

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7293109号

(P7293109)

(45)発行日 令和5年6月19日(2023.6.19)

(24)登録日 令和5年6月9日(2023.6.9)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 Q 1/6886(2018.01)

C 1 2 Q 1/6886

Z Z N A

C 1 2 Q 1/686(2018.01)

C 1 2 Q 1/686

Z

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/50

P

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09

Z

C 1 2 Q 1/6809(2018.01)

C 1 2 Q 1/6809

Z

請求項の数 6 (全80頁)

(21)出願番号 特願2019-512308(P2019-512308)

(86)(22)出願日 平成29年9月1日(2017.9.1)

(65)公表番号 特表2019-528704(P2019-528704
A)

(43)公表日 令和1年10月17日(2019.10.17)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/049915

(87)国際公開番号 WO2018/045322

(87)国際公開日 平成30年3月8日(2018.3.8)

審査請求日 令和2年8月13日(2020.8.13)

(31)優先権主張番号 62/383,165

(32)優先日 平成28年9月2日(2016.9.2)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(73)特許権者 513195570

マヨ ファウンデーション フォア メデ
ィカル エデュケーション アンド リサ
ーチMayo Foundation for
Medical Education a
nd Researchアメリカ合衆国, 55905 ミネソタ
州, ロチェスター, ファースト ストリ
ート サウスウェスト 200200 First Street SW
, Rochester, Minneso
ta 55905, United Sta
tes of America

(73)特許権者 518065773

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 肝細胞癌の検出

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

肝細胞癌(HCC)を伴うまたは伴うと疑われる対象からの試料中の遺伝子のメチル化状態を検出するための方法であって、

ヒト個体の生体試料において、TSPLYL5遺伝子、及びH O X A 1遺伝子に関してC p G部位のメチル化レベルを測定することを含む前記方法であり、

前記生体試料が、HCCを伴うまたは伴うと疑われる対象からのものであり、

前記メチル化レベルの測定が、

前記生体試料中のゲノムDNAをバイサルファイトで処理し、

前記バイサルファイトで処理されたゲノムDNAを、前記TSPLYL5遺伝子、及び前記H O X A 1遺伝子に対するプライマーのセットを用いて増幅し、

前記C p G部位の前記メチル化レベルを、メチル化特異的PCR、定量的メチル化特異的PCR、メチル化感受性DNA制限酵素分析、定量的バイサルファイトピロシーケンシング、またはバイサルファイトゲノム配列決定PCRによって測定することを介する、前記方法。

【請求項2】

さらに、前記メチル化レベルを、HCCを伴わない対照試料における対応する遺伝子のセットのメチル化レベルと比較すること、及び

前記TSPLYL5遺伝子、及び前記H O X A 1遺伝子において測定された前記メチル化レベルを、それぞれの対照試料において測定された前記メチル化レベルより高い場合に、前

10

20

記個体がHCCを有すると判断する指標とすることを含み、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記生体試料が組織試料である場合に、前記TSPYL5遺伝子、及び前記HOXA1遺伝子に対して以下のプライマーのセット、すなわち、

HOXA1に対しては、配列番号28及び29または配列番号88及び89からなるプライマーのセット、ならびに

TSPYL5に対しては、配列番号1及び2または配列番号43及び44からなるプライマーのセット、

を使用する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記生体試料が、血漿試料または組織試料である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記CpG部位が、コード領域または調節領域に存在する、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記TSPYL5遺伝子、及び前記HOXA1遺伝子に関してCpG部位のメチル化レベルを前記測定することが、前記CpG部位のメチル化スコアを測定すること及び前記CpG部位のメチル化の頻度を測定することからなる群から選択される測定を含む、請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2016年9月2日に出願された、米国仮特許出願第62/383,165号の優先権の利益を主張する。当該仮出願は、参照することによりその全体が組み込まれる。

【0002】

本明細書に提供するのは、肝細胞癌のスクリーニング用の技術であり、具体的には、限定されないが、肝細胞癌の存在を検出するための方法、組成物、及び関連する使用である。

【背景技術】

【0003】

肝細胞癌(HCC)は、肝臓の原発性悪性腫瘍であり、主に基礎慢性肝疾患及び肝硬変の患者に発生する。起源の細胞(複数可)は、肝幹細胞であると考えられている(Allison MR. Stem Cell Rev. 2005. 1(3): 253-60参照)。腫瘍は、局所的な拡大、肝内進展、及び遠隔転移を伴い進行する。

【0004】

HCCは現在、世界でがんによる死亡原因の第3位であり、500,000人超が侵されている。HCCの発生率は、アジア及びアフリカで最も高く、そこでは、高侵淫性のB型肝炎及びC型肝炎によって、慢性肝疾患及びそれに続くHCCがかなり生じやすくなる。

【0005】

HCCの提示は、過去数十年にわたって大きく進化した。過去には、HCCは一般に、右上腹部痛、体重減少、及び非代償性肝疾患の兆候を伴う進行期に見つかったが、現在では、断面像の解析及び血清アルファ-フェトプロテイン(AFP)測定を用いた既知の肝硬変患者の日常のスクリーニングの結果、かなり早いステージでの認識が増えている。

【0006】

HCCの脅威は、今後何年間も拡大し続けると予想される(Llovet JM, et al., Liver Transpl. 2004 Feb. 10(2 Suppl 1): S115-20参照)。従って、これらの患者の生存率を上げるため、HCCの早期発見に対する要求が大きい。

【発明の概要】

【0007】

10

20

30

40

50

肝細胞癌（HCC）は、世界的に2番目に致命的ながんである。生存率は早期発見で向上し、正確で非侵襲的なスクリーニング手段が必要とされる。早期のHCCの発症前検出のための正確で安価かつ安全なスクリーニング手段を供給する技術革新が必要不可欠である。

【0008】

本発明は、この必要性に対処する。実際には、本発明は、正常な対照（肝硬変を伴う対照及び伴わない対照）からHCCを区別する新規なメチル化DNAマーカーを提供する。

【0009】

メチル化DNAは、ほとんどの腫瘍型の組織における潜在的なバイオマーカーの種類として研究されてきた。多くの場合、DNAメチルトランスフェラーゼは、シトシン-リン酸-グアニン（CpG）アイランド部位で、遺伝子発現のエピジェネティック制御として、DNAにメチル基を付加する。生物学的に魅力的な機序では、腫瘍抑制遺伝子のプロモーター領域での後天的なメチル化事象は、発現を抑制し、ひいては腫瘍形成に寄与すると考えられる。DNAのメチル化は、RNAまたはタンパク質の発現よりも化学的及び生物学的に安定な診断手段であり得る（Laird（2010）Nat Rev Genet 11:191-203）。さらに、散发性結腸癌のような他のがんでは、メチル化マーカーは、優れた特異度を与え、個々のDNA突然変異より広く情報を提供しかつ感度が高い（Zou et al（2007）Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16:2686-96参照）。

【0010】

CpGアイランドの分析は、動物モデル及びヒト細胞株に適用した場合に重要な発見をもたらした。例えば、Zhangらは、同じCpGアイランドの異なる部分からのアンプリコンが、異なるメチル化のレベルを有し得ることを見出した（Zhang et al.（2009）PLoS Genet 5:e1000438）。さらに、メチル化のレベルは、高メチル化及び非メチル化配列間で二峰性に分布し、DNAメチルトランスフェラーゼ活性のバイナリスイッチ様パターンをさらに裏付けた（Zhang et al.（2009）PLoS Genet 5:e1000438）。インビボでのマウス組織及びインビトロでの細胞株の分析で、動的組織特異的パターンにおいて、高CpG密度のプロモーター（HCP、300塩基対の領域内に>7%のCpG配列を有すると定義される）は約0.3%しかメチル化されない一方、低CpG密度（300塩基対の領域内に<5%のCpG配列を有すると定義される）の領域は、高頻度にメチル化される傾向があることが示された（Meissner et al.（2008）Nature 454:766-70）。HCPは、遍在するハウスキーピング遺伝子及び高度に調節された発生遺伝子に対するプロモーターを含む。HCP部位の中でも、>50%メチル化されたのは、いくつかの確立されたマーカー、例えば、Wnt2、NDRG2、SFRP2、及びBMP3であった（Meissner et al.（2008）Nature 454:766-70）。

【0011】

本発明の実施形態を開発する過程で行われた実験は、HCCを有する対象の血漿由来のDNAマーカーのメチル化状態を、対照の対象（例えば、肝硬変を有するまたは正常の対象）由来の同じDNAマーカーのメチル化状態と比較した。かかる実験は、かかる対照群からHCCを区別するメチル化DNAマーカーの候補を特定及び確認した。

【0012】

従って、本明細書に提供するのは、HCCのスクリーニング（例えば、監視）用の技術であり、具体的には、限定されないが、HCCの存在を検出するための方法、組成物、及び関連する使用である。

【0013】

マーカー及び/またはマーカーのパネルは、HCC（実施例I、II、及びIII参照）（ACP1、BDH1、Chr12.133、CLEC11A、DAB2IP、DBNL、EMX1、EFNB2、HOXA1、LRRC4、SPINT2、TSPYL5、C

10

20

30

40

50

C N J _ 3 7 0 7、C C N J _ 3 1 2 4、P F K P、S C R N 1、及びE C E 1)を検出することができると認定された。

【 0 0 1 4 】

本明細書に記載の通り、該技術は、対象においてH C Cの存在を検出するための高い識別性の多くのメチル化DNAマーカー及びそれらのサブセット(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12マーカーのセット)を提供する。実験は、選択フィルターを候補マーカーに適用し、高シグナル対ノイズ比及び低バックグラウンドレベルを与え、高い特異度を、例えば、スクリーニングまたは診断(例えば、H C Cのスクリーニングまたは診断)の目的で媒体(例えば、血漿)をアッセイする場合に与えるマーカーを識別した。

10

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態では、該技術は、本明細書で特定された1つ以上のマーカーの存在及びメチル化状態を生体試料(例えば、血漿試料)で評価することに関する。これらのマーカーは、例えば、表1及び4に示す本明細書で論じる1つ以上の差次的メチル化領域(DMR)を含む。メチル化状態は、該技術の実施形態で評価される。従って、本明細書に提供する技術は、遺伝子のメチル化状態を測定する方法に限定されない。例えば、いくつかの実施形態では、メチル化状態はゲノムスキニング法で測定される。例えば、1つの方法は、制限酵素ランドマークゲノムスキニング法(Kawai et al. (1994) Mol. Cell. Biol. 14: 7421 - 7427 参照)を含み、別の例は、メチル化感受性任意プライムPCR(Gonzalgo et al. (1997) Cancer Res. 57: 594 - 599 参照)を含む。いくつかの実施形態では、特定のCpG部位におけるメチル化パターンの変化は、メチル化感受性制限酵素によるゲノムDNAの消化と、それに続く目的の領域のサザン解析により観察される(消化 - サザン法)。いくつかの実施形態では、メチル化パターンの変化の分析は、PCR増幅に先立つメチル化感受性制限酵素によるゲノムDNAの消化を含むPCRに基づく方法を含む(Singer - Sam et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18: 687 参照)。さらに、DNAのバイサルファイト処理をメチル化分析の開始点として利用する他の技術が報告されている。これらには、メチル化特異的PCR(MSP)(Herman et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9821 - 9826 参照)及びバイサルファイト変換DNAから増幅されたPCR産物の制限酵素消化(Sadri and Hornsby (1996) Nucl. Acids Res. 24: 5058 - 5059、及びXiong and Laird (1997) Nucl. Acids Res. 25: 2532 - 2534 参照)が含まれる。PCR技術は、遺伝子突然変異の検出(Kuppuswamy et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1143 - 1147 参照)及び対立遺伝子特異的発現の定量化(Szabo and Mann (1995) Genes Dev. 9: 3097 - 3108、及びSinger - Sam et al. (1992) PCR Methods Appl. 1: 160 - 163)用に開発された。かかる技術は、内部プライマーを使用し、これは、PCR生成鋳型にアニールし、アッセイする単一のヌクレオチドの5'を直接終結させる。米国特許第7,037,650号に記載の「定量的Ms - SNuPEアッセイ」を用いた方法をいくつかの実施形態で使用する。

20

30

40

【 0 0 1 6 】

メチル化状態の評価に際して、メチル化状態は、多くの場合、特定の部位(例えば、単一のヌクレオチドで、特定の領域または遺伝子座で、より長い目的の配列で、例えば、DNAの最大約100bp、200bp、500bp、1000bpの部分配列、またはそれ以上)でメチル化されたDNAの個々の鎖の、該特定の部位を含む試料におけるDNAの全集団に対する割合またはパーセンテージとして表される。伝統的に、非メチル化核酸の量は、標準物質を用いたPCRにより測定される。その後、既知量のDNAをバイサルファイトで処理し、得られたメチル化特異的配列は、リアルタイムPCRまたは他の指数増幅、例えば、QuARTSアッセイ(例えば、米国特許第8,361,720号、第8

50

、715、937号、及び第8、916、344号で提供されている)のいずれかを用いて測定される。

【0017】

例えば、いくつかの実施形態では、方法は、外部標準を用いて非メチル化標的の標準曲線を作成することを含む。該標準曲線は、少なくとも2点から構成され、非メチル化DNAのリアルタイムCt値を既知の定量標準と関連付ける。その後、メチル化標的についての第二の標準曲線を少なくとも2点及び外部標準から構成する。この第二の標準曲線は、メチル化DNAのCtを既知の定量標準と関連付ける。次に、試験試料のCt値をメチル化及び非メチル化集団について測定し、DNAのゲノム当量を先の2つのステップで作成された標準曲線から計算する。目的の部位でのメチル化のパーセンテージを、該集団のDNAの全量に対するメチル化DNAの量から計算する。例えば、 $(\text{メチル化DNA数}) / (\text{メチル化DNA数} + \text{非メチル化DNA数}) \times 100$ 。

10

【0018】

本明細書に同様に提供するのは、該方法を実施するための組成物及びキットである。例えば、いくつかの実施形態では、1つ以上のマーカーに特異的な試薬(例えば、プライマー、プローブ)を単独で、またはセット(例えば、複数のマーカーを増幅するためのプライマー対のセット)で提供する。検出アッセイを実施するための追加の試薬(例えば、酵素、緩衝剤、陽性及び陰性対照でQUARTS、PCR、配列決定、バイサルファイト、または他のアッセイを実施するためのもの)もまた提供する場合がある。いくつかの実施形態では、方法を行うために必要な、十分な、または有用な1つ以上の試薬を含むキットを提供する。該試薬を含む反応混合物もまた提供する。さらに、互いに添加され及び/または試験試料に添加して反応混合物を完成させ得る複数の試薬を含むマスターミックス試薬のセットを提供する。

20

【0019】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の技術は、本明細書に記載の方法によって提供される一連の算術演算または論理演算を実行するように設計されたプログラブル機械と関連している。例えば、該技術のいくつかの実施形態は、コンピュータソフトウェア及び/またはコンピュータハードウェアと関連している(例えば、それにより実行される)。一態様において、該技術は、メモリの形式、算術演算及び論理演算を実行するための要素、ならびにデータの読み取り、操作、及び保存のための一連の命令(例えば、本明細書に提供する方法)を実行するための処理要素(例えば、マイクロプロセッサ)を含むコンピュータに関連している。いくつかの実施形態では、マイクロプロセッサは、メチル化状態(例えば1つ以上のDMR、例えば、表1及び4に示すDMR1~400のもの)の測定、メチル化状態(例えば1つ以上のDMR、例えば、表1及び4に示すDMR1~400のもの)の比較、標準曲線の作成、Ct値の測定、メチル化(例えば1つ以上のDMR、例えば、表1及び4に示すDMR1~400のもの)の割合、頻度、またはパーセンテージの計算、CpGアイランドの特定、アッセイまたはマーカーの特異度及び/または感度の測定、ROC曲線及び関連するAUCの計算、配列分析のためのシステムの一部であり、すべて本明細書に記載されているか、または当技術分野で既知である。

30

【0020】

いくつかの実施形態では、マイクロプロセッサまたはコンピュータは、がんの部位を予測するためのアルゴリズムにおいてメチル化状態のデータを使用する。

40

【0021】

いくつかの実施形態では、あるソフトウェアまたはハードウェアコンポーネントは、複数のアッセイの結果を受け取り、使用者に報告するための複数のアッセイの結果に基づくがんのリスクを示す単一の値の結果を決定する(例えば、複数のDMR、例えば、表1及び4に示すDMRのメチル化状態を決定する)。関連する実施形態は、例えば、複数のマーカー(例えば、複数のDMR、例えば、表1及び4に示す)のメチル化状態を測定する複数のアッセイからの結果の数学的結合(例えば、重み付き結合、線形結合)に基づくリスクファクターを計算する。いくつかの実施形態では、DMRのメチル化状態は、次元を

50

規定し、多次元空間に値を有する場合があります、複数のDMRのメチル化状態によって規定される座標は、例えば、使用者に報告するための結果である。

【0022】

いくつかの実施形態は、記憶媒体及びメモリ要素を含む。メモリ要素（例えば、揮発性及び／または不揮発性メモリ）は、命令（例えば、本明細書に提供する方法の実施形態）及び／またはデータ（例えば、メチル化測定、配列、及びそれらに関連する統計的記述等のワークピース）の格納に用途を見出す。いくつかの実施形態は、CPU、グラフィックスカード、及びユーザインタフェース（例えば、ディスプレイ等の出力デバイス及びキーボード等の入力デバイスを含む）のうちの1つ以上もまた含むシステムに関する。

【0023】

該技術と関連したプログラマブル機械は、従来の現存する技術及び開発中またはまだ開発されていない技術（例えば、量子コンピュータ、化学コンピュータ、DNAコンピュータ、光コンピュータ、スピントロニクス系コンピュータ等）を含む。

【0024】

いくつかの実施形態では、該技術は、データ送信用の有線（例えば、金属ケーブル、光ファイバー）または無線の伝送媒体を含む。例えば、いくつかの実施形態は、ネットワーク（例えば、ローカルエリアネットワーク（LAN）、広域ネットワーク（WAN）、アドホックネットワーク、インターネット等）を通じたデータ送信に関する。いくつかの実施形態では、プログラマブル機械は、ピアとしてかかるネットワークに含まれ、いくつかの実施形態では、該プログラマブル機械は、クライアント／サーバー関係を有する。

【0025】

いくつかの実施形態では、データは、ハードディスク、フラッシュメモリ、光媒体、フロッピーディスク等のコンピュータ可読記憶媒体に格納される。

【0026】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供する技術は、協調して作動して本明細書に記載の方法を実行する複数のプログラマブルデバイスと関連している。例えば、いくつかの実施形態では、例えば、従来のネットワークインタフェース、例えば、イーサネット（登録商標）、光ファイバーによって、または無線ネットワーク技術によってネットワーク（私的、公的、またはインターネット）に接続されたクラスタコンピューティングもしくはグリッドコンピューティング、または完全なコンピュータに依存するいくつかの他の分散コンピュータアーキテクチャ（搭載CPU、記憶装置、動力供給装置、ネットワークインタフェース等を備えた）の実行において、複数のコンピュータ（例えば、ネットワークで接続された）が並行して稼働し、データを集めて処理し得る。

【0027】

例えば、いくつかの実施形態は、コンピュータ可読媒体を含むコンピュータを提供する。該実施形態は、プロセッサに結合されたランダムアクセスメモリ（RAM）を含む。該プロセッサは、メモリに格納されたコンピュータ実行可能プログラム命令を実行する。かかるプロセッサは、マイクロプロセッサ、ASIC、状態機械、または他のプロセッサを含んでよく、Intel Corporation of Santa Clara, California及びMotorola Corporation of Schaumburg, Illinois製のプロセッサ等のいくつかのコンピュータプロセッサのいずれかであり。かかるプロセッサは、媒体、例えば、該プロセッサが実行する場合に、該プロセッサに本明細書に記載のステップを行わせる命令を格納するコンピュータ可読媒体を具備するか、またはこれと通じていてもよい。

【0028】

コンピュータ可読媒体の実施形態としては、プロセッサにコンピュータ可読命令を与えることが可能な電子、光学、磁気、もしくは他の記憶または送信デバイスが挙げられるがこれらに限定されない。他の適切な媒体の例としては、フロッピーディスク、CD-ROM、DVD、磁気ディスク、メモリチップ、ROM、RAM、ASIC、設定済みプロセッサ、すべての光媒体、すべての磁気テープもしくは他の磁気媒体、またはコンピュータ

10

20

30

40

50

プロセッサが命令を読み取ることができる任意の他の媒体が挙げられるがこれらに限定されない。また、様々な他のコンピュータ可読媒体の形式が、コンピュータに命令を送信または届けてもよく、ルータ、私的もしくは公的ネットワーク、または有線及び無線両方の他の送信デバイスもしくはチャンネルが含まれる。該命令は、例えば、C、C++、C#、ビジュアルベーシック、ジャバ、パイソン、パール、及びジャバスクリプトを含めた任意の適切なコンピュータプログラミング言語のコードを含んでもよい。

【0029】

いくつかの実施形態では、コンピュータはネットワークに接続される。コンピュータはまた、マウス、CD-ROM、DVD、キーボード、ディスプレイ、または他の入力もしくは出力デバイスなどのいくつかの外部または内部デバイスを含み得る。コンピュータの例は、パーソナルコンピュータ、デジタル補助装置、携帯端末、携帯電話 (cellular phone)、携帯電話 (mobile phone)、スマートフォン、ポケットベル、デジタルタブレット、ラップトップコンピュータ、インターネット家電、及び他のプロセッサ系デバイスである。一般に、本明細書に提供する技術の態様に関するコンピュータは、本明細書に提供する技術を含む1つ以上のプログラムを支援することができるMicrosoft Windows、Linux (登録商標)、UNIX (登録商標)、Mac OS X等の任意のオペレーティングシステムで作動する任意の種類のプロセッサ系プラットフォームでよい。いくつかの実施形態は、他のアプリケーションプログラム (例えば、アプリケーション) を実行するパーソナルコンピュータを含む。これらのアプリケーションは、メモリに含まれてもよく、また、例えば、文書作成アプリケーション、スプレッドシートアプリケーション、電子メールアプリケーション、インスタントメッセージアプリケーション、プレゼンテーションアプリケーション、インターネットブラウザアプリケーション、カレンダー/スケジュール管理アプリケーション、及びクライアントのデバイスによって実行することが可能な任意の他のアプリケーションを含み得る。

【0030】

該技術に関連する本明細書に記載のすべてのかかるコンポーネント、コンピュータ、及びシステムは、ロジカルでもバーチャルでもよい。

【0031】

本明細書に提供するのは、対象から採取される試料におけるHCCのスクリーニング方法に関する技術であり、該方法は、対象から採取される試料におけるマーカのメチル化状態をアッセイすること、及び該マーカのメチル化状態が、HCCを有さない対象 (例えば、HCCを有さない対象) (例えば、HCCを有さないが肝硬変を有する対象) においてアッセイされたマーカのメチル化状態と異なる場合に、該対象がHCCを有していることを特定することを含み、該マーカは、表1及び4に示すACP1、BDH1、Chr12、133、CLEC11A、DAB2IP、DBNL、EMX1、EFNB2、HOXA1、LRRC4、SPINT2、TSPYL5、CCNJ_3707、CCNJ_3124、PFKP、SCRN1、及びECE1から選択される1つ以上の差次的メチル化領域 (DMR) の塩基を含む。

【0032】

該技術は、評価されるメチル化状態に限定されない。いくつかの実施形態では、試料中のマーカのメチル化状態の評価は、1つの塩基のメチル化状態を測定することを含む。いくつかの実施形態では、試料中のマーカのメチル化状態の評価は、複数の塩基でメチル化の程度を測定することを含む。さらに、いくつかの実施形態では、マーカのメチル化状態は、当該マーカの通常のメチル化状態に対する該マーカのメチル化の増加を含む。いくつかの実施形態では、マーカのメチル化状態は、当該マーカの通常のメチル化状態に対する該マーカのメチル化の減少を含む。いくつかの実施形態では、マーカのメチル化状態は、当該マーカの通常のメチル化状態に対する該マーカの異なるメチル化パターンを含む。

【0033】

さらに、いくつかの実施形態では、該マーカは、100以下の塩基の領域であり、該

10

20

30

40

50

マーカーは、500以下の塩基の領域であり、該マーカーは、1000以下の塩基の領域であり、該マーカーは、5000以下の塩基の領域であるか、または、いくつかの実施形態では、該マーカーは、1つの塩基である。いくつかの実施形態では、該マーカーは、高CpG密度のプロモーター内にある。

【0034】

該技術は、試料の種類によって制限されない。例えば、いくつかの実施形態では、該試料は血液試料（例えば、血漿、血清、全血）、ふん便試料、組織試料（例えば、胃組織、脾臓組織、胆管/肝臓組織、脾液、及び結腸直腸組織）、排せつ物、または尿試料である。

【0035】

さらに、該技術は、メチル化状態を測定するために使用される方法に限定されない。いくつかの実施形態では、該アッセイは、メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応、核酸配列決定、質量分析、メチル化特異的ヌクレアーゼ、質量ベースの分離、または標的捕獲を使用することを含む。いくつかの実施形態では、該アッセイは、メチル化特異的オリゴヌクレオチドの使用を含む。いくつかの実施形態では、該技術は、超並列配列決定（例えば、次世代シーケンシング）、例えば、合成による配列決定、リアルタイム（例えば、単一分子）配列決定、ビーズエマルジョン配列決定、ナノ細孔配列決定等を用いてメチル化状態を測定する。

10

【0036】

該技術は、DMRを検出するための試薬を提供し、例えば、いくつかの実施形態では、配列番号1～94（表2及び5）が示す配列を含む一連のオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態では、DMRの塩基を有する染色体領域に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチド、例えば、DMRのメチル化状態に感受性のあるオリゴヌクレオチドを提供する。

20

【0037】

該技術は、様々なマーカーのパネルを提供し、例えば、いくつかの実施形態では、該マーカーは、表1または3に示され、該マーカーを含むアノテーションを有する染色体領域を含む。さらに、実施形態は、DMR番号1～400の1つ以上である表1及び/または4からのDMRを分析する方法を提供する。

【0038】

キットの実施形態、例えば、バイサルファイト試薬、ならびにDMR1～400（表1及び4より）からなる群から選択されるDMR由来の配列を含み、HCCを有さない対象（例えば、HCCを有さず、肝硬変を有さない対象）（例えば、HCCを有さないが肝硬変を有する対象）と関連するメチル化状態を有する対照核酸を含むキットを提供する。キットの実施形態、例えば、バイサルファイト試薬、ならびにDMR1～400（表1及び4より）からなる群から選択されるDMR由来の配列を含み、HCCを有さない対象と関連するメチル化状態を有する対照核酸を含むキットを提供する。

30

【0039】

いくつかのキットの実施形態は、対象から試料（例えば、ふん便試料）を採取するための試料コレクター、該試料から核酸を単離するための試薬、バイサルファイト試薬、及び本明細書に記載のオリゴヌクレオチドを含む。

40

【0040】

該技術は、組成物（例えば、反応混合物）の実施形態に関する。いくつかの実施形態では、DMRを含む核酸及びバイサルファイト試薬を含む組成物を提供する。いくつかの実施形態は、DMRを含む核酸及び本明細書に記載のオリゴヌクレオチドを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態は、DMRを含む核酸及びメチル化感受性制限酵素を含む組成物を提供する。いくつかの実施形態は、DMRを含む核酸及びポリメラーゼを含む組成物を提供する。

【0041】

対象から採取される試料（例えば、血漿試料）中のHCCをスクリーニングするためのさらなる関連する方法の実施形態を提供する。例えば、ある方法は、DMR1～400（

50

表 1 及び 4 より) の 1 つ以上である D M R の塩基を含む試料中のマーカのメチル化状態を測定すること、該対象の試料由来のマーカのメチル化状態を、H C C を有さない対象からの正常対照試料由来のマーカのメチル化状態と比較すること、ならびに該対象の試料と該正常対照試料のメチル化状態の差の信頼区間及び / または p 値を測定することを含む。

【 0 0 4 2 】

いくつかの実施形態では、該信頼区間は、9 0 %、9 5 %、9 7 . 5 %、9 8 %、9 9 %、9 9 . 5 %、9 9 . 9 %、または 9 9 . 9 9 % であり、該 p 値は、0 . 1、0 . 0 5、0 . 0 2 5、0 . 0 2、0 . 0 1、0 . 0 0 5、0 . 0 0 1、または 0 . 0 0 0 1 である。いくつかの方法の実施形態は、D M R を含む核酸をバイサルファイト試薬と反応させてバイサルファイトを反応させた核酸を生成し、該バイサルファイトと反応させた核酸の配列を決定して該バイサルファイトと反応させた核酸のヌクレオチド配列を与え、該バイサルファイトと反応させた核酸のヌクレオチド配列を、がんを有さない対象由来の D M R を含む核酸のヌクレオチド配列と比較してこれら 2 つの配列の差を特定し、差が存在する場合に該対象が腫瘍を有すると特定するステップを提供する。

【 0 0 4 3 】

対象から採取される試料中の H C C をスクリーニングするシステムが該技術によって提供される。例示的なシステムの実施形態としては、例えば、対象から採取される試料中の H C C をスクリーニングするためのシステムが挙げられ、該システムは、試料のメチル化状態を測定するように構成された分析コンポーネント、該試料のメチル化状態を、データベースに記録された対照試料または参照試料のメチル化状態と比較するように構成されたソフトウェアコンポーネント、及び H C C 関連のメチル化状態 (例えば、H C C がいない場合のメチル化状態、H C C のメチル化状態) を使用者に警告するように構成された警告コンポーネントを含む。警告は、いくつかの実施形態では、複数のアッセイ (例えば、複数のマーカ、例えば、D M R、例えば、表 1 及び 4 に示されるもののメチル化状態を測定する) からの結果を受け取り、これら複数の結果に基づいて、報告する値または結果を計算するソフトウェアコンポーネントによって決定される。いくつかの実施形態は、使用者 (例えば、医師、看護師、臨床医等) に報告する値もしくは結果の計算及び / または警告に使用するための本明細書に提供する各 D M R に関連する加重パラメータのデータベースを提供する。いくつかの実施形態では、複数のアッセイからのすべての結果が報告され、いくつかの実施形態では、1 つ以上の結果を用いて、複数のアッセイからの 1 つ以上の結果の混合に基づくスコア、値、または結果を提供し、これが対象における H C C のリスクを示す。

【 0 0 4 4 】

いくつかのシステムの実施形態では、試料は、D M R を含む核酸を含む。いくつかの実施形態では、該システムはさらに、核酸を単離するためのコンポーネント、試料を採取するためのコンポーネント、例えば、血漿試料を採取するためのコンポーネントを含む。いくつかの実施形態では、該システムは、D M R を含む核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、該データベースは、H C C を有さない対象由来の核酸配列を含む。核酸、例えば、各核酸が D M R を含む配列を有する核酸のセットもまた提供する。いくつかの実施形態では、該核酸のセットは、各核酸が H C C を有さない対象由来の配列を有する。関連するシステムの実施形態は、記載された核酸のセット及び該核酸のセットと関連する核酸配列のデータベースを含む。いくつかの実施形態は、さらに、バイサルファイト試薬を含む。また、いくつかの実施形態は、さらに、核酸シーケンサーを含む。

【 0 0 4 5 】

ある特定の実施形態では、対象から採取される試料 (例えば、血漿試料) 中の H C C を検出する方法を提供し、これは、a) 対象から D N A を含む試料を採取すること、b) 採取した D N A を、該採取した D N A 中の非メチル化シトシン残基を選択的に修飾して修飾残基を生成するが、メチル化シトシン残基を修飾しない試薬で処理すること、c) ステップ b) の処理を受けた D N A における 1 つ以上の D N A メチル化マーカのメチル化レベ

ルを測定すること、ここで、1つ以上のDNAメチル化マーカーは、DMR 1 ~ 400 (表1及び4より)が示す差次的メチル化領域(DMR)の塩基を含み、d)測定された該1つ以上のDNAメチル化マーカーのメチル化レベルを、HCCを有さない対象についての1つ以上のDNAメチル化マーカーのメチル化レベル参照と比較すること、及びe)差が存在する場合に該対象がHCCを有すると特定することを含む。

【0046】

いくつかの実施形態では、1つ以上のDNAメチル化マーカーにおけるメチル化上昇の測定はCpGアイランド及びCpGアイランドショアからなる群から選択される領域内のメチル化の変化の測定を含む。

【0047】

いくつかの実施形態では、該CpGアイランドまたはCpGショア内のメチル化の上昇の測定は、当該DNAメチル化マーカーのコード領域または調節領域内のメチル化の上昇を含む。

【0048】

いくつかの実施形態では、ステップb)の処理を受けたDNAにおける1つ以上のDNAメチル化マーカーのメチル化レベルを測定することは、該1つ以上のDNAメチル化マーカーのメチル化スコア及び/またはメチル化の頻度を測定することを含む。いくつかの実施形態では、ステップb)の処理は、採取されたDNAのバイサルファイト修飾により達成される。

【0049】

いくつかの実施形態では、ステップb)の処理を受けたDNAにおける1つ以上のDNAメチル化マーカーのメチル化レベルを測定することは、メチル化特異的PCR、定量的メチル化特異的PCR、メチル化感受性DNA制限酵素分析、定量的バイサルファイトピロシーケンシング、及びバイサルファイトゲノム配列決定PCRからなる群から選択される技術によって達成される。

【0050】

さらなる実施形態は、本明細書に含まれる開示に基づいて、当業者には明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】HCCのDNA試料を、正常対照(例えば、肝硬変を有するまたは有さない非HCCの個体)由来のDNAと区別するための、311の差次的メチル化領域(DMR)の特定に關与する四段階の描写。

【図2】相補的な3マーカーの組み合わせ(EMX1、LRRC4、及びBDH1)は、血漿中で20/21のHCC及び32/33の対照を識別した。1つのHCCはBDH1が低レベルであり、1つの対照はLRRC4が高かった。このパネルは、HCCに対して、特異度97%(95%信頼区間(CI)、82%~100%)で感度95%(95%CI、74%~100%)であり、AUC0.98を達成した(図2参照)。

【図3】図3A~I:ACP1、Chr12.133、CLEC11A、DAB2IP、DBNL、EMX1、HOXA1、LRRC4、SPINT2、及びTSPYL5に関する受信者操作特性曲線下面積の情報。

【図4】図4A~C:生物組織検証データからの27の胃癌マーカー(フィット点分析を加えて29)の箱ひげ図(対数目盛)。試料は、左端に正常肝、次に肝硬変なしのHCC、肝硬変を有するHCC、及び肝硬変対照(炎症性)で並べている。縦軸は、メチル化度である(-アクチン鎖に対して正規化)。

【図5】95%正常特異度のマトリックス形式での75のHCC組織試料及び29の対照(肝硬変16、正常肝13)における27のHCC癌マーカーの性能。マーカーは縦に、試料は横に記載している。試料は、左端に正常肝(NI)、次に肝硬変なしのHCC(HN)、肝硬変を有するHCC(HC)、及び肝硬変対照(In)で並べている。ポジティブヒットはライトグレーであり、ミスはダークグレーである。このプロットにより、マーカーを補完的に評価することができる。注:2つのマーカー、すなわち、TBX15及び

10

20

30

40

50

E G R 2 は、q M S P データに対してフィット点法を用いて二度目に分析し、ここに含める。

【図 6】Q u A R T s (定量的対立遺伝子特異的リアルタイム標的及びシグナル増幅) アッセイによるメチル化 D N A シグネチャーの検出に使用される F R E T カセットのオリゴヌクレオチド配列を示す。各 F R E T 配列は、3 つの別々のアッセイと一緒に多重化することができるフルオロフォア及びクエンチャを含む。

【図 7】A) 上位 3 マーカーの組み合わせ (E M X 1、B D H 1、L R R C 4) についてのカットオフでの r P a r t 二分木。この木は、以下のプロセスで構築される。すなわち、第一に、データを 2 群に最適に分割する単一変数 (マーカー) を見出す。このデータを分割し、その後、当該下位群が最小のサイズに達するまで、またはそれ以上改善がなされなくなるまでのいずれか、このプロセスを各下位群等に別々に再帰的に適用する。カットオフを満たす、またはカットオフを満たさない対照試料数は、分子の位置に表し、症例の試料は分母の位置に表す。ここでは、この組み合わせが血漿中 2 1 の H C C のうちの 2 0 及び 3 3 対照のうちの 3 2 を識別した。B) 上位 3 マーカーの組み合わせ (E M X 1、D A B 2 I P、T S P Y L 5) についてのカットオフでの r P a r t 二分木。C) 上位 3 マーカーの組み合わせ (E M X 1、H O X A 1、A C P 1) についてのカットオフでの r P a r t 二分木。D) 上位 3 マーカーの組み合わせ (E M X 1、E F N B 2、S P I N T 2) についてのカットオフでの r P a r t 二分木。

【図 8】メチル化マーカー E M X 1 を用いた 1 0 0 % の特異度でステージ A ~ C による血漿中の H C C 感度を示す棒グラフ。U に分類された試料は、ステージが不明確であった。

【図 9】この分析で検討されたメチル化マーカー (A C P 1、B D H 1、C h r 1 2 . 1 3 3、C L E C 1 1 A、D A B 2 I P、D B N L、E M X 1、E F N B 2、H O X A 1、L R R C 4、S P I N T 2、T S P Y L 5、C C N J _ 3 7 0 7、C C N J _ 3 1 2 4、P F K P、S C R N 1、及び E C E 1) の各々の相対的重要性を示すグラフ。マーカーの全パネルの感度及び特異度の交差検定推定値は、それぞれ、7 5 % 及び 9 6 % であった。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 2 】

詳細な説明

本明細書に提供するのは、肝細胞癌のスクリーニング用の技術であり、具体的には、限定されないが、肝細胞癌の存在を検出するための方法、組成物、及び関連する使用である。

【 0 0 5 3 】

該技術が本明細書に記載される場合、使用されるセクションの見出しは、構成する目的のためのみであり、その主題を限定するものとは決して解釈されない。

【 0 0 5 4 】

様々な実施形態のこの詳細な説明では、説明の目的で、多数の具体的な詳細を記載し、本開示の実施形態の完全な理解を与える。しかしながら、当業者にはこれらの様々な実施形態がこれらの具体的な詳細の有無にかかわらず実施され得ることが理解されよう。他の例では、構造及び装置がブロック図の形で示される。さらに、当業者には、方法が提示され、実行される特定の順序が例示的であり、これらの順序は変更することができ、本明細書に開示する様々な実施形態の趣旨及び範囲内になお留まることが企図されることが容易に理解され得る。

【 0 0 5 5 】

本出願に引用するすべての文献及び同種の資料、すなわち、限定されないが、特許、特許出願、記事、本、論文、及びインターネットのウェブページ等は、あらゆる目的のため、参照することによりそれらの全体が明示的に組み込まれる。特に定義されない限り、本明細書で使用するすべての技術用語及び科学用語は、本明細書に記載の様々な実施形態が属する当業者が一般に理解するものと同じ意味を有する。組み込まれた参考文献での用語の定義が本開示に提供する定義と異なると思われる場合、本開示に提供する定義が統制するものとする。

【 0 0 5 6 】

10

20

30

40

50

定義

本技術の理解を容易にするため、いくつかの用語及び表現を以下に定義する。さらなる定義は、詳細な説明を通して記載する。

【0057】

本明細書及び特許請求の範囲を通して、以下の用語は、その文脈が明らかにそうではないと指示しない限り、本明細書に明白に関連する意味を取る。本明細書で使用される「1つの実施形態では」という表現は、必ずしも同じ実施形態を指すわけではないが、そうであってもよい。さらに、本明細書で使用される「別の実施形態では」という表現は、必ずしも異なる実施形態を指すわけではないが、そうであってもよい。従って、以下に記載する通り、本発明の様々な実施形態は、本発明の範囲または趣旨から逸脱することなく、容易に組み合わせられ得る。

10

【0058】

さらに、本明細書で使用される、「または」という用語は、包括的な「または」演算子であり、その文脈が明らかにそうではないと指示しない限り、「及び/または」という用語と同等である。「～に基づく」という用語は、排他的ではなく、その文脈が明らかそうではないと指示しない限り、記載されていないさらなる因子に基づいていることを許可する。さらに、本明細書を通して、「a」、「an」、及び「the」の意味は、複数の言及を含む。「in」の意味は、「in」及び「on」を含む。

【0059】

本明細書で使用される「核酸」または「核酸分子」は、概して、任意のリボ核酸またはデオキシリボ核酸を指し、これは、未修飾もしくは修飾DNAまたはRNAでよい。「核酸」としては、制限なく、一本鎖及び二本鎖核酸が挙げられる。本明細書で使用される「核酸」という用語は、1つ以上の修飾塩基を含む上記のDNAもまた含む。従って、安定性のため、または他の理由のために修飾された骨格を有するDNAは「核酸」である。本明細書で使用される「核酸」という用語は、かかる化学的、酵素的、または代謝的に修飾された形の核酸、ならびに、例えば、単純型細胞及び複雑型細胞を含めたウイルス及び細胞に特徴的なDNAの化学形を包含する。

20

【0060】

「オリゴヌクレオチド」または「ポリヌクレオチド」または「ヌクレオチド」または「核酸」という用語は、2個以上の、好ましくは3個を超える、通常は10個を超えるデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを有する分子を指す。正確なサイズは、多くの要因によって決まり、同様にして該オリゴヌクレオチドの最終的な機能または使用によって決まる。該オリゴヌクレオチドは、化学合成、DNA複製、逆転写、またはそれらの組み合わせを含めた任意の方法で生成され得る。典型的なDNAのデオキシリボヌクレオチドは、チミン、アデニン、シトシン、及びグアニンである。典型的なRNAのリボヌクレオチドは、ウラシル、アデニン、シトシン、及びグアニンである。

30

【0061】

本明細書で使用される、核酸の「遺伝子座」または「領域」という用語は、核酸の小領域、例えば、染色体上の遺伝子、一塩基、CpGアイランド等を指す。

【0062】

「相補的」及び「相補性」という用語は、塩基対合則によって結びつけられるヌクレオチド（例えば、1つのヌクレオチド）またはポリヌクレオチド（例えば、ヌクレオチドの配列）を指す。例えば、配列5'-A-G-T-3'は、配列3'-T-C-A-5'と相補的である。相補性は、当該核酸の塩基の一部のみが塩基対合則に従って適合する「部分的」でもよい。または、当該核酸間で「完全な」もしくは「全体の」相補性であってもよい。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率及び強度をもたらす。これは、核酸間の結合に依存する増幅反応及び検出方法において特に重要である。

40

【0063】

「遺伝子」という用語は、RNAの産生、またはポリペプチドもしくはその前駆体の産生に必要なコード配列を含む核酸（例えば、DNAまたはRNA）配列を指す。機能性の

50

ポリペプチドは、完全長コード配列によって、または、該ポリペプチドの所望の活性もしくは機能的特性（例えば、酵素活性、リガンド結合、シグナル伝達等）が保持される限り、該コード配列の任意の部分によってコードされ得る。遺伝子に関して使用される場合、「部分」という用語は、その遺伝子の断片を指す。該断片は、数個のヌクレオチドから全遺伝子配列マイナス1個のヌクレオチドまでのサイズに及び得る。従って、「遺伝子の少なくとも部分を含むヌクレオチド」は、当該遺伝子の断片を含む場合もあれば全遺伝子を含む場合もある。

【0064】

「遺伝子」という用語はまた、該遺伝子が完全長 mRNA（例えば、コード配列、調節配列、構造配列、及び他の配列を含む）の長さに相当するように、構造遺伝子のコード領域も包含し、5' 及び 3' 両末端のコード領域に隣接して、例えば、いずれかの末端の約 1 kb の距離の間に位置する配列を含む。該コード領域の 5' に位置し、該 mRNA に存在する配列は、5' 非翻訳 (non-translated) または非翻訳 (untranslated) 配列と呼ばれる。該コード領域の 3' または下流に位置し、該 mRNA に存在する配列は、3' 非翻訳 (non-translated) または 3' 非翻訳 (untranslated) 配列と呼ばれる。「遺伝子」という用語は、cDNA 及びゲノム形態の遺伝子の両方を包含する。いくつかの生物（例えば、真核生物）では、遺伝子のゲノム形態またはクローンは、「イントロン」または「介在領域」もしくは「介在配列」と呼ばれる非コード配列で中断されたコード領域を含む。イントロンは、核 RNA (hnRNA) に転写される遺伝子のセグメントであり、イントロンは、エンハンサーのような調節要素を含み得る。イントロンは、核または一次転写物から除去または「スプライスアウト」され、イントロンはそれ故、メッセンジャー RNA (mRNA) 転写物には存在しない。該 mRNA は、翻訳の過程で新生ポリペプチドのアミノ酸の配列または順序を特定するように機能する。

【0065】

イントロンを含むことに加えて、ゲノム形態の遺伝子はまた、当該 RNA 転写物に存在する配列の 5' 及び 3' 両末端に位置する配列を含み得る。これらの配列は、「フランキング」配列または領域と呼ばれる（これらのフランキング配列は、該 mRNA 転写物に存在する非翻訳配列に対して 5' または 3' に位置する）。5' フランキング領域は、遺伝子の転写を制御するまたはこれに影響を与えるプロモーター及びエンハンサー等の調節配列を含み得る。3' フランキング領域は、転写の終結、転写後切断、及びポリアダニル化を指示する配列を含み得る。

【0066】

「対立遺伝子」という用語は、遺伝子の多様性を指し、該多様性には、バリエーション及び変異体、多型座、及び一塩基多型座、フレームシフト、ならびにスプライス変異が含まれるがこれらに限定されない。対立遺伝子は、集団内で自然発生する場合もあれば、集団の任意の特定の個体の一生の間に生じる場合もある。

【0067】

従って、ヌクレオチド配列に関して使用される場合の「バリエーション」及び「変異体」という用語は、別の、通常は関連するヌクレオチド酸配列と 1 つ以上のヌクレオチドが異なる核酸配列を指す。「多様性」は、2 つの異なるヌクレオチド配列の間の差であり、通常は、一方の配列が参照配列である。

【0068】

「増幅」は、鋳型特異性に関与する核酸複製の特殊な場合である。これは、非特異的鋳型複製（例えば、鋳型に依存するが特定の鋳型には依存しない複製）と対比される。鋳型特異性は、ここでは、複製の忠実度（例えば、適切なポリヌクレオチド配列の合成）及びヌクレオチド（リボまたはデオキシリボ）特異性とは区別される。鋳型特異性は、しばしば「標的」特異性の観点から記載される。標的配列は、それらが他の核酸から選別されることが求められるという意味で「標的」である。増幅技術は、主にこの選別のために設計されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 9 】

核酸の増幅は、一般に、ポリヌクレオチド、またはポリヌクレオチドの一部の複数のコピーの生成を指し、通常は、少量のポリヌクレオチド（例えば、単一のポリヌクレオチド分子、ポリヌクレオチド分子の10～100個のコピー、これらは厳密に同じでも同じでなくてもよい）から開始し、その増幅産物またはアンプリコンは一般に検出可能である。ポリヌクレオチドの増幅は、様々な化学的及び酵素的過程を包含する。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）またはリガーゼ連鎖反応（LCR、例えば、米国特許第5,494,810号参照）の過程での標的もしくは鋳型DNA分子の1つまたは数個のコピーからの複数のDNAコピーの生成は、ある種の増幅である。増幅のさらなる種類としては、限定されないが、対立遺伝子特異的PCR（例えば、米国特許第5,639,611号参照）、アセンブリPCR（例えば、米国特許第5,965,408号参照）、ヘリカーゼ依存性増幅（例えば、米国特許第7,662,594号参照）、ホットスタートPCR（例えば、米国特許第5,773,258号及び第5,338,671号参照）、配列間特異的PCR、逆PCR（例えば、Triglia, et al. (1988) *Nucleic Acids Res.*, 16:8186参照）、ライゲーション媒介PCR（例えば、Guilfoyle, R. et al., *Nucleic Acids Research*, 25:1854-1858 (1997)、米国特許第5,508,169号参照）、メチル化特異的PCR（例えば、Herman, et al., (1996) *PNAS* 93(13)9821-9826参照）、ミニプライマーPCR、マルチプレックスライゲーション依存性プローブ増幅（例えば、Schouten, et al., (2002) *Nucleic Acids Research* 30(12):e57参照）、マルチプレックスPCR（例えば、Chamberlain, et al., (1988) *Nucleic Acids Research* 16(23)11141-11156、Bal labio, et al., (1990) *Human Genetics* 84(6)571-573、Hayden, et al., (2008) *BMC Genetics* 9:80参照）、ネステッドPCR、オーバーラップ・エクステンションPCR（例えば、Higuchi, et al., (1988) *Nucleic Acids Research* 16(15)7351-7367参照）、リアルタイムPCR（例えば、Higuchi, et al. (1992) *Biotechnology* 10:413-417、Higuchi, et al., (1993) *Biotechnology* 11:1026-1030参照）、逆転写PCR（例えば、Bustin, S. A. (2000) *J. Molecular Endocrinology* 25:169-193参照）、固相PCR、熱非対称インターレースPCR、及びタッチダウンPCR（例えば、Don, et al., *Nucleic Acids Research* (1991) 19(14)4008、Roux, K. (1994) *Biotechniques* 16(5)812-814、Hecker, et al., (1996) *Biotechniques* 20(3)478-485参照）が挙げられる。ポリヌクレオチドの増幅はまた、デジタルPCRを用いても達成することができる（例えば、Kalinina, et al., *Nucleic Acids Research*. 25, 1999-2004, (1997)、Vogelstein and Kinzler, *Proc Natl Acad Sci USA*. 96, 9236-41, (1999)、国際特許公開第WO05023091A2号、米国特許出願公開第20070202525号参照）。

【 0 0 7 0 】

「ポリメラーゼ連鎖反応」（「PCR」）という用語は、K. B. Mullisの米国特許第4,683,195号、第4,683,202号、及び第4,965,188号の方法を指し、これらは、ゲノムDNAの混合物中の標的配列のセグメントの濃度を、クローニングや精製をすることなく増加させるための方法を記載している。標的配列を増幅する方法は、所望の標的配列を含むDNA混合物に大過剰の2つのオリゴヌクレオチドプライマーを導入し、その後、DNAポリメラーゼの存在下で正確な順序の熱サイクルを行うことからなる。これら2つのプライマーは、二本鎖標的配列のそれらのそれぞれの鎖

10

20

30

40

50

と相補的である。増幅を生じさせるため、該混合物を変性し、その後、該プライマーを当該標的分子内のそれらの相補的配列にアニーリングさせる。アニーリングの後、これらプライマーをポリメラーゼで伸長させ、新たな相補鎖の対を形成する。変性、プライマーのアニーリング、及びポリメラーゼ伸長のステップを多数回繰り返し（すなわち、変性、アニーリング、及び伸長が1つの「サイクル」を構成し、多数の「サイクル」があり得る）、高濃度の所望の標的配列の増幅セグメントを得ることができる。所望の標的配列の増幅セグメントの長さは、互いに対するプライマーの相対位置によって決まり、従って、この長さは、制御可能なパラメータである。この工程の繰り返しの観点から、この方法は、「ポリメラーゼ連鎖反応」（「PCR」）と呼ばれる。標的配列の所望の増幅セグメントが当該混合物中で優勢な配列（濃度の点で）になるため、それらは、「PCRで増幅された」といわれ、「PCR産物」または「アンプリコン」である。

10

【0071】

鋳型特異性は、ほとんどの増幅技術において、酵素の選択により達成される。増幅酵素は、それらが使用される条件下、核酸の異種混合物中の核酸の特定の配列のみを処理する酵素である。例えば、Qレプリカーゼの場合は、MDV-1 RNAが該レプリカーゼの特異的鋳型である（Kacian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69:3038 [1972]）。他の核酸は、この増幅酵素によって複製されない。同様に、T7 RNAポリメラーゼの場合、この増幅酵素は、それ自体のプロモーターに対して厳密な特異性を有する（Chamberlin et al., Nature, 228:227 [1970]）。T4 DNAリガーゼの場合、該酵素は、2つのオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを結合しない。ここでは、当該オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド基質と鋳型間にライゲーシンの接合部でミスマッチがある（Wu and Wallace (1989) Genomics 4:560）。最後に、熱安定性鋳型依存性DNAポリメラーゼ（例えば、Taq及びPfu DNAポリメラーゼ）は、高温で機能する能力のため、プライマーによって囲まれ、それ故画定される配列に対して高い特異性を示すことが分かる。高温は、標的配列とのプライマーのハイブリダイゼーションには有利に働き、非標的配列とのハイブリダイゼーションには都合が悪い熱力学的条件をもたらす（H. A. Erlich (ed.), PCR Technology, Stockton Press [1989]）。

20

【0072】

本明細書で使用される「核酸検出アッセイ」という用語は、目的の核酸のヌクレオチド組成を決定する任意の方法を指す。核酸検出アッセイとしては、限定されないが、DNA配列決定法、プローブハイブリダイゼーション法、構造特異的切断アッセイ（例えば、INVADERアッセイ、Hologic, Inc.）（例えば、米国特許第5,846,717号、第5,985,557号、第5,994,069号、第6,001,567号、第6,090,543号、及び第6,872,816号、Lyamichev et al., Nat. Biotech., 17:292 (1999)、Hall et al., PNAS, USA, 97:8272 (2000)、ならびにUS2009/0253142）に記載されている）、酵素ミスマッチ切断法（例えば、Variagenics、米国特許第6,110,684号、第5,958,692号、第5,851,770号）、ポリメラーゼ連鎖反応、分岐ハイブリダイゼーション法（例えば、Chiron、米国特許第5,849,481号、第5,710,264号、第5,124,246号、及び第5,624,802号）、ローリングサークル複製（例えば、米国特許第6,210,884号、第6,183,960号、及び第6,235,502号）、NASBA（例えば、米国特許第5,409,818号）、分子標識技術（例えば、米国特許第6,150,097号）、Eセンサー技術（Motorola、米国特許第6,248,229号、第6,221,583号、第6,013,170号、及び第6,063,573号）、サイクリングプローブ技術（例えば、米国特許第5,403,711号、第5,011,769号、及び第5,660,988号）、Dade Behringシグナル増幅法（例えば、米国特許第6,121,001号、第6,110,677号、第5,914,230

30

40

50

号、第5,882,867号、及び第5,792,614号)、リガーゼ連鎖反応(例えば、Barnay Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88,189-93(1991))、ならびにサンドイッチハイブリダイゼーション法(例えば、米国特許第5,288,609号)が挙げられる。

【0073】

「増幅可能な核酸」という用語は、任意の増幅法で増幅され得る核酸を指す。「増幅可能な核酸」は、通常、「試料鋳型」を含むことが企図される。

【0074】

「試料鋳型」という用語は、「標的」(以下に定義する)の存在について分析される試料に由来する核酸を指す。対照的に、「バックグラウンド鋳型」は、試料中に存在する場合もしない場合もある試料鋳型以外の核酸に関して使用される。バックグラウンド鋳型は、ほとんどの場合不注意である。それはキャリーオーバーの結果の場合もあれば、当該試料から精製されることが求められている核酸混入物質の存在に起因する場合もある。例えば、検出されるべきものの以外の生物由来の核酸が、試験試料中にバックグラウンドとして存在する場合がある。

【0075】

「プライマー」という用語は、精製された制限消化物において見られるように天然に存在するか合成的に生成されるかにかかわらず、核酸鎖に相補的なプライマーの伸長産物の合成が誘導される条件下(例えば、ヌクレオチド及び誘導剤、例えば、DNAポリメラーゼの存在下、ならびに適切な温度及びpH)に置かれた場合に合成の開始点として作用することが可能なオリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、増幅における最大効率のために一本鎖であることが好ましいが、代替的に二本鎖でもよい。二本鎖の場合、プライマーは、最初にその鎖を分離するための処理をされ、その後伸長産物の調製に使用される。好ましくは、プライマーはオリゴデオキシリボヌクレオチドである。プライマーは、誘導剤の存在下で伸長産物の合成を開始するのに十分な長さでなければならない。プライマーの正確な長さは、温度、プライマーの供給源、及び当該方法の用途を含めた多くの要因に依存する。

【0076】

「プローブ」という用語は、精製された制限消化物において見られるように天然に存在するか、または合成的に、組み換え的に、もしくはPCR増幅により生成されるかにかかわらず、目的の別のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチド(例えば、ヌクレオチドの配列)を指す。プローブは、一本鎖でも二本鎖でもよい。プローブは、特定の遺伝子配列の検出、識別、及び単離に有用である(例えば、「捕捉プローブ」)。本発明で使用される任意のプローブは、いくつかの実施形態では、限定されないが、酵素(例えば、ELISA、及び酵素ベースの組織化学的アッセイ)、蛍光、放射性、及び発光システムを含めた任意の検出システムで検出できるように、任意の「レポーター分子」で標識され得ることが企図される。本発明は、任意の特定の検出システムまたは標識に限定されることを意図しない。

【0077】

本明細書で使用される「メチル化」は、シトシンのC5またはN4位でのシトシンメチル化、アデニンのN6位、または他の種類の核酸のメチル化を指す。通常のインビトロDNA増幅法は、増幅鋳型のメチル化パターンを保持しないため、インビトロ増幅DNAは、通常メチル化されていない。しかしながら、「非メチル化DNA」または「メチル化DNA」は、それらの元の鋳型がそれぞれメチル化されていないまたはメチル化されている増幅DNAも指す場合がある。

【0078】

従って、本明細書で使用される「メチル化ヌクレオチド」または「メチル化ヌクレオチド塩基」は、当該メチル部分が広く認められている典型的なヌクレオチド塩基には存在しないヌクレオチド塩基のメチル部分の存在を指す。例えば、シトシンは、そのピリミジン環にメチル部分を含まないが、5-メチルシトシンはそのピリミジン環の5位にメチル部

10

20

30

40

50

分を含む。従って、シトシンはメチル化ヌクレオチドではなく、5 - メチルシトシンはメチル化ヌクレオチドである。別の例では、チミンはそのピリミジン環の5位にメチル部分を含むが、本明細書の目的のため、チミンはDNAの典型的なヌクレオチド塩基であるため、DNAに含まれる場合、チミンをメチル化ヌクレオチドと見なさない。

【0079】

本明細書で使用される「メチル化核酸分子」は、1つ以上のメチル化ヌクレオチドを含む核酸分子を指す。

【0080】

本明細書で使用される、核酸分子の「メチル化状態 (methylation state)」、「メチル化プロファイル」、及び「メチル化状態 (methylation status)」は、該核酸分子中での1つ以上のメチル化ヌクレオチド塩基の存在または非存在を指す。例えば、メチル化シトシンを含む核酸分子は、メチル化されていると見なされる (例えば、該核酸分子のメチル化状態は、メチル化である)。メチル化ヌクレオチドを少しも含まない核酸分子は、非メチル化と見なされる。

【0081】

特定の核酸配列 (例えば、本明細書に記載の遺伝子マーカーまたはDNA領域) のメチル化状態は、該配列のすべての塩基のメチル化状態を示す場合もあれば、該配列内の塩基のサブセット (例えば、1つ以上のシトシンの) のメチル化状態を示す場合もあれば、該配列内の局所的なメチル化の密度に関する情報を、メチル化が生じる配列内の正確な位置情報を提供して、または提供せずに示す場合もある。

【0082】

核酸分子のヌクレオチドの遺伝子座のメチル化状態は、該核酸分子の特定の遺伝子座においてメチル化されたヌクレオチドの存在または非存在を指す。例えば、核酸分子の7番目のヌクレオチドでのシトシンのメチル化状態は、該核酸分子の7番目のヌクレオチドに存在するヌクレオチドが5 - メチルシトシンである場合にメチル化である。同様に、核酸分子の7番目のヌクレオチドでのシトシンのメチル化状態は、該核酸分子の7番目のヌクレオチドに存在するヌクレオチドがシトシンである (5 - メチルシトシンでない) 場合に非メチル化である。

【0083】

該メチル化状態は、任意に、「メチル化値」によって表すことまたは示すことができる (例えば、メチル化の頻度、割合、比率、パーセント等を表す)。メチル化値は、例えば、メチル化依存性制限酵素による制限消化後に存在するインタクトな核酸の量を定量することによっても、バイサルファイト反応後の増幅プロファイルと比較することによっても、バイサルファイト処理及び未処理の核酸の配列を比較することによっても生成することができる。従って、ある値、例えば、メチル化値は、メチル化状態を表し、ひいては、遺伝子座の複数のコピーにわたるメチル化状態の数値指標として使用することができる。これは、試料中のある配列のメチル化状態を閾値または基準値と比較することが望ましい場合に特に有用である。

【0084】

本明細書で使用される「メチル化頻度」または「メチル化パーセント (%)」は、分子または遺伝子座が非メチル化である場合の数に対する分子または遺伝子座がメチル化である場合の数を指す。

【0085】

このように、該メチル化状態は、核酸 (例えば、ゲノム配列) のメチル化状態を表す。さらに、該メチル化状態は、メチル化と関連する特定のゲノム遺伝子座での核酸セグメントの特徴を指す。かかる特徴としては、限定されないが、このDNA配列内のシトシン (C) 残基のいずれかがメチル化されているかどうか、メチル化C残基 (複数可) の位置、核酸の任意の特定の領域にわたるメチル化Cの頻度またはパーセンテージ、及び、例えば、当該対立遺伝子の起源の差に起因する対立遺伝子のメチル化の差が挙げられる。「メチル化状態 (methylation state)」、「メチル化プロファイル」、及び

10

20

30

40

50

「メチル化状態 (methylation status)」という用語はまた、生体試料の核酸の任意の特定の領域にわたるメチル化Cまたは非メチル化Cの相対濃度、絶対濃度、またはパターンを指す。例えば、核酸配列内のシトシン (C) 残基 (複数可) がメチル化されている場合、「高度メチル化」または「メチル化が増加」していると呼ばれ得る一方、DNA配列内のシトシン (C) 残基 (複数可) がメチル化されていない場合、「低メチル化」または「メチル化が減少」していると呼ばれ得る。同様に、核酸配列内のシトシン (C) 残基 (複数可) が、別の核酸配列 (例えば、異なる領域由来または異なる個体由来のもの等) と比較してメチル化されている場合、その配列は、他方の核酸配列と比較して高度メチル化またはメチル化が増加していると見なされる。代替的に、DNA配列内のシトシン (C) 残基 (複数可) が、別の核酸配列 (例えば、異なる領域由来または異なる個体由来のもの等) と比較してメチル化されていない場合、その配列は、他方の核酸配列と比較して低メチル化またはメチル化が減少していると見なされる。さらに、本明細書で使用される「メチル化パターン」という用語は、核酸のある領域にわたるメチル化及び非メチル化ヌクレオチドの集合部位を指す。2つの核酸は、当該領域にわたってメチル化及び非メチル化ヌクレオチドの数が同一または同様であるが、メチル化及び非メチル化ヌクレオチドの位置が異なる場合、同一または同様のメチル化頻度またはメチル化パーセントを有し得るが、異なるメチル化パターンを有し得る。配列は、メチル化の程度が異なる (例えば、一方が他方に対してメチル化が増加または減少している)、頻度が異なる、またはパターンが異なる場合「差次的メチル化」、または「メチル化の差」を有する、または「異なるメチル化状態」を有するといわれる。「差次的メチル化」という用語は、がん陰性試料における核酸のメチル化のレベルまたはパターンと比較した、がん陽性試料における核酸のメチル化のレベルまたはパターンの差を指す。これはまた、手術後にがんが再発した患者と再発していない患者の間のレベルまたはパターンの差を指す場合もある。差次的メチル化及び特定のレベルまたはパターンのDNAメチル化は、例えば、正しいカットオフまたは予測特性が定義されると、予後及び予測バイオマーカーである。

【0086】

メチル化状態の頻度は、個体の集団または単一の個体由来の試料を説明するために使用することができる。例えば、メチル化状態の頻度50%を有するヌクレオチド遺伝子座は、50%の事例がメチル化されており、50%の事例が非メチル化である。かかる頻度を用いて、例えば、ヌクレオチド遺伝子座または核酸領域が、個体の集団または核酸の一群においてメチル化される程度を示すことができる。従って、核酸分子の第一の集団またはプールにおけるメチル化が核酸分子の第二の集団またはプールにおけるメチル化と異なる場合、該第一の集団またはプールのメチル化状態の頻度は、該第二の集団またはプールのメチル化状態の頻度と異なる。かかる頻度を用いて、例えば、ヌクレオチド遺伝子座または核酸領域が、単一の個体においてメチル化される程度を示すこともできる。例えば、かかる頻度を用いて、組織試料由来の細胞群がヌクレオチド遺伝子座または核酸領域でメチル化されているまたはメチル化されていない程度を示すことができる。

【0087】

本明細書で使用される「ヌクレオチド遺伝子座」は、核酸分子におけるヌクレオチドの位置を指す。メチル化ヌクレオチドのヌクレオチド遺伝子座は、核酸分子におけるメチル化ヌクレオチドの位置を指す。

【0088】

通常、ヒトDNAのメチル化は、隣接するグアニンとシトシンを含み、シトシンがグアニンの5'に位置するジヌクレオチド配列 (CpGジヌクレオチド配列とも呼ばれる) で起こる。CpGジヌクレオチド内のシトシンはほとんど、ヒトゲノムではメチル化されているが、CpGアイランドとして知られる特定の高CpGジヌクレオチドのゲノム領域では一部非メチル化のままである (例えば、Antequera et al. (1990) Cell 62: 503-514 参照)。

【0089】

本明細書で使用される「CpGアイランド」とは、全ゲノムDNAに対して増加したC

p Gジヌクレオチド数を含むゲノムDNAの高G : C領域を指す。C p Gアイランドは、長さが少なくとも100、200、またはそれ以上の塩基対であることができ、ここでは、当該領域のG : C含量は、少なくとも50%であり、観察されるC p G頻度の予測される頻度に対する比は、0.6であり、いくつかの場合では、C p Gアイランドは、長さが少なくとも500塩基対であることができ、ここでは、当該領域のG : C含量は、少なくとも55%であり、観察されるC p G頻度の予測される頻度に対する比は0.65である。予測される頻度に対する観察されるC p G頻度は、Gardiner - Gardener et al (1987) J. Mol. Biol. 196 : 261 - 281に示される方法に従って計算することができる。例えば、予測される頻度に対する観察されるC p G頻度は、式 $R = (A \times B) / (C \times D)$ に従って計算することができ、ここで、Rは、観察されるC p G頻度の予測される頻度に対する比であり、Aは、分析される配列におけるC p Gジヌクレオチドの数であり、Bは、分析される配列におけるヌクレオチドの総数であり、Cは、分析される配列におけるCヌクレオチドの総数であり、Dは、分析される配列におけるGヌクレオチドの総数である。メチル化状態は、通常、C p Gアイランドの、例えば、プロモーター領域で測定される。しかしながら、ヒトゲノムにおける他の配列、例えば、C p A及びC p TがDNAメチル化をしやすいことが理解されよう（例えば、Ram sa h o y e (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 : 5237 - 5242、Salmon and Kaye (1970) Biochim. Biophys. Acta. 204 : 340 - 351、Grafstrom (1985) Nucl e i c A c i d s R e s . 13 : 2827 - 2842、Nyce (1986) Nucl e i c A c i d s R e s . 14 : 4353 - 4367、Woodcock (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 145 : 888 - 894 参照）。

【0090】

本明細書で使用される、当該核酸分子のメチル化状態に応じて該核酸分子のヌクレオチドを修飾する試薬、すなわち、メチル化特異的試薬とは、該核酸分子のメチル化状態を反映する方法で核酸分子のヌクレオチド配列を変化させることができる化合物もしくは組成物または他の薬剤を指す。かかる試薬で核酸分子を処理する方法は、該核酸分子を該試薬と接触させ、所望であればさらなるステップと組み合わせ、所望のヌクレオチド配列の変化を達成することを含み得る。該核酸分子のヌクレオチド配列のかかる変化は、メチル化ヌクレオチドの各々が異なるヌクレオチドに修飾される核酸分子をもたらすことができる。該核酸のヌクレオチド配列のかかる変化は、非メチル化ヌクレオチドの各々が異なるヌクレオチドに修飾される核酸分子をもたらすことができる。該核酸のヌクレオチド配列におけるかかる変化は、選択された非メチル化ヌクレオチドの各々（例えば、各非メチル化シトシン）が異なるヌクレオチドに修飾される核酸分子をもたらすことができる。該核酸のヌクレオチド配列を変更するためのかかる試薬の使用は、メチル化ヌクレオチドである各ヌクレオチド（例えば、各メチル化シトシン）が異なるヌクレオチドに修飾される核酸分子をもたらすことができる。本明細書で使用される、選択されたヌクレオチドを修飾する試薬の使用とは、核酸分子に通常生じる4種のヌクレオチド（DNAではC、G、T、及びAならびにRNAではC、G、U、及びA）のうちの1種のヌクレオチドを修飾する試薬を指し、従って、該試薬は他の3種のヌクレオチドを修飾することなく該1種のヌクレオチドを修飾する。1つの例示的な実施形態では、かかる試薬は、選択された非メチル化ヌクレオチドを修飾して異なるヌクレオチドを生成する。別の例示的な実施形態では、かかる試薬は、非メチル化シトシンヌクレオチドを脱アミノ化することができる。例示的な試薬はバイサルファイトである。

【0091】

本明細書で使用される「バイサルファイト試薬」という用語は、いくつかの実施形態では、メチル化及び非メチル化シチジンを、例えば、C p Gジヌクレオチド配列において区別するためのバイサルファイト、ジサルファイト、ハイドロジェンサルファイト、またはそれらの組み合わせを含む試薬を指す。

【0092】

「メチル化アッセイ」という用語は、ある核酸の配列内の1つ以上のCpGジヌクレオチド配列のメチル化状態を測定するための任意のアッセイを指す。

【0093】

「MSAP-PCR」(メチル化感受性任意プライムポリメラーゼ連鎖反応)という用語は、高CGプライマーを用いたゲノムの全体的なスキャンを可能にし、CpGジヌクレオチドを含む可能性が最も高い領域に焦点を合わせるものであり、Gonzalogo et al. (1997) Cancer Research 57: 594-599に記載されている、当技術分野で認められている技術を指す。

【0094】

「MethyLight (商標)」という用語は、Eads et al. (1999) Cancer Res. 59: 2302-2306に記載されている、当技術分野で認められている蛍光ベースのリアルタイムPCR技術を指す。

【0095】

「HeavyMethyl (商標)」という用語は、増幅プライマー間の、またはこれらに覆われたCpG部分を覆うメチル化特異的ブロッキングプロープ(本明細書ではブロkkerとも呼ばれる)が、核酸試料のメチル化特異的選択的増幅を可能にするアッセイを指す。

【0096】

「HeavyMethyl (商標) MethyLight (商標)」アッセイという用語は、HeavyMethyl (商標) MethyLight (商標)アッセイを指し、これは、MethyLight (商標)アッセイの変形であり、ここでは、MethyLight (商標)アッセイが増幅プライマー間のCpG位置を覆うメチル化特異的ブロッキングプロープと組み合わせられる。

【0097】

「Ms-SNuPE」(メチル化感受性単一ヌクレオチドプライマー伸長)という用語は、Gonzalogo & Jones (1997) Nucleic Acids Res. 25: 2529-2531に記載の当技術分野で認められているアッセイを指す。

【0098】

「MSP」(メチル化特異的PCR)という用語は、Herman et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9821-9826、及び米国特許第5,786,146号に記載の当技術分野で認められているメチル化アッセイを指す。

【0099】

「COBRA」(複合バイサルファイト制限分析)という用語は、Xiong & Laird (1997) Nucleic Acids Res. 25: 2532-2534に記載の当技術分野で認められているメチル化アッセイを指す。

【0100】

「MCA」(メチル化CpGアイランド増幅)という用語は、Toyota et al. (1999) Cancer Res. 59: 2307-12、及びWO00/26401A1に記載のメチル化アッセイを指す。

【0101】

本明細書で使用される「選択されたヌクレオチド」とは、核酸分子に通常生じる4種のヌクレオチド(DNAではC、G、T、及びAならびにRNAではC、G、U、及びA)のうちの1種のヌクレオチドを指し、該通常生じるヌクレオチドのメチル化誘導体を含む場合がある(例えば、Cが選択されたヌクレオチドの場合、メチル化及び非メチル化Cの両方が選択されたヌクレオチドの意味に含まれる)一方、メチル化された選択されたヌクレオチドは、メチル化された通常生じるヌクレオチドを特異的に指し、メチル化されていない選択されたヌクレオチドは、メチル化されていない通常生じるヌクレオチドを特異的に指す。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 2 】

「メチル化特異的制限酵素」または「メチル化感受性制限酵素」という用語は、その認識部位のメチル化状態に依存して、核酸を選択的に消化する酵素を指す。認識部位がメチル化されていない、またはヘミメチル化されている場合に特異的に切断する制限酵素の場合は、認識部位がメチル化されている場合には切断が起こらないか、または著しく低下した効率で起こる。認識部位がメチル化されている場合に特異的に切断する制限酵素の場合は、認識部位がメチル化されていない場合には切断が起こらないか、または著しく低下した効率で起こる。好ましいのは、その認識配列が、C G ジヌクレオチド（例えば、C G C G または C C C G G 等の認識配列）を含むメチル化特異的制限酵素である。いくつかの実施形態にとってさらに好ましいのは、このジヌクレオチドのシトシンが、炭素原子 C 5 においてメチル化されている場合に切断しない制限酵素である。

10

【 0 1 0 3 】

本明細書で使用される「異なるヌクレオチド」とは、選択されたヌクレオチドとは化学的に異なるヌクレオチドを指し、通常は、従って、該異なるヌクレオチドは、該選択されたヌクレオチドとは異なるワトソン・クリックの塩基対合特性を有し、それにより、該選択されたヌクレオチドに相補的な通常生じるヌクレオチドは、該異なるヌクレオチドに相補的な通常生じるヌクレオチドと同じではない。例えば、C が選択されたヌクレオチドである場合、U または T が異なるヌクレオチドである可能性があり、これは、C と G の相補性及び U または T と A の相補性によって例示される。本明細書で使用される、選択されたヌクレオチドに相補的なヌクレオチドまたは異なるヌクレオチドに相補的なヌクレオチドとは、高ストリンジェンシー条件下で、該選択されたヌクレオチドまたは異なるヌクレオチドと、4 種の通常生じるヌクレオチドのうちの 3 種との相補的ヌクレオチドの塩基対合より高い親和性で塩基対合するヌクレオチドを指す。相補性の例は、DNA（例えば、A - T 及び C - G）ならびに RNA（例えば、A - U 及び C - G）のワトソン・クリック塩基対である。従って、例えば、G は C と、高ストリンジェンシー条件下で、G が G、A、または T と塩基対合するより高い親和性で塩基対合し、それ故、C が選択されたヌクレオチドである場合、G が、該選択されたヌクレオチドに相補的なヌクレオチドである。

20

【 0 1 0 4 】

本明細書で使用される、所与のマーカーの「感度」とは、腫瘍性試料と非腫瘍性試料を区別する閾値を超える DNA メチル化値を報告する試料のパーセンテージを指す。いくつかの実施形態では、陽性は、閾値を超える DNA メチル化値（例えば、疾患に関連する範囲）を報告する組織学的に確認される新生物形成として定義され、偽陰性は、閾値未満の DNA メチル化値（例えば、無疾患に関連する範囲）を報告する組織学的に確認される新生物形成として定義される。感度の値は、従って、既知の病変試料由来の所与のマーカーの DNA メチル化測定値が疾患関連測定値の範囲内である確率を反映する。本明細書で定義される通り、計算された感度値の臨床的関連性は、臨床症状を有する対象に適用された場合に所与のマーカーがその臨床症状の存在を検出する確率の推定を表す。

30

【 0 1 0 5 】

本明細書で使用される、所与のマーカーの「特異度」とは、腫瘍性試料と非腫瘍性試料を区別する閾値未満の DNA メチル化値を報告する非腫瘍性試料のパーセンテージを指す。いくつかの実施形態では、陰性は、閾値未満の DNA メチル化値（例えば、無疾患に関連する範囲）を報告する組織学的に確認される非腫瘍性試料として定義され、偽陽性は、閾値を超える DNA メチル化値（例えば、疾患に関連する範囲）を報告する組織学的に確認される非腫瘍性試料として定義される。特異度の値は、従って、既知の非腫瘍性試料由来の所与のマーカーの DNA メチル化測定値が無疾患関連測定値の範囲内である確率を反映する。本明細書で定義される通り、計算された特異度値の臨床的関連性は、臨床症状がない患者に適用された場合に所与のマーカーがその臨床症状の欠如を検出する確率の推定を表す。

40

【 0 1 0 6 】

本明細書で使用される「AUC」という用語は、「曲線下面積」の略語である。特に、

50

これは、受信者操作特性 (ROC) 曲線下面積を指す。ROC 曲線は、診断試験の異なる可能なカットポイントに関する偽陽性率に対する真陽性率のプロットである。これは、選択されたカットポイントに応じた感度と特異度の間のトレードオフを示す (感度の何らかの増加は、特異度の減少を伴う)。ROC 曲線下面積 (AUC) は、診断試験の正確さの尺度である (面積が大きいほど良好である。最適は 1 である。ランダム試験は、面積 0.5 の対角線に ROC 曲線を有する。参考までに、J. P. Egan. (1975) Signal Detection Theory and ROC Analysis, Academic Press, New York)。

【0107】

本明細書で使用される「腫瘍」という用語は、「その増殖が正常組織のものを上回り、それと調和しない異常な組織の塊」を指す。例えば、Willis RA, "The Spread of Tumors in the Human Body", London, Butterworth & Co, 1952 を参照されたい。

【0108】

本明細書で使用される「腺腫」という用語は、腺起源の良性腫瘍を指す。これらの腫瘍は両性であるが、時間とともにそれらが進行して悪性になる可能性がある。

【0109】

「前がん状態」または「新生物発生前」という用語及びそれらの等価物は、悪性転換を受けている任意の細胞増殖性疾患を指す。

【0110】

腫瘍、腺腫、がん等の「部位」または「領域」は、該腫瘍、腺腫、がん等が位置する対象の体内の組織、器官、細胞型、解剖学的領域、身体部分等である。

【0111】

本明細書で使用される「診断」試験の適用は、対象の病態や病状の検出または特定を含み、対象が所与の疾患または状態に罹患する可能性を判断し、疾患または状態を有する対象が治療に反応する可能性を判断し、疾患または状態を有する対象の予後 (またはその推定進行もしくは後退) を決定し、疾患または状態を有する対象に対する治療の効果を判断する。例えば、ある診断は、腫瘍に罹患している対象の存在もしくは可能性、またはそのような対象が化合物 (例えば、医薬品、例えば、薬物) または他の治療に好都合に反応する可能性を検出するために使用することができる。

【0112】

本明細書で使用される「マーカー」という用語は、正常細胞と障害関連細胞 (例えば、該障害と関連する非がん性細胞) (例えば、該障害と関連するがん性細胞) を、例えばそのメチル化状態に基づいて区別することによって、障害 (例えば、非がん性障害) (例えば、がん性障害) と診断することができる物質 (例えば、核酸または核酸のある領域) を指す。

【0113】

「単離されたオリゴヌクレオチド」のように、核酸に関して使用される場合の「単離された」という用語は、ある核酸配列がその天然の供給源において通常関連する少なくとも 1 つの核酸混入物質から識別及び分離された核酸配列を指す。単離された核酸は、それが天然に見出されるものとは異なる形態または状況で存在する。対照的に、DNA 及び RNA 等の単離されていない核酸は、それらが天然に存在する状態で見られる。単離されていない核酸の例としては、隣接する遺伝子に近接して宿主細胞の染色体に見出される所与の DNA 配列 (例えば、遺伝子)、RNA 配列、例えば、多数のタンパク質をコードする多くの他の mRNA との混合物として細胞に存在する、特定のタンパク質をコードする特定の mRNA 配列が挙げられる。しかしながら、特定のタンパク質をコードする単離された核酸は、例として、該タンパク質を通常発現する細胞内のかかる核酸を含み、ここで、該核酸は、天然の細胞のものとは異なる染色体位置にあるか、または、天然に見られるものとは異なる核酸配列が横に配置されている。該単離された核酸またはオリゴヌクレオチドは、一本鎖の形態で存在する場合もあれば、二本鎖の形態で存在する場合もある。単離さ

10

20

30

40

50

れた核酸またはオリゴヌクレオチドがタンパク質を発現するために利用される場合、該オリゴヌクレオチドは、最低でもセンス鎖またはコード鎖を含む（すなわち、該オリゴヌクレオチドは一本鎖であり得る）が、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方を含んでもよい（すなわち、該オリゴヌクレオチドは二本鎖であり得る）。単離された核酸は、その天然のまたは通常的环境から単離後、他の核酸または分子と組み合わせられ得る。例えば、単離された核酸は、例えば、異種発現のため、それが配置されている宿主細胞に含まれてもよい。

【0114】

「精製された」という用語は、それらの天然の環境から取り出された、単離された、または分離された核酸またはアミノ酸配列のいずれかの分子を指す。「単離された核酸配列」は、従って、精製された核酸配列であり得る。「実質的に精製された」分子は、それらと天然に結びついている他の成分を少なくとも60%含まず、好ましくは少なくとも75%含まず、及びより好ましくは少なくとも90%含まない。本明細書で使用される「精製された」または「精製すること」という用語はまた、試料からの混入物質の除去も指す。夾雑タンパク質の除去により、試料中の目的のポリペプチドまたは核酸の割合が増加する。別の例では、組み換えポリペプチドは、植物、細菌、酵母、または哺乳類の宿主細胞で発現され、これらのポリペプチドは、宿主細胞のタンパク質の除去により精製され、組み換えポリペプチドの割合は、それにより当該試料中で増加する。

【0115】

所与のポリヌクレオチド配列またはポリペプチドを「含む組成物」という用語は、所与のポリヌクレオチド配列またはポリペプチドを含む任意の組成物を広く指す。該組成物は、塩（例えば、NaCl）、洗剤（例えば、SDS）、及び他の成分（例えば、デンハート液、粉乳、サケ精子DNA等）を含む水溶液を含み得る。

【0116】

「試料」という用語は、その最も広い意味で使用される。ある意味では、それは動物細胞または組織を指すことができる。別の意味では、それは、任意の供給源、ならびに生体試料及び環境試料由来の標本または培養を含むことを意味する。生体試料は、植物または動物（ヒトを含む）から採取してよく、流体、固体、組織、及び気体を包含する。環境試料には、環境物質、例えば、表面物質、土壌、水、及び工業試料が含まれる。これらの例は、本発明に適用可能な試料の種類を限定すると解釈されない。

【0117】

本明細書で使用される、一部の状況で用いられる「遠隔試料」は、当該試料の細胞、組織、または器官供給源ではない部位から間接的に採取された試料に関連する。例えば、脾臓由来の試料物質がふん便試料中（例えば、脾臓から直接取った試料からではない）で評価される場合、この試料は遠隔試料である。

【0118】

本明細書で使用される「患者」または「対象」という用語は、当該技術が提供する様々な試験に供される生物を指す。「対象」という用語は、動物、好ましくは、ヒトを含めた哺乳類を含む。好ましい実施形態では、該対象は霊長類である。さらにいっそう好ましい実施形態では、該対象はヒトである。

【0119】

本明細書で使用される「キット」という用語は、物質を送達するための任意の送達システムを指す。反応アッセイとの関係において、かかる送達システムには、反応試薬（例えば、適切な容器の中のオリゴヌクレオチド、酵素等）及び/または支持材（例えば、緩衝剤、アッセイを行うための取扱説明書等）の保存、輸送、もしくは送達をある位置から別の位置へと可能にするシステムが含まれる。例えば、キットは、関連する反応試薬及び/または支持材を含む1つ以上の筐体（例えば、箱）を具備する。本明細書で使用される「断片化したキット」という用語は、各々が全キット成分の小部分を含む2つ以上の別々の容器を含む送達システムを指す。これらの容器は、対象とされるレシピエントに対して一緒にまたは別々に供給され得る。例えば、第一の容器は、アッセイに使用するための酵素を含む場合がある一方、第二の容器はオリゴヌクレオチドを含む。「断片化されたキット

10

20

30

40

50

」という用語は、連邦食品・医薬品・化粧品法第520条(e)の定めにより規制されるアナライト特異的試薬(ASR)を含むキットを包含することを意図しているが、それに限定されない。実際、各々が全キット成分の小部分を含む2つ以上の別々の容器を含む任意の送達システムは、「断片化されたキット」という用語に含まれる。対照的に、「混合型キット」とは、単一の容器に(例えば、所望の成分の各々を含む単一の箱に)反応アッセイの成分のすべてを含む送達システムを指す。「キット」という用語は、断片化されたキット及び混合型キットの両方が含まれる。

【0120】

技術の実施形態

本明細書に提供するのは、HCCのスクリーニング(例えば、調査)用の技術であり、具体的には、限定されないが、対象におけるHCCの存在を検出するための方法、組成物、及び関連する使用である。

10

【0121】

マーカー及び/またはマーカーのパネルは、HCC(実施例I、II、及びIII参照)(例えば、ACP1、BDH1、Chr12.133、CLEC11A、DAB2IP、DBNL、EMX1、EFNB2、HOXA1、LRRC4、SPINT2、TSPYL5、CCNJ_3707、CCNJ_3124、PFKP、SCRN1、及びECE1)を検出できると確認された(例えば、表1及び4に示されるアノテーションを有する染色体領域)。

【0122】

本明細書の開示は、ある特定の例示された実施形態に言及しているが、これらの実施形態は、例として示されており、限定としてではないことを理解されたい。

20

【0123】

該方法は、対象から単離した生体試料中の少なくとも1つのメチル化マーカーのメチル化状態を測定することを含み、ここで、該マーカーのメチル化状態の変化は、HCCの存在、またはHCCのクラスを示す。特定の実施形態は、差次的メチル化領域(DMR、例えば、DMR1~400(表1及び4より))を含み、HCCの診断(例えば、スクリーニング)に使用されるマーカーに関する。

【0124】

本明細書に提供され、表1及び3に記載されるDMR(例えば、DMR1~400)を含む少なくとも1つのマーカー、マーカーの領域、またはマーカーの塩基のメチル化分析が分析される実施形態に加えて、該技術は、さらに、対象におけるHCCの検出に有用なDMRを含む少なくとも1つのマーカー、マーカーの領域、またはマーカーの塩基を含むマーカーのパネルを提供する。

30

【0125】

該技術のいくつかの実施形態は、DMRを含む少なくとも1つのマーカー、マーカーの領域、またはマーカーの塩基のCpGメチル化状態の分析に基づいている。

【0126】

いくつかの実施形態では、本技術は、DMR(例えば、表1及び4に提供される(例えば、DMR1~400))を含む少なくとも1つのマーカー内のCpGジヌクレオチド配列のメチル化状態を測定するための1つ以上のメチル化アッセイと組み合わせたバイサルファイト技術の使用を提供する。ゲノムCpGジヌクレオチドは、メチル化される場合もされない場合もある(代替的に、それぞれアップ及びダウンメチル化として知られる)。しかしながら、本発明の方法は、異種性の生体試料、例えば、低濃度の腫瘍細胞、またはそれ由来の生体物質の、遠隔試料(例えば、血液、器官溶出液、またはふん便)のバックグラウンド内での分析に適する。従って、かかる試料内のCpG位置のメチル化状態を分析する場合、特定のCpG位置でのメチル化のレベル(例えば、パーセント、割合、比率、比、または程度)を測定するための定量的アッセイを使用してもよい。

40

【0127】

本技術によれば、DMRを含むマーカーにおけるCpGジヌクレオチド配列のメチル化

50

状態の測定は、対象におけるHCCの診断及び特徴づけの両方において有用性がある。

【0128】

マーカーの組み合わせ

いくつかの実施形態では、該技術は、表1及び/または4からの2つ以上のDMR（例えば、DMR番号1～400からの2つ以上のDMR）を含むマーカーの組み合わせのメチル化状態を評価することに関する。いくつかの実施形態では、2つ以上のマーカーのメチル化状態を評価することで、対象におけるHCCの存在を特定するためのスクリーニングまたは診断の特異度及び/または感度が増加する。

【0129】

様々ながんが様々なマーカーの組み合わせによって予測される。例えば、予測の特異度及び感度に関連する統計的技術によって特定される。該技術は、いくつかのがんに関する予測の組み合わせ及び有効な予測の組み合わせを特定するための方法を提供する。

【0130】

例えば、マーカー及び/またはマーカーのパネルは、HCC（実施例I、II、及びIII参照）（例えば、ACP1、BDH1、Chr12.133、CLEC11A、DAB2IP、DBNL、EMX1、EFNB2、HOXA1、LRRC4、SPINT2、TSPYL5、CCNJ__3707、CCNJ__3124、PFKP、SCRN1、及びECE1）を検出することができると認定された（例えば、表1及び4に示されるアノテーションを有する染色体領域）。

【0131】

メチル化状態のアッセイ方法

5-メチルシトシンの存在に関して、核酸を分析するために最も頻繁に用いられる方法は、DNA中の5-メチルシトシンの検出に関してFrommerらによって記載されたバイサルファイト法（Frommer et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1827-31）またはその変形に基づいている。5-メチルシトシンをマッピングするこのバイサルファイト法は、5-メチルシトシンではなくシトシンがハイドロジェンサルファイトイオン（バイサルファイトとしても知られる）と反応するという観察に基づいている。この反応は、通常、以下のステップに従って行われる。すなわち、第一に、シトシンがハイドロジェンサルファイトと反応してスルホン化シトシンを形成する。次に、このスルホン化された反応中間物の自発的な脱アミノ化でスルホン化ウラシルが得られる。最後に、このスルホン化ウラシルがアルカリ性条件下で脱スルホン化されてウラシルを生じる。ウラシルはアデニンと塩基対を形成する（それ故チミンのように振る舞う）一方、5-メチルシトシンはグアニンと塩基対合する（それ故シトシンのように振る舞う）ため、検出が可能である。これは、メチル化シトシンと非メチル化シトシンの区別を、例えば、バイサルファイトゲノム配列決定（Grigg G, & Clark S, Bioessays (1994) 16:431-36、Grigg G, DNA Seq. (1996) 6:189-98）または、例えば、米国特許第5,786,146号に開示されているメチル化特異的PCR（MSP）により可能にする。

【0132】

いくつかの従来の技術は、分析されるDNAをアガロースのマトリックスに封入し、それにより、DNAの拡散及び再生を防止し（バイサルファイトは一本鎖DNAとしか反応しない）、高速透析で沈殿及び精製のステップを置き換える（Olek A, et al. (1996) "A modified and improved method for bisulfite based cytosine methylation analysis" Nucleic Acids Res. 24:5064-6）ことを含む方法に関する。それ故、個々の細胞のメチル化状態を分析することが可能であり、この方法の有用性及び感度を説明している。5-メチルシトシンを検出するための従来法の概説は、Rein, T., et al. (1998) Nucleic Acids Res. 26:2255に示されている。

【0133】

該バイサルファイト技術は通常、バイサルファイト処理に続いて、既知の核酸の短い特定の断片を増幅し、その後、その生成物を配列決定 (Olek & Walter (1997) Nat. Genet. 17: 275 - 6) によって分析するか、またはプライマー伸長反応 (Gonzalgo & Jones (1997) Nucleic Acids Res. 25: 2529 - 31、WO95/00669、米国特許第6,251,594号) で個々のシトシン位置を分析することを含む。いくつかの方法は、酵素消化を用いる (Xiong & Laird (1997) Nucleic Acids Res. 25: 2532 - 4)。ハイブリダイゼーションによる検出もまた、当技術分野で記載されている (Olek et al., WO99/28498)。さらに、個々の遺伝子に関するメチル化の検出のためのバイサルファイト技術の使用が記載されている (Grigg & Clark (1994) Bioessays 16: 431 - 6、Zeschneigk et al. (1997) Hum Mol Genet. 6: 387 - 95、Feil et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22: 695、Martin et al. (1995) Gene 157: 261 - 4、WO9746705、WO9515373)。

【0134】

様々なメチル化アッセイ手法が当技術分野で知られており、本発明の技術に従うバイサルファイト処理と組み合わせて使用することができる。これらのアッセイは、核酸配列内の1つまたは複数のCpGジヌクレオチド (例えば、CpGアイランド) のメチル化状態の測定を可能にする。かかるアッセイには、他の技術の中でも、バイサルファイト処理核酸の配列決定、PCR (配列特異的増幅用)、サザンブロット分析、及びメチル化感受性制限酵素の使用が含まれる。

【0135】

例えば、ゲノム配列決定は、バイサルファイト処理を使用することによってメチル化パターン及び5 - メチルシトシン分布の分析について単純化されている (Frommer et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1827 - 1831)。さらに、バイサルファイト変換DNAから増幅されたPCR産物の制限酵素による消化は、例えば、Sadri & Hornsby (1997) Nucleic Acids Res. 24: 5058 - 5059に記載されるように、または、COBRA (複合バイサルファイト制限分析) (Xiong & Laird (1997) Nucleic Acids Res. 25: 2532 - 2534) として知られる方法に具体化されているように、メチル化状態の評価に用途を見出している。

【0136】

COBRA (商標) 分析は、少量のゲノムDNA中、特定の遺伝子座でDNAメチル化レベルを測定するのに有用な定量的メチル化アッセイである (Xiong & Laird, Nucleic Acids Res. 25: 2532 - 2534, 1997)。簡潔には、制限酵素による消化を用いて、重亜硫酸ナトリウムで処理されたDNAのPCR産物におけるメチル化依存性の配列の相違を明らかにする。メチル化依存性の配列の相違は、Frommerらによって記載された手順 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1827 - 1831, 1992) に従う標準的なバイサルファイト処理によって最初にゲノムDNAに導入される。バイサルファイト変換DNAのPCR増幅をその後、目的のCpGアイランドに対して特異的なプライマーを使用して行い、続いて、制限エンドヌクレアーゼ消化、ゲル電気泳動、及び特異的標識ハイブリダイゼーションプローブを用いた検出を行う。元のDNA試料中のメチル化レベルは、消化及び未消化のPCR産物の相対量によって、広範囲のDNAメチル化レベルにわたって直線的に定量的に表される。さらに、この技術は、確実に、顕微解剖されたパラフィン包埋組織試料由来のDNAに適用することができる。

【0137】

COBRA (商標) 分析用の通常の試薬 (例えば、通常のCOBRA (商標) ベースのキットに見出だされ得るもの) としては、限定されないが、特定の遺伝子座 (例えば、特

定の遺伝子、マーカー、DMR、遺伝子の領域、マーカーの領域、バイサルファイト処理DNA配列、CpGアイランド等)に対するPCRプライマー、制限酵素及び適切な緩衝剤、遺伝子ハイブリダイゼーションオリゴヌクレオチド、対照のハイブリダイゼーションオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドプローブ用のキナーゼ標識キット、及び標識ヌクレオチドが含まれ得る。さらに、バイサルファイト変換試薬としては、DNA変性緩衝剤、スルホン化緩衝剤、DNA回収試薬またはキット(例えば、沈殿、限外濾過、アフィニティークラム)、脱スルホン化緩衝剤、及びDNA回収成分を含み得る。

【0138】

好ましくは、「MethyLight(商標)」(蛍光ベースのリアルタイムPCR技術)(Eads et al., Cancer Res. 59:2302-2306, 1999)、Ms-SNuPE(商標)(メチル化感受性単一ヌクレオチドプライマー伸長)反応(Gonzalgo & Jones, Nucleic Acids Res. 25:2529-2531, 1997)、メチル化特異的PCR(「MSP」、Herman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826, 1996、米国特許第5,786,146号)、及びメチル化CpGアイランド増幅(「MCA」、Toyota et al., Cancer Res. 59:2307-12, 1999)等のアッセイが単独で、または1つ以上のこれら方法と組み合わせて使用される。

【0139】

「HeavyMethyl(商標)」アッセイ、すなわち技術は、バイサルファイト処理DNAのメチル化特異的増幅に基づくメチル化の差を評価するための定量的方法である。増幅プライマー間の、またはこれらに覆われたCpG位置を覆うメチル化特異的ブロッキングプローブ(「ブロッカー」)が、核酸試料のメチル化特異的選択的増幅を可能にする。

【0140】

「HeavyMethyl(商標)MethyLight(商標)」アッセイという用語は、HeavyMethyl(商標)MethyLight(商標)アッセイを指し、これは、MethyLight(商標)アッセイの変形であり、ここでは、MethyLight(商標)アッセイが増幅プライマー間のCpG位置を覆うメチル化特異的ブロッキングプローブと組み合わされる。このHeavyMethyl(商標)アッセイはまた、メチル化特異的増幅プライマーと組み合わせて使用してもよい。

【0141】

HeavyMethyl(商標)分析用の通常の試薬(例えば、通常のMethyLight(商標)ベースのキットに見出だされ得るもの)としては、限定されないが、特定の遺伝子座(例えば、特定の遺伝子、マーカー、DMR、遺伝子の領域、マーカーの領域、バイサルファイト処理DNA配列、CpGアイランド、またはバイサルファイト処理DNA配列もしくはCpGアイランド等)に対するPCRプライマー、ブロッキングオリゴヌクレオチド、最適化PCR緩衝剤及びデオキシヌクレオチド、ならびにTaqポリメラーゼを含み得る。

【0142】

MSP(メチル化特異的PCR)は、CpGアイランド内の事実上任意の群のCpG部位のメチル化状態を、メチル化感受性制限酵素の使用とは無関係に評価することを可能にする(Herman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826, 1996、米国特許第5,786,146号)。簡潔には、DNAを重亜硫酸ナトリウムで修飾し、これにより、メチル化シトシンではなく非メチル化シトシンをウラシルに変換し、その生成物を続いて、非メチル化に対比してメチル化DNAに特異的なプライマーで増幅する。MSPは、少量のDNAしか必要とせず、所与のCpGアイランド遺伝子座の0.1%のメチル化対立遺伝子に感受性であり、パラフィン包埋試料から抽出したDNAで行うことができる。MSP分析用の通常の試薬(例えば、通常のMSPベースのキットに見出だされ得るもの)としては、限定されないが、特定の遺伝

10

20

30

40

50

子座（例えば、特定の遺伝子、マーカー、DMR、遺伝子の領域、マーカーの領域、バイサルファイト処理DNA配列、CpGアイランド等）に対するメチル化及び非メチル化PCRプライマー、最適化PCR緩衝剤及びデオキシヌクレオチド、ならびに特定のプローブを含み得る。

【0143】

MethyLight（商標）アッセイは、PCRステップ後にさらなる操作を必要としない蛍光ベースのリアルタイムPCR（例えば、TaqMan（登録商標））を利用するハイスループット定量的メチル化アッセイである（Eads et al., Cancer Res. 59: 2302 - 2306, 1999）。簡潔には、MethyLight（商標）工程は、ゲノムDNAの混合試料から始め、標準的な手順に従ってこれを重亜硫酸ナトリウム反応で変換してメチル化依存性の配列の相違の混合プールにする（このバイサルファイト工程で非メチル化シトシン残基がウラシルに変換される）。その後、例えば、既知のCpGジヌクレオチドに重なるPCRプライマーを用い、「偏りのある」反応で蛍光ベースのPCRを行う。配列識別は、増幅工程のレベル及び蛍光検出工程のレベルの両方で起こる。

【0144】

MethyLight（商標）アッセイは、核酸、例えば、ゲノムDNA試料におけるメチル化パターンについての定量試験として使用され、配列識別はプローブのハイブリダイゼーションのレベルで起こる。定量型では、そのPCR反応は、特定の推定メチル化部位に重なる蛍光プローブの存在下、メチル化特異的増幅を与える。投入したDNA量に対する偏りのない対照は、プライマーもプローブも、いずれのCpGジヌクレオチドにも重ならない反応によって提供される。代替的に、ゲノムメチル化の定性試験は、偏りのあるPCRプールを、既知のメチル化部位を覆わない対照オリゴヌクレオチドで（例えば、蛍光ベース型のHeavyMethyl（商標）及びMSP技術）、または潜在的なメチル化部位を覆うオリゴヌクレオチドのいずれかでプローブすることによって達成される。

【0145】

MethyLight（商標）工程は、任意の適切なプローブ（例えば、「TaqMan（登録商標）」プローブ、Lightcycler（登録商標）プローブ等）とともに使用される。例えば、いくつかの用途では、二本鎖ゲノムDNAを重亜硫酸ナトリウムで処理し、TaqMan（登録商標）プローブと、例えば、MSPプライマー、及び/またはHeavyMethylブロッカーオリゴヌクレオチド及びTaqMan（登録商標）プローブを用いる2組のPCR反応のうちの1つに供する。TaqMan（登録商標）プローブは、蛍光「レポーター」及び「クエンチャ」分子で二重に標識され、比較的高GC含量の領域に特異的であるように設計されているため、PCRサイクルにおいて、順方向または逆方法プライマーより約10 高い温度で融解する。これにより、TaqMan（登録商標）プローブがPCRのアニーリング/伸長ステップの過程で完全にハイブリダイズされたままになる。PCRの過程でTaqポリメラーゼが新たな鎖を酵素的に合成するため、最終的にアニーリングされたTaqMan（登録商標）プローブに至る。Taqポリメラーゼの5'から3'のエンドヌクレアーゼ活性は、その後、TaqMan（登録商標）プローブを消化して外し、該蛍光レポーター分子を放出して、ここでクエンチが外された状態のそのシグナルの定量的検出のため、リアルタイム蛍光検出システムを用いる。

【0146】

MethyLight（商標）分析用の通常の実薬（例えば、通常のMethyLight（商標）ベースのキットに見出だされ得るもの）としては、限定されないが、特定の遺伝子座（例えば、特定の遺伝子、マーカー、DMR、遺伝子の領域、マーカーの領域、バイサルファイト処理DNA配列、CpGアイランド等）に対するPCRプライマー、TaqMan（登録商標）またはLightcycler（登録商標）プローブ、最適化PCR緩衝剤及びデオキシヌクレオチド、ならびにTaqポリメラーゼを含み得る。

【0147】

QM（商標）（定量的メチル化）アッセイは、ゲノムDNA試料におけるメチル化パタ

10

20

30

40

50

ーンの代替的な定量試験であり、配列識別は、プローブハイブリダイゼーションのレベルで起こる。この定量型では、そのPCR反応は、特定の推定メチル化部位に重なる蛍光プローブの存在下、偏りのない増幅を与える。投入したDNA量に対する偏りのない対照は、プライマーもプローブも、いずれのCpGジヌクレオチドにも重ならない反応によって提供される。代替的に、ゲノムメチル化の定性試験は、偏りのあるPCRプールを、既知のメチル化部位を覆わない対照オリゴヌクレオチドで（蛍光ベース型のHeavy Methyl（商標）及びMSP技術）、または潜在的なメチル化部位を覆うオリゴヌクレオチドでプローブすることによって達成される。

【0148】

QM（商標）工程は、任意の適切なプローブ、例えば、「TaqMan（登録商標）」プローブ、Lightcycler（登録商標）プローブ等とともに増幅工程で使用され得る。例えば、二本鎖ゲノムDNAを重亜硫酸ナトリウムで処理し、偏りのないプライマー及びTaqMan（登録商標）プローブに供する。TaqMan（登録商標）プローブは、蛍光「レポーター」及び「クエンチャ」分子で二重に標識され、比較的高GC含量の領域に特異的であるように設計されているため、PCRサイクルにおいて、順方向または逆方法プライマーより約10 高い温度で融解する。これにより、TaqMan（登録商標）プローブがPCRのアニーリング/伸長ステップの過程で完全にハイブリダイズされたままになる。PCRの過程でTaqポリメラーゼが新たな鎖を酵素的に合成するため、最終的にアニーリングされたTaqMan（登録商標）プローブに至る。Taqポリメラーゼの5'から3'のエンドヌクレアーゼ活性は、その後、TaqMan（登録商標）プローブを消化して外し、該蛍光レポーター分子を放出して、ここでクエンチが外された状態のそのシグナルの定量的検出のため、リアルタイム蛍光検出システムを用いる。QM（商標）分析用の通常の試薬（例えば、通常のQM（商標）ベースのキットに見出だされ得るもの）としては、限定されないが、特定の遺伝子座（例えば、特定の遺伝子、マーカー、DMR、遺伝子の領域、マーカーの領域、バイサルファイト処理DNA配列、CpGアイランド等）に対するPCRプライマー、TaqMan（登録商標）またはLightcycler（商標）プローブ、最適化PCR緩衝剤及びデオキシヌクレオチド、ならびにTaqポリメラーゼを含み得る。

【0149】

Ms-SNuPE（商標）技術は、DNAのバイサルファイト処理と、それに続く単一ヌクレオチドのプライマー伸長に基づく特定のCpG部位でのメチル化の違いを評価するための定量的方法である（Gonzalgo & Jones, Nucleic Acids Res. 25: 2529 - 2531, 1997）。簡潔には、ゲノムDNAを重亜硫酸ナトリウムと反応させて非メチル化シトシンをウラシルに変換すると同時に5 - メチルシトシンを変化させずにおく。所望の標的配列の増幅をその後、バイサルファイト変換DNAに特異的なPCRプライマーを用いて行い、得られた生成物を単離し、目的のCpG部位でのメチル化分析用の鋳型として使用する。少量のDNA（例えば、顕微解剖された病理切片）を分析することができ、CpG部位でのメチル化状態を測定するための制限酵素の利用を回避する。

【0150】

Ms-SNuPE（商標）分析用の通常の試薬（例えば、通常のMs-SNuPE（商標）ベースのキットに見出だされ得るもの）としては、限定されないが、特定の遺伝子座（例えば、特定の遺伝子、マーカー、DMR、遺伝子の領域、マーカーの領域、バイサルファイト処理DNA配列、CpGアイランド等）に対するPCRプライマー、最適化PCR緩衝剤及びデオキシヌクレオチド、ゲル抽出キット、陽性対照プライマー、特定の遺伝子に対するMs-SNuPE（商標）プライマー、反応緩衝剤（Ms-SNuPE反应用）、ならびに標識ヌクレオチドを含み得る。さらに、バイサルファイト変換試薬としては、DNA変性緩衝剤、スルホン化緩衝剤、DNA回収試薬またはキット（例えば、沈殿、限外濾過、アフィニティーカラム）、脱スルホン化緩衝剤、及びDNA回収成分が含まれ得る。

【0151】

Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) は、すべての非メチル化シトシンをウラシルに変換させるための核酸のバイサルファイト処理で始まり、制限酵素による消化（例えば、MspI 等のCG配列を含む部位を認識する酵素による）及びアダプターリガンドへの結合後の断片の完全な配列決定が続く。制限酵素を選択することで、CpG高密度領域用の断片を濃縮し、分析過程で複数の遺伝子位置に位置し得る不必要な配列の数を減らす。このように、RRBSは、配列決定用の制限断片のサブセットを選択することにより（例えば、分取ゲル電気泳動を用いるサイズ選択により）核酸試料の複雑さを減少させる。全ゲノムバイサルファイト配列決定とは対照的に、制限酵素による消化によって生成されたすべての断片は、少なくとも1つのCpGジヌクレオチドに関するDNAメチル化情報を含む。このように、RRBSは、それらの領域内に高頻度の制限酵素切断部位を有するプロモーター、CpGアイランド、及び他のゲノムの特徴用の試料を濃縮し、ひいては、1つ以上のゲノム遺伝子座のメチル化状態を評価するアッセイを提供する。

10

【0152】

RRBSの典型的なプロトコルは、MspI等の制限酵素で核酸試料を消化するステップ、オーバーハングを埋める及びA-テリングのステップ、アダプターを結合するステップ、バイサルファイト変換ステップ、ならびにPCRのステップを含む。例えば、etal.(2005) "Genome-scale DNA methylation mapping of clinical samples at single-nucleotide resolution" Nat Methods 7:133-6、Meisner et al.(2005) "Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis" Nucleic Acids Res. 33:5868-77を参照されたい。

20

【0153】

いくつかの実施形態では、定量的対立遺伝子特異的リアルタイム標的及びシグナル増幅 (QuARTS) アッセイを用いてメチル化状態を評価する。一次反応における増幅（反応1）及び標的プローブ切断（反応2）、ならびに二次反応におけるFRET切断及び蛍光シグナル生成（反応3）を含む3つの反応が各QuARTSアッセイで連続して起こる。標的核酸が特定のプライマーで増幅された場合、フラップ配列を有する特定の検出プローブが当該アンプリコンにゆるく結合する。該標的結合部位における特定の侵入性オリゴヌクレオチドの存在が亀裂を引き起こし、該検出プローブと該フラップ配列の間を切断することにより該フラップ配列を放出する。該フラップ配列は、対応するFRETカセットの非ヘアピン部分と相補的である。従って、該フラップ配列は、該FRETカセットに対して侵入性のオリゴヌクレオチドとして機能し、FRETカセットのフルオロフォアとクエンチャの間の切断をもたらし、これが蛍光シグナルを生成する。この切断反応は、1つの標的につき複数のプローブを切断し、ひいては1つのフラップにつき複数のフルオロフォアを放出し、指数関数的シグナル増幅を与える。QuARTSは、FRETカセットを異なる色素とともに用いることによって、単一の反応において複数の標的を十分に検出することができる。例えば、Zou et al.(2010) "Sensitive quantification of methylated markers with a novel methylation specific technology" Clin Chem 56:A199、米国特許出願第12/946,737号、第12/946,745号、第12/946,752号、及び第61/548,639号を参照されたい。

30

40

【0154】

「バイサルファイト試薬」という用語は、バイサルファイト、ジサルファイト、ハイドロジェンサルファイト、またはそれらの組み合わせを含む試薬を指し、本明細書に開示の通り、メチル化及び非メチル化CpGジヌクレオチド配列の区別に有用である。当該処理方法は、当技術分野で知られている（例えば、PCT/EP2004/011715）。

50

該バイサルファイト処理は、*n*-アルキレングリコールまたはジエチレングリコールジメチルエーテル (DME) 等であるがこれらに限定されない変性溶媒の存在下で、または、ジオキサンもしくはジオキサン誘導体の存在下で行うのが好ましい。いくつかの実施形態では、該変性溶媒は、濃度 1% ~ 35% (v/v) で使用される。いくつかの実施形態では、該バイサルファイト反応は、クロマン誘導体、例えば、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン2-カルボン酸またはトリヒドロキシベンズ酸及びその誘導体、例えば、没食子酸等であるがこれらに限定されない捕捉剤の存在下で行われる (PCT/EP 2004/011715 参照)。このバイサルファイト変換は、好ましくは、反応温度 30 ~ 70 で行われ、それにより、該温度は反応中に短時間 85 超に上昇する (PCT/EP 2004/011715 参照)。このバイサルファイトで処理された DNA は、好ましくは、定量化の前に精製される。これは、当技術分野で知られている任意の方法、例えば、これに限定されないが、限外濾過により、例えば、Microcon (商標) カラム (Millipore (商標) 製) を用いて行ってもよい。この精製は、修正された製造業者のプロトコルに従って行われる (例えば、PCT/EP 2004/011715 参照)。

【0155】

いくつかの実施形態では、処理された DNA の断片は、本発明に従うプライマーオリゴヌクレオチド (例えば、表 2 参照) と増幅酵素のセットを用いて増幅される。いくつかの DNA セグメントの増幅は、1つの同じ反応容器で同時に行うことができる。通常、増幅はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて行われる。アンプリコンは、通常、長さ 100 ~ 2000 塩基対である。

【0156】

該方法の別の実施形態では、DMR (例えば、DMR 1 ~ 400、表 1 及び 4) を含むマーカ内またはその近くの CpG 位置のメチル化状態は、メチル化特異的プライマーオリゴヌクレオチドの使用によって検出され得る。この技術 (MSP) は、Herman の米国特許第 6, 265, 171 号に記載されている。バイサルファイト処理 DNA の増幅用のメチル化状態特異的プライマーの使用で、メチル化核酸と非メチル化核酸の識別が可能になる。MSP プライマー対は、バイサルファイト処理 CpG ジヌクレオチドにハイブリダイズする少なくとも 1つのプライマーを含む。従って、当該プライマーの配列は、少なくとも 1つの CpG ジヌクレオチドを含む。非メチル化 DNA に特異的な MSP プライマーは、CpG の C 位置の位置に「T」を含む。

【0157】

増幅によって得られた断片は、直接的または間接的に検出可能な標識を担持することができる。いくつかの実施形態では、これらの標識は、蛍光標識、放射性核種、または質量分析計で検出できる典型的な質量を有する分離可能な分子断片である。該標識が質量標識の場合、いくつかの実施形態は、標識されたアンプリコンが単一の正または負の正味電荷を有すると定め、質量分析計でのより良好な検出性を可能にする。この検出は、例えば、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化質量分析 (MALDI) によって、または電子スプレー質量分析 (ESI) を用いて実施及び可視化され得る。

【0158】

これらのアッセイ技術に適した DNA の単離方法は、当技術分野で知られている。特に、いくつかの実施形態は、米国特許出願第 13/470, 251 号 (“Isolation of Nucleic Acids”) に記載の核酸の単離を含む。

【0159】

方法

いくつかの実施形態では、以下のステップを含む技術、すなわち、方法を提供する。

1) 対象から採取される核酸 (例えば、ゲノム DNA、例えば、血液試料 (例えば、血漿試料) 等の体液、ふん便試料、または組織試料から単離されたもの) を、DMR (例えば、DMR 1 ~ 400 (表 1 及び 4 より)) を含む少なくとも 1つのマーカ内のメチル化及び非メチル化 CpG ジヌクレオチドを区別する少なくとも 1つの試薬または一連の試薬

10

20

30

40

50

と接触させ、

2) HCCの欠如を検出する(例えば、80%以上の感度及び80%以上の特異度で与えられる)。

【0160】

いくつかの実施形態では、以下のステップを含む技術、すなわち、方法を提供する。

1) 対象から採取される核酸(例えば、ゲノムDNA、例えば、血液試料(例えば、血漿試料)等の体液、ふん便試料、または組織試料から単離されたもの)を、DMR(例えば、DMR1~400(表1及び4より))を含む少なくとも1つのマーカー内のメチル化及び非メチル化CpGジヌクレオチドを区別する少なくとも1つの試薬または一連の試薬と接触させ、

2) HCCを分類する(例えば、80%以上の感度及び80%以上の特異度で与えられる)。

好ましくは、該感度は約70%~約100%、または約80%~約90%、もしくは約80%~約85%である。好ましくは、該特異度は、約70%~約100%、または約80%~約90%、もしくは約80%~約85%である。

【0161】

ゲノムDNAは、市販のキットの使用を含め、任意の方法で単離され得る。簡潔には、目的のDNAが細胞膜に封入されている場合、当該生体試料を、酵素的、化学的、または機械的手段で破壊及び溶解する必要がある。そのDNA溶液からその後、例えば、プロテイナーゼKで消化することにより、タンパク質及び他の混入物質が除去され得る。そのゲノムDNAを次いでその溶液から回収する。これは、塩析、有機抽出、またはそのDNAを固相支持体に結合させることを含めた様々な方法で行われ得る。方法の選択は、時間、費用、及びDNAの必要量を含めたいくつかの要因に影響を受ける。腫瘍性物または前腫瘍性物を含むすべての臨床試料タイプ、例えば、細胞株、組織学的スライド、生検、パラフィン包埋組織、体液、ふん便、結腸溶出液、尿、血漿、血清、全血、単離された血球、血液から単離された細胞、及びそれらの組み合わせが本発明の方法での使用に適する。

【0162】

該技術は、試料を調製するため及び試験用の核酸を与えるために使用される方法に限定されない。例えば、いくつかの実施形態では、DNAは、ふん便試料から、または血液から、または血漿試料から、例えば、米国特許出願第61/485386号に詳述されている直接遺伝子捕獲または関連する方法を用いて単離される。

【0163】

ゲノムDNA試料をその後、DMR(例えば、DMR1~400、例えば、表1及び4により示される)を含む少なくとも1つのマーカー内のメチル化及び非メチル化CpGジヌクレオチドを区別する少なくとも1つの試薬、または一連の試薬で処理する。

【0164】

いくつかの実施形態では、該試薬は、5'位でメチル化されていないシトシン塩基をウラシル、チミン、またはハイブリダイゼーション挙動に関してシトシンとは異なる別の塩基に変換する。しかしながら、いくつかの実施形態では、該試薬は、メチル化感受性制限酵素であり得る。

【0165】

いくつかの実施形態では、該ゲノムDNA試料は、5'位でメチル化されていないシトシン塩基が、ウラシル、チミン、またはハイブリダイゼーション挙動に関してシトシンとは異なる別の塩基に変換されるような方法で処理される。いくつかの実施形態では、この処理は、バイサルファイト(ヒドロジェンサルファイト、ジサルファイト)を用いて行われ、その後、アルカリ加水分解が続く。

【0166】

処理された核酸をその後分析し、標的遺伝子配列(DMR、例えば、DMR1~400、例えば、表1及び4に示すものから選択される少なくとも1つのDMRを含むマーカー由来の少なくとも1つの遺伝子、ゲノム配列、またはヌクレオチド)のメチル化状態を決

10

20

30

40

50

定する。分析方法は、本明細書に記載のものを含めた当技術分野で知られているもの、例えば、本明細書に記載の Q u A R T S 及び M S P から選択され得る。

【 0 1 6 7 】

該技術は、H C C と関連する任意の試料の分析に関する。例えば、いくつかの実施形態では、該試料は、患者由来の血漿試料を含む。いくつかの実施形態では、該試料は、患者から採取された組織及び／または体液を含む。いくつかの実施形態では、該試料は、肝臓組織を含む。いくつかの実施形態では、該組織は、分泌物を含む。いくつかの実施形態では、該試料は、血液、血漿、及び／または血清を含む。いくつかの実施形態では、該対象はヒトである。これらの試料は、上部消化管、下部消化管が起源であっても、上部消化管及び下部消化管の両方由来の細胞、組織、及び／または分泌物を含んでもよい。該試料は、肝臓、胆管、膵臓、胃、結腸、直腸、食道、小腸、虫垂、十二指腸、ポリープ、胆嚢、肛門、及び／または腹膜由来の細胞、分泌物、または組織を含み得る。いくつかの実施形態では、該試料は、細胞液、腹水、尿、便、腓液、内視鏡検査の過程で得られる液、血液、粘液、または唾液を含む。いくつかの実施形態では、該試料はふん便試料である。

10

【 0 1 6 8 】

かかる試料は、当技術分野で知られている、例えば、当業者に明らかな様々な手段で採取することができる。例えば、尿及び便試料は容易に獲得可能である一方、血液、腹水、血清、または腓液試料は、例えば針と注射器を用いることによって非経口的に採取することができる。無細胞または実質的に無細胞の試料は、遠心分離及び濾過が挙げられるがこれらに限定されない当技術分野で知られている様々な技術に試料を供することによって獲得することができる。侵襲的な技術を用いずに試料を採取することが一般的に好ましいが、組織ホモジネート、組織切片、及び生検標本などの試料を得ることが好ましい場合もある。

20

【 0 1 6 9 】

該技術のいくつかの実施形態では、対象の H C C を診断する方法を提供する。本明細書で使用される「診断すること」及び「診断」という用語は、ある対象が所与の疾患または状態に罹患しているかどうか、または将来所与の疾患または状態を発症し得るかどうかを当業者が推定及びさらには判断することができる方法を指す。当業者は、多くの場合 1 つ以上の診断上の指標、例えば、該状態の存在、重症度、または非存在をそのメチル化状態が示すバイオマーカー（例えば、本明細書に開示する D M R ）に基づいて診断する。

30

【 0 1 7 0 】

診断とともに、臨床的ながんの予後（例えば、H C C について）は、がんの悪性度及び腫瘍の再発の可能性を判断して最も効果的な治療を計画することに関わる。より正確な予後診断を行うことができるか、またはがんの発症の潜在的なリスクさえも評価することができるか、当該患者にとって適切な治療、及び場合によってはあまり厳しくない治療を選択することができる。がんのバイオマーカーの評価（例えば、メチル化状態の測定）は、予後が良好であり、及び／またはがんの発症のリスクが低く、治療を必要としないか、または限定的な治療を必要とする対象を、がんの発症またはがんの再発の可能性がより高く、より集中的な治療が有効である対象と切り離すのに有用である。

【 0 1 7 1 】

40

このように、本明細書で使用される「診断を行うこと」または「診断すること」とは、さらに、がんを発症するリスクを判断することまたは予後を決定することを含み、これにより、本明細書に開示される診断的バイオマーカー（例えば、D M R ）の測定値に基づいて、臨床転帰が予測され（医療の有無にかかわらず）、適切な治療が選択され（もしくは治療が有効かどうか）、または現行の治療が管理され及び潜在的にその治療の変更がなされ得る。さらに、本開示の主題のいくつかの実施形態では、バイオマーカーの経時的な複数の測定を行い、診断及び／または予後を容易にすることができる。バイオマーカーの時間変化を用いて臨床転帰を予測し、H C C の進行を監視し、及び／またはがんに対する適切な治療の有効性を観察することができる。かかる実施形態では、例えば、有効な治療の過程で、生体試料における本明細書に開示される 1 つ以上のバイオマーカー（例えば、D

50

DMR) (及び観察される場合には潜在的に1つ以上のさらなるバイオマーカー)のメチル化状態の経時的変化を期待し得る。

【0172】

本開示の主題はさらに、いくつかの実施形態では、対象におけるHCCの予防もしくは治療を開始または継続するかどうかを判断する方法を提供する。いくつかの実施形態では、該方法は、当該対象からある期間にわたって一連の生体試料を供給し、該一連の生体試料を分析して該生体試料の各々における本明細書に開示する少なくとも1つのバイオマーカーのメチル化状態を測定し、該生体試料の各々における該バイオマーカーの1つ以上のメチル化状態の任意の測定可能な変化を比較することを含む。該期間にわたるバイオマーカーのメチル化状態の任意の変化を用いて、HCCの発症リスクを予測し、臨床転帰を予測し、該がんの予防もしくは治療を開始または継続するかどうかを判断し、現行の治療が効果的にHCCを治療しているかどうかを判断することができる。例えば、第一の時点进行治疗の開始前に選択することができ、第二の時点将该治療の開始後のある時点で選択することができる。メチル化状態は、異なる時点から採取された試料の各々で測定することができ、定性的及び/または定量的な違いが指摘される。異なる試料からのバイオマーカーレベルのメチル化状態の変化は、当該対象における障害のリスク(例えば、HCCのリスク)、予後、治療有効性の判断、及び/または進行と関連し得る。

10

【0173】

好ましい実施形態では、本発明の方法及び組成物は、疾患の初期段階での、例えば、該疾患の症状が現れる前の治療または診断用である。いくつかの実施形態では、本発明の方法及び組成物は、ある臨床ステージでの疾患の治療または診断用である。

20

【0174】

述べたように、いくつかの実施形態では、1つ以上の診断または予後バイオマーカーの複数の測定を行うことができ、該マーカーの時間変化を用いて診断または予後を判断することができる。例えば、診断マーカーを最初の時点で測定し、第二の時点で再度測定することができる。かかる実施形態では、最初の時点から第二の時点への該マーカーの増加は、特定のタイプもしくは重症度の障害、または所与の予後の診断となり得る。同様に、最初の時点から第二の時点への該マーカーの減少は、特定のタイプもしくは重症度の障害、または所与の予後の指標となり得る。さらに、1つ以上のマーカーの変化の程度は、障害の重症度及び将来的な有害事象に関連し得る。当業者には、ある特定の実施形態では複数の時点で同じバイオマーカーについて比較測定を行うことができる一方で、所与のバイオマーカーを1つの時点で、第二のバイオマーカーを第二の時点で測定することもでき、これらのマーカーの比較が診断情報を与え得ることが理解されよう。

30

【0175】

本明細書で使用される「予後を判断する」という表現は、当業者がある対象における状態の経過または転帰を予測することができる方法を指す。「予後」という用語は、100%の正確さで状態の経過または転帰を予測する能力を指すのではなく、バイオマーカー(例えば、DMR)のメチル化状態に基づいて、所与の経過または転帰が予想通りに事実上起こる可能性が高いことを指すのでもない。その代わり、当業者には、「予後」という用語が、ある特定の経過または転帰が起こる確率の増加、すなわち、ある経過または転帰が、所与の状態を示している対象において、該状態を示していない個体と比較して起こりやすいことを指すことが理解されよう。例えば、該状態を示していない(例えば、1つ以上のDMRの通常のメチル化状態を有する)個体では、所与の転帰の可能性は極めて低い場合がある。

40

【0176】

いくつかの実施形態では、ある統計分析は、予後指標を有害転帰への傾向と結びつける。例えば、いくつかの実施形態では、統計的有意水準で測定される、障害を有さない患者由来の正常対照試料のものと異なるメチル化状態は、ある対象が、該対照試料におけるメチル化状態とより類似したレベルを有する対象より、ある障害に罹患しやすいことを示唆する可能性がある。さらに、ベースライン(例えば、「正常」)レベルからのメチル化状

50

態の変化は、対象の予後を反映する可能性があり、メチル化状態の変化の程度は、有害事象の重症度に関連し得る。統計的有意性は、多くの場合、2つ以上の集団を比較し、信頼区間及び/またはp値を決定することによって決定される(例えば、Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York, 1983参照)。本主題の例示的な信頼区間は、90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.9%、及び99.99%であり、例示的なp値は、0.1、0.05、0.025、0.02、0.01、0.005、0.001、及び0.0001である。

【0177】

他の実施形態では、本明細書に開示する予後または診断バイオマーカー(例えば、DMR)のメチル化状態の変化度の閾値を規定することができ、生体試料中のバイオマーカーのメチル化状態の変化度を、単純に該メチル化状態の変化度の閾値と比較する。本明細書に提供するバイオマーカーのメチル化状態における好ましい閾値変化は、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約50%、約75%、約100%、及び約150%である。さらに他の実施形態では、「ノモグラム」を規定することができ、これにより、予後または診断指標(バイオマーカーまたはバイオマーカーの組み合わせ)のメチル化状態が、所与の転帰への関連する傾向と直接的に関連する。当業者であれば、母集団の平均ではなく個々の試料の測定値が参照されるため、この測定における不確実性がマーカー濃度の不確実性と同じであるという理解のもとで、2つの数値を関連させるためのかかるノモグラムの使用に精通している。

【0178】

いくつかの実施形態では、生体試料から得られる結果を対照試料から得られる結果と比較することができるように、対照試料を生体試料と同時に分析する。さらに、生体試料についてのアッセイの結果が比較され得る標準曲線が提供され得ることが企図される。かかる標準曲線は、バイオマーカーのメチル化状態をアッセイ単位、例えば、蛍光標識が使用される場合、蛍光シグナル強度の関数として示す。複数のドナーから採取した試料を用いて、標準曲線は、正常組織における1つ以上のバイオマーカーの対照メチル化状態に関してだけでなく、化生のドナーまたは障害(例えば、HCC)を有するドナーから採取した組織における1つ以上のバイオマーカーの「リスクがある」レベルに関して提供することができる。該方法のある特定の実施形態では、ある対象は、該対象由来の生体試料において本明細書に提供する1つ以上のDMRの異常なメチル化状態を特定すると、HCCを有すると特定される。該方法の他の実施形態では、当該対象由来の生体試料における1つ以上のかかるバイオマーカーの異常なメチル化状態の検出により、結果的に該対象がHCCを有すると特定される。

【0179】

マーカーの分析は、1つの試験試料内のさらなるマーカーとは別に行っても同時に行ってもよい。例えば、多様な試料の効率的な処理のため、及び潜在的に診断及び/または予後の正確さを高めるために、いくつかのマーカーを1つの試験に統合することができる。さらに、当業者には、同じ対象由来の複数の試料(例えば、連続する時点での)を調べる価値が認識されよう。連続する試料のかかる試験は、マーカーのメチル化状態の経時変化の特定を可能にし得る。メチル化状態の変化だけでなく、メチル化状態の変化の欠如は、疾患状態に関する有用な情報を提供することができる。これに含まれるのは、事象の発生からのおおよその時間、救済可能な組織の存在及び量、薬物療法の妥当性、様々な治療の有効性、ならびに将来的な事象のリスクを含めた当該対象の転帰の同定であるがこれらに限定されない。

【0180】

バイオマーカーの分析は、様々な物理的形式で実行することができる。例えば、マイクロタイプレートの使用または自動化を使用して、多数の試験試料の処理を容易にすることができる。代替的に、単一試料の形式を開発して、例えば、外来輸送時、または緊急治療室の設定において、適時に緊急の処理及び診断を容易にすることができる。

【 0 1 8 1 】

いくつかの実施形態では、該対象は、対照のメチル化状態と比較した場合に、当該試料中の少なくとも1つのバイオマーカーのメチル化状態に測定可能な違いがあれば、HCCを有すると診断される。反対に、当該生体試料中でメチル化状態に変化が特定されない場合、該対象は、HCCではない、HCCのリスクがない、またはHCCのリスクが低いと特定され得る。これに関して、HCCまたはそのリスクを有する対象は、HCCまたはそのリスクが低～実質的にない対象と区別され得る。HCCを発症するリスクがあるそれらの対象は、より集中的な及び/または定期的なスクリーニングの予定を入れられ得る。

【 0 1 8 2 】

上述の通り、本技術の方法の実施形態に応じて、1つ以上のバイオマーカーのメチル化状態の変化を検出することは、定性的な測定である場合もあれば、定量的な測定である場合もある。従って、ある対象がHCCを有する、またはHCCを発症するリスクを有すると診断するステップは、ある特定の閾値の測定がなされること、例えば、生体試料中の1つ以上のバイオマーカーのメチル化状態が、所定の対照メチル化状態とは異なることを示す。該方法のいくつかの実施形態では、該対照のメチル化状態は、該バイオマーカーの任意の検出可能なメチル化状態である。対照試料が生体試料と同時に試験される方法の他の実施形態では、該所定のメチル化状態は、該対照試料のメチル化状態である。該方法の他の実施形態では、該所定のメチル化状態は、標準曲線に基づいている、及び/または標準曲線によって特定される。該方法の他の実施形態では、該所定のメチル化状態は、具体的な状態または状態の範囲である。従って、該所定のメチル化状態は、一部には、実施されている方法の実施形態及び所望の特異度等に基づいて、当業者には明白であろう許容範囲内で選択することができる。

【 0 1 8 3 】

さらに、診断方法に関しては、好ましい対象は、脊椎動物対象である。好ましい脊椎動物は、温血動物であり、好ましい温血脊椎動物は哺乳類である。好ましい哺乳類は、最も好ましくはヒトである。本明細書で使用される「対象」という用語には、ヒト及び動物の両方の対象が含まれる。従って、動物の治療上の使用を本明細書に提供する。従って、本技術は、ヒト等の哺乳類だけでなく、絶滅の危機に瀕した重要な動物、例えば、シベリアトラ、経済的に重要な動物、例えば、ヒトが消費するために養殖された動物、及び/またはヒトにとって社会的に重要な動物、例えば、ペットとしてまたは動物園で飼育されている動物の診断を提供する。かかる動物の例としては、限定されないが、肉食動物、例えば、ネコ及びイヌ、ブタ(pig)、ブタ(hog)、及びイノシシを含めたブタ(swine)、反芻動物及び/または有蹄動物、例えば、畜牛、雄牛、ヒツジ、キリン、シカ、ヤギ、バイソン、及びラクダ、ならびにウマが挙げられる。従って、家畜化されたブタ、反芻動物、有蹄動物、ウマ(競走馬を含む)等が挙げられるがこれらに限定されない家畜類の診断及び治療もまた提供する。本開示の主題はさらに、対象におけるHCCを診断するシステムを含む。該システムは、例えば、生体試料を採取した対象におけるかかる障害のリスクをスクリーニングするために使用することができる市販のキットとして提供され得る。本技術に従って提供される例示的なシステムは、表1及び/または4に示すDMRのメチル化状態を評価することを含む。

【実施例】

【 0 1 8 4 】

実施例 I .

本実施例は、HCCのDNA試料を、正常対照(例えば、肝硬変を有するまたは有さない非HCCの個体)由来のDNAと区別するための、311の差次的メチル化領域(DMR)の特定を記載する。

【 0 1 8 5 】

実験は、四段階で行った。

【 0 1 8 6 】

第一に、DNAメチル化マーカーの発見を、凍結腫瘍HCC組織(肝硬変を伴うもの及

10

20

30

40

50

び伴わないもの)ならびに凍結正常肝臓組織(肝硬変を伴うもの及び伴わないもの)、ならびに健常志願者由来のパフィーコート試料から抽出したDNAに対してRRBSを用いて行った。判別差次的メチル化領域(DMR)は、厳密な濾過基準により特定し、同じまたは拡大した標本のいずれかで再度アッセイし、リアルタイムメチル化特異的定量PCRアッセイ(qMSP)を用いた結果の再現性を確保した(技術的検証)。

【0187】

第二に、候補マーカーを、独立した保存症例及び対照の組織から抽出したDNAに対する盲検qMSPアッセイによる生物学的検証の基準をさらにランク付けすることによって選択した。

【0188】

第三に、これら候補マーカーに関する配列決定の結果を、汎GIRRBSS配列決定セットにわたって比較し、メチル化特異度のレベルを測定した。

【0189】

第四に、別の決定モデルを適用し、大部分のDNAが非肝臓源由来である血液ベースの環境で最も良好に機能するであろうHCCマーカーの小セットを選択した。選択されたマーカーを次に、独立した血漿試料にて盲検で調べ、臨床媒体でのHCC検出を評価した。

【0190】

図1にこれら四段階を要約する。

【0191】

結果

偏りのない全メチローム配列決定を18のHCC及び35の対照(肝硬変9、正常肝26)組織から抽出したDNAに対して行った。組織検証を通じて、75のHCC及び29の対照(肝硬変16、正常肝13)由来の独立した組織から抽出したDNAにて、メチル化特異的PCRを用いて最良のDMRを確認した。21のHCC症例(BCLC[バルセロナ臨床肝癌病期分類]ステージA 9、ステージB 6、ステージC 6)及び33の肝硬変対照を含む独立した患者のセット由来の血漿DNAに対して、上位DMRを標的とした盲検定量的対立遺伝子特異的リアルタイム標的及びシグナル増幅アッセイを次に行った。再起分割決定分析を用いて、最良のDMRの組み合わせを特定した。最初の配列決定で、AUCが0.75超の311のDMRを特定した。生物学的検証の後、上位12のDMR(ACP1、BDH1、Chr12.133、CLEC11A、DAB2IP、DBNL、EMX1、EFNB2、HOXA1、LRRC4、SPINT2、TSPYL5、CCNJ_3707、CCNJ_3124、PFKP、SCRN1、及びECE1)を選択し、血漿試験に進めた。プラズマ中の最も多くの判別マーカーであるEMX1は、単独でAUC0.89を有していた。相補的な3マーカーの組み合わせ(EMX1、LRRC4、及びBDH1)は、血漿中20/21のHCC及び32/33の対照を特定し、1つのHCCは低レベルのBDH1を有し、1つの対照は上昇したLRRC4を有していた。このパネルは、97%の特異度(95%CI、82%~100%)でHCCに対して95%の感度(95%CI、74%~100%)であり、AUC0.98を達成した(図2参照)。この生物組織検証段階からのACP1、Chr12.133、CLEC11A、DAB2IP、DBNL、EMX1、HOXA1、LRRC4、SPINT2、及びTSPYL5に対する受信者操作特性曲線下面積の情報を図3A~Iで示す。

【0192】

図4A~CCは、生物組織検証データからの27の胃癌マーカー(フィット点分析を加えて29)の箱ひげ図(対数目盛)を提供する。試料は、左端に正常肝、次に肝硬変なしのHCC、肝硬変を有するHCC、及び肝硬変対照(炎症性)で並べている。縦軸は、メチル化度である(- アクチン鎖に対して正規化)。

【0193】

図5は、95%正常特異度のマトリックス形式での75のHCC組織試料及び29の対照(肝硬変16、正常肝13)における27のHCC癌マーカーの性能を示す。マーカーは縦に、試料は横に記載している。試料は、左端に正常肝(NI)、次に肝硬変なしのH

10

20

30

40

50

C C (H N)、肝硬変を有する H C C (H C)、及び肝硬変対照 (I n) で並べている。ポジティブヒットはライトグレーであり、ミスはダークグレーである。このプロットにより、マーカーを補完的に評価することができる。注：2つのマーカー、すなわち、T B X 1 5 及び E G R 2 は、q M S P データに対してフィット点法を用いて二度目に分析し、ここに含める。

【 0 1 9 4 】

表 1 は、H C C を正常対照と区別するための D M R の情報を示す。

【 0 1 9 5 】

表 2 は、表 1 から選択された D M R に関するプライマー情報を示す。

【 0 1 9 6 】

表 3 は、H C C と正常肝の比較における特定の D M R の A U C 及び比の情報を提供し、この比は、症例のメチル化度の対照のメチル化度に対する比率である。

【 0 1 9 7 】

10

20

30

40

50

【表 1】

表1.

DMR 番号	遺伝子アノテーション	染色体番号	DMR 開始及び終了位置
1	Septin9	chr17	75368812-75368887
2	Septin9	chr17	75369228-75369313
3	Septin9	chr17	75368948-75369052
4	ACP1	chr2	264204-264250
5	ACP1	chr2	264087-264151
6	ACTG1	chr17	79481554-79481612
7	AKRIB1	chr7	134143298-134143341
8	AKRIB1	chr7	134143650-134143684
9	AKRIB1	chr7	134143461-134143500
10	ALDH1A3	chr15	101419689-101419707
11	ALDH1A3	chr15	101419988-101420013
12	ANKRD33B	chr5	10564710-10564793
13	ANKRD34B	chr5	79866119-79866169
14	ARHGEF19	chr1	16533241-16533318
15	ARL4C	chr2	235404686-235404738
16	ATL1	chr14	51027344-51027417
17	B3GNT4	chr12	122688498-122688504
18	B3GNT4	chr12	122688516-122688554
19	B3GNT5	chr3	182971710-182971817
20	B3GNT5	chr3	182971523-182971580
21	BAALC	chr8	104153072-104153134
22	BACE2	chr21	42539722-42539743
23	BACE2	chr21	42539915-42539974
24	BLVRB	chr19	40973164-40973202
25	BLVRB	chr19	40973019-40973041
26	BMP6	chr6	7727949-7728013
27	BMP6	chr6	7726324-7726384
28	BVES	chr6	105584689-105584756
29	BVES	chr6	105584565-105584590

10

20

30

40

50

30	BVES	chr6	105584763-105584789
31	C6orf126	chr6	35744417-35744467
32	C6orf174	chr6	127837271-127837331
33	C7orf51	chr7	100091317-100091392
34	C7orf57	chr7	48075209-48075261
35	CATSPERG	chr19	38852416-38852441
36	CATSPERG	chr19	38853253-38853336
37	CCDC48	chr3	128745984-128746119
38	CCNI2	chr5	132082945-132083024
39	CCNJ	chr10	97803226-97803325
40	CCNJ	chr10	97803156-97803203
41	CCNJ	chr10	97803124-97803152
42	CCNJ	chr10	97803707-97803733
43	CDKN2A	chr9	21974872-21974890
44	CDKN2A	chr9	21974943-21975018
45	CELF2	chr10	11059845-11059861
46	CELF2	chr10	11059991-11060017
47	CELSR3	chr3	48693898-48693974
48	CHST2	chr3	142839074-142839107
49	CHST2	chr3	142839408-142839457
50	CHST2	chr3	142838525-142838580
51	CHST2	chr3	142838038-142838164
52	CHST2	chr3	142838701-142838753
53	CHST2	chr3	142838686-142838696
54	CHST2	chr3	142839245-142839275
55	CHST2	chr3	142838916-142838930
56	CLIP4	chr2	29338189-29338335
57	COR02B	chr15	68871554-68871567
58	COR02B	chr15	68871572-68871581
59	COR02B	chr15	68871623-68871639
60	COR02B	chr15	68871190-68871224

10

20

30

40

50

61	CRHR2	chr7	30722095-30722147
62	DCLK2	chr4	150999533-150999622
63	DCLK2	chr4	150999775-150999832
64	DGCR14	chr22	19137109-19137145
65	DGCR14	chr22	19137067-19137086
66	DKFZp686024166	chr11	17373279-17373346
67	DNAJB6	chr7	157129265-157129325
68	DUSP4	chr8	29207072-29207112
69	DUSP4	chr8	29207421-29207440
70	ECE1	chr1	21616801-21616877
71	EFNB2	chr13	107188064-107188108
72	EFNB2	chr13	107188196-107188212
73	EFNB2	chr13	107187748-107187766
74	EFNB2	chr13	107187768-107187785
75	EFNB2	chr13	107188435-107188478
76	EFNB2	chr13	107188935-107189019
77	EFNB2	chr13	107188790-107188904
78	EFNB2	chr13	107187702-107187716
79	EFNB2	chr13	107188503-107188558
80	EGR2	chr10	64575092-64575141
81	EHD3	chr2	31456843-31456921
82	EHD3	chr2	31457043-31457061
83	EIF4E3	chr3	71803308-71803340
84	EIF4E3	chr3	71803236-71803290
85	EMILIN2	chr18	2847067-2847090
86	EMILIN2	chr18	2847092-2847100
87	EMILIN2	chr18	2847233-2847274
88	FAHD2B	chr2	97760723-97760782
89	FAM105A	chr5	14582008-14582040
90	FAM105A	chr5	14582046-14582064
91	FAM105A	chr5	14582380-14582417

10

20

30

40

50

92	FAM55C	chr3	101498249-101498337
93	FBXL19	chr16	30935481-30935570
94	FCHSD1	chr5	141031071-141031122
95	FCHSD1	chr5	141031057-141031069
96	FHOD1	chr16	67281136-67281198
97	FHOD1	chr16	67281037-67281085
98	FIBCD1	chr9	133815197-133815238
99	FIBCD1	chr9	133814914-133814942
100	FOXD1	chr5	72743623-72743647
101	FOXD1	chr5	72743444-72743467
102	FOXD1	chr5	72743469-72743495
103	FUT4	chr11	94277618-94277669
104	FYN	chr6	112194124-112194158
105	FYN	chr6	112194611-112194633
106	GALNT12	chr9	101569940-101569975
107	GALNT12	chr9	101570002-101570029
108	GNG4	chr1	235813128-235813161
109	GNG4	chr1	235813683-235813724
110	GPX7	chr1	53068129-53068171
111	GPX7	chr1	53068016-53068063
112	GPX7	chr1	53068089-53068108
113	GRID2IP	chr7	6543224-6543246
114	GRID2IP	chr7	6570807-6570820
115	GRID2IP	chr7	6543285-6543348
116	GRID2IP	chr7	6570602-6570650
117	HDGFRP3	chr15	83876476-83876501
118	HDGFRP3	chr15	83876552-83876612
119	HDGFRP3	chr15	83876614-83876641
120	HK1	chr10	71078304-71078341
121	HK1	chr10	71078661-71078739
122	HOXA13	chr7	27239880-27239914

10

20

30

40

50

123	HOXA13	chr7	27239850-27239876
124	HPDL	chr1	45792443-45792512
125	IKZF1	chr7	50343562-50343603
126	IKZF1	chr7	50343493-50343512
127	IKZF1	chr7	50343859-50343873
128	IKZF1	chr7	50344046-50344106
129	IKZF1	chr7	50343990-50344044
130	ITPR3	chr6	33601477-33601537
131	KCNQ3	chr8	133493278-133493345
132	KCNS2	chr8	99439489-99439524
133	KCNS2	chr8	99439451-99439464
134	KCTD12	chr13	77460548-77460628
135	KCTD12	chr13	77460089-77460122
136	KCTD12	chr13	77459810-77459868
137	KIAA1614	chr1	180881686-180881721
138	KIAA1614	chr1	180881734-180881776
139	LCNL1	chr9	139872612-139872667
140	LGALS3	chr14	55596202-55596277
141	LIMD2	chr17	61777597-61777647
142	LMO2	chr11	33891092-33891223
143	LOC440461	chr17	66195307-66195331
144	LOC440461	chr17	66195475-66195486
145	LOC440461	chr17	66195649-66195686
146	LOC441617	chr11	74953198-74953215
147	LOC441617	chr11	74952822-74952901
148	LOC441617	chr11	74953185-74953195
149	LPAR2	chr19	19739243-19739256
150	LPAR2	chr19	19739094-19739141
151	LRRC10B	chr11	61276689-61276765
152	LRRC10B	chr11	61276161-61276167
153	LRRC34	chr3	169530174-169530220

10

20

30

40

50

154	LRRC34	chr3	169530317-169530418	10
155	LRRK1	chr15	101459830-101459847	
156	LRRK1	chr15	101459790-101459821	
157	LRRN1	chr3	3841285-3841390	
158	MATK	chr19	3785888-3785923	
159	MATK	chr19	3785942-3785986	
160	MAX. chr1. 1535351-1535441	chr1	1535351-1535441	
161	MAX. chr1. 161582155-161582236	chr1	161582155-161582236	
162	MAX. chr1. 227976136-227976180	chr1	227976136-227976180	
163	MAX. chr1. 227976189-227976206	chr1	227976189-227976206	
164	MAX. chr1. 41847970-41848023	chr1	41847970-41848023	20
165	MAX. chr11. 1357749-1357833	chr11	1357749-1357833	
166	MAX. chr11. 45377012-45377082	chr11	45377012-45377082	
167	MAX. chr11. 75947388-75947438	chr11	75947388-75947438	
168	MAX. chr17. 1132739-1132794	chr17	1132739-1132794	
169	MAX. chr19. 37288291-37288390	chr19	37288291-37288390	
170	MAX. chr19. 37464150-37464218	chr19	37464150-37464218	
171	MAX. chr19. 9896775-9896833	chr19	9896775-9896833	
172	MAX. chr2. 144694740-144694873	chr2	144694740-144694873	
173	MAX. chr2. 219773668-219773754	chr2	219773668-219773754	
174	MAX. chr20. 62461671-62461721	chr20	62461671-62461721	30
175	MAX. chr3. 184243258-184243328	chr3	184243258-184243328	
176	MAX. chr4. 56915281-56915399	chr4	56915281-56915399	
177	MAX. chr5. 178957711-178957760	chr5	178957711-178957760	
178	MAX. chr6. 130686855-130686917	chr6	130686855-130686917	
179	MAX. chr6. 155316859-155316913	chr6	155316859-155316913	
180	MAX. chr7. 139930482-139930532	chr7	139930482-139930532	
181	MAX. chr9. 140024004-140024057	chr9	140024004-140024057	
182	MAX. chr9. 99983940-99983992	chr9	99983940-99983992	
183	MECOM	chr3	169380257-169380286	40
184	MECOM	chr3	169380412-169380427	

185	MEX3B	chr15	82339734-82339758
186	MEX3B	chr15	82339894-82339967
187	MGC16703	chr22	21368623-21368674
188	MIR3132	chr2	220417386-220417427
189	MIR3132	chr2	220417233-220417279
190	MIR92B	chr1	155164705-155164747
191	MIR92B	chr1	155164749-155164784
192	MNT	chr17	2297347-2297397
193	N4BP3	chr5	177540980-177541072
194	NCRNA00085	chr19	52207589-52207731
195	NCRNA00085	chr19	52207475-52207527
196	OBSCN	chr1	228401498-228401559
197	OBSCN	chr1	228463603-228463619
198	ODF2L	chr1	86861515-86861590
199	OVOL1	chr11	65554351-65554410
200	OXT	chr20	3052753-3052809
201	PAQR8	chr6	52227453-52227521
202	PDE4D	chr5	58335632-58335685
203	PFKP	chr10	3110620-3110694
204	PFKP	chr10	3110554-3110609
205	PFKP	chr10	3111174-3111244
206	PFKP	chr10	3110913-3110978
207	PLEKH01	chr1	150122743-150122798
208	PMAIP1	chr18	57567061-57567089
209	PMAIP1	chr18	57567094-57567115
210	PPP2R5C	chr14	102248080-102248126
211	PPP2R5C	chr14	102248158-102248201
212	PRDM13	chr6	100061630-100061691
213	PRDM5	chr4	121843466-121843518
214	PSMG2	chr18	12658195-12658238
215	PSMG2	chr18	12658247-12658264

10

20

30

40

50

216	RANGRF	chr17	8192319-8192372
217	RANGRF	chr17	8192381-8192390
218	RASL11B	chr4	53728280-53728354
219	RASSF2	chr20	4803295-4803348
220	RASSF2	chr20	4803983-4804072
221	RECK	chr9	36037020-36037061
222	RECK	chr9	36037093-36037184
223	RGS10	chr10	121302301-121302309
224	RGS10	chr10	121302871-121302922
225	RGS10	chr10	121302655-121302672
226	RGS20	chr8	54793664-54793736
227	RPP25	chr15	75248658-75248693
228	RPP25	chr15	75249650-75249686
229	SCRN1	chr7	30029222-30029267
230	SCRN1	chr7	30029115-30029160
231	SCRN1	chr7	30029187-30029209
232	SDK1	chr7	3340834-3340842
233	SDK1	chr7	3340543-3340635
234	SDK1	chr7	3340737-3340813
235	SDK1	chr7	3340869-3340900
236	SLC16A3	chr17	80186851-80186883
237	SLC16A3	chr17	80186820-80186835
238	SLC35F1	chr6	118228406-118228451
239	SLC35F1	chr6	118228566-118228578
240	SLC35F1	chr6	118228886-118228910
241	SLC6A20	chr3	45838034-45838084
242	SLC6A6	chr3	14443943-14444020
243	SLC7A5	chr16	87902822-87902863
244	SLC7A5	chr16	87903100-87903127
245	SPNS2	chr17	4403134-4403184
246	ST8SIA1	chr12	22487540-22487711

10

20

30

40

247	ST8SIA6	chr10	17496576-17496610
248	ST8SIA6	chr10	17496378-17496406
249	STK32C	chr10	134121022-134121044
250	STK32C	chr10	134121172-134121183
251	STK32C	chr10	134122104-134122151
252	STK32C	chr10	134122249-134122269
253	STXBP1	chr9	130370839-130370874
254	STXBP1	chr9	130370883-130370925
255	SYCE1L	chr16	77246378-77246432
256	TAF4B	chr18	23806638-23806671
257	TAF4B	chr18	23806718-23806723
258	TCF24	chr8	67875000-67875071
259	TMEM143	chr19	48837211-48837295
260	TMEM163	chr2	135476181-135476192
261	TMEM163	chr2	135476038-135476121
262	TMEM163	chr2	135476286-135476322
263	TRIM17	chr1	228604397-228604446
264	TRPC3	chr4	122872963-122873035
265	TSC22D1	chr13	45150818-45150847
266	TSC22D1	chr13	45150763-45150815
267	UAP1L1	chr9	139972155-139972218
268	VASH1	chr14	77228066-77228133
269	VASH2	chr1	213124546-213124598
270	WDR66	chr12	122356382-122356450
271	WNT7A	chr3	13921575-13921631
272	ZC3HAV1L	chr7	138720665-138720718
273	ZEB2	chr2	145274897-145275040
274	ZNF160	chr19	53606314-53606402
275	ZNF160	chr19	53606256-53606282
276	ZNF160	chr19	53606572-53606659
277	ZNF354C	chr5	178487210-178487287

10

20

30

40

50

278	ZNF468	chr19	53360825-53360874
279	ZNF506	chr19	19932506-19932566
280	ZNF510	chr9	99540238-99540295
281	ZNF549	chr19	58038905-58038971
282	ZNF568	chr19	37407242-37407355
283	ZNF607	chr19	38210327-38210438
284	ZNF611	chr19	53238186-53238286
285	ZNF671	chr19	58238870-58238942
286	ZNF816	chr19	53466145-53466206
287	ZNF816	chr19	53466048-53466114
288	SPINT2	chr19	38755130-38755164
289	DBNL	chr7	44080227-44080310
290	PRKAG2	chr7	151329671-151329753
291	TDH	chr8	11205044-11205092
292	COTL1	chr16	84651245-84651314
293	PHF21B	chr22	45403120-45403172
294	PHF21B	chr22	45404843-45404858
295	PHF21B	chr22	45405759-45405766
296	MCF2L2	chr3	183146162-183146204
297	MCF2L2	chr3	183146290-183146355
298	MCF2L2	chr3	182897154-182897207
299	AMN	chr14	103394822-103394849
300	MARK1	chr1	220701604-220701619
301	MARK1	chr1	220701582-220701599
302	MARK1	chr1	220701657-220701686
303	EMX1	chr2	73147710-73147772
304	TSPYL5	chr8	98289858-98290220
305	DAB2IP	chr9	124461305-124461420
306	CLEC11A	chr19	51228217-51228732
307	HOXA1	chr7	27136145-27136425
308	ADCY1	chr7	45613877-45614572

10

20

30

40

309	DMRTA2	chr1	50884349-50884499
310	TBX15	chr1	119527066-119527655
311	AKO55957	chr12	133484978-133485739

【表 2】

表2.

マーカー	オリゴの種類	配列
TSPYL5	プライマー	GCGCGGAGGATTTTCG (配列番号1)
	プライマー	CCGCCACCATAAACGACC (配列番号2)
	プローブ	CCACGGACG CGAAATCGAAAT/3C6/ (配列番号3)
DAB2IP	プライマー	CGTTCGTTACGTCGTTTTCGT (配列番号4)
	プライマー	GATCGACGCGACTCGAC (配列番号5)
	プローブ	CCACGGACGCTCGACGTCGCC/3C6/ (配列番号6)
CLEC11A	プライマー	GCGGGAGTTTGGCGTAG (配列番号7)
	プライマー	CGCGCAAATACCGAATAAACG (配列番号8)
	プローブ	CCACGGACGGTCGGTAGATCG/3C6/ (配列番号9)
ACP1	プライマー	GCGCGTTGTTTCGTTTCG (配列番号10)
	プライマー	CGTCACCTACCGCAAATACG (配列番号11)
	プローブ	CCACGGACGCGGATAAGGAG/3C6/ (配列番号12)
BDH1	プライマー	AGTACGTAAGTAGAGCGCG (配列番号13)
	プライマー	CTAAAAATTAACACGCCGCCGT (配列番号14)
	プローブ	CCACGGACGGAGAACGTTTCA/3C6/ (配列番号15)
EMX1	プライマー	GGCGTCGCGTTTTTTAGAGAA (配列番号16)
	プライマー	TTCTTTTTCGTTTGTATAAAATTCGTT (配列番号17)
	プローブ	CCACGGACGATCGGGTTTTAG/3C6/ (配列番号18)
ZF_RASSF1	プライマー	TGCGTATGGTGGCG AG (配列番号19)
	プライマー	CCTAATTTACACGTCAACCAATCGAA (配列番号20)
	プローブ	CCACGGACGCGCGTGCCTTT/3C6/ (配列番号21)
BTACT	プライマー	TTTGTTTTTTTGATTAGGTGTTAAGA (配列番号22)
	プライマー	CACCAACCTCATAACCTTATC (配列番号23)
	プローブ	GACGCGGAGATAGTGTGTGG /3C6/ (配列番号24)
AK055957 (chr12.133)	プライマー	GCGTTTTAGTTAGATAGGGCGG (配列番号25)
	プライマー	GAAAACCCCTTCCCGAAAC (配列番号26)
	プローブ	CGCCGAGGCGCACGCCTAAA/3C6/ (配列番号27)

10

20

30

40

50

HOXA1	プライマー	AGTCGTTTTTTTAGGTAGTTAGGCG (酉己列番号 28)
	プライマー	CGACCTTTACAATCGCCGC (酉己列番号 29)
	プローブ	CGCCGAGGGCGGTAGTTGT/3C6/ (酉己列番号 30)
SPINT2	プライマー	GGGAGCGGTGCGTAG (酉己列番号 31)
	プライマー	GCACCTAACTAAACAAACGAACTAAAC (酉己列番号 32)
	プローブ	CGCCGAGGCGCAACGCAAA/3C6/ (酉己列番号 33)
DBNL	プライマー	AGGTGGCGGTATTACG (酉己列番号 34)
	プライマー	CCTACTAAACGCGCTCAACC (酉己列番号 35)
	プローブ	CGCCGAGGCGCTCGATTCCC/3C6/ (酉己列番号 36)
EFNB2	プライマー	TTCGATATTGGGTGTCGCG (酉己列番号 37)
	プライマー	CGCGAAAACCAAAACGAAAC (酉己列番号 38)
	プローブ	CGCCGAGG GAGGCGGGTTC/3C6/ (酉己列番号 39)
LRRC4	プライマー	GCGTTAATTTGCGGAGGTA (酉己列番号 40)
	プライマー	ACAATACTCTTATATATTAACGCGGCTC (酉己列番号 41)
	プローブ	CGCCGAGGAGGCGACGAGG/3C6/ (酉己列番号 42)

10

20

【 0 1 9 9 】

30

40

50

【表 3】

表3.

遺伝子アノテーション	曲線下面積	比(正常肝に対して)	比(正常バフィーに対して)
DAB2IP	0.94	55.04	403.81
TSPYL5	0.94	159.16	648.30
AK055957 (chr12.133)	0.94	166.22	483.57
EMX1	0.90	578.89	154.47
X57SPINT2	0.89	15.73	83.12
X61ACP1	0.89	378.07	17.96
TBX15.fit	0.86	10.02	N/A
X44SCRN1	0.85	5.68	12.94
TBX15	0.85	8.57	41.50
X53HDGFRP3	0.83	2.85	74.06
OPLAH	0.83	2.16	900.80
X49ST8SIA6	0.82	5405378.50	90.32
X52HDGFRP3	0.82	285.68	42.86
CLEC11A	0.82	30.73	51.09
X63DBNL	0.81	3.04	32.20
X65EGR2.fit	0.80	9.83	N/A
HOXA1	0.80	9.13	2746.00
X50OVOL1	0.79	17.01	66.53
X65EGR2	0.78	23.71	12.57
X71COTL1	0.77	2407.68	10613.37
X72RASSF2	0.77	4.35	6960.58
X47TDH	0.76	8.55	13.52
X74GALNT12	0.75	16.31	42.20
X45PRKAG2	0.72	20.02	923.17
ST8SIA1	0.71	1.66	56.25
LRRC4	0.71	1.47	433.42
C13orf18	0.68	1.99	27.00
X39ECE1	0.65	3.36	163.46
X67chr4.56915281	0.64	6.39	102.50

【0200】

かかる実験はさらに、肝臓（癌及び正常）ではメチル化されるが正常白血球DNA試料ではされない89の肝上皮DMRの特定をもたらした。

【0201】

表4は、肝臓（癌及び正常）ではメチル化されるが正常白血球DNA試料ではされない肝上皮DMRに関する情報を示す。

【0202】

10

20

30

40

50

【表 4】

表4.

DMR 番号	遺伝子アノテーション	DMR 染色体番号ならびに開始及び終了位置
312	ABHD8	chr19:17403265-17403457
313	ABTB1	chr3:127391081-127391163
314	ADAM8	chr10:135090174-135090246
315	AGAP3	chr7:150812289-150812467
316	AGAP3	chr7:150812127-150812178
317	AMIGO3	chr3:49757070-49757161
318	ANXA2	chr15:60690852-60690949
319	APBB2	chr4:40859188-40859260
320	ATP2B4	chr1:203598701-203598782
321	B3GALT4	chr6:33245156-33245191
322	B3GALT4	chr6:33244921-33245067
323	BDH1	chr3:197282831-197282922
324	BDH1	chr3:197281722-197281827
325	BMP2	chr20:6750738-6750803
326	C17orf64	chr17:58499118-58499182
327	C6orf223	chr6:43970506-43970593
328	CELF6	chr15:72612688-72612773
329	DAP2IP	chr9:124461326-124461415
330	DLEC1	chr3:38080680-38080710
331	EPS8L2	chr11:726256-726367
332	ESPNP	chr1:17027786-17027840
333	F12	chr5:176830943-176831003
334	F12	chr5:176830740-176830823
335	FIGL2	chr12:52214703-52214931
336	FLJ45983	chr10:8097592-8097679
337	GAL3ST2	chr2:242743108-242743318
338	GRIN2D	chr19:48901811-48901852
339	GSTO2	chr10:106028898-106028963

10

20

30

40

50

340	IL17C	chr16:88701236-88701393
341	IL4I1	chr19:50393413-50493491
342	IRF4	chr6:393636-393768
343	JARID2	chr6:15244974-15245009
344	KCNQ4	chr1:41249959-41250042
345	KDM2B	chr12:121904281-121904436
346	LFNG	chr7:2559582-2559607
347	LGALS3	chr14:55595740-55595831
348	LIMD2	chr17:61778042-61778108
349	LOC389333	chr5:138728888-138728935
350	LOC389333	chr5:138728233-138728342
351	LRRC4	chr7:127671917-127672169
352	LRRC4	chr7:127672388-127672445
353	LRRFIP1	chr2:238600061-238600124
354	LTBP4	chr19:41119803-41119889
355	LVL1	chr19:13215369-13215437
356	LVL1	chr19:13210345-13210498
357	MACROD1	chr11:63828351-63828427
358	MARVELD1	chr10:99474326-99474382
359	MAX chr10:22765154-22765214	chr10:22765154-22765214
360	MAX chr11:518982-519057	chr11:518982-519057
361	MAX chr14:107253126-107253203	chr14:107253126-107253203
362	MAX chr20:1784481-1784547	chr20:1784481-1784547
363	MAX chr6:167763903-167763975	chr6:167763903-167763975
364	MAX chr8:142215988-142216025	chr8:142215988-142216025
365	MAX chr8:145104176-145104352	chr8:145104176-145104352
366	MBOAT2	chr2:9144074-9144113
367	MTHFD1L	chr6:151187945-151188021
368	MTHFD2	chr2:74425838-74425898
369	MYPOP	chr19:46405010-46405058
370	NGEF	chr2:2337929980233793066

10

20

30

40

371	NR2F6	chr19:17346368-17346464
372	NR2F6	chr19:17346575-17346695
373	NTN1	chr17:9143556-9143609
374	NTRK1	chr1:156786617-156786674
375	PDZD7	chr10:102792180-102792249
376	PTK2B	chr8:27183159-27183229
377	PTPRE	chr10:129845681-129845740
378	RASSF1	chr3:50378497-50378540
379	RUNX3	chr1:25256236-25256294
380	S1PR4	chr19:3179884-3179960
381	SBN02	chr19:1131812-1131869
382	SH3PXD2A	chr10:105453034-105453075
383	SHH	chr7:155597905-155597937
384	SLC25A36	chr3:140661249-140661281
385	SOCS3	chr17:76355477-76355512
386	SP9	chr2:175202178-175202322
387	SPDYA	chr2:29033684-29033774
388	TFR2	chr7:100230996-100231029
389	TIAM1	chr21:32930248-32930318
390	TIAM1	chr21:32931595-32931681
391	TIAM1	chr21:32931280-32931363
392	UCP2	chr11:73693845-73693912
393	VIM	chr10:17271919-17271971
394	WNT1	chr12:49375039-49375117
395	WNT11	chr11:75917494-75917626
396	ZFYVE28	chr4:2415181-2415265
397	ZMIZ1	chr10:81003086-81003157
398	ZMIZ1	chr10:81002084-81002169
399	ZMIZ1	chr10:81002889-81002992
400	ZNF703	chr8:37554906-37554971

10

20

30

40

【 0 2 0 3 】

試験対象及び試料

この試験は、Mayo Clinic Institutional Review Board (Rochester, MN) によって承認された。新鮮凍結 (FF) 組織、血漿、及び Buffy コート試料は、IRB 承認の患者バイオバンクによって提供された。腫瘍組織切片は、専門の GI 病理学者が再度見直して診断を確定し、腫瘍性の細胞充実度を推定した。切片を次に巨視的に解剖した。ゲノム DNA を、QiaAmp Mini キット (Qiagen, Valencia CA) を用いて精製し、続いて、AMPure XP キット (Beckman Coulter, Brea CA) で再精製した。

50

【0204】

Reduced Representation Bisulfite Sequencingライブラリの調製

配列決定ライブラリを、先に公開された方法の修正版を用いて調製した。ゲノムDNA (300 ng) を10 UのMspIで一夜消化した。これ以降のステップで用いた酵素はすべて、特に明記しない限り、New England Biolabs (NEB) によって提供された。断片は、5 Uのクレノウ断片 (3' - 5' エキソ-) を用いて末端修復及びA - テール化し、バーコード配列及び普遍的にメチル化されたシトシンを含むTruSeqアダプター (Illumina) に一夜結合させた。SYBR Green qPCR (LightCycler 480 - Roche) を用いて結合効率及び断片の品質を評価した。試料を、修正EpiTectプロトコル (Qiagen) を用いてバイサルファイト処理及び精製し (2回)、その後最後のAMPure XPクリーンアップを行った。qPCRを用いて、ライブラリ濃縮のために最適なPCRサイクルを決めた。以下の条件を濃縮PCRに用いた。各50 µLの反応物には、5 µLの10倍緩衝液、1.25 µLの10 mMの各デオキシリボヌクレオチド三リン酸、(dNTP)、5 µLのプライマーカクテル (約5 µM)、15 µLの試料、1 µLのPfuTurbo Cxホットスタート、及び22.75 µLの水を含めた。温度及び時間は、それぞれ、95°C - 5分、98°C - 30秒、12 ~ 16サイクルの98°C - 10秒、65°C - 30秒、72°C - 30秒、72°C - 5分、及び4°C保持であった。試料は、PicoGreenアッセイ (Molecular Probes) で定量し、ランダム化4重ライブラリに統合し、Bioanalyzer 2100 (Agilent) でサイズ検証のための試験をした。AMPure XP精製/サイズ選択のさらなるラウンドを、アダプターダイマーの混入を最小にし、350 bpより大きい挿入物を除去するために経験的に決定された緩衝液濃度で行った。最終的なライブラリの評価は、qPCRにより、ファイX対照標準 (Illumina) 及びアダプター特異的プライマーを用いて達成した。

【0205】

超並列配列決定及びバイオインフォマティクス

試料をランダム化レーン割り当てに従ってフローセルにロードし、さらなるレーンを内部アッセイ対照用に確保した。配列決定は、Mayo Clinic Medical Genome Facilityにて、Next Generation Sequencing Coreにより、Illumina HiSeq 2000で行った。リードは、101サイクルに対して一方向性であった。各フローセルのレーンは、アラインされる配列について30 ~ 50倍の配列決定深度の中央値カバレッジに十分な1億 ~ 1億2000万のリードを生成した。標準的なIlluminaのパイプラインソフトウェアはベースを呼び出し、fastq形式でリードを生成した。SAAP-RRBS (reduced representation bisulfite sequencingのための流線解析及びアノテーションパイプライン) を配列リードの評価及びクリーンアップ、参照ゲノムへのアラインメント、メチル化状態の抽出、ならびにCpGの報告及びアノテーションに使用した。低カバレッジ (10) のCpGを除外した。三次分析は、無情報または低試料カバレッジのCpGを除去すること、及びスライドする100 bpのウインドウ内で低バックグラウンド及び高密度集団を有するメチル化CpG領域を特定することで構成した。リード - 深度の基準は、症例と対照の間のメチル化%における10%の差を検出するために望ましい検出力を基にした。統計的有意性は、リード数に基づいて、DMRごとのメチル化パーセンテージのロジスティック回帰によって決定した。個々の対象間で異なるリード深度を説明するため、過分散ロジスティック回帰モデルを用い、分散パラメータは、近似モデルからの残差のピアソンカイ2乗統計を用いて推定した。有意水準に従ってランク付けしたDMRを、対照群におけるメチル化%が、がんにおいて1%及び10%である場合にさらに検討した。ほとんどの器官部位では、これにより数百の潜在的候補が得られた。使用したさらなるフィルターは、受信者操作特性曲線下面積、シグナル対バックグラウンドメチル化%比率 (比)、及びDMR全体 (ならびに対照においてはその欠

10

20

30

40

50

如)にわたる CpG の陽性試料対試料共メチル化であった。

【0206】

技術的及び生物組織検証

メチル化特異的 PCR (MSP) マーカーのアッセイを、上記の基準で判断された、肝臓探索データセットからの 30 の最も見込みのある DMR について発展させた。プライマーを、ソフトウェア (Methprimer - University of California, San Francisco CA、MSP Primer - Johns Hopkins University, Baltimore, MD) または手動のいずれかで設計した。アッセイは、パイサルファイトで変換された (メチル化及び非メチル化ゲノム DNA)、変換されていない、及び非鋳型対照に対する SYBR Green qPCR によって厳密に試験し、最適化した。陰性対照と交差反応したアッセイは、再設計または廃棄のいずれかとした。さらに、融解曲線分析を行い、特異的増幅が生じていることを確認した。技術的検証段階では、RRBS の発見に用いた同じ試料を qMSP で再試験した。メチル化が見えないように設計した - アクチンアッセイを、全 DNA コピーを表す分母として用いた。これらのデータをロジスティック回帰で分析し、AUC 及びシグナル対バックグラウンドの結果を発見値と比較した。半数よりやや少ないマーカーは働きが悪く、除外された。残り (N = 16) を qMSP により、104 の独立した組織試料の拡張セットで調べた。さらに、実験には、11 個のメチル化がんマーカーを含めた。これらは、他の GI 癌 (結腸、食道、膵臓、胆管) での以前の配列決定試験で特定及び検証されたとともに、強力な多臓器がんマーカーである。転帰の測定基準は、AUC 及び比であった (表 3)。アッセイされたマーカーに関する箱ひげ図及び相補性マトリックスは、それぞれ図 4 及び 5 に描かれている。

【0207】

全器官での検証

最良のメチル化マーカーが肝臓の外でどのように機能するかを評価するため、実験で、比較 CpG メチル化 % マトリックスを、HCC 試料ならびに以前に配列決定された他の主な GI 癌、すなわち、結腸、膵臓、食道、及び胃癌にわたる検証 DMR に関する配列決定リードを用いて構築した。最終的なマーカーのパネルは、1) 生物組織検証段階における全体的な性能及び 2) 他のがんにわたるマーカーの部位特異的特性に基づいて選択し、血漿中で試験した。血中で最も良好に HCC を検出するため、非 HCC の DNA の過剰を前提として、普遍的かつ肝臓に特異的ながんのシグナルの両方を示すであろうロバストな 12 マーカーのパネルを選択した。これらマーカーのうちの 10 個は、組織検証からのものであり、異常な肝臓部位特異性を示す 2 つのさらなるマーカーである EFN2 及び BDH1 は、RRBS のデータからその後の組織検証をせずに、直接設計及び使用した。

【0208】

血漿での検証

血漿 DNA は、Exact Sciences にて開発された自動シリカビーズ法により、2 mL の画分から抽出した。

【0209】

10

20

30

40

50

【表 5】

1	2 m l の T e 緩衝液 (1 m M T r i s 0. 1 m M E D T A)
2	1 0 0 μ l の 1 2 0 c p / u l ゼブラフィッシュ DNA の 0. 4 n g / μ l フ イッシュ DNA 希釈剤溶液
3	7 m l の血漿溶解緩衝液 (4. 3 M G T C 1 0 % I G E P A L)
4	2 m l の血漿
5	5 5 °C で 1 時間 インキュベートする
6	2 0 0 μ l の結合ビーズを加える
7	2. 8 m l の 1 0 0 % イソプロパノールを加える
8	3 0 °C で 3 0 分間 インキュベートする
9	ビーズを磁化し、その上清を除去する
10	7 5 0 μ l の 3 M G u H C l 5 6. 8 % E t O H を加え、結合ビーズを再 懸濁する
11	4 0 0 R P M で 2 分間振盪する
12	ビーズを固め、上清を吸引して捨てる
13	1 0 0 0 μ l 洗浄 1 回 (8 0 % E T O H)、3 0 °C で 3 分間 インキュベートし、 ビーズを固め、上清を吸引して捨てる
14	5 0 0 μ l 洗浄 1 回 (8 0 % E T O H)、3 0 °C で 3 分間 インキュベートし、ビ ーズを固め、上清を吸引して捨てる
15	2 5 0 μ l 洗浄 1 回 (8 0 % E T O H)、3 0 °C で 3 分間 インキュベートし、ビ ーズを固め、上清を吸引して捨てる
16	2 5 0 μ l 洗浄 1 回 (8 0 % E T O H)、3 0 °C で 3 分間 インキュベートし、ビ ーズを固め、上清を吸引して捨てる
17	振盪しながら、7 0 °C で 1 5 分間乾燥させる
18	1 2 5 u l の T e 緩衝液 (1 m M T r i s 0. 1 m M E D T A) を加え、 6 5 °C で 2 5 分間振盪しながら インキュベートする
19	ビーズを固め、DNA を含む上清を清浄なチューブに移す
20	− 2 0 °C で使用まで保存する

10

20

30

【 0 2 1 0 】

この DNA をその後以下に概説する独自方法を用いてバイサルファイトで変換し、精製した。

【 0 2 1 1 】

40

50

【表 6】

1	5 u l 0.36% BSA
2	70 u l の試料
3	5 u l 1.6N NaOH
4	42℃で20分間インキュベートする(変性)
5	8分間冷却する
6	120 u l の重亜硫酸アンモニウムを加える
7	65℃で75分間インキュベートする(変換)(3分間振盪する)
8	750 u l の7M GuHClを加える
9	50 u l の結合ビーズを加える
10	30℃で30分間振盪しながらインキュベートする
11	ビーズを固める
12	上清を吸引して捨てる
13	1000 u l の80% EtOHを加える
14	30℃で3分間振盪しながらインキュベートする
15	ビーズを固める
16	上清を吸引して捨てる
17	200 u l の脱スルホン化溶液を分注する
18	30℃で7分間振盪しながらインキュベートする
19	ビーズを固める
20	上清を吸引して捨てる
21	250 u l の80% EtOHを加える
22	30℃で3分間振盪しながらインキュベートする
23	ビーズを固める
24	上清を吸引して捨てる
25	70℃で15分間振盪しながらビーズを乾燥させる
26	80 u l のTE緩衝液(1mM Tris 0.1mM EDTA)を加える
27	65℃で25分間振盪しながらインキュベートする
28	ビーズを固め、DNAを含む上清を清浄なチューブに移す
29	-20℃で使用まで保存する

【0212】

試料は、DMR配列から作製したプライマー及びプローブ(表2参照)、GoTaq DNAポリメラーゼ(Promega)、Cleavase II(Hologic)、ならびにFAM、HEX、及びQuasar 670色素を含む蛍光共鳴エネルギー移動レポーターカセット(FRET)(Biosearch Technologies)を用いて、QuARTs形式(米国特許第8,361,720号参照)のリアルタイムPCR装置(Roche LC480)でランした。

【0213】

図6は、QuARTs(定量的対立遺伝子特異的リアルタイム標的及びシグナル増幅)アッセイによるメチル化DNAシグネチャーの検出に使用されるFRETカセットのオリゴヌクレオチド配列を示す。各FRET配列は、3つの別々のアッセイと一緒に多重化することができるフルオロフォア及びクエンチャを含む。

【0214】

目的のマーカー配列を含むプラスミドは、Genscriptから入手し、1x Qu

A R T s 試薬で希釈し、設定濃度 15 u l の反応物当たり 1 コピーとした。この反応混合物を 384 ウェルの各々に分配し、L i g h t C y c l e r で 45 サイクルを繰り返し、データを収集した。ウェルには、試料を含むか含まないかのいずれかのコールを与えた。ポアソン確率変数を 1 に設定し、平均成功率の値を試行錯誤で入力し、それを用いてその値についての累積確率を計算した。その累積確率がシグナルを伴うウェルのパーセントと等しい場合、正しい平均成功率、この場合コピー数が見出された。これらのプラスミドを希釈し、アッセイ標準として使用した。

【 0 2 1 5 】

Q u A R T s - X (米国仮特許第 6 2 / 2 4 9 , 0 9 7 号参照) を、11 サイクルの増幅を受ける 12 個までの標的に対して、プライマーを用いて行われる試料の予備増幅プレート
10
を最初に作製することによって行う。この産物をその後 1 : 9 に希釈し、三重反応で 3 つの標的しか含まない後続の Q u A R T s 反应用的の鑄型として用いる。鎖の数を計算するために用いる標準は、この予備増幅を経由しない。標準ではなく試料を予備増幅すること
で、このアッセイの感度が増加する。

【 0 2 1 6 】

結果を回帰分割 (r P a r t) で分析した。複数のメチル化マーカーを単一のリスクスコアに統合するためのロジスティック回帰を用いることは、標準的な手法である。しかしながら、ロジスティックモデル内でマーカー間に高次相互作用を発見すること及び/またはモデル化することは困難である。かかる効果が存在する場合、このことが我々のマーカー
20
のパネルの予測能力を制限する。回帰分割木 (r P a r t) は、決定木のアプローチであり、これは、マーカーのパネルの予測精度を最大にするような方法でマーカー間の高次相互作用を発見することができる。r P a r t では、上位 3 つのマーカーの組み合わせ (E M X 1、B D H 1、L R R C 4) に関する H C C 血液試料の感度及び特異度は、それぞれ、97% 及び 95% であった (図 7 A)。別の 3 つのマーカーの組み合わせをモデル化した。すなわち、

選択肢番号 1 (E M X 1、D A B 2 I P、T S P Y L 5) : 特異度 = 100% 感度 = 90% (図 7 B)

選択肢番号 2 (E M X 1、H O X A 1、A C P 1) : 特異度 = 88% 感度 = 100% (図 7 C)

選択肢番号 3 (E M X 1、E F N B 2、S P I N T 2) : 特異度 = 100% 感度 = 90% (図 7 D)
30

血漿中の優良単一マーカーである E M X 1 は、100% の特異度で 77% の感度とともに A U C 0 . 89 を有した。E M X 1 に対するシグナルは、ステージが上がるほど高いベータアクチン正規化シグナルを示した (図 8)。

【 0 2 1 7 】

実施例 I I .

組織試料 (H C C 75、肝硬変 20、正常 30) は、D M R 配列から作製したプライマー及びプローブ (表 5 参照)、G o T a q D N A ポリメラーゼ (P r o m e g a)、C l e a v a s e 2 . 0 (H o l o g i c)、ならびに F A M、H E X、及び Q u a s a r 670 色素を含む蛍光共鳴エネルギー移動レポーターカセット (F R E T) (B i o s e a r c h T e c h n o l o g i e s) を用いて、Q u A R T s 形式 (米国特許第 8 , 361 , 720 号参照) のリアルタイム P C R 装置 (R o c h e L C 480) でランした。
40
表 6 は、各マーカーが 100% の感度で H C C を肝硬変及び正常から区別する能力を示す。

【 0 2 1 8 】

【表 7】

表 5.

遺伝子	順方向 QuARTS プライマー(5' -3')	逆方向 QuARTS プライマー(5' -3')	プローブ
TSPYL5	TTTGTTTCGGTTTTTGGCG (配列番号 43)	ACCATAAACGACCGAAATCGA (配列番号 44)	CCACGGACG GCGGGAGGATTT /3C6/ (配列番号 45)
DAB2IP	CGTTCGTTACGTCGTTTTCGT (配列番号 46)	GATCGACGCGACTCGAC (配列番号 47)	CCACGGACG CTCGACGTCGCC/3C6/ (配列番号 48)
Chr12_133_V2	GCGTTTTAGTTAGATAGGGCG G (配列番号 49)	GAAACCCCTTCCCCGAAAC (配列番号 50)	CGCCGAGG CGCAGCCTAAA/3C6/ (配列番号 51)
CLEC11A	GCGGGAGTTTGGCGTAG (配列番号 52)	CGCGCAAATACCGAATAAACG (配列番号 53)	CCACGGACG-GTCGGTAGA TCG/3C6/ (配列番号 54)
SPINT2	GGGAGCGGTCGCGTAG (配列番号 55)	GCACCTAACTAAACAAACGAACTAAAC (配列番号 56)	CGCCGAGG CGCAAACGAAA/3C6/ (配列番号 57)
ACP1	GCGCGTTGTTTCGTTTCG (配列番号 58)	CGTCACCTACCGCAAATACG (配列番号 59)	CCACGGACG GCGGATAAGGAG/3C6/ (配列番号 60)
BDH1	AGTACGTAAGTAGAGCGCG (配列番号 61)	CTAAATTAACGCGCGCGT (配列番号 62)	CCACGGACG GAGAACGTTTGA/3C6/ (配列番号 63)
EFNB2	CGTTCGTTGTTATTTTTTT CGA (配列番号 64)	GCCGCGAAAACCAAAAAC (配列番号 65)	CGCCGAGG CGAACTCACCT/3C6/ (配列番号 66)
CCNJ_3707	GCGTTTTTTTTAGCGGGTT A (配列番号 67)	CGAACTAAAATTCTCCCGC (配列番号 68)	CGCCGAGG ATGAGCGTGTTA/3C6/ (配列番号 69)
CCNJ_3124	CGGTTTCGTTGGGTACG	CCAAACCAACACGCC (配列番号 71)	CCACGGACG

10

20

30

40

50

	(配列番号70)		CGCGCGTACGA/3C6/ (配列番号72)	
PFKP	GGAGGTTGGCGGGAG (配列 番号73)	CATATACTATCGCCTTCCGACTC (配列番 号74)	CGCCGAGG CGTAACAAAAC/3C6/ (配列番号75)	
SCRN1	TCGTTTTAGGTGAGTCGCG (配列番号76)	AAATAAACCGCCGAAAAACAAC (配列番 号77)	CCACGACG CGCTACAAACG/3C6/ (配列番号78)	10
ECE1	GGAGGGTTTCGTTCTG (配 列番号79)	CTACTATCGACGCTAAAAATAAACGAAC (配列番号80)	CGCCGAGG CGCGACCTAAAA/3C6/ (配列番号81)	
DBNL	AGGTGGCGGTATTACG (配 列番号82)	CCTACTAAACGCGCTCAACC (配列番号 83)	CGCCGAGG CGCTCGATTCCC/3C6/ (配列番号84)	20
LRR4	GCGTTAATTCGCGAGGTA (配列番号85)	ACAATACTCTTATATTAACGCCGCTC (配 列番号86)	CGCCGAGG AGGCGACGGAGG/3C6/ (配列番号87)	
HOXA1	AGTCGTTTTTTAGGTAGTTT AGGCG (配列番号88)	CGACCTTTACAATCGCCGC (配列番号89)	CGCCGAGG GGCGGTAGTTGT/3C6/ (配列番号90)	
EMX1	GGCGTCGCGTTTTTTAGAGAA (配列番号91)	TTCCTTTTCGTTCTGTATAAAATTTCTG (配 列番号92)	CCACGACG ATCGGGTTTTAG/3C6/ (配列番号93) または CGCCGAGG ATCGGGTTTTAG/3C6/ (配列番号94)	30

【表 8】

表6.

遺伝子	100%の特異度でHCCを肝硬変または正常から区別するための感度
TSPYL5	79%
DAB2IP	91%
Chr12_133_V2	91%
CLEC11A	69%
SPINT2	68%
ACP1	84%
BDH1	8%
EFNB2	45%
CCNJ_3707	53%
CCNJ_3124	49%
PFKP	57%
SCRN1	51%
ECE1	49%
EMX1	67%
LRRC4	20%
HOXA1	52%

10

20

【0220】

実施例ⅠⅠⅠ.

この主な目的は、肝細胞癌（HCC）を予測するマーカーのパネルを決定することであった。244名の対象（肝細胞癌95名、対照149名）由来の血漿を2mLに調整し、抽出した。対照149名は、肝硬変患者51名及び正常患者98名からなっていた。

30

【0221】

図9は、この分析で検討されたメチル化マーカーの各々の相対的重要性を示す。マーカーの全パネルの感度及び特異度の交差検定推定値は、それぞれ、75%及び96%であった。

【0222】

正常に対して対照の88.6%の特異度で、以下のマーカーのパネル（Chr12_133、CLEC11A、EMX1、HOXA1、CCNJ_3707）は、HCCに対して85.3%の感度であった（表7）。

40

【0223】

【表 9】

表7.

	患者合計	予測		感度
		陰性	陽性	
HCC	95	14	81	85.3%
対照	149	132	17	

50

【 0 2 2 4 】

同じパネル (C h r 1 2 . 1 3 3 、 C L E C 1 1 A 、 E M X 1 、 H O X A 1 、 C C N J _ 3 7 0 7) は、正常及び肝硬変 (対照群) 患者に対して以下の特異度の内訳であった (表 8) 。

【 0 2 2 5 】

【 表 1 0 】

表 8.

患者群	患者合計	予測		特異度
		陰性	陽性	
肝硬変	51	41	10	80.4%
正常	98	91	7	92.9%
合計	149	132	17	88.6%

10

【 0 2 2 6 】

4 m L の血漿試料から D N A を単離する例示的な手順は、以下の通りに行われる。

- ・ 2 m L の血漿試料に、 3 0 0 μ L のプロテイナーゼ K (2 0 m g / m L) を加えて混合する。試料が 2 m L 未満の血漿である場合、 1 0 m M T r i s - H C l 、 0 . 1 m M E D T A 溶液を加えて 2 m L に調整する。
- ・ 6 m L の血漿溶解緩衝液 1 を血漿に加え、室温で混合する。

20

【 0 2 2 7 】

血漿溶解緩衝液は、

- 4 . 3 M のグアニジンチオシアネート
- 1 0 % I G E P A L C A - 6 3 0 (オクチルフェノキシポリ (エチレンオキシ) エタノール、分岐) である (5 . 3 g の I G E P A L C A - 6 3 0 が 4 5 m L の 4 . 8 M グアニジンチオシアネートと混合される)
- ・ 2 0 0 μ L の磁性シリカ結合ビーズ [1 6 μ g のビーズ / μ L] を加え、再度混合する。
- ・ 7 m L の溶解緩衝液 2 をチューブに加える。

30

【 0 2 2 8 】

血漿溶解緩衝液 2 は、 6 0 % の割合の溶解緩衝液 1 を 4 0 % のイソプロパノールと混合して調製する。

- ・ 試料を溶解緩衝液 2 と 6 0 分間混合する。
- ・ チューブを磁石の上に置き、 1 0 分間ビーズを集める。その上清を吸引して捨てる。
- ・ 1 0 0 0 μ L の洗浄用緩衝液 (1 0 m M T r i s H C l 、 8 0 % E t O H) をビーズに加え、振盪しながら 3 0 秒で 3 分間インキュベートする。
- ・ チューブを磁石の上に置き、ビーズを集める。その上清を吸引して捨てる。
- ・ 5 0 0 μ L の洗浄用緩衝液をビーズに加え、振盪しながら 3 0 秒で 3 分間インキュベートする。
- ・ チューブを磁石の上に置き、ビーズを集める。その上清を吸引して捨てる。
- ・ 2 5 0 μ L の洗浄用緩衝液を加え、振盪しながら 3 0 秒で 3 分間インキュベートする。
- ・ チューブを磁石の上に置き、ビーズを集める。残りの緩衝液を吸引して捨てる。
- ・ 2 5 0 μ L の洗浄用緩衝液を加え、振盪しながら 3 0 秒で 3 分間インキュベートする。
- ・ チューブを磁石の上に置き、ビーズを集める。残りの緩衝液を吸引して捨てる。
- ・ 振盪しながらビーズを 7 0 秒で 1 5 分間乾燥させる。
- ・ 1 2 5 μ L の溶出用緩衝液 (1 0 m M T r i s H C l 、 p H 8 . 0 、 0 . 1 m M E D T A) をビーズに加え、振盪しながら 6 5 秒で 2 5 分間インキュベートする。
- ・ チューブを磁石の上に置き、ビーズを 1 0 分間集める。
- ・ D N A を含む上清を、新たな容器またはチューブに吸引して移す。

40

50

バイサルファイト変換

I. 亜硫酸水素アンモニウムを用いたDNAのスルホン化

1. 各チューブに、64 μ LのDNA、7 μ Lの1N NaOH、ならびに0.2 mg/mLのBSA及び0.25 mg/mLのフィッシュDNAを含む9 μ Lの担体溶液を合わせる。

2. 42 で20分間インキュベートする。

3. 120 μ Lの45%亜硫酸水素アンモニウムを加え、66 で75分間インキュベートする。

4. 4 で10分間インキュベートする。

II. 磁気ビーズを用いた脱スルホン化

10

材料

磁気ビーズ (Promega MagneSil Paramagnetic Particles、Promegaカタログ番号AS1050、16 μ g/ μ L)。

結合用緩衝液：6.5 ~ 7 Mグアニジン塩酸塩。

変換後洗浄用緩衝液：10 mMのTris HClを含む80%エタノール (pH 8.0)。

脱スルホン化用緩衝液：70%イソプロピルアルコール、0.1N NaOHを脱スルホン化用緩衝液として選択した。

【0229】

本質的に以下に記載の温度及び混合速度で試料を混合もしくはインキュベートするのに適切な任意の装置または技術を用いて試料を混合する。例えば、Thermomixer (Eppendorf) を試料の混合またはインキュベーションに使用することができる。例示的な脱スルホン化は以下の通りである。

20

1. ボトルを1分間ボルテックスし、ビーズストックを完全に混合する。

2. 50 μ Lのビーズを2.0 mLのチューブ (例えば、USA Scientific 製) に分取する。

3. 750 μ Lの結合用緩衝液をビーズに加える。

4. ステップIからのスルホン化DNAを150 μ L加える。

5. 混合する (例えば、1000 RPMで30 にて30分間)。

6. 磁石スタンドにチューブを置き、5分間置いておく。チューブをスタンドに置いたまま、その上清を取り出して捨てる。

30

7. 1,000 μ Lの洗浄用緩衝液を加える。混合する (例えば、1000 RPMで30 にて3分間)。

8. 磁石スタンドにチューブを置き、5分間置いておく。チューブをスタンドに置いたまま、その上清を取り出して捨てる。

9. 250 μ Lの洗浄用緩衝液を加える。混合する (例えば、1000 RPMで30 にて3分間)。

10. チューブを磁気ラックに置き、1分後に上清を取り出して捨てる。

11. 200 μ Lの脱スルホン化用緩衝液を加える。混合する (例えば、1000 RPMで30 にて5分間)。

40

12. チューブを磁気ラックに置き、1分後に上清を取り出して捨てる。

13. 250 μ Lの洗浄用緩衝液を加える。混合する (例えば、1000 RPMで30 にて3分間)。

14. チューブを磁気ラックに置き、1分後に上清を取り出して捨てる。

15. 250 μ Lの洗浄用緩衝液をチューブに加える。混合する (例えば、1000 RPMで30 にて3分間)。

16. チューブを磁気ラックに置き、1分後に上清を取り出して捨てる。

17. すべてのチューブを30 で、ふたを開けたまま15分間インキュベートする。

18. 磁気ラックからチューブを取り出し、70 μ Lの溶出用緩衝液を直接ビーズに加える。

50

19. ビーズを溶出用緩衝液とともにインキュベートする（例えば、1000RPMで40にて45分間）。

20. チューブを磁気ラックに約1分間置き、その上清を取り出して保存する。

【0230】

変換されたDNAをその後予備増幅及び/またはフラップエンドヌクレアーゼアッセイに用いる。

【0231】

上記明細書で言及したすべての刊行物及び特許は、すべての目的のため、参照することによりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。記載された該技術の組成物、方法、及び使用の様々な修正及び変形は、記載された技術の範囲及び趣旨から逸脱することなく、当業者には明らかであろう。該技術を特定の例示的な実施形態に関連して説明してきたが、請求項にかかる本発明は、かかる特定の実施形態に必要以上に限定されるべきではないことを理解されたい。実際、薬理学、生化学、医科学、または関連する分野の当業者にとって明らかである本発明を実施するために記載された方法の様々な修正は、以下の特許請求の範囲内であることが意図される。

10

20

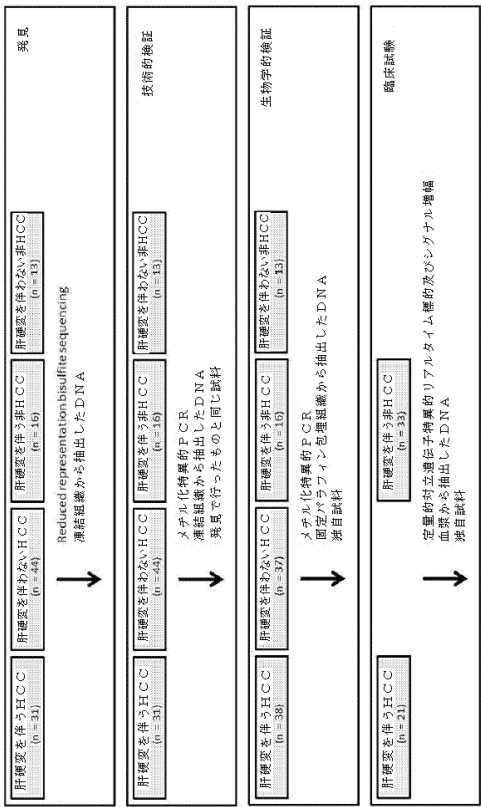
30

40

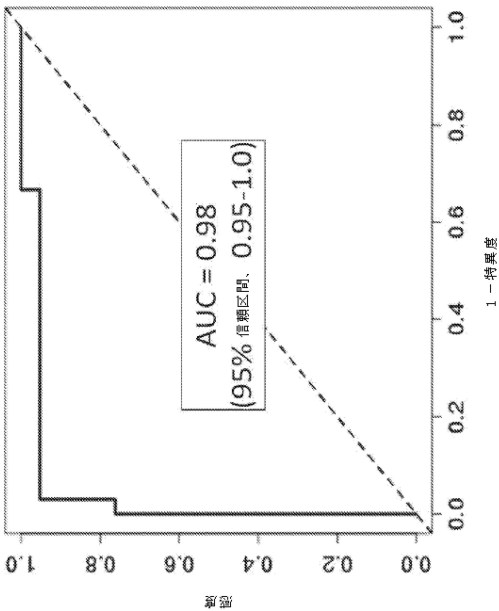
50

【図面】

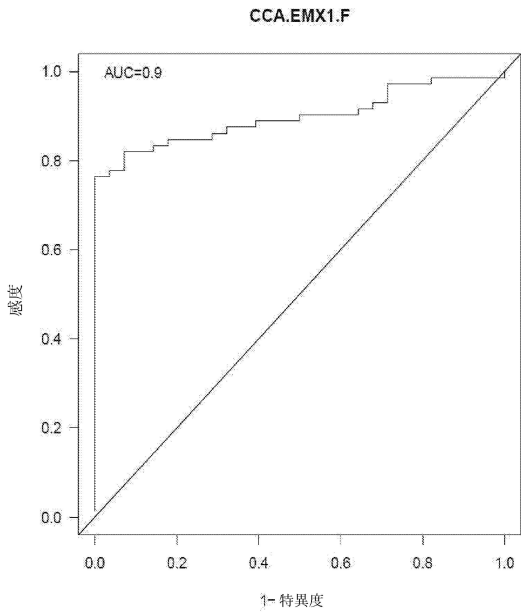
【図 1】



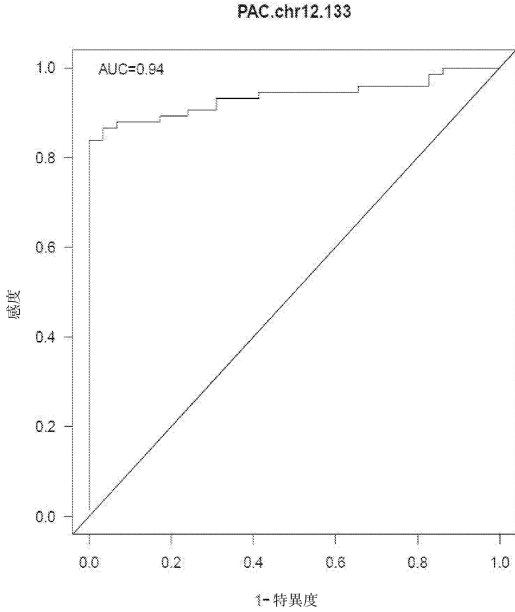
【図 2】



【図 3 A】



【図 3 B】



10

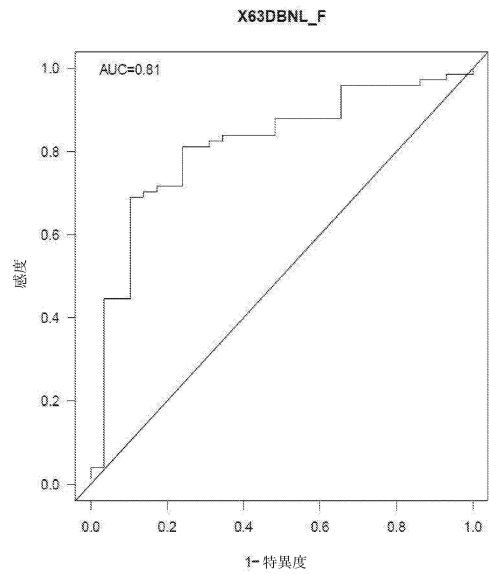
20

30

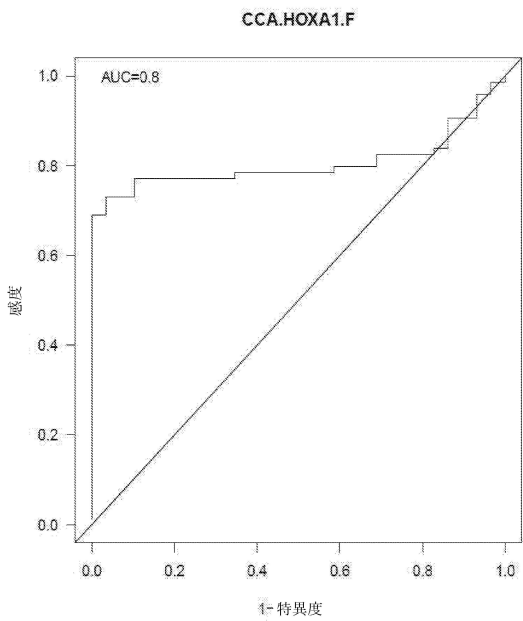
40

50

【図 3 C】



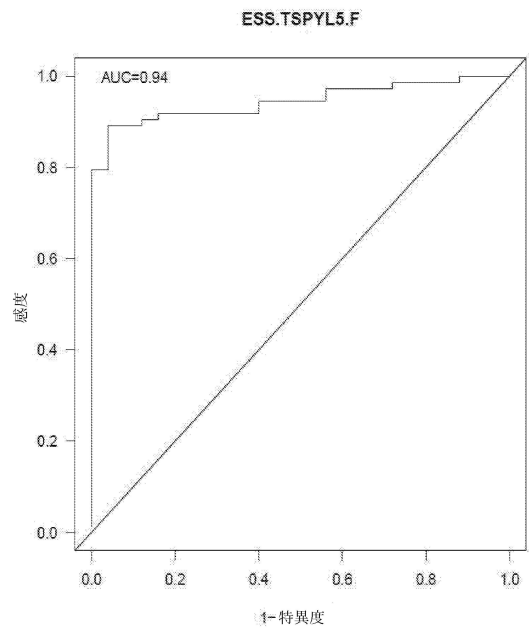
【図 3 D】



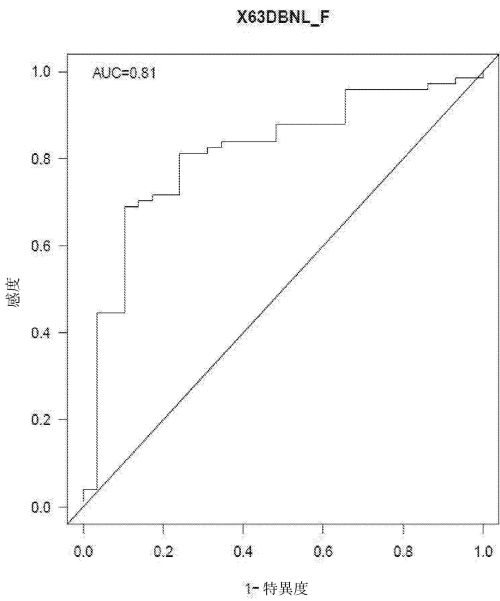
10

20

【図 3 E】



【図 3 F】

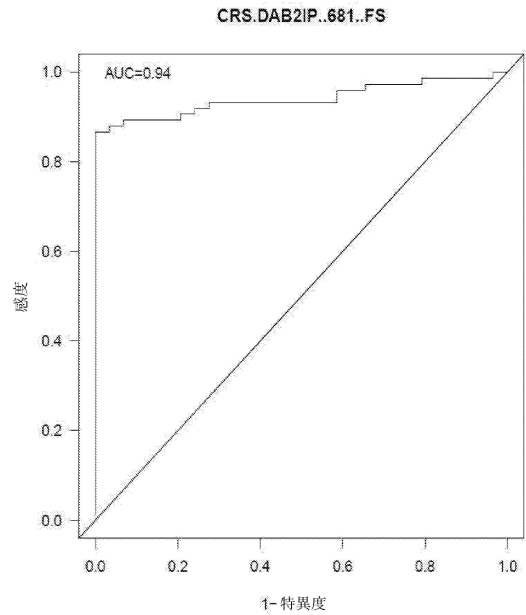



30

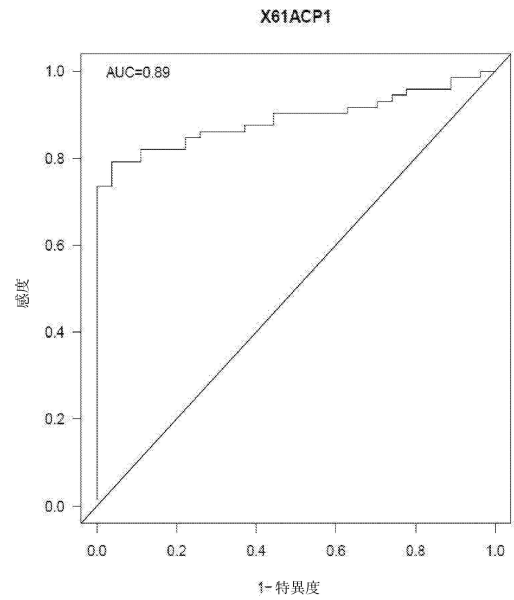
40

50


【 3 G - 1】

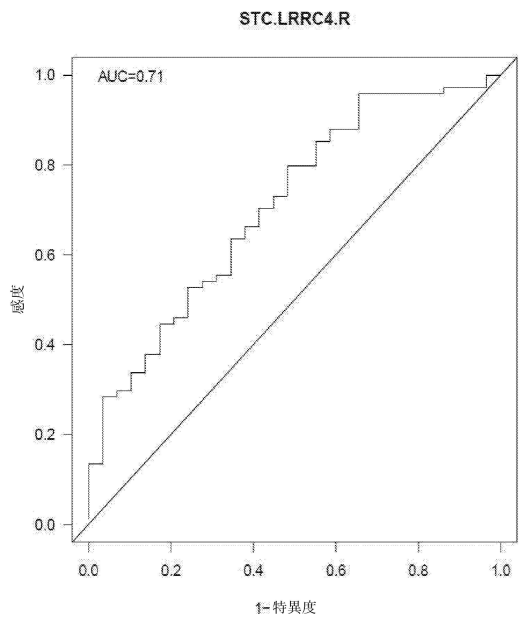



【 3 G - 2】

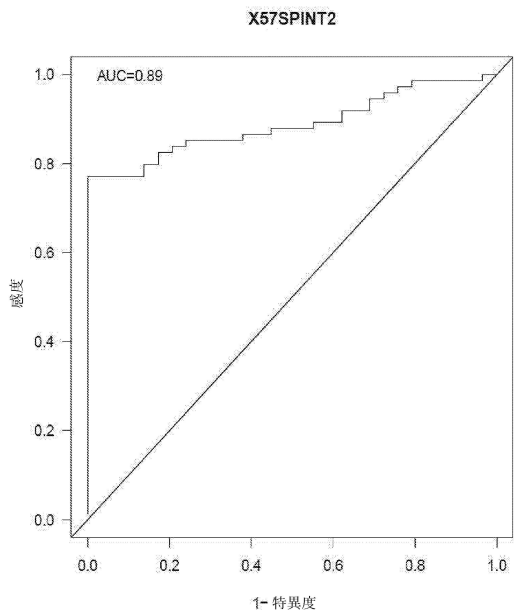


10

【 3 H】



【 3 I】



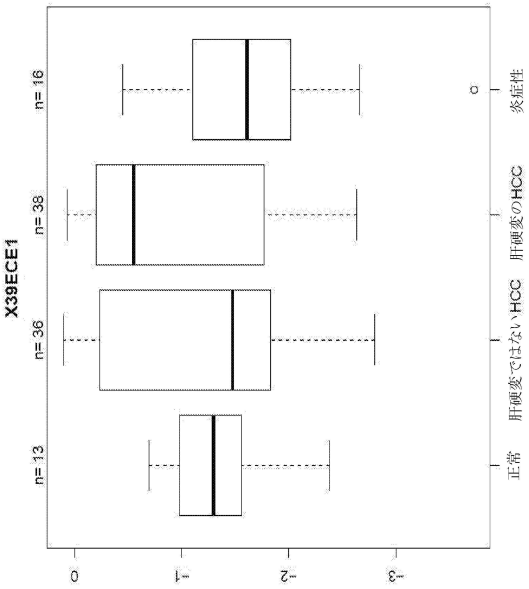
20

30

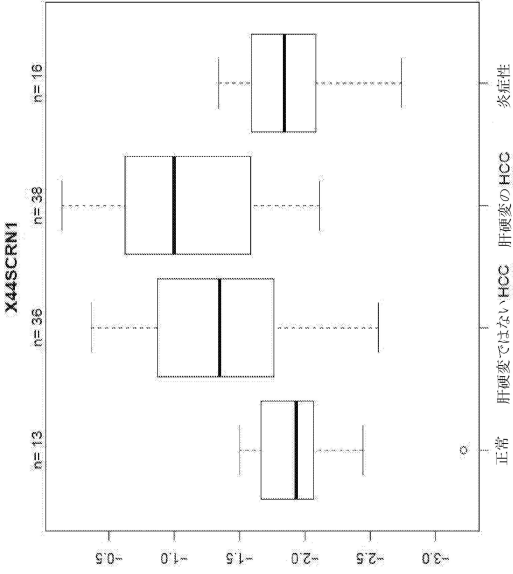
40

50

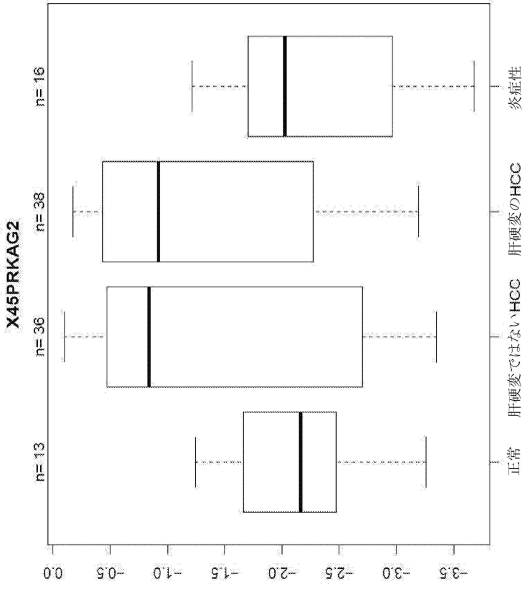
【図 4 A】



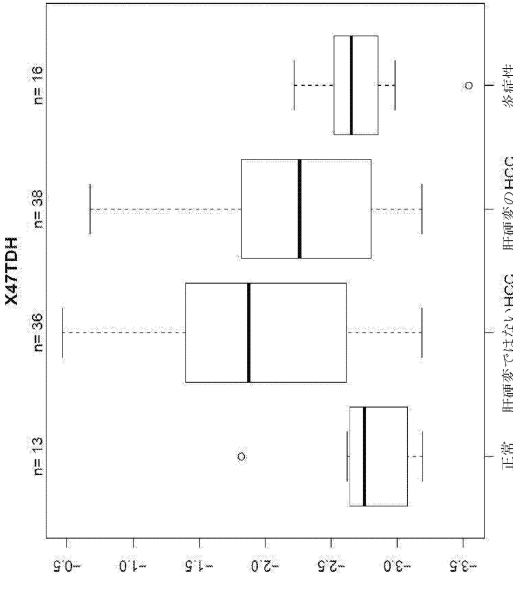
【図 4 B】



【図 4 C】



【図 4 D】




10

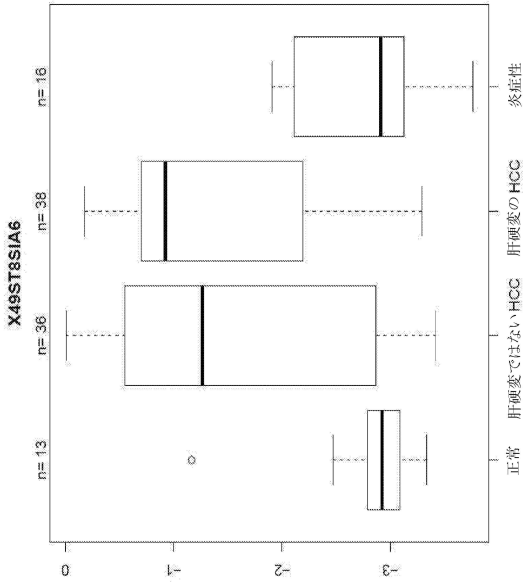
20

30

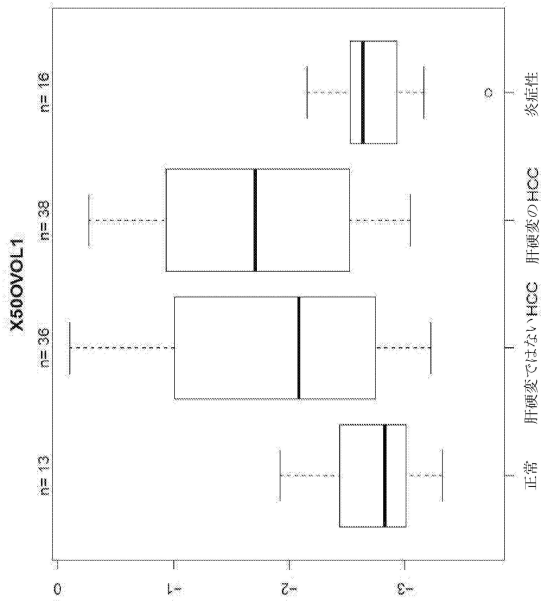
40

50


【 4 E】

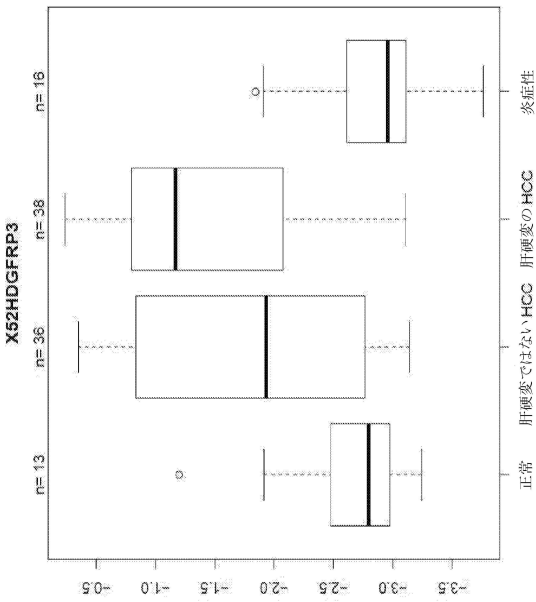



【 4 F】

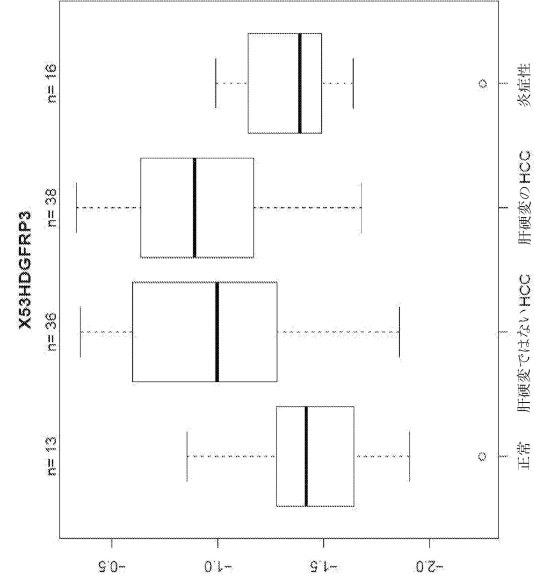


10

【 4 G】



【 4 H】



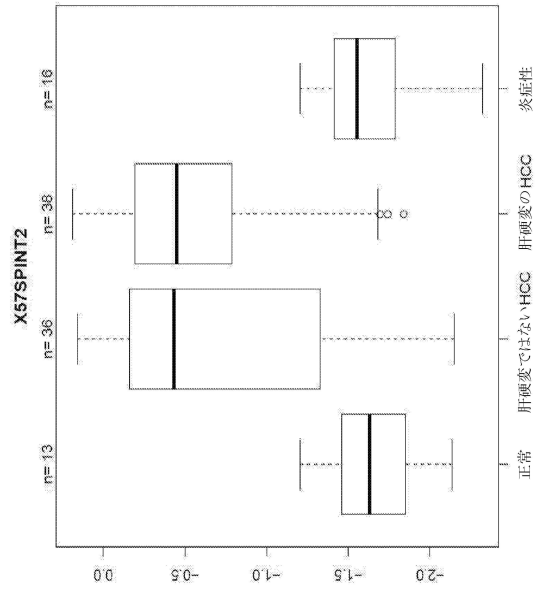
20

30

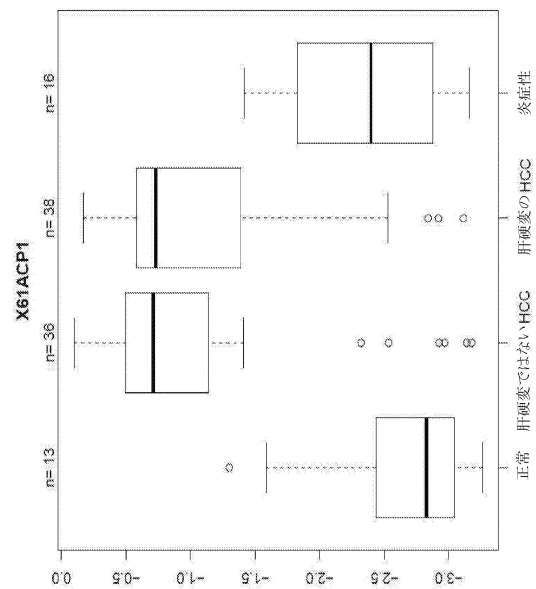
40

50

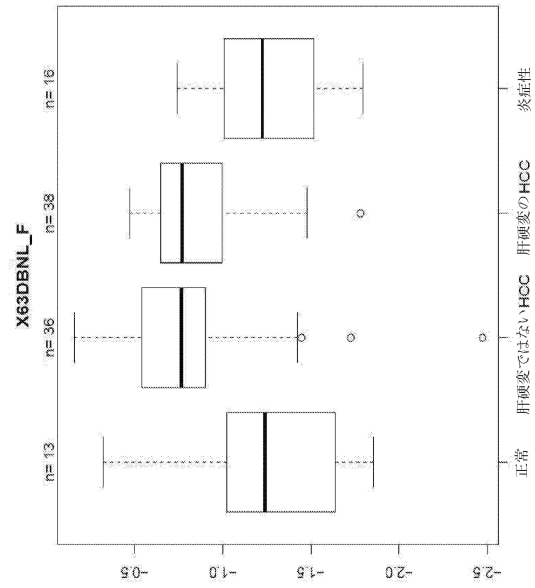
【図 4 I】



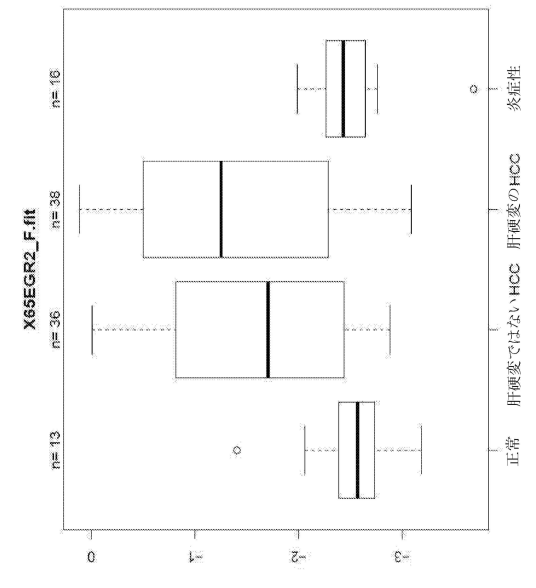
【図 4 J】



【図 4 K】



【図 4 L】




10

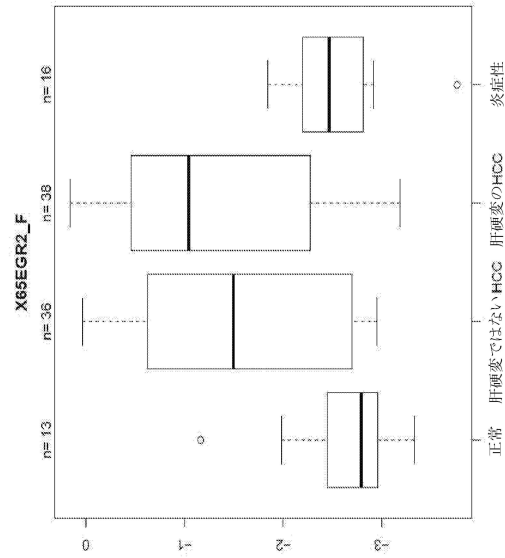
20


30

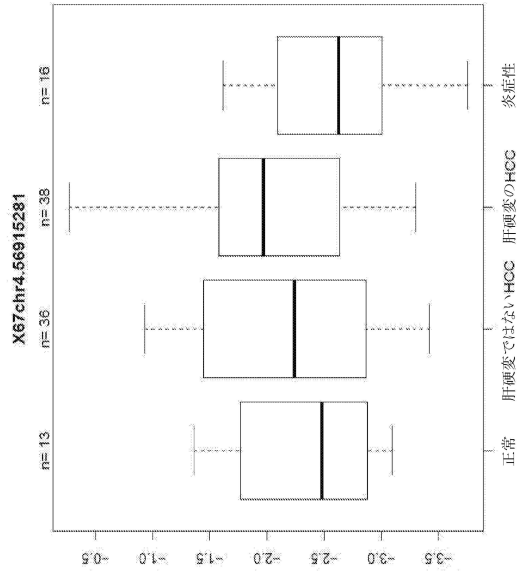
40

50


【 4 M】

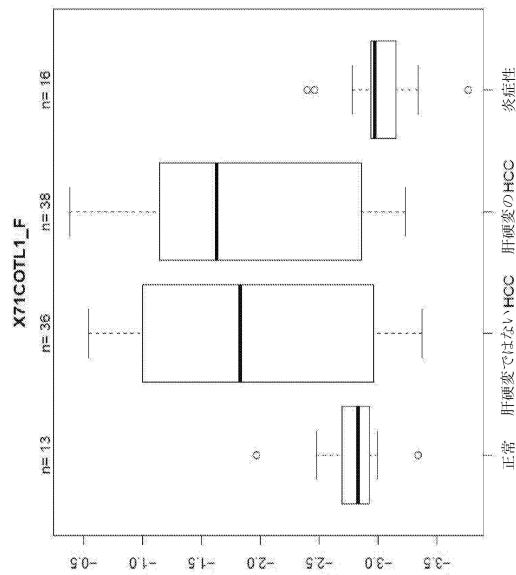



【 4 N】

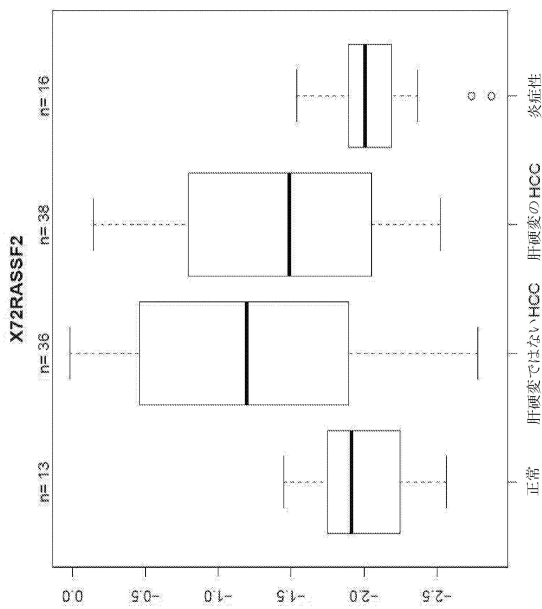


10

【 4 O】



【 4 P】



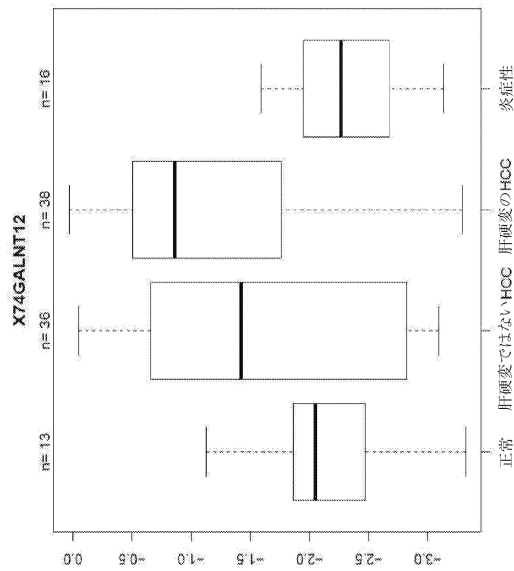
20

30

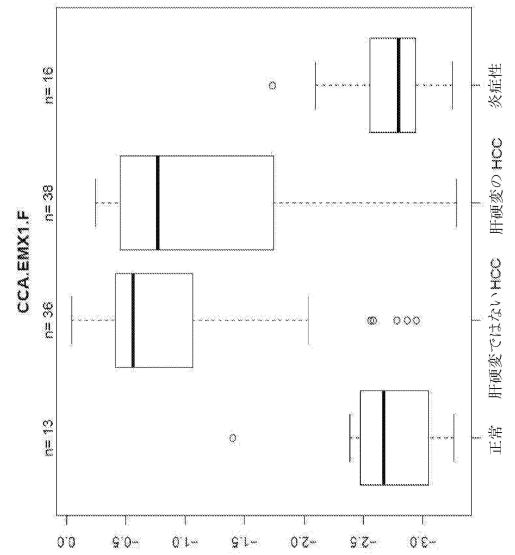
40

50

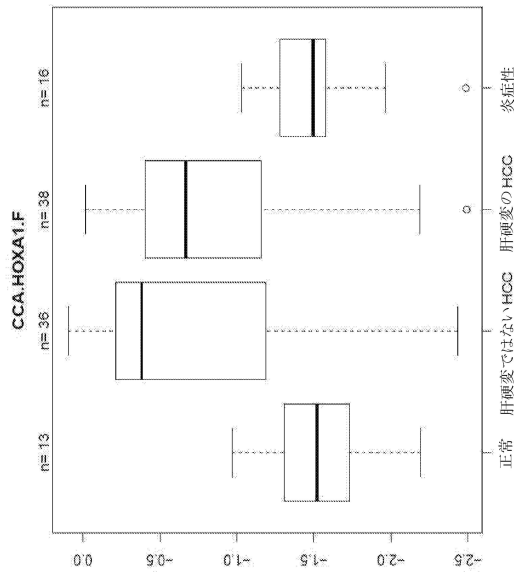
【図 4 Q】



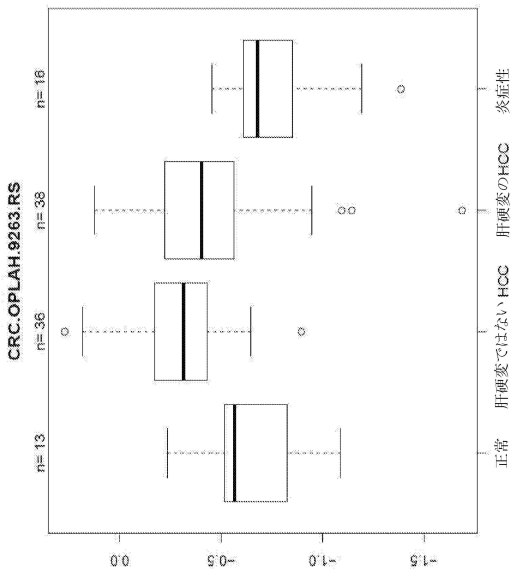
【図 4 R】



【図 4 S】



【図 4 T】



10

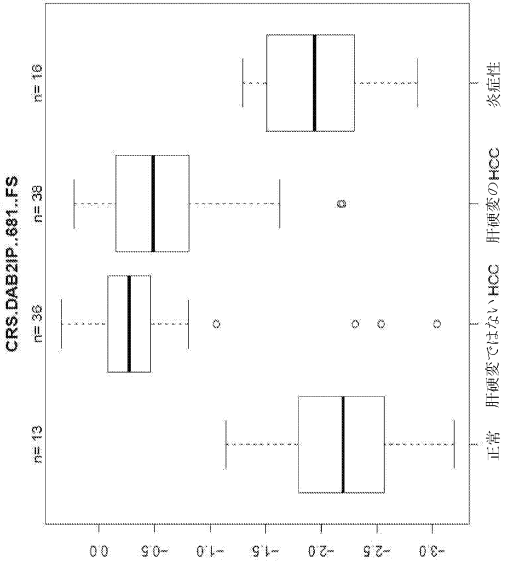
20

30

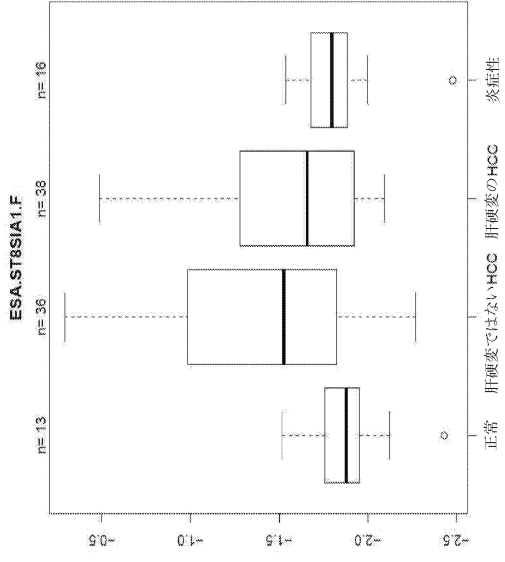
40

50

【図 4 U】

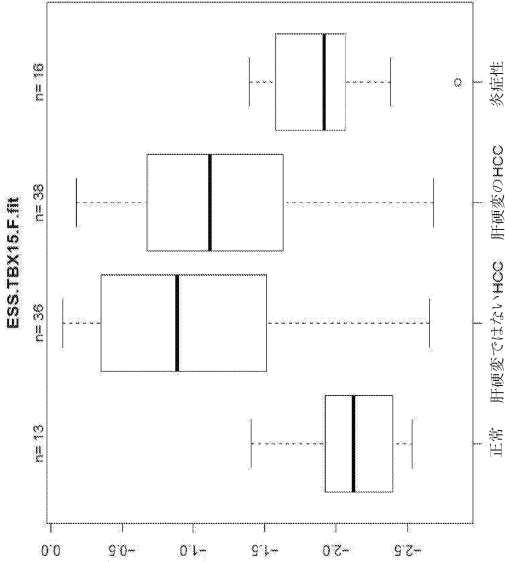


【図 4 V】

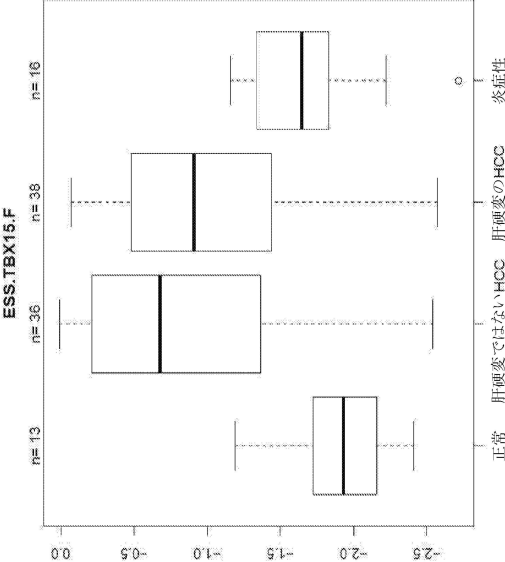


10

【図 4 W】



【図 4 X】



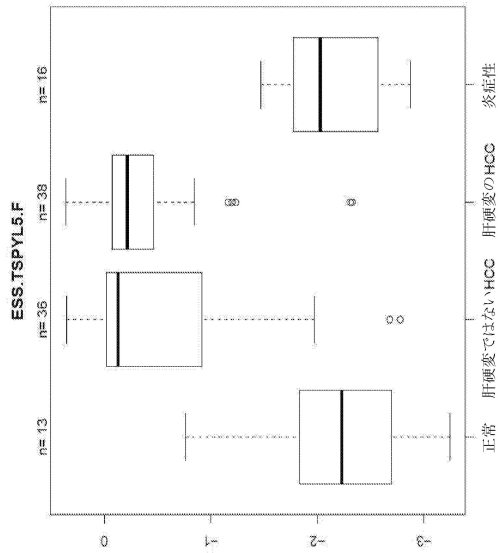
20

30

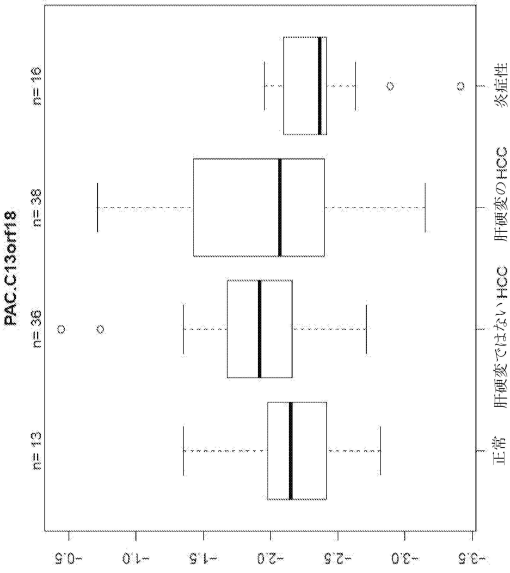
40

50

【 図 4 Y 】

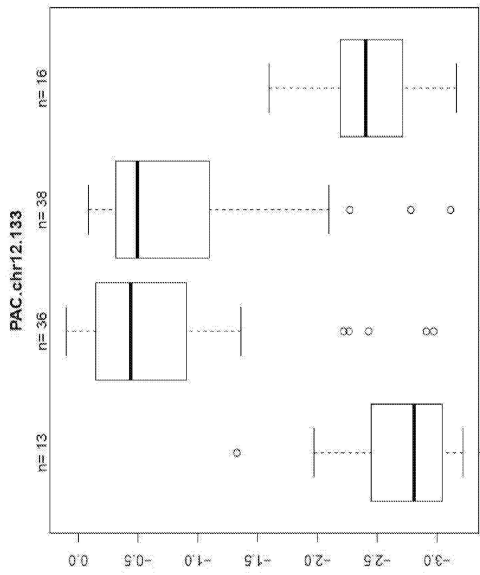


【 図 4 Z 】

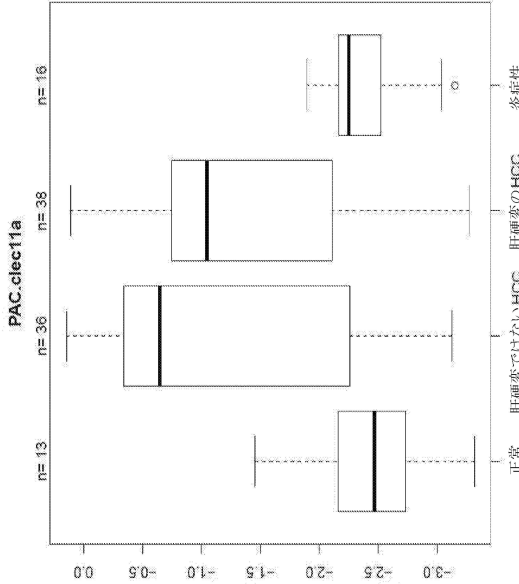


10

【 図 4 A A 】



【 図 4 B B 】



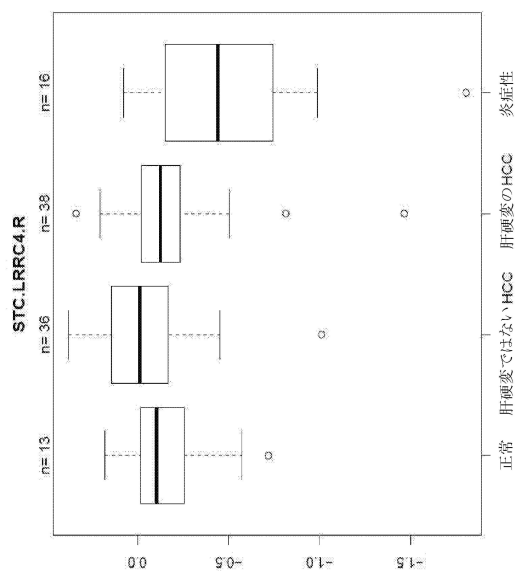
20

30

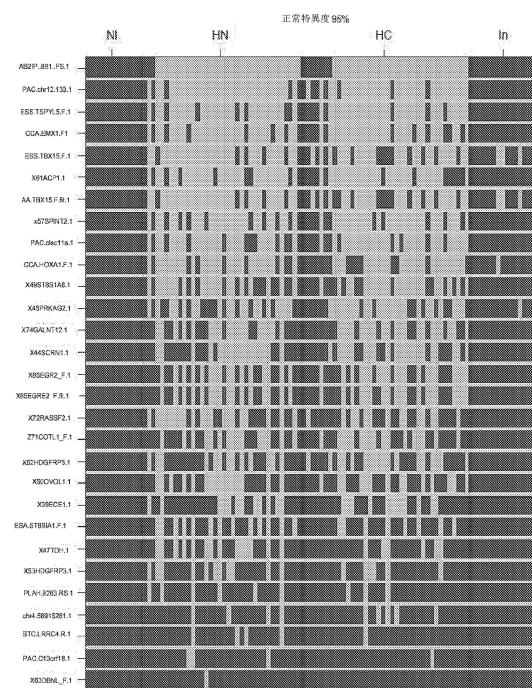
40

50

【 図 4 C C 】



【图 5】



对象

正常			肝硬変ではないHCC			肝硬変のHCC			炎症性		
偽真	偽	真	偽	真		偽	真		偽	真	
	13	0		1	2		3	4		12	3
	0	0		0	33		0	31		0	1

【 図 6 】

ア—人差

1	5' ~CGCCGAGG (配列番号101)
3	5' ~GACGGGAG (配列番号102)
5	5' ~CCACGGACG (配列番号103)
7	5' ~GCGGGTCC (配列番号104)

メチル化マーカーに関して、
A1はHEXであり、
A5はFAMであり、
A3はQUASARである。

5'-d-Q670-TCI-BHQ-2-AGCCGGTTTCGGCTGAGACTCCGGTC-C6 3'
(配列番号95)

235 5'-Q670 TCTQAGCCGGTT
3'-C6-CTGCGGCTCAGAGTCGGCC-T
7-A3 (配列番号96)

5' d-FAM-TCI-BHQ-1-AGCCGGTITTCGGCTGAGACGTCGGTGG-C6 3'
(配列番号97)

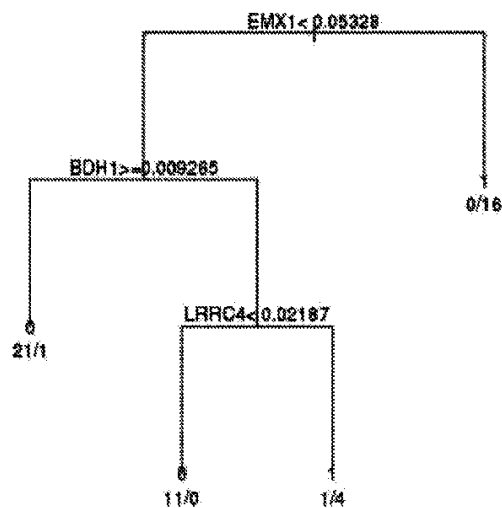
1256 3'-FAM TCTGACCGT
3'-CG-GGTCTGCAAGTCGCTT
7-Δ5 (配列番号98)

5' d-HEX-TCT-BHQ-1-AGCCGTTTCCGGCTGAGACTCGCG-C6 3'
(配列番号99)

0036 5'-HEX TCTAGCGGT
3'-C6-GCGCTCAGATCGGC
了-△1 (配列番号100)

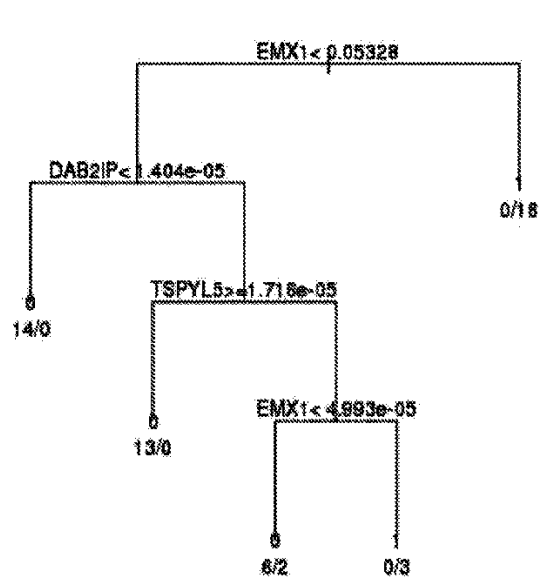
【圖 7 A】

FIG. 7A



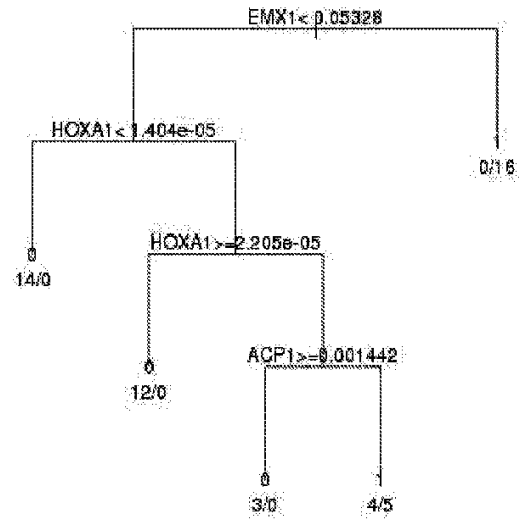
【図 7 B】

FIG. 7B



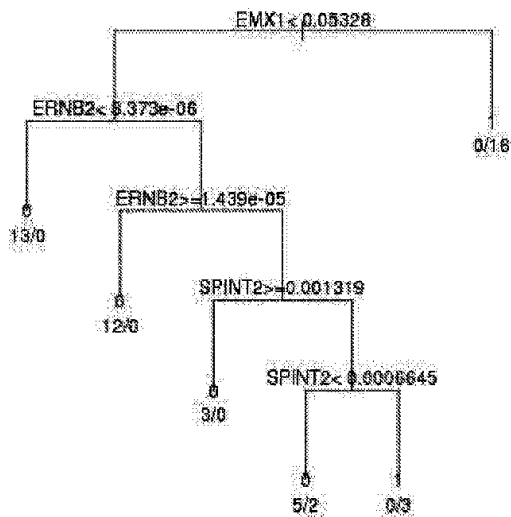
【図 7 C】

FIG. 7C

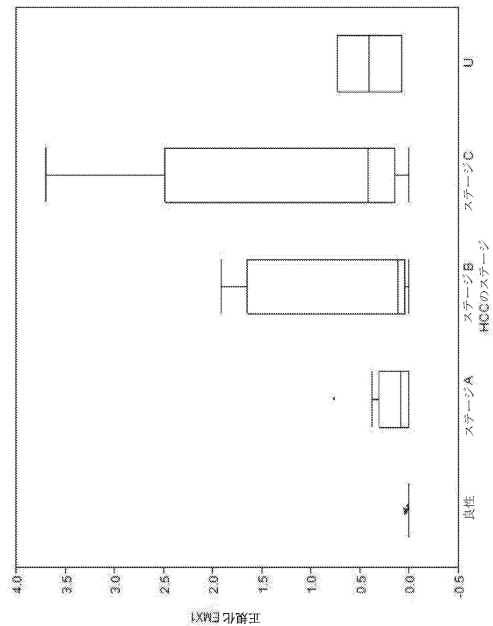


【図 7 D】

FIG. 7D



【図 8】



10

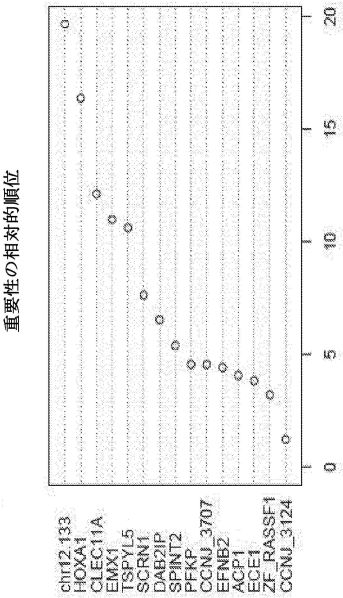
20

30

40

50

【図 9】



【配列表】

0007293109000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- エグザクト サイエンスーズ コーポレーション
 アメリカ合衆国, 5 3 7 1 9 ウィスコンシン州, マディソン, エンデヴァー レーン 5 5 0 5
 (74)代理人 110000338
 弁理士法人 H A R A K E N Z O W O R L D P A T E N T & T R A D E M A R K
 (72)発明者 テイラー, ウィリアム アール.
 アメリカ合衆国, 5 5 9 0 5 ミネソタ州, ロチェスター, ファースト ストリート サウスウェスト 2 0 0 シー/オー マヨ ファウンデーション フォア メディカル エデュケーション アンド リサーチ
 (72)発明者 アールクイスト, デビッド エー.
 アメリカ合衆国, 5 5 9 0 5 ミネソタ州, ロチェスター, ファースト ストリート サウスウェスト 2 0 0 シー/オー マヨ ファウンデーション フォア メディカル エデュケーション アンド リサーチ
 (72)発明者 マホーニー, ダグラス ダブリュー.
 アメリカ合衆国, 5 5 9 0 5 ミネソタ州, ロチェスター, ファースト ストリート サウスウェスト 2 0 0 シー/オー マヨ ファウンデーション フォア メディカル エデュケーション アンド リサーチ
 (72)発明者 キシエル, ジョーン ビー.
 アメリカ合衆国, 5 5 9 0 5 ミネソタ州, ロチェスター, ファースト ストリート サウスウェスト 2 0 0 シー/オー マヨ ファウンデーション フォア メディカル エデュケーション アンド リサーチ
 (72)発明者 ヤブ, トレーシー シー.
 アメリカ合衆国, 5 5 9 0 5 ミネソタ州, ロチェスター, ファースト ストリート サウスウェスト 2 0 0 シー/オー マヨ ファウンデーション フォア メディカル エデュケーション アンド リサーチ
 (72)発明者 アラーウィ, ハティム ティー.
 アメリカ合衆国, 5 3 7 1 9 ウィスコンシン州, マディソン, チャーマニー ドライブ 4 4 1 シー/オー エグザクト サイエンスーズ コーポレーション
 (72)発明者 ギ阿克モプロス, マリア
 アメリカ合衆国, 5 3 7 1 9 ウィスコンシン州, マディソン, チャーマニー ドライブ 4 4 1 シー/オー エグザクト サイエンスーズ コーポレーション
 (72)発明者 リドガード, グラハム ピー.
 アメリカ合衆国, 5 3 7 1 9 ウィスコンシン州, マディソン, チャーマニー ドライブ 4 4 1 シー/オー エグザクト サイエンスーズ コーポレーション
 審査官 伊達 利奈
 (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 0 9 0 6 3 4 (U S , A 1)
 特開 2 0 1 5 - 0 0 6 1 6 3 (J P , A)
 中国特許出願公開第 1 0 4 7 6 2 3 0 1 (C N , A)
 特開 2 0 0 9 - 0 9 5 2 6 2 (J P , A)
 Calvisi DF. et al. , Journal of hepatology , 2011年 , 54(2) , 311-319
 Qiu X. et al. , Digestive diseases and sciences , 2016年 , 61(1) , 149-157 , Published online: 20150919
 Anderson BW. et al. , Gastroenterology , 2016年04月01日 , 150(4), SUPPLEMENT 1 , S863-S864, #Tu1281
 Huang W. et al. , Genetic testing and molecular biomarkers , 2015年 , 19(6) , 295-302
 Shen J. et al. , BMC medical genomics , 2015年 , 8 , pp.1-12 , DOI: 10.1186/s12920-015-0105-1
 Zha TZ. et al. , Tumour biology , 2012年 , 33(6) , 2125-2134
 (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
 C 1 2 Q 1 / 6 8

C 1 2 N 1 5 / 0 0

P u b M e d

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)