

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4436685号
(P4436685)

(45) 発行日 平成22年3月24日(2010.3.24)

(24) 登録日 平成22年1月8日(2010.1.8)

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68 Z N A Z
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 A

請求項の数 15 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2003-571502 (P2003-571502)	(73) 特許権者	500488225
(86) (22) 出願日	平成15年2月26日 (2003.2.26)		アンスティテュ ナショナル ド ラ サ
(65) 公表番号	特表2005-518798 (P2005-518798A)		ント エ ド ラ ルシュルシェ メディ
(43) 公表日	平成17年6月30日 (2005.6.30)		カル (アンセルム)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/002654		INSTITUT NATIONAL D
(87) 国際公開番号	W02003/072822		E LA SANTE ET DE LA
(87) 国際公開日	平成15年9月4日 (2003.9.4)		RECHERCHE MEDICALE
審査請求日	平成18年2月1日 (2006.2.1)		(INSERM)
(31) 優先権主張番号	02290483.3		フランス、エフ-75654 パリ セデ
(32) 優先日	平成14年2月28日 (2002.2.28)		ックス 13、リュド トルビアク、1
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		01
			101, rue de Tolbiac,
			F-75654 Paris Cedex
			13 France

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロサテライト不安定性の検出のためのモノヌクレオチド反復マイクロサテライトマーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

NR21、NR22、NR24およびNR27から選択される少なくとも1つのマイクロサテライト遺伝子座の増幅を含むことを特徴とする、腫瘍からのゲノムDNAを含む生物学的サンプル中のマイクロサテライト遺伝子座の増幅、およびDNA増幅産物のサイズの決定により、腫瘍に関連するマイクロサテライト不安定性を評価する方法。

【請求項 2】

NR21およびNR24である2つのマイクロサテライト遺伝子座の増幅、ならびにNR22およびNR27から選択される第三のマイクロサテライト遺伝子座の増幅を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

さらに、BAT-25およびBAT-26から選択される少なくとも1つのモノヌクレオチド反復遺伝子座の増幅を含むことを特徴とする請求項1または2のいずれかに記載の方法。

【請求項 4】

BAT-25、BAT-26、NR21、NR24である4つのマイクロサテライト遺伝子座の増幅、ならびにNR22およびNR27から選択される第五のマイクロサテライト遺伝子座の増幅を含むことを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

- SEQ ID NO: 1に由来する、マイクロサテライト遺伝子座NR21の増幅に適したプライマー対；

- SEQ ID NO: 2に由来する、マイクロサテライト遺伝子座NR22の増幅に適したプライマー対；および

- SEQ ID NO: 3に由来する、マイクロサテライト遺伝子座NR24の増幅に適したプライマー対

から選択されるプライマー対。

【請求項6】

- オリゴヌクレオチドSEQ ID NO: 4およびSEQ ID NO: 5からなる、NR21の増幅に適したプライマー対；

- オリゴヌクレオチドSEQ ID NO: 17およびSEQ ID NO: 18からなる、NR21の増幅に適したプライマー対；

- オリゴヌクレオチドSEQ ID NO: 6およびSEQ ID NO: 7からなる、NR22の増幅に適したプライマー対；

- オリゴヌクレオチドSEQ ID NO: 8およびSEQ ID NO: 9からなる、NR24の増幅に適したプライマー対；

- オリゴヌクレオチドSEQ ID NO: 19およびSEQ ID NO: 9からなる、NR24の増幅に適したプライマー対

から選択される請求項5に記載のプライマー対。

【請求項7】

少なくとも、NR21の増幅に適した請求項5または6のいずれかのプライマー対と、NR24の増幅に適した請求項5または6のいずれかのプライマー対とを含むことを特徴とするマイクロサテライト不安定性を分析するためのキット。

【請求項8】

さらに、

- NR22の増幅に適した請求項5または6のいずれかのプライマー対；

- SEQ ID NO: 16に由来する、NR27の増幅に適したプライマー対

から選択されるプライマー対を含むことを特徴とする請求項7に記載のキット。

【請求項9】

前記NR27の増幅に適したプライマー対が、オリゴヌクレオチドSEQ ID NO: 20およびSEQ ID NO: 21からなることを特徴とする請求項8に記載のキット。

【請求項10】

さらに、

- SEQ ID NO: 10に由来する、マイクロサテライト遺伝子座BAT-25の増幅に適したプライマー対；

- SEQ ID NO: 11に由来する、マイクロサテライト遺伝子座BAT-26の増幅に適したプライマー対

から選択される少なくとも1つのプライマー対を含むことを特徴とする請求項7~9のいずれかに記載のキット。

【請求項11】

BAT-25の増幅に適したプライマー対が、オリゴヌクレオチドSEQ ID NO: 12およびSEQ ID NO: 13からなるプライマー対、ならびにオリゴヌクレオチドSEQ ID NO: 22およびSEQ ID NO: 13からなるプライマー対から選択され；

- BAT-26の増幅に適したプライマー対が、オリゴヌクレオチドSEQ ID NO: 14およびSEQ ID NO: 15からなるプライマー対、ならびにオリゴヌクレオチドSEQ ID NO: 23およびSEQ ID NO: 15からなるプライマー対から選択される

ことを特徴とする請求項10に記載のキット。

【請求項12】

請求項1~4のいずれか1項によるマイクロサテライト不安定性の評価を含む、腫瘍のMSI-H表現型の検出のための方法。

【請求項13】

腫瘍が、胃腸の腫瘍である請求項12に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項14】

腫瘍が、結腸直腸腫瘍または胃腫瘍である請求項13に記載の方法。

【請求項15】

腫瘍が、子宮内膜の腫瘍である請求項12に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規なマイクロサテライトマーカー、およびある腫瘍に関連するマイクロサテライト不安定性(MSI)の検出のためのそれらの使用に関する。

【背景技術】

10

【0002】

マイクロサテライトは、ゲノム中の非常に多数の遺伝子座にタンデムな反復としておこる、短いDNAのモチーフ(1~10塩基対)である。

マイクロサテライト不安定性(MSI)表現型は、対応する生殖系列DNAには見られない、腫瘍DNA中の交互のサイズのマイクロサテライトの存在として定義される(AALTONENら、*Science*、260(5109)、812~816、1993; IONOVら、*Nature*、363(6429)、558~561、1993; THIBODEAUら、*Science*、260(5109)、816~819、1993; IACOPETTAら、*Hum. Mutat.*、12(5)、355~360、1998)。

【0003】

MSI表現型は、遺伝性非ポリポーシス直腸結腸癌(HNPCC)症候群の特徴であり、ここで、これは全てのHNPCC腫瘍の90%を超えて検出され得る(LIUら、*Nature Med.*、2、169~174、1996); これは散発性の結腸および胃の腫瘍の約15%にも発生する。これは、膵臓癌腫(HANら、*Cancer Res.*、53、5087~5089、1993)、前立腺癌腫(GAOら、*Oncogene*、9、2999~3003、1994)、子宮内膜の癌腫(RISINGERら、*Cancer Res.*、53、5100~5103、1993; PELTOMAKIら、*Cancer Res.*、53、5853~5855、1993)のようなその他の腫瘍においても検出されている。

20

【0004】

MSIは、マイクロサテライト配列の複製中に導入された誤りを認識し損なう、潜在的なミスマッチ修復(MMR)の欠損を反映する。家族性癌症候群であるHNPCCにおいては、MSI表現型は、ミスマッチ修復(MMR)遺伝子であるhMSH2、hMLH1およびより低い頻度でhPMS1、hPMS2およびhMSH6中の生殖系列の変異により引き起こされる(KINZLERら、*Cell*、87、159~170、1996)。散発性の癌においては、これは、しばしば、この遺伝子の転写のサイレンシングの原因となるhMLH1プロモーターのメチル化により引き起こされる。(HERMANら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、95(12)、6870~6875、1998)。

30

【0005】

MSIの結腸および胃の腫瘍は、特徴的な分子のおよび臨床病理的なプロフィールを有し、しばしば有利な予後に関連する(LOTHEら、*Cancer Res.*、53、5849~5852、1993; KIMら、*Am. J. Pathol.*、145、148~156、1994; OLIVEIRAら、*Am. J. Pathol.*、153、1211~1219、1998)。また、MSI腫瘍をもつ結腸直腸癌患者が、5FUベースの化学療法からの良好な生存利益を示すことを示唆する証拠もあり(ELSALEHら、*The Lancet*、355、1745~1750、2000; LIANGら、*Int. J. Cancer*、101、519~525、2002)、よってMSIは、このタイプのアジュバント療法への応答についての有用な分子予測マーカーであろう。MSI状態のルーチンの分析は、起こり得るHNPCC事例の診断を助けるために臨床的に使用することも有する(AALTONENら、*N. Eng. J. Med.*、338、1481~1487、1998)。実際に、HNPCC患者からの腫瘍は、それらを散発性の腫瘍から直ちに区別する表現型の特徴を欠失しており、したがってこの疾患の診断は、歴史的に、例えばアムステルダム基準を用いる癌の家族歴に基づいていた(VASENら、*Dis. Colon Rectum*、34、424~425、1991; VASENら、*Gastroenterology*、115、1453~1456、1999)。しかしながら、このような基準は非常に制限的であり、そしてHNPCC家族のフラクションのみを同定するので、この疾患の本当の発生率は知られておらず、0.5~13%で変動して見積もられる。MMR異常の家族性のキャリアが、80%を超える癌の

40

50

発生の危険性を有すると仮定すると、この症状を検出する有効で、費用に対して効率がよい方法を工夫することが重要である。

【 0 0 0 6 】

この目的のために、HNPCC診断を確立するのを助けるであろう分子ベースの実験室的アプローチが、現在、開発されている。2つの方法が、一般的に提案されている：マイクロサテライト遺伝子型決定(microsatellite genotyping)および主要なミスマッチ修復タンパク質の免疫組織化学である。これらの方法の一方もしくは他方、または両方の使用は、それらの相対的な効率、特異性および費用に基づいて、いまだに論争の下である(LINDORら、J. Clin. Oncol., 20, 1043~1048, 2002; WAHLBERGら、Cancer Res., 62, 3485~3492, 2002; TERDIMANら、Gastroenterology, 120, 21~30, 2001; LOUKOLAら、Cancer Res., 61, 4545~4549, 2001)。

10

【 0 0 0 7 】

今までのところ、マイクロサテライト遺伝子型分類は、IHCよりも高い感度を有しているが、より高価であり、日常の実験室で用意するにはより困難である。よって、素因および予後の診断の情報についてMSI腫瘍を測定する、単純で正確な方法を開発することが重要である。

【 0 0 0 8 】

多数の異なるマイクロサテライトが、MSI腫瘍の同定のために、研究者により研究されている。

分析されたマイクロサテライトのタイプおよび数に応じて、種々の腫瘍のタイプにおけるMSIの頻度について広範に多様な結果が発表されている(PERUCHO、Cancer Res., 59(1)、249~256、1999)。

20

【 0 0 0 9 】

BAT-25およびBAT-26マーカーの組み合わせの使用が、MSIの検出に関して提案されている(ZHOUら、Genes, Chromosomes & Cancer, 21(2)、101~107、1998; HOANGら、Cancer Res., 57(2)、300~303、1997)。

【 0 0 1 0 】

BAT-25およびBAT-26は、c-kitのイントロン16およびhMSH2のイントロン5にそれぞれ位置する、モノヌクレオチドの反復である。これらの2つの反復は、白色人種の個体群において、擬単形である(HOANGら、Cancer Res., 57(2)、300~303、1997; ZHOUら、Oncogene, 15(14)、1713~1718、1997)。この特性は、体細胞変化のために、MSI腫瘍DNA中にみられる広い対立遺伝子サイズの変化の、容易な分類を許容する。腫瘍の大多数において、BAT-25およびBAT-26の分析は、生殖系列DNAに関係なく、それらのMSI状態を確立するのに充分である(ZHOUら、Genes, Chromosomes & Cancer, 21(2)、101~107、1998)。

30

【 0 0 1 1 】

しかしながら、交互のサイズのBAT-25およびBAT-26対立遺伝子は、アフリカ系アメリカ人の18.4および12.6%でそれぞれ同定されている(PYATTら、Am. J. Pathol., 155(2)、349~353、1999; SAMOWITZら、Am. J. Pathol., 154(6)、1637~1641、1999)。よって、付加的な反復の分析が、これらの生殖系列の多型から時折発生する偽陽性の結果を避けるために、必要であろう。

40

【 0 0 1 2 】

したがって、腫瘍および生殖系列のDNAの両方において、ジヌクレオチドの付加的な分析によりこれらのモノヌクレオチド反復の分析を完了することが提案されている。

例えば、米国特許6,150,100号は、任意にペンタヌクレオチド反復TP53Aluと共にAPC、Mfd15、D2S123およびD18S69から選択される2または3のジヌクレオチド反復に関連する、BAT25、BAT26およびBAT40から選択される、2つのモノヌクレオチド反復の使用を提案している。米国特許6,150,100に開示されているマイクロサテライトマーカーの好ましい組み合わせは、BAT25、BAT26、APC、Mfd15およびD2S123またはBAT26、BAT40、APC、Mfd15およびD2S123である。

【 0 0 1 3 】

50

1997年に、MSIの検出についての国際コンセンサス会議は、MSI状態の均一な分析のための5つのマーカーのパネルを推薦した(BOLANDら、Cancer Res., 58(22)、5248~5257、1998)。これは、2つのモノヌクレオチド(BAT-25およびBAT-26)、および3つのジヌクレオチド(D5S346、D2S123およびD17S250)反復を含む。これらのマーカーの2以上において不安定性がある腫瘍は、MSI-Hであると定義された。1つのマーカーで不安定性がある腫瘍、および不安定性がない腫瘍は、それぞれMSI-LおよびMSSと定義された。MSI-Hの癌は、MSI-LおよびMSS腫瘍からは明らかに区別される臨床病理的な特徴を有する。

【0014】

ジヌクレオチド反復の特徴のいくつかは、MSIの状態のマーカーとしてのそれらの使用を、多少問題のあるものにする。上記のパネルのジヌクレオチド反復は、通常、MSI-H腫瘍のたった60~80%において不安定性を示す(SUTTERら、Mol. Cell Probes, 13(2)、157~165、1999)。MMRの損失およびその後のモノヌクレオチド反復の変化が、MSI-H腫瘍進行経路において、ジヌクレオチド反復の変異よりも先に起こることを示唆する、いくつかの証拠がある(PERUCHOら、Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 59、339~348、1994)。

さらに、hMSH6変異により引き起こされる、MMR異常をもつあるMSI細胞株は、ジヌクレオチド反復において変化を示さない(AKIYAMAら、Cancer Res., 57(18)、3920~3923、1997)。したがって、モノヌクレオチドおよびジヌクレオチド反復に影響する潜在的なMMR異常は、異なることが可能であり、両者の分析は、いくつかの腫瘍のMSI状態の誤った解釈に導き得る。多くの場合において、ジヌクレオチド反復の分析は、モノヌクレオチド反復の分析により得られた結果に、少しのさらなる情報も付加しない(DIETMAIERら、Cancer Res., 57(21)、4749~4756、1997; LOUKOLAら、Cancer Res., 61(11)、4545~4549、2001)。

【0015】

さらに、BAT-25およびBAT-26のようなモノヌクレオチド反復と違って、ジヌクレオチド反復は、高度に多型である。したがって、腫瘍DNAにおけるMSIの同定のためのそれらの使用は、対応する生殖系列DNAの分析を常に必要とする。

これが、MSIスクリーニングプロセスを、高度により時間を浪費し、高価なものにすると共に、生殖系列および腫瘍DNAのサンプルの混合のために、誤りを導入する可能性がある。さらに、これらのジヌクレオチド反復におけるサイズの変化の解釈は困難であり、誤った分類に導き得る(PERUCHO、Cancer Res., 59(1)、249~256、1999)。最後に、多くの状況において、癌患者からの生殖系列のDNAは、容易に入手することができない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

これらの全ての理由から、BAT-26およびBAT-25のいずれか単独、またはジヌクレオチド反復との組み合わせを用いる方法は、ヒト腫瘍におけるMSI状態の正確な測定のために完全に充分ではなく、改良への差し迫った必要性がある。

【0017】

したがって、多数の、偽単形モノヌクレオチド反復が、MSI腫瘍の正確な診断のために必要である。

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明者らは、今回、白色人種およびアフリカ人の対象からの生殖系列DNAで保存されており、かつBAT-25およびBAT-26と同様に、MSI-H腫瘍中の体細胞欠失に高度に敏感である新規なモノヌクレオチド反復を同定している。

【0019】

これらの新規なマイクロサテライトマーカーの3つは、本明細書中の以下においてNR21、NR22およびNR24という、ポリ(T)反復である。

NR21マーカーは、SLC7A8遺伝子(cDNA配列 GenBank XM_033393)の5'非翻訳領域において同定される21Tの反復である。

10

20

30

40

50

NR22マーカーは、推定の膜貫通前駆体タンパク質B5遺伝子(cDNA配列 GenBank L38961)の3'非翻訳領域において同定される22Tの反復である。

NR24マーカーは、ジンクフィンガー-2遺伝子(cDNA配列 GenBank X60152)の3'非翻訳領域において同定される24Tの反復である。

【0020】

本明細書中の以下においてNR27という、第四のマイクロサテライトマーカーは、アポトーシスプロテイン-1の阻害剤の遺伝子(cDNA配列 GenBank AF070674)の5'非翻訳領域において同定される27Aの反復である。

NR21、NR22、NR24およびNR27マーカーは、腫瘍の診断において、マイクロサテライト不安定性の評価のために有用である。

【0021】

したがって、本発明は、NR21、NR22、NR24およびNR27から選択される少なくとも1つのマイクロサテライト遺伝子座の増幅を含むことを特徴とする、腫瘍からのゲノムDNAを含む生物学的サンプル中のマイクロサテライト遺伝子座の増幅、およびDNA増幅産物のサイズの決定により、腫瘍に関連するマイクロサテライト不安定性を評価する方法を提供する。

【0022】

本発明の好ましい実施形態によると、該方法は、2つのマイクロサテライト遺伝子座NR21およびNR24の増幅、ならびにNR22およびNR27から選択される第三のマイクロサテライト遺伝子座の増幅を含む。

有利には、該方法は、さらに、NR21、NR22、NR24およびNR27とは異なる少なくとも1つのマイクロサテライト遺伝子座の増幅を含む。好ましくは、該マイクロサテライト遺伝子座は、モノヌクレオチド反復遺伝子座である。より好ましくは、このモノヌクレオチド反復遺伝子座は、BAT-25およびBAT-26から選択される。

【0023】

特定の実施形態によると、本発明の方法は、5つのマイクロサテライト遺伝子座BAT-25、BAT-26、NR21、NR22およびNR24の増幅を含む。

その他の特定の実施形態によると、本発明の方法は、5つのマイクロサテライト遺伝子座BAT-25、BAT-26、NR21、NR27およびNR24の増幅を含む。

【0024】

これらの遺伝子座のそれぞれでのマイクロサテライト不安定性は、腫瘍DNAから得られる増幅産物のサイズを、プライマーの同じ組を用いて正常(すなわち、非腫瘍)DNAから得られる増幅産物のサイズと比較することにより評価される。

この比較は、プライマーの同じ組を用いて、同じ対象からの正常DNAからの増幅産物を得て、そしてそれを参照として用いることによる、通常の方法で行うことができる。

【0025】

しかしながら、本発明は、ほとんどの場合において、同じ対象からの正常DNAを増幅する必要を回避することを可能にする。代わりに、プライマーの同じ組を用いて、対象のプールの正常DNAから得られる増幅産物の平均のサイズを参照することにより、比較を行うことができる。これらの場合において、遺伝子座BAT-26の場合は、腫瘍DNAから得られる増幅産物のサイズが、プライマーの同じ組を用いて正常DNAから得られる増幅産物の平均サイズより、3bpを超えて短いときに、そして遺伝子座BAT-25、NR21、NR22、NR24およびNR27の場合は、腫瘍DNAから得られる増幅産物のサイズが、プライマーの同じ組を用いて正常DNAから得られる増幅産物の平均サイズより、2bpを超えて短いときに、マイクロサテライト不安定性が想定される。

【0026】

腫瘍のゲノムDNAは、主に生検もしくは腫瘍組織、または散在性の腫瘍細胞を含有する体液もしくは分泌物、パラフィンに包埋された組織を含む、種々の起源から得ることができる。

【0027】

本発明は、本発明の方法を行うための試薬も提供する。

特に、本発明は、NR21、NR22、NR24およびNR27から選択されるマイクロサテライト遺伝子座の増幅に適したプライマー対を提供する。

適切なプライマーは、上記のマイクロサテライト遺伝子座を取り囲むゲノム配列に由来し得る。

例えば：

- NR21の増幅を許容するプライマーは、ゲノム配列GenBank AL117258に、好ましくはその部分がSEQ ID NO: 1により表されるものに由来することが可能であり；

- NR22の増幅を許容するプライマーは、ゲノム配列GenBank AP001132に、好ましくはその部分がSEQ ID NO: 2により表されるものに由来することが可能であり；

- NR24の増幅を許容するプライマーは、ゲノム配列GenBank AC092835に、好ましくはその部分がSEQ ID NO: 3により表されるものに由来することが可能であり；

- NR27の増幅を許容するプライマーは、ゲノム配列GenBank AP001167に、好ましくはその部分がSEQ ID NO: 16により表されるものに由来することが可能である。

【0028】

一例として：

- NR21の増幅に適したプライマー対は、次のオリゴヌクレオチド：

TAAATGTATGTCTCCCTGG (SEQ ID NO: 4)

ATTCCTACTCCGCATTCACA (SEQ ID NO: 5)

からなり、

- NR22の増幅に適したプライマー対は、次のオリゴヌクレオチド：

GAGGCTTGCAAGGACATAA (SEQ ID NO: 6)

AATTCGGATGCCATCCAGTT (SEQ ID NO: 7)

からなり、

- NR24の増幅に適したプライマー対は、次のオリゴヌクレオチド：

CCATTGCTGAATTTTACCTC (SEQ ID NO: 8)

ATTGTGCCATTGCATTCCAA (SEQ ID NO: 9)

からなる。

上記のプライマーは、正常DNAに用いた場合、NR21、NR22およびNR24について、それぞれ104、143および134 bpの増幅産物を与える。

【0029】

これらは、蛍光色素で有利に標識され、多重(multiplex) PCRアッセイで用いることができる。好ましくは、類似のサイズの増幅産物(すなわち、15~20 pb未満で異なるサイズを有する)を与えるプライマーについて、異なる蛍光色素を用いることができる。これは、MSI腫瘍中のこれらのマーカーに対する5~12 bpの平均欠失のための、PCR産物のオーバーラップに起因し得る不確実さを回避することを許容する。

【0030】

異なる蛍光色素を用いるのが好ましくない場合、明らかに異なるサイズの増幅産物を得る目的で、プライマーを設計することができる(すなわち、異なるマーカー間で、少なくとも15 pb、好ましくは少なくとも20 pbで異なるサイズを有する)。これは、腫瘍DNAにおいてマイクロサテライト不安定性により欠失していたとしても、標準の電気泳動技術によりサイズベースで、マーカー間に明確な分離を許容する。

【0031】

NR21、NR24およびNR27について、明らかに区別されるサイズの増幅産物を与えるプライマーは、一例として：

- 次のオリゴヌクレオチドからなるNR21の増幅に適したプライマー対：

GAGTCGCTGGCACAGTTCTA (SEQ ID NO: 17)；

CTGGTCACTCGCGTTTACAA (SEQ ID NO: 18)；

- 次のオリゴヌクレオチドからなるNR24の増幅に適したプライマー対：

GCTGAATTTTACCTCCTGAC (SEQ ID NO: 19)；

ATTGTGCCATTGCATTCCAA (SEQ ID NO: 9) ;

- 次のオリゴヌクレオチドからなるNR27の増幅に適したプライマー対 :

AACCATGCTTGCAAACCACT (SEQ ID NO: 20) ;

CGATAATACTAGCAATGACC (SEQ ID NO: 21)

である。

正常DNAに用いた場合、上記のプライマーは、NR24、NR21およびNR27について、それぞれ131、109および87 bpの増幅産物を与える。

【 0 0 3 2 】

本発明は、NR21、NR22、NR24およびNR27から選択される少なくとも2つのマイクロサテライト遺伝子座の増幅に適した少なくとも2つのプライマー対を含むことを特徴とする、マイクロサテライト不安定性の分析のためのキットも提供する。

10

【 0 0 3 3 】

有利には、該キットは少なくとも :

- NR21の増幅に適した1つのプライマー対 ;

- NR24の増幅に適した1つのプライマー対 ;

- NR22の増幅に適したプライマー対 ; およびNR27の増幅に適したプライマー対から選択される1つのプライマー対

を含む。

【 0 0 3 4 】

好ましい実施形態によると、該キットは、さらに、NR21、NR22、NR24およびNR27とは異なる少なくとも1つのマイクロサテライト遺伝子座の増幅に適した、少なくとも1つのプライマー対を含む。好ましくは、該マイクロサテライト遺伝子座は、モノヌクレオチド反復遺伝子座である。より好ましくは、このモノヌクレオチド反復遺伝子座は、BAT-25およびBAT-26から選択される。

20

【 0 0 3 5 】

BAT-26の増幅を許容するプライマーは、ゲノム配列GenBank AC0799775に、好ましくはその部分がSEQ ID NO: 10により表されるものに由来することが可能である。

BAT-25の増幅を許容するプライマーは、ゲノム配列GenBank AC092545に、好ましくはその部分がSEQ ID NO: 11により表されるものに由来することが可能である。

【 0 0 3 6 】

一例として、本発明のキットは :

- 次のオリゴヌクレオチドからなるBAT-25の増幅に適したプライマー対 :

TCGCCTCCAAGAATGTAAGT (SEQ ID NO: 12)

TCTGCATTTTAACTATGGCTC (SEQ ID NO: 13) ;

- 次のオリゴヌクレオチドからなるBAT-26の増幅に適したプライマー対 :

TGACTACTTTTGGACTTCAGCC (SEQ ID NO: 14)

AACCATTCAACATTTTAAACCC (SEQ ID NO: 15) ;

を含む。

正常DNAに用いた場合、上記のプライマーは、BAT-26について121 bp、およびBAT-25について124 bpのフラグメントを増幅する。

40

【 0 0 3 7 】

特に、これらは、例えばNR21プライマーであるSEQ ID NO: 4および5、NR22プライマーであるSEQ ID NO: 6および7、ならびにNR24プライマーであるSEQ ID NO: 8および9と組み合わせ、異なる蛍光色素を用いる多重PCRアッセイにおいて用いることができる。

BAT-25およびBAT-26について明らかに区別されるサイズの増幅産物を得るのが好ましい場合、例えば :

- 次のオリゴヌクレオチドからなるBAT-25の増幅に適したプライマー対 :

TACCAGGTGGCAAAGGGCA (SEQ ID NO: 22) ;

TCTGCATTTTAACTATGGCTC (SEQ ID NO: 13) ;

- 次のオリゴヌクレオチドからなるBAT-26の増幅に適したプライマー対 :

50

CTGCGGTAATCAAGTTTTTAG (SEQ ID NO: 23) ;
AACCATTCAACATTTTAAACCC (SEQ ID NO: 15)

を用い得る。

正常DNAに用いた場合、上記のプライマーは、BAT-25およびBAT-26について、153および183 bpの増幅産物をそれぞれ与える。

【0038】

これらは、NR21プライマー (SEQ ID NO: 17および18) および / または NR24プライマー (SEQ ID NO: 19および9) および / または NR27プライマー (SEQ ID NO: 20および21) と組み合わせて、有利に用いることができ、サイズベースで5つのマーカーの明確な分離を許容する。

10

【0039】

任意に、本発明のキットは、さらに、DNA増幅を行うのに有用な、適切な試薬および材料を含むことができる。

【0040】

本発明の方法、試薬およびキットは、マイクロサテライト不安定性の評価の従来技術の方法と同じ使用に用いることができる。これは、主に腫瘍、特に胃腸管の腫瘍、より具体的には結腸もしくは胃の腫瘍、または子宮内膜の腫瘍のMSI表現型の診断を含む。BAT-25、BAT-26、NR21、NR22 (もしくはNR27) またはNR24遺伝子座の3つ以上で不安定性がある腫瘍は、MSI-Hであると定義される。

【0041】

20

本発明の方法は、各患者からの対応する生殖系列DNAの同時の分析を必要とせずに、特に胃腸管の腫瘍の場合に、曖昧さなしにMSI状態を確立することを許容するので、従来技術の方法よりも利点を有する。

【0042】

我々は、単一の五重PCRシステムにおけるこれらのモノヌクレオチドの同時の使用が、100%の感度、100%の特異性で腫瘍のMSI状態の正確な評価を許容することを提案する。このアッセイは、ジヌクレオチドマーカーを含むよりも用いるのが簡便であり、BAT-25およびBAT-26のみを用いるよりもより特異的である。この試験は、病院で日常的に用いて、アジュバント療法に対する応答を予想し得るものとして、予後についての情報を与えることができ、そして新規なHNPCCファミリーメンバーの検出のために用いることができる。

30

【0043】

本発明は、次に続く付加的な記載によりさらに説明され、これは本発明のモノヌクレオチドマーカーの多重PCR分析における使用の実施例に言及する。しかしながら、この実施例は、本発明の説明としてのみ与えられており、その限定を構成するものではないことが理解されるべきである。

【0044】

実施例：

材料および方法

モノヌクレオチド反復および多重ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)

3つの新規なポリ(T)反復、および1つの新規なポリ(A)反復が、それぞれ、SLC7A8 (NR21、21T)、膜貫通前駆体タンパク質B5 (NR22、22T)、ジンクフィンガー-2 (NR24、24T)、およびアポトシスプロテイン-1の阻害剤 (NR27、27A) の遺伝子の3'または5'非翻訳領域で同定された。これらの反復のプライマー配列、ならびにBAT 25およびBAT 26を含む詳細を、以下の表1に示す。

40

【0045】

【表1】

名前	遺伝子	GenBank 受け入れ (cDNA)	反復の位置	蛍光マーカ― 色	プライマー	SEQ ID NO	PCR産物 (bp)*
BAT 26	hMSH2	U04045	26(A)イントロン5	FAM ^a 青	TGACTACTTTTGACTTCAGCC AACCATTCAACATTTTAAACCC	14 15	121
BAT 25	c-kit	X06182	25(T)イントロン16	NED ^b 黄	CTGCGGTAATCAAGTTTTTAG AACCATTCAACATTTTAAACCC	23 15	183
NR21	SLC7A8	XIM_033393	21(T)5'UTR	HEX ^a 緑	TCCGCTCCAAGAATGTAAGT TCTGCATTTTAACTATGGCTC	12 13	124
NR22	推定膜貫通前駆体タンパク質 B5	L38961	22(T)3'UTR	FAM ^a 青	TACCAGGTGGCAAAAGGGCA TCTGCATTTTAACTATGGCTC	22 13	153
NR24	ジンクフィンガー2 (ZNF-2)	X60152	24(T)3'UTR	HEX ^a 緑	TAAATGTATGTCTCCCTGG ATTCTACTCCGCATTACA	4 5	104
NR27	アポトーシスプロテイン-1の阻害 剤	AF070674	27 (A) 5'UTR		GAGTCGCTGGCACAGTTCTA CTGGTCACTCGCGTTACAA	17 18	109
					GAGGCTTGTCAAGGACATAA AATTCGGATGCCATCCAGTT	6 7	143
					CCATTGCTGAATTTTACCTC ATTGTGCCATTGCATTCCAA	8 9	134
					GCTGAATTTTACCTCCTGAC ATTGTGCCATTGCATTCCAA	19 9	131
					AACCATGCTTGGCAAAACCACT CGATAATACTAGCAATGACC	20 21	87

^a: センセンスプライマー

^b: アンチセンスプライマー

*: GenBank 配列から導出される理論的なサイズ

【0046】

プライマーは、ABI PRISM 377自動化DNAシーケンサーでの5%変性ゲル上で分離されることとなる、異なるPCR産物のサイズを許容するように設計された。各蛍光PCR産物のサイズ、高さおよび面積を算出するのにGENESCANソフトウェア (GENOTYPER 2.1) を用いた。

【0047】

次のプライマーを、以下に記載する実験に用いた：

- BAT 26プライマー：SEQ ID NO: 14およびSEQ ID NO: 15；
- BAT 25プライマー：SEQ ID NO: 12およびSEQ ID NO: 13；
- NR21 プライマー：SEQ ID NO: 4およびSEQ ID NO: 5；
- NR22プライマー：SEQ ID NO: 6およびSEQ ID NO: 7；
- NR24プライマー：SEQ ID NO: 8およびSEQ ID NO: 9。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 8 】

各対の1つのプライマーを、FAM、HEXまたはNED (PE APPLIED BIOSYSTEMS)の蛍光マーカーの1つで標識した。5つのモノヌクレオチド反復を、20 μMの各プライマー、200 μM dNTP、1.5 mM MgCl₂および0.75ユニットのTaq DNAポリメラーゼを含む、1回の多重PCRで増幅した。PCRを、次の条件を用いて行った：94 で5分間の変性、94 で30秒間の変性を35サイクル、55 で30秒間のアニーリング、そして72 で30秒間の伸長、それに続いて72 で7分間の伸長工程。

【 0 0 4 9 】

DNAサンプル

生殖系列DNAを、パリのCentre d'Etudes du Polymorphisme Humain (CEPH)で128人の白色人種の個体から、および56人のアフリカ系の個体から得た。

以前に、いくつかのジヌクレオチドマーカーならびにBAT-25およびBAT-26モノヌクレオチドマーカー(147件)、またはBAT26およびBAT25のみ(63件)を用いてMSIについて試験された、全体で124の結腸腫瘍、50の胃腫瘍、10の子宮内膜腫瘍、および16の結腸細胞株(HOANGら、Cancer Res., 57(2)、300~303、1997; SERUCAら、Int. J. Cancer、64、32~36、1995; TIBELETTIら、Gynecol. Oncol., 73(2)、247~252、1999)。これらのうち、全体で81の原発結腸腫瘍、42の原発胃癌腫、20の原発子宮内膜腫瘍、および5の結腸腫瘍細胞株は、上記の反復での欠失に基づいて、MSI-Hであるとみなされた。

【 0 0 5 0 】

結果蛍光多重PCR

5つのモノヌクレオチドマーカーであるBAT-25、BAT-26、NR21、NR22およびNR24を、上記のPCR条件を用いて単一の多重PCRミックス中で共増幅(co-amplified)し、自動化DNAシーケンサーでサイズを分析した。これらの条件において、100~142 bpサイズの範囲内の非特異的バンドは観察されず、したがって、5つのマーカーの正確な同定を許容した。

【 0 0 5 1 】

図1は、(a) 生殖系列から、またはMSS腫瘍からのDNA中のBAT25、BAT26、NR21、NR22およびNR24、(b) 欠失、および正常サイズの対立遺伝子の両方を示すMSI-H原発腫瘍、ならびに(c) 同型接合欠失を示すMSI-H細胞株の典型的な対立遺伝子プロフィールを示す。

図1aは、各マーカーについて観察された蛍光ピークの例を示し、この場合は生殖系列DNA中にみられる最も一般的な対立遺伝子のサイズを表す。

【 0 0 5 2 】

PCR産物および対応する蛍光ラベルのサイズは、通常サイズの対立遺伝子と、MSI-H腫瘍中に一般的にみられる欠失を含む、より小さいサイズの対立遺伝子との同時の分析を許容するように選択された(図1b)。より小さい対立遺伝子に加えて、ほとんどのMSI-H原発腫瘍も、非癌性細胞の混入から生じると推定される、通常サイズの対立遺伝子を示した。

これらは、図1cに示す同型接合変異体MSI-H細胞株にはなかった。

BAT-25、BAT-26、NR21、NR22およびNR24についての最も一般的な対立遺伝子のサイズは、各反復について、PCR産物のサイズを表すピークの位置にわずかな変動が観察されたが、それぞれ、124、120、103、142および132 bpであった(図2)。

【 0 0 5 3 】

図2の凡例：

【表 2】

- ☒ = BAT-25
- = BAT-26
- ▣ = NR21
- ▤ = NR22
- ▥ = NR24

10

20

30

40

50

【 0 0 5 4 】

これらの変動を説明するために、BAT-25、NR21、NR22およびNR24対立遺伝子について 3 pb、およびBAT-26対立遺伝子のサイズについて 4 pbを、多型または体細胞変化(somatic alterations)とみなした。

【 0 0 5 5 】

生殖系列DNAの多型

以下の表3 - 1に示すように、各マーカーは、血縁のない白色人種からの128の生殖系列DNAサンプル(CEPHサンプル)において、少なくとも95%の単形であった。

【 0 0 5 6 】

【表 3 - 1】

		BAT-26	BAT-25	NR21	NR22	NR24
生殖系列 白色人種	生殖系列 DNA	128/128 (100%)	126/128 (98.4%)	122/128 (95.3%)	128/128 (100%)	128/128 (100%)
生殖系列 アフリカ人	生殖系列 DNA	51/56 (91.1%)	44/56 (78.6%)	54/56 (96.1%)	56/56 (100%)	52/56 (92.9%)

【 0 0 5 7 】

さらに、この個体群の121 (94.5%)が、5つ全ての反復において単形であり、残りの7個体(5.5%)は、4/5のマーカーにおいて単形であった。いずれのCEPH DNAサンプルも、5つの反復のうち1つ以上において多型を含んでいなかった。多型は、アフリカ人の生殖系列DNAにおいてより一般的であり、BAT 25が、21.4%で最高レベルの多型を有していた。興味深いことに、試験された56のアフリカ人の生殖系列DNAサンプルのうち、37 (66.1%)が5つ全ての反復において単形であったが、15 (26.8%)が1/5のマーカーについて、そして4 (7.1%)が2/5のマーカーについて多型を示した。いずれの生殖系列DNAサンプルも、>2/5のマーカーにおいて多型でなかった。これらのデータを図3にも示す。

【 0 0 5 8 】

MSI-H腫瘍の同定

上記の基準を用いて、各モノヌクレオチド反復について観察された平均欠失を、MSI-Hの胃および結腸の腫瘍において算出した。異なるタイプのDNAにおける5つのマーカーの感度、特異性および平均欠失を、以下の表3 - 2に示す。

【 0 0 5 9 】

【表 3 - 2】

		BAT-26	BAT-25	NR21	NR22	NR24
結腸	平均欠失	11.9	7.3	6.8	5.1	5.6
	MSI-H (感度)	77/77 (100%)	72/72 (100%)	78/78 (100%)	77/79 (97.5%)	72/75 (96%)
	MSS (特異性)	42/43 (97.7%)	44/44 (100%)	43/44 (97.7%)	45/45 (100%)	43/44 (97.7%)
結腸細胞株	平均欠失	11	7.8	7.4	4.4	7.6
	MSI-H (感度)	4/4 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)
	MSS (特異性)	11/11 (100%)	11/11 (100%)	11/11 (100%)	11/11 (100%)	10/10 (100%)
胃	平均欠失	12	7.2	6.8	4.9	5
	MSI-H (感度)	39/39 (100%)	39/39 (100%)	37/39 (94.9%)	38/39 (97.4%)	26/30 (86.7%)
	MSS (特異性)	8/11 (72.7%)	10/11 (90.9%)	10/10 (100%)	10/11 (90.9%)	11/11 (100%)
子宮内膜	平均欠失	5.9	4.6	3.9	2.9	2.4
	MSI-H (感度)	15/17 (88.2%)	18/19 (94.7%)	17/19 (89.5%)	14/19 (73.7%)	10/16 (62.5%)

【 0 0 6 0 】

BAT-26について、平均欠失は約12 bpであるか、またはその他のマーカーでみられる欠失の平均長の約2倍であった。各モノヌクレオチド反復は、MSI-H腫瘍中で、>86%の感度で欠失された。多型または体細胞変異による対立遺伝子のシフトは、非-MSI腫瘍においては希であり、これらのマーカーのそれぞれによるMSIの検出の特異性の高い程度となるが、その特異性が、以下に論じるような6の腫瘍の以前の誤った分類のために低下されたBAT-26は、例外である。

【 0 0 6 1 】

104の結腸および胃の腫瘍、ならびに以前にMSI-Hと同定された細胞株の全体は、5つ全てのマーカーについての増幅データを示した。腫瘍は、全て(88腫瘍)、または4/5 (9腫瘍)のモノヌクレオチド反復のいずれかにおいて欠失を示した(図3)。1つのサンプルのみが、3/5のマーカーにおいて欠失を示した。以前にMSI-Hと同定された5件において、Bat-26またはBat-25のみにおいて、サイズの変化がみられた；これらのサンプルは、人種多型(4件)または境界短縮(borderline shortening) (1件)のために誤って分類されたとみなされた。最後に、さらなる腫瘍サンプルは、BAT-26ではなくジヌクレオチド反復を用いて、以前にMSI-Hと分類された(HOANGら、Cancer Res., 59(1)、300~303、1997)。このサンプルは、本研究において用いた5つ全てのモノヌクレオチド反復について多型であり、おそらく生殖系列DNAが腫瘍DNAと一致しなかった事実のために、ジヌクレオチド反復を用いて誤って分類されたことを示唆した。表3および図3において、これらの6つのサンプルは、MSSとみなされた。

【 0 0 6 2 】

55の結腸および胃の腫瘍、ならびに以前にMSSと分類され、かつ5つ全ての反復についてのデータを持つ細胞株のうち、53 (96.4%)が、5つ全てのマーカーにおいて単形であった。1つの腫瘍は、4のマーカー(2%)において単形であり、1つの腫瘍は、3/5 (2%)の反復において単形であった。55のMSS腫瘍のいずれも、3以上の反復において対立遺伝子のシフトを示さず(図3)、まだ上記の2/5の反復の多型のMSI同定基準に従っていた。

【 0 0 6 3 】

これらの結果は、図 3 により示され、これは白色人種の生殖系列 DNA(□)、アフリカ人の生殖系列 DNA(■)、MSS 腫瘍(▨)、MSI-H 結腸直腸腫瘍(⊠)、および MSI-H 胃腫瘍(⊡)での 5 つのモノヌクレオチド反復中の対立遺伝子サイズシフトがあるサンプルのパーセンテージを示す。

【 0 0 6 4 】

3つのモノヌクレオチド反復であるNR21、NR22およびNR24は、生殖系列DNAにおいて擬単形であり、BAT-25およびBAT-26と同様に、MSI-H腫瘍中の体細胞欠失に高度に敏感である。MSS腫瘍からのMSI-Hの相違点は、これらの3つの新規なマーカーがBAT-25およびBAT-26と共に用いられるときに、明白である。これらの5つのマーカーの多重PCRは、各患者からの対応する生殖系列DNAの同時の分析への必要性を回避するという、付加的な利点を有する。

【 0 0 6 5 】

3つの新規なモノヌクレオチド反復の擬単形の性質は、種々の個体群において完全に確立されずに残っているが、128件の白色人種および56件のアフリカ人の生殖系列DNAのいずれも、反復の2以上において多型を有さなかった。5マーカーの成功した増幅と共に、ここで検査された全ての98の真のMSI-H腫瘍が少なくとも3マーカーでの欠失を示したので、5マーカーのうちの3以上における多型を原因とするMSI結果の誤った解釈の可能性は、統計的にほんのわずかである。したがって、5つ全ての反復からの結果を一緒に分析したときに、この全体の159の腫瘍の列のMSI状態は、100%の感度および特異性で明白に決定された。さらに、これは、対応する生殖系列DNAを分析する必要なしに達成された。

【 0 0 6 6 】

以下の表4は、BAT-26またはBAT-25での多型または境界の欠失が、対応する腫瘍のMSI状態を誤って分類したであろう腫瘍を示す。全ての場合において、多重のパネルの使用は、

腫瘍を明白に分類することを許容した。

【0067】

【表4】

五重 PCR を用いて MSS と再分類された MSI-H 腫瘍

MSS	BAT-26	BAT-25	NR21	NR22	NR24
多型	11	2	0	0	0
	11	0	0	0	0
	11	0	0	0	0
	12	0	0	0	0
境界欠失	0	4	0	0	0
ジヌクレオチド反復においてのみ不安定性	0	0	0	0	0

10

【0068】

結腸および胃の腫瘍からのさらなる31のDNAサンプル中、5つのマーカーのうち4つだけが正確に増幅された。これはおそらく、ホルマリンで固定され、そしてパラフィンに包埋された組織から抽出されたDNAの質による。これらの事例のうち24が、4/4または3/4の不安定性遺伝子座を示し、そしてMSI-Hであると正確に同定され、0/4または1/4の不安定性遺伝子座を示す残りの7件が、MSSと正確に同定された(結果は示していないが、表3に含まれる)。したがって、5つの反復の不完全な増幅は、困難なDNAのMSI状態を同定するのに有効に用いることができた。

【0069】

20

我々は、以前に、子宮内膜MSI-H腫瘍が、胃腸MSI H腫瘍に比べて、不安定性にかなりの量的および質的な違いを示すことを観察している(DUVALら、Cancer Res., 62, 1609~1612, 2002)。本研究では、MSI-Hと知られている20の子宮内膜腫瘍も、同じ蛍光五重アッセイを用いて試験された。これらの腫瘍は、MSI-Hの胃腸の腫瘍に比べて、5つ全てのモノヌクレオチド反復マーカー中に、有意により短い平均長の欠失を示した(表3)。このマイクロサテライトパネルを用いて確立されたMSI検出基準を用いて、17/20の子宮内膜腫瘍がMSI-Hであると同定され、1の腫瘍が、MSSと同定された(データは示さず)。5つ全てのマーカーにおいて観察された非常に小さい対立遺伝子のシフトのために、残りの2つの腫瘍のMSI状態を決定的に同定することはできなかった。

【0070】

30

よって、以前に誤って分類された6のサンプルを含む、本実験で試験された190の全ての結腸および胃の腫瘍、ならびに細胞株のMSI状態を効率的に同定することが可能であった。MSI-H子宮内膜の腫瘍中に見られたより小さいサイズの対立遺伝子のシフトのために、我々は、この癌のタイプの日常的なMSIスクリーニングのために生殖系列DNAを調和させる、継続した分析を勧める。

【0071】

蓄積された証拠は、MSI状態が、特徴的な生物学的および臨床的特性と共に、直腸結腸の癌のサブセットを定義し、検出のための簡便で正確なマーカーの重要性を強調することを示唆する。5つのモノヌクレオチドマーカーのこの組は、BAT-25およびBAT-26のみよりも、より高い感度および特異性で腫瘍のMSI状態を決定し、ベテスダコンセンサス会議で推薦されたパネルよりも、用いるのが技術的により単純である。

40

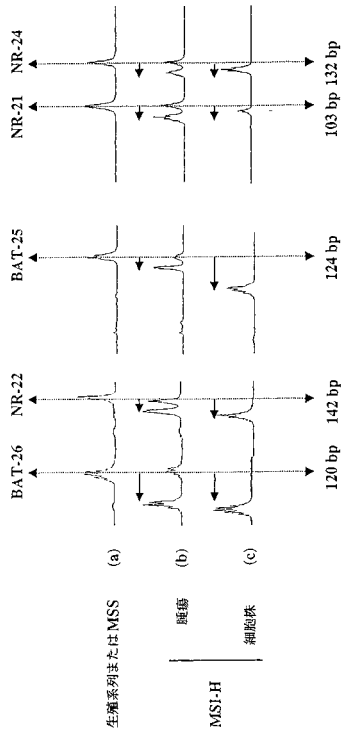
【図面の簡単な説明】

【0072】

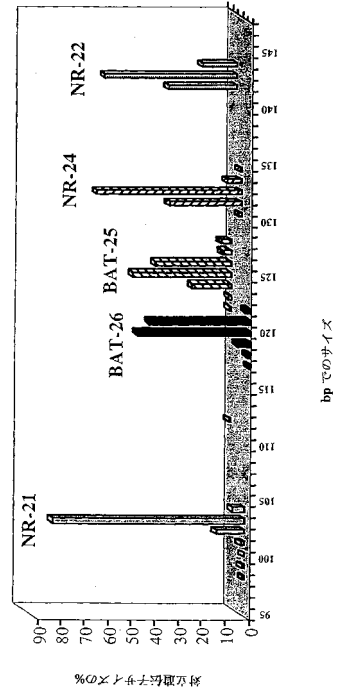
【図1】図1は、(a) 生殖系列から、またはMSS腫瘍からのDNA中のBAT25、BAT26、NR21、NR22およびNR24、(b) 欠失、および正常サイズの対立遺伝子の両方を示すMSI-H原発腫瘍、ならびに(c) 同型接合欠失を示すMSI-H細胞株の典型的な対立遺伝子プロフィールを示す。

。

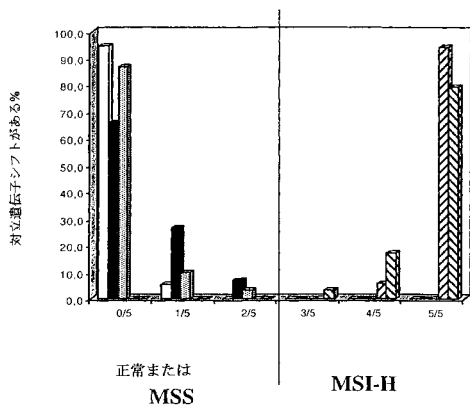
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【配列表】

0004436685000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100065248

弁理士 野河 信太郎

(72)発明者 ハメリン, リチャード

フランス、エフ - 7 5 0 1 9 パリ、アレ パーネットテ ドウ ガレット 4

(72)発明者 サラウエエラ, ニローシャ

イギリス、ハイ ウィカム エイチピー 1 3 7、ハウソーネ ロード 5

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 Oncogene, 1 9 9 2年, Vol.7, No.4, p.635-41

GASTROENTEROLOGY, 2 0 0 2年1 2月, Vol.123, p.1804-1811

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12Q 1/68

C12N 15/00-15/90

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

REGISTRY(STN)

PubMed