

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2011 年 10 月 27 日(27.10.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/132798 A1

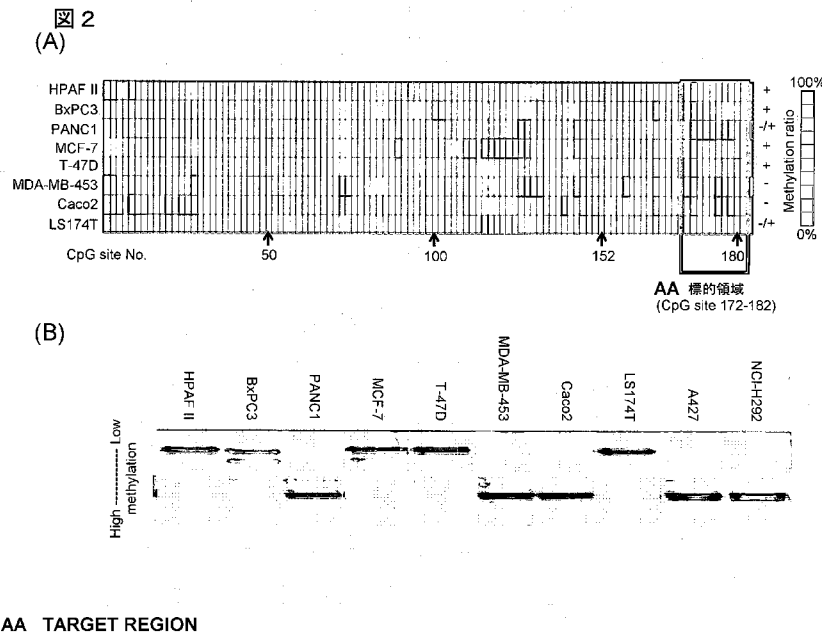
- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/060339
- (22) 国際出願日: 2011 年 4 月 21 日(21.04.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-098163 2010 年 4 月 21 日(21.04.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人鹿児島大学(KAGOSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目 2 1 番 2 4 号 Kagoshima (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 横山勢也(YOKOYAMA, Seiya) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目 2 1 番 2 4 号国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP). 米澤傑(YONEZAWA, Suguru) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目 2 1 番 2 4 号国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP).

- (74) 代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 20 号 神谷町 MT ビル 19 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: NOVEL DNA METHYLATION ANALYSIS METHOD

(54) 発明の名称: 新規な DNA メチル化解析方法



(57) Abstract: Disclosed is a method that can efficiently detect DNA methylation. Specifically, the DNA methylation detection method includes bisulfate treatment of DNA, a first PCR of the bisulfate-treated DNA, and following Nested PCR, denaturing gradient gel electrophoresis of the amplified DNA.

(57) 要約: 本発明は、DNA メチル化を効率的に検出できる方法を提供することを目的とし、具体的には、DNA を重亜硫酸塩処理に供し、重亜硫酸塩処理後の DNA を第 1 の PCR に供し、次いで Nested PCR に供した後、増幅 DNA を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動に供することを含む、DNA メチル化検出方法に関する。

WO 2011/132798 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称

新規な DNA メチル化解析方法

技術分野

本発明は、例えば、DNA メチル化パターン及び連続性等の DNA メチル化を検出する方法に関する。

背景技術

エピジェネティクス (Epigenetics) とは、ゲノムでは規定されない遺伝子発現の制御機構を明らかにしようとする、遺伝学又は分子生物学の研究分野である。当該エピジェネティクスを支える主要な分子機構が DNA のメチル化である。DNA メチル化は、化学的に安定であり、DNA 配列自体に変化を加えることなく、細胞分裂を通じて伝達される情報である。このような DNA メチル化の特性により、DNA メチル化は、例えば組織特異的な遺伝子発現、刷り込み、X 染色体の不活性化、癌化等の様々な現象において重要な役割を担っていると考えられている。近年では、DNA メチル化酵素遺伝子や DNA メチル化状態の異常に起因する先天的又は後天的疾患、クローン動物における DNA メチル化の異常等が既に多数同定されている。

従来において、DNA メチル化を解析すべく様々な方法が存在する。種々の DNA メチル化解析方法は、解析感度、網羅性、解像度、定量性等において異なる特徴を有し、目的に応じて適宜選択される。例えば、特定の遺伝子の転写抑制機構を明らかにする場合には、1 塩基レベルの解像度が必要となる。一方、メチル化の頻度を解析する場合には、定量性や精度も考慮しなければならない。

特定領域におけるメチル化 DNA の検出では、重亜硫酸塩 (Bisulfite) 処理による塩基置換反応を行い、DNA の配列を決定する。当該塩基置換反応では、非メチル化シトシンが重亜硫酸ナトリウムと反応して、ウラシルへと変換される。メチル化シトシンは重亜硫酸ナトリウムと反応しないので、原理上全てのシトシンのメ

チル化状態を塩基の違いとして検出できる。従来における検出方法としては、例えばPCRを使用したメチル化特異的PCR(MSP)法、定量的PCRを使用したReal-time MSP法、TAクローニングを使用したBisulfite-sequencing法、質量分析を使用したMassARRAY法、次世代sequencerを使用したパイロシーケンス法等が挙げられる。さらに、重亜硫酸塩反応を必要としないICON-prove法も開発されている。

目的タンパク質やマイクロRNA(microRNA)の発現量は個々のCpGメチル化の程度のみでは判別が難しく、その特定領域のメチル化パターンや連続性が重要となる。CpGメチル化程度を検出する方法として様々な方法が開発されているものの、そのパターンや連続性を検出する方法としては、Bisulfite-sequencing法のみである。

一方、Bisulfite-DGGE法は、AbramsとStanton(非特許文献1)によって提案された変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: DGGE)法を基本とし、P.Guldborg等(非特許文献2)によって開発された方法である。当該方法では、重亜硫酸塩処理後のサンプルをPCRによって増幅した後、そのアプリーコンを、ポリアクリルアミドと変性剤の濃度勾配から成るゲルを使用した電気泳動に供する。ポリアクリルアミドの濃度勾配に基づき二本鎖DNAの分子量の違いによる分離を行い、さらに変性剤の濃度勾配に基づき二本鎖DNAの変性度の差異による分離を行い、目的領域中のウラシル(非メチル化シトシン)とシトシン(メチル化シトシン)の違いによる分離が行われる。当該方法は、MSP法と同様に視覚的評価を行うことができ、さらに、電気泳動後のゲル中のバンドをシーケンス反応に転用することができる。また、Bisulfite-sequencing法と比較すると、Bisulfite-DGGE法によれば大幅な時間短縮を行うことができる。

しかしながら、Bisulfite-DGGE法では、重亜硫酸塩処理後にPCRによる増幅を行うため、非メチル化シトシンがチミンに変換され、もともとDNA配列に存在するチミンと混在するため類似した配列が増加することとなる。当該増加に伴い、PCRにおいてミスアニーリングが生じやすく、PCRのサイクル数を上げると、非特異的アプリーコンが増幅されてしまうこととなる。微量サンプルの解析やマイナーなDNAメチル化パターンの検出を行う際には、PCRのサイクル数を上げることが必須であり、その結果、Bisulfite-DGGE法によると、解像度の低下が生じる。

また、Bisulfite-DGGE 法は、電気泳動ゲルの作製に、ポリアクリルアミドと変性剤の二つのグラジエントを必要とする。そのため、確認したい標的を変更する場合に、ゲルの最適化を検討する必要がある、大変煩雑である。

先行技術文献

非特許文献

非特許文献 1 Abrams, E. S. 及び Stanton, V. P. Jr., Use of denaturing gradient gel electrophoresis to study conformational transitions in nucleic acids. 「Methods Enzymol.」, 1992 年, 第 212 巻, pp. 71-104

非特許文献 2 Guldberg, P., Gronbak, K., Aggerholm, A., Platz, A., thor Straten, P., Ahrenkiel, V., Hokland, P., 及び Zeuthen, J., Detection of mutations in GC-rich DNA by bisulphite denaturing gradient gel electrophoresis. 「Nucleic Acids Res.」, 1998 年, 第 26 巻, 第 6 号, pp. 1548-1549

発明の概要

そこで、本発明は、上述した実情に鑑み、DNA メチル化を効率良く検出できる方法を提供することを目的とする。

上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、DNA を重亜硫酸塩処理(以下、「Bisulfite 処理」と称する場合がある)に供し、重亜硫酸塩処理後の DNA を第 1 の PCR に供し、次いで Nested PCR に供し、増幅 DNA(アンプリコン)を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(以下、「DGGE」と称する場合がある)に供することで、標的領域の DNA メチル化を効率良く検出できることを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明は以下を包含する。

(1) DNA を重亜硫酸塩処理に供する工程と、標的領域の外側の領域に対応する第 1 プライマーセットを用いて重亜硫酸塩処理後の DNA を第 1 の PCR に供する工程と、標的領域に対応する第 2 プライマーセットを用いて第 1 の PCR 後の増幅 DNA を第 2 の PCR に供する工程と、第 2 の PCR 後の増幅 DNA を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動に供する工程とを含み、第 2 プライマーセットのプライマーのアニール位置は、標的領域に対して第 1 プライマーセットのプライマーのアニール

ング位置の内側に存在する、DNA メチル化検出方法。

(2) 第2プライマーセットの一方のプライマーは、5'側に GC-clamp 配列を有する、(1)記載の方法。

(3) 変性剤濃度勾配ゲルが濃度勾配として変性剤濃度勾配のみを有する、(1)記載の方法。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2010-098163 号の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1は、ヒトムチンコアタンパク質 1(MUC1) 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域の配列(配列番号2;ただし、Bisulfite 処理後の DNA 配列であり、且つ非メチル化シトシンから変換されたウラシルをチミンで表示する)を示す。

図2は、本発明に係る方法を用いた MUC1 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化を解析した結果を示す。

図3は、ヒトムチンコアタンパク質 2(MUC2) 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域の配列(配列番号7;ただし、Bisulfite 処理後の DNA 配列であり、且つ非メチル化シトシンから変換されたウラシルをチミンで表示する)を示す。

図4は、本発明に係る方法を用いた MUC2 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化を解析した結果を示す。

図5は、ヒトムチンコアタンパク質 4(MUC4) 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域の配列(配列番号12;ただし、Bisulfite 処理後の DNA 配列であり、且つ非メチル化シトシンから変換されたウラシルをチミンで表示する)を示す。

図6は、本発明に係る方法を用いた MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化を解析した結果を示す。

図7は、本発明に係る方法の検出限界を検討した結果を示す。

図8は、ヒト大腸の正常粘膜と癌組織における本発明に係る方法によるヒト MUC1 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析と当該

遺伝子からの mRNA の発現解析及び免疫組織化学染色によるタンパク質発現解析との比較を示す。

図 9 は、ヒト大腸の正常粘膜と癌組織における本発明に係る方法によるヒト MUC2 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析と当該遺伝子からの mRNA の発現解析及び免疫組織化学染色によるタンパク質発現解析との比較を示す。

図 10 は、ヒト大腸の正常粘膜と癌組織における本発明に係る方法によるヒト MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析と当該遺伝子からの mRNA の発現解析及び免疫組織化学染色によるタンパク質発現解析との比較を示す。

図 11 は、ヒト手術症例サンプルにおける本発明に係る方法によるヒト MUC1 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析と免疫組織化学染色による当該遺伝子によりコードされるタンパク質の発現解析との比較を示す。

図 12 は、ヒト手術症例サンプルにおける本発明に係る方法によるヒト MUC2 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析と免疫組織化学染色による当該遺伝子によりコードされるタンパク質の発現解析との比較を示す。

図 13 は、ヒト手術症例サンプルにおける本発明に係る方法によるヒト MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析と免疫組織化学染色による当該遺伝子によりコードされるタンパク質の発現解析との比較を示す。

図 14 は、ヒトの膵嚢胞性腫瘍の嚢胞内液サンプルと膵癌症例から得られた膵液サンプルにおける本発明に係る方法によるヒト MUC1、MUC2 及び MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析と免疫組織化学染色による当該遺伝子によりコードされるタンパク質の発現解析との比較を示す。

図 15 は、ヒトの膵嚢胞性腫瘍の嚢胞内液サンプルと膵癌症例から得られた膵液サンプルにおける本発明に係る方法によるヒト MUC1、MUC2 及び MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析と免疫組織化学染色に

よる当該遺伝子によりコードされるタンパク質の発現解析との比較を示す。

図 16 は、ヒトの胆管嚢胞性腫瘍の嚢胞内液サンプルと肝外胆管癌 (EHBDC) の胆汁サンプルにおける本発明に係る方法によるヒト MUC1、MUC2 及び MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析と免疫組織化学染色による当該遺伝子によりコードされるタンパク質の発現解析との比較を示す。

図 17 は、ホルマリン固定時間及びパラフィン包埋時間による DNA メチル化への影響に関する本発明に係る方法による評価を示す。

図 18 は、ヒトムチンコアタンパク質 5AC (MUC5AC) 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域の配列 (配列番号 29 ; ただし、Bisulfite 処理後の DNA 配列であり、且つ非メチル化シトシンから変換されたウラシルをチミンで表示する) を示す。

図 19 は、本発明に係る方法を用いた MUC5AC 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化を解析した結果を示す。

図 20 は、Bisulfite-DGGE 法と本発明に係る方法とを比較した結果を示す。

図 21 は、細胞株において Bisulfite-DGGE 法と本発明に係る方法との検出力を比較した結果を示す。

図 22 は、組織サンプルにおいて Bisulfite-DGGE 法と本発明に係る方法との検出力を比較した結果を示す。

図 23 は、体液サンプルにおいて Bisulfite-DGGE 法と本発明に係る方法との検出力を比較した結果を示す。

発明を実施するための形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に係る DNA メチル化検出方法 (以下、「MSE (Methylation Specific Electrophoresis) 法」と称する) は、(1) DNA を重亜硫酸塩処理に供する工程、(2) 標的領域の外側の領域に対応する第 1 プライマーセットを用いて重亜硫酸塩処理後の DNA を第 1 の PCR に供する工程、(3) 標的領域に対応する第 2 プライマーセットを用いて第 1 の PCR 後の増幅 DNA を第 2 の PCR に供する工程、(4) 第 2 の PCR 後の増幅 DNA を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動に供する工程を含む方法である。MSE

法によれば、例えば微量の DNA サンプルにおいても DNA メチル化を検出でき、また DNA メチル化パターン又は連続性を効率良く検出できる。

ここで、MSE 法に適用する DNA は、DNA メチル化の現象が生じるいずれの生物(例えば細菌、ヒト等の哺乳動物等)由来の生物学的サンプル(例えば器官、組織、細胞、体液等)に由来する(抽出した)DNA であってもよい。例えば、癌組織由来の組織、体液及び細胞等から抽出した DNA を MSE 法に適用することができる。

以下に、MSE 法の各工程について説明する。

(1) DNA を重亜硫酸塩処理に供する工程

MSE 法では、先ず DNA を重亜硫酸塩処理に供する。当該処理により、非メチル化シトシンが重亜硫酸塩によりスルホン化され、さらに加水分解により脱アミノ化され、さらに、アルカリ存在下での脱スルホン化により、ウラシルに変換される。これに対して、メチル化されたシトシンは、重亜硫酸塩処理してもウラシルに変換されない。このため、CpG 含有 DNA の塩基配列中のシトシンがメチル化されているか否かを、重亜硫酸塩処理により、ウラシルに変換されているかどうかで区別する。なお、市販の重亜硫酸塩処理用のキット(例えば、EpiTect Bisulfite Kits(QIAGEN 社製))を使用して、当該キットのマニュアルに準じて、DNA を重亜硫酸塩処理に供することができる。

(2) 重亜硫酸塩処理後の DNA を第 1 の PCR に供する工程

MSE 法では、次いで標的領域の外側の領域に対応する第 1 プライマーセットを用いて重亜硫酸塩処理後の DNA を第 1 の PCR に供する。重亜硫酸塩処理後に PCR による増幅により、非メチル化シトシンがチミンに変換され、もともと DNA 配列に存在するチミンと混在するため類似した配列が増加することとなる。当該増加に伴い、PCR においてミスアニーリングが生じやすく、PCR のサイクル数を上げると、非特異的アンプリコンが増幅されてしまうこととなる。そこで MSE 法では、このようなノイズの発生を防止すべく、標的領域の外側に対応する第 1 プライマーセットを用いて第 1 の PCR を行い、次いで、第 2 の PCR(Nested PCR)を行うことで、当該ノイズを低下させる。当該ノイズの低下により、PCR サイクル数の増加が可能となり、検出限界を向上させることができる(すなわち、微量の DNA サンプルを使用することができる)。

ここで、標的領域とは、DNA における検出対象のメチル化状態を有する領域を意味する。標的領域としては、例えば CG のジヌクレオチドが偏って存在する領域であり、メチル化の対象である CpG アイランド(又は CpG 部位)が挙げられる。例えば哺乳動物の多くの遺伝子の 5' 上流領域に CpG アイランドが存在することが知られている。また、MassARRAY 法によって事前に DNA における CpG 部位を決定し、重要な CpG 部位のみを含む領域を標的領域とすることもできる。当該標的領域決定方法によれば、検出解像度を向上させることができる。標的領域の長さとしては、200~400 塩基が挙げられる。

第 1 プライマーセットの一对のプライマーは、標的領域の外側の領域に対応し、当該外側の領域にアニーリングするように設計される。当該外側の領域は、標的領域の両末端の各々から外側方向に例えば 10~100 塩基(好ましくは 20~80 塩基)離れた位置とすることができる。また、第 1 プライマーセットのプライマーの長さとしては、例えば 15~30 塩基、好ましくは 18~22 塩基が挙げられる。

PCR は、例えば増幅産物の長さや GC 含量等を考慮し、PCR 反応液組成(例えば PCR バッファー、ポリメラーゼ、dNTP ミックス、プライマー等を含む)、熱変性、アニーリング、伸長反応等における温度設定並びにサイクル数を適宜決定し、行うことができる。このような PCR 条件は、例えば使用するポリメラーゼに最適な条件下で行う等適宜決定することができる。なお、当該 PCR によれば、非メチル化シトシンから変換されたウラシルは、チミンへと変換される。

(3) 第 1 の PCR 後の増幅 DNA を第 2 の PCR に供する工程

MSE 法では、第 1 の PCR 後、標的領域に対応する第 2 プライマーセットを用いて第 1 の PCR 後の増幅 DNA(増幅産物)を第 2 の PCR に供する。当該第 2 の PCR は、nested PCR と呼ばれるものである。すなわち、第 1 の PCR 後の増幅産物の内側に第 2 のプライマーセットのプライマーを設計し、第 1 の PCR 後の増幅産物を新たな鋳型として第 2 の PCR を行う。

第 2 プライマーセットのプライマーは、アニーニング位置が、標的領域を基準として第 1 プライマーセットのプライマーのアニーニング位置の内側に存在するように設計する。すなわち、第 2 プライマーセットのプライマーのアニーニング位置は、標的領域の両末端又はその隣接領域とする。なお、第 2 プライマーセッ

トのプライマーと第1プライマーセットのプライマーとは、第2プライマーセットのプライマーのアニーリング位置が第1プライマーセットのプライマーのアニーリング位置の内側にある限り、一部重複していてもよい。第2プライマーセットのプライマーの長さとしては、例えば15～30塩基、好ましくは18～22塩基が挙げられる。なお、第2のプライマーの一方のプライマー(例えば、フォワード(センス)プライマー)の5'側にGC-clamp配列を付加することで、後続の変性剤濃度勾配ゲル電気泳動工程において、分離能を向上させることができる。ここで、GC-clamp配列とは、30～50塩基程度のG-Cが豊富で安定な配列を意味し、例えば配列番号1に記載の塩基配列が挙げられる。

また、第1のPCRと同様に、PCRは、標的領域の長さやGC含量等を考慮し、PCR反応液組成(例えばPCRバッファー、ポリメラーゼ、dNTPミックス、プライマー等を含む)、熱変性、アニーリング、伸長反応等における温度設定並びにサイクル数を適宜決定し、行うことができる。

(4) 第2のPCR後の増幅DNAを変性剤濃度勾配ゲル電気泳動に供する工程

MSE法では、第2のPCR後、増幅DNAを変性剤濃度勾配ゲル電気泳動に供することで、増幅DNAを分離し、視覚的にメチル化パターンや連続性を評価することができる。

従来のBisulfite-DGGE法では、サンプル中に非特異的増幅断片が多く、DNA鎖長による分離のために分離効率を上げるべく、電気泳動ゲルの作製において、ゲル成分であるアクリルアミドと変性剤の双方の濃度勾配を必要とした。このように、従来のBisulfite-DGGE法では、2種の濃度勾配を必要とし、標的領域毎にゲルの最適化操作が煩雑であった。一方、MSE法では、上記第1のPCR及び第2のPCR(Nested PCR)を行うことで、非特異的な増幅を抑え、非特異的増幅断片によるノイズを低下させる。従って、高い検出感度の増幅DNAを使用することで、MSE法に使用するゲルは変性剤の濃度勾配のみを有するものとすることができ、再現性を向上させ、且つゲルの最適化を容易に行うことができる。

変性剤濃度勾配ゲルは、例えばゲル成分(アクリルアミド)、尿素とホルムアミドとの組合せ等の変性剤、TAEバッファー等を使用して作製される。具体的には、例えばポリアクリルアミドゲルを使用し、且つ変性剤として尿素及びホルムアミ

ドの組合せを使用する場合には、増幅産物の長さ等に応じて、ゲルにおいて例えば6~15% (好ましくは8~10%) のアクリルアミド濃度となるように、且つ尿素及びホルムアミドの組合せの濃度勾配が例えば10%→50%→20%→30% (好ましくは濃度勾配の幅が10%以上) となるように作製する。また、最適条件の検討としては、濃度勾配の幅の広い(10%~50%)ゲルで検討し、濃度勾配の幅を狭くする方法を検討する。また、検出したバンドがスメアを呈する場合はアクリルアミドの濃度を上げる。なお、変性剤濃度勾配は、電気泳動における陰極から陽極方向へ(DNAが泳動する方向へ)低濃度から高濃度へと勾配をつける。

MSE法では、第2のPCR後の増幅DNA(例えば4~15 μ l、好ましくは5~10 μ l)を変性剤濃度勾配ゲルにアプライし、電気泳動に供する。電気泳動条件としては、例えば泳動槽温度:60℃、定電圧:70~250V及び泳動時間:300~900分が挙げられる。

電気泳動後、変性剤濃度勾配ゲルをエチジウムプロマイド染色、もしくはゲルレッドによる染色に供することで、アプライした増幅DNAのバンドを視覚的に観察することができる。GとCとの対における水素結合は3本であり、一方、AとTとの対における水素結合は2本である。従って、GCの結合は、ATの結合よりも変性剤に対して耐性を有する。そのため、GCの結合を多数有するDNAは、ATの結合を多数有するDNAと比べて変性剤濃度勾配ゲルにおいてより泳動することとなる。

MSE法では、DNAにおける非メチル化シトシンがウラシル、そしてチミンに変換されているため、非メチル化シトシンを有する標的領域に対応する増幅DNAは、メチル化シトシンを有する標的領域に対応する増幅DNAよりも泳動速度が遅く、変性剤濃度勾配ゲルの陰極に近い側に位置することとなる。一方、メチル化シトシンを有する標的領域に対応する増幅DNAは、泳動速度が早く、変性剤濃度勾配ゲルの陽極に近い側に位置することとなる。従って、当該泳動の違いにより、メチル化シトシンを有する標的領域と非メチル化シトシンを有する標的領域とを判断でき、標的領域におけるメチル化パターン又は連続性を評価することができる。

さらに、電気泳動後の変性剤濃度勾配ゲルから目的のバンドを切り出し、バンド中の増幅DNAを抽出し、当該抽出した増幅DNAの塩基配列を決定することで、DNAメチル化の状態を一塩基レベルで評価することもできる。

以上に説明した MSE 法によれば、DNA メチル化を効率的に且つ簡便に検出できる。DNA メチル化は、例えば組織特異的な遺伝子発現、刷り込み、X 染色体の不活性化、癌化等の様々な現象において重要な役割を担っており、また DNA メチル化酵素遺伝子や DNA メチル化状態の異常に起因する先天的又は後天的疾患、クローン動物における DNA メチル化の異常が知られている。従って、DNA メチル化が関与する疾患等の診断に MSE 法を有効に利用することができる。

また、MSE 法は、従来の DNA メチル化検出方法と比べて以下のような利点を有する。

従来、エピジェネティクスな領域で多用されている MSP 法は、視覚的に DNA メチル化を評価できる。MSP 法におけるメチル化検出は、プライマーを設計した CpG 部位に依存する。そのため、標的領域中の CpG 部位のメチル化パターンが均一な場合には高い解像度で評価を行うことができるものの、モザイク状の場合、そのメチル化解析の解像度が低下してしまう。また、リアルタイム MSP 法におけるメチル化検出は、プローブを設計した CpG 部位に依存しているため、評価可能な標的領域が狭く、MSP 法と同様に標的領域中の CpG 部位のメチル化パターンがモザイク状の場合には解像度が落ちる。一方、MSE 法は、増幅した標的領域において、CpG 部位のメチル化パターン全てを視覚的に評価することができる。

また、Bisulfite-sequencing 法では、増幅した標的領域を TA クローニングにより配列決定を行う。しかしながら、当該方法では、「確からしさ」を得るために、10 クローン以上が必要であり、時間を要する。また、メチル化パターンの多数を決定するためには低コストで評価できるが、少数のメチル化パターンの評価には向かない。一方、MSE 法は、PCR における増幅数(サイクル数)を増やすことで、マイナーなメチル化パターンも評価することができる。また、電気泳動後に個々のバンドを切り出し、精製し、当該バンド中の標的領域の配列決定を行うことで、メチル化パターンについて配列を確認することができ、Bisulfite-sequencing 法と同等の評価を全ての配列で行うことができる。

さらに、MassARRAY 法は、個々の CpG のメチル化を評価するには定量性、解像度ともに優れた方法である。しかしながら、CpG メチル化パターンの決定を行うことができない。従って、CpG メチル化パターンが標的領域中に混在する場合に

は、MassARRAY 法での評価は難しい。一方、MSE 法は、MassARRAY 法と同等の検出感度を有し、メチル化パターンの評価を行うことができる。

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1〕MSE 法を用いたムチンコアタンパク質 1 (MUC1) 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析

本実施例では、MSE 法を使用して、ヒト MUC1 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化を解析した。図 1 は、ヒト MUC1 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域の配列(配列番号 2 ;ただし、Bisulfite 処理後の DNA 配列であり、且つ非メチル化シトシンから変換されたウラシルをチミンで表示する)を示す。当該領域は、CpG 部位 172-181 を有する。本実施例では、当該 CpG 部位を含む領域を標的領域とする。なお、論文(Norishige Yamada, Yukari Nishida, Hideaki Tsutsumida, Tomofumi Hamada, Masamichi Goto, Michiyo Higashi, Mitsuharu Nomoto and Suguru Yonezawa (2008) MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3-K9 modification in cancer cells. Cancer Res., 68(8): 2708-16)と同様に、CpG 部位の番号は、ヒト MUC1 遺伝子の推定プロモーター上流(当該遺伝子の転写開始点より上流 2,753bp)より順にナンバリングされている。

1-1. サンプル作製及び方法

各細胞株(HPAF II(ヒト膵癌由来)、BxPC3(ヒト膵癌由来)、PANC1(ヒト膵癌由来)、MCF-7(ヒト乳癌由来)、T-47D(ヒト乳癌由来)、MDA-MB-453(ヒト乳癌由来)、Caco2(ヒト結腸腺癌由来)、LS174T(ヒト大腸癌由来)、A427(ヒト肺癌由来)及びNCI-H292(ヒト肺癌由来))から DNA を、DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN 社製)を使用して抽出した。

次いで、EpiTect Bisulfite Kits(QIAGEN 社製)を使用して、抽出した DNA を Bisulfite 処理に供した。

Bisulfite 処理後の DNA を、以下のプライマーを使用した PCR に供した。

プライマーセット(小文字の塩基配列は GC clamp である)：

Primer 1-1: 5'-AAAGGGGGAGGTTAGTTGGA-3' (配列番号 3)；

Primer 1-2: 5'-AAACAACCCACTCCCCACCT-3' (配列番号 4);

Primer 1-3:

5'-cgcccgccgcgcgcgcgggcgggcgggggcgggggcacggggggAAGAGGTAGGAGGTAGGGGA-3' (配列番号 5);

Primer 1-4: 5'-AAAACAAAACAAATTCAAAC-3' (配列番号 6)。

各 PCR は、図 1 に示すように、1st PCR は上記 Primer 1-1 と Primer 1-2 を用いて、2nd PCR(nested PCR)は上記 Primer 1-3 と Primer 1-4 を用いて行った。ポリメラーゼは、AmpliTaQ Gold(登録商標)Fast PCR Master Mix(Applied Biosystem 社製)を使用した。PCR 条件及び温度設定を下記表 1 に示す。

表 1

1 st PCR 反応液組成		2 nd PCR 反応液組成	
Bisulfite 処理後 DNA	1 μ l	1 st PCR amplicon	2 μ l
Master Mix	10 μ l	Master Mix	10 μ l
Primer 1-1	0.3 μ l	Primer 1-3	0.3 μ l
Primer 1-2	0.3 μ l	Primer 1-4	0.3 μ l
dH ₂ O	8.4 μ l	dH ₂ O	7.4 μ l
総量	20 μ l	総量	20 μ l

1 st PCR 温度設定		2 nd PCR 温度設定	
95°C	10 分	95°C	10 分
96°C	5 秒	96°C	5 秒
63°C	5 秒	53°C	5 秒
68°C	9 秒	68°C	9 秒
72°C	10 秒	72°C	10 秒

次いで、下記表 2 に示す DGGE ゲル条件下の変性剤濃度勾配ゲルを使用し、2nd PCR 後の反応液を DGGE に供した。なお、電気泳動条件は、泳動槽温度：60°C、定電圧：230V、泳動時間：300 分であった。電気泳動槽は、Dcode システム(BIO-RAD 社製)を使用した。

表 2

DGGE ゲル条件

10% アクリルアミドゲル

変性剤濃度勾配：30%-----40%

30%変性剤ゲル組成

40% stock solution	3.0ml
50×TAE buffer	0.3ml
Urea	1.88g
Formamide	1.8ml

40%変性剤ゲル組成

40% stock solution	3.0ml
50×TAE buffer	0.3ml
Urea	2.51g
Formamide	2.4ml

40% stock solution: BIO-RAD, 40(w/v)%-Acrylamide/Bis Mixed Solution(37.5:1);

50X TAE buffer: nacalai tesque, Tris-Acetate-EDTA Buffer(50x);

Urea: nacalai tesque, SP grade;

Formamide: nacalai tesque, SP grade

1-2. 解析結果

各細胞株における解析結果を図2に示す。(A)のパネルは、MassARRAY法による各細胞株のヒト MUC1 遺伝子プロモーターの発現に關与するメチル化領域におけるメチル化の評価を示す。MassARRAY法は、論文 (Norishige Yamada, Yukari Nishida, Hideaki Tsutsumida, Tomofumi Hamada, Masamichi Goto, Michiyo Higashi, Mitsuharu Nomoto and Suguru Yonezawa (2008) MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3-K9 modification in cancer cells. Cancer Res., 68(8): 2708-16)を参照して同様に行った。緑色から黄色、赤色へのグラデーションは、非メチル化(0%)からメチル化(100%)の程度を示す。四角で囲んだ領域が、本実施例における標的領域の CpG 部位である。一方、(B)のパネルは、本実施例における DGGE 後のゲルの写真である。ゲルにおける変性剤濃度勾配は、電気泳動における陰極から陽極方向へ(パネルにおける上部から底部方向へ)低濃度から高濃度へと勾配をつけている。

図2に示すように、MSE法によるメチル化の評価は、MassARRAY法による評価と高い相関を示した。A427株及びNCI-H292株については、MassARRAY法による評価を行っていないものの、そのメチル化の程度は、MDA-MB-453株やCaco2株と同等であることを容易に示唆することができる。

〔実施例2〕MSE法を用いたムチンコアタンパク質2(MUC2)遺伝子プロモーターの発現に關与するメチル化領域のメチル化解析

本実施例では、MSE法を使用して、ヒト MUC2 遺伝子プロモーターの発現に關与

するメチル化領域のメチル化を解析した。図3は、ヒト MUC2 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域の配列(配列番号7;ただし、Bisulfite 処理後の DNA 配列であり、且つ非メチル化シトシンから変換されたウラシルをチミンで表示する)を示す。当該領域は、CpG 部位 36-43 を有する。本実施例では、当該 CpG 部位を含む領域を標的領域とする。なお、論文(Norishige Yamada, Tomofumi Hamada, Masamichi Goto, Hideaki Tsutsumida, Michiyo Higashi, Mitsuharu Nomoto and Suguru Yonezawa (2006) MUC2 expression is regulated by histone H3 modification and DNA methylation in pancreatic cancer. Int. J. Cancer, 119(8): 1850-7)と同様に、CpG 部位の番号は、ヒト MUC2 遺伝子の推定プロモーター上流(当該遺伝子の転写開始点より上流 1,989bp)より順にナンバリングされている。

2-1. サンプル作製及び方法

実施例1と同様にして、各細胞株(HPAF II、BxPC3、PANC1、MCF-7、T-47D、MDA-MB-453、Caco2、LS174T、A427、NCI-H292 及び ACC3(腺様嚢胞癌由来))から DNA を DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN 社製)を使用して抽出した後、EpiTect Bisulfite Kits(QIAGEN 社製)を使用して、抽出した DNA を Bisulfite 処理に供した。

Bisulfite 処理後の DNA を、以下のプライマーを使用した PCR に供した。

プライマーセット(小文字の塩基配列は GC clamp である):

Primer 2-1: 5'-TTTGGGGTTAGTTTGAAG-3' (配列番号8);

Primer 2-2: 5'-ACCTTCTCAAAATAAAACAACC-3' (配列番号9);

Primer 2-3:

5'-cgcccgccgcgcgcgcgggcgggcgggcgggggcacggggggTTTTAGAGTTTGGGTTTTAG-3' (配列番号10);

Primer 2-4: 5'-TAACCTAAATACCAACACACA-3' (配列番号11)。

各 PCR は図3に示すように、1st PCR は上記 Primer 2-1 と Primer 2-2 を用いて、2nd PCR(nested PCR)は上記 Primer 2-3 と Primer 2-4 を用いて行った。ポリメラーゼは、AmpliTaQ Gold(登録商標)Fast PCR Master Mix(Applied Biosystem 社製)を使用した。PCR 条件及び温度設定を下記表3に示す。

表 3

<u>1st PCR 反応液組成</u>		<u>2nd PCR 反応液組成</u>	
Bisulfite 処理後 DNA	1 μ l	1 st PCR amplicon	2 μ l
Master Mix	10 μ l	Master Mix	10 μ l
Primer 2-1	0.3 μ l	Primer 2-3	0.3 μ l
Primer 2-2	0.3 μ l	Primer 2-4	0.3 μ l
dH ₂ O	8.4 μ l	dH ₂ O	7.4 μ l
総量	20 μ l	総量	20 μ l

<u>1st PCR 温度設定</u>		<u>2nd PCR 温度設定</u>	
95°C	10 分	95°C	10 分
96°C	5 秒	96°C	5 秒
59°C	5 秒	51°C	5 秒
68°C	9 秒	68°C	9 秒
72°C	10 秒	72°C	10 秒

次いで、下記表 4 に示す DGGE ゲル条件下の変性剤濃度勾配ゲルを使用し、2nd PCR 後の反応液を DGGE に供した。なお、電気泳動条件及び電気泳動槽は、実施例 1 と同様であった。

表 4

DGGE ゲル条件
 10%アクリルアミドゲル
 変性剤濃度勾配：20%-----28%

<u>20%変性剤ゲル組成</u>		<u>28%変性剤ゲル組成</u>	
40% stock solution	3.0ml	40% stock solution	3.0ml
50×TAE buffer	0.3ml	50×TAE buffer	0.3ml
Urea	1.25g	Urea	1.76g
Formamide	1.2ml	Formamide	1.7ml

40% stock solution: BIO-RAD, 40(w/v)%-Acrylamide/Bis Mixed Solution(37.5:1);
 50X TAE buffer: nacalai tesque, Tris-Acetate-EDTA Buffer(50x);
 Urea: nacalai tesque, SP grade;
 Formamide: nacalai tesque, SP grade

2-2. 解析結果

各細胞株における解析結果を図 4 に示す。(A)のパネルは、MassARRAY 法による各細胞株のヒト MUC2 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域におけるメチル化の評価を示す。MassARRAY 法は、論文(Norishige Yamada, Tomofumi Hamada, Masamichi Goto, Hideaki Tsutsumida, Michiyo Higashi, Mitsuharu Nomoto and Suguru Yonezawa (2006) MUC2 expression is regulated by histone

H3 modification and DNA methylation in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer*, 119(8): 1850-7)を参照して同様に行った。四角で囲んだ領域が本実施例における標的領域の CpG 部位である。一方、(B)のパネルは、本実施例における DGGE 後のゲルの写真である。ゲルにおける変性剤濃度勾配は、電気泳動における陰極から陽極方向へ(パネルにおける上部から底部方向へ)低濃度から高濃度へと勾配をつけている。

図 4 から判るように、MSE 法による MUC2 プロモーター領域のメチル化評価においても、MassARRAY 法による評価と高い相関を示した。

[実施例 3]MSE 法を用いたムチンコアタンパク質 4(MUC4)遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析

本実施例では、MSE 法を使用して、ヒト MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化を解析した。図 5 は、ヒト MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域の配列(配列番号 1 2 ;ただし、Bisulfite 処理後の DNA 配列であり、且つ非メチル化シトシンから変換されたウラシルをチミンで表示する)を示す。当該領域は、CpG 部位 108-112 を有する。本実施例では、当該 CpG 部位を含む領域を標的領域とする。なお、論文(Norishige Yamada, Yukari Nishida, Hideaki Tsutsumida, Masamichi Goto, Michiyo Higashi, Mitsuharu Nomoto and Suguru Yonezawa (2009) Promoter CpG methylation in cancer cells contributes to regulation of MUC4. *Br. J. Cancer*, 100 (2): 344-51)と同様に、CpG 部位の番号は、ヒト MUC4 遺伝子の推定プロモーター上流(当該遺伝子の転写開始点より上流 3,622bp)より順にナンバリングされている。

3-1. サンプル作製及び方法

実施例 1 と同様にして、各細胞株(HPAF II、BxPC3、PANC1、MCF-7、T-47D、MDA-MB-453、Caco2、LS174T、A427、NCI-H292 及び ACC3)から DNA を DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN 社製)を使用して抽出した後、EpiTect Bisulfite Kits(QIAGEN 社製)を使用して、抽出した DNA を Bisulfite 処理に供した。

Bisulfite 処理後の DNA を、以下のプライマーを使用した PCR に供した。

プライマーセット(小文字の塩基配列は GC clamp である)：

Primer 4-1: 5'-TAGTGGGGTGGGGTTGA-3' (配列番号 1 3)；

Primer 4-2: 5'-AAACACCCAAAAAAGCC-3' (配列番号 1 4);

Primer 4-3:

5'-cgcccgccgcgcgcgcgggcgggcgggggcgggggcgacggggggAGGAGAGAAAAGGGTGATTA-3' (配列番号 1 5);

Primer 4-4: 5'-ACCCAAAAAACCTCCTCCA-3' (配列番号 1 6)。

各 PCR は図 5 に示すように、1st PCR は上記 Primer 4-1 と Primer 4-2 を用いて、2nd PCR (nested PCR) は上記 Primer 4-3 と Primer 4-4 を用いて行った。ポリメラーゼは、AmpliTaQ Gold(登録商標)Fast PCR Master Mix (Applied Biosystem 社製)を使用した。PCR 条件及び温度設定を下記表 5 に示す。

表 5

1 st PCR 反応液組成		2 nd PCR 反応液組成	
Bisulfite 処理後 DNA	1 μ l	1 st PCR amplicon	2 μ l
Master Mix	10 μ l	Master Mix	10 μ l
Primer 4-1	0.3 μ l	Primer 4-3	0.3 μ l
Primer 4-2	0.3 μ l	Primer 4-4	0.3 μ l
dH ₂ O	8.4 μ l	dH ₂ O	7.4 μ l
総量	20 μ l	総量	20 μ l

1 st PCR 温度設定		2 nd PCR 温度設定	
95°C	10 分	95°C	10 分
96°C	5 秒	96°C	5 秒
57°C	5 秒	66°C	5 秒
68°C	9 秒	68°C	9 秒
72°C	10 秒	72°C	10 秒
40 サイクル		45 サイクル	

次いで、下記表 6 に示す DGGE ゲル条件下の変性剤濃度勾配ゲルを使用し、2nd PCR 後の反応液を DGGE に供した。なお、電気泳動条件及び電気泳動槽は、実施例 1 と同様であった。

表 6

DGGE ゲル条件

10% アクリルアミドゲル

変性剤濃度勾配：25%-----45%

25%変性剤ゲル組成

40% stock solution	3.0ml
50×TAE buffer	0.3ml
Urea	1.57g
Formamide	1.5ml

45%変性剤ゲル組成

40% stock solution	3.0ml
50×TAE buffer	0.3ml
Urea	2.82g
Formamide	2.7ml

40% stock solution: BIO-RAD, 40(w/v)%-Acrylamide/Bis Mixed Solution(37.5:1);

50X TAE buffer: nacalai tesque, Tris-Acetate-EDTA Buffer(50x);

Urea: nacalai tesque, SP grade;

Formamide: nacalai tesque, SP grade

3-2. 解析結果

各細胞株における解析結果を図6に示す。(A)のパネルは、MassARRAY法による各細胞株のヒト MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域におけるメチル化の評価を示す。MassARRAY法は、論文(Norishige Yamada, Yukari Nishida, Hideaki Tsutsumida, Masamichi Goto, Michiyo Higashi, Mitsuharu Nomoto and Suguru Yonezawa (2009) Promoter CpG methylation in cancer cells contributes to regulation of MUC4. Br. J. Cancer, 100 (2): 344-51)を参照して同様に行った。四角で囲んだ領域が本実施例における標的領域の CpG 部位である。一方、(B)のパネルは、本実施例における DGGE 後のゲルの写真である。ゲルにおける変性剤濃度勾配は、電気泳動における陰極から陽極方向へ(パネルにおける上部から底部方向へ)低濃度から高濃度へと勾配をつけている。

図6に示すように、MSE法によるメチル化の評価は、MassARRAY法による評価と高い相関を示した。

〔実施例4〕MSE法の検出限界の検討

MSE法の検出限界を検討するために、実施例1におけるヒト MUC1 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析において DNA 高メチル化を呈する細胞株(PANC 1)とDNA低メチル化を呈する細胞株(BxPC3)の細胞数を計測し、比率に応じて混合したものより DNA を抽出し、Bisulfite 処理を行ったものをサンプルとし、そのバンドの検出限界を確認した。サンプルの調製は、BxPC3 細胞株由来の DNA 含有率を 100%から順次 0.1%まで低下させ、最終的に BxPC3 細胞株

由来の DNA を含まず PANC 1 細胞株由来の DNA のみとした。PCR 及び DGGE は、実施例 1 と同様に行った。

結果を図 7 に示す。(A) のパネルは、本実施例における DGGE 後のゲルの写真である。ゲルにおける変性剤濃度勾配は、電気泳動における陰極から陽極方向へ(パネルにおける上部から底部方向へ)低濃度から高濃度へと勾配をつけている。(B) のパネルは、同じサンプルを用いて行った MSP 法によるメチル化解析の結果である。MSP 法は、primer set:MSP-UL(GGGGATTGGTATAAAGTGGTAGGT : 配列番号 17);MSP-UR(AAAACAAAACAATTCAAACAAACA : 配列番号 18);MSP-ML(GATCGGTATAAAGCGGTAGGC : 配列番号 19); 及び MSP-MR(AAAACAAAACAATTCAAACAAACG : 配列番号 20)を用いて、論文(Norishige Yamada, Yukari Nishida, Hideaki Tsutsumida, Tomofumi Hamada, Masamichi Goto, Michiyo Higashi, Mitsuharu Nomoto and Suguru Yonezawa (2008) MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3-K9 modification in cancer cells. Cancer Res., 68(8): 2708-16)を参照して行った。

また、(B) のパネルにおいて「U」は非メチル化を示し、「M」はメチル化を示す。(C) のパネルは、本実施例における非メチル化バンドの発光を ImageJ により数値化し、BxPC3 細胞株由来の DNA 含有率に対してプロットしたグラフである。横軸は BxPC3 細胞株由来の DNA 含有率(%)を示す。

図 7 (A) に示すように、非メチル化のバンドが BxPC3 細胞株由来の DNA 含有率と共に低下しているのが示されている。また、図 7 (B) に示すように、この非メチル化バンドの発光を ImageJ により数値化し、BxPC3 細胞株由来の DNA 含有率に対してプロットすると、その R^2 は 0.993 と非常に高い相関関係を示した。この結果、MSE 法は、0.1%の含有率においても有意に検出することが可能であり、検出限界はこれ以下に存在することを示唆している。

既知のメチル化測定方法における検出限界は、MassARRAY 法で 10%、パイロシーケンス法で 5%であることから、MSE 法は非常に高い精度で検出していると考えられる。

〔実施例 5〕 ヒト大腸の正常粘膜と癌組織における MSE 法によるヒト MUC1、MUC2 及び MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析と

当該遺伝子からの mRNA の発現解析及び免疫組織化学染色によるタンパク質発現解析との比較

ヒト大腸の正常粘膜と癌組織について、間質の混入を来すことなく理想的に分離できるヒト大腸の腺管分離サンプルにおいて、ヒト MUC1(図 8)、MUC2(図 9)及び MUC4(図 10)遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析を実施例 1～3と同様に MSE 法にて行い、またこれら遺伝子の mRNA の発現解析及び免疫組織化学染色によるこれら遺伝子によりコードされるタンパク質の発現確認との比較を行った。

結果を図 8～10に示す。図 8～10において、「N」はヒト大腸正常粘膜サンプルを示し、「T」はヒト大腸癌組織サンプルを示す。(A)のパネルは、RT-PCRにより検出した各サンプルにおける mRNA 発現量を示す。(B)のパネルは、MSE 法による DGGE 後のゲルの写真である。ゲルにおける変性剤濃度勾配は、電気泳動における陰極から陽極方向へ(パネルにおける上部から底部方向へ)低濃度から高濃度へと勾配をつけている。従って、「U」は非メチル化を示し、「M」はメチル化を示す。(C)のパネルは、免疫組織化学染色によるヒト MUC 遺伝子によりコードされるタンパク質の発現を示す写真である。

なお、タンパク質の発現を検索する免疫組織化学染色に際して、MUC1 に関しては、従来の抗 MUC1 抗体である「MUC1-DF3」(TFB 社製)のみでなく、「MUC1 cytoplasmic tail」に対する新規開発の抗 MUC1 抗体(ハイブリドーマ株 MUC1-common (clone 014E)由来(特願 2010-028729、受託番号 NITE P-867);以下、「MUC1-014E」と称する)をも用いた。また、MUC2 に関しては、抗 MUC2 抗体「MUC2-Ccp58」(novo 社製)を使用した。さらに、MUC4 に関しては、N 末端側 subunit に対する抗体である抗 MUC4 抗体「MUC4-8G7」(university of nebraska medical center, omaha)と C 末端側 subunit に対する抗体である抗 MUC4 抗体「MUC4-1G8」(zymed 社製)の双方を用いた。以下の実施例 6～9においても同様の抗体を使用した。

ヒト MUC1、MUC2 及び MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化の程度とこれら遺伝子からの mRNA 及びタンパク質の発現とは概ね逆相関関係を示す。

図 8 に示すように、MUC1 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域に関する MSE 法の結果は、従来の抗 MUC1 抗体である「MUC1-DF3」の染色結果とは一致しないが、RT-PCR による MUC1mRNA の測定値、並びに「MUC1-014E」免疫組織化学染色の結果とは高い相関を示し、ヒト大腸の腺管分離サンプルにおいて MSE 法による MUC1 遺伝子のメチル化解析が可能であることを示すことができた。

図 9 に示すように、MUC2 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域に関する MSE 法の結果は、大腸正常粘膜では、大多数の検体が「低メチル化」であり、RT-PCR による MUC2mRNA の測定値、並びに MUC2 の陽性所見と一致した。一方、癌組織においては、大多数の検体が「低メチル化」であり、RT-PCR による MUC2mRNA の測定値と概ね一致したが、MUC2 の免疫組織化学染色結果とは一致しない例がかなり多く、この所見は、大腸癌組織における MUC2 タンパク質の発現には、MUC2mRNA の発現後の「post-transcriptional」因子の影響があることを示していると考えられる。以上を総合すると、MUC2 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域に関する MSE 法の結果は、MUC2mRNA の発現とは概ね一致しており、MSE 法による MUC2 遺伝子のメチル化解析が可能であることを示すことができた。

図 10 に示すように、MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域に関する MSE 法の結果は、全例において、大腸正常粘膜も大腸癌も「低メチル化」であり、RT-PCR による MUC4mRNA の測定値と一致したが、「MUC4-8G7」の免疫組織化学染色結果とは一致する例と一致しない例があり、この所見は、大腸癌組織における MUC4 タンパク質の発現には、MUC4mRNA の発現後の「post-transcriptional」因子の影響があることを示していると考えられる。以上を総合すると、MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域に関する MSE 法の結果は、MUC4mRNA の発現とは完全に一致しており、MSE 法による MUC4 遺伝子のメチル化解析が可能であることを示すことができた。

図 8 ～ 10 に示すように、MSE 法において、低メチル化を呈したサンプル全てにおいて、mRNA の高発現を示した。さらに、メチル化の程度は、タンパク質の発現とも高い相関を示した。従って、ヒト大腸の腺管分離サンプルにおいても MSE 法によるメチル化解析が可能であると考えられる。

〔実施例 6〕 ヒト手術症例サンプルにおける MSE 法によるヒト MUC1、MUC2 及び

MUC4 遺伝子プロモーターの発現に關与するメチル化領域のメチル化解析と免疫組織化学染色による当該遺伝子によりコードされるタンパク質の発現解析との比較

大腸癌及び膵癌のヒト手術症例標本の腫瘍部と正常組織から得られたサンプルにおいて、ヒト MUC1(図 1 1)、MUC2(図 1 2)及び MUC4(図 1 3)遺伝子プロモーターの発現に關与するメチル化領域のメチル化解析を実施例 1～3 と同様に MSE 法にて行い、またこれら遺伝子によりコードされるタンパク質の発現を免疫組織化学染色によって確認し、比較を行った。

結果を図 1 1～1 3 に示す。図 1 1～1 3 において、「N」は正常組織サンプルを示し、「T」は癌組織サンプルを示す。(A)のパネルは、MSE 法による DGGE 後のゲルの写真である。ゲルにおける変性剤濃度勾配は、電気泳動における陰極から陽極方向へ(パネルにおける上部から底部方向へ)低濃度から高濃度へと勾配をつけている。従って、「U」は非メチル化を示し、「M」はメチル化を示す。(B)のパネルは、免疫組織化学染色によるヒト MUC 遺伝子によりコードされるタンパク質の発現を示す写真である。

図 1 1 に示すように、MUC1 遺伝子プロモーターの発現に關与するメチル化領域に關する MSE 法の結果は、従来の抗 MUC1 抗体である「MUC1-DF3」の染色結果と、正常組織においては一致せず、腫瘍部でも一致しないことがあったが、MUC1 の mRNA 発現を反映すると考えられる「MUC1-014E」の染色性とは高い相関を示し、ヒト手術症例サンプルにおいて MSE 法による MUC1 遺伝子のメチル化解析が可能であることを示すことができた。

図 1 2 に示すように、MUC2 遺伝子プロモーターの発現に關与するメチル化領域に關する MSE 法の結果は、一部の大腸癌組織において不一致例をみたが、概ね高い相関を示し、常に MUC2 が陽性である大腸正常粘膜では、図 9 の腺管分離サンプルの場合と同様全例「低メチル化」であり、常に MUC2 が陰性である膵正常組織においては全例「高メチル化」、MUC2 が陰性の膵癌組織でも「高メチル化」であったが、例外的に癌腺管の一部が腸上皮化生をきたした膵癌組織では「低メチル化」バンドも観察され、ヒト手術症例サンプルにおいて MSE 法による MUC2 遺伝子のメチル化解析が可能であることを示すことができた。

図 1 3 に示すように、MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域に関する MSE 法の結果は、N 末端側 subunit に対する抗体である「MUC4-8G7」と C 末端側 subunit に対する抗体である「MUC4-1G8」の双方による免疫組織化学染色を総合した結果と高い相関を示し、ヒト手術症例サンプルにおいて MSE 法による MUC4 遺伝子のメチル化解析が可能であることを示すことができた。

〔実施例 7〕 ヒトの膵嚢胞性腫瘍の嚢胞内液サンプルと膵癌症例から得られた膵液サンプルにおける MSE 法によるヒト MUC1、MUC2 及び MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析と免疫組織化学染色による当該遺伝子によりコードされるタンパク質の発現解析との比較

ヒトの膵嚢胞性腫瘍である膵管内乳頭粘液性腫瘍・腸型 (IPMN-intestinal) 手術症例の嚢胞内液サンプル又は膵癌 (PDAC) 症例から逆行性膵管造影時に得られた膵液サンプルにおいて、ヒト MUC1、MUC2 及び MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析を実施例 1 ～ 3 と同様に MSE 法にて行い、また由来する腫瘍組織におけるこれら遺伝子によりコードされるタンパク質の発現を免疫組織化学染色によって検索し、比較を行った。

結果を図 1 4 に示す。図 1 4 において、(A) のパネルは、MSE 法による DGGE 後のゲルの写真である。ゲルにおける変性剤濃度勾配は、電気泳動における陰極から陽極方向へ (パネルにおける上部から底部方向へ) 低濃度から高濃度へと勾配をつけている。従って、「U」は非メチル化を示し、「M」はメチル化を示す。(B) のパネルは、免疫組織化学染色によるヒト MUC 遺伝子によりコードされるタンパク質の発現を示す写真である。

図 1 4 の左パネルに示すように、MUC1 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域に関する MSE 法の結果は、IPMN-intestinal と PDAC の双方において「低メチル化」であり、従来の抗 MUC1 抗体である「MUC1-DF3」の染色結果とは一致しない場合でも、MUC1 の mRNA 発現を反映すると考えられる「MUC1-014E」が陽性の染色結果とは相関を示した。

図 1 4 の中央パネルに示すように、MUC2 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域に関する MSE 法の結果は、IPMN-intestinal において「低メチル化」であり、MUC2 陽性の染色結果と一致していたが、PDAC における「低メチル化」が

主体である結果は MUC2 陰性の染色結果と一致しなかった。

図 1 4 の右パネルに示すように、MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域に関する MSE 法の結果は、IPMN-intestinal において「低メチル化」から「高メチル化」にわたり、多くのバンドが認められ、「MUC4-8G7」の陽性と陰性が混じり合った免疫組織化学染色と相関を示した。PDAC における「低メチル化」の結果は、「MUC4-1G8」の陽性の染色結果と一致していた。

以上の結果から、ヒトの膵嚢胞性腫瘍 (IPMN-intestinal) の嚢胞内液サンプルや膵癌症例から得られた膵液サンプルにおいても MSE 法によるメチル化解析が有用である可能性が示された。

〔実施例 8〕 ヒトの膵嚢胞性腫瘍の嚢胞内液サンプルと膵癌症例から得られた膵液サンプルにおける MSE 法によるヒト MUC1、MUC2 及び MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析と免疫組織化学染色による当該遺伝子によりコードされるタンパク質の発現解析との比較

ヒトの膵管内乳頭粘液性腫瘍・胃型 (IPMN-gastric) 手術症例の嚢胞内液サンプルにおいて、ヒト MUC1、MUC2 及び MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析を実施例 1 ～ 3 と同様に MSE 法にて行い、由来する腫瘍組織におけるこれら遺伝子によりコードされるタンパク質の発現を免疫組織化学染色によって検索し、比較を行った。なお、PDAC についての結果は、図 1 4 と同一のものである。

結果を図 1 5 に示す。図 1 5 において、(A) のパネルは、MSE 法による DGGE 後のゲルの写真である。ゲルにおける変性剤濃度勾配は、電気泳動における陰極から陽極方向へ (パネルにおける上部から底部方向へ) 低濃度から高濃度へと勾配をつけている。従って、「U」は非メチル化を示し、「M」はメチル化を示す。(B) のパネルは、免疫組織化学染色によるヒト MUC 遺伝子によりコードされるタンパク質の発現を示す写真である。

図 1 5 の左パネルに示すように、MUC1 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域に関する MSE 法の結果は、IPMN-gastric において「低メチル化」と「高メチル化」のバンドが認められ、「MUC1-014E」が陽性の染色結果とは、「低メチル化」のバンドは相関を示したが、「高メチル化」のバンドは相関を示さなかった。

図 15 の中央パネルに示すように、MUC2 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域に関する MSE 法の結果は、IPMN-gastric において「高メチル化」であり、MUC2 陰性の染色結果と一致していた。

図 15 の右パネルに示すように、MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域に関する MSE 法の結果は、IPMN-gastric において「高メチル化」であり、「MUC4-8G7」と「MUC4-1G8」の双方とも陰性の染色結果と一致していた。

以上の結果から、ヒトの膵嚢胞性腫瘍(IPMN-gastric)の嚢胞内液サンプルや膵癌症例から得られた膵液においても MSE 法によるメチル化解析が有用である可能性が示された。

〔実施例 9〕ヒトの胆管嚢胞性腫瘍の嚢胞内液サンプルと肝外胆管癌(EHBDC)の胆汁サンプルにおける MSE 法によるヒト MUC1、MUC2 及び MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析と免疫組織化学染色による当該遺伝子によりコードされるタンパク質の発現解析との比較

ヒトの粘液産生性胆管腫瘍・円柱細胞型(MPBT-columnar)手術症例の嚢胞内液サンプル又は肝外胆管癌(EHBDC)の胆嚢管浸潤症例の胆嚢内胆汁サンプルにおいて、ヒト MUC1、MUC2 及び MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析を実施例 1～3 と同様に MSE 法にて行い、また由来する腫瘍組織におけるこれら遺伝子によりコードされるタンパク質の発現を免疫組織化学染色によって確認し、比較を行った。

結果を図 16 に示す。図 16 において、(A)のパネルは、MSE 法による DGGE 後のゲルの写真である。ゲルにおける変性剤濃度勾配は、電気泳動における陰極から陽極方向へ(パネルにおける上部から底部方向へ)低濃度から高濃度へと勾配をつけている。従って、「U」は非メチル化を示し、「M」はメチル化を示す。(B)のパネルは、免疫組織化学染色によるヒト MUC 遺伝子によりコードされるタンパク質の発現を示す写真である。

図 16 の左パネルに示すように、MUC1 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域に関する MSE 法の結果は、MPBT-columnar において「低メチル化」であったが、由来する腫瘍組織の「MUC1-DF3」と「MUC1-014E」の双方とも陰性の染色結果とは相関を示さなかった。一方、EHBDC においては「低メチル化」のバン

ドは、由来する腫瘍組織の「MUC1-DF3」と「MUC1-014E」の双方とも陽性の染色結果と一致したが、「高メチル化」に近いバンドも認められた。

図16の中央パネルに示すように、MUC2 遺伝子プロモーターの発現に關与するメチル化領域に關する MSE 法の結果は、MPBT-columnar においては「低メチル化」であり MUC2 陽性の染色結果と一致し、EHBDC においては「高メチル化」であり MUC2 陰性の染色結果と一致した。

図16の右パネルに示すように、MUC4 遺伝子プロモーターの発現に關与するメチル化領域に關する MSE 法の結果は、MPBT-columnar においては「低メチル化」であり「MUC4-8G7」と「MUC4-1G8」の双方の免疫組織化学染色の陽性部分と相関を示した。EHBDC においては「低メチル化」から「高メチル化」にわたり多くのバンドが認められ、「MUC4-8G7」と「MUC4-1G8」の陽性と陰性が混じり合った免疫組織化学染色と相関を示した。

以上の結果から、ヒトの胆管嚢胞性腫瘍(MPBT-columnar)の嚢胞内液サンプルや肝外胆管癌から得られた胆汁サンプルにおいても、一部に不一致はあるものの、MSE 法によるメチル化解析が有用である可能性が示された。

〔実施例10〕ホルマリン固定時間及びパラフィン包埋時間による DNA メチル化への影響に關する MSE 法による評価

本実施例では、ホルマリン固定時間及びパラフィン包埋時間による DNA メチル化への影響が、MSE 法にて詳細に解明できることを示す。

ホルマリン固定パラフィン包埋病理標本は保存性に優れ、過去の症例についての遺伝子検索も可能であるため、ホルマリン固定パラフィン包埋病理標本のマイクロディセクション標本等を用いた遺伝子解析も盛んに行われるようになってきている。しかしながら、ホルマリン固定時間やパラフィン包埋により、DNA メチル化に変化が起きてしまわないか否かの検討は十分にはなされていない。

そこで、ホルマリン固定時間及びパラフィン包埋時間による DNA メチル化への影響を MSE 法および MSP 法により解析を行った。これまでの分析でムチンに關し、発現状況と DNA メチル化の解析結果のデータの蓄積があるヒト大腸の正常粘膜組織をサンプルとして用い、各ムチン(MUC1、MUC2 及び MUC4)の遺伝子プロモーターの発現に關与するメチル化領域のメチル化解析を実施例1～3と同様に MSE 法に

て行った。

MUC1 に関する MSP 法は、primer set:MSP-UL(GGGGATTGGTATAAAGTGGTAGGT : 配列番号 17);MSP-UR(AAAACAAAACAATTCAAACAAACA : 配列番号 18);MSP-ML(GATCGGTATAAAGCGGTAGGC : 配列番号 19); 及び MSP-MR(AAAACAAAACAATTCAAACAAACG : 配列番号 20)を用いて、論文(Norishige Yamada, Yukari Nishida, Hideaki Tsutsumida, Tomofumi Hamada, Masamichi Goto, Michiyo Higashi, Mitsuharu Nomoto and Suguru Yonezawa (2008) MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3-K9 modification in cancer cells. Cancer Res., 68(8): 2708-16)を参照して行った。

MUC2 に関する MSP 法は、primer set:MSP-UL(GTTGTTTTATTTTGAAGAAGGTTGTG : 配列番号 21);MSP-UR(TAACAAAAACAATATAAATTACACCCAAA : 配列番号 22);MSP-ML(GTTGTTTTATTTTGAAGAAGGTTGC : 配列番号 23); 及び MSP-MR(CGATATAAATTACGCCCGAA : 配列番号 24)を用いて、論文(Norishige Yamada, Tomofumi Hamada, Masamichi Goto, Hideaki Tsutsumida, Michiyo Higashi, Mitsuharu Nomoto and Suguru Yonezawa (2006) MUC2 expression is regulated by histone H3 modification and DNA methylation in pancreatic cancer. Int. J. Cancer, 119(8): 1850-7)を参照して行った。

さらに、MUC4 に関する MSP 法は、primer set:MSP-UL(GGTGATTAGTGTGGGGTTTTG : 配列番号 25);MSP-UR(CCAAACCAAATACATTTCTCCAA : 配列番号 26);MSP-ML(GGTGATTAGCGTGGGGTTTC : 配列番号 27); 及び MSP-MR(CGAACCAAATACGTTTCTCCG : 配列番号 28)を用いて、論文(Norishige Yamada, Yukari Nishida, Hideaki Tsutsumida, Masamichi Goto, Michiyo Higashi, Mitsuharu Nomoto and Suguru Yonezawa (2009) Promoter CpG methylation in cancer cells contributes to regulation of MUC4. Br. J. Cancer, 100 (2): 344-51)を参照して行った。

図 17 に示すように、ヒト大腸の正常粘膜組織を、ホルマリン固定の時間を区切って最長 140 時間まで行った。一方、ホルマリン固定を 24 時間あるいは 48 時間行った後、パラフィン包埋を行い、全てのサンプルについて MSE 法及び MSP 法により解析を行った。結果を図 17 に示す。MSE 法において、ゲルにおける変性

剤濃度勾配は、電気泳動における陰極から陽極方向へ（パネルにおける左側から右側方向へ）低濃度から高濃度へと勾配をつけている。「U」は非メチル化を示し、「M」はメチル化を示す。また、MSP のパネルにおいて「U」は非メチル化を示し、「M」はメチル化を示す。

(1) ホルマリン固定時間による DNA メチル化への影響

MSE 法による解析において、MUC1 及び MUC4 遺伝子の標的領域に対しては、140 時間までのホルマリン固定による影響は示されなかった。一方、MUC2 遺伝子の標的領域に対しては、116 時間までのホルマリン固定では影響は認められなかったが、140 時間のホルマリン固定後のサンプルにおいて、「低メチル化」を呈すバンドの消失が示された。

MSP 法による解析においては、MSE 法で示されたような詳細なホルマリン固定パラフィン包埋の影響を解析することが出来なかった。

この結果より、ホルマリン固定後のサンプルにおいて DNA メチル化解析を行う場合には、標的領域の処理時間における影響の検討が必要であることが示された。

(2) ホルマリン固定後パラフィン包埋による DNA メチル化への影響

24 時間あるいは 48 時間にわたりホルマリン固定後パラフィンに包埋したサンプルにおける、各ムチンの遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析を行った。パラフィン包埋後直ちに脱パラフィンを行い DNA の精製を行ったサンプルに限っては、標的領域にメチル化の変化は生じていなかった。

しかし、パラフィン包埋後 116 時間あるいは 140 時間にわたり室温にて放置したパラフィンブロックから得られたサンプルにおける MSE 法による解析で、MUC1 及び MUC4 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域では「高メチル化」を呈すバンドの消失を確認でき、また、MUC2 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域では、「低メチル化」を呈すバンドの消失を確認することができた。

同様の解析を MSP 法で行った場合、安定した結果を得られず、MSE 法で示されたような詳細なホルマリン固定パラフィン包埋の影響を解析することが出来なかった。

この結果より、ホルマリン固定後パラフィン包埋したサンプルにおいても、メチル化の解析を行う場合には、標的領域への経時変化の影響の検討が必要である

ことが示された。

以上の結果は、安易に、長期保存されているホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて DNA メチル化解析を行うことへの警鐘となる。

以上の実施例 5～9 に示す結果より、MSE 法は、ヒト由来の手術摘出サンプルや唾液・胆汁のような体液にも応用できることを示すものであり、実際に、ヒト癌の早期診断に役立つ可能性があると考えられる。また、実施例 10 に示すように、MSE 法は、従来の MSP 法等ではその実態が分からなかったサンプルのホルマリン固定やパラフィン包埋による DNA メチル化への影響をも明らかにできる。

〔実施例 11〕MSE 法を用いたムチンコアタンパク質 5AC (MUC5AC) 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化解析

本実施例では、MSE 法を使用して、ヒト MUC5AC 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域のメチル化を解析した。図 18 は、ヒト MUC5AC 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域の配列 (配列番号 29 ; ただし、Bisulfite 処理後の DNA 配列であり、且つ非メチル化シトシンから変換されたウラシルをチミンで表示する) を示す。図 18 において、四角で囲まれた太字の TG はヒト MUC5AC 遺伝子プロモーターの発現に重要な CpG 部位を示し、四角で囲まれた TG はそれ以外の CpG 部位を示す。また、斜体の T は、Bisulfite 処理により C が T に変換されたものを示す。

11-1. サンプル作製及び方法

実施例 1 と同様にして、各細胞株 (MCF-7、T-47D、MDA-MB-453、NCI-H292、A427、BxPC3、HPAF II、PANC1、LS174T、及び Caco2) から DNA を DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社製) を使用して抽出した後、EpiTect Bisulfite Kits (QIAGEN 社製) を使用して、抽出した DNA を Bisulfite 処理に供した。

Bisulfite 処理後の DNA を、以下のプライマーを使用した PCR に供した。

プライマーセット (小文字の塩基配列は GC clamp である) :

Primer 5-1: 5'-AAAGTTTGGGTGTGTGGAG-3' (配列番号 30) ;

Primer 5-2: 5'-ATCAATATCCAACCCCAAC-3' (配列番号 31) ;

Primer 5-3:

5'-cgcccgccgcgcgcgcgcgcgggcgggcgggcgggggcacggggggTTTATGTTTAGGGGTTTGG-3' (配列

番号 3 2) ;

Primer 5-4: 5'-ACCAACTAACCACCCAAACC-3' (配列番号 3 3)。

各 PCR は図 1 8 に示すように、1st PCR は上記 Primer 5-1 と Primer 5-2 を用いて、2nd PCR (nested PCR) は上記 Primer 5-3 と Primer 5-4 を用いて行った。ポリメラーゼは、AmpliTaQ Gold(登録商標)Fast PCR Master Mix(Applied Biosystem 社製)を使用した。さらに、PCR 条件及び温度設定を下記表 7 に示す。

表 7

<u>1st PCR 反応液組成</u>		<u>2nd PCR 反応液組成</u>	
Bisulfite 処理後 DNA	1 μ l	1 st PCR amplicon	2 μ l
Master Mix	10 μ l	Master Mix	10 μ l
Primer 5-1	0.3 μ l	Primer 5-3	0.3 μ l
Primer 5-2	0.3 μ l	Primer 5-4	0.3 μ l
dH ₂ O	8.4 μ l	dH ₂ O	7.4 μ l
総量	20 μ l	総量	20 μ l

<u>1st PCR 温度設定</u>		<u>2nd PCR 温度設定</u>	
95°C	10 分	95°C	10 分
96°C	5 秒	96°C	5 秒
62°C	5 秒	62°C	5 秒
68°C	9 秒	68°C	9 秒
72°C	10 秒	72°C	10 秒

次いで、下記表 8 に示す DGGE ゲル条件下の変性剤濃度勾配ゲルを使用し、2nd PCR 後の反応液を DGGE に供した。なお、電気泳動条件は、泳動槽温度：60°C、定電圧：230V、泳動時間：300 分であった。電気泳動槽は、Dcode システム(BIO-RAD 社製)を使用した。

表 8

DGGE ゲル条件

10%アクリルアミドゲル

変性剤濃度勾配：30%-----40%

<u>30%変性剤ゲル組成</u>		<u>40%変性剤ゲル組成</u>	
40% stock solution	3.0ml	40% stock solution	3.0ml
50×TAE buffer	0.3ml	50×TAE buffer	0.3ml
Urea	1.88g	Urea	2.51g
Formamide	1.8ml	Formamide	2.4ml

40% stock solution: BIO-RAD, 40(w/v)%-Acrylamide/Bis Mixed Solution(37.5:1);

50X TAE buffer: nacalai tesque, Tris-Acetate-EDTA Buffer(50x);

Urea: nacalai tesque, SP grade;

Formamide: nacalai tesque, SP grade

11-2. 解析結果

各細胞株における解析結果を図 19 に示す。(A)のパネルは、MassARRAY 法による各細胞株のヒト MUC5AC 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域におけるメチル化の評価を示す。四角で囲んだ領域が本実施例における標的領域の CpG 部位である。一方、(B)のパネルは、本実施例における DGGE 後のゲルの写真である。ゲルにおける変性剤濃度勾配は、電気泳動における陰極から陽極方向へ(パネルにおける上部から底部方向へ)低濃度から高濃度へと勾配をつけている。

図 19 に示すように、MSE 法によるメチル化の評価は、MassARRAY 法による評価と高い相関を示した。MUC5AC 遺伝子において、(A)のパネルにおける左側の四角で囲んだ領域のように、-3,700 付近のかなり上流のメチル化状態と、mRNA に相関があることを見出し、Pyrosequence と MSE によりそれを確認し、全てが一致していた。なお、ヒストンの修飾も、この上流領域において MUC5AC 遺伝子発現に関与していた。

〔比較例 1〕 Bisulfite-DGGE 法と MSE 法との比較

従来法である Bisulfite-DGGE 法により作製したサンプルと MSE 法により作製したサンプルとの比較を行った。なお、DGGE では、変性剤のみの濃度勾配アクリルアミドゲルを使用した。DNA メチル化評価の対象は、実施例 1 と同様にヒト MUC1 遺伝子プロモーターの発現に関与するメチル化領域である。

Bisulfite-DGGE 法では、サンプルは、実施例 1 に記載の上記プライマーセットの Primer 1-3 と Primer 1-4 を用いて nested PCR を行わずに通常の PCR のみを行い、作製した。PCR 反応液組成及び温度設定は、表 1 に記載の 1stPCR に準じたものである。

一方、MSE 法では、サンプルは、実施例 1 と同様にして作製した。

結果を図 20 に示す。(A) のパネルが Bisulfite-DGGE 法による DGGE 後のゲルの写真である。(B) のパネルが MSE 法による DGGE 後のゲルの写真である。ゲルにおける変性剤濃度勾配は、電気泳動における陰極から陽極方向へ(パネルにおける上部から底部方向へ)低濃度から高濃度へと勾配をつけている。

図 20 に示すように、Bisulfite-DGGE 法では、Bisulfite 処理に起因する非特異的増幅や目的外領域の増幅により正確な解析が行うことができなかった。あるいは、極少量のサンプル量に起因し、PCR の増幅が十分でないためにバンドが検出できなかった。一方、MSE 法では、安定した解析結果を呈した。

また、Bisulfite-DGGE 法と MSE 法との比較として、細胞株(図 21)、組織サンプル(図 22)及び体液サンプル(図 23)について、DGGE 後のゲルの写真におけるバンドの発光強度を Image J により計測し、算出した。図 21～23 において、(A) のパネルが MSE 法に関する結果であり、(B) のパネルが Bisulfite-DGGE 法に関する結果である。

また、Bisulfite-DGGE 法と MSE 法との検出力の比較結果を下記の表 9 に示す。表 9 においては、バンド発光強度の比率を、(MSE 法による発光強度 / Bisulfite-DGGE 法による発光強度) の値として算出した。

表 9

バンド発光強度の比率 (MUC1 解析)

細胞株 サンプル	8.0	42.4	25.1	10.4	11.0	104.6	10.7	64.3	50.9	13.0	平均	34.0
組織 サンプル	39.9	32.5	68.7								平均	47.0
体液 サンプル	18.7	76.3	30.0	86.3							平均	52.8
											全体平均	44.6

図 2 1 ~ 2 3 及表 9 に示すように、MSE 法は、Bisulfite-DGGE 法と比較して、細胞株サンプルで平均 34 倍、組織サンプルで平均 47 倍、体液サンプルで平均 53 倍の検出力を示した。従って、MSE 法は、Bisulfite-DGGE 法と比較して全体で平均 45 倍 (最高 105 倍) の検出力を示した。双方の解析方法で検出可能なバンドにおいても、MSE 法は、Bisulfite-DGGE 法よりも高い検出力を示した。

産業上の利用可能性

本発明によれば、微量の DNA サンプルであっても DNA メチル化を検出でき、また DNA メチル化パターン又は連続性を検出できる。

また、本発明に係る DNA メチル化検出方法は、エピジェネティクス等のライフサイエンス分野において有効に利用することができる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1. DNA を重亜硫酸塩処理に供する工程と、
標的領域の外側の領域に対応する第 1 プライマーセットを用いて重亜硫酸塩処理後の DNA を第 1 の PCR に供する工程と、
標的領域に対応する第 2 プライマーセットを用いて第 1 の PCR 後の増幅 DNA を第 2 の PCR に供する工程と、
第 2 の PCR 後の増幅 DNA を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動に供する工程と、
を含み、第 2 プライマーセットのプライマーのアニーリング位置は、標的領域に対して第 1 プライマーセットのプライマーのアニーリング位置の内側に存在する、DNA メチル化検出方法。
2. 第 2 プライマーセットの一方のプライマーは、5' 側に GC-clamp 配列を有する、請求項 1 記載の方法。
3. 変性剤濃度勾配ゲルが濃度勾配として変性剤濃度勾配のみを有する、請求項 1 記載の方法。

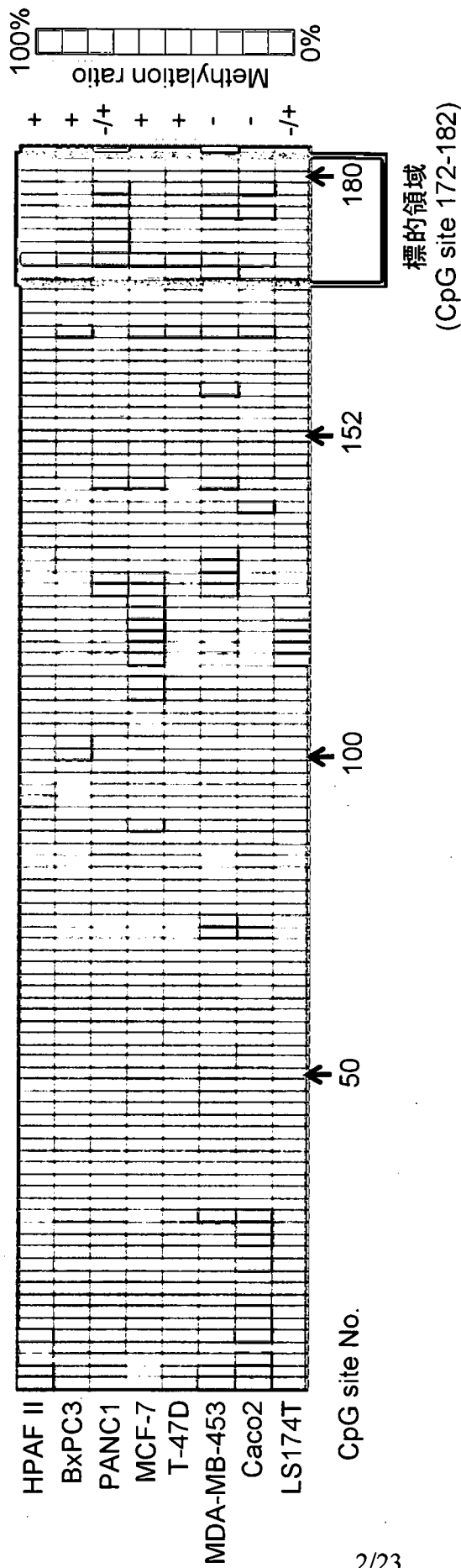
1

-400

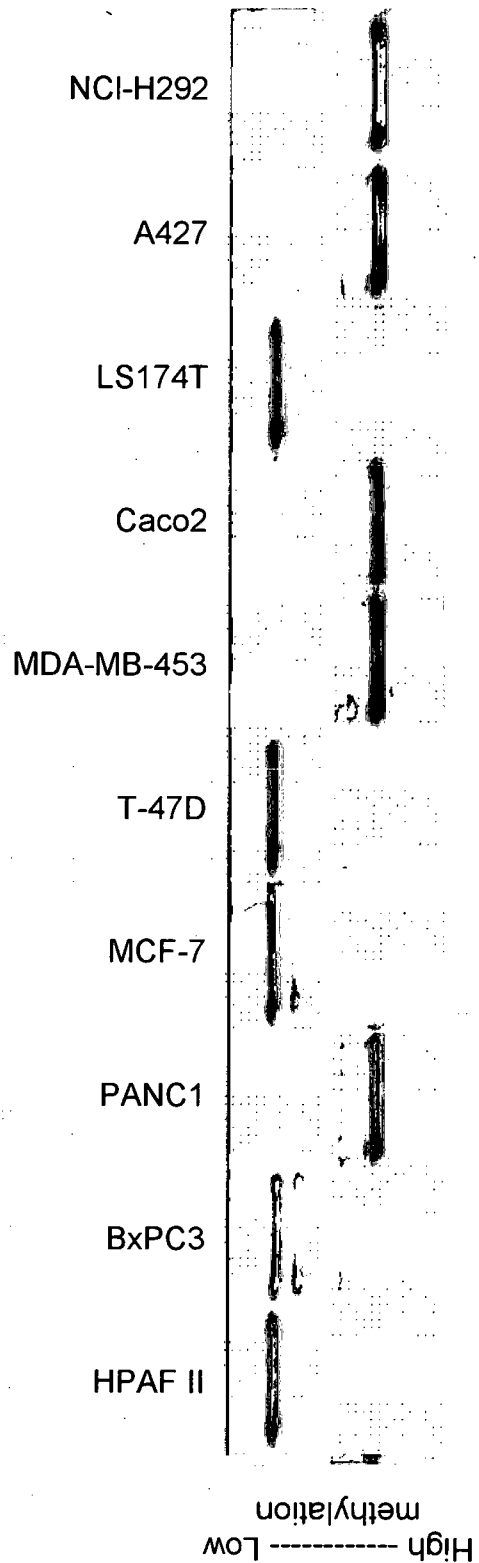
GGGAAGTGGAGTGGGAGATTAGGGTGGGTTTTTTGATTTTGTATAGGATTTTG
 ATTAGTTGGTTTTGTTTTTAATTTTAAGTTAGTTGTTGTTTGAGGTTAAATTAGAGT
 TTAGGGGTTTTAAGTTTTAGATTGTTTTTTTTTTTTTTTGGAGTTAGGGAGTGGTTGG
 TGAAGGGGGAGGTTAGTTGGAGAAATAAATGGGTAGTTAGGGGTTGAGTGATTAGA
 GTTTTTGTATTTTATTTAGGAATGGTTGGGAGGAGGAGGAAGAGGTAGGAGGTAGG
 GGAGGGGGTGGGTTTTGTTATTTGTTATTTGTTTGGTTGTGTTAGGGTGGGTGG
 GTGGGAGTGGGGGATTGGTATAAAGTGGTAGGTGTTGTGTTTATTTTATTTTA
 AGTAGTAGTGTGTTGTTGAATTTGTTTTTTTTTTTTTATTTATTTATTTATTTATGAT
 ATTGGTATTAGTTTTTTTTTTTTTTGTTGTTGTTTTTATAGTGTTTATAGGTGAGGGG
 TATGAGGTGGGAGTGGGTTGTTTTGTTTAGGTGGTTTTTGTGTTTTTTGTGGGTT
 TTGTTTTTTG

200

図 2
(A)



(B)



3

-500

GAAGGATTTATATTTTTTTGTTTTTGGGGAGGTTTTTTTTTTGGGGTTAGGTTTGGAA

Primer 2-1

GTTGTTTTAGAGTTGGGTTTTAGGAATGGGTTGGTTTTTTTTTAGTGTAATGTGAGTTTG

Primer 2-3

ATTAGGTTTGGGGATTGTAGTGGGTGTTGGGGGTTATGGTGGGTTAAGGAGTT

TGATTAGATTTGTTTTGGTAGGATAATTTTTTTTTGGTTAATTTGGGTTTGTTTTTTAG

TAGTTGTATGTGTTTTTTGGGIGTGTTGGTATTTAGGTTAAGGGTTTATTTTG

Primer 2-4

AAGAAGGTTGTGTTTATTAGGGAGTTATAAAGAGATGATTTTTTGATAATTTGAATTAAT

Primer 2-2

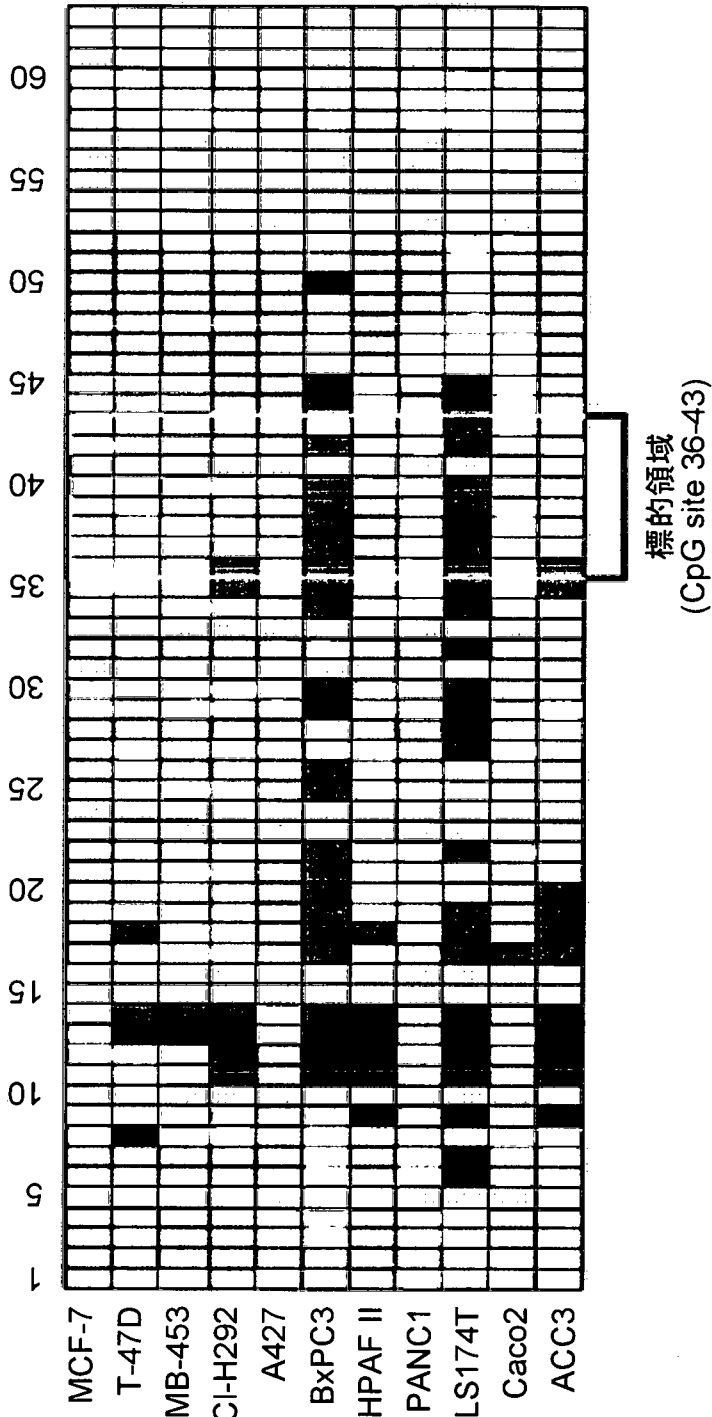
ATTTTTTTATTGGGGTTTGGGTTTTTGTAGTTGTTTTTTTGATTATTGGTAGATGTTATA

TTTATTTTTGGTTTTTTTTTGTTTTTTTTGTATTTTTTTTGTAGGATATATAAGGATT

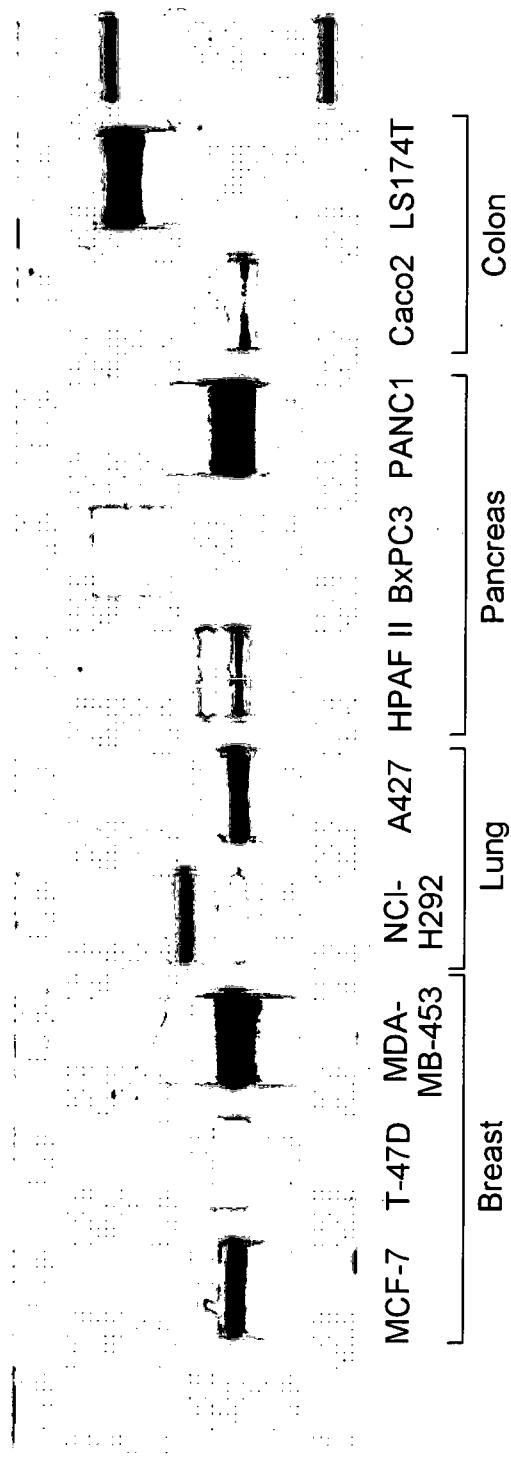
AGATTTTTGTGTTTTTGGGTG

-1

図 4
(A)



(B)



5

-250

TAGAGTAATGGGTGATTGGTGTTTTTTTTTTGGTGGGGTAGTGGGGTGGGGTTGA
Primer 4-1

GGAGAGAAAGGGTGATTAGTGTGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGGTTTT

Primer 4-3

TTGGTTTTTTTGGAGAAATGTATTTGGTTTGGGTAGTTGTTTGAGGGGATGGGTTTAT

GTTTGTTTTTATATTGTAGTTGTTGGGTTGTGGAGTTTTTTTAGGGAGTTAGGGGAT

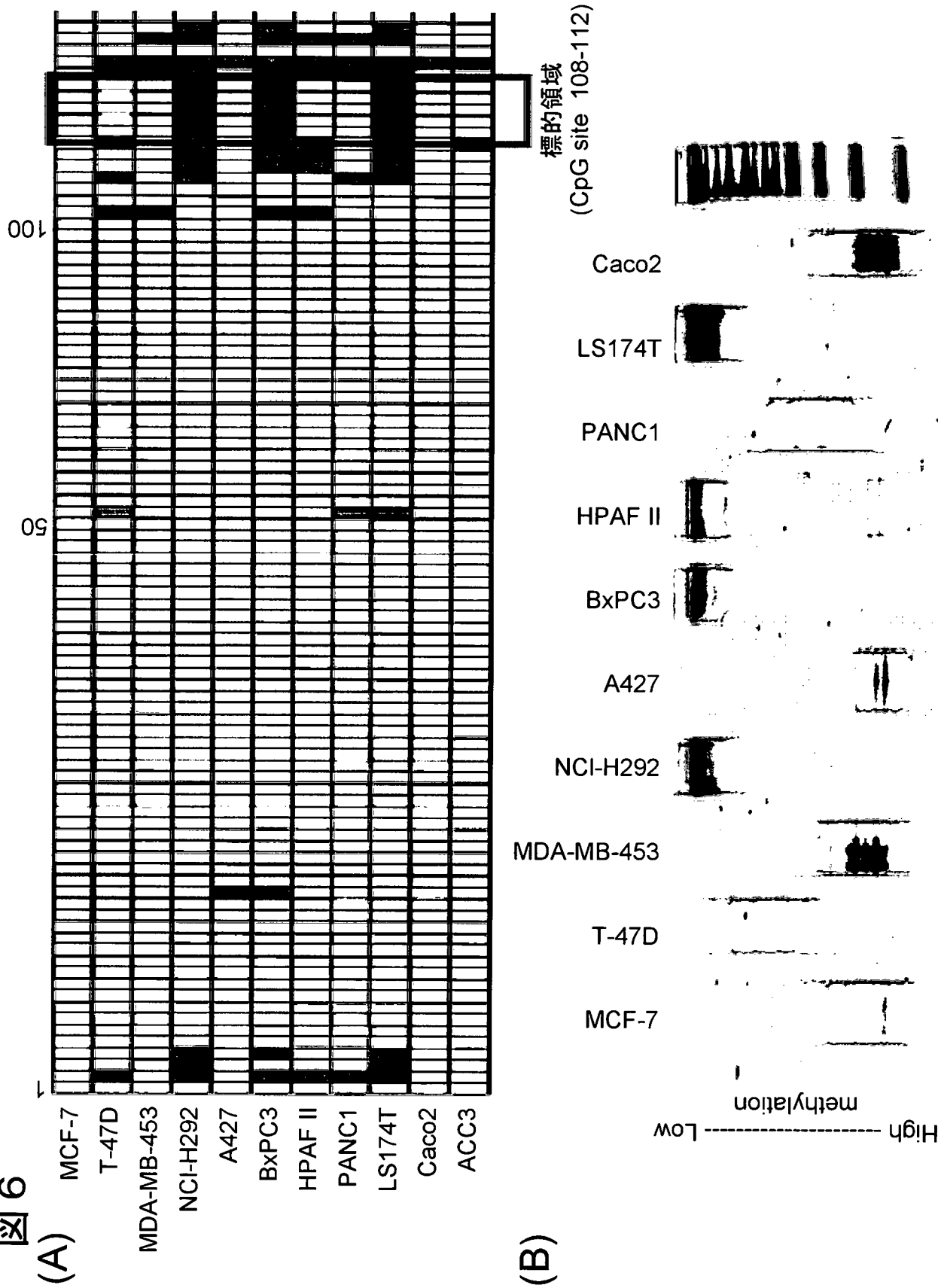
TTTTGTTGTAGTTATGAAGGGGGTATGTTGGAGGAGGGTTTTTTTGGGTGTTTTTGAGT
Primer 4-2

Primer 4-4

TGTTTGTTTTTTGTTTTTTTTTTGTAATGTTGGTTTTTAGGTAAGTGATGGAGATA

95

図 6



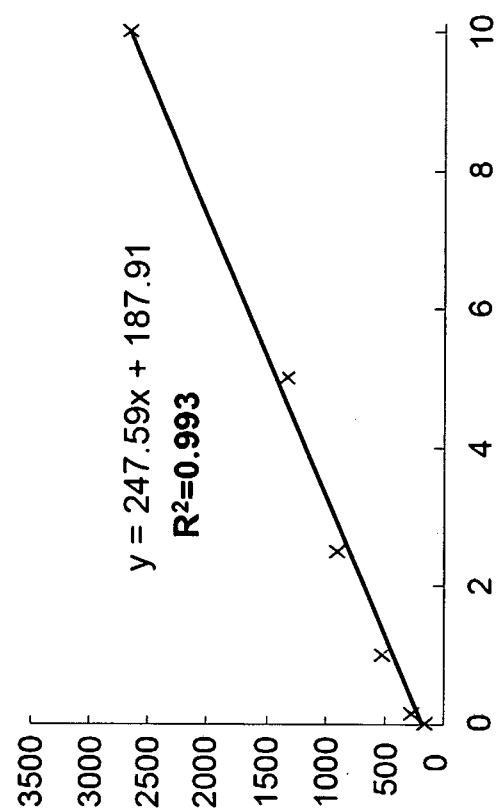
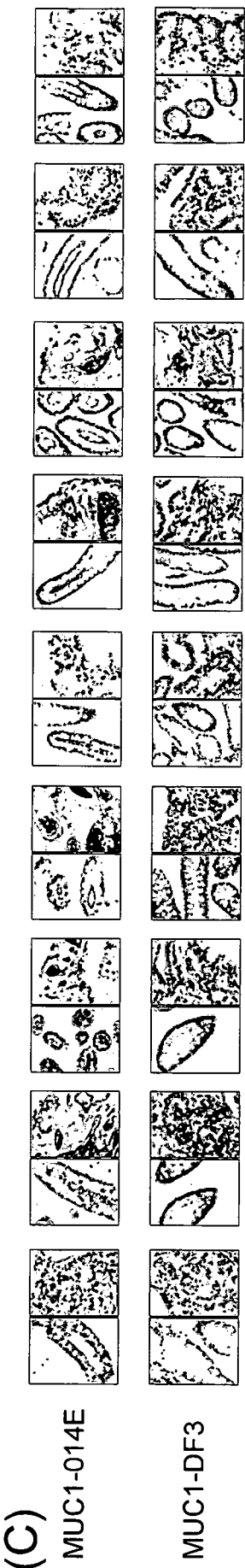
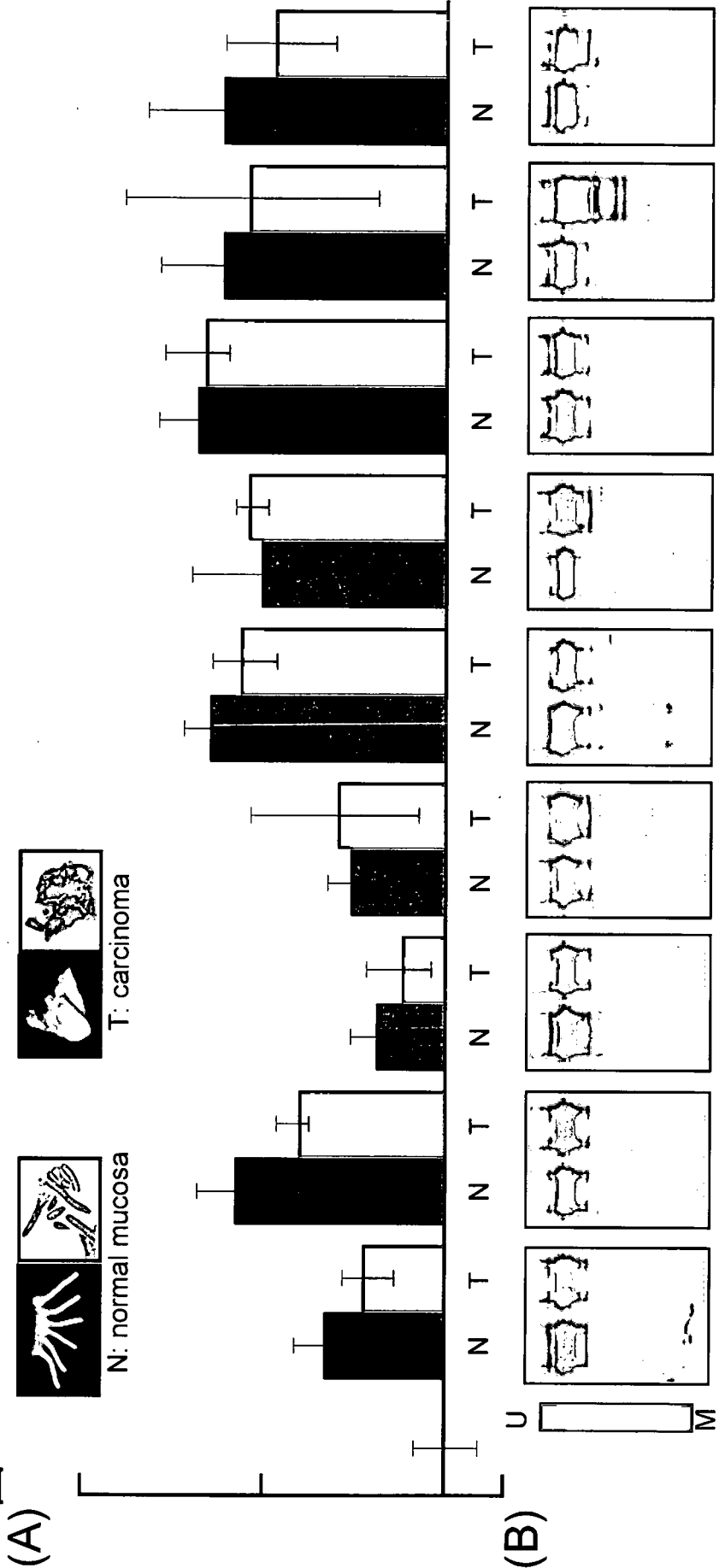
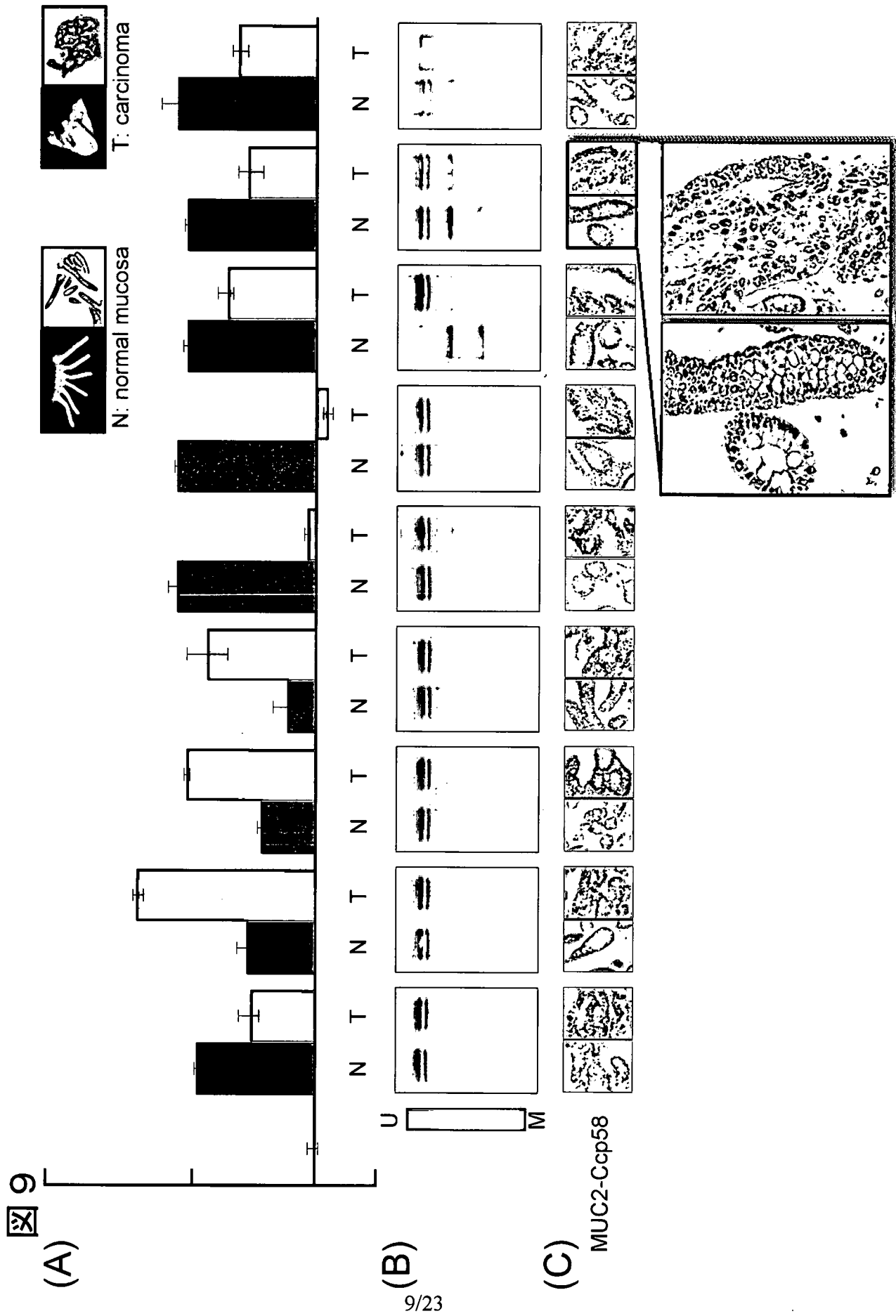


図 8





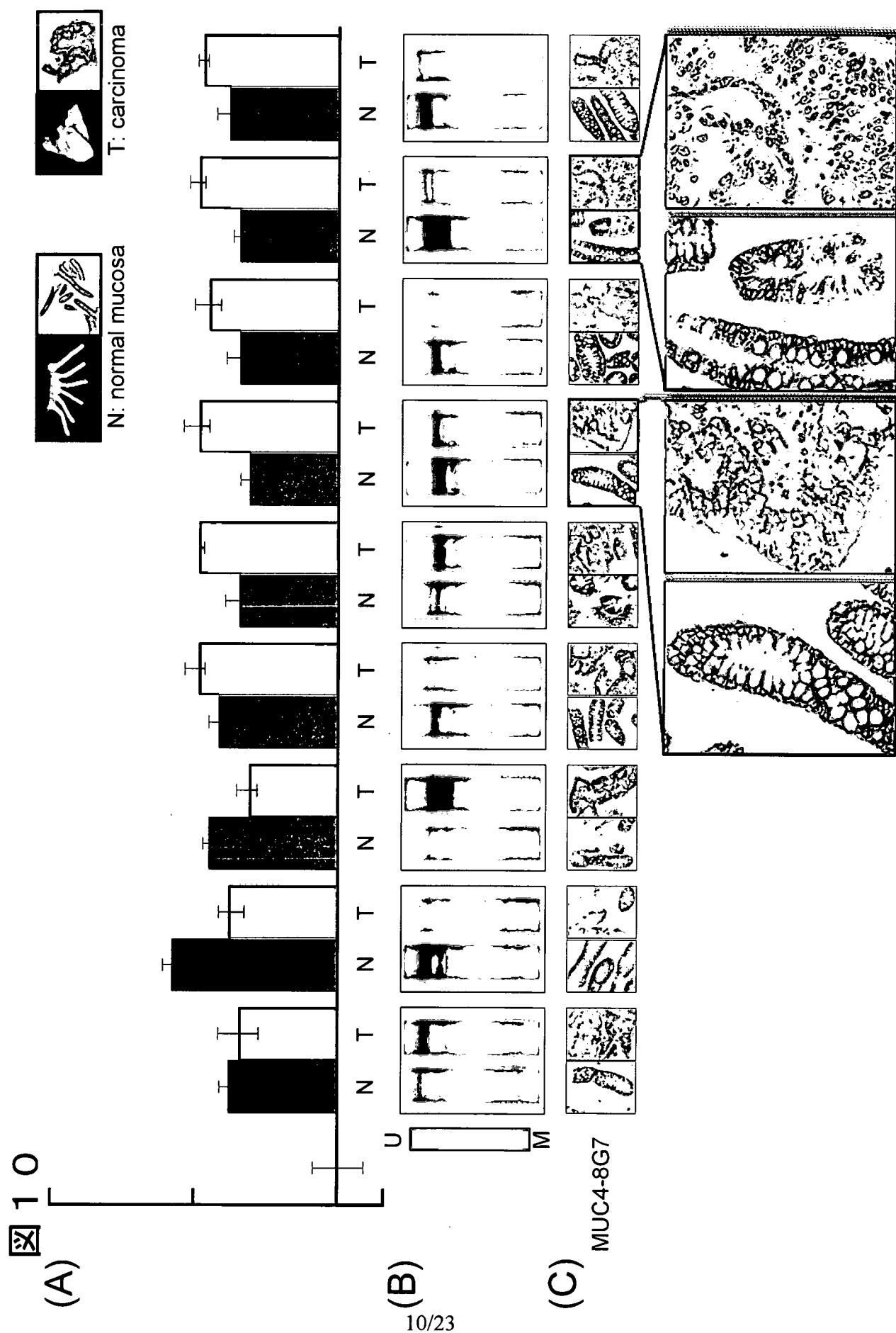
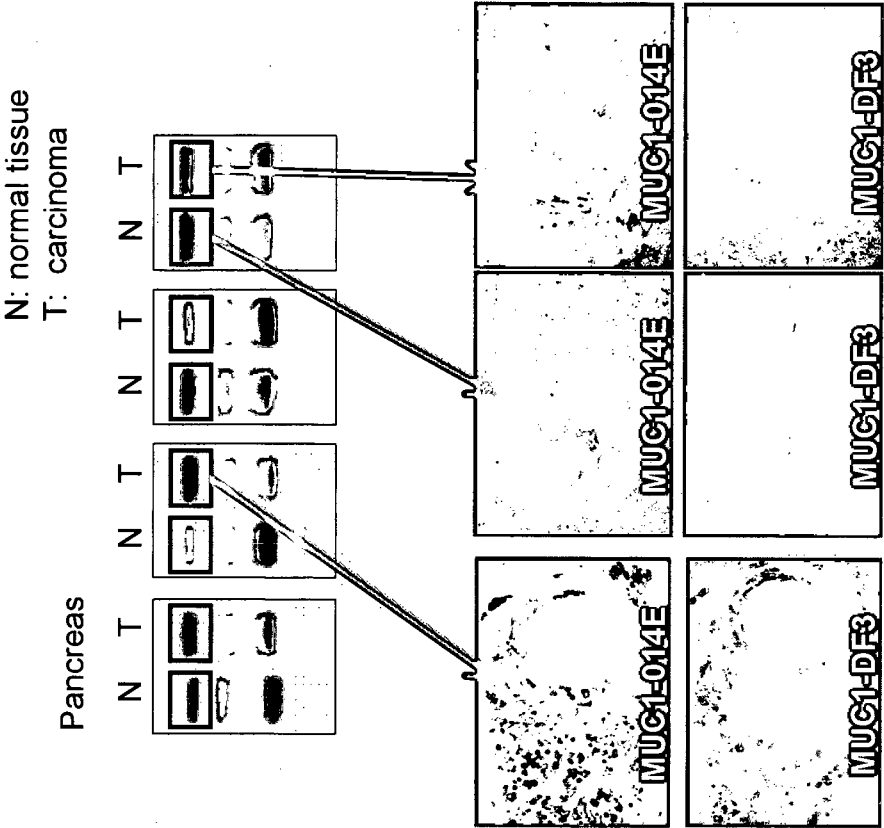


図 11

(A)



(B)

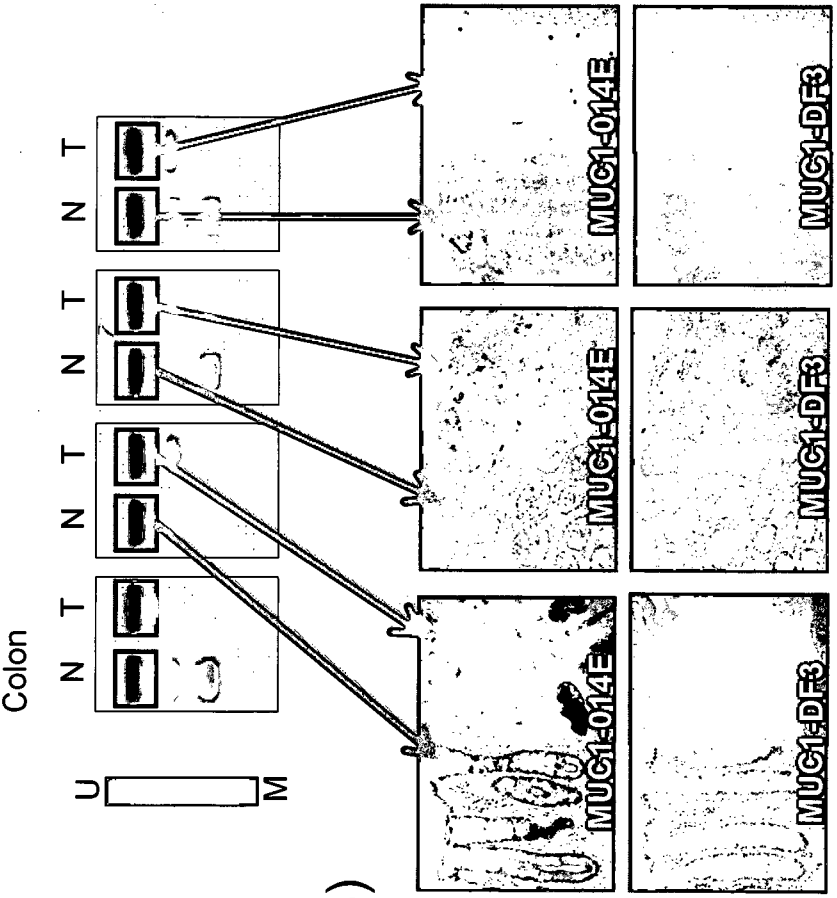
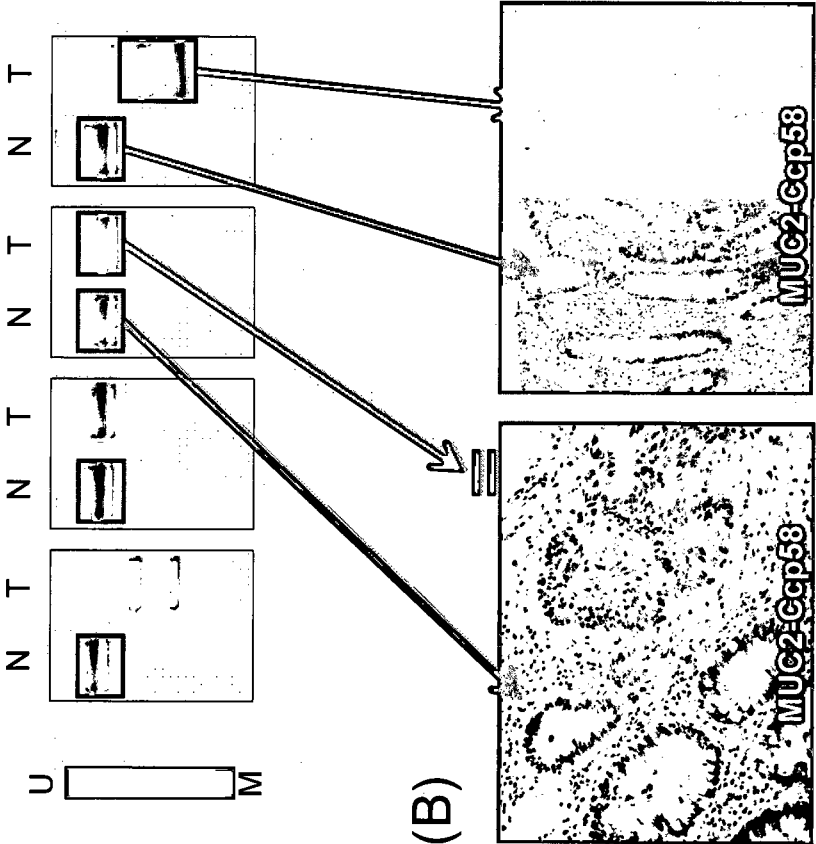


図 12

(A)

Colon



(B)

N: normal tissue
T: carcinoma

Pancreas

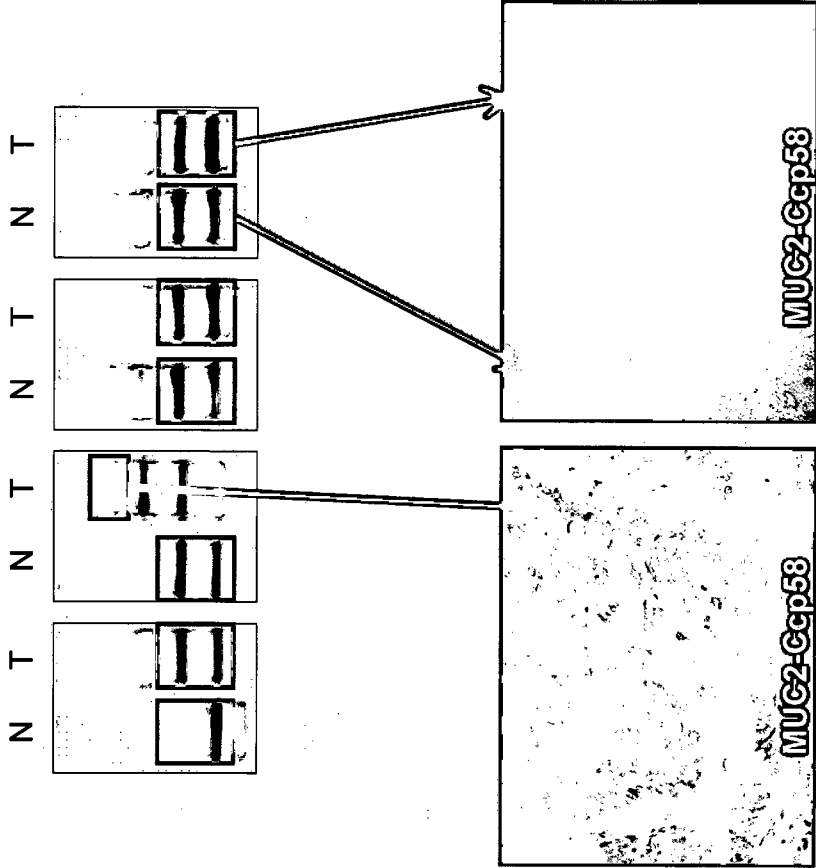
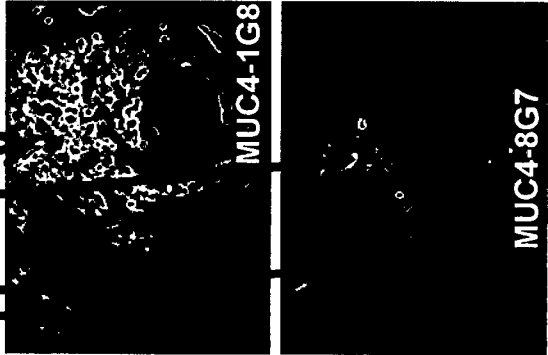
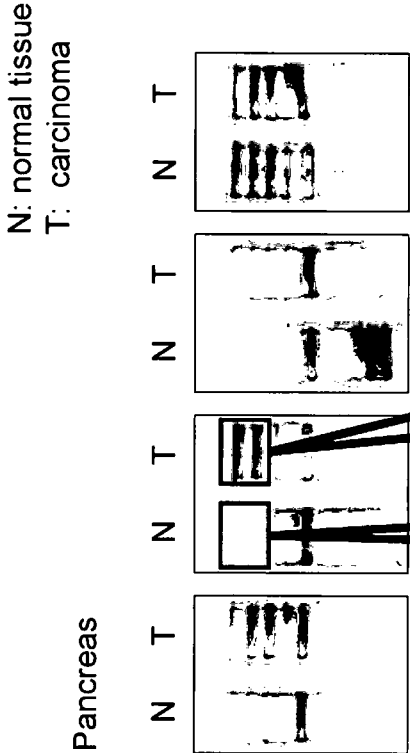
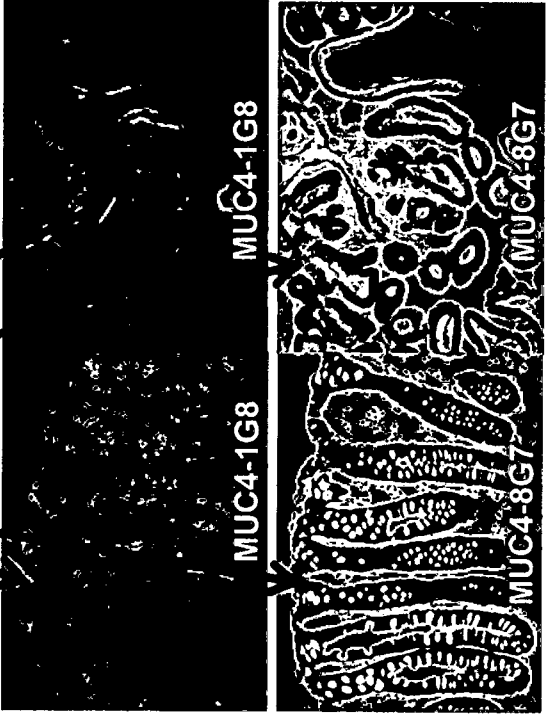
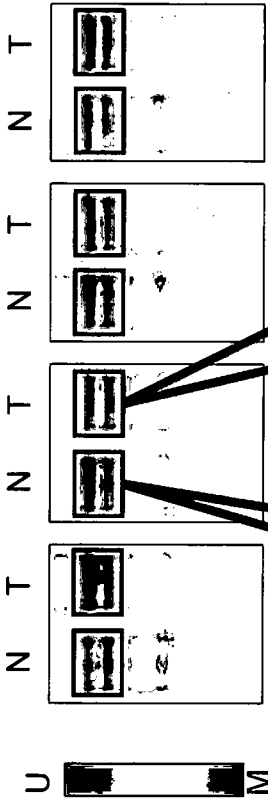


図 13

(A)



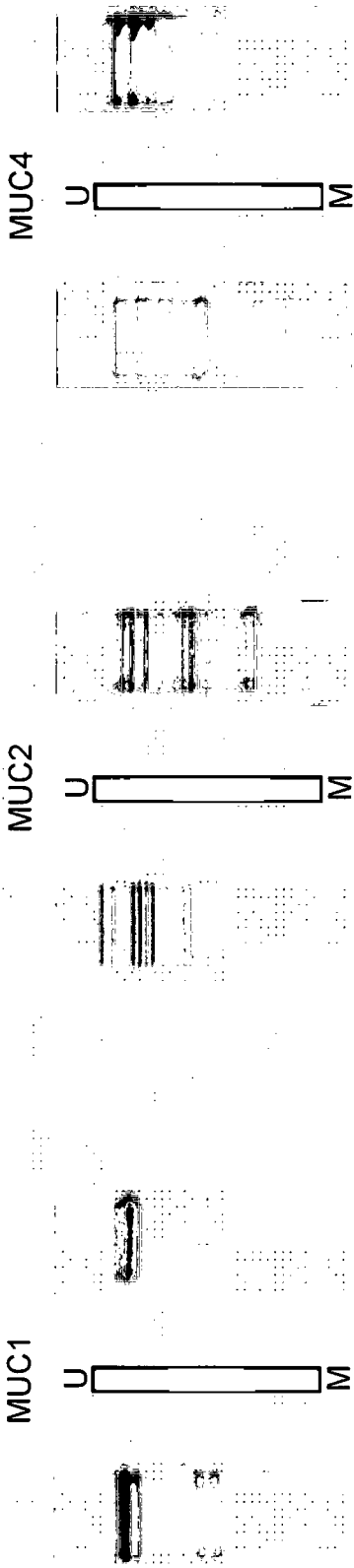
Colon



(B)

図 14

(A)



(B)

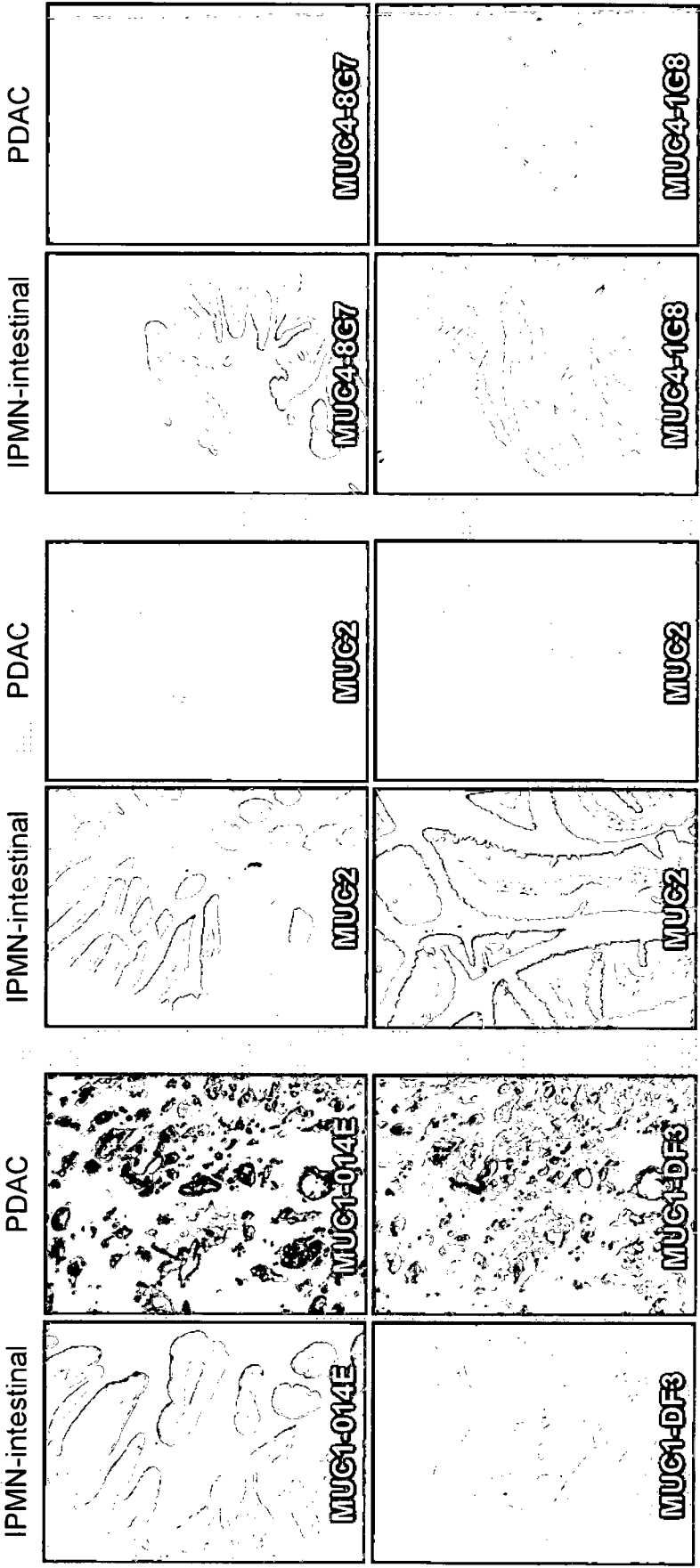
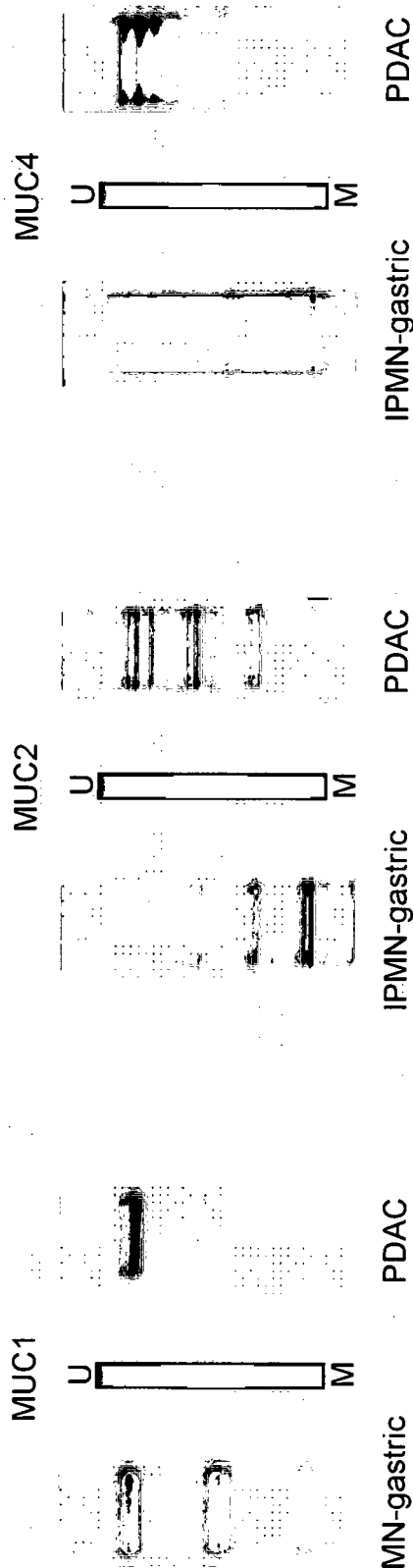


図 15

(A)



(B)

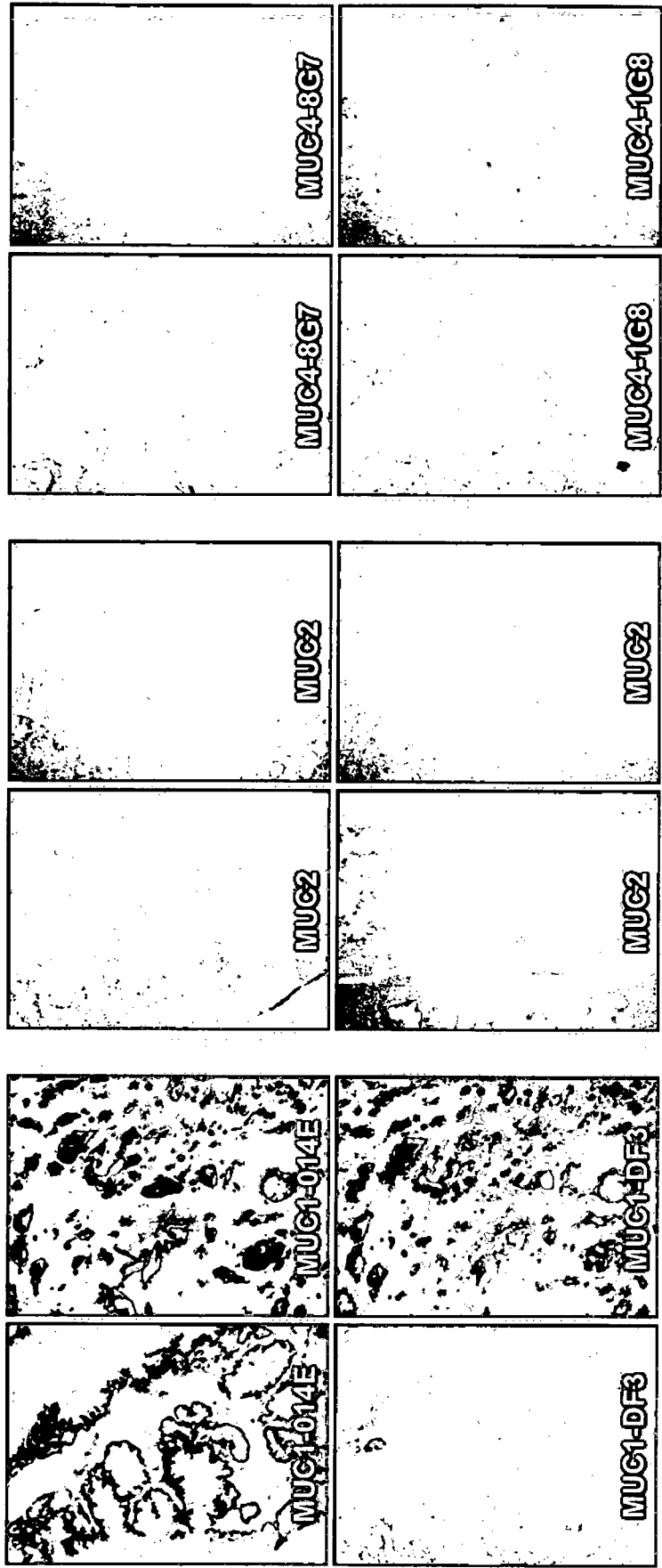


図 16

(A)



(B)

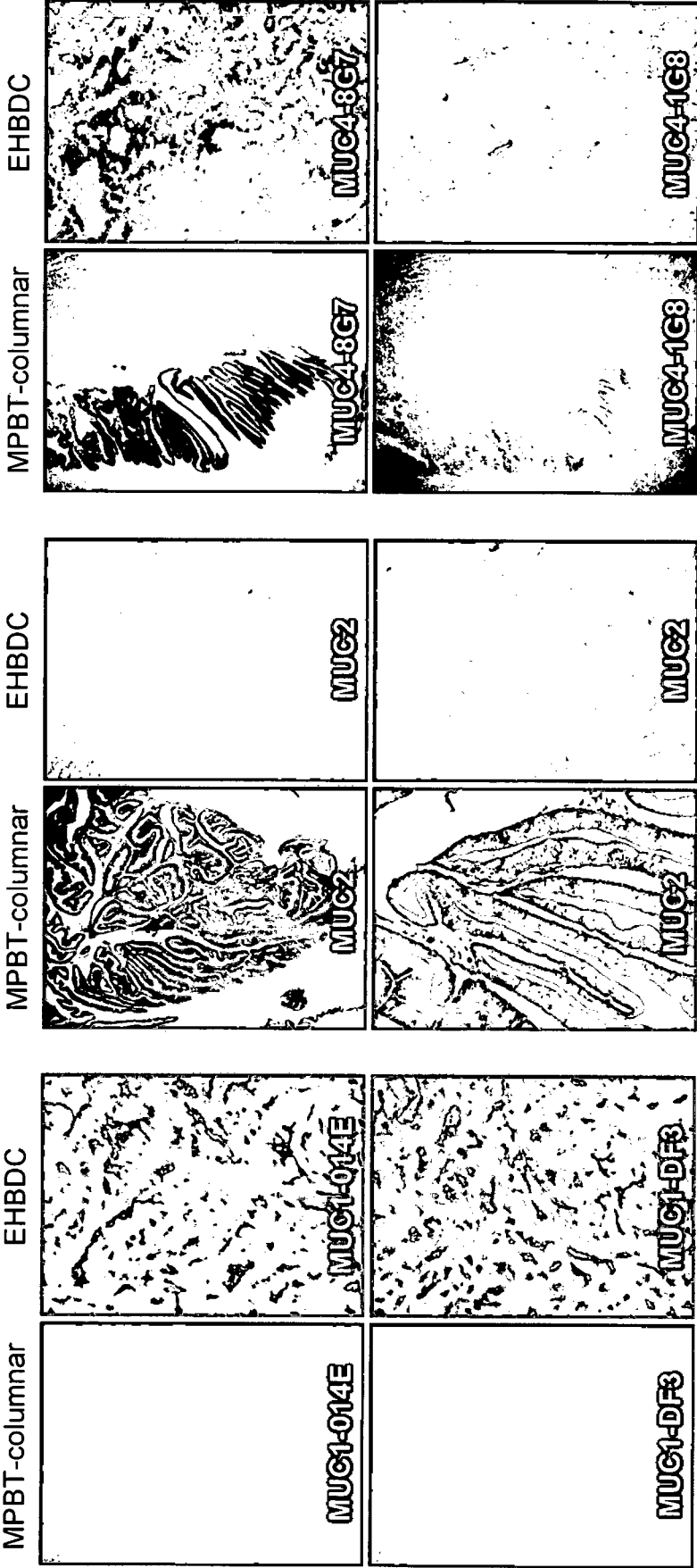


図 17

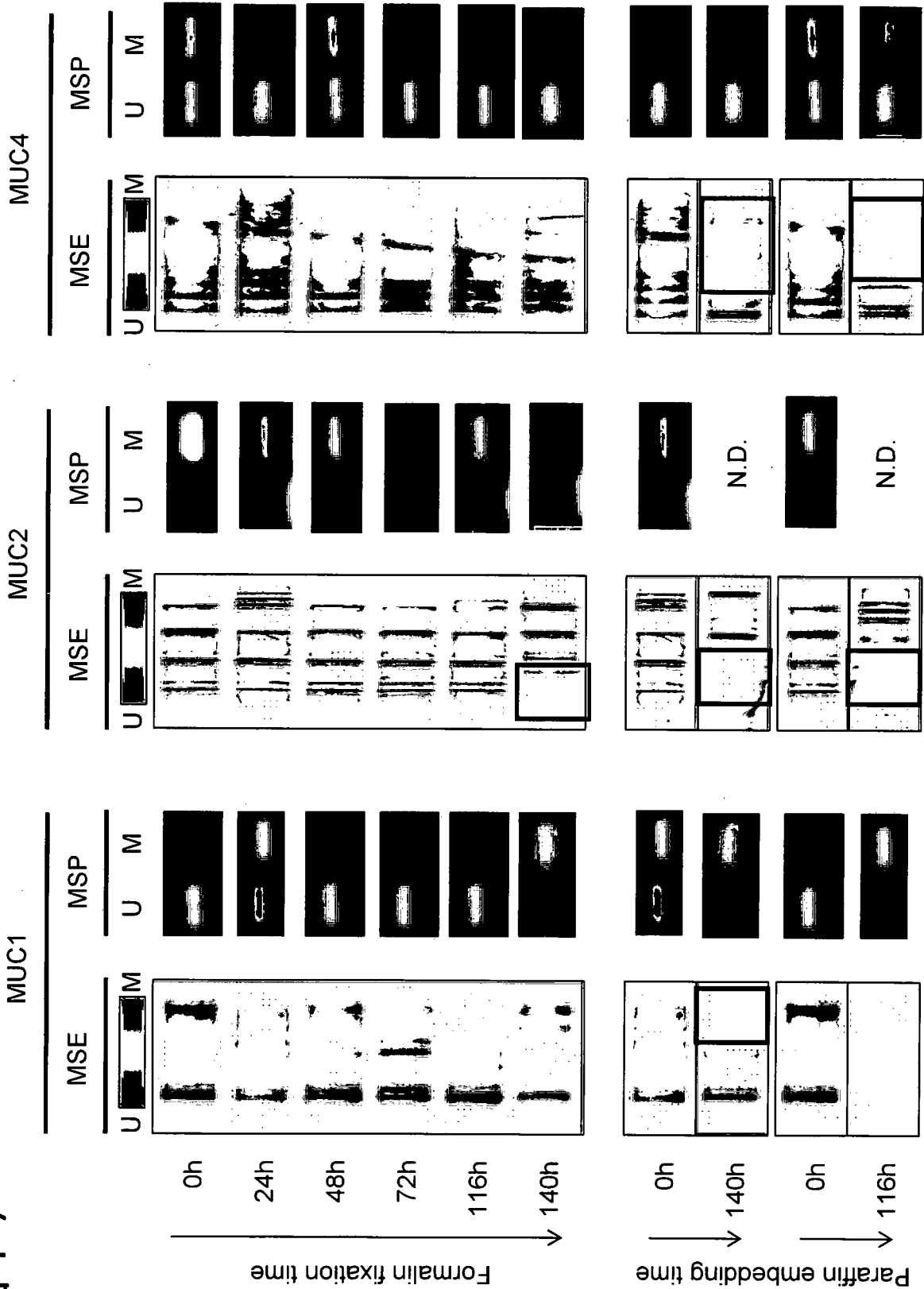


図 18

(-4150

bp)TTAGGAGGTAGGTGGTTGTCGTTATGCGTTTCGGTTAGTTTGTGTTGTAATTTTGA
 GAGTTTTAGTAAGGTGTAGTGATTAATTTAGATTTTTTTTGAGGTTGTGGTCGTT
 GGTTGCGGATTTATTTGTTTTGGGGAATAATAGAAAATGTTTATAGAGTTTAGAAA
 TAAGGTTTAGTGGGTTTTTTGGAAAGTTTTGGGTGTGTGGAGTTTGGGGTTGTA
 GGTTTGGAAATTGTAGGTAATGGTTTAGGTTTGTAGGTTTTCGGTTTGGTGGG
 GTTTTATGGGATTAGGTGGTTAGTTTCGTTGTTTATGTTTAGGGGTTTTGGGTGT
 TTGAGTTTAGGTTTTAAGAGGAAGTTTAGTATAGTTAGGGGTATTAATTTGGTG
 GGGGGAAGTTATTTAGTTGGAATTTAGTAGTCGTTTGGGTGATGTTTGGTTGA
 GGGAGGAGAAAGTTGTGGTTGGGGTCGTAAGGTTTGGGTGGTTAGTTGGTTAG
 GTGTTTTCGGGTTTGGTTAGTTTAGATACTGTAAGGGGTATTTTTTTGAGGGT
 TATGTTGGTGATTAGATTGTTTAGAGGTATCGTATGGAATGGGTAGTGATTA
 GGTTTGTTTTTGTTGGGGTTGGATATTGATTATTTAATTTGTTTGTATTATTG
 AGGGTCGTAAGGAGGGTAGGTTTTTAGGTAATTAATAT(転写開始地点より-3450 bp)

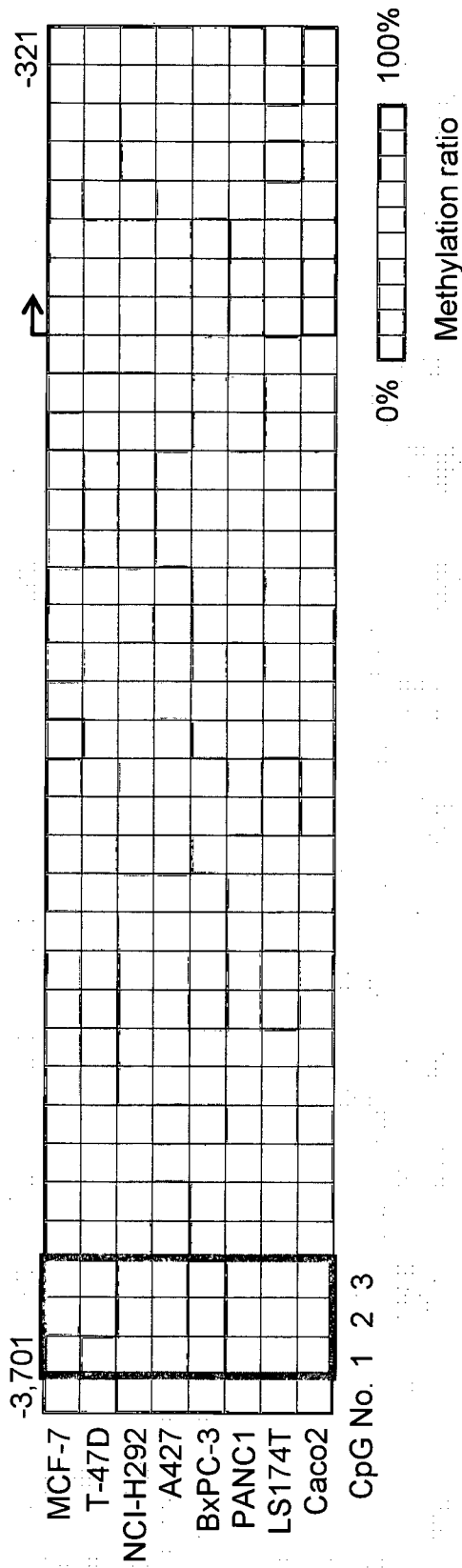
Primer 5-1

Primer 5-3

Primer 5-4

Primer 5-2

19
(A)



(B)

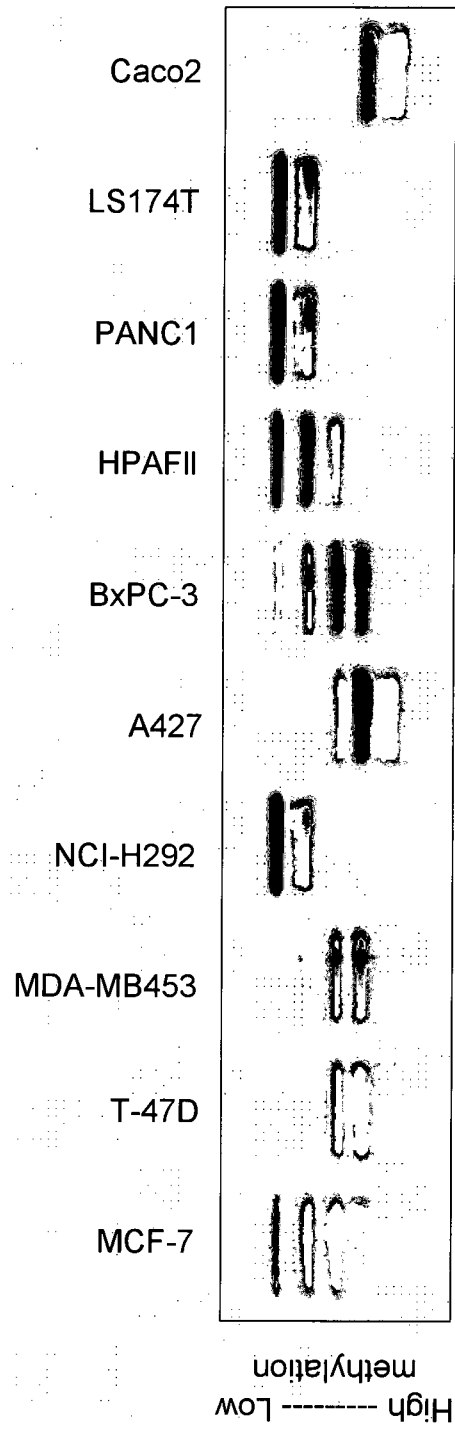


図 20

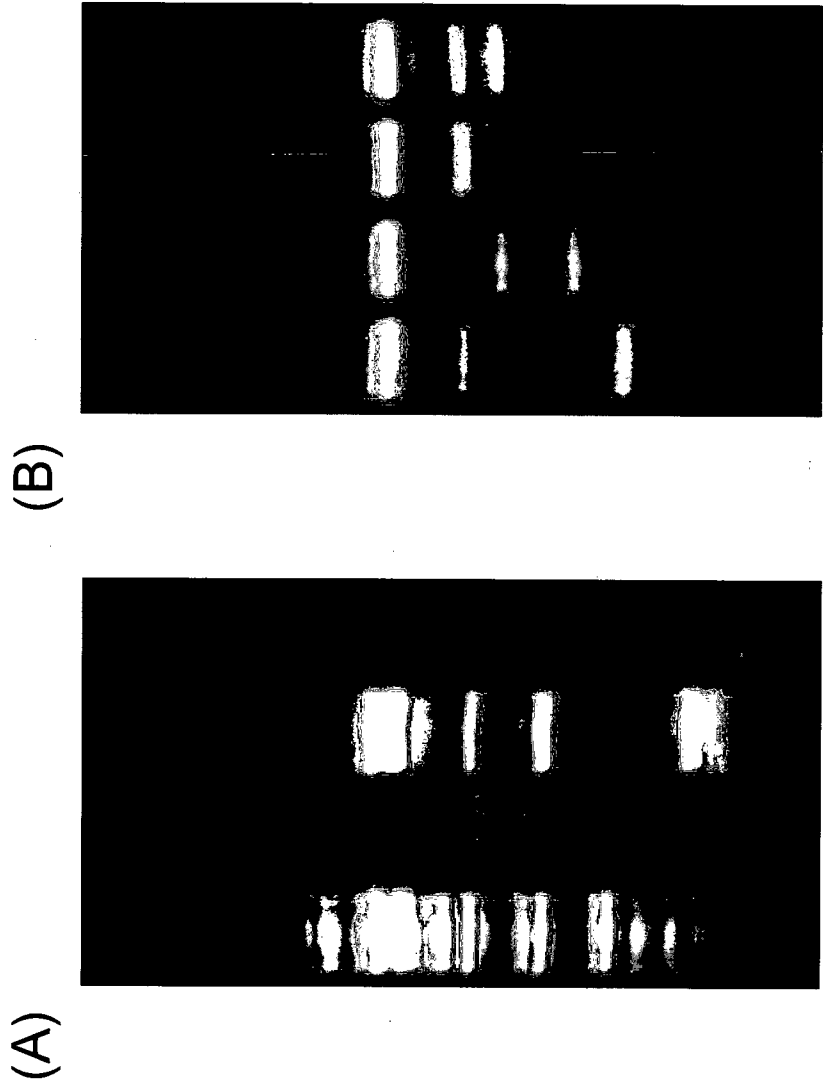


図 2 1

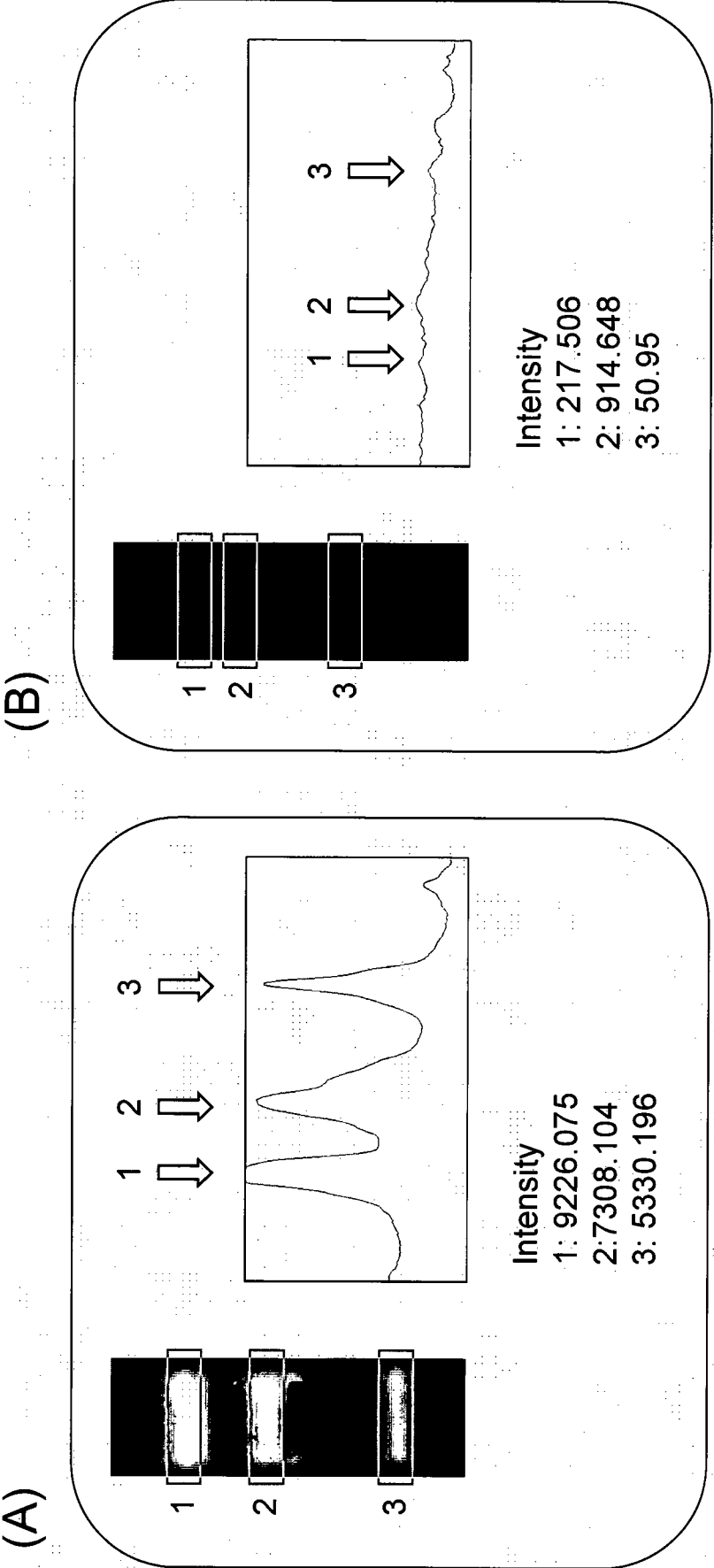


図 22

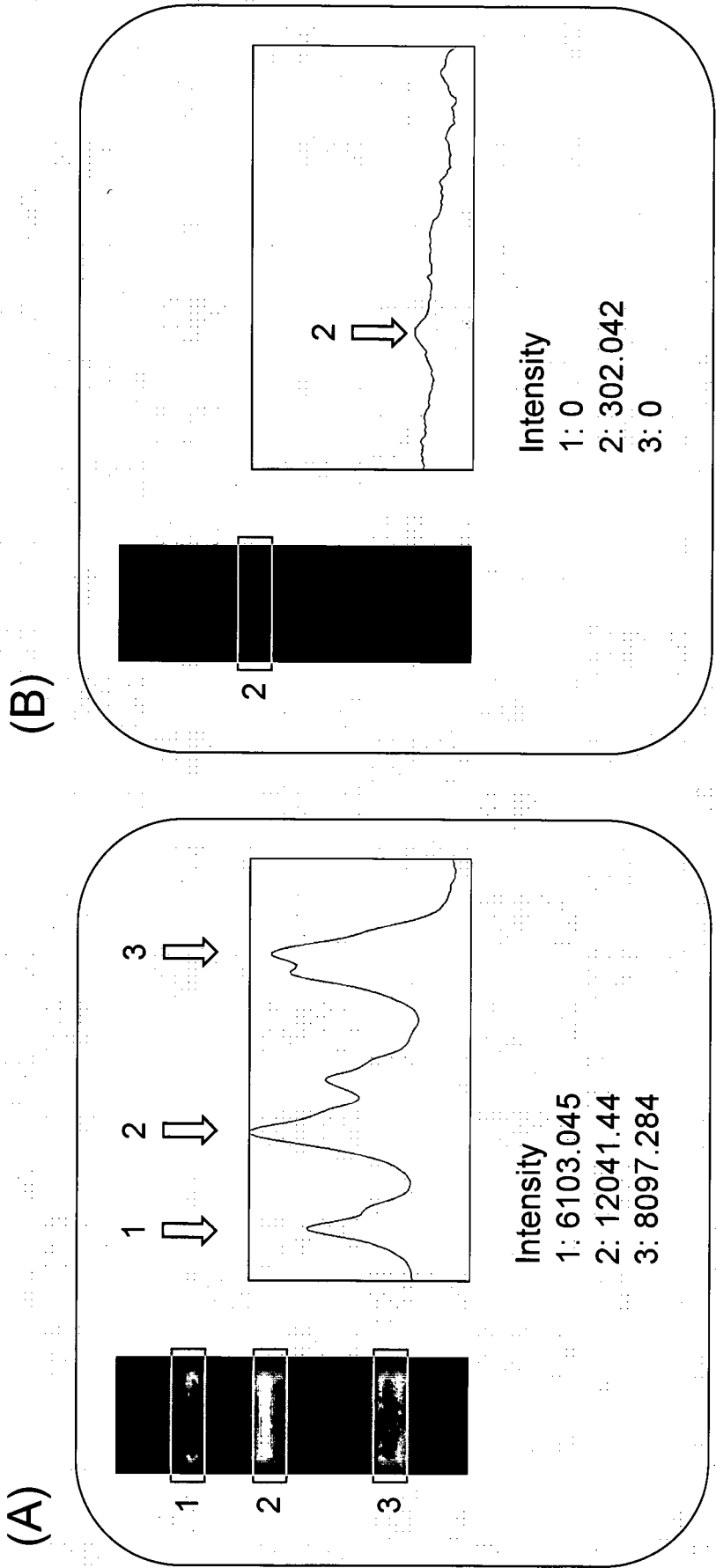
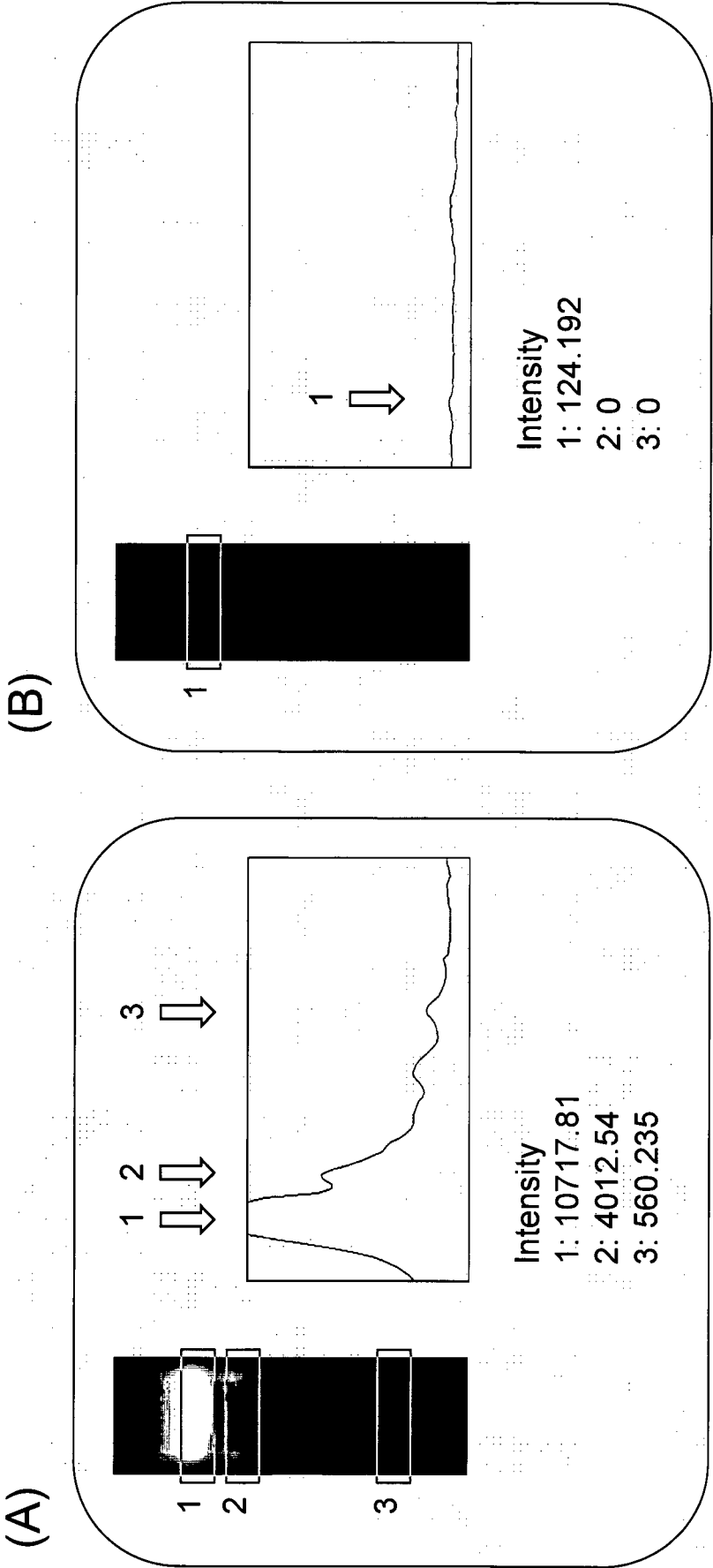


図 23



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/060339

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12Q1/68

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

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDREAMII), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GULDBERG P. ET AL, Detection of mutations in GC-rich DNA by bisulphite denaturing gradient gel electrophoresis., Nucleic Acids Res., 1998, Vol.26, No.6, p.1548-1549, entire text	1-3
Y	Yasuo KOGA et al., "I, Kan, Tandogan ni Okeru Kesseichu DNA Methylation Shindan no Kokoromi", Japanese Journal of gastroenterology, 2005, vol.102, no.special extra issue Sokai, page A189(031), entire text	1-3



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 June, 2011 (24.06.11)

Date of mailing of the international search report

05 July, 2011 (05.07.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

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

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	GULDBERG P. ET AL, Detection of mutations in GC-rich DNA by bisulphite denaturing gradient gel electrophoresis., Nucleic Acids Res., 1998, Vol.26, No.6, p.1548-1549, 全文	1-3
Y	古賀靖大、外, 胃, 肝, 胆道癌における血清中 DNA メチル化診断の試み, 日本消化器病学会雑誌, 2005, Vol.102, No. 臨時増刊号総会, p. A189(031), 全文	1-3

☐ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 4 . 0 6 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

0 5 . 0 7 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

柴原 直司

4 N

3 5 3 4

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8