

(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  
2024年3月28日(28.03.2024)



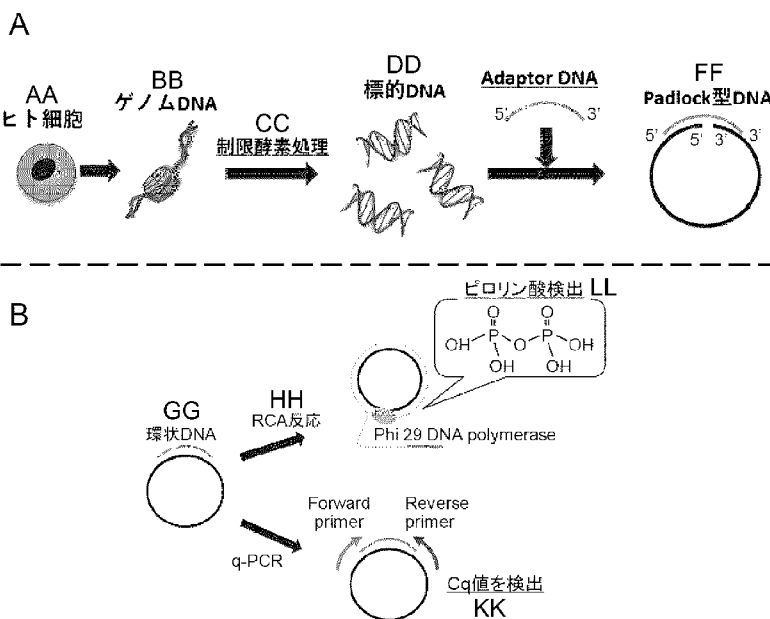
(10) 国際公開番号

WO 2024/063036 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/6876 (2018.01)  
C12Q 1/6851 (2018.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/033826
- (22) 国際出願日: 2023年9月19日(19.09.2023)
- (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 2022-149222 2022年9月20日(20.09.2022) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東京農工大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND TECHNOLOGY) [JP/
- JP]; 〒1838538 東京都府中市晴見町3-8-1 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 池袋 一典 (IKEBUKURO Kazunori); 〒1838538 東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学法人東京農工大学内 Tokyo (JP). 稲葉 真太郎 (INABA Shintaro); 〒1838538 東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学法人東京農工大学内 Tokyo (JP). 北川 雄大 (KITAGAWA Yudai); 〒1838538 東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学法人東京農工大学内 Tokyo (JP). 渡邊 貴和子 (WATANABE Kiwako); 〒1838538 東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学法人東京農工大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 弁理士法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都

(54) Title: METHOD FOR DETECTING METHYLATION OF GENOME DNA

(54) 発明の名称: ゲノムDNAのメチル化検出法



(57) Abstract: The present invention pertains to a method and a kit for detecting the methylation of target DNA. Specifically provided is a method for detecting the methylation of target DNA, the method comprising: a step in which adaptor DNA including a sequence complementary to the 5' region of the target DNA at the 5' end thereof and a sequence complementary to the 3' region of the target DNA at the 3' end thereof is bonded to the target DNA; a step in which the 5' end and the 3' end of the target DNA are ligated using a DNA ligase to obtain a circular DNA; and a step in which the methylation of the target DNA is detected on the basis of the ligation efficiency or the amplification efficiency of a rolling circle amplification (RCA) reaction in which the circular DNA serves as a template.

港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズ  
MOR Iタワー32階 Tokyo (JP).

- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 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))

---

(57) 要約: 本発明は、本発明は、標的DNAのメチル化を検出するための方法及びキットに関する。具体的には、標的DNAのメチル化を検出する方法であって、標的DNAの5'領域に相補的な配列を5'末端側を含み、かつ前記標的DNAの3'領域に相補的な配列を3'末端側を含むアダプターDNAを、前記標的DNAに結合させる工程、前記標的DNAの5'末端及び3'末端をDNAリガーゼを用いてライゲーションし、環状DNAを得る工程、前記ライゲーションの効率又は前記環状DNAを鋳型としたローリングサークル増幅(RCA)反応による増幅効率に基づいて前記標的DNAのメチル化を検出する工程を含む方法を提供する。

## 明 細 書

発明の名称：ゲノムDNAのメチル化検出法

### 技術分野

[0001] 本発明は、様々な疾病の発症前診断を可能にする、標的DNAのメチル化を検出するための方法及びキットに関する。

### 背景技術

[0002] ヒトゲノムDNAのCpGメチル化異常は、がんをはじめとする様々な疾患の発症に関与することが報告されている。つまり、疾患の発症原因となる標的遺伝子のCpGメチル化の解析結果を疾病の発症前診断に応用できると考えられる。

[0003] 現在最も一般的に用いられているメチル化検出技術として、バイサルファイトシーケンシング（非特許文献1）がある。これはバイサルファイト（亜硫酸水素塩）処理を利用した方法で、非メチル化シトシンはウラシルに脱アミノ化されるが、メチル化シトシンは脱アミノ化されないという反応を利用している。この反応後にポリメラーゼ連鎖反応（PCR）でDNAを増幅し、シーケンシングを行うことで、一塩基単位でメチル化シトシンの位置を解析できる。また近年、このバイサルファイトシーケンシングを全ゲノムに対して行うWhole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) による解析（非特許文献2）も行われている。

[0004] またメチル化特異的PCR（非特許文献3）とは、バイサルファイト処理後の配列に対して、非メチル化シトシンとメチル化シトシンに特異的に結合するプライマーを設計してPCRを行い、シーケンシングを行うものである。

[0005] そのほかにメチル化DNA免疫沈降法（Me-DIP）（非特許文献4）では、メチル化シトシン特異的な抗体を用いて免疫沈降法を行い、メチル化シトシンを含むDNA断片を取り出し、シーケンシングを行うものである。

[0006] またメチル化感受性制限酵素を用いてDNAを切断し、DNA増幅の有無をマイクロアレイでの標識物質の発光により評価する方法（特許文献1）や、メチ

ル化結合タンパク質をメチル化配列に結合させ、その配列を増幅、シーケンシングを行う方法（特許文献2）などが報告されている。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0007] 特許文献1：特許第4189495号

特許文献2：米国特許出願公開US2007/0161029 A1

### 非特許文献

[0008] 非特許文献1：Frommer, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第89号第1827-1831頁(1992)

非特許文献2：Lister, R. et al., Nature, 第462巻第315-322頁 (2009)

非特許文献3：Herman, JG et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第93号第9821-9826頁(1996)

非特許文献4：Weber, M. et al., Nature genetics, 第37号第853-862頁 (2005)

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0009] 従来技術で主に用いられているバイサルファイト処理とシーケンシングは、迅速で簡便な検出手法としては課題がある。1つには、バイサルファイト処理では反応が不十分な場合には、配列中のすべての非メチル化シトシンの変換が不完全になる可能性がある。また高濃度の亜硫酸水素塩で長時間反応させるため非特異的なDNAの切断が起こり、多くのDNA試料と時間を要するという問題点がある。またシーケンシングのためにPCRなどを利用した遺伝子の増幅を行う場合、プライマー配列によって適用できる塩基配列に制限がある。シーケンシングは専用の機器を必要とし結果の解析も行う必要がある。そのため多くの費用と時間を要する。

[0010] 特にバイサルファイトシーケンシングに関しては、バイサルファイト処理していない試料とバイサルファイト処理を行った試料の2つに対して行い、

2つの配列を比較してメチル化シトシンの位置を決定するため、より多くのシーケンシング解析が必要となる。WGBSにおいては全ゲノムに対して上記の操作を行うため、簡易な検出法にはなり得ないと考えられる。

[0011] またバイサルファイト処理、シーケンシングを用いないCpGメチル化迅速検出法においても標的遺伝子への特異性が低く、適用できる配列が限られており、汎用性が低いという課題がある。

[0012] そこで本発明は、標的DNAのメチル化を迅速かつ簡便に検出するための方法及び手段を提供することを目的とする。また本発明は、標的DNAのメチル化を検出することにより、そのようなDNAのメチル化に関連する疾患又は障害を診断又はモニタリングするための方法及び手段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

[0013] 本発明者は上記課題を解決するため鋭意検討を行った結果、メチル化の標的となるDNAをPadlock（錠前）型プローブ（DNAアダプター）と結合させ、標的DNAの5'末端及び3'末端をライゲーションした場合に、メチル化の有無又はメチル化の程度に応じて、生じるライゲーションの効率に変化することを見出し、本発明を完成するに至った。

[0014] 例えば、本発明は以下の実施形態を包含する：

[1] 標的DNAのメチル化を検出する方法であって、

標的DNAの5'領域に相補的な配列を5'末端側に含み、かつ前記標的DNAの3'領域に相補的な配列を3'末端側に含むアダプターDNAを、前記標的DNAに結合させる工程、

前記標的DNAの5'末端及び3'末端をDNAリガーゼを用いてライゲーションし、環状DNAを得る工程、

前記ライゲーションの効率又は前記環状DNAを鋳型としたローリングサークル増幅（RCA）反応による増幅効率に基づいて前記標的DNAのメチル化を検出する工程

を含む方法。

[2] サンプルDNAを少なくとも1種の制限酵素で切断し、標的DNAを得る工程

をさらに含む、[1]に記載の方法。

[3] 前記制限酵素が、4~8塩基を認識してDNAを切断する制限酵素を含む、  
[2]に記載の方法。

[4] 前記5'領域及び／又は前記3'領域が5~30塩基を含む領域である、[1]  
] ~ [3] のいずれかに記載の方法。

[5] 前記アダプターDNAが、10~60塩基の配列を有する、[1] ~ [4] の  
いずれかに記載の方法。

[6] 前記アダプターDNAを前記標的DNAに結合させる工程において、  
前記標的DNAとして、一本鎖のDNAを使用し、  
前記アダプターDNAとして、前記5'領域に相補的な配列と前記3'領域に相補  
的な配列の部分が一本鎖であるDNAを使用する、[1] ~ [5] のいずれかに  
記載の方法。

[7] 前記ライゲーションの効率を、前記環状DNAを鋳型としたローリングサ  
ークル増幅 (RCA) 反応により決定することを含む、[1] ~ [6] のいずれ  
かに記載の方法。

[8] 前記RCA反応が、前記アダプターDNAをプライマーとして使用して前記  
環状DNAを鋳型としたRCA反応である、[1] ~ [7] のいずれかに記載の方  
法。

[9] 前記ライゲーションの効率を、前記環状DNAを鋳型とした定量ポリメ  
ラーゼ連鎖反応 (q-PCR) により決定することを含む、[1] ~ [6] のいずれ  
かに記載の方法。

[10] 前記アダプターDNAが結合する前記標的DNAの領域が増幅されるよう  
にq-PCRが行われる、[9]に記載の方法。

[11] 前記標的DNAが、疾患又は障害に関連してメチル化頻度が変化する領  
域を含む、[1] ~ [10] のいずれかに記載の方法。

[12] 前記環状DNAが、50~500塩基のサイズを有する、[1] ~ [11]  
のいずれかに記載の方法。

[0015] [13] 標的DNAのメチル化を検出するためのキットであって、

前記標的DNAの5'領域に相補的な配列を5'末端側に含み、かつ前記標的DNAの3'領域に相補的な配列を3'末端側に含むアダプターDNAと、

DNAリガーゼと

を含むキット。

[14] 前記5'領域及び／又は前記3'領域が5～30塩基を含む領域である、[13]に記載のキット。

[15] 少なくとも1種の制限酵素をさらに含む、[13]又は[14]に記載のキット。

[16] 前記制限酵素が、4～8塩基を認識してDNAを切断する制限酵素を含む、[15]に記載のキット。

[17] ローリングサークル増幅(RCA)反応用のポリメラーゼをさらに含む、[13]～[16]のいずれかに記載のキット。

[18] ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)用のプライマーセット及び／又はポリメラーゼをさらに含む、[13]～[16]のいずれかに記載のキット。

[0016] [19] 標的DNAのメチル化の検出に使用するための、前記標的DNAの5'領域に相補的な配列を5'末端側に含み、かつ前記標的DNAの3'領域に相補的な配列を3'末端側に含むアダプターDNAと、DNAリガーゼとの使用。

[19-1] 前記5'領域及び／又は前記3'領域が5～30塩基を含む領域である、[19]に記載の使用。

[0017] [20] 対象において標的DNAのメチル化に関連する疾患若しくは障害を診断若しくはモニタリングする方法又は対象において標的DNAのメチル化に関連する疾患若しくは障害の診断若しくはモニタリングを補助する方法であって、

前記対象に由来するゲノムDNAを準備する工程、

前記ゲノムDNAをサンプルDNAとして使用して、[1]～[12]のいずれかに記載の方法を実施し、前記標的DNAのメチル化を検出する工程を含む方法。

[21] 前記対象がヒトである、[20]に記載の方法。

[22] 前記標的DNAのメチル化に関連する疾患若しくは障害が、統合失調症

、うつ病を含む精神疾患、又はがんである、[20]又は[21]に記載の方法。

[23] 標的DNAのメチル化に関連する疾患又は障害を診断又はモニタリングするためのキットであって、

前記標的DNAの5'領域に相補的な配列を5'末端側に含み、かつ前記標的DNAの3'領域に相補的な配列を3'末端側に含むアダプターDNAと、

DNAリガーゼとを含むキット。

[24] 前記5'領域及び／又は前記3'領域が5~30塩基を含む領域である、[23]に記載のキット。

## 発明の効果

[0018] 本発明により、簡便かつ迅速にDNAのメチル化を検出するための方法及び手段が提供される。本発明に係る方法は、あらゆる塩基配列からなるDNAに適用することができ、例えば細胞から抽出したゲノムDNAのメチル化頻度を正確に評価できることが確認されている。また、非常に簡便であるため、DNAのメチル化について検出が望まれるあらゆる分野、例えば疾病の発症前診断などに適用することが可能である。

## 図面の簡単な説明

[0019] [図1]DNAメチル化によるライゲーション効率の変化を利用したDNAメチル化検出の概要を示す図である。Aは、細胞由来のゲノムDNAからPadlock型DNAが得られるまでを示し、Bは、環状DNAにおけるライゲーション効率を決定する方法の例を示す。

[図2]メチル化DNA及び非メチル化DNAを用いたアダプターDNAの結合及びライゲーション反応後の結果を示す電気泳動ゲルの写真である。AはDRD2についての結果、BはDRD2の相補鎖であるDRD2 comp DNAについての結果、CはBMP3についての結果を示す。

[図3]メチル化DNA及び非メチル化DNAを用いたアダプターDNAの結合及びライゲーション反応後、RCAを行った結果を示すグラフである。Aは、BMP3 DNA (

配列番号5及び6) について経時に伴う化学発光強度の変化を示す。Bは、DRD2 comp DNA (配列番号3及び4) について経時に伴う化学発光強度の変化を示す。

[図4]メチル化DNA及び非メチル化DNAを用いたアダプターDNAの結合及びライゲーション反応後、q-PCRを行った結果を示すグラフである。

[図5]VEGF遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNA及び非メチル化DNAを用いたアダプターDNAの結合及びライゲーション反応後、所定の時間にわたりRCAを行った結果を示す電気泳動ゲルの写真である。

[図6]VEGF遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNA及び非メチル化DNAを用いたアダプターDNAの結合及びライゲーション反応後、RCAを行った結果を示すグラフである。

[図7]ゲノムDNAを用いたアダプターDNAの結合及びライゲーション反応後、RCAを行った結果を示すグラフである。Aは、AR遺伝子プロモーター領域のメチル化レベルが異なる細胞Du145及びLNCaPから抽出したgDNAを用いた場合の結果を示すグラフである。Bは、Aの結果を、反応時間0分を基準として相対化した結果を示すグラフである。

### 発明を実施するための形態

[0020] 本出願は、2022年9月20日に出願された日本国特許出願番号2022-149222の優先権を主張するものであり、その全内容を参照により本明細書に援用する。

[0021] 以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、標的DNAにメチル化が含まれる場合に、ゲノムDNAを制限酵素処理した後、標的の一本鎖DNAとPadlock (錠前) 型プローブ (アダプターDNA) を結合させて標的一本鎖DNAを自己ライゲーションさせると (図1のA)、メチル化の程度により、そのライゲーション効率や得られる産物を鋳型としたローリングサークル増幅 (RCA) 反応の増幅効率が大きく変化するという知見に部分的に基づいている。そして、ライゲーション反応で生成した環状一本鎖DNAを、定量PCR (q-PCR) やローリングサークル増幅 (RCA) 反応により検出す

ると(図1のB)、その反応効率に基づいてメチル化程度を正確に判定することができる。また、ライゲーション反応で生成した環状一本鎖DNAをRCA反応により増幅すると(図示せず)、その増幅効率に基づいてメチル化程度を正確に判定することができる。本発明は、どのような塩基配列を有する標的DNAに対しても適用でき、Padlock(錠前)型プローブ(アダプターDNA)を用いるためゲノムDNA(特にヒトゲノムDNA)の他の塩基配列に影響されず、汎用性の高い検出手段となる。

- [0022] 一態様において、本発明は、標的DNAのメチル化を検出する方法であって、  
標的DNAの5'領域に相補的な配列を5'末端側に含み、かつ前記標的DNAの3'領域に相補的な配列を3'末端側に含むアダプターDNAを、前記標的DNAに結合させる工程、  
前記標的DNAの5'末端及び3'末端をDNAリガーゼを用いてライゲーションし、環状DNAを得る工程、  
前記ライゲーションの効率又は前記環状DNAを鋳型としたローリングサークル増幅(RCA)反応による増幅効率に基づいて前記標的DNAのメチル化を検出する工程  
を含む方法に関する。

- [0023] 本明細書中、「標的DNA」とは、メチル化の検出の対象となる塩基又は領域を含むDNAを指す。例えば、標的DNAは、疾患又は障害に関連してメチル化頻度が増加する塩基又は領域(遺伝子、プロモーターなど)を含む。一例として、ドーパミン受容体D2(DRD2)遺伝子における、DNAのメチル化(シトシンのメチル化)が統合失調症に関連することが報告されている領域(「Low methylation rates of dopamine receptor D2 gene promoter sites in Japanese schizophrenia subjects」Yuta Yoshino et al., The World Journal of Biological Psychiatry 2016, 17, 449-456)、骨形成因子3(BMP3)遺伝子のプロモーターにおける、DNAのメチル化が直腸がんに関連することが報告されている領域(「BMP3 promoter hypermethylation in plasma-derived cell-free DNA in colorectal cancer patients」Parisa Rokni et al., Genes an

d Genomics 2018, 40, 423-428)、炎症に関与することが報告されている血管内皮増殖因子(VEGF)遺伝子のプロモーターにおいて、G4構造が形成される領域(「Facilitation of a structural transition in the polypurine/polypyrimidine tract within the proximal promoter region of the human VEGF gene by the presence of potassium and G-quadruplex-interactive agents」 Daekyu Sun et al., Nucleic Acids Research 2005, 33, 6070-6080、「Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress」, Napoleone Ferrara, Endocrine Reviews 2004, 25, 581-611)、そしてアンドロゲン受容体遺伝子のプロモーターにおける、DNAのメチル化が前立腺がんに関連することが報告されている領域(「Methylation of the androgen receptor minimal promoter silences transcription in human prostate cancer」 Hidefumi Kinoshita et al., Cancer Research 2000, 60, 3623-3630)が挙げられるが、これらに限定されるものではなく、疾患又は障害に関連してメチル化頻度が変化するゲノムDNAの領域は多数報告がある。本発明では、1種類の標的DNAのメチル化を検出するだけでなく、複数種の標的DNAのメチル化を検出することも可能である。標的DNAは、当技術分野で公知の任意の方法により調製することができる。

[0024] 本明細書中、「メチル化」とは、DNAのシトシン又はアデニン塩基、特にCpGアイランド中のシトシン塩基、にメチル基が付加されること又は付加された状態を指す。「メチル化の検出」とは、標的DNA中の塩基のメチル化の有無を検出すること、標的DNA中の塩基のメチル化の程度を検出すること、標的DNAの特定の塩基のメチル化の有無を検出することを含む。

[0025] 標的DNAは、サンプルDNAから調製してもよい。サンプルDNAは、標的DNAを含む2本鎖DNAであり、メチル化について検出しようとする配列を含むDNAであれば特に限定されるものではなく、ゲノムDNA、合成されたDNAなどとしてすることができる。その由来も特に限定されるものではなく、生体(例えば細胞、組織、液体など)及び合成(例えばDNAライブラリなど)の任意の供与源に由来する2本鎖DNAを用いることができる。生体供与源の場合、その生体も特に

限定されるものではなく、脊椎動物（例えば哺乳類、鳥類、爬虫類、魚類、両生類など）、無脊椎動物（例えば昆虫、線虫、甲殻類など）、原生生物、植物、真菌、細菌、ウイルスなどの任意の生体に由来する供与源を用いることができる。好ましい実施形態では、サンプルDNAは、哺乳動物、特にヒト、実験動物（マウス、ラット、サル等）に由来するDNAである。

[0026] サンプルDNAは、当技術分野で公知の方法により調製することができる。例えば、細胞からサンプルDNAを調製する場合には、Proteinase Kのようなタンパク質分解酵素、チオシアン酸グアニジン・グアニジン塩酸などのカオトロピック塩、Tween及びSDSなどの界面活性剤、あるいは市販の細胞溶解用試薬を用いて、細胞を溶解し、それに含まれる核酸、すなわちゲノムDNAを溶出することができる。DNAの調製を行うために、市販のキットが販売されており、目的とするサンプルDNAを簡便に精製することが可能である。

[0027] サンプルDNAから標的DNAを調製する場合、本発明に係る方法は、サンプルDNAを、少なくとも1種の制限酵素で切断し、標的DNAを得るステップを含んでもよい。制限酵素は、標的DNA、すなわちメチル化について検出対象となる領域を含むDNAが生じるように、標的DNAの周辺の配列情報を基に選択することが好ましい。このような制限酵素の選択は、当業者であればメチル化検出の目的に応じて（特定の塩基又は特定の領域におけるメチル化の検出など）、適宜行うことができる。あるいは、サンプルDNAを単に断片化する目的で、適当な制限酵素を使用してもよい。好ましい実施形態では、制限酵素は、4~8塩基を認識してDNAを切断する制限酵素を含む。本発明において使用可能な制限酵素は、特に限定されるものではなく、例えば、BciI 130 I（4塩基認識）、Msp I（4塩基認識）、Alu I（4塩基認識）、BamH I（6塩基認識）、Cla I（6塩基認識）、EcoR I（6塩基認識）、EcoR V（6塩基認識）、Hae III（4塩基認識）、Hind III（6塩基認識）、Hinf I（5塩基認識）、Hpa I（6塩基認識）、Kpn I（6塩基認識）、Not I（8塩基認識）、Pov II（6塩基認識）、Pst I（6塩基認識）、Sac I（6塩基認識）、Sal I（6塩基認識）、Sau3A I（4塩基認識）、Sma I（6塩基認識）、Taq I（4塩基認識）などが挙げられる。

一実施形態において、使用する制限酵素は、メチル化感受性制限酵素ではない又はそれを含まない。

[0028] 制限酵素は、1種の制限酵素を使用してもよいし、複数種の制限酵素を使用してもよい。標的DNAの両末端が別の制限酵素で切断されることにより、標的DNAの自己アニーリングを回避することが可能となる。複数種を使用する場合には、それらの制限酵素を同時に使用してもよいし、別の反応として順に使用してもよい。

[0029] サンプルDNAの切断後、適当な長さを有するDNAを選択する工程を行ってもよい。例えば、ゲルろ過により、切断されたDNAを篩にかけ、適当な長さを超える又は適当な長さ未満のDNAを取り除くことができる。

[0030] 本発明に係る方法では、標的DNAに、アダプターDNAを結合させる。その前又はそれと同時に、標的DNAを一本鎖化することが好ましい。当技術分野で公知の方法、例えば加熱処理によって、標的DNAを一本鎖化できる。

[0031] アダプターDNAは、図1のAに示すように、標的DNAとアダプターDNAとの結合によってPadlock（錠前）型DNAが生じるように設計する。このようなアダプターDNAの設計は当技術分野で公知であり、標的DNAの配列情報、使用した制限酵素の種類などを考慮して行われる。一実施形態では、アダプターDNAは、標的DNAの5'領域に相補的な配列を5'末端側に含み、かつ標的DNAの3'領域に相補的な配列を3'末端側に含む。

[0032] 「相補的」又は「相補性」とは、塩基対合する核酸の塩基の対応を指し、DNAの場合、アデニン（A）とチミン（U）、グアニン（G）とシトシン（C）との対応である。本明細書では、完全な相補性（100%相補性）でなくても、アダプターDNAが標的DNAに結合できる程度の部分的な相補性であってもよく、例えば90%相補性、好ましくは95%相補性を有するアダプターDNAが標的DNAに結合できる場合がある。

[0033] 具体例として、標的DNAの5'領域が5'→3'配向でATGCCであり、3'領域が5'→3'配向でTAGCCである場合、アダプターDNAは、5'→3'配向で、5'末端側にGGCATを含み、3'末端側にGGCTAを含む。好ましい実施形態において、この標的

DNAの5'領域及び／又は3'領域は、5～30塩基を含む領域として設定する。例えば、標的DNAは、上述の通り特定の制限酵素により断片化されているため、標的DNAの5'領域及び／又は3'領域としてその制限酵素の認識配列を利用することも可能である。

[0034] アダプターDNAは、標的DNAに対して結合能を有するように、上述した5'末端側の配列及び3'末端側の配列を含み、10塩基以上の長さ、例えば10～100塩基、好ましくは10～60塩基、より好ましくは30～60塩基の長さの配列を有することができる。アダプターDNAは、5'末端側の配列と3'末端側の配列との間に1～数塩基のスペーサーを含んでいてもよい。一実施形態において、アダプターDNAとして、少なくとも5'領域に相補的な配列と3'領域に相補的な配列の部分が一本鎖であるDNAを使用する（他の部分は二本鎖であってもよい）。例えば、標的DNAとして、一本鎖のDNAを使用し、アダプターDNAとして、5'領域に相補的な配列と3'領域に相補的な配列の部分が一本鎖であるDNAを使用する。アダプターDNAは、5'末端側の配列と3'末端側の配列との間にスペーサーを含まないことが好ましく、この場合には、アダプターDNAの全長を一本鎖とすることができる。

[0035] アダプターDNAは、当技術分野で公知の方法により調製することができ、例えばオリゴヌクレオチド合成器を使用して合成することができる。

[0036] 標的DNAにアダプターDNAが結合した後、図1のAに示すようなPadlock型DNAが得られ、標的DNAの5'末端及び3'末端は近接している。この標的DNAの5'末端及び3'末端をDNAリガーゼを用いてライゲーションし、環状DNAを得る。ライゲーションに使用し得るDNAリガーゼは、DNAの末端同士をリン酸ジエステル結合で連結（ライゲート）する酵素であれば、当技術分野で公知のリガーゼを使用することができる。そのようなDNAリガーゼの代表例は、T4 DNAリガーゼであるが、これに限定されるものではない。

[0037] 上記のライゲーション反応により、図1のBに示すような環状DNAが得られる。一実施形態では、安定性を考慮して、環状DNAが、50～500塩基、好ましくは50～300塩基のサイズを有するように、標的DNA及びアダプターDNAを設定す

る。

- [0038] 標的DNAとアダプターDNAとの結合は、両者を含む反応液をインキュベーションすることにより実施することができる。また、標的DNAとアダプターDNAとの結合、及びライゲーションを同時に行うことも可能であり、標的DNAとアダプターDNAをDNAリガーゼの存在下でインキュベーションすることにより行うことができる。そのようなインキュベーションの条件は、使用する酵素の種類に応じて適宜設定することができる。反応後、不要な試薬や成分を洗浄・除去することが好ましい。
- [0039] このようにして生じるライゲーションの効率、及び／又は得られる環状DNAを鋳型としたローリングサークル増幅（RCA）反応による増幅効率は、標的DNAのメチル化の有無又はメチル化の程度に応じて変化する。そのため、ライゲーションの効率、又は環状DNAを鋳型としたRCA反応による増幅効率に基づいて、標的DNAのメチル化を検出する。
- [0040] 本発明に関連して、「ライゲーションの効率」とは、標的DNAのメチル化によって影響を受ける反応、例えばアダプターDNAの標的DNAへの結合及び／又は標的DNAの5'末端及び3'末端のライゲーションなどの反応の結果として、最終的に生じるライゲーションの効率を意味する。メチル化の検出は、例えば、対照として非メチル化DNA、メチル化DNA（未知の程度のメチル化若しくは既知の程度のメチル化）などを使用して得られたライゲーションの効率と比較して行うことができる。標的DNAの配列やライゲーション反応の条件等によって、メチル化によりライゲーションの効率が向上する場合と低下する場合の両方があり得る。あらかじめ、標的DNAのメチル化によりライゲーションの効率が向上するか低下するかを確認しておくことにより、被検対象となる標的DNAのライゲーションの効率に基づいて、メチル化を検出することができる。
- [0041] ライゲーションの効率は、例えば、図1のBに示すように、得られた環状DNAを鋳型としたローリングサークル増幅（RCA）反応により、又は環状DNAを鋳型とした定量ポリメラーゼ連鎖反応（q-PCR）により、あるいは、例えば実施

例1及び4に示すように、ライゲーション反応後の環状DNAを含む反応産物の電気泳動により、決定することができる。

[0042] RCA反応は、当技術分野で公知であり、RCA反応用のポリメラーゼ（例えば、phi29 DNAポリメラーゼ、Bst DNAポリメラーゼ（ラージフラグメント）、Bca(exo-)DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント、Vent(exo-)DNAポリメラーゼ（Vent DNAポリメラーゼからエクソヌクレアーゼ活性を除いたもの）、DeepVent(exo-)DNAポリメラーゼ（DeepVent DNAポリメラーゼからエクソヌクレアーゼ活性を除いたもの）及びKOD DNAポリメラーゼ等）を使用し、環状DNAを鋳型として行うことができる。RCA反応は、アダプターDNAを増幅反応の起点となるプライマーとして使用して行ってもよいし、あるいは標的DNAの他の領域に対して設計されたプライマーを別に添加して行ってもよい。別のプライマーを添加した場合には、検出の特異性がより高まる。RCA反応の条件は、選択したポリメラーゼの種類に応じて、適宜設定する。例えばphi29 DNAポリメラーゼを用いる場合は、その反応至適温度である25～38℃付近（約30℃）で反応を行うことが望ましい。

[0043] ライゲーションの効率が低い場合には、RCA反応がより進行する。そのため、RCA反応の進行を評価することによって、ライゲーション効率の変化、ひいてはDNAのメチル化を検出することができる。RCA反応の進行の評価は、当技術分野で慣用的に用いられている方法又は手段を使用することができる。例えば、増幅反応時に生じるピロリン酸（PPi）を検出するための試薬が市販されており、そのような試薬を使用して簡便にRCA反応の進行を評価することができる。あるいは、増幅反応時に取り込まれる基質を標識（例えば、蛍光標識、放射性標識、酵素標識など）し、増幅産物への標識の取り込みを検出することによってRCA反応の進行を評価することも可能である。

[0044] q-PCRもまた当技術分野で公知であり、PCR反応用のポリメラーゼ及びプライマーセットを使用し、環状DNAを鋳型として行うことができる。ここで、q-PCRは、アダプターDNAが結合する標的DNAの領域（つまり、ライゲーションした部分を含む領域）が増幅されるように行われることが好ましい。そのため

、プライマーセットは、標的DNAの、アダプターDNAが結合する領域が増幅されるように設計される（例えば、図1のB）。プライマーセットの設計は、当技術分野で公知であり、標的DNA（環状DNA）の配列情報やT<sub>m</sub>値を考慮して適宜行うことができる。

[0045] ライゲーションの効率が低い場合には、q-PCR反応がより進行する。そのため、q-PCR反応の進行を評価することによって、ライゲーション効率の変化、ひいてはDNAのメチル化を検出することができる。q-PCR反応の進行の評価は、当技術分野で慣用的に用いられている方法又は手段を使用して行うことができる。例えば、増幅産物となる核酸を検出するための試薬（例えば、SYBR Greenと呼ばれるシアニン系色素）が市販されており、そのような試薬を使用して簡便にq-PCR反応の進行を評価することができる。あるいは、増幅反応時に取り込まれる基質を標識（例えば、蛍光標識、放射性標識、酵素標識など）し、増幅産物への標識の取り込みを検出することによってq-PCR反応の進行を評価することも可能である。

[0046] あるいは、ライゲーションの効率は、ライゲーション反応後の環状DNAを含む反応産物の電気泳動によっても検出することができる。ライゲーションの効率が変化した場合、ライゲーション反応後の反応産物の数及び分子量（サイズ）も変化することから、電気泳動を行うことで、そのようなライゲーション効率の変化を検出することができる。

[0047] 別の実施形態では、環状DNAを鋳型としたRCA反応による増幅効率に基づいて、標的DNAのメチル化を検出する。標的DNAによって生じた環状DNAがメチル化塩基を含む場合、その環状DNAを鋳型としたRCA反応による増幅効率が、メチル化塩基を含まない環状DNAを用いた場合から変化する（例えば、メチル化塩基を含む場合は、RCA反応による増幅効率が高くなる）。これは、メチル化によって鋳型となる環状DNAの立体構造や全体の嵩に変化が生じるためと考えられる。RCA反応による増幅効率は、上述したようにRCA反応の進行を評価することによって決定することができる。標的DNAの配列やRCA反応の条件等によって、メチル化によりRCA反応の増幅効率が向上する場合と低下する場合の

両方があり得うる。あらかじめ、標的DNAのメチル化によりRCA反応の増幅効率が向上するか低下するかを確認しておくことにより、被検対象となる標的DNAのRCA反応の増幅効率に基づいて、メチル化を検出することができる。

[0048] 上述のようにして、標的DNAのメチル化を検出することができる。本発明に係る方法は、制限酵素及びアダプターDNAを適当に選択することによって、原理的には任意の塩基配列を有する標的DNAのメチル化の検出に適用することができる。また、当技術分野で慣用的に行われている簡便な手法を利用しているため、当業者であれば簡便かつ迅速に実施することができる。

[0049] また本発明に係る標的DNAのメチル化検出方法は、DNAのメチル化に関連する疾患又は障害の診断又はモニタリングに応用することができる。すなわち、疾患又は障害に関連してメチル化頻度が変化する領域（遺伝子、プロモーターなど）が存在することが知られており、そのような「DNAのメチル化に関連する疾患又は障害」をDNAのメチル化を検出することにより、診断又はモニタリングすることができる。

[0050] したがって、さらなる態様において、本発明は、対象において標的DNAのメチル化に関連する疾患若しくは障害を診断若しくはモニタリングする方法又は対象において標的DNAのメチル化に関連する疾患若しくは障害の診断若しくはモニタリングを補助する方法であって、

前記対象に由来するゲノムDNAを準備する工程、

前記ゲノムDNAをサンプルDNAとして使用して、前記標的DNAのメチル化検出方法を実施し、前記標的DNAのメチル化を検出する工程を含む方法、並びにそのためのキットに関する。

[0051] DNA（標的DNA）のメチル化に関連する疾患又は障害は、当技術分野でDNAのメチル化との関連性が報告されている疾患又は障害であれば特に限定されるものではなく、例えば統合失調症やうつ病などの精神疾患、がんなどが挙げられる。

[0052] 疾患又は障害の診断又はモニタリングとは、その疾患又は障害の発症、進行、再発、悪化又は予後を予測又は判定すること、その疾患又は障害の発症

、進行、再発又は悪化のリスクを評価すること、その疾患又は障害の治癒、改善又は寛解を評価すること、その疾患又は障害に対する治療の効果をモニタリングすることなどを意味し、その疾患又は障害の診断又はモニタリングを補助することも包含する。なお、本発明に係る方法又はキットによる「診断又はモニタリング」は、統計学的に有意な割合の対象を診断又はモニタリングできることを意図している。よって本発明に係る方法又はキットによる「診断又はモニタリング」には、対象の全て（すなわち100%）について必ず正しい結果が得られない場合も含まれる。好ましくは、対象の少なくとも60%、少なくとも80%又は少なくとも90%を、本発明に係る方法又はキットによって適切に診断又はモニタリングすることができる。

[0053] 対象は、疾患又は障害について診断又はモニタリングが望まれる対象であれば特に限定されるものではないが、好ましくはヒトである。対象がヒトである場合、種々の疾患又は障害についてのスクリーニングを目的とした健康診断や、特定の疾患又は障害についての診断又はモニタリングを目的とした検査などにおいて、本発明に係る方法又はキットが使用され得る。

[0054] 対象からサンプルDNAとしてゲノムDNAを準備する際、ゲノムDNAは、対象由来の任意の試料（例えば、血液を含む体液、細胞、組織など）から調製されてもよいし、あるいは疾患又は障害の種類によっては特定の試料（例えば、疾患又は障害に関連する細胞、組織など）から調製されてもよい。そのような対象からのゲノムDNAの調製は、当技術分野で周知であり、当業者であれば適切な方法で適当なゲノムDNAを調製することができる。

[0055] 調製されたゲノムDNAをサンプルDNAとして使用して、上述した本発明に係る方法を実施し、標的DNAのメチル化を検出する。標的DNAのメチル化の有無やメチル化の程度に応じて、疾患又は障害を予測又はモニタリングする。

[0056] このようにして、DNAのメチル化に関連する疾患又は障害の存在や進行を早期に知ることができ、詳細な検査や治療方針の決定に役立つ。簡便な検査で疾患又は障害か否かの診断が可能となれば、治療はもちろん過度な検査による侵襲リスクを防ぐことが期待できる。対象は、疾患又は障害の治療を早期

に受けたり、リスクが高い場合にはその発症について経過観察することが可能となる。

[0057] 本発明に係る方法は、キットを用いることによってより容易かつ簡便に行うことができる。すなわち、さらなる態様において、本発明は、標的DNAのメチル化を検出するためのキットであって、

前記標的DNAの5'領域に相補的な配列を5'末端側に含み、かつ前記標的DNAの3'領域に相補的な配列を3'末端側に含むアダプターDNAと、

DNAリガーゼと

を含むキットに関する。ここで、5'領域及び／又は3'領域は、5~30塩基を含む領域であることが好ましい。

[0058] アダプターDNAは、上述した通りであり、標的DNAの配列情報、及び場合により使用する制限酵素の種類に基づいて、適宜設計される。DNAリガーゼも上述したような適当なりガーゼ（例えば、T4 DNAリガーゼ）を使用することができる。

[0059] 本発明に係るキットは、少なくとも1種の制限酵素をさらに含んでもよい。好ましい実施形態において、制限酵素は、例えば4~8塩基を認識してDNAを切断する制限酵素を含む。

[0060] 本発明に係るキットは、アダプターDNAとDNAリガーゼによって得られる環状DNAのライゲーションの効率を検出するための手段を含んでもよい。一実施形態において、本発明に係るキットは、ローリングサークル増幅（RCA）反応用のポリメラーゼ（例えば、上述したようなphi29 DNAポリメラーゼ）をさらに含んでもよい。RCA反応を行う場合、キットに含まれるアダプターDNAをプライマーとして使用してRCA反応を行ってもよいし、別にプライマーを添加してRCA反応を行ってもよい。別にプライマーを使用する場合には、そのような別のプライマーもキットに含めることができる。RCA反応の進行を評価するための試薬、例えば増幅反応によって生じるピロリン酸（PPi）を検出するための試薬をさらにキットに含めてもよい。

[0061] 別の実施形態において、本発明に係るキットは、ポリメラーゼ連鎖反応（P

CR)用のプライマーセット及び／又はポリメラーゼをさらに含んでもよい。この場合、PCR反応の進行を評価するための試薬をさらにキットに含めてもよい。

[0062] 本発明に係るキットは、上述した構成要素に加えて、サンプルDNAを調製するための試薬、反応液を構成するバッファー、増幅反応に使用される基質（dNTP混合物、標識されていてもよい）、校正又は対照用の標準試料、使用説明書（メチル化検出のための手順、判断基準となる対照データなどが記載されている）などを含んでもよい。キットとして提供することにより、DNAのメチル化の検出をより迅速かつ簡便に行うことが可能となる。

[0063] また、本発明に係るキットは、標的DNAのメチル化に関連する疾患又は障害を診断又はモニタリングするためのキットとしても使用可能である。

## 実施例

[0064] 以下、本発明を実施例及び図面によりさらに具体的に説明する。ただし、以下の実施例は、本発明を限定するものではない。

[0065] [実施例1] DNAのメチル化が与えるPadlock型（錠前型）DNAのライゲーション効率の影響評価

本実施例では、メチル化DNAに対するPadlock型DNAのライゲーション効率について検討した。5′末端がリン酸基修飾されたグアニンが豊富でDNAのメチル化が統合失調症に関連することが報告されている遺伝子DRD2中のDNA（DRD2 DNA：配列番号1）、その相補鎖配列でシトシンが豊富なDNA（DRD2 comp DNA：配列番号3）、その他にDNAのメチル化が直腸がんに関連することが報告されている遺伝子BMP3中のDNA（BMP3 DNA：配列番号5）、そして、これらのDNAのCpGサイトがメチル化されたDNA（それぞれ配列番号2、4及び6）を用いて実験を行った。

[0066] これらのDNA（10 $\mu$ M）にその5′末端及び3′末端の合計30塩基がハイブリダイズできるような、Padlock型プローブとしての短いDNA断片（DRD2 adaptor（配列番号7）、DRD2 comp adaptor（配列番号8）、BMP3 adaptor（配列番号9）10 $\mu$ M）とT4リガーゼ（1～3 U/ $\mu$ L）、10 $\times$ ライゲーション用bufferを

加え、総量100  $\mu$ Lに調整した。16°Cで30分間インキュベートすることでライゲーション反応を行った。エタノール沈殿によってDNAを回収後、風乾し、25  $\mu$ LのmiliQに溶かした。次にライゲーション反応後のDNA溶液を等量の10M尿素溶液と混合し、95°Cで5分間インキュベートした。インキュベート後、7M 10% (w/v) 尿素ポリアクリルアミドゲルに添加し、室温、120Vで45分泳動を行った。泳動後、ゲルをSYBR™ Gold Nucleic acid Gel stainで20分間染色し、ゲルを観察した。

[0067] 使用したDNAの配列を以下の表1にまとめる。表1中、下線はメチル化塩基を表す。

[0068] [表1]

	配列	配列番号
DRD2 DNA	5'- GACCCAGCCTGCAATCACAGCTTATTACTCTGGGTGTGGGTGGGAGC GCAGTGGGCGGTCGAGGGTTGCGTTCCCGCCTCAAAACAAGGGATGG CGG-3'	1
DRD2 DNA メチル化	5'- GACCCAGCCTGCAATCACAGCTTATTACTCTGGGTGTGGGTGGGAGC <u>GCAGTGGGCGGTCGAGGGTTGCGTTCCCGCCTCAAAACAAGGGATGG</u> <u>CGG-3'</u>	2
DRD2 comp	5'- ATTCCGCCATCCCTTGTTTTGAGGCGGGAACGCAACCCCTCGAC CGCCCACTGCGCTCCCACCCACACCCAGAGTAATAAGCTGTGA TTGCAGGCTGG-3'	3
DRD2 comp メチル化	5'- ATTCCGCCATCCCTTGTTTTGAGG <u>CGGGAACGCAACCCCTCGAC</u> <u>CGCCCACTGCGCTCCCACCCACACCCAGAGTAATAAGCTGTGA</u> <u>TTGCAGGCTGG-3'</u>	4
BMP3 DNA	5'- CTGGTTTGAGTTCAACCCTCGGCTCCGCCCGCGCTCCTTGCGCCT TCGGAGTGCCCGCAGCGACGCCGGGAGCCGACGCGCCGCGCGG-3'	5
BMP3 DNA メチル化	5'- CTGGTTTGAGTTCAACCCTCGGCTCCGCCCGCGCTCCTTGCGCCT TCGGAGTGCCCGCAGCGACGCCGGGAGCCGACGCGCCGCGCGG-3'	6
DRD2 DNA adaptor	5'-TAAGCTGTGATTGCAGGCTGGGTCCCGCCA-3'	7
DRD2 comp DNA adaptor	5'-AAGGGATGGCGGAATCCAGCCTGCAATCAC-3'	8
BMP DNA adaptor	5'-TGAACTCCAAACCAGCCGCGCGGCGCTCG -3'	9

[0069] 得られた電気泳動後のゲルの結果を図2に示す。DRD2についての結果を図2のAに示す。非メチル化DRD2 DNA（配列番号1）とメチル化DRD2 DNA（配列番号2）を比較した時、メチル化DRD2 DNA（図2のA、左側）では高分子量側に多くの輝度の高いバンドが観察された。このことより、メチル化によってPadlock型DNAのライゲーション効率が変化したことが示された。

[0070] DRD2の相補鎖であるDRD2 comp DNAの結果を図2のBに示す。ライゲーション反応によって生じたバンドの輝度がメチル化によって低下したことから（図2のB、右側）、メチル化によるPadlock型DNAのライゲーション効率の変化が示唆された。またBMP3についての結果を図2のCに示す。非メチル化BMP3 DNA（図2のC、左側）では100~200 bpの間にバンドが観察されたが、このバンドはメチル化BMP3 DNA（図2のC、右側）では観察されなかった。これらのことから、配列の塩基に関わらず、DNAのメチル化によってPadlock型DNAのライゲーション効率に変化したことが示された。したがって、DNAのメチル化がライゲーション効率に影響を与えていることが考えられる。

[0071] [実施例2] RCA反応を用いたライゲーション効率変化の検出

実施例1に示したようにライゲーション効率がメチル化によって変化することから、Padlock型DNAを鋳型としたRCA反応によって生じるピロリン酸量も変化すると考えた。そこで、DRD2 comp DNA（配列番号3及び4）、及びBMP3 DNA（配列番号5及び6）を用いて、図1のBのRCA反応に示すような実験を行った。

[0072] 実施例1と同様にライゲーション反応後、10倍に希釈したライゲーションサンプル、必要に応じてadaptor DNA（配列番号8又は9、10  $\mu$ M）、10 $\times$ phi29 polymerase buffer、dNTP（each 2.5 mM）、phi29 polymerase（10 U/ $\mu$ L）、を混合し、総量40  $\mu$ Lに調整した。混合したサンプルを37 $^{\circ}$ Cで、様々な時間インキュベートしてRCA反応を行った。その後RCA反応産物を70 $^{\circ}$ Cのヒートブロック上で15分間熱処理し、酵素を失活させた。次に384穴ポリプロピレンプレートに、RCA反応産物5  $\mu$ L、PPiLight™converting reagent（LONZA）（ピロリン酸をATPに変換する基質と酵素を含む試薬）2.5  $\mu$ Lを添加し、30分間室温でインキュベートした。さらにPPiLight™detection reagent（LONZA）（ルシフェリンとルシフェラーゼを含む試薬）2.5  $\mu$ Lを加え、30分間室温でインキュベートした。最後に化学発光を検出した。実験はN=3で行った。

[0073] 反応時間0分における化学発光強度をバックグラウンド値として考慮した結果を図3に示す。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。BMP3 DNA（配列番号5及び6）について、経時に伴う化学発光強度の変化を図3のAに示す。メチル化

の有無に関わらず、経時に伴って化学発光強度が増加しており、RCA反応の進行が確認された。また、化学発光強度の増加度合いはメチル化によって低下しており、このことからライゲーション反応のメチル化による効率の変化をRCA反応で検出できることがわかった。

[0074] またDRD2 comp DNA（配列番号3及び4）について、時間経過に伴う化学発光強度の変化を図3のBに示す。メチル化の有無に関わらず経時に伴って化学発光強度が増加しており、RCA反応の進行が確認できた。また、化学発光強度の増加度合いはメチル化によって低下しており、このことからライゲーション反応時のメチル化による効率の変化をRCA反応で検出することができた。

[0075] したがって、メチル化によって化学発光強度が変化したことより、Padlock型DNAのライゲーション効率の変化はRCA反応によって生じるピロリン酸による化学発光として検出できた。以上の結果から、メチル化によるライゲーション効率の変化はRCA反応によって生じるピロリン酸を検出することで評価できることが示された。

[0076] [実施例3] q-PCRを用いたライゲーション効率変化の検出

実施例1に示したようにライゲーション効率がメチル化によって変化することから、Padlock型DNA中のライゲーション領域が増幅されるq-PCRを行うことで、Cq値も変化すると考えた。そこで、BMP3 DNA（配列番号5及び6）を用いて、図1のBのq-PCRに示すような実験を行った。

[0077] 実施例1と同様にライゲーション反応後、96穴プレートに $1.0 \times 10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 倍に希釈したライゲーションサンプルとPCR反応溶液（TaKaRa Ex Taq HS（5 U/ $\mu$ L）、 $10 \times$ 反应用buffer、dNTP（each 2.5 mM）、Forward Primer（ $100 \mu$ M：5' -CGCACCGCCCCAGCCCG -3'（配列番号11））、Reverse Primer（ $100 \mu$ M：5' -AAGGCGCAAGGAGCCGGC -3'（配列番号10））、5000倍希釈されたSYBR（登録商標）Green I Nucleic Acid Gel Stainを含む）を等量混合させた。そして1分間で98°Cに上昇させたのち、98°Cで10秒間変性を行い、59°Cで30秒間アニーリング後、72°Cで3秒間伸長反応を行うサイクルを30サイクルすることで目的配列を増幅させ、Cq値を検出した。

[0078] 実験結果を図4に示す。エラーバーは標準偏差 (SD) を示す。図4に示されるように、BMP3 DNA (配列番号5及び6) を用いた場合、メチル化によってCq値が変化したことより、ライゲーション効率の変化はq-PCRを用いても検出できた。また、メチル化の有無で比較したとき、各希釈倍率においてメチル化によって0.5~1.0サイクル上昇していた (表2)。これは、鑄型となる、環状を形成しているライゲーション産物量がメチル化によって変化したため、閾値に達するサイクル数が上昇したことが示唆された。このことより、メチル化によるライゲーション効率の変化をq-PCRによって評価できることが示された。

[0079] [表2]

各希釈率に対する、非メチル化 BMP3 DNA とメチル化 BMP3 DNA の Cq 値

Name (dilution rate)	Cq value (unmethylated)	Cq value (methylated)
<b>1.0 × 10<sup>3</sup></b>	<b>8.1</b>	<b>8.6</b>
<b>1.0 × 10<sup>4</sup></b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>1.0 × 10<sup>5</sup></b>	<b>14</b>	<b>15</b>

[0080] [実施例4] ゲル電気泳動を用いたDNAのメチル化が与えるRCA反応効率への影響評価

本実施例では、DNAのメチル化がRCA反応の効率 (増幅効率) に影響を与えているのかをゲル電気泳動を用いて検討した。5' 末端がリン酸基修飾された血管内皮増殖因子遺伝子のプロモーター部分のDNA (VEGF DNA : 配列番号12)、このDNAのCpGサイトが3か所メチル化されたDNA (配列番号13) 及びVEGF DNA adaptor (配列番号14) を用いて、RCA反応を行い、RCA反応後のDNA溶液に対してゲル電気泳動を行った。

[0081] 実施例1と同様にライゲーション反応を行った後、実施例2と同様にRCA反応を行った。その後70°Cのヒートブロック上で15分間熱処理し、酵素を失活させた。RCA反応後のDNA溶液を8% (w/v) アクリルアミドゲルに添加し、室温、120 Vで60分間泳動を行った。泳動後、ゲルを銀染色し、ゲルを観察した。

[0082] 標的となるVEGF遺伝子のプロモーター領域の配列 (非メチル化及びメチル

化DNA) と使用したVEGF DNA adaptorの配列を以下の表3にまとめる。表3中、  
下線はメチル化塩基を表す。

[0083] [表3]

	配列	配列 番号
VEGF promoter DNA	5'- CCCGAGCCGCGTGTGGAAGGGCTGAGGCTCGCCTGTCCCCGCCCC GGGGCGGGCCGGGGCGGGTCCCGCGGGCGGAGCCATGCGCC CCCCCTTTTTTTTAAAAGTC -3'	12
VEGF promoter DNA メチル化	5'- CCCGAGCCGCGTGTGGAAGGGCTGAGGCTCGCCTGTCCCCGCCCC GGGG <u>CGGGCCGGGGCGGGT</u> CCCGCGGGCGGAGCCATGCGCC CCCCCTTTTTTTTAAAAGTC -3'	13
VEGF DNA adaptor	5'-CCTTCCACACGCGGCTCGGGGACTTTTAAAAAAAAGGG-3'	14

[0084] 得られた電気泳動後のゲルの結果を図5に示す。RCA反応時間2時間以上の各  
反応時間で、非メチル化VEGF DNA (配列番号12) のほうがメチル化VEGF DNA  
(配列番号13) よりも上部のバンドの輝度が濃く観察された。このことよりD  
NAのメチル化によってRCA反応産物量が増加したことが示された。したがって  
DNAのメチル化によってRCA反応効率が増加したと考えられる。

[0085] [実施例5] ピロリン酸検出を用いたDNAのメチル化が与えるRCA反応効率へ  
の影響評価

本実施例では、DNAのメチル化がRCA反応の効率に影響を与えているのかを  
ピロリン酸検出を用いて検討した。実施例4と同様のDNA (配列番号12、13及  
び14) を用いて、図1のBのRCA反応に示すような実験を行った。

[0086] 実施例1と同様にライゲーション反応を行った後、実施例2と同様にRCA反応  
とピロリン酸検出を行った。

[0087] 得られた結果を図6に示す。エラーバーは標準偏差 (SD) を示す。VEGF DNA  
(配列番号12及び13) について、メチル化の有無に関わらず、経時に伴って  
化学発光強度が増加しており、RCA反応の進行が確認された。また、化学発光  
強度の増加度合いはメチル化によって低下していた。このことからDNAのメチ  
ル化がRCA反応効率に影響を与えることが示された。

[0088] したがって、DNAのメチル化はRCA反応効率にも影響を与え、このRCA反応効  
率の変化はRCA反応によって生じるピロリン酸を検出することで評価できるこ  
とが示された。

[0089] [実施例6] 細胞中のgDNAを用いた、RCAによるライゲーション効率変化の検出

本実施例では、アンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子のプロモーター領域のメチル化レベルが低いことで知られている前立腺がん関連細胞LNCaP、及びメチル化レベルが高いことで知られている前立腺がん関連細胞Du 145から抽出されたgDNAを用いて、DNAのメチル化の検出を試みた。

[0090] 初めに、上記の2種類の細胞から抽出されたgDNAと、制限酵素 Msp I (10 U/ $\mu$ L)、BciT 130 I (10 U/ $\mu$ L)、CutSmartバッファー (New England Biolabs)、0.1%BSAを混合し、総量を20 $\mu$ Lに調整した。そして、37°Cで1時間インキュベートすることで制限酵素処理を行った。エタノール沈殿によって反応産物を回収後、風乾し、10 $\mu$ LのmiliQに溶かした。

[0091] 溶解したサンプルと標的DNAの5'末端及び3'末端の合計42塩基がハイブリダイズできるような、短いDNA断片 (adaptor AR DNA (配列番号17)、100 $\mu$ M) と10 $\times$ ライゲーション用bufferを混合して総量を38.4 $\mu$ Lに調整した。そして、95°Cで10分間熱処理を行い、2時間かけて25°Cまで徐冷することで鎖交換反応を行った。反応後、T4リガーゼ (1~3 U/ $\mu$ L) を混合し、16°Cで30分間反応させることでライゲーションを行った。フェノール・クロロホルム抽出によってライゲーション産物を回収後、風乾させ、20 $\mu$ LのmiliQで溶解した。

[0092] 溶解したライゲーション産物を10 $\times$ phi29 polymerase buffer、dNTP (each 2.5 mM)、phi29 polymerase (10 U/ $\mu$ L)、を混合し、総量40 $\mu$ Lに調整した。混合したサンプルを37°Cで、様々な時間インキュベートしてRCA反応を行った。その後RCA反応産物を70°Cのヒートブロック上で15分間熱処理し、酵素を失活させた。次に384穴ポリプロピレンプレートに、RCA反応産物10 $\mu$ L、PPiLight™converting reagent (LONZA) (ピロリン酸をATPに変換する基質と酵素を含む試薬) 5.0 $\mu$ Lを添加し、30分間室温でインキュベートした。さらにPPiLight™detection reagent (LONZA) (ルシフェリンとルシフェラーゼを含む試薬) 5.0 $\mu$ Lを加え、30分間室温でインキュベートした。最後に化学発光を検出した。

[0093] 標的となるAR遺伝子のプロモーター領域の配列（非メチル化及びメチル化DNA）と使用したAR DNA adaptorの配列を以下の表4にまとめる。表4中、下線はメチル化塩基を表す。

[0094] [表4]

	配列	配列番号
Target AR promoter DNA	5'- AGGGCTAGAGCTAGCCTCTCCTGCCCTCGCCCACGCTGCGCCAGCAC TTGTTTCTCAAAGCCACTAGGCAGGCGTTAGCGCGCGGTGAGGGGA GGGGAGAAAAGGAAAGGGGAGGGGAGGGGAAAAGGAGGTGGGAAGGCA AGGAGGC -3'	15
Target AR promoter DNA メチル化	5'- AGGGCTAGAGCTAGCCTCTCCTGCCCTCGCCCACGCTGCGCCAGCAC TTGTTTCTCAAAGCCACTAGGCAGGCGTTAGCGCGCGGTGAGGGGA GGGGAGAAAAGGAAAGGGGAGGGGAGGGGAAAAGGAGGTGGGAAGGCA AGGAGGC -3'	16
AR DNA adaptor	5'-GGAGAGGCTAGCTCTAGCCCTGCCTCCTTGCCCTCCCACCTC -3'	17

[0095] 実験結果を図7に示す。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。図7のAは、AR遺伝子プロモーター領域のメチル化レベルが異なる細胞から抽出したgDNAを用いた場合の結果を示す。adaptor DNA（配列番号17）存在下では、LNCaP及びDu145の細胞の種類に関わらず、反応時間に応じて化学発光強度が増加した。一方でadaptor DNA非存在下では反応時間に伴う化学発光強度の変化は観察されなかった。このことより、adaptor DNAによって環状構造が形成され、RCA反応が起こっていることが示された。

[0096] また反応時間0分を基準として相対化した結果を図7のBに示す。反応時間が0分に対する、相対的な化学発光強度を算出し、反応時間に対する相対的発光強度の近似直線の傾きを求めると、メチル化レベルが高いDu145を用いたときの傾きは、メチル化レベルが低いLNCaPを用いたときの2.2倍になっていた。このことから、メチル化によってRCA反応によって生じるピロリン酸生成速度が上昇したことが示唆された（図7のB）。したがって、細胞から抽出したgDNAを用いても、DNAのメチル化をRCA反応によって生じるピロリン酸を化学発光で検出し、メチル化によるライゲーション効率の変化を評価できることが示された。

## 請求の範囲

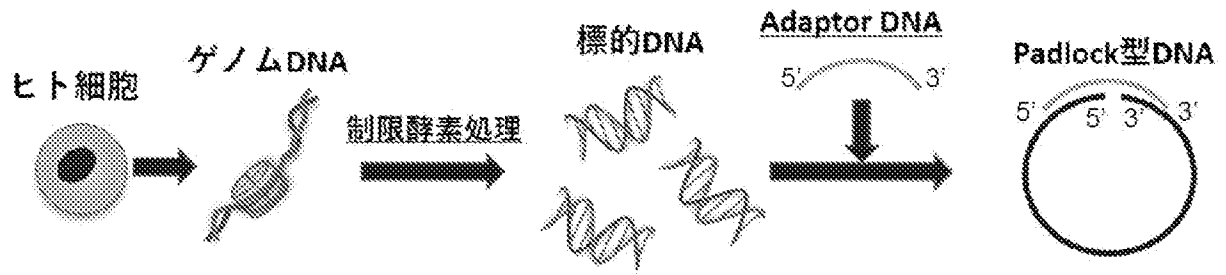
- [請求項1] 標的DNAのメチル化を検出する方法であって、  
標的DNAの5'領域に相補的な配列を5'末端側に含み、かつ前記標的DNAの3'領域に相補的な配列を3'末端側に含むアダプターDNAを、前記標的DNAに結合させる工程、  
前記標的DNAの5'末端及び3'末端をDNAリガーゼを用いてライゲーションし、環状DNAを得る工程、  
前記ライゲーションの効率又は前記環状DNAを鋳型としたローリングサークル増幅（RCA）反応による増幅効率に基づいて前記標的DNAのメチル化を検出する工程  
を含む方法。
- [請求項2] サンプルDNAを少なくとも1種の制限酵素で切断し、標的DNAを得る工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記制限酵素が、4～8塩基を認識してDNAを切断する制限酵素を含む、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 前記5'領域及び／又は前記3'領域が5～30塩基を含む領域である、請求項1に記載の方法。
- [請求項5] 前記アダプターDNAが、10～60塩基の配列を有する、請求項1に記載の方法。
- [請求項6] 前記アダプターDNAを前記標的DNAに結合させる工程において、  
前記標的DNAとして、一本鎖のDNAを使用し、  
前記アダプターDNAとして、前記5'領域に相補的な配列と前記3'領域に相補的な配列の部分が一本鎖であるDNAを使用する、請求項1に記載の方法。
- [請求項7] 前記ライゲーションの効率を、前記環状DNAを鋳型としたローリングサークル増幅（RCA）反応により決定することを含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項8] 前記RCA反応が、前記アダプターDNAをプライマーとして使用して前

記環状DNAを鋳型としたRCA反応である、請求項1又は7に記載の方法。

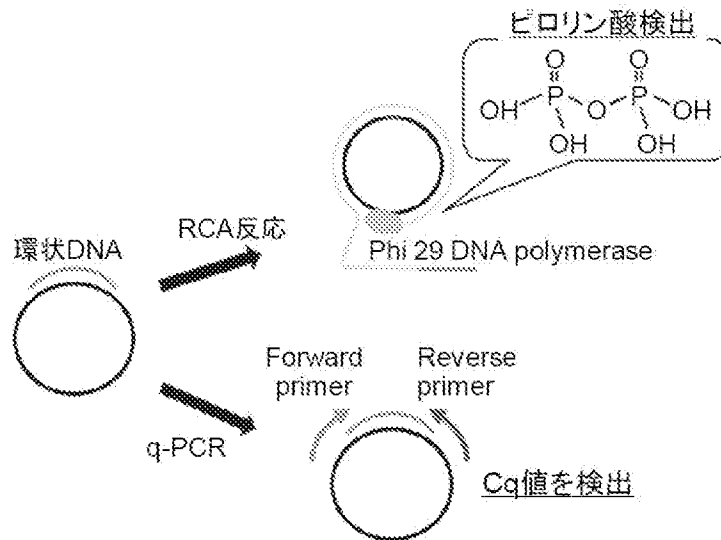
- [請求項9] 前記ライゲーションの効率を、前記環状DNAを鋳型とした定量ポリメラーゼ連鎖反応 (q-PCR) により決定することを含み、請求項1に記載の方法。
- [請求項10] 前記アダプターDNAが結合する前記標的DNAの領域が増幅されるようにq-PCRが行われる、請求項9に記載の方法。
- [請求項11] 前記標的DNAが、疾患又は障害に関連してメチル化頻度が変化する領域を含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項12] 前記環状DNAが、50～500塩基のサイズを有する、請求項1に記載の方法。
- [請求項13] 標的DNAのメチル化を検出するためのキットであって、  
前記標的DNAの5'領域に相補的な配列を5'末端側に含み、かつ前記標的DNAの3'領域に相補的な配列を3'末端側に含むアダプターDNAと、  
DNAリガーゼと  
を含むキット。
- [請求項14] 前記5'領域及び／又は前記3'領域が5～30塩基を含む領域である、請求項13に記載のキット。
- [請求項15] 少なくとも1種の制限酵素をさらに含む、請求項13に記載のキット。
- [請求項16] 前記制限酵素が、4～8塩基を認識してDNAを切断する制限酵素を含む、請求項15に記載のキット。
- [請求項17] ローリングサークル増幅 (RCA) 反応用のポリメラーゼをさらに含む、請求項13に記載のキット。
- [請求項18] ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 用のプライマーセット及び／又はポリメラーゼをさらに含む、請求項13に記載のキット。

[図1]

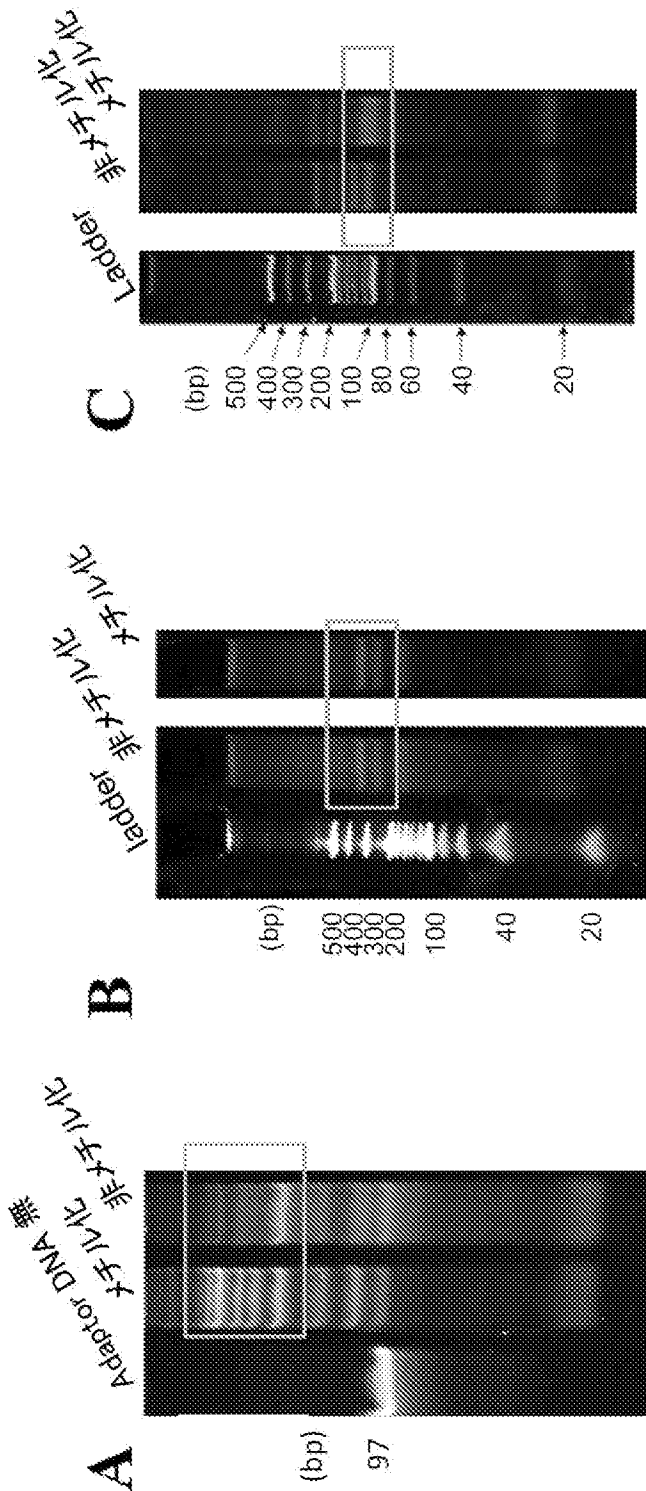
A



B

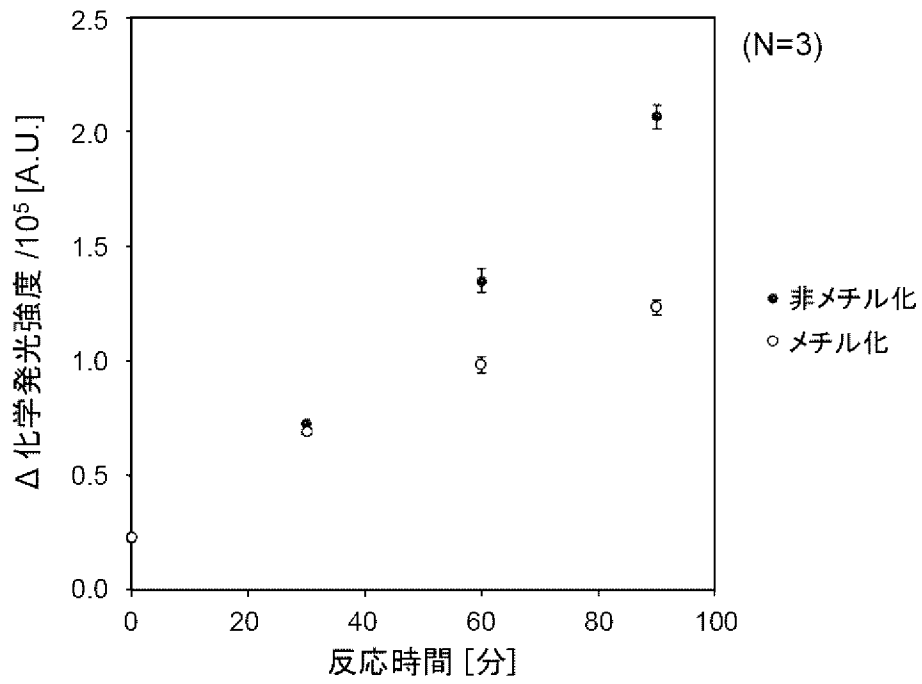


[図2]

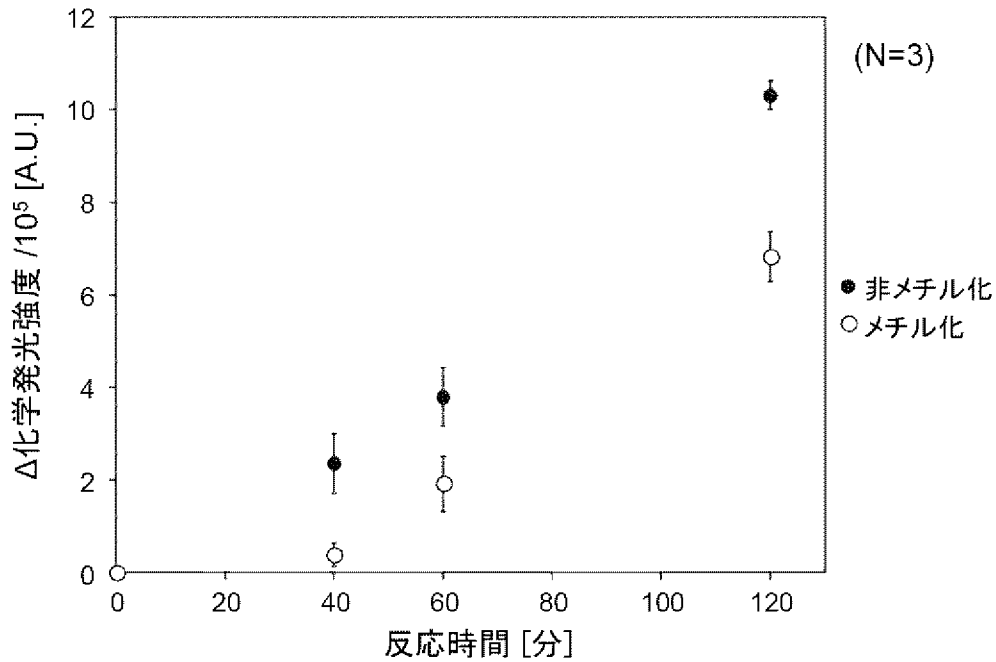


[図3]

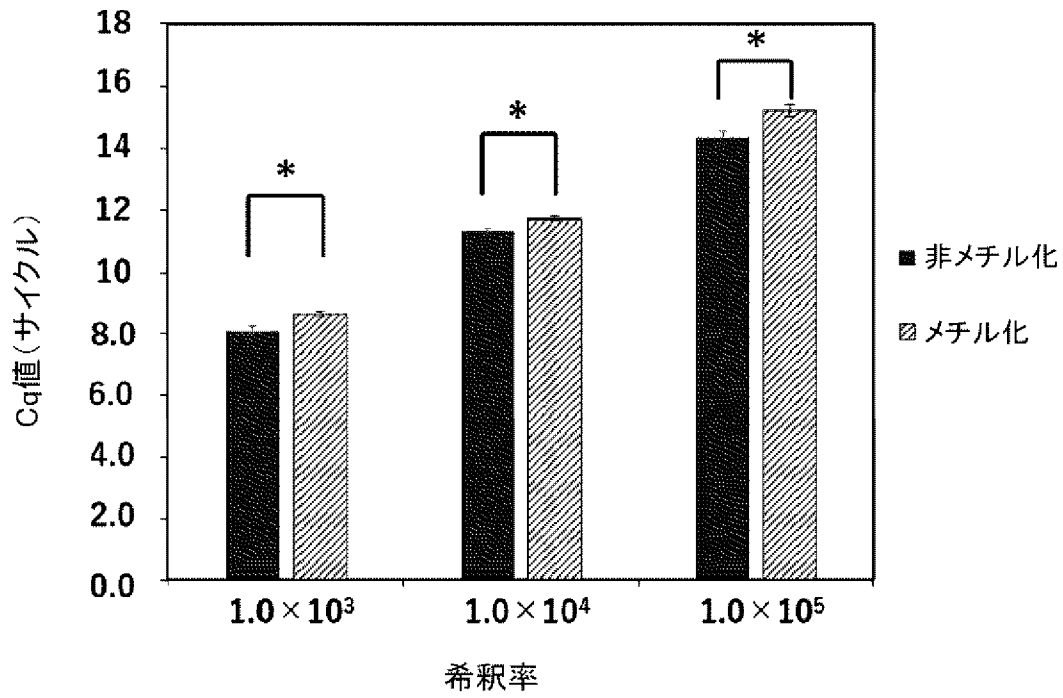
A



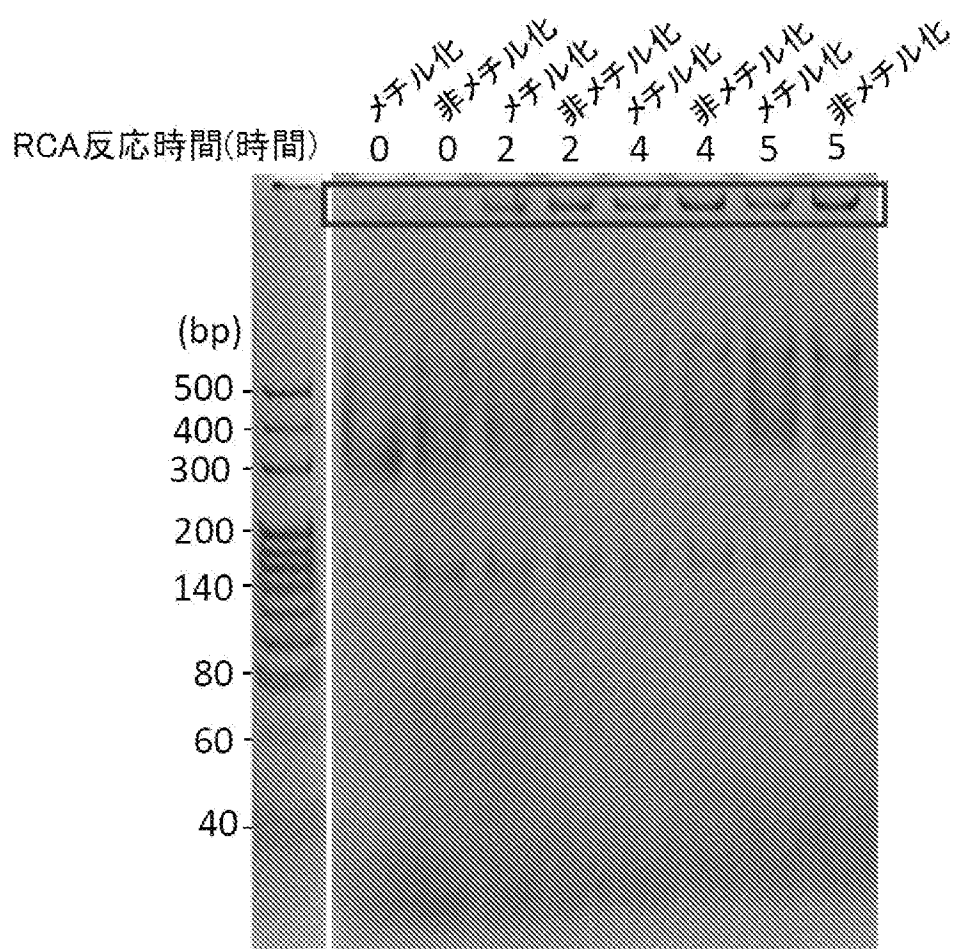
B



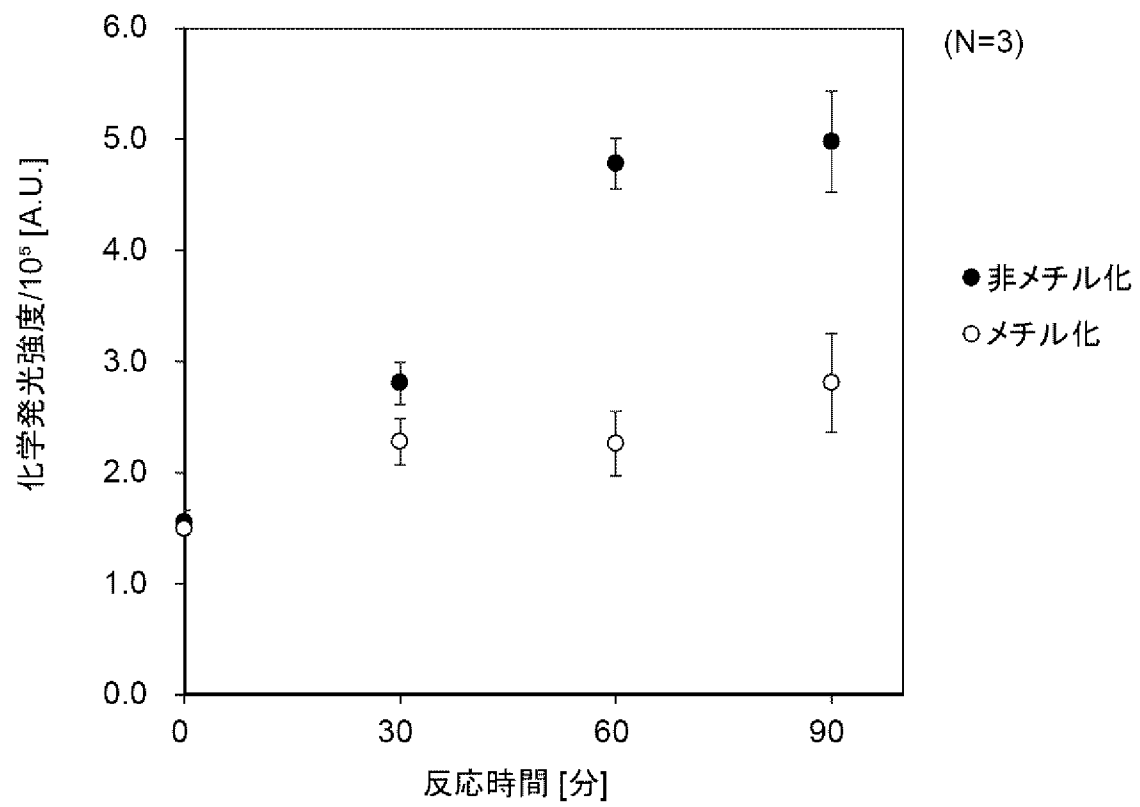
[図4]



[図5]

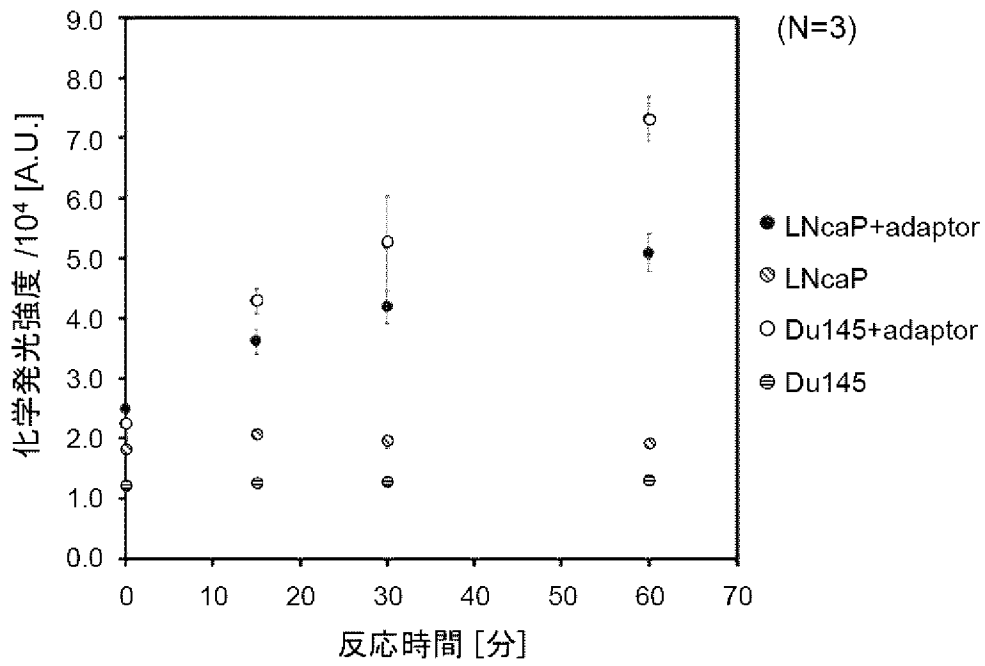


[図6]

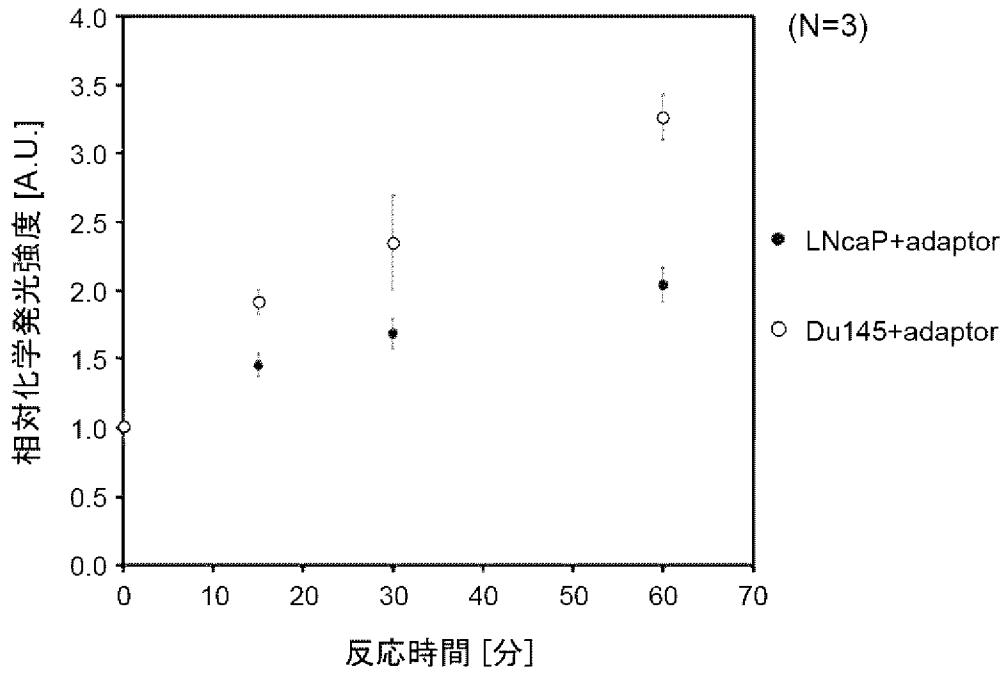


[図7]

A



B



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/033826

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12N 15/11</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/6851</i> (2018.01)i; <i>C12Q 1/6876</i> (2018.01)i FI: C12N15/11 Z; C12Q1/6876 Z; C12Q1/6851 Z ZNA		
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) C12N15/11; C12Q1/6851; C12Q1/6876		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<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 A	WO 2022/109496 A2 (PLENO, INC.) 27 May 2022 (2022-05-27) paragraphs [0232]-[0233], [0240], [0244], [0246], [0305]-[0309], fig. 6, 9, 15	13-18 1-12
X A	CN 103589777 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 19 February 2014 (2014-02-19) example 1	13-17 1-12, 18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>14 November 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>28 November 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	二宮鴻介 ほか, Padlock probeとhyperbranching rolling circle amplification (H-RCA) 法を用いた病理組織切片上でのp16遺伝子プロモータ領域メチル化検出法, 日本組織細胞化学会総会・学術集会講演プログラム・予稿集, 10 September 2013, vol. 54th, p. 62, Internet: <URL:https://dl.ndl.go.jp/info:ndljp/pid/10798442> entire text, (NINOMIYA, Kosuke et al.), non-official translation (Detection of p16 gene promoter region methylation on pathological tissue sections using padlock probe and hyperbranching rolling circle amplification (H-RCA) method. Lecture programs and Preprints of the the General and Academic Meeting of Japanese Histochemistry and Cytochemistry.)	13-14, 17-18
A		1-12, 15-16

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

“Annex C/ST.25 text file format” should be read as ‘ST.26 format’

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2023/033826**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2022/109496 A2	27 May 2022	WO 2023/096671 A1 WO 2023/096672 A1 WO 2023/096674 A1 WO 2023/096675 A1	
CN 103589777 A	19 February 2014	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/11(2006.01)i; C12Q 1/6851(2018.01)i; C12Q 1/6876(2018.01)i FI: C12N15/11 Z; C12Q1/6876 Z; C12Q1/6851 Z ZNA		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/11; C12Q1/6851; C12Q1/6876 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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
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
X	WO 2022/109496 A2 (PLENO, INC.) 27.05.2022 (2022-05-27) [0232]-[0233], [0240], [0244], [0246], [0305]-[0309], FIG. 6, FIG. 9, FIG. 15	13-18
A		1-12
X	CN 103589777 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 19.02.2014 (2014-02-19) 実施例 1	13-17
A		1-12, 18
X	二宮鴻介 ほか, Padlock probeとhyperbranching rolling circle amplification (H-RCA) 法を用いた病理組織切片上でのp16遺伝子プロモータ 領域メチル化検出法, 日本組織細胞化学会総会・学術集会講演プログラム・予 稿集, 2013.09.10, Vol. 54th, Page. 62, インターネット:<URL:https:// dl.ndl.go.jp/info:ndl.jp/pid/10798442>	13-14, 17-18
A	全文	1-12, 15-16
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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、一般的な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抵 触するものではなく、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	14.11.2023	国際調査報告の発送日 28.11.2023
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  中山 基志 4B 5086  電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

## 第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:
- 上記「附属書 C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

国際調査報告  
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/033826

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2022/109496 A2	27.05.2022	WO 2023/096671 A1	
		WO 2023/096672 A1	
		WO 2023/096674 A1	
		WO 2023/096675 A1	
-----		-----	
CN 103589777 A	19.02.2014	(ファミリーなし)	
-----		-----	