAY（登録商標）では、DNA断片を測定して、メチル化DNA断片に由来するピークと非メチル化DNA断片に由来するピークとの面積比からメチル化スコアが算出される。

[0026] 本発明の実施形態では、CREM、VRK2およびMYL12Aの各遺伝子のプロモータ領域中のいずれのCpG部位（あるいは該CpG部位を含む所定の範囲）を解析対

象とするかについては特に限定されず、当業者が適宜決定することができる。なお、これらの遺伝子のプロモータ領域に存在するCpG部位の位置および数は既知であるので、解析対象とするCpG部位または範囲は、後述の公知の解析方法を用いたルーチンの実験により決定することができる。

[0027] メチル化の状態を解析する方法は、当該技術において種々の方法が公知である。本発明の方法では、いずれの解析方法を用いるかは特に限定されないが、好ましくは、メチル化DNAと非メチル化DNAとを区別する工程と、DNAを増幅する工程と、メチル化DNAおよび／または非メチル化DNAを検出する工程とを含む方法である。

[0028] メチル化DNAと非メチル化DNAとを区別する工程としては、メチル化感受性制限酵素処理、MeDIP法、非メチル化シトシン変換処理などを行う工程が挙げられる。

DNAを増幅する工程としては、PCR法、定量的PCR法、IVT (in vitro transcription) 増幅法、SPIA (商標) 増幅法などを行う工程が挙げられる。

メチル化DNAおよび／または非メチル化DNAを検出する工程としては、電気泳動法、シーケンス解析法、マイクロアレイ解析法、質量分析法、サザンハイブリダイゼーションなどを行う工程が挙げられる。

[0029] MeDIP法とは、抗メチル化シトシン抗体もしくは抗メチル化シチジン抗体、またはメチル化DNA結合タンパク質を特異的に認識する抗体を用いる免疫沈降により、生体試料に含まれるメチル化DNAを濃縮する方法である。本発明の実施形態において、解析工程は、抽出工程で得られたDNAに含まれるメチル化DNAをMeDIP法により濃縮し、得られたメチル化DNAのメチル化状態を解析する工程であってもよい。また、MeDIP法により濃縮したメチル化DNAを、IVT増幅法などにより増幅し、得られた増幅産物について、マイクロアレイを用いてメチル化状態を解析することもできる。このような解析方法は、MeDIP on chip法と呼ばれる。

[0030] 非メチル化シトシン変換処理とは、生体試料から抽出したDNAと非メチル化シトシン変換剤とを反応させることにより、該DNA中の非メチル化シトシンを

他の塩基（ウラシル、チミン、アデニンまたはグアニン）に変換する処理である。ここで、非メチル化シトシン変換剤とは、DNAと反応して該DNA中の非メチル化シトシンを他の塩基（ウラシル、チミン、アデニンまたはグアニン）に変換できる物質である。このような非メチル化シトシン変換剤としては、例えば亜硫酸水素のナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などの亜硫酸水素塩（バイサルファイト）が好適に用いられる。

バイサルファイトを用いる処理では、DNA中の非メチル化シトシンは、脱アミノ化反応によりウラシルに変換されるが、メチル化シトシンには、このような塩基の変換が起こらない。

したがって、DNA中のCpG部位のメチル化状態の違いは、バイサルファイトを用いる非メチル化シトシン変換処理によって、塩基配列の違い（CおよびU）に変換される。なお、バイサルファイトによる非メチル化シトシン変換処理は、バイサルファイト処理と呼ばれる。

[0031] バイサルファイト処理を行なう場合、バイサルファイトの添加量（濃度）は、DNA中の非メチル化シトシンを十分に変換できる程度であれば特に限定されないが、例えば、DNAを含む溶液中の終濃度として1 M以上、好ましくは1～15 M、より好ましくは3～10 Mである。また、バイサルファイトを添加した後のインキュベーションの条件（温度および時間）は、バイサルファイトの添加量に応じて適宜設定できるが、例えば、バイサルファイトを終濃度6 Mで添加した場合、50～80℃で10～90分間インキュベーションする。

[0032] DNAに含まれるCpG部位のメチル化状態は、バイサルファイト処理したDNAをシーケンス解析して、本来の塩基配列との違いを検出することにより解析できる。この方法は、バイサルファイトシーケンス法と呼ばれている。

[0033] また、CpG部位のメチル化状態は、質量分析法によって解析することができる。具体的には、バイサルファイト処理したDNAを鋳型として、解析対象とする塩基配列に特異的なプライマーセットを用いてPCR増幅した後、得られたPCR産物をさらにIVT増幅することにより、メチル化シトシンおよびウラシルはそれぞれグアニン（G）およびアデニン（A）となる。得られたIVT増幅産物を

RNase Aで切断し、得られた核酸断片間におけるGとAとの質量差（16 Da）をMALDI-TOF（マトリックス支援レーザー脱離イオン化－飛行時間）型質量分析装置を用いて検出することにより、DNAのメチル化状態を解析できる。この方法はMassARRAY（登録商標）解析と呼ばれる。

[0034] IVT産物においてRNase Aによって切断される部位は、任意の塩基と該塩基に隣接するウラシル（U）またはチミン（T）の間であることが知られている。したがって、RNase Aによって切断されたIVT産物の塩基配列および質量は、鋳型として用いたDNAの塩基配列から予測することが可能である。したがって、MassARRAY（登録商標）で得られた各ピークについて、鋳型としたDNAの塩基配列のどの部分に由来するかを同定できる。例えば、DNA断片中の1か所のCpG部位がメチル化していた場合、MassARRAY（登録商標）で得られるピークは、高質量側へ16 Daシフトする。複数のCpG部位を有するDNA断片の解析では、例えば、該DNA断片中のCpG部位が2か所メチル化していた場合は32 Daシフトし、3か所メチル化していた場合は48 Daシフトする。

[0035] MassARRAY（登録商標）などの質量分析法では、測定したDNA断片のメチル化スコアを算出することができる。例えば、所定の配列のDNA断片について、分析で得られたチャートにおける非メチル化DNA断片のピークとメチル化DNA断片のピークとの面積比が1：3であった場合、このDNA断片のメチル化スコアは、 $3 / (1 + 3) = 0.75$ より、0.75となる。なお、メチル化スコアは、理論上、DNA断片が有する全てのCpG部位がメチル化している場合は1であり、全てのCpG部位がメチル化していない場合は0である。

[0036] CpG部位のメチル化状態は、メチル化特異的PCR（MSP）法によって解析することができる。MSP法とは、バイサルファイト処理したDNAを、後述するプライマーセットを用いてPCR増幅を行い、PCR産物の有無を確認することによって、CpG部位のメチル化状態（メチル化の有無）を解析する方法である。

MSP法では、解析対象のCpG部位がメチル化されている（すなわち、シトシンがウラシルに変換されていない）塩基配列は増幅できるが、CpG部位がメチル化されていない（すなわち、該シトシンがウラシルに変換されている）塩

基配列は増幅できないプライマーセットを用いる。このようなプライマーセットを用いるMSP法では、PCR産物が存在する場合に、解析対象のCpG部位がメチル化されていることがわかる。

また、MSP法は、解析対象のCpG部位のシトシンがウラシルに変換されていない塩基配列は増幅できないが、CpG部位のシトシンがウラシルに変換されている塩基配列は増幅できるプライマーセットを用いて行なうこともできる。この場合、PCR産物が存在しない場合に、解析対象のCpG部位がメチル化されていることがわかる。

[0037] MSP法で用いられるプライマーセットに含まれる各プライマーは、解析対象のCpG部位を含む塩基配列に応じて当業者が適宜設計できるが、プライマーの3'末端またはその付近に、解析対象のCpG部位のシトシンを含むように設計することが好ましい。

[0038] CpG部位のメチル化状態は、マイクロアレイを用いて解析することもできる。この場合、解析用マイクロアレイは、CREM、VRK2およびMYL12Aの各遺伝子のプロモータ領域の塩基配列に相補的な核酸プローブを、基板上に固定して作製できる。なお、このようなマイクロアレイは、当該技術において公知の方法により作製できる。

[0039] マイクロアレイによる解析では、生体試料から抽出したDNAは、当該技術において公知の標識物質により標識されていることが好ましい。よって、本発明の判定方法は、抽出したDNAを標識する工程をさらに含むことが好ましい。この標識工程は、生体試料中の全てのDNAを標識できるので、上記のDNA増幅工程の後に行われるのが有利である。なお、標識物質としては、蛍光物質、ビオチンなどのハプテン、放射性物質などが挙げられる。また、蛍光物質としては、Cy3、Cy5、FITC、Alexa Fluor（商標）などが挙げられる。このようにDNAを標識することにより、マイクロアレイ上のプローブからのシグナルの測定が容易になる。なお、DNAをこれらの標識物質で標識する方法は、当該技術において公知である。

[0040] 上記のシグナルは、マイクロアレイの種類に応じて適切なシグナルであり

得る。例えば、シグナルは、マイクロアレイの各プローブとハイブリダイズしたDNA断片が存在する場合に発生する電氣的シグナルであってもよいし、上記のように解析対象のDNAが標識されている場合は、標識物質から生じる蛍光、発光などのシグナルであってもよい。シグナルの検出は、通常のマイクロアレイ測定装置に備えられたスキャナーにより行うことができる。スキャナーとしては、例えば、GeneChip（登録商標）Scanner3000 7G（Affymetrix社）、Illumina（登録商標）BeadArray Reader（Illumina社）などが挙げられる。

[0041] 本発明の方法では、上記の解析工程で得られた解析結果に基づいて、被験者の脳腫瘍に関する情報を取得する。ここで、脳腫瘍に関する情報とは、脳腫瘍の診断の指標となり得る情報であれば特に限定されないが、好ましくは、被験者における脳腫瘍の発生もしくは状態またはその両方を示す情報である。そのような情報としては、例えば、被験者から採取した生体試料における脳腫瘍由来の腫瘍細胞の存否、脳腫瘍が被験者に発生している可能性、脳腫瘍がこれから被験者に発生する危険性などが挙げられる。また、被験者に脳腫瘍が発生している場合は、脳腫瘍に関する情報として、被験者の予後、腫瘍の進行度（ステージ）などが挙げられる。なお、上記の解析工程で得られた解析結果に基づいて取得した脳腫瘍に関する情報は、脳腫瘍とは異なる種類の腫瘍に関する情報を実質的に含まない。これは、本発明の方法でマーカーとして用いる上記の遺伝子のプロモータ領域が、脳腫瘍に由来する腫瘍細胞に特異的にメチル化していることによる。

[0042] 本発明の実施形態では、解析工程において、メチル化されたCpG部位が有るという解析結果が得られた場合、脳腫瘍が発生していることを示唆する情報、または脳腫瘍の状態が不良である（もしくは、悪い）という情報を取得することができる。

また、本発明の別の実施形態では、解析工程で得られたメチル化の頻度が所定の閾値より高いか、または閾値と同じという結果が得られた場合、そのような情報を取得することができる。

より具体的には、生体試料中に脳腫瘍由来の腫瘍細胞が存在するという情報を取得することができる。あるいは、被験者が脳腫瘍になる危険性が高いという情報、または脳腫瘍がすでに発生しているという情報を取得することができる。また、被験者に脳腫瘍が発生しているならば、被験者の予後が不良である（もしくは、悪い）という情報、または腫瘍の状態がより進行したステージであるという情報を取得することができる。

[0043] 反対に、解析工程において、メチル化されたCpG部位が無いという結果が得られた場合、脳腫瘍が発生していないことを示唆する情報または脳腫瘍の状態が良好であるという情報を取得することができる。あるいは、解析工程で得られたメチル化の頻度が所定の閾値より低いという結果が得られた場合に、そのような情報を取得することができる。より具体的には、生体試料中に脳腫瘍に由来する腫瘍細胞が存在しないという情報を取得することができる。あるいは、被験者が脳腫瘍になる危険性が低いという情報、または脳腫瘍はまだ発生していないという情報を取得することができる。また、被験者に脳腫瘍が発生しているならば、被験者の予後が良好であるという情報、または腫瘍の状態がそれほど進行したステージではないという情報を取得することができる。

[0044] なお、所定の閾値は特に限定されず、種々の生体試料についてのデータの蓄積により経験的に設定することができる。あるいは、次のようにして所定の閾値を設定してもよい。まず、脳腫瘍に由来する腫瘍細胞を含まないことが予め確認されている生体試料（正常脳組織または正常脳細胞）、および、脳腫瘍に由来する腫瘍細胞を含む生体試料のそれぞれから抽出したDNAについて、メチル化の頻度を解析する。次いで、得られた解析結果に基づいて、腫瘍細胞を含まない生体試料のメチル化の頻度よりも高く、且つ、腫瘍細胞を含む生体試料のメチル化の頻度よりも低い範囲から閾値を設定する。好ましくは、腫瘍細胞を含まない生体試料と腫瘍細胞を含む生体試料とを高精度に区別し得る値を、閾値として設定する。

[0045] 本発明の範囲には、メチル化解析により脳腫瘍に関する情報を取得するた

めのマーカー（以下、単に「マーカー」ともいう）も含まれる。本発明のマーカーは、CREM、VRK2およびMYL12Aの各遺伝子のプロモータ領域に存在するCpG部位から選択される少なくとも1つである。

本発明の実施形態では、被験者から採取した生体試料から調製したDNA試料におけるマーカーのメチル化状態を解析し、得られた解析結果に基づいて該被験者の脳腫瘍に関する情報を取得することができる。なお、メチル化状態の解析および脳腫瘍の情報の取得については、これまでに述べたことと同様である。

[0046] また、本発明の範囲には、脳腫瘍に関する情報を取得するためのキット（以下、単に「キット」ともいう）も含まれる。本発明のキットは、CREM、VRK2およびMYL12Aの各遺伝子のプロモータ領域に存在するCpG部位から選択される少なくとも1つのメチル化の状態を解析するためのプライマーセットを含む。

[0047] 本発明の実施形態において、キットに含まれるプライマーセットは、MassARRAY（登録商標）などの質量分析法、MSP法、バイサルファイトシーケンス法などのPCR増幅を伴う解析方法によりCpG部位のメチル化の状態を解析するためのプライマーセットであればよいが、好ましくはMassARRAY（登録商標）などの質量分析法またはMSP法で用いられるプライマーセットである。なお、プライマーセットに含まれる各プライマーの塩基配列は、上記のプロモータ領域の塩基配列に応じて当業者が適宜設定できる。例えば、配列番号4および配列番号5の塩基配列であるプライマーセット、配列番号6および配列番号7の塩基配列であるプライマーセット、配列番号8および配列番号9の塩基配列であるプライマーセット、配列番号12および配列番号13の塩基配列であるプライマーセット、配列番号14および配列番号15の塩基配列であるプライマーセット、ならびに配列番号16および配列番号17の塩基配列であるプライマーセットが挙げられる。

[0048] 本発明には、被験者における脳腫瘍に関する情報の提供に適するシステムも含まれる。そのようなシステムは、例えば、次のとおりである。

[0049] プロセッサおよび該プロセッサの制御下にあるメモリを含むコンピュータを備え、

該メモリには、下記のステップ：

被験者由来のDNA試料に含まれるCREM、VRK2およびMYL12Aから選択される少なくとも1つの遺伝子のプロモータ領域に存在するCpG部位のメチル化の状態の解析結果を取得するステップと、

得られた解析結果に基づいて、上記の被験者の脳腫瘍に関する情報を提供するステップと

を該コンピュータに実行させるためのコンピュータプログラムが記録されている、

被験者における脳腫瘍に関する情報の提供に適するシステム。

[0050] また、本発明には、被験者における脳腫瘍に関する情報の提供をコンピュータに実行させるためのコンピュータプログラム製品も含まれる。そのようなコンピュータプログラム製品は、例えば、次のとおりである。

[0051] コンピュータに読み取り可能な媒体を備え、

該媒体には、下記のステップ：

被験者由来のDNA試料に含まれるCREM、VRK2およびMYL12Aから選択される少なくとも1つの遺伝子のプロモータ領域に存在するCpG部位のメチル化の状態の解析結果を取得するステップと、

得られた解析結果に基づいて、上記の被験者の脳腫瘍に関する情報を提供するステップと

を該コンピュータに実行させるためのコンピュータプログラムが記録されている、

被験者における脳腫瘍に関する情報の提供をコンピュータに実行させるためのコンピュータプログラム製品。

[0052] 以下に、本発明の方法を実施するのに好適な装置の一形態を、図面を参照して説明する。しかし、本発明はこの実施形態のみに限定されるものではない。図7は、被験者の脳腫瘍に関する情報を提供するための判定装置の一例

を示した概略図である。図 7 に示された判定装置 1 は、測定装置 2 と、該測定装置 2 と接続されたコンピュータシステム 3 とを含んでいる。

[0053] 本実施形態においては、測定装置 2 は、MALDI-TOF 型質量分析装置である。この測定装置 2 は、被験物質の飛行時間や質量電荷比 (m/z 値) などの質量分析情報を取得する。被験者由来の DNA 試料から調製した測定用試料を測定装置 2 にセットすると、測定装置 2 は、該測定用試料に含まれる核酸の質量分析情報を取得し、得られた質量分析情報をコンピュータシステム 3 に送信する。

[0054] なお、メチル化の状態を MSP 法により解析する場合、測定装置 2 は、蛍光イメージスキャナなどのゲルイメージング装置であってもよい。この場合、MSP 法による核酸増幅を行った反応液をゲル電気泳動し、泳動後のゲルを測定装置 2 にセットすると、測定装置 2 は増幅産物を検出する。そして、測定装置 2 は、増幅産物のバンド強度データを取得し、得られたデータをコンピュータシステム 3 に送信する。

[0055] コンピュータシステム 3 は、コンピュータ本体 3 a と、入力デバイス 3 b と、検体情報、判定結果などを表示する表示部 3 c とを含む。コンピュータシステム 3 は、測定装置 2 から質量分析情報を受信する。そして、コンピュータシステム 3 のプロセッサは、質量分析情報に基づいて、被験者における脳腫瘍に関する情報を提供するプログラムを実行する。

[0056] 図 8 は、図 7 に示された判定装置の機能構成を示すブロック図である。図 8 に示されるように、コンピュータシステム 3 は、取得部 3 0 1 と、記憶部 3 0 2 と、算出部 3 0 3 と、判定部 3 0 4 と、出力部 3 0 5 とを備える。取得部 3 0 1 は、測定装置 2 と、ネットワークを介して通信可能に接続されている。なお、算出部 3 0 3 と判定部 3 0 4 とは、制御部 3 0 6 を構成している。

[0057] 取得部 3 0 1 は、測定装置 2 から送信された情報を取得する。記憶部 3 0 2 は、判定に必要な閾値およびメチル化スコアを算出するための式を記憶する。算出部 3 0 3 は、取得部 3 0 1 で取得された情報を用い、記憶部 3 0 2

に記憶された式にしたがって、メチル化スコアを算出する。判定部304は、算出部303によって算出されたメチル化スコアが、記憶部302に記憶された閾値よりも低いか否かを判定する。出力部305は、判定部304による判定結果を、被験者の脳腫瘍に関する情報(例えば、該被験者から採取した生体試料中の脳腫瘍由来の癌細胞の有無)として出力する。

[0058] 図9は、図7に示された判定装置のハードウェア構成を示すブロック図である。図9に示されるように、コンピュータ本体3aは、CPU(Central Processing Unit)30と、ROM(Read Only Memory)121と、ROM32と、ハードディスク33と、入出力インターフェイス34と、読出装置35と、通信インターフェイス36と、画像出力インターフェイス37とを備えている。CPU30、ROM31、RAM(Random Access Memory)32、ハードディスク33、入出力インターフェイス34、読出装置35、通信インターフェイス36および画像出力インターフェイス37は、バス38によってデータ通信可能に接続されている。

[0059] CPU30は、ROM31に記憶されているコンピュータプログラムおよびROM32にロードされたコンピュータプログラムを実行することが可能である。CPU30がアプリケーションプログラムを実行することにより、上述した各機能ブロックが実現される。これにより、コンピュータシステムが、被験者の脳腫瘍に関する情報を提供するための判定装置としての端末として機能する。

[0060] ROM31は、マスクROM、PROM、EPROM、EEPROMなどによって構成されている。ROM31には、CPU30によって実行されるコンピュータプログラムおよびこれに用いるデータが記録されている。

[0061] ROM32は、SRAM、DRAMなどによって構成されている。ROM32は、ROM31およびハードディスク33に記録されているコンピュータプログラムの読み出しに用いられる。ROM32はまた、これらのコンピュータプログラムを実行するときに、CPU30の作業領域として利用される。

- [0062] ハードディスク 33 は、CPU 30 に実行させるためのオペレーティングシステム、アプリケーションプログラム(被験者の脳腫瘍に関する情報を提供するためのコンピュータプログラム)などのコンピュータプログラムおよび当該コンピュータプログラムの実行に用いるデータがインストールされている。
- [0063] 読出装置 35 は、フレキシブルディスクドライブ、CD-ROMドライブ、DVD-ROMドライブなどによって構成されている。読出装置 35 は、可搬型記録媒体 40 に記録されたコンピュータプログラムまたはデータを読み出すことができる。
- [0064] 入出力インターフェイス 34 は、例えば、USB、IEEE 1394、RS-232Cなどのシリアルインターフェイスと、SCSI、IDE、IEEE 1284などのパラレルインターフェイスと、D/A変換器、A/D変換器などからなるアナログインターフェイスとから構成されている。入出力インターフェイス 34 には、キーボード、マウスなどの入力デバイス 3b が接続されている。操作者は、当該入力デバイス 3b を使用することにより、コンピュータ本体 3a にデータを入力することが可能である。
- [0065] 通信インターフェイス 36 は、例えば、Ethernet(登録商標)インターフェイスなどである。コンピュータシステム 3 は、通信インターフェイス 36 により、プリンタへの印刷データの送信が可能である。
- [0066] 画像出力インターフェイス 37 は、LCD、CRTなどで構成される表示部 3c に接続されている。これにより、表示部 3c は、CPU 30 から与えられた画像データに応じた映像信号を出力することができる。表示部 3c は、入力された映像信号にしたがって画像(画面)を表示する。
- [0067] 次に、判定装置 1 による、被験者の脳腫瘍に関する情報の提供の処理手順を説明する。図 10 は、図 7 に示された判定装置を用いた脳腫瘍に関する情報の提供のフローチャートである。ここでは、被験者由来のDNA試料から調製した測定用試料に含まれる核酸の質量分析情報からピーク面積を算出し、得られたピーク面積からメチル化スコアを算出し、得られたメチル化スコアが

閾値よりも低いか否かの判定を行なう場合を例として挙げて説明する。しかし、本発明は、この実施形態のみに限定されるものではない。

[0068] まず、ステップS 1-1において、判定装置1の取得部301は、測定装置2から質量分析情報を取得する。次に、ステップS 1-2において、算出部303は、取得部301が取得した質量分析情報からピーク面積を算出し、記憶部302に送信する。そして、ステップS 1-3において、算出部303は、記憶部302に記憶された該ピーク面積に基づき、記憶部302に記憶された式にしたがって、メチル化スコアを算出する。

[0069] その後、ステップS 1-4において、判定部304は、算出部303で算出されたメチル化スコアが、記憶部302に記憶された閾値よりも低いか否かの判定を行う。ここで、メチル化スコアが閾値よりも低いとき、処理は、ステップS 1-5に進行し、判定部304は、被験者から採取した生体試料には脳腫瘍由来の癌細胞がないことを示す判定結果を出力部305に送信する。また、メチル化スコアが閾値よりも低くないとき(すなわち、メチル化スコアが閾値以上であるとき)、被験者から採取した生体試料には脳腫瘍由来の癌細胞があることを示す判定結果を出力部305に送信する。

[0070] そして、ステップS 1-7において、出力部305は、判定結果を、被験者の脳腫瘍に関する情報として出力し、表示部3cに表示させたり、プリンタに印刷させたりする。これにより、被験者において脳腫瘍があるのか、またはないのかについて判定することを補助する情報を医師などに提供することができる。

[0071] 以下に、本発明を実施例によって詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

実施例

[0072] 参考例1： 脳腫瘍の癌部組織および正常脳組織のメチル化データを利用した新規マーカーの同定

(1) メチル化データの取得

本参考例では、脳腫瘍の癌部組織(283検体)および正常脳組織(2検体)

について、TCGA (The Cancer Genome Atlas : <http://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/tcgaHome2.jsp>) において公開されているInfinium HumanMethylation27 BeadChip (Illumina社) のメチル化データを取得した。

[0073] (2) 新規マーカーの同定

Infinium HumanMethylation27 BeadChipには、ヒトのゲノム上にあるCpG部位のうち、27,578ヶ所のCpG部位ごとにメチル化用プローブと非メチル化用プローブを設けている。本参考例では、CpG部位のメチル化用プローブのシグナル強度 (シグナルM) と非メチル化用プローブのシグナル強度 (シグナルU) とをBeadArray Readerで検出し、以下の計算式により各遺伝子のCpG領域のメチル化率 (mCpG) を算出した。

$$(mCpG) = (\text{シグナルM}) / (\text{シグナルM} + (\text{シグナルU}))$$

[0074] 得られた各遺伝子のメチル化率 (mCpG) の値について、閾値を「0.4」に設定し、メチル化率の値がこの閾値と同じか、またはこの閾値よりも高い検体を「メチル化陽性検体」とした。そして、メチル化陽性検体の数に基づいて、各種の組織における遺伝子のメチル化陽性率 (%) を下記の式により算出した。

$$\text{メチル化陽性率 (\%)} = (\text{メチル化陽性検体数} / \text{総検体数}) \times 100$$

[0075] 例えば、癌部組織検体の場合、遺伝子のメチル化陽性率は「(癌部組織検体のうちメチル化陽性検体数 / 癌部組織の総検体数) × 100」によって算出される。そして、癌部組織検体と正常脳組織検体との間で統計学的に有意な差を認められる場合に、その遺伝子を癌部組織でメチル化が認められるマーカーとした。

Infinium HumanMethylation27 BeadChip (Illumina社) を用いたデータマイニングの結果、CREM、VRK2およびMYL12Aの各遺伝子のプロモータ領域が、脳腫瘍の癌部組織に高度にメチル化が認められるマーカーとして同定された (図1A~C参照)。以降、これらのマーカーを本発明のマーカーとも呼ぶ。

[0076] 参考例2 : 複数種類の癌 / 腫瘍由来の癌 / 腫瘍組織検体、非癌部組織検体および正常組織検体におけるメチル化データの比較

(1) メチル化データの取得

本参考例では、参考例 1 で示される脳腫瘍の癌部組織（283検体）および正常脳組織（2 検体）に加えて、9 種類の癌／腫瘍組織検体、7 種類の非癌部組織検体および12種類の正常組織検体のメチル化データを比較した。なお、各組織の検体数を以下の表に示す。

[0077] [表2]

癌／腫瘍組織検体

組織	検体数
大腸癌 (Colon)	236
乳癌 (Breast)	186
肺癌 (Lung)	59
胃癌 (Gastric)	82
肝細胞癌 (Liver)	100
腎細胞癌 (Kidney)	219
子宮 (Uterus)	70
卵巣 (Ovary)	519
前立腺 (Prostate)	93

[0078]

[表3]

非癌部組織

組織	検体数
大腸粘膜 (Colon)	16
肺 (Lung)	59
肝硬変組織 (Liver)	39
腎 (Kidney)	199
子宮 (Uterus)	1
卵巣 (Ovary)	16
前立腺 (Prostate)	87

[0079]

[表4]

正常組織

組織	検体数
正常口腔粘膜 (Oral)	2
正常肺 (Lung)	2
正常大腸粘膜 (Colon)	2
正常肝 (Liver)	2
健常人末梢血 (Blood)	2
正常骨格筋 (Skeletal)	2
正常精巣 (Testis)	1
正常胃粘膜 (Stomach)	2
正常膵臓 (Pancreas)	1
正常脾臓 (Spleen)	1
正常腎臓 (Kidney)	2
健常人末梢血 (Blood)※(Blood, Saliva B ら)	93

[0080] 上記の検体のうち、胃癌由来の癌組織検体、肝細胞癌由来の癌組織検体、肝細胞癌由来の非癌部組織検体、正常肝臓由来の正常組織検体、11種類の正常組織検体については、上記参考例1と同様にして、Infinium HumanMethylation27 BeadChip (Illumina社)を用いたInfinium Methylation Assayにより測定されたメチル化データを取得した。それ以外の検体については、TCGA (The Cancer Genome Atlas : <http://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/tcgaHome2.jsp>)、または肺癌、前立腺癌、健常人末梢血93検体については下記の文献において公開されているInfinium HumanMethylation27 BeadChip (Illumina社

）のメチル化データを取得した。なお、ここでいうメチル化データとは、上記参考例１の（２）の記載のようにして得られた、CREM、VRK2およびMYL12AのCpG領域のメチル化率（mCpG）である。

・肺癌：Selamat SAら、Genome-scale analysis of DNA methylation in lung adenocarcinoma and integration with mRNA expression, *Genome Res.* Jul;22(7):1197-211(2012).

・前立腺癌：Kobayashi Yら、DNA methylation profiling reveals novel biomarkers and important roles for DNA methyltransferases in prostate cancer, *Genome Res.* Jul 21(7):1017-27(2011)

・健常人末梢血93献体のデータ：Salhia Bら、DNA methylation analysis determines the high frequency of genic hypomethylation and low frequency of hypermethylation events in plasma cell tumors, *Cancer Res.* Sep 1;70(17):6934-44(2010).

[0081] （２）複数種類の癌／腫瘍由来の癌／腫瘍組織検体、非癌部組織検体および正常組織検体におけるメチル化陽性率の比較

各遺伝子のメチル化率（mCpG）の値について、閾値を「0.4」に設定し、メチル化率の値がこの閾値と同じか、またはこの閾値よりも高い検体を「メチル化陽性検体」とした。メチル化陽性検体の数に基づいて、各種の組織における本発明のマーカーのメチル化陽性率（％）を上記の式により算出した。結果を図２A～Cに示す。なお、図２において、「正常組織」とは、表４に示される組織のうち、健常人末梢血93検体（Salhia Bら）を除いた正常組織を表し、「正常血液」とは健常人末梢血93検体（Salhia Bら）を表す。

[0082] 図２A～Cより、本発明のマーカーはいずれも、他の種類の癌、ならびにヒト正常組織およびヒト正常血液（健常人末梢血、Salhia Bら）では高度なメチル化は認められず、脳腫瘍において特異的に、且つ高度にメチル化していることがわかった。

[0083] 比較例１： 複数種類の癌／腫瘍由来の癌／腫瘍組織検体、非癌部組織検体および正常組織検体におけるメチル化陽性率の比較

脳腫瘍由来の腫瘍細胞においてメチル化されていることが既に知られているMGMTおよびCDKN2Aの各遺伝子（以下、「既知マーカー」という）について、参考例2と同様にして各組織におけるメチル化陽性率を算出した。結果を図3AおよびBに示す。

[0084] 図3AおよびBより、MGMTおよびCDKN2Aはいずれも脳腫瘍で症例の陽性率が高いが、他の種類の癌および他の非癌部組織でもメチル化を検出しているので、脳腫瘍への特異性は低い。したがって、既知マーカーは、脳腫瘍マーカーとして感度は高いが、特異性の面では低い。よって、既知マーカーは脳腫瘍の診断マーカーとしての性能において課題が多い。すなわち、他の種類の癌および他の非癌部組織における特異性を考慮したマーカー探索を実施する必要あることが示された。

[0085] 実施例1： 正常脳および脳腫瘍におけるメチル化データ（MassARRAY）の比較

(1) 生体試料

本実施例では、生体試料として、正常脳組織（1検体）および脳腫瘍の癌部組織（8検体）を用いた。

[0086] (2) 測定用試料および対照試料の作製

(i) ゲノムDNAの抽出

上記の各組織からゲノムDNAを、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN社) を用いて抽出した。得られたDNA溶液に含まれるゲノムDNAを、Bioruptor (COSMO BIO社製) によって断片化した。また、質量分析法における検量線を作成するため、対照用ゲノムDNAとして、ヒト末梢血リンパ球のゲノムDNAを用いた。このヒト末梢血リンパ球のゲノムDNAを、GenomiPhi v2DNA amplificationキット (GEヘルスケアライフサイエンス社) を用いて増幅した。得られた増幅産物は非メチル化DNAからなる。次いで、該増幅産物をBioruptor (COSMO BIO社製) により断片化して、非メチル化DNA断片（0%メチル化DNA）の溶液を得た。この非メチル化DNA断片の溶液の一部を取り、これにSssIメチラーゼ (New England Biolab社) を反応させることによりCG配列にある全てのシトシ

ンをメチル化させて、メチル化DNA断片（100%メチル化DNA）の溶液を得た。そして、0%メチル化DNAの溶液と100%メチル化DNAの溶液とを所定の割合で混合して、25%、50%および75%メチル化DNAの溶液を得た。

(ii) バイサルファイト処理

上記で得られた各DNA断片(500 ng)を、EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research社)を用いてバイサルファイト処理を行い、処理後のゲノムDNAを滅菌蒸留水(80 μ l)に溶出した。

(iii) PCRおよびIVTによる増幅

バイサルファイト処理した各DNA断片に含まれるメチル化シトシンおよびウラシルを、PCR法およびIVT増幅法により、それぞれグアニンおよびアデニンに変換した。

なお、PCR法に用いたプライマーセットがメチル化DNAおよび非メチル化DNAのいずれも偏りなく増幅できることは、後述する対照試料を用いたMassARRAY（登録商標）解析によって確認されている。本発明のマーカに対するプライマーセットの配列を、表5に示した。また、CREM、VRK2およびMYL12A遺伝子のプロモータ領域について、表5に示されるプライマーセットで解析される領域の塩基配列を、それぞれ配列番号18~20で示した（配列番号18の塩基配列はマイナス鎖の配列であり、配列番号19および20の塩基配列はプラス鎖の配列である）。

[0087] [表5]

マーカ	プライマーの塩基配列		配列番号
CREM	フォワード:	TTAAGAGGAGGAATTAGTT	4
	リバース:	RAAACCCCTAAAAACCTAACA	5
VRK2	フォワード:	GGTAAGGATTAGTTATTTG	6
	リバース:	TATATTACTACGTCACCC	7
MYL12A	フォワード:	TTAAGTTTTTGTAGGGAAAT	8
	リバース:	AACTCTTAATAAAATTACACT	9

[0088] なお、上記のプライマーセットのフォワードプライマーおよびリバースプ

ライマーの5'末端には、IVT反応のために、それぞれ以下のタグ配列およびT7プロモータ配列が付加されている。

・タグ配列：AGGAAGAGAG（配列番号10）

・T7プロモータ配列：CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCT（配列番号11）

[0089] PCR反応液は、下記の試薬類を混合して調製した。

10x Hot Starバッファ（QIAGEN社）	0.5 μ L
25 mM dNTPミックス	0.04 μ L
Hot Star Taq（5 U/ μ L）（QIAGEN社）	0.04 μ L
プライマーミックス	2.0 μ L
DNA溶液	1.0 μ L
水	1.42 μ L
トータル	5 μ L

[0090] 上記の反応液について、下記の条件でPCR反応を行った。

94°Cで15分を1サイクル、

94°Cで20秒、52°Cで30秒および72°Cで1分を45サイクル、

72°Cで3分。

[0091] 得られた各PCR産物を、MassCLEAVE（商標）Reagentキット（SEQUENOM社）に含まれるSAP（Shrimp Alkaline Phosphatase）を用いて脱リン酸化処理した。次いで、これらに、上記のキットを用いて調製した下記の反応液を添加した。

5x T7 R&DNAポリメラーゼバッファ	0.89 μ L
T Cleavageミックス	0.24 μ L
100 mM DTT	0.22 μ L
T7 R&DNAポリメラーゼ	0.44 μ L
RNase A	0.06 μ L
RNaseフリーの水	3.15 μ L
トータル	5 μ L

[0092] 得られた混合物を37°Cで3時間インキュベーションして、IVT反応と、ウラ

シルまたはチミン特異的切断反応とを行った。そして、得られた各反応物をClean Resin (SEQUENOM社) により精製して、質量分析法のための試料を得た。これらの試料について、上記の臨床検体から抽出したゲノムDNAに由来する試料を測定用試料とし、対照ゲノムDNAに由来する試料を対照試料として、後述する質量分析法に用いた。

[0093] (3) MassARRAY (登録商標) を用いた質量分析法によるメチル化状態の解析

(i) 検量線の作成

上記で得られた対照試料を2回ずつ独立に質量分析を行った。得られた解析結果より、各プライマーセットについての検量線を作成し、相関係数を算出した。これにより、用いたプライマーセットは、メチル化DNAおよび非メチル化DNAのいずれにも偏りなく増幅できることが確認された。

(ii) 測定用試料の解析

上記で得られた測定用試料の質量分析を行い、測定用試料に含まれるDNA断片のピークを得た。次いで、得られた各ピークが、CREM、VRK2およびMYL12Aの塩基配列のどの部分に由来するかを同定した。そして、同一の塩基配列に由来する断片について、メチル化CpG部位を含む断片のピークとメチル化CpG部位を含まない断片のピークとの面積比から、メチル化スコアを算出した。結果を図4A～Cに示す。

[0094] 図4A～Cより、CREM、VRK2およびMYL12Aのメチル化スコアは、正常脳組織で低く、脳腫瘍で顕著に高いことを確認した。参考例1のInfinium法の結果と同様に、本発明のマーカーのメチル化スコアと脳腫瘍とが相関することが示された。また、図4より、本発明のマーカーを用いるメチル化の頻度の解析では、脳腫瘍の検体と正常脳組織の検体とを区別可能な閾値を設定できることがわかった。

[0095] 実施例2： 正常脳および脳腫瘍におけるメチル化データ (MSP) の比較

(1) 生体試料

本実施例では、生体試料として、上記の実施例1と同じ、正常脳組織 (1検体) および脳腫瘍の癌部組織 (8検体) を用いた。

[0096] (2) 測定用試料および対照試料の作製

(i) ゲノムDNAの抽出

上記の各組織からゲノムDNAを、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN社) を用いて抽出した。得られたDNA溶液に含まれるゲノムDNAを、Bioruptor (COSMO BIO社製) によって断片化した。

また、対照用ゲノムDNAとして、ヒト末梢血リンパ球のゲノムDNAを用いた。このヒト末梢血リンパ球のゲノムDNAを、GenomiPhi v2DNA amplification キット (GEヘルスケアライフサイエンス社) を用いて増幅した。得られた増幅産物は非メチル化DNAからなる。次いで、該増幅産物をBioruptor (COSMO BIO社製) により断片化して、非メチル化DNA断片 (0%メチル化DNA) の溶液を得た。この非メチル化DNA断片の溶液の一部を取り、これにSssIメチラーゼ (New England Biolab社) を反応させることによりCG配列にある全てのシトシンをメチル化させて、メチル化DNA断片 (100%メチル化DNA) の溶液を得た。

(ii) バイサルファイト処理

上記で得られた各DNA断片 (500 ng) を、EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research社) を用いてバイサルファイト処理を行い、処理後のゲノムDNAを滅菌蒸留水 (80 μ l) に溶出した。

[0097] (3) メチル化特異的PCR (MSP)

上記 (2) で得られた測定用試料および対照試料 (バイサルファイト処理後のDNA) を用いて、MSPを行った。MSPで用いたPCR試薬の組成、プライマーセットおよびPCRの反応条件を以下に示す。

<PCR試薬>

DDW (滅菌水)	16.8 μ L
10 $\times$ PCR buffer with MgCl ₂ (Roche社)	2.5 μ L
2mM dNTP mix	2.5 μ L
10 μ Mセンスプライマー	1.0 μ L
10 μ Mアンチセンスプライマー	1.0 μ L

Faststart Taq polymerase (Roche社)	0.2 μ L
測定用試料または対照試料	1.0 μ L
トータル	25 μ L

[0098] <プライマーセット>

上記のMSPで用いたプライマーセットを表6に示す。これらは、増幅される領域のDNAがメチル化している場合に増幅産物を得ることができるプライマーセットである。また、精度管理用プライマーセットとして、バイサルファイト処理が適切に行なわれたか否かを判定するためのプライマーセットも用いた（表7参照）。なお、CREM、VRK2およびMYL12A遺伝子のプロモータ領域について、表6に示されるプライマーセットで解析される領域の塩基配列を、それぞれ配列番号23～25で示した（配列番号23の塩基配列はマイナス鎖の配列であり、配列番号24および25の塩基配列はプラス鎖の配列である）。

[0099] [表6]

遺伝子シンボル	プライマー	プライマーの塩基配列	配列番号	PCR産物のサイズ(bp)	アニーリング温度(°C)	サイクル
CREM	CREM_MF	AATGATTTGTTAGTTAGAGTAACGG	12	119	57	36
	CREM_MR	AACCTAAAGAAAAATAAAACGCT	13			
VRK2	VRK2_MF	GGTAAGGATTAGTTATTTGGAAGTTC	14	102	56	34
	VRK2_MR	GAATTTAATACGAAATAAACACGAC	15			
MYL12A	MYL12A_MF	TTAAGTTTTTGTAGGGAAATCGA	16	84	56	36
	MYL12A_MR	AAACTAAAACCCGACTTCGAA	17			

[0100] [表7]

プライマーの塩基配列		配列番号	PCR産物のサイズ(bp)	アニーリング温度(°C)	サイクル
フォワード	GGGATATTAAGTGGAGTTATTTGGTTTTAGTT	21	129	60	40
リバース	CCCTGCCAACATCCTTCCTAA	22			

[0101] <PCR反応条件>

95°Cで6分、

95°Cで30秒、X°Cで30秒、72°Cで30秒をYサイクル、

72°Cで7分、

16℃で放置。

なお、上記の反応条件において「X」および「Y」はそれぞれ、表6および7に示されるアニーリング温度およびサイクル数を表す。

[0102] (4) メチル化特異的PCR (MSP) の結果解析

上述のMSPで得られた増幅産物を2%アガロースゲル電気泳動で確認した。結果を図5に示す。なお、図中で「control」として示されている「0」および「100」はそれぞれ0%メチル化対照試料および100%メチル化対照試料を表す。

[0103] 図5より、精度管理用プライマーセットを用いたPCRにより全てのレーンにバンドが現れていた。このことから、試料のバイサルファイト処理が適切に行なわれたことがわかる。本発明のマーカについてのPCRでは、正常脳組織ではメチル化CpGに由来するバンドを検出しなかった。他方で、脳腫瘍組織では、CREM、VRK2およびMYL12Aはそれぞれ8症例中8症例、8症例中7症例、および8例中7症例でバンドを検出した。このように、MSP法による本発明のマーカのメチル化解析では、参考例1のInfinium法の結果と同様に、本発明のマーカのメチル化と脳腫瘍とが相関することが示された。すなわち、CREM、VRK2およびMYL12Aは高率に脳腫瘍でメチル化傾向を示すが、他の正常組織では検出されない特異性の高いマーカであることが示唆された。

[0104] 実施例3： 血液試料を用いたMSP法によるメチル化解析

本実施例では、生体試料として末梢血を用いて、MSPにより、CREMおよびVRK2のプロモータ領域中のCpG部位についてメチル化解析を行った。

(1) 生体試料

本実施例では、生体試料として、脳腫瘍患者から採取した末梢血（8検体）を用いた。また、対照試料として、健常人末梢血（3検体）を用いた。

[0105] (2) 測定用試料の作製

(i) ゲノムDNAの抽出

上記の各末梢血（2ml）から常法により血漿を得た。得られた各血漿からゲノムDNAを、QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit（QIAGEN社）を用いて

抽出した。

(ii) バイサルファイト処理

上記で得られた各DNA断片 (500 ng) を、EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research社) を用いてバイサルファイト処理を行い、処理後のゲノムDNAを滅菌蒸留水 (80 μ l) に溶出した。

[0106] (3) MSP

上記(2)で得られた測定用試料を用いて、定性MSPを行った。用いたPCR試薬の組成およびPCR条件を以下に示す。なお、本実施例に用いたプライマーセット (CREM、VRK2および精度管理) の塩基配列は、表6および表7に示されている。

<PCR試薬>

DW (滅菌水)	10.88 μ L
10 $\times$ PCR buffer with MgCl ₂ (Roche社)	1.5 μ L
10mM dNTP mix	0.3 μ L
10 μ Mセンスプライマー	0.6 μ L
10 μ Mアンチセンスプライマー	0.6 μ L
Faststart Taq polymerase (Roche社)	0.12 μ L
測定用試料	1.0 μ L
トータル	15 μ L

[0107] <PCR反応条件>

95°Cで6分、
95°Cで30秒、X°Cで30秒、72°Cで30秒をYサイクル、
72°Cで7分、
16°Cで放置。

なお、上記の反応条件において「X」および「Y」はそれぞれ、表8に示されるアニーリング温度およびサイクル数を表す。

[0108]

[表8]

	X(°C)	Y(サイクル)
CREM	54	50
VRK2	54	45
精度管理	60	50

[0109] (4) MSPの結果解析

上述のMSPで得られた増幅産物を2%アガロースゲル電気泳動で確認した。各増幅産物のバンド強度をグラフで表した(図6A~C参照)。図6AおよびBにおいて、健常人の末梢血として表示されている棒グラフはバックグラウンドに相当し、バンドを検出していないことを示す。図6AおよびBより、CREMおよびVRK2についてのPCRの結果、健常人の末梢血ではバンドを検出せず、脳腫瘍患者の末梢血では8症例中7症例でバンドを検出することができたことがわかる。また、CREMおよびVRK2を組み合わせることで、8症例の全てにおいてバンドを検出することができ、本発明のマーカの高い性能を示された。なお、図6Cより、精度管理用プライマーセットを用いたPCRにより、全てのサンプルにおいてバンドが検出されたことがわかる。これは、試料のバイサルファイト処理が適切に行なわれたことを示している。このように、本発明のマーカは、生体試料として末梢血を用いた場合でも、脳腫瘍患者において高率にメチル化傾向を示し、健常人ではメチル化が検出されないことがわかった。したがって、本発明のマーカは、脳腫瘍に特異性の高いマーカであり、血液試料中で脳腫瘍に由来する癌細胞の存否を判定するのに有用であることが示唆された。

符号の説明

- [0110] 1 判定装置
- 2 測定装置
- 3 コンピュータシステム
- 3 a コンピュータ本体
- 3 b 入力デバイス

3 c 表示部

請求の範囲

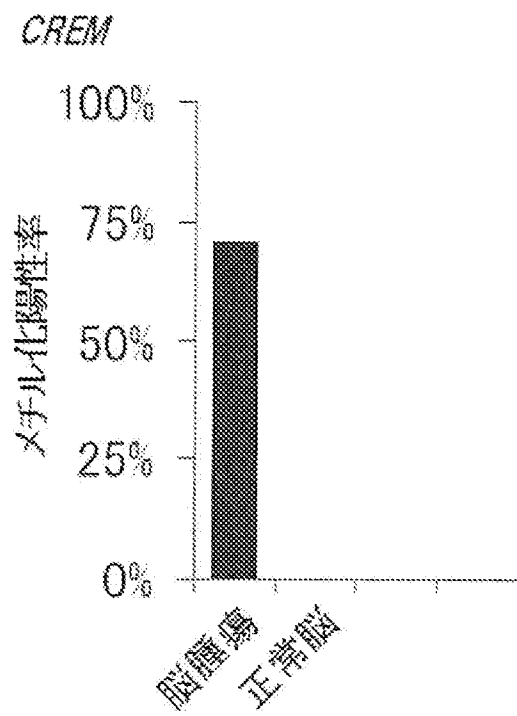
- [請求項1] 被験者から採取した生体試料からDNA試料を調製する工程と、
調製工程で得られたDNA試料に含まれるCREM、VRK2およびMYL12Aから選択される少なくとも1つの遺伝子のプロモータ領域に存在するCpG部位のメチル化の状態を解析する工程と、
解析工程で得られた解析結果に基づいて、前記被験者の脳腫瘍に関する情報を取得する工程と
を含む、脳腫瘍に関する情報の取得方法。
- [請求項2] 脳腫瘍がグリオーマである請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 解析工程が、少なくとも1つのCpG部位のメチル化の有無を解析する工程である請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 被験者の脳腫瘍に関する情報が、被験者から採取した生体試料における脳腫瘍に由来する腫瘍細胞の存否であり、
情報取得工程が、メチル化されたCpG部位が有るという解析結果が得られた場合に、生体試料中に脳腫瘍由来の腫瘍細胞が存在するという情報を取得する工程である請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 解析工程が、メチル化の頻度を解析する工程である請求項1または2に記載の方法。
- [請求項6] 被験者の脳腫瘍に関する情報が、被験者から採取した生体試料における脳腫瘍に由来する腫瘍細胞の存否であり、
情報取得工程が、解析工程で得られたメチル化の頻度が所定の閾値より高い場合に、生体試料中に脳腫瘍由来の腫瘍細胞が存在するという情報を取得する工程である、
請求項5に記載の方法。
- [請求項7] CREM、VRK2およびMYL12Aの各遺伝子のプロモータ領域に存在するCpG部位から選択される少なくとも1つである、メチル化解析により脳腫瘍に関する情報を取得するためのマーカー。
- [請求項8] CREM、VRK2およびMYL12Aの各遺伝子のプロモータ領域に存在するCp

G部位から選択される少なくとも1つのメチル化の状態を解析するためのプライマーセットを含む、脳腫瘍に関する情報を取得するためのキット。

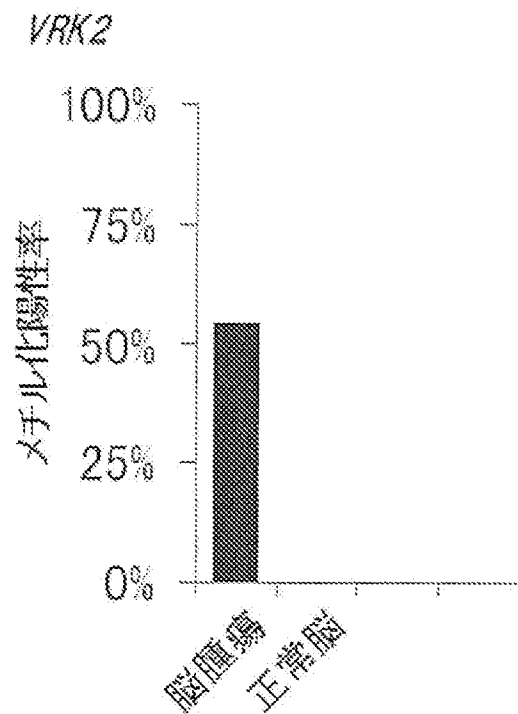
[請求項9] プライマーセットが、質量分析法およびメチル化特異的PCR法から選択される少なくとも1つの方法によりCpG部位のメチル化の状態を解析するためのプライマーセットである請求項8に記載のキット。

[請求項10] プライマーセットが、
配列番号4および配列番号5の塩基配列であるプライマーセット、
配列番号6および配列番号7の塩基配列であるプライマーセット、
配列番号8および配列番号9の塩基配列であるプライマーセット、
配列番号12および配列番号13の塩基配列であるプライマーセット、
配列番号14および配列番号15の塩基配列であるプライマーセット、ならびに
配列番号16および配列番号17の塩基配列であるプライマーセット
から選択される少なくとも1つである請求項9に記載のキット。

[図1A]

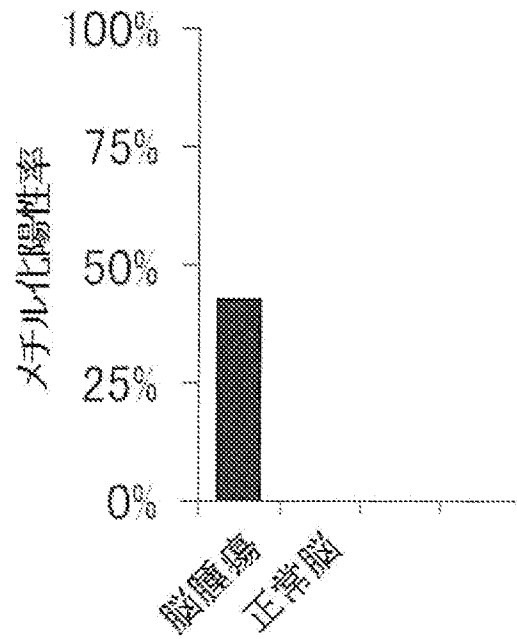


[図1B]



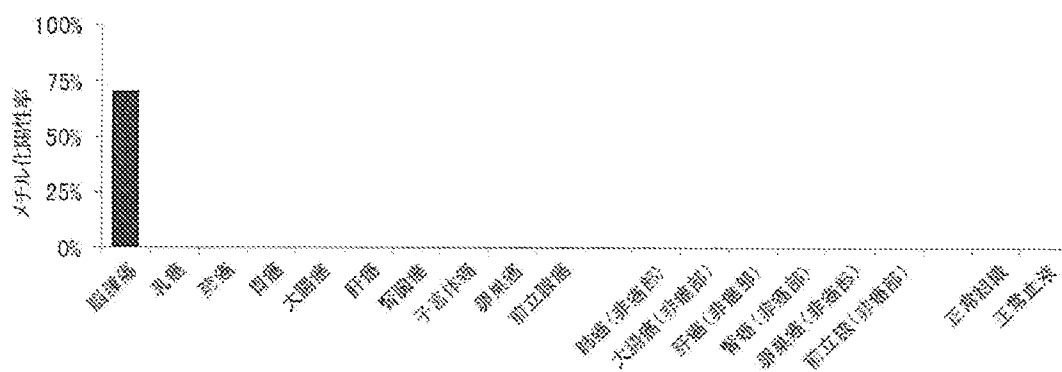
[図1C]

MYL12A



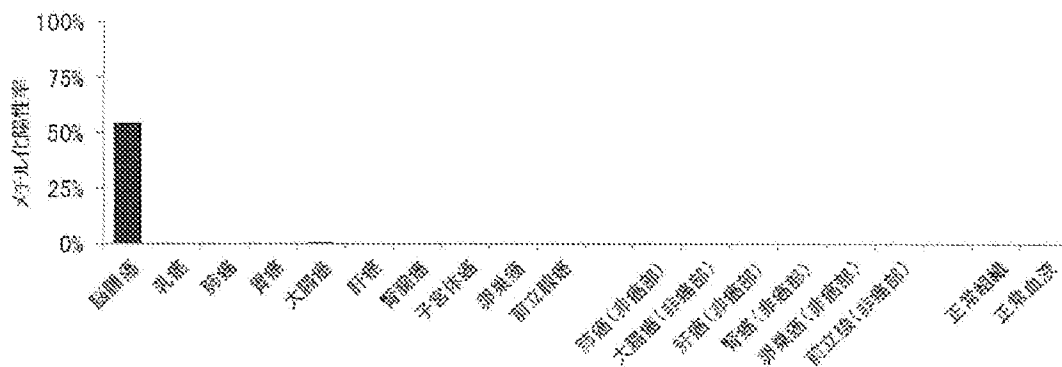
[図2A]

CREM

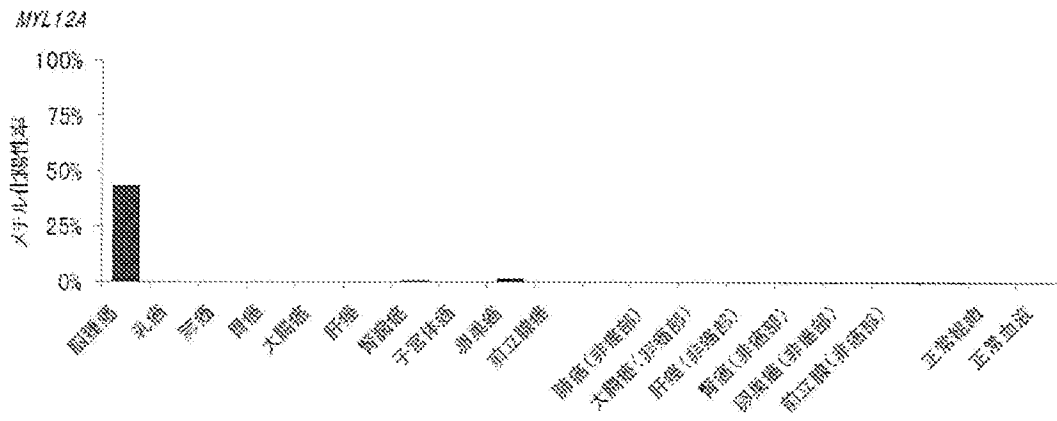


[図2B]

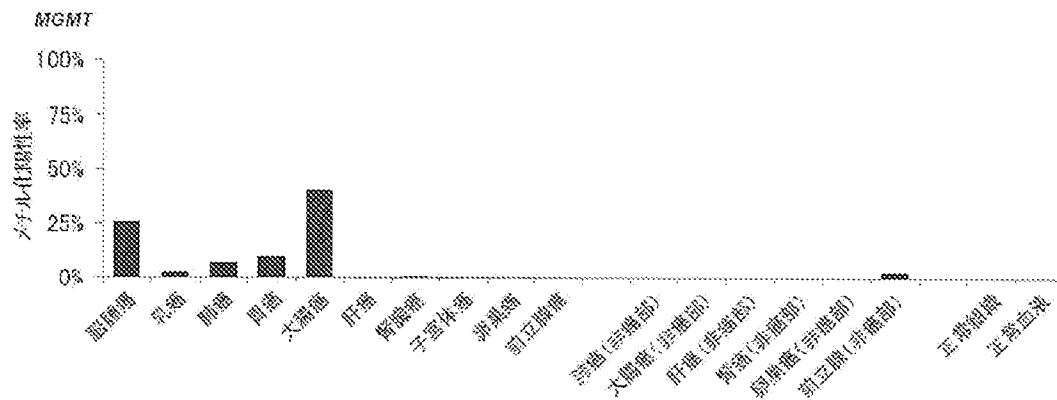
VRK2



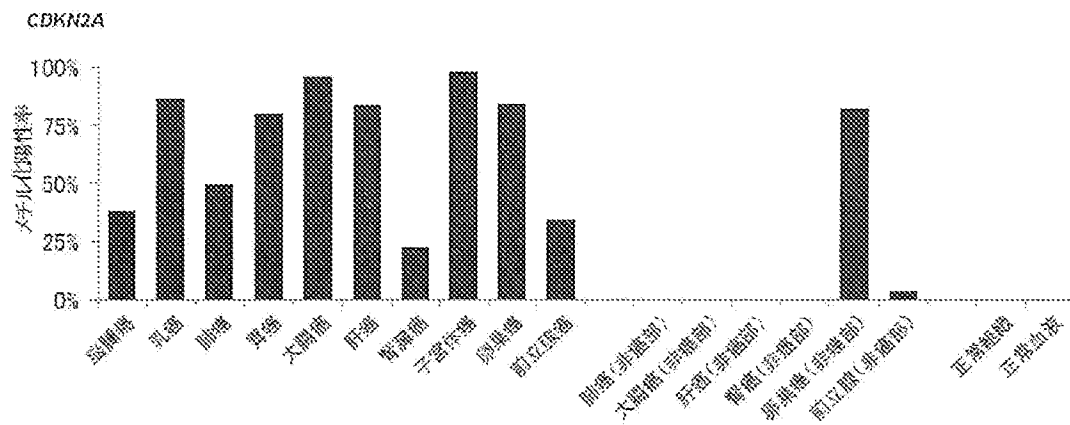
[図2C]



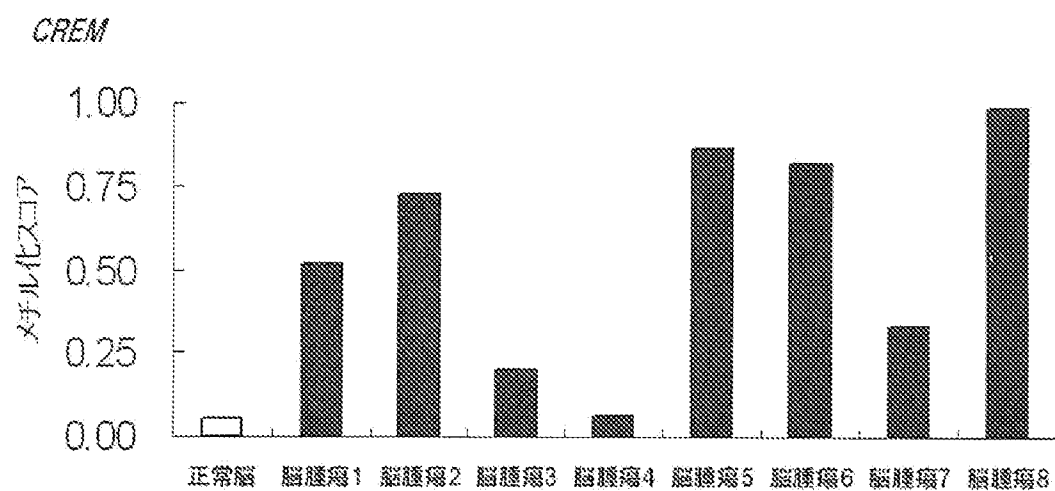
[図3A]



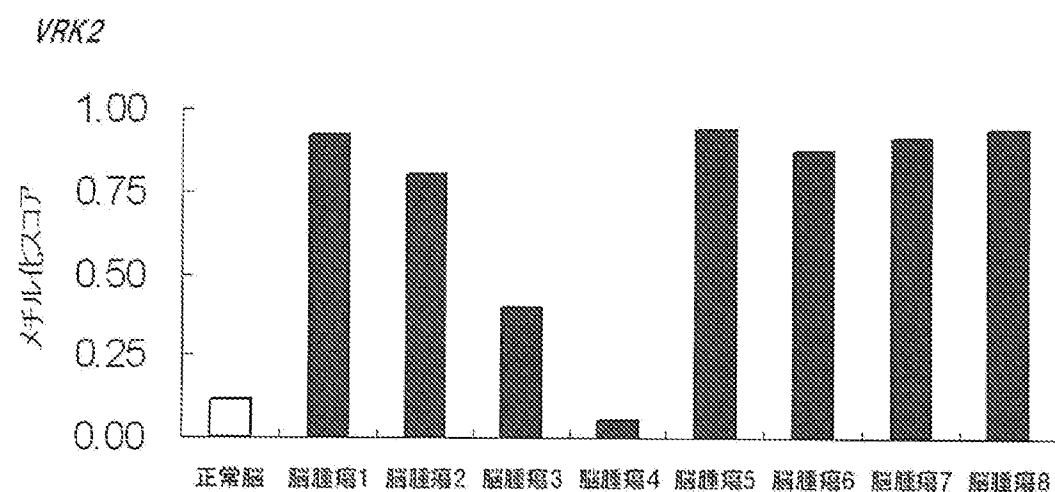
[図3B]



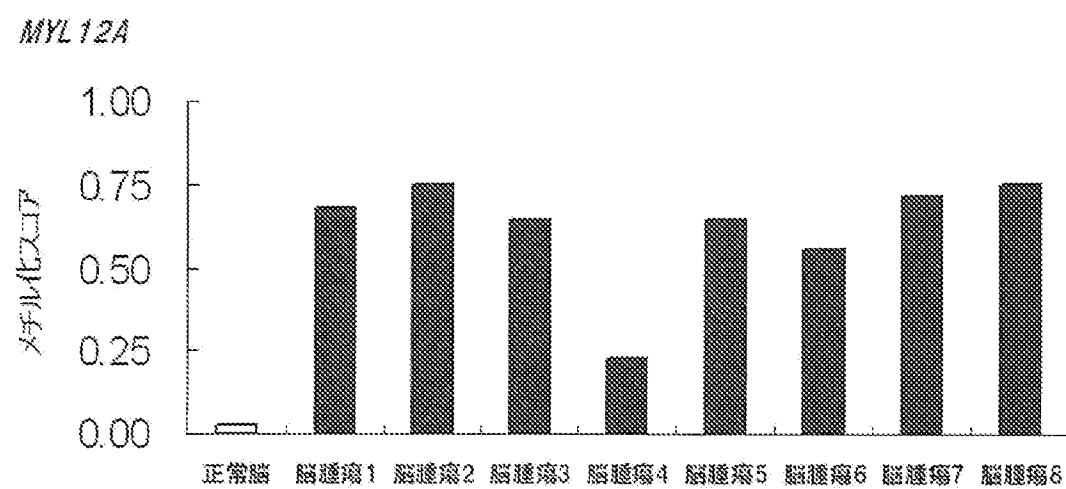
[図4A]



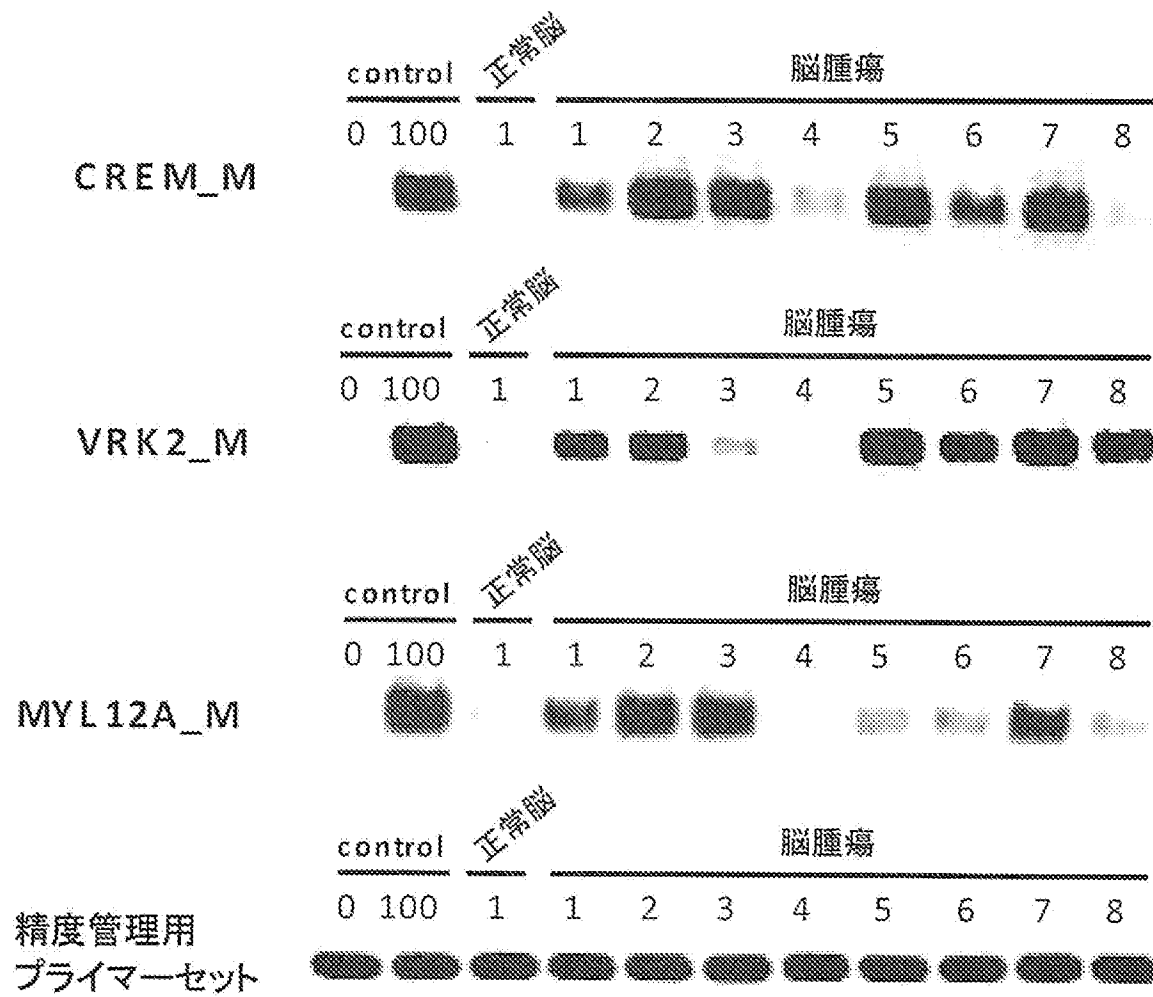
[図4B]



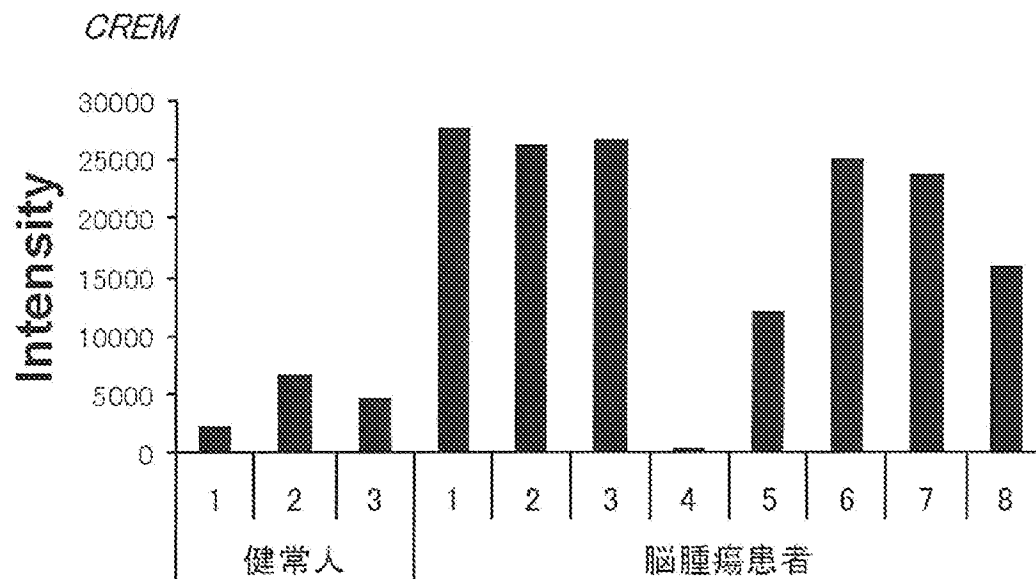
[図4C]



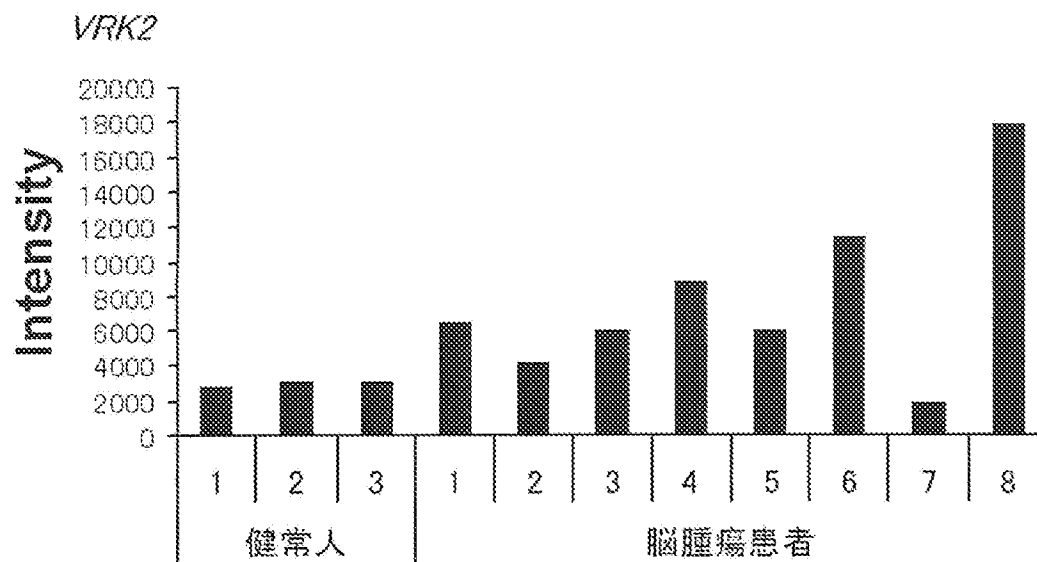
[図5]



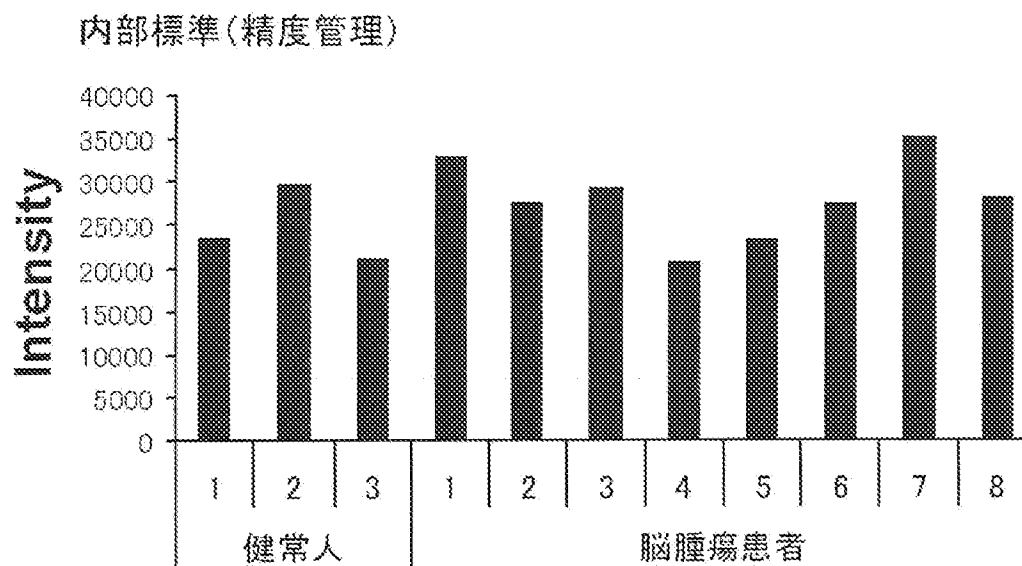
[図6A]



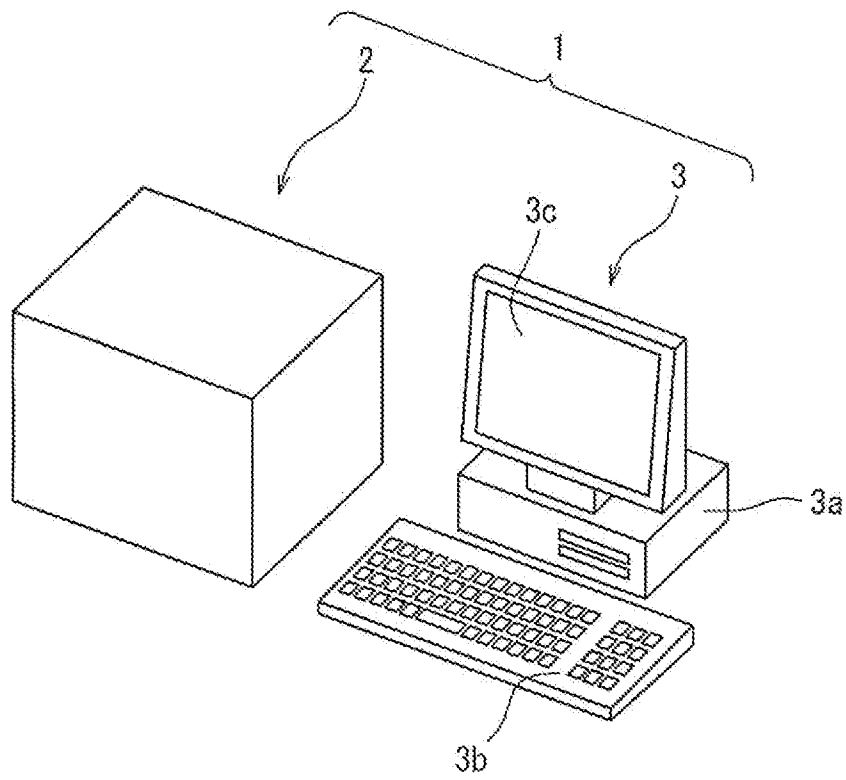
[図6B]



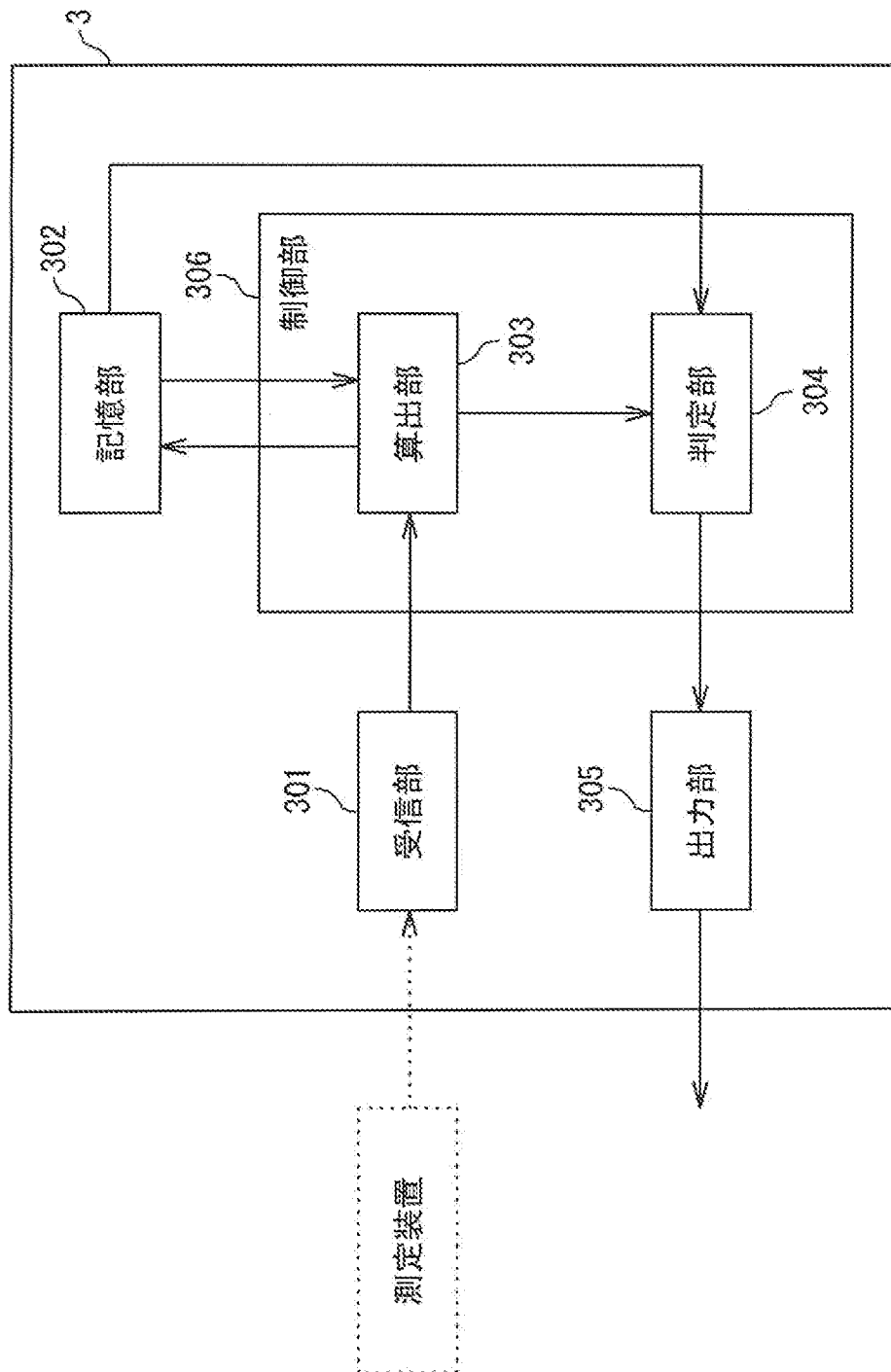
[図6C]



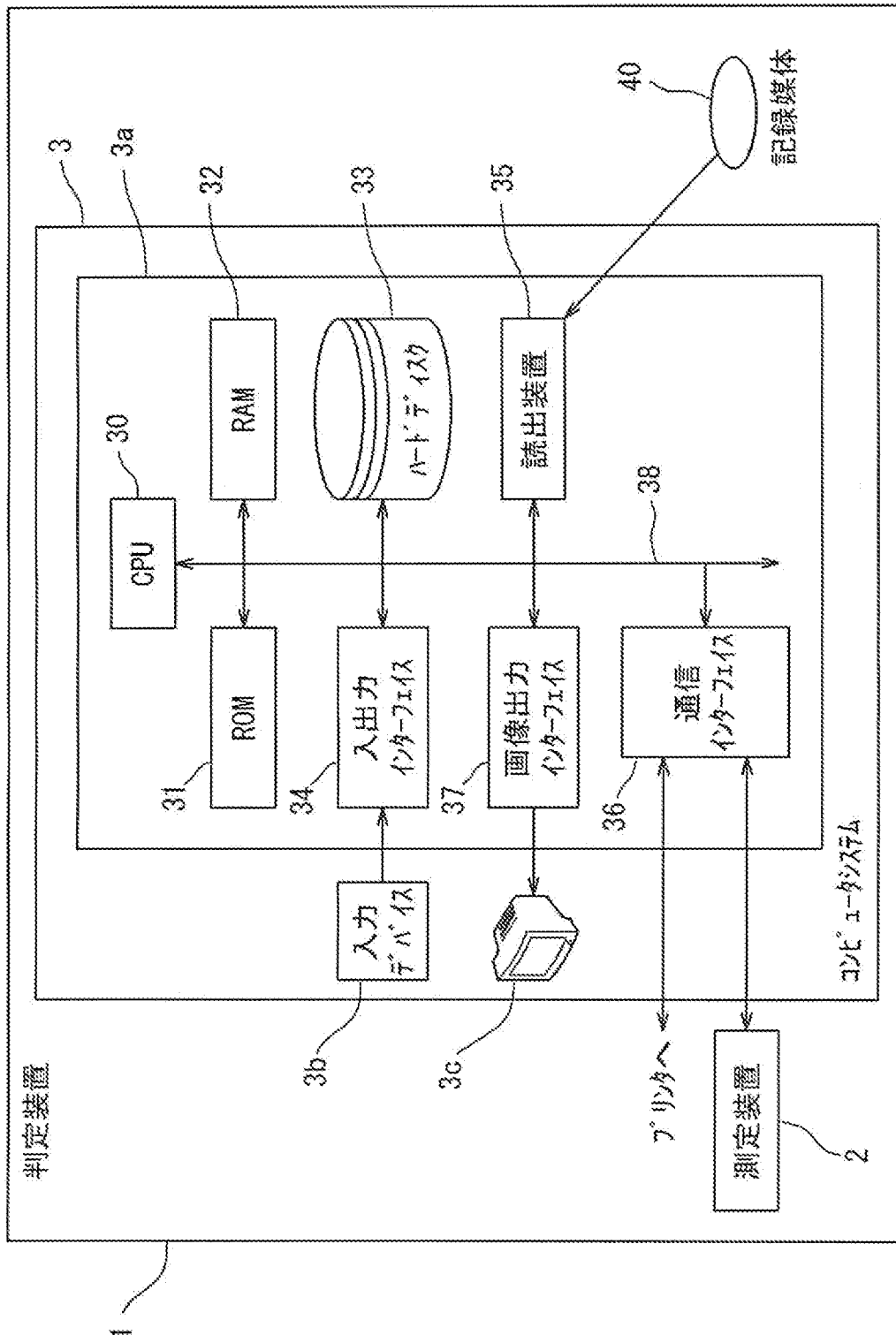
[図7]



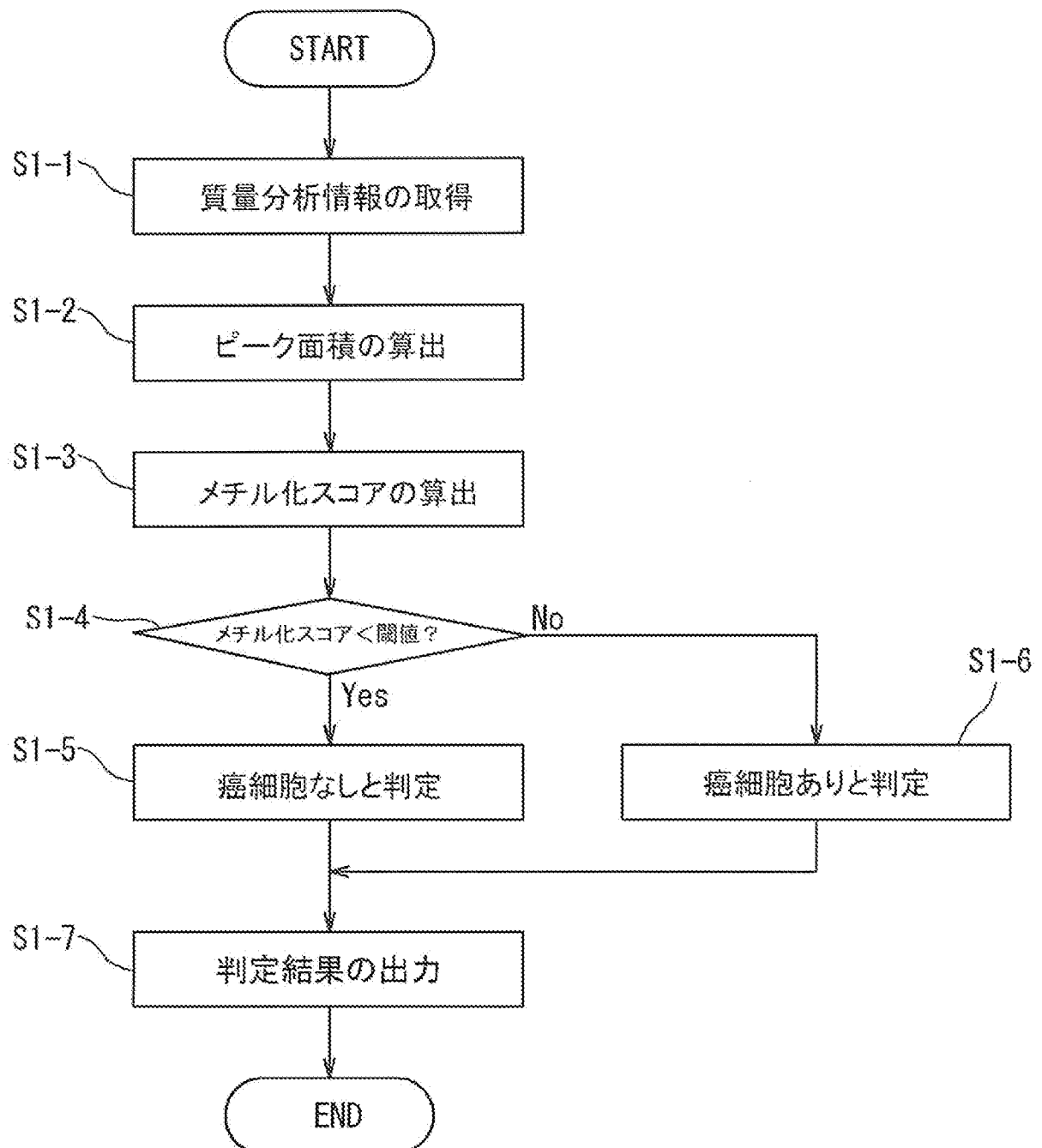
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/075336

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00-15/90, C12Q1/00-1/70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII), GeneCards

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/112845 A2 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM), 15 September 2011 (15.09.2011), & US 2011/0223180 A1	1-10
Y	WANG, H. et al. Chk2 down-regulation by promoter hypermethylation in human bulk gliomas. Life Sci., 2010, Vol. 86, p. 185-191	1-10
Y	NOUSHMEHR, H. et al. Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. Cancer Cell, 2010, Vol. 17, p. 510-522 (with Suppl.)	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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
07 October, 2013 (07.10.13)

Date of mailing of the international search report
15 October, 2013 (15.10.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/075336

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-504308 A (Hyseq, Inc.), 12 February 2002 (12.02.2002), & US 6392018 B1 & US 6392019 B1 & US 2003/0036508 A1 & US 2003/0165886 A1 & US 2003/0166909 A1 & US 2002/0132250 A1 & EP 1032666 A1 & WO 1999/027096 A1	1-10

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

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（I P C））

Int.Cl. C12N15/00-15/90, C12Q1/00-1/70

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

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）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GeneCards

C. 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
Y	WO 2011/112845 A2 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 2011. 09. 15 & US 2011/0223180 A1	1-10
Y	WANG, H. et al. Chk2 down-regulation by promoter hypermethylation in human bulk gliomas. Life Sci., 2010, Vol. 86, p. 185-191	1-10

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「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
「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
「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）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「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
「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
「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
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 7 . 1 0 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

1 5 . 1 0 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

三原 健治

4 B

2 9 3 7

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 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
Y	NOUSHMEHR, H. et al. Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. Cancer Cell, 2010, Vol. 17, p. 510-522 (with Suppl.)	1-10
Y	JP 2002-504308 A (ハイセック インコーポレイテッド) 2002.02.12 & US 6392018 B1 & US 6392019 B1 & US 2003/0036508 A1 & US 2003/0165886 A1 & US 2003/0166909 A1 & US 2002/0132250 A1 & EP 1032666 A1 & WO 1999/027096 A1	1-10