

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第7109462号**  
**(P7109462)**

(45)発行日 令和4年7月29日(2022.7.29)

(24)登録日 令和4年7月21日(2022.7.21)

(51)国際特許分類

C 1 2 Q	1/6806(2018.01)	F I	C 1 2 Q	1/6806	Z Z N A
C 1 2 Q	1/686(2018.01)		C 1 2 Q	1/686	Z
C 1 2 Q	1/6837(2018.01)		C 1 2 Q	1/6837	Z
C 1 2 Q	1/68 (2018.01)		C 1 2 Q	1/68	
C 1 2 Q	1/6869(2018.01)		C 1 2 Q	1/6869	Z

請求項の数 34 (全43頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-544790(P2019-544790)  
 (86)(22)出願日 平成29年10月27日(2017.10.27)  
 (65)公表番号 特表2020-500551(P2020-500551  
 A)  
 (43)公表日 令和2年1月16日(2020.1.16)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/058789  
 (87)国際公開番号 WO2018/081580  
 (87)国際公開日 平成30年5月3日(2018.5.3)  
 審査請求日 令和2年10月22日(2020.10.22)  
 (31)優先権主張番号 62/413,708  
 (32)優先日 平成28年10月27日(2016.10.27)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 62/523,511  
 (32)優先日 平成29年6月22日(2017.6.22)  
 最終頁に続く

(73)特許権者 519156524  
 ジェネオスコピー インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 6 3 1 2 4 ミズーリ州  
 セントルイス クレイトン ロード 9 3  
 0 0  
 (74)代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74)代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74)代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74)代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊  
 (74)代理人 100142929  
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 検出方法

**(57)【特許請求の範囲】****【請求項1】**

糞便試料から真核生物の核酸を単離する方法であって、

a ) 懸濁物を形成するために、前記試料を緩衝液、界面活性剤、およびリボヌクレアーゼ阻害剤と混合する工程と、

b ) 前記懸濁物を真核細胞に富む部分と細菌細胞に富む部分とに分離する工程および前記真核細胞に富む部分を保持する工程と、

c ) 溶解物を形成するために、前記真核細胞に富む部分にカオトロピック剤および任意選択的に界面活性剤を添加する工程と、

d ) 前記溶解物を、細胞片層、真核生物の核酸を含む層、および脂質層に分画する工程と、

e ) 前記真核生物の核酸を含む層および任意選択的に前記脂質層を回収する工程とを含み、

前記核酸が、RNA、総RNA、mRNA、tRNA、rRNA、ncRNA、smRNA、もしくはsnorRNA、またはRNA、総RNA、mRNA、tRNA、rRNA、ncRNA、smRNA、もしくはsnorRNAのうちのいずれかの組み合わせを含む、方法。

**【請求項2】**

糞便試料を提供することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項3】**

前記糞便試料がヒトの糞便試料である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記糞便試料が非ヒト動物の糞便試料である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記非ヒト動物が、イヌ、ネコ、非ヒト靈長類、反すう動物、クマ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、水牛、シカ、エルク、ムース、イタチ、ウサギ、モルモット、ハムスター、ラット、マウス、厚皮動物、サイ、およびチンチラからなる群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記非ヒト動物がイヌである、請求項 5 に記載の方法。

10

**【請求項 7】**

前記非ヒト動物がネコである、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記分離工程が遠心分離を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記分離工程がカラムベースの方法を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記分離工程が、真核細胞に結合する標的指向化プローブを利用する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記分離工程が示差的濾過を利用する、請求項 1 に記載の方法。

20

**【請求項 12】**

工程 a および b が、1、2、3、4 回またはそれ以上繰り返される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記分画工程が遠心分離を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記分画工程が、真核生物の核酸に特異的に結合する標的指向化プローブを利用する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記分画工程が示差的濾過を利用する、請求項 1 に記載の方法。

30

**【請求項 16】**

工程 d および e が 2 回以上繰り返される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記真核生物の核酸を含む層が小口径チップを使用して回収される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 18】**

回収された前記真核生物の核酸を含む層から前記真核生物の核酸を抽出する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 19】**

前記抽出工程が、磁性粒子ベース、カラムベース、フィルタベース、ビーズベース、または有機溶媒ベースの方法である、請求項 18 に記載の方法。

40

**【請求項 20】**

前記核酸が、R N A、総 R N A、m R N A、または R N A、総 R N A、もしくは m R N A のうちのいずれかの組み合わせを含む、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 21】**

糞便試料中の真核生物バイオマーカーを検出する方法であって、請求項 18 に記載の方法によって核酸を抽出し、当該核酸をマイクロアレイ配列決定、分子バーコード化、プローブ捕捉、ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R )、d d P C R、R T - P C R、R T - q P C R、または核酸配列決定によって分析する工程を含む、方法。

50

**【請求項 2 2】**

前記真核生物バイオマーカーが、図 6（パネル A）または図 13（パネル B）に列挙されたバイオマーカーから選択される、請求項 2 1 に記載の方法。

**【請求項 2 3】**

前記真核生物バイオマーカーが、B 細胞マーカー、T 細胞マーカー、または免疫グロブリンである、請求項 2 1 に記載の方法。

**【請求項 2 4】**

対象に大腸癌の危険性があるかどうかを判定する方法であって、

a ) 請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項記載の方法に従ってヒト核酸を単離し、前記対象由來の生物学的試料中の、図 6（パネル A）または図 13（パネル B）に列挙された結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のうちのいずれかから選択される 2 つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の発現レベルを測定する工程と、

b ) 前記生物学的試料中の前記 2 つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の前記測定された発現レベルを、対照中の前記 2 つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の測定された発現レベルと比較する工程であって、前記対照中の前記 2 つ以上の遺伝子の前記測定された発現レベルに対する前記生物学的試料中の前記 2 つ以上の遺伝子の前記測定された発現レベルにおける差は、前記対象に大腸癌の危険性があることを示す、工程とを含む、方法。

**【請求項 2 5】**

前記結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子が、図 5 A に示される 2 0 0 個の示差的に発現される転写物クラスター内に含まれ、かつ図 5 B に示される大腸癌に関連する共通経路内に含まれる、請求項 2 4 に記載の方法。

**【請求項 2 6】**

前記結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子が、図 6（パネル A）または図 13（パネル B）に列挙されたバイオマーカーから選択される、請求項 2 4 に記載の方法。

**【請求項 2 7】**

大腸癌を有するかまたはその危険性がある対象についての臨床計画を選択するのを補助する方法であって、

a ) 請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項記載の方法に従ってヒト核酸を単離し、前記対象由來の生物学的試料中の、図 6（パネル A）または図 13（パネル B）に列挙された結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のうちのいずれかから選択される 2 つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の発現レベルを測定する工程と、

b ) 前記生物学的試料中の前記 2 つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の前記測定された発現レベルを、対照中の前記 2 つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の測定された発現レベルと比較する工程であって、前記対照中の前記 2 つ以上の遺伝子の前記測定された発現レベルに対する前記生物学的試料中の前記 2 つ以上の遺伝子の前記測定された発現レベルにおける差は、前記対象が大腸癌を有するかまたはその危険性があることを示す、工程と、

c ) 工程 b に基づいて臨床計画を選択するのを補助する工程とを含む、方法。

**【請求項 2 8】**

前記結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子が、図 5 A に示される 2 0 0 個の示差的に発現される転写物クラスター内に含まれ、かつ図 5 B に示される大腸癌に関連する共通経路内に含まれる、請求項 2 7 に記載の方法。

**【請求項 2 9】**

前記結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子が、図 6（パネル A）または図 13（パネル B）に列挙されたバイオマーカーから選択される、請求項 2 7 に記載の方法。

**【請求項 3 0】**

非ヒト動物に胃腸障害の危険性があるかどうかを判定する方法であって、

a ) 請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項記載の方法に従って非ヒト動物核酸を単離し、対象

10

20

30

40

50

由来の生物学的試料中の1つ以上のB細胞、T細胞、または免疫グロブリン遺伝子の発現レベルを測定する工程と、

b) 前記試料中の前記1つ以上のB細胞、T細胞、または免疫グロブリン遺伝子の前記測定された発現レベルを、対照中の1つ以上のB細胞、T細胞、または免疫グロブリン遺伝子の測定された発現レベルと比較する工程であって、前記対照中の前記1つ以上の遺伝子の前記測定された発現レベルに対する前記生物学的試料中の前記1つ以上の遺伝子の前記測定された発現レベルにおける差は、前記対象に胃腸障害の危険性があることを示す、工程と

を含む、方法。

**【請求項31】**

前記胃腸障害が、胃腸リンパ腫または炎症性腸疾患を含む、請求項30に記載の方法。

**【請求項32】**

前記非ヒト動物がネコである、請求項30に記載の方法。

**【請求項33】**

前記非ヒト動物がイヌである、請求項30に記載の方法。

**【請求項34】**

前記生物学的試料が糞便試料を含む、請求項30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10月27日に出願された米国仮特許出願第62/413,708号、2017年6月22日に出願された米国仮特許出願第62/523,511号、および2017年8月17日に出願された米国仮特許出願第62/547,046号の優先権を主張し、それらの開示内容は、それらの全体が参考により本明細書に明示的に組み込まれる。

**【0002】**

発明の分野

本発明は、糞便試料からの真核生物の核酸の抽出、ならびに腸疾患の診断および治療のための当該核酸の使用に関する。

**【背景技術】**

**【0003】**

背景

胃腸障害、例えば、胃腸癌ならびに炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、およびクローン病などの他の消化器疾患が広まっている。米国では、胃腸障害は、年間6000万人～7000万人が罹患していると推定されている。一部の疾患では、早期のスクリーニングおよび診断により、死亡率が低下し、患者の生活の質が向上した。しかしながら、結腸鏡検査などの標準的な診断方法は、侵襲的で、時間がかかり、かつ比較的高い費用を伴う。胃腸障害はまた、動物、例えば、ネコおよびイヌなどのペットとして飼われている動物にも影響を及ぼし得る。そのような障害についてスクリーニングする獣医学的方法も、同様に侵襲的であり、かつ費用がかかる。ヒトおよび動物の両方において胃腸障害を診断するための非侵襲的方法に対する継続的な必要性がある。

**【発明の概要】**

**【0004】**

概要

糞便試料から真核生物の核酸を単離するための材料および方法を本明細書に提供する。本方法は、懸濁物を形成するために、試料を緩衝液、界面活性剤、およびリボヌクレアーゼ阻害剤と混合する工程と、懸濁物を真核細胞に富む部分と細菌細胞に富む部分とに分離する工程および、真核細胞に富む部分を保持する工程と、溶解物を形成するために、真核細胞に富む部分にカオトロピック剤および任意選択的に界面活性剤を添加する工程と、溶

10

20

30

40

50

解物を、細胞片層、真核生物の核酸を含む層、および脂質層に分画する工程と、真核生物の核酸を含む層および任意選択的に脂質層を回収する工程と、を含み得る。糞便試料は、ヒトまたは非ヒト動物の糞便試料であり得る。いくつかの実施形態では、非ヒト動物の糞便試料は、イヌまたはネコから得られた試料であり得る。本方法は、回収された真核生物の核酸を含む層から真核生物の核酸を抽出する工程をさらに含み得る。核酸は、DNA、RNA、総RNA、mRNA、tRNA、rRNA、ncRNA、smRNA、もしくはsnORNA、またはDNA、RNA、総RNA、mRNA、tRNA、rRNA、ncRNA、smRNA、もしくはsnORNAのうちのいずれかの組み合わせを含み得る。

#### 【0005】

糞便試料中の真核生物バイオマーカーを検出するための材料および方法も提供する。本方法は、抽出された核酸をマイクロアレイ配列決定、分子バーコード化、プローブ捕捉、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、ddPCR、RT-PCR、RT-qPCR、または核酸配列決定によって分析する工程を含み得る。いくつかの実施形態では、真核生物バイオマーカーは、図6（パネルA）または図13（パネルB）に列挙されたバイオマーカーから選択される。いくつかの実施形態では、真核生物バイオマーカーは、B細胞マーカー、T細胞マーカー、または免疫グロブリンであり得る。

#### 【0006】

対象に大腸癌の危険性があるかどうかを判定するための方法も提供する。本方法は、対象由来の生物学的試料中の、図6（パネルA）または図13（パネルB）に列挙された結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のうちのいずれかから選択される2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の発現レベルを測定する工程と、試料中の2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の前記測定された発現レベルを、対照中の2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の測定された発現レベルと比較する工程であって、対照中の2つ以上の遺伝子の測定された発現レベルに対する生物学的試料中の2つ以上の遺伝子の測定された発現レベルにおける差は、対象に大腸癌の危険性があることを示す、比較する工程と、を含み得る。いくつかの実施形態では、結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子は、図5Aに示される200個の示差的に発現される転写物クラスター内に含まれ得、かつ図5Bに示される大腸癌に関連する共通経路内に含まれ得る。いくつかの実施形態では、結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子は、図6（パネルA）または図13（パネルB）に列挙されたバイオマーカーから選択され得る。

#### 【0007】

大腸癌を有するかまたはその危険性がある対象についての臨床計画のための材料および方法も提供する。本方法は、対象由来の生物学的試料中の、図6（パネルA）または図13（パネルB）に列挙された結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のうちのいずれかから選択される2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の発現レベルを測定する工程と、試料中の2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の測定された発現レベルを、対照中の2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の測定された発現レベルと比較する工程であって、対照中の2つ以上の遺伝子の測定された発現レベルに対する2つ以上の遺伝子の測定された発現レベルにおける差は、対象が大腸癌を有するかまたはその危険性があることを示す、工程と、対照中の2つ以上の遺伝子の測定された発現レベルに対する2つ以上の遺伝子の測定された発現レベルにおける差は、対象が大腸癌を有するかまたはその危険性があることを示すことに基づいて臨床計画を選択する工程と、を含み得る。

#### 【0008】

非ヒト動物に胃腸障害の危険性があるかどうかを判定するための方法も提供する。本方法は、対象由来の生物学的試料中の1つ以上のB細胞、T細胞、または免疫グロブリン遺伝子の発現レベルを測定する工程と、試料中の1つ以上のB細胞、T細胞、または免疫グロブリン遺伝子の測定された発現レベルを、対照中の1つ以上のB細胞、T細胞、または免疫グロブリン遺伝子の測定された発現レベルと比較する工程であって、対照中の1つ以上の遺伝子の測定された発現レベルに対する生物学的試料中の1つ以上の遺伝子の測定された発現レベルにおける差は、対象に胃腸障害の危険性があることを示す、工程と、を含

10

20

30

40

50

み得る。胃腸障害は、胃腸リンパ腫または炎症性腸疾患であり得る。非ヒト動物はネコまたはイヌであり得る。生物学的試料は糞便試料であり得る。

[本発明1001]

- 糞便試料から真核生物の核酸を単離する方法であって、
- a ) 懸濁物を形成するために、前記試料を緩衝液、界面活性剤、およびリボヌクレアーゼ阻害剤と混合する工程と、
- b ) 前記懸濁物を真核細胞に富む部分と細菌細胞に富む部分とに分離する工程および前記真核細胞に富む部分を保持する工程と、
- c ) 溶解物を形成するために、前記真核細胞に富む部分にカオトロピック剤および任意選択的に界面活性剤を添加する工程と、
- d ) 前記溶解物を、細胞片層、真核生物の核酸を含む層、および脂質層に分画する工程と、
- e ) 前記真核生物の核酸を含む層および任意選択的に前記脂質層を回収する工程とを含む、方法。

[本発明1002]

- 糞便試料を提供することをさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1003]

- 前記糞便試料がヒトの糞便試料である、本発明1001の方法。

[本発明1004]

- 前記糞便試料が非ヒト動物の糞便試料である、本発明1001の方法。

[本発明1005]

- 前記非ヒト動物が、イヌ、ネコ、非ヒト靈長類、反すう動物、クマ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、水牛、シカ、エルク、ムース、イタチ、ウサギ、モルモット、ハムスター、ラット、マウス、厚皮動物、サイ、およびチンチラからなる群から選択される、本発明1004の方法。

[本発明1006]

- 前記非ヒト動物がイヌである、本発明1005の方法。

[本発明1007]

- 前記非ヒト動物がネコである、本発明1005の方法。

[本発明1008]

- 前記分離工程が遠心分離を含む、本発明1001の方法。

[本発明1009]

- 前記分離工程がカラムベースの方法を含む、本発明1001の方法。

[本発明1010]

- 前記分離工程が、真核細胞に結合する標的指向化プローブを利用する、本発明1001の方法。

[本発明1011]

- 前記分離工程が示差的濾過を利用する、本発明1001の方法。

[本発明1012]

- 工程aおよびbが、1、2、3、4回またはそれ以上繰り返される、本発明1001の方法。

[本発明1013]

- 前記分画工程が遠心分離を含む、本発明1001の方法。

[本発明1014]

- 前記分画工程が、真核生物の核酸に特異的に結合する標的指向化プローブを利用する、本発明1001の方法。

[本発明1015]

- 前記分画工程が示差的濾過を利用する、本発明1001の方法。

[本発明1016]

- 工程dおよびeが2回以上繰り返される、本発明1001の方法。

[本発明1017]

10

20

30

40

50

前記真核生物の核酸を含む層が小口径チップを使用して回収される、本発明1001の方法

—  
[本発明1018]

回収された前記真核生物の核酸を含む層から前記真核生物の核酸を抽出する工程をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1019]

前記抽出方法が、磁性粒子ベース、カラムベース、フィルタベース、ビーズベース、または有機溶媒ベースの方法である、本発明1001の方法。

[本発明1020]

前記核酸が、DNA、RNA、総RNA、mRNA、tRNA、rRNA、ncRNA、smRNA、もしくはsnRNA、またはDNA、RNA、総RNA、mRNA、tRNA、rRNA、ncRNA、smRNA、もしくはsnRNAのうちのいずれかの組み合わせを含む、本発明1001の方法。

10

[本発明1021]

糞便試料中の真核生物バイオマーカーを検出する方法であって、本発明1001の抽出された核酸をマイクロアレイ配列決定、分子バーコード化、プローブ捕捉、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、ddPCR、RT-PCR、RT-qPCR、または核酸配列決定によって分析する工程を含む、方法。

[本発明1022]

前記真核生物バイオマーカーが、図6（パネルA）または図13（パネルB）に列挙されたバイオマーカーから選択される、本発明1021の方法。

20

[本発明1023]

前記真核生物バイオマーカーが、B細胞マーカー、T細胞マーカー、または免疫グロブリンである、本発明1021の方法。

[本発明1024]

対象に大腸癌の危険性があるかどうかを判定する方法であって、

a) 前記対象由来の生物学的試料中の、図6（パネルA）または図13（パネルB）に列挙された結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のうちのいずれかから選択される2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の発現レベルを測定する工程と、

b) 前記生物学的試料中の前記2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の前記測定された発現レベルを、対照中の前記2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の測定された発現レベルと比較する工程であって、前記対照中の前記2つ以上の遺伝子の前記測定された発現レベルに対する前記生物学的試料中の前記2つ以上の遺伝子の前記測定された発現レベルにおける差は、前記対象に大腸癌の危険性があることを示す、工程とを含む、方法。

30

[本発明1025]

前記生物学的試料が、本発明1001～1020のいずれかの方法に従って単離されたヒト核酸を含む、本発明1024の方法。

[本発明1026]

前記結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子が、図5Aに示される200個の示差的に発現される転写物クラスター内に含まれ、かつ図5Bに示される大腸癌に関連する共通経路内に含まれる、本発明1024の方法。

40

[本発明1027]

前記結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子が、図6（パネルA）または図13（パネルB）に列挙されたバイオマーカーから選択される、本発明1024の方法。

[本発明1028]

大腸癌を有するかまたはその危険性がある対象についての臨床計画を選択する方法であって、

a) 前記対象由来の生物学的試料中の、図6（パネルA）または図13（パネルB）に列挙された結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のうちのいずれかから選択される2つ以上

50

の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の発現レベルを測定する工程と、

b ) 前記生物学的試料中の前記2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の前記測定された発現レベルを、対照中の前記2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の測定された発現レベルと比較する工程であって、前記対照中の前記2つ以上の遺伝子の前記測定された発現レベルに対する前記生物学的試料中の前記2つ以上の遺伝子の前記測定された発現レベルにおける差は、前記対象が大腸癌を有するかまたはその危険性があることを示す、工程と、

c ) 工程bに基づいて臨床計画を選択する工程と  
を含む、方法。

[本発明1029]

10

前記生物学的試料が、本発明1001～1020のいずれかの方法に従って単離されたヒト核酸を含む、本発明1028の方法。

[本発明1030]

前記結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子が、図5Aに示される200個の示差的に発現される転写物クラスター内に含まれ、かつ図5Bに示される大腸癌に関連する共通経路内に含まれる、本発明1028の方法。

[本発明1031]

前記結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子が、図6(パネルA)または図13(パネルB)に列挙されたバイオマーカーから選択される、本発明1028の方法。

[本発明1032]

20

非ヒト動物に胃腸障害の危険性があるかどうかを判定する方法であって、

a ) 対象由来の生物学的試料中の1つ以上のB細胞、T細胞、または免疫グロブリン遺伝子の発現レベルを測定する工程と、

b ) 前記試料中の前記1つ以上のB細胞、T細胞、または免疫グロブリン遺伝子の前記測定された発現レベルを、対照中の1つ以上のB細胞、T細胞、または免疫グロブリン遺伝子の測定された発現レベルと比較する工程であって、前記対照中の前記1つ以上の遺伝子の前記測定された発現レベルに対する前記生物学的試料中の前記1つ以上の遺伝子の前記測定された発現レベルにおける差は、前記対象に胃腸障害の危険性があることを示す、工程と

を含む、方法。

30

[本発明1033]

前記生物学的試料が、本発明1001～1020のいずれかの方法に従って単離された非ヒト動物核酸を含む、本発明1032の方法。

[本発明1034]

前記胃腸障害が、胃腸リンパ腫または炎症性腸疾患を含む、本発明1032の方法。

[本発明1035]

前記非ヒト動物がネコである、本発明1032の方法。

[本発明1036]

前記非ヒト動物がイヌである、本発明1032の方法。

[本発明1037]

40

前記生物学的試料が糞便試料を含む、本発明1032の方法。

【図面の簡単な説明】

【0009】

本発明のこれらおよび他の特徴および利点は、同様の番号が同様の部分を指す添付の図面と共に考慮されるべきである本発明の好ましい実施形態の以下の詳細な説明において、より十分に開示されるか、または明らかになるであろう。

【0010】

【図1】電気泳動ファイル実験である。電気泳動分析を使用して、抽出されたRNAの質を調べた。

【図2】電気泳動図である。電気泳動図を使用して、抽出されたRNAの質を調べた。

50

【図3】抽出の要約である。これは、実施例2に記載される抽出方法を使用して評価された120個の試料についての品質チェックの要約を図示する。

【図4】図4Aは、総RNA抽出方法を比較した実験の結果を図示するグラフである。図4Aは、実施例2に記載される抽出方法を使用して品質チェックに合格した試料の総数を示す。図4Bは、様々な抽出方法による5回の電気泳動実験を図示する。

【図5】図5Aは、示差的に発現される転写物クラスターを示すヒートマップである。示されるように、ヒートマップは、187個の異なる遺伝子にマッピングされた200個の転写物クラスターを使用して生成され、265個の試料が、訓練セットにおいて分析された。試料は、癌（赤）、前癌性腺腫（オレンジ）、正常（緑）の群によって順序付けされる。図5Bは、GAGE Rパッケージを使用して示差的に発現されるGO用語および経路を示す（ $p < 0.05$ ）。各バーの高さは、各経路内の濃縮遺伝子の設定サイズを詳述しており、青い線は、各経路に対する $-log(p\text{ 値})$ を示す。赤い点線は、有意性を示す（ $p = 0.05$ ）。

【図6】結腸直腸新生物において示差的に発現されると同定された遺伝子のリストを示す。

【図7】図7Aは、4つの個々のネコ試料および4つの個々のイヌ試料を示す電気泳動実験を図示する。図7Bは、4つの個々のネコ試料および4つの個々のイヌ試料についてのRNA完全性数（RIN）、ならびに8つすべての試料の平均を示す。図7Cは、4つの個々のネコ試料および4つの個々のイヌ試料についての電気泳動実験からの推定真核生物RNA濃度（ng /  $\mu L$ ）、ならびに8つすべての試料についての平均質量を示す。

【図8】図8Aは、イヌ試料中のリンパ球関連転写物の存在を同定するためのIgM C  $\mu$ 重鎖領域についてのRT-qPCR結果を図示する。図8Bは、イヌ試料中のT細胞受容体ガンマ領域の2つの組み換えについてのRT-qPCR結果を図示する。

【図9】ネコ試料中のアクチン-BについてのRT-qPCR結果を図示する。

【図10】図10Aは、アフィメトリクスヒトトランスクリプトームアレイを使用した70,524個の転写物クラスター発現レベルの4つの技術的複製物を図示する。図10Bは、アフィメトリクスヒトトランスクリプトームアレイを使用した70,524個の転写物クラスター発現レベルの4つの生物学的複製物を図示する。図10Cは、アフィメトリクスヒトトランスクリプトームアレイを使用した70,524個の転写物クラスター発現レベルを分析するために6ヶ月間隔で試験された6つの技術的複製物を図示する。

【図11】図11Aは、アフィメトリクスヒトトランスクリプトームアレイを使用した5,149個の転写物クラスター発現レベルの4つの技術的複製物を図示する。図11Bは、アフィメトリクスヒトトランスクリプトームアレイを使用した5,149個の転写物クラスター発現レベルの4つの生物学的複製物を図示する。図11Cは、アフィメトリクスヒトトランスクリプトームアレイを使用した5,149個の転写物クラスター発現レベルを分析するために6ヶ月間隔で試験された6つの技術的複製物を図示する。

【図12】図12Aは、文献中の抽出方法から実験された比較電気泳動図および電気泳動ファイルを図示する。図12Bは、実施例2に記載される抽出方法から実験された電気泳動図および電気泳動ファイルを図示する。

【図13】結腸直腸新生物において示差的に発現されると同定された遺伝子、ならびに癌、結腸直腸新生物、および/または胃腸の健康に関与している遺伝子のリストを示す。

【図14】生物学的複製物の中での真核生物および原核生物のRNA指標の一貫性を実証する、4匹の個々のネコに由来する8つの試料についての電気泳動ファイル実験を図示する。

【図15A】イヌ試料のRT-qPCR分析に使用されるプライマーを示す表である。出現順にそれぞれSEQ\_ID\_NO: 1~15を開示する。

【図15B】ネコ試料のRT-qPCR分析に使用されるプライマーを示す表である。出現順にそれぞれSEQ\_ID\_NO: 16~33を開示する。

【図16】図16Aは、イヌ試料中のリンパ球特異的転写物の存在を同定するためのB細胞免疫グロブリンの2つの再配列についてのRT-qPCRの結果を図示する。図16Bは、ネコ試料中のリンパ球特異的転写物の存在を同定するためのT細胞受容体ガンマ領域

10

20

30

40

50

の 6 つの再配列についての R T - q P C R 結果を図示する。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 1 】

好ましい実施形態のこの説明は、添付の図面と関連して読まれることを意図されており、それらの図面は、この発明の記載された説明全体の一部と見なされるべきである。図面は必ずしも一定の縮尺で描かれているわけではなく、本発明の特定の特徴は、明瞭さおよび簡潔さのために、誇張された縮尺で、またはやや概略的な形で示されている場合がある。本説明では、「水平」、「垂直」、「上方」、「下方」、「上」および「下」などの相対用語、ならびにそれらの派生語（例えば、「水平に」、「下向きに」、「上向きに」等）は、そのとき記載されているような、または検討中の図面に示されているような向きを指すと解釈されるべきである。これらの相対用語は説明の便宜上のものであり、通常特定の方向を必要とすることを意図するものではない。「内向きに」対「外向きに」、「長手方向」対「横方向」などを含む用語は、必要に応じて、互いに対しても、または伸長軸、または回転軸もしくは回転中心に対して、解釈されるべきである。「接続された」および「相互接続された」などの取り付け、連結などに関する用語は、別段明示的に記載されない限り、構造が介在構造を通して直接的もしくは間接的のいずれかで互いに固定または取り付けられた関係、ならびに可動もしくは剛性の両方の取り付けもしくは関係を指す。「動作可能に接続された」という用語は、関連する構造がその関係によって意図されたように動作することを可能にする、そのような取り付け、連結、または接続である。単一の機械のみが例示される場合、「機械」という用語は、本明細書で検討される方法論のうちの任意の 1 つまたは複数を実施するために 1 セット（または複数セット）の命令を個別にまたは共同で実行する任意の機械の集合も含むものと解釈される。特許請求の範囲において、ミーンズプラスファンクション条項は、使用される場合、構造上の等価物だけでなく等価な構造も含む、列挙された機能を実施するための記述もしくは図面によって説明、示唆、または明白にされる構造を網羅することを意図する。

10

【 0 0 1 2 】

本発明は、糞便試料、例えば、哺乳動物から得られた糞便試料中の真核細胞を細菌細胞から分離するための方法の本発明者らの開発に一部基づく。結腸内には、腸内容物 1 グラム当たり約 1012 個の細菌細胞が存在する。この結腸内細菌叢は、300 ~ 1000 種を含み得る。糞便または便試料は、胃腸管の腸管腔から剥落した真核細胞だけでなく、細菌および任意の胃腸寄生虫を含む微生物、非消化非吸収食品残渣、腸細胞からの分泌物、ならびに粘膜および顔料などの排泄物を含む、複雑な高分子混合物である。通常の糞便は、約 75 % の水および 25 % の固体物で構成されている。細菌は、糞便の総乾燥質量の約 60 % を占めている。高い細菌負荷は、糞便試料から真核生物バイオマーカーを検出するための好ましくない信号対雑音比に寄与し得る。さらに、真核生物信号は、著しく低下する可能性がある。そのような真核生物の核酸の抽出および処理は、分解を促進または加速させる可能性があり、これはさらなる分析を厳しく限定する。

20

【 0 0 1 3 】

本明細書に開示される方法および材料は、糞便試料から真核生物の核酸を単離するための方法を含む。そのような真核生物の核酸は、真核生物、例えば哺乳動物における胃腸障害または疾患の指標となり得る特定のバイオマーカーのレベルについて評価することができる。哺乳動物は、ヒトまたは非ヒト動物、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、非ヒト靈長類、反すう動物、クマ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、水牛、シカ、エルク、ムース、イタチ、ウサギ、モルモット、ハムスター、ラット、マウス、厚皮動物、サイ、およびチンチラであり得る。

30

【 0 0 1 4 】

本発明者らは、真核生物の糞便試料中の真核細胞を細菌細胞から効果的に分離することができることを見出した。本発明者らはまた、そのような真核細胞から単離された RNA 中の真核生物バイオマーカーを検出することができる見出した。このようなバイオマーカーは、胃腸障害、例えば、大腸癌、セリック病、クローン病、胃炎、胃腸炎、胃

40

50

癌、胃潰瘍、壊死性腸炎、胃腸間質腫瘍、胃腸リンパ腫、胃腸腫瘍、リンパ腫、腺癌、炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、膵臓新生物、肝新生物、胆管癌、大腸炎、ネコ白血病ウイルス、ウシウイルス性下痢、空腸出血症候群、胃腸炎、悪性カタル熱、ネコ汎白血球減少症、小腸結腸症、漫潤性結腸疾患、クリプトスポリジウム症、コクシジウム症、および他の人畜共通感染症、またはコロナウイルス、パルボウイルス、アストロウイルス、ノロウイルス、もしくはロタウイルス感染症の検出に有用であり得る。対象、例えば、ヒト、イヌ、もしくはネコが胃腸疾患、例えば、大腸癌、リンパ腫、もしくは炎症性腸疾患または他の疾患の危険性があるかどうかを判定するための材料および方法を本明細書に提供する。疾患の診断のための材料および方法、ならびに対象の健康状態を同定する方法も提供する。

10

#### 【0015】

本明細書に開示される方法および組成物は、胃腸の健康状態の検出、診断、および治療に一般的かつ様々に有用である。検出方法は、胃腸障害を有するかまたは胃腸障害を有すると疑われる対象、例えば患者由来の試料中の1つ、2つ、またはそれ以上のバイオマーカーの糞便試料中の発現レベルを測定する工程と、測定された発現を、対照中の1つ、2つまたはそれ以上のバイオマーカーの測定された発現レベルと比較する工程と、を含み得る。対照中の1つ、2つまたはそれ以上のバイオマーカーの測定された発現レベルに対する、対象の試料中の1つ、2つまたはそれ以上のバイオマーカーの測定された発現レベルにおける差は、対象が胃腸障害を有することの指標である。いくつかの実施形態では、対照中の1つ、2つまたはそれ以上のバイオマーカーの測定された発現レベルに対する、対象の試料中の1つ、2つまたはそれ以上のバイオマーカーの測定された発現レベルにおける差は、対象、例えば患者が胃腸障害の危険性があることの指標である。

20

#### 【0016】

別の実施形態では、疾患の検出方法は、相対的発現レベルの割合、例えば、対象の糞便試料中の1つ、2つまたはそれ以上のバイオマーカーの相対比を測定する工程と、これらのバイオマーカーの相対的割合を、対照中の1つ、2つまたはそれ以上のバイオマーカーの相対的な発現レベルの割合と比較する工程と、を含み得る。対照に対する対象の試料中の1つ、2つまたはそれ以上のバイオマーカーの測定された相対的な発現レベルにおける差は、対象が胃腸疾患を有することの指標である。いくつかの実施形態では、対照中の1つ、2つまたはそれ以上のバイオマーカーの測定された発現レベルの割合に対する、対象の試料中の1つ、2つまたはそれ以上のバイオマーカーの測定された発現レベルの割合における差は、対象に胃腸障害の危険性があることの指標である。

30

#### 【0017】

本方法は、2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のレベルが対照中の同じ2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のレベルに対して異なるかどうかを判定することによって、患者から得られた糞便試料から単離されたヒトRNA中の2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の発現レベルを判定することを含み得る。例示的な結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子を、図6(パネルA)および図13(パネルB)に示す。図6(パネルA)および図13(パネルB)に列挙された結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のうちのいくつかまたはすべてが、パネルを形成することができる。いくつかの実施形態では、図6(パネルA)および図13(パネルB)に列挙された結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子はまた、結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のサブセットを含み得る。組成物は、本明細書に開示されるマーカーのパネルの特異的検出のために構成された遺伝子アレイおよびプローブセットを含み得る。組成物はまた、本明細書に開示されるマーカーのパネルの特異的検出のために構成された遺伝子アレイおよびプローブセットを含むキットも含み得る。

40

#### 【0018】

大腸癌または前癌性病変の診断に使用するための結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子および結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のパネルを本明細書に提供する。バイオマーカーは、一般に、客観的に測定および定量化され得、かつ生物学的プロセス、例えば、結

50

腸直腸新生物の発症、進行、寛解、および再発を評価するために使用され得る特徴である。バイオマーカーは、核酸、ポリペプチド、代謝産物、または物理的もしくは生理学的パラメータを含む多くの形態をとることができる。

#### 【0019】

これらの真核細胞由来のバイオマーカーは、a) デオキシリボ核酸 (DNA) の配列、b) リボ核酸 (RNA) の配列、c) タンパク質の骨格を含むアミノ酸の予測された配列、d) リボ核酸バイオマーカーの発現レベル、e) アミノ酸配列の予測された発現レベル、またはf) 上記の任意の組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態では、バイオマーカーは、T細胞マーカーまたはB細胞マーカーであり得る。いくつかの実施形態では、バイオマーカーは、T細胞またはB細胞のクローン増殖の検出に有用であるバイオマーカーであり得る。例示的なバイオマーカーは、IgA、IgM、IgG、IgE、IgD、T細胞ガンマ受容体、T細胞アルファ受容体、T細胞ベータ受容体、T細胞デルタ受容体領域、またはB細胞相補性決定領域を含み得る。いくつかの実施形態では、GADPHなどのバイオマーカーを正規化のために使用することができる。いくつかの実施形態では、上皮細胞の検出のためにアクチン-Bを使用すること、またはリンパ球の検出のためにIgM C-muを使用することなど、特異的細胞型の検出のためにバイオマーカーを使用することができる。いくつかの実施形態では、リンパ球のクローン増殖の検出のためのT細胞受容体ガンマの検出など、疾患の特異的マーカーの検出のためにバイオマーカーを使用することができる。いくつかの実施形態では、バイオマーカーは、キャプシド、キャプソメア、レプリカーゼ、およびオーシスト壁タンパク質のためのものを含む、ウイルスおよび寄生虫の検出のためのものを含み得る。10

#### 【0020】

生物学的試料は、核酸もしくは他の分析物を得ることができる細胞もしくは他の細胞材料を含む試料であり得る。生物学的試料は、対照または実験試料であり得る。生物学的試料は、糞便試料であり得る。生物学的試料は、便器内、地上、または回収デバイス内への排便直後に得られ得る。いくつかの実施形態では、生物学的試料は、浣腸または内視鏡検査などの手順に従って得られ得る。生物学的試料は、直後に試験され得る。代替的に、生物学的試料は、試験前に、緩衝液、例えば、水性緩衝液、グリセロール系緩衝液、極性溶媒系緩衝液、浸透圧バランス緩衝液、または生物学的試料を保存するのに十分な他の緩衝液に保存することができる。加えて、または代替的に、生物学的試料を回収し、試験前に、例えば、4℃で冷蔵保存され得るか、または例えば、0℃、-20℃、-80℃、-140℃以下で冷凍保存され得る。生物学的試料は、試験前に、1ヶ月、2ヶ月、4ヶ月、6ヶ月、1年、2年またはそれ以上保存され得る。20

#### 【0021】

生物学的試料は、真核生物、例えば哺乳動物に由来し得る。哺乳動物は、ヒトまたは非ヒト動物、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、非ヒト靈長類、反すう動物、クマ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、水牛、シカ、エルク、ムース、イタチ、ウサギ、モルモット、ハムスター、ラット、マウス、厚皮動物、サイ、およびチンチラであり得る。30

#### 【0022】

##### 方法

真核生物の核酸に富む生物学的試料、例えば糞便試料から核酸を単離するのに有用な方法を本明細書に提供する。本方法は、糞便試料を緩衝液で破碎することを含み得る。試料は、ボルテックス、振とう、攪拌、回転、または固形物および糞便細菌を分散させるのに十分な他の攪拌方法にかけることができる。攪拌および遠心分離工程が実行される温度は、例えば、約4℃～約20℃に、約4℃～約1℃に、約4℃～約10℃に、約4℃～約6℃に変化し得る。破碎後、試料を1回以上の遠心分離にかけることができる。いくつかの実施形態では、破碎工程および遠心分離は、さらに1回、2回、3回またはそれ以上繰り返され得る。市販の試薬、例えばNucleisens (登録商標) Easy Mag (登録商標) 試薬は、糞便の破碎、洗浄、および細胞溶解のために使用され得る。溶解緩衝液はまた、真核細胞を溶解するためのものであり得る。溶解物をさらに遠心分離し、上清を自40

10

20

30

40

50

動RNA単離機、例えばE asy Mag(登録商標)機器へと投入するために使用することができる。いくつかの実施形態では、抽出された核酸をDNaseで処理して、DNAの溶液を除去することができる。機械的または酵素的細胞破碎、その後のカラムクロマトグラフィーもしくは有機溶媒による抽出などの固相法、例えば、フェノール-クロロホルムもしくはチオシアネート-フェノール-クロロホルム抽出を含む、他の方法を使用することができる。いくつかの実施形態では、核酸を官能化ビーズ上に抽出することができる。いくつかの実施形態では、官能化ビーズは、磁気コア(「磁気ビーズ」)をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、官能化ビーズは、荷電部分で官能化された表面を含み得る。荷電部分は、アミン、カルボン酸、カルボン酸塩、四級アミン、硫酸塩、スルホン酸塩、またはリン酸塩から選択することができる。

10

#### 【0023】

核酸の抽出のために、糞便試料を、緩衝液、界面活性剤、およびリボヌクレアーゼ阻害剤のうちの1つ以上の存在下で破碎して、懸濁物を形成し得る。緩衝液は、生物学的に適合する緩衝液、例えば、ハンクス平衡塩溶液、アルセバー溶液、アール平衡塩溶液、ゲイ平衡塩溶液、リン酸緩衝食塩水、パック平衡塩溶液、リンガー平衡塩溶液、シム平衡塩溶液、TRIS緩衝食塩水、またはタイロード平衡塩溶液であり得る。界面活性剤は、イオン性または非イオン性界面活性剤、例えば、Tween-20、またはTriton-X-100であり得る。リボヌクレアーゼ阻害剤は、例えば、Protector RNAse Inhibitor(Roche)、RNasin(登録商標)(Promega)、SUPERase-In(商標)(Thermo Fisher Scientific)、RNaseOUT(商標)(Thermo Fisher Scientific)、ANTI-RNase、組み換えRNase阻害剤、またはクローン化RNase阻害剤を含む、溶媒ベースの方法、タンパク質ベースの方法、またはRNA破碎を防止するための他の種類の方法であり得る。糞便試料は、様々な方法で、例えば、ボルテックス、振とう、攪拌、回転、または固体物および糞便細菌を分散させるのに十分な他の攪拌方法によって破碎することができる。いくつかの実施形態では、糞便試料は、コーティングされたビーズ、磁気ビーズ、またはガラス棒、金属棒、木の棒、もしくは木刃などの攪拌用具を使用して破碎することができる。

20

#### 【0024】

次に、懸濁物を液体部分と固体部分に分離することができる。分離は、例えば、遠心分離、濾過、真核細胞に特異的に結合する標的指向化プローブ、抗体、カラムベースの濾過、ビーズベースの濾過、またはクロマトグラフィー法によって実行することができる。液体部分は、細菌核酸に富み、廃棄することができる。固体部分は、界面活性剤の存在下または不在下およびリボヌクレアーゼの存在下または不在下のいずれかで、緩衝液中に再懸濁され得る。分離工程は、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回またはそれ以上繰り返され得る。

30

#### 【0025】

破碎および分離工程が実行される温度は、例えば、約4～約20に、約4～約15に、約4～約10に、約4～約6に変化し得る。

#### 【0026】

分離工程から得られたペレットを、溶解緩衝液、例えば、カオトロピック剤および任意選択的に界面活性剤を含む緩衝液に懸濁して、溶解物を形成することができる。いくつかの実施形態では、カオトロピック剤は、チオシアン酸グアニジウムであり得、界面活性剤は、Triton-X-100であり得る。いくつかの実施形態では、溶解緩衝液は、トリス-HCl、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、ノニデットP-40、デオキシコール酸ナトリウム、またはジチオトレイトルを含み得るか、またはこれらを除外し得る。

40

#### 【0027】

溶解物は、真核生物の核酸に富む部分に分画することができる。分画は、例えば、遠心分離、濾過、真核生物の核酸に特異的に結合する標的指向化プローブ、抗体、カラムベー

50

スの濾過、ビーズベースの濾過、またはクロマトグラフィー法によって実行することができる。いくつかの実施形態では、遠心分離による分画は、細胞片を含む底層（ペレット）、真核生物の核酸を含む親水性中間層、ならびに脂質および膜画分を含む疎水性最上層の形成をもたらし得る。中間層を回収することができる。いくつかの実施形態では、中間層および最上層と一緒に回収することができる。小口径オリフィスを通して、中間層を回収することができる。小口径オリフィスは、ピペットチップまたは針を装着した注射器であり得る。ピペットチップは、例えば、1、5、10、20 µL または 100 µL のピペットチップであり得る。針は、例えば、18 ゲージまたは 15 ゲージの針であり得る。

#### 【0028】

真核生物の核酸を含む回収された層は、さらなる抽出に供され得る。さらなる抽出方法は、様々であり得る。例示的な方法としては、磁性粒子ベースの方法、カラムベースの方法、フィルタベースの方法、ビーズベースの方法、または有機溶媒ベースの方法が挙げられる。磁性粒子ベースの方法は、市販の試薬、例えば N u c l i s e n s (登録商標) E a s y M a g (登録商標) 試薬 ( b i o M e r i e u x ) を含み得る。

10

#### 【0029】

抽出された核酸は、胃腸障害または胃腸細胞に関連する真核生物バイオマーカーについて分析することができる。バイオマーカーは、個体、すなわち対象の健康に関する情報を提供することができる。これらの真核細胞由来のバイオマーカーは、a) デオキシリボ核酸 (D N A) の配列、b) リボ核酸 (R N A) の配列、c) タンパク質の骨格を含むアミノ酸の予測された配列、d) R N A バイオマーカーの発現レベルもしくは発現レベルの割合、e) アミノ酸配列の予測された発現レベルもしくは予測された発現レベルの割合、または f) 上記の任意の組み合わせを含み得る。真核細胞からのバイオマーカーの単離は、実験試料と対照との間の比較を可能にし得る。真核細胞からのこれらのバイオマーカーの単離は、実験試料中の腸疾患の検出のための方法を提供することができる。比較は、a) D N A 配列における変動、b) R N A 配列における変動、c) 予測されるアミノ酸配列における変動、d) R N A バイオマーカーの発現レベルにおける変動もしくは発現レベルの割合の変動、e) アミノ酸配列の予測された発現レベルの変動もしくは予測発現レベルの割合の変動、または f) 上記の任意の組み合わせを構成する変動に対する評価を含み得る。実験試料の測定されたバイオマーカーが対照中の測定されたバイオマーカーと異なる場合に、変動を判定することができる。

20

#### 【0030】

本方法は、実験試料および対照、例えば糞便試料を得ることを含み得る。糞便試料は、バイオマーカーについて評価することができる剥落した真核細胞を含有する。いくつかの実施形態では、真核細胞は、腸細胞、リンパ球、エンテロクロミフィン様細胞、腸内分泌細胞、神経内分泌細胞、膵臓細胞、肝細胞、胃細胞などであり得る。本方法は、糞便試料中の真核細胞を真核生物バイオマーカーについて評価することができる方法を提供する。バイオマーカーは、D N A の配列、R N A の配列、予測されるアミノ酸の配列、R N A バイオマーカーの発現レベルもしくは発現レベルの割合、アミノ酸配列の予測される発現レベルもしくは予測される発現レベルの割合、または上記の任意の組み合わせを含み得る。一態様では、評価工程は、任意の種類のマイクロアレイ配列決定、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R)、核酸配列決定、分子バーコード化、またはプローブ捕捉から構成される。

30

#### 【0031】

本方法および組成物はまた、腸疾患を罹患している個体のための臨床計画を選択するのにも有用である。この方法を通して、臨床計画は、さらなる診断手順の投与を含み得る。いくつかの実施形態では、臨床計画は、治療方法を含み得る。

40

#### 【0032】

真核生物バイオマーカーのレベルは、様々な方法を使用して評価することができる。発現レベルは、核酸レベル、例えば、R N A レベルまたはポリペプチドレベルのいずれかで判定することができる。R N A 発現は、総 R N A、m R N A、t R N A、r R N A、n c R N A、s m R N A、m i R N A、および s n o R N A の発現を包含し得る。R N A レベ

50

ルでの発現は、関連するRNAに対応するcDNAのレベルを測定することによって直接的または間接的に測定することができる。代替的に、または加えて、RNAによってコードされるポリペプチド、関連する転写因子をコードする遺伝子のRNA調節因子、および転写因子ポリペプチドのレベルもまたアッセイされ得る。mRNAレベルで遺伝子発現を判定するための方法としては、例えば、マイクロアレイ分析、遺伝子発現の連続分析(SAGE)、RT-PCR、プロッティング、デジタルバーコード定量化アッセイに基づくハイブリダイゼーション、マルチプレックスRT-PCR、デジタルドロップPCR(ddPCR)、NanoDrop分光光度計、RT-qPCR、qPCR、UV分光法、RNA配列決定、次世代配列決定、Quantigene 2.0 Single Plexなどの分岐DNA信号増幅を利用した溶解物ベースのハイブリダイゼーションアッセイ、および分岐DNA分析方法が挙げられる。デジタルバーコード定量化アッセイは、BeadArray(Illumina)、xMAPシステム(Luminex)、nCounter(Nanostring)、High Throughput Genomics(HTG)分子、BioMark(Fluidigm)、またはWafergenマイクロアレイを含み得る。アッセイには、DASL(Illumina)、RNA-Seq(Illumina)、TrueSeq(Illumina)、SureSelect(Agilent)、Bioanalyzer(Agilent)、およびTaqMan(Theermo Fisher)が含まれ得る。

#### 【0033】

我々は、「核酸」および「ポリヌクレオチド」という用語を互換的に使用して、cDNA、ゲノムDNA、合成DNA、および核酸類似体を含むDNA(またはRNA)を含む、RNAおよびDNAの両方を指し、それらのうちのいずれも、本発明のポリペプチドをコードし得、それらのすべてが本発明に包含される。ポリヌクレオチドは、本質的にあらゆる三次元構造を有することができる。核酸は、二本鎖または一本鎖(すなわち、センス鎖またはアンチセンス鎖)であってもよい。ポリヌクレオチドの非限定的な例には、遺伝子、遺伝子断片、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA(mRNA)およびその一部分、転移RNA、マイクロRNA、リボソームRNA、siRNA、マイクロRNA、リボザイム、cDNA、組み換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブ、およびプライマー、ならびに核酸類似体が含まれる。本発明の文脈において、核酸は、バイオマーカーの断片、例えば、B細胞もしくはT細胞クローニングのためのバイオマーカー、またはそれらの生物学的に活性な変異体をコードすることができる。

#### 【0034】

「単離された」核酸は、例えば、ゲノム中のそのDNA分子のすぐ隣に通常見出される核酸配列のうちの少なくとも1つが除去されているか、または存在しないという条件で、DNA分子もしくはその断片であり得る。したがって、単離された核酸は、他の配列とは無関係に、別個の分子として存在するDNA分子(例えば、化学合成核酸、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)もしくは制限エンドヌクレアーゼ処理によって產生されるcDNAもしくはゲノムDNA断片)を含むが、これらに限定されない。単離された核酸はまた、ベクター、自律複製プラスミド、ウイルス、または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAに組み込まれたDNA分子を指す。加えて、単離された核酸は、ハイブリッドまたは融合核酸の一部であるDNA分子などの遺伝子操作された核酸を含み得る。例えば、cDNAライブラリーもしくはゲノムライブラリー、またはゲノムDNA制限消化物を含むゲルスライス内の他の核酸のうちの多数(例えば、数十個、または数百~数百万個)の間に存在する核酸は、単離された核酸ではない。

#### 【0035】

単離された核酸分子は、種々の方法で产生することができる。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術を使用して、本明細書に記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、本明細書に記載されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸を得ることができる。PCRを使用して、全ゲノムDNAまたは全細胞RNAからの配列を含

10

20

30

40

50

む、DNAならびにRNAからの特異的配列を増幅させることができる。一般に、対象となる領域の末端またはそれ以降の配列情報を用いて、増幅される錆型の反対の鎖と配列が同一または類似のオリゴヌクレオチドプライマーを設計する。部位特異的ヌクレオチド配列修飾を錆型核酸に導入することができる、様々なPCR戦略もまた利用可能である。

#### 【0036】

単離された核酸はまた、単一の核酸分子として（例えば、ホスホルアミダイト技術を使用して3'～5'方向への自動DNA合成を使用して）または一連のオリゴヌクレオチドとしてのいずれかで化学合成することもできる。例えば、オリゴヌクレオチド対がアニーリングされたときに二本鎖が形成されるように、各対が相補性の短いセグメント（例えば、約15ヌクレオチド）を含む、所望の配列を含む一对以上の長いオリゴヌクレオチド（例えば、>50～100ヌクレオチド）を合成することができる。DNAポリメラーゼを使用してオリゴヌクレオチドを伸長し、その結果、オリゴヌクレオチド対当たり一本鎖の二本鎖核酸分子が得られ、次に、これをベクターに結合することができる。

10

#### 【0037】

それらがコードする2つの核酸またはポリペプチドは、互いにある程度の同一性を有するものとして記載され得る。例えば、図6（パネルA）または図13（パネルB）から選択される結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子およびその生物学的に活性な変異体は、ある程度の同一性を示すものとして記載され得る。アライメントは、Protein Information Research (PIR) サイト (<http://pir.georgetown.edu>) で短い配列を見つけ、続いてNCBIのウェブサイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 上の「短いほぼ同一の配列」のBasic Local Alignment Search Tool (BLAST) アルゴリズムを用いて分析することによって組み立てることができる。

20

#### 【0038】

本明細書で使用される場合、「パーセント配列同一性」という用語は、任意の所与のクエリ配列と対象配列との間の同一性の程度を指す。例えば、図6（パネルA）または図13（パネルB）に列挙された結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子配列は、クエリ配列であり得、図6（パネルA）または図13（パネルB）に列挙された結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子配列の断片は、対象配列であり得る。同様に、図6（パネルA）または図13（パネルB）に列挙された結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子配列の断片は、クエリ配列であり得、その生物学的に活性な変異体は、対象配列であり得る。

30

#### 【0039】

配列同一性を判定するために、クエリ核酸もしくはアミノ酸配列を、コンピュータプログラム、例えばClustalW（バージョン1.83、デフォルトパラメータ）を使用して、それぞれ1つ以上の対象核酸もしくはアミノ酸配列に整列させることができ、これにより、全長にわたって実行される核酸もしくはタンパク質配列のアラインメント（グローバルアラインメント）を可能にする。

#### 【0040】

本明細書に記載される核酸およびポリペプチドは、「外因性」と呼ばれる場合がある。「外因性」という用語は、核酸またはポリペプチドが組み換え核酸構築物の一部であるか、それによってコードされるか、またはその天然の環境にはないことを示す。例えば、外因性核酸は、別の種に導入されたある種由来の配列、すなわち、異種核酸であり得る。典型的には、そのような外因性核酸は、組み換え核酸構築物を介して他の種に導入される。外因性核酸はまた、生物に固有のものであり、かつその生物の細胞に再導入されたものであり得る。天然配列を含む外因性核酸は、外因性核酸につなげられた非天然配列、例えば、組み換え核酸構築物中の天然配列に隣接する非天然調節配列の存在によって天然配列と区別することができることが多い。加えて、安定的に形質転換された外因性核酸は、典型的には、天然配列が見出される位置以外の位置に組み込まれる。

40

#### 【0041】

本発明の核酸は、図6（パネルA）もしくは図13（パネルB）に列挙された結腸直腸

50

新生物バイオマーカーのうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を有する核酸、または図6(パネルA)または図13(パネルB)に列挙された核酸と、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%同一である核酸配列を含み得る。

#### 【0042】

標的核酸に特異的な核酸、例えばオリゴヌクレオチド(例えば、プローブまたはプライマー)は、好適な条件下で標的核酸にハイブリダイズするであろう。オリゴヌクレオチド一本鎖が規定のハイブリダイゼーション条件下で塩基対合を介して相補鎖とアニーリングするプロセスとしてのハイブリダイゼーションまたはハイブリダイズを指す場合がある。それは、2つの相補的ポリヌクレオチド間の特異的な、すなわち非ランダムな相互作用である。ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションの強度(すなわち、核酸間の会合の強度)は、核酸間の相補性の程度、関与する条件の厳密性、および形成される分子の融解温度( $T_m$ )などの要因によって影響を受ける。ハイブリダイゼーション生成物は、溶液中または固体支持体上の標的と共に形成された二本鎖または三本鎖であり得る。

10

#### 【0043】

いくつかの実施形態では、核酸は、図6または13に列挙された結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の分析および定量化のために有用な短い核酸配列を含み得る。そのような単離された核酸は、オリゴヌクレオチドプライマーであり得る。一般に、オリゴヌクレオチドプライマーは、標的ヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチドであり、例えば、DNAもしくはRNAポリメラーゼの存在下でのプライマーの3'末端へのヌクレオチドの付加によってDNA合成の開始点として機能することができる、図6または13に列挙された結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のうちのいずれかのヌクレオチド配列である。プライマーの3'ヌクレオチドは、一般に、最適な伸長および/または増幅のために対応するヌクレオチド位置で標的配列と同一であるべきである。プライマーは、例えば、ペプチド核酸プライマー、ロックド核酸プライマー、ロック解除核酸プライマー、および/またはホスホロチオエート修飾プライマーを含む多くの形態をとることができる。いくつかの実施形態では、フォワードプライマーは、dsDNAのアンチセンス鎖に相補的なプライマーであり得、リバースプライマーは、dsDNAのセンス鎖に相補的なプライマーであり得る。また、プライマー対を指す場合もある。いくつかの実施形態では、5'標的プライマー対は、標的ヌクレオチド配列の5'領域を増幅させる、少なくとも1つのフォワードプライマーおよび少なくとも1つのリバースプライマーを含むプライマー対であり得る。いくつかの実施形態では、3'標的プライマー対は、標的ヌクレオチド配列の3'領域を増幅させる、少なくとも1つのフォワードプライマーおよび少なくとも1つのリバースプライマーを含むプライマー対であり得る。いくつかの実施形態では、プライマーは、以下に検討されるように、検出可能な標識を含み得る。いくつかの実施形態では、検出可能な標識は定量化可能な標識であり得る。

20

#### 【0044】

本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドプライマーは、図6(パネルA)または図13(パネルB)に列挙された結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子配列のうちのいずれかの増幅に有用である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドプライマーは、本明細書に開示される結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のうちの2つ以上、例えば、図6(パネルA)または図13(パネルB)に列挙された結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子に相補的であり得る。プライマー長は、プローブのヌクレオチド塩基配列および特異的核酸配列の組成、ならびにプローブが使用される特定の方法に応じて変化し得る。一般に、有用なプライマー長は、約8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30ヌクレオチド塩基であり得る。有用なプライマー長は、8ヌクレオチド塩基~約60ヌクレオチド塩基、約12ヌクレオチド塩基~約50ヌクレオチド塩基、約12ヌクレオチド塩基~約45ヌクレオチド塩基、約12ヌクレオチド塩基~約40ヌクレオチド塩基、約12ヌクレオチド塩基~約35ヌクレオチド塩基、約15ヌクレオチド塩基~約40ヌクレ

30

40

50

オチド塩基、約 15 ヌクレオチド塩基～約 35 ヌクレオチド塩基、約 18 ヌクレオチド塩基～約 50 ヌクレオチド塩基、約 18 ヌクレオチド塩基～約 40 ヌクレオチド塩基、約 18 ヌクレオチド塩基～約 35 ヌクレオチド塩基、約 18 ヌクレオチド塩基～約 30 ヌクレオチド塩基、約 20 ヌクレオチド塩基～約 30 ヌクレオチド塩基、約 20 ヌクレオチド塩基～約 25 ヌクレオチド塩基の範囲であり得る。

#### 【 0045 】

プローブ、すなわち、図 6 (パネル A) および図 13 (パネル B) に列挙された結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子配列のうちのいずれかに選択的に結合し、かつそれと相補的である、単離された核酸断片も提供する。プローブは、オリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド、DNA もしくは RNA、一本鎖もしくは二本鎖、およびヌクレオチド塩基または骨格のいずれかにおける天然もしくは修飾されたものであり得る。プローブは、化学合成または酵素合成を含む様々な方法によって產生され得る。

10

#### 【 0046 】

プローブ長は、プローブのヌクレオチド塩基配列および特異的核酸配列の組成、ならびにプローブが使用される特定の方法に応じて変化し得る。一般に、有用なプローブ長は、約 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、110、120、140、150、175、または 200 ヌクレオチド塩基であり得る。一般に、有用なプローブ長は、約 8～約 200 ヌクレオチド塩基、約 12～約 175 ヌクレオチド塩基、約 15～約 150 ヌクレオチド塩基、約 15～約 100 ヌクレオチド塩基、約 15～約 75 ヌクレオチド塩基、約 15～約 60 ヌクレオチド塩基、約 20～約 100 ヌクレオチド塩基、約 20～約 75 ヌクレオチド塩基、約 20～約 60 ヌクレオチド塩基、約 20～約 50 ヌクレオチド塩基の範囲の長さであろう。いくつかの実施形態では、プローブセットは、図 6 (パネル A) および図 13 (パネル B) の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のうちの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575 個もしくはそれ以上、またはすべてを対象とするプローブを含み得る。

20

#### 【 0047 】

本明細書に開示されるプライマーおよびプローブは、検出可能に標識され得る。標識は、検出され得るか、または検出可能な応答を導き得る分子部分もしくは化合物であり得、これは、直接的または間接的に核酸に接合され得る。直接標識化は、共有結合、非共有相互作用（水素結合、疎水性およびイオン性相互作用）、またはキレートもしくは配位錯体を含む、結合と相互作用を使用して標識とプローブとをつなげることができる。間接標識化は、直接的または間接的に標識化されて信号を增幅させることができる。架橋部分またはリンカー（例えば、抗体、オリゴマー、または他の化合物）を使用することができる。標識は、任意の検出可能な部分、例えば、放射性核種、ビオチンもしくはアビシンなどのリガンド、酵素、酵素基質、反応基、発色団（検出可能な染料、粒子、またはビーズ）、発蛍光団、または発光化合物（生物発光、燐光、または化学発光標識）を含む。標識は、混合物中の結合標識プローブが、非結合形態からの結合の物理的分離を必要とせずに、非結合標識プローブのものと比較して検出可能な変化、例えば、安定性または段階的分解を示す均質アッセイにおいて検出可能であり得る。

30

#### 【 0048 】

好適な検出可能な標識は、それ自体が検出可能である分子（例えば、蛍光部分、電気化学的標識、金属キレートなど）、ならびに検出可能な反応生成物の產生によって、またはそれ自体が検出可能であり得る特異的結合分子（例えば、ビオチン、ジゴキシゲニン、マルトース、オリゴヒスチジン、2,4-ジントロベンゼン、フェニルアルセネート、ss

40

50

D N A、d s D N Aなど)によって、間接的に検出され得る分子(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどの酵素)を含み得る。上記に検討されるように、検出可能な標識への1つ以上のリガンドモチーフおよび/またはリガンドの連結は、直接または間接的であり得る。検出は、インサイチュ、インビボ、インビトロで、組織切片上でまたは溶液中などであり得る。

#### 【0049】

いくつかの実施形態では、本方法は、アルカリホスファターゼ共役ポリヌクレオチドプローブの使用を含む。アルカリホスファターゼ(AP)共役ポリヌクレオチドプローブを使用する場合、ファストブルーまたはファストレッド基質などの適切な基質を順次添加した後、APは基質を分解して沈殿物を形成し、それによって特異的標的R N A分子のインサイチュ検出が可能になる。アルカリホスファターゼは、いくつかの基質、例えば、ファストブルー、ファストレッド、または5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-ホスフェート(BCIP)と共に使用することができる。例えば、米国特許第5,780,277号および米国特許第7,033,758号に一般的に記載されているものを参照されたい。

10

#### 【0050】

いくつかの実施形態では、フルオロフォア共役プローブは、蛍光染料共役標識プローブであり得るか、または3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)のような基質を有する西洋ワサビペルオキシダーゼ共役プローブの使用など、発色検出経路のためのアルカリホスファターゼに加えた他の酵素アプローチを利用し得る。

20

#### 【0051】

共役標識プローブに使用される蛍光染料は、典型的には、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、シアニンおよびその誘導体、クマリンおよびその誘導体、Cascade Blue(商標)およびその誘導体、ルシファーイエローおよびその誘導体、BODIPYおよびその誘導体などに分類され得る。例示的なフルオロフォアとしては、インドカルボシアニン(C3)、インドジカルボシアニン(C5)、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、テキサスレッド、パシフィックブルー、オレゴングリーン488、Alexa Fluor(登録商標)-355、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor-555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、JOE、リサミン、ローダミングリーン、BODIPY、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、カルボキシフルオレセイン(FAM)、フイコエリトリン、ローダミン、ジクロロローダミン(dRhodamine(商標))、カルボキシテトラメチルローダミン(TAMRA(商標))、カルボキシ-X-ローダミン(ROX(商標))、LIZ(商標)、VIC(商標)、NED(商標)、PET(商標)、SYBR、Picogreen、Ribogreenなどが挙げられる。フルオロフォアおよびそれらの使用の説明は、とりわけ、R. Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9th ed. (2002), Molecular Probes, Eugene, Oreg., M. Schena, Microarray Analysis (2003), John Wiley & Sons, Hoboken, N.J., Synthetic Medicinal Chemistry 2003/2004 Catalog, Berry and Associates, Ann Arbor, Mich., G. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press (1996)、およびGlen Research 2002 Catalog, Sterling, Va. Near-infrared dyes are expressly within the intended meaning of the terms fluorophore and fluorescent reporter groupに見出され得る。

30

40

50

## 【0052】

いくつかの実施形態では、真核生物バイオマーカーのレベルは、遺伝子アレイ上で分析することができる。マイクロアレイ分析は、カスタマイズされた遺伝子アレイ上で実施することができる。代替的に、または加えて、マイクロアレイ分析は、製造元の指示およびプロトコルに従って市販のシステムを使用して実行することができる。例示的な市販のシステムには、Affymetrix GENECHIP（登録商標）技術（Affymetrix、米国カリフォルニア州サンタクララ）、Agilentマイクロアレイ技術、Nanocounter（登録商標）分析システム（Nanostring（登録商標）Technologies）、およびBeadArray Microarray Technology（Illumina）が含まれる。糞便試料から抽出された核酸は、遺伝子アレイ上のプローブとハイブリダイズすることができる。プローブ-標的ハイブリダイゼーションは、化学発光によって検出されて、特定の配列の相対存在量を判定することができる。

## 【0053】

いくつかの実施形態では、プローブおよびプローブセットは、遺伝子アレイとして構成され得る。マイクロアレイまたは遺伝子チップとしても知られる遺伝子アレイは、複雑な生物学的試料の並行分析を可能にする核酸の規則正しいアレイである。典型的には、遺伝子アレイは、固体基板、例えば、マイクロチップ、スライドガラス、またはビーズに付着されているプローブを含む。付着は、一般に、基板とプローブとの間に共有結合をもたらす化学的連結を伴う。アレイ内のプローブの数は様々であり得るが、各プローブは、アレイまたはマイクロチップ上の特定のアドレス可能な場所に固定される。いくつかの態様では、プローブは、約18ヌクレオチド塩基、約20ヌクレオチド塩基、約25ヌクレオチド塩基、約30ヌクレオチド塩基、約35ヌクレオチド塩基、または約40ヌクレオチド塩基の長さであり得る。いくつかの実施形態では、プローブセットは、図6（パネルA）および図13（パネルB）の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のうちの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45、50、60、70、80、90、100、125、150個もしくはそれ以上、またはすべてを対象とするプローブを含む。プローブセットは、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、200,000、300,000、400,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000、1,000,000、2,000,000、3,000,000、4,000,000、5,000,000、6,000,000、7,000,000、8,000,000個またはそれ以上の異なるプローブを含む、高密度アレイに組み込まれ得る。

## 【0054】

遺伝子アレイ合成の方法は様々であり得る。例示的な方法としては、プローブの合成、その後のインサイチュ合成である「スポット」による、例えばフォトリソグラフィー、または微小電極アレイ上で電気化学を使用した、アレイ表面への堆積が挙げられる。

## 【0055】

真核生物バイオマーカーのレベルは、様々な方法を使用して評価することができる。発現レベルは、核酸、例えば、RNAレベルまたはポリペプチドレベルのいずれかで判定され得る。RNA発現は、総RNA、mRNA、tRNA、rRNA、ncRNA、smRNA、miRNA、およびsnorRNAの発現を包含し得る。RNAレベルでの発現は、関連するRNAに対応するcDNAのレベルを測定することによって直接的または間接的に測定することができる。代替的に、または加えて、RNAによってコードされるポリペプチド、関連する転写因子をコードする遺伝子のRNA調節因子、および転写因子ポリペプチドのレベルもまたアッセイされ得る。mRNAレベルで遺伝子発現を判定するための方法としては、例えば、マイクロアレイ分析、遺伝子発現の連続分析（SAGE）、RT-PCR、プロッティング、デジタルバーコード定量化アッセイに基づくハイブリダイゼーション、マルチプレックスRT-PCR、デジタルドロップPCR（ddPCR）、N

10

20

30

40

50

a n o D r o p 分光光度計、q R T - P C R、q P C R、U V 分光法、R N A 配列決定、次世代配列決定、Q u a n t i G e n e 2 . 0 S i n g l e P l e x などの分岐D N A 信号増幅を利用する溶解物ベースのハイブリダイゼーションアッセイ、および分岐D N A 分析方法が挙げられる。デジタルバーコード定量化アッセイは、B e a d A r r a y ( I l l u m i n a )、x M A P システム ( L u m i n e x )、n C o u n t e r ( N a n o s t r i n g )、H i g h T h r o u g h p u t G e n o m i c s ( H T G ) 分子、B i o M a r k ( F l u i d i g m )、またはW a f e r g e n マイクロアレイを含み得る。アッセイには、D A S L ( I l l u m i n a )、R N A - S e q ( I l l u m i n a )、T r u S e q ( I l l u m i n a )、S u r e S e l e c t ( A g i l e n t )、B i o a n a l y z e r ( A g i l e n t )、およびT a q M a n ( T h e r m o F i s h e r ) が含まれ得る。

#### 【 0 0 5 6 】

真核生物バイオマーカーのレベルはまた、D N A 配列決定によって分析され得る。D N A 配列決定は、標的指向化配列決定、全ゲノム配列決定、またはエクソーム配列決定などの配列決定方法によって実施することができる。配列決定方法は、サンガー配列決定またはハイスループット配列決定を含み得る。ハイスループット配列決定は、合成による配列決定、パイロ配列決定、ライゲーションによる配列決定、リアルタイム配列決定、ナノポア配列決定、およびサンガー配列決定を含み得る。いくつかの実施形態では、単離されたR N A を使用して、対応するc D N A を生成することができ、そのc D N A を配列判定することができる。

#### 【 0 0 5 7 】

本明細書に記載される配列決定方法は、複数の異なる標的核酸が同時に操作されるよう に多重形式で実行され得る。いくつかの実施形態では、異なる標的核酸を共通の反応容器中または特定の基質の表面上で処理することができ、これにより、配列決定試薬の便利な送達、未反応試薬の除去、および多重様式での組み込み事象の検出が可能になる。表面結合標的核酸が関与するいくつかの実施形態では、標的核酸は、アレイ形式であり得る。アレイ形式では、標的核酸は、典型的には、空間的に区別可能な様式で表面に連結され得る。例えば、標的核酸は、直接共有結合、ビーズもしくは他の粒子への付着、または表面に付着されたポリメラーゼもしくは他の分子と関連する付着によって結合され得る。アレイは、各部位に標的核酸の单一のコピー（特徴部とも呼ばれる）を含み得るか、または同じ配列を有する複数のコピーが各部位もしくは特徴部に存在し得る。多重コピーは、ブリッジ増幅、P C R、またはエマルジョンP C Rなどの増幅方法によって產生される。

#### 【 0 0 5 8 】

いくつかの実施形態では、正規化工程を使用して、核酸回収率および試料間の変動性を制御することができる。いくつかの実施形態では、規定量の外因性対照核酸を、抽出真核生物の核酸に添加（「混入」）することができる。外因性対照核酸は、1つ以上の真核生物配列に対応する配列を有する核酸であり得る。代替的に、または加えて、外因性対照核酸は、別の種に見られる配列に対応する配列、例えば、B a c i l l i s s u b t i l i s 配列などの細菌配列を有し得る。いくつかの実施形態では、本方法は、1つ以上のハウスキーピング遺伝子のレベルを判定することを含み得る。いくつかの実施形態では、本方法は、バイオマーカーの発現レベルをハウスキーピング遺伝子のレベルに正常化することを含み得る。

#### 【 0 0 5 9 】

本方法は、実験試料中の1つ、2つまたはそれ以上のバイオマーカーの測定された発現レベルが、対照中の1つ、2つまたはそれ以上のバイオマーカーの測定された発現レベルと異なるかどうかを判定する工程を含む。別の実施形態では、本方法は、実験試料中の1つ、2つまたはそれ以上のバイオマーカーの測定された発現レベルが、対照中の1つ、2つまたはそれ以上のバイオマーカーの測定された発現レベルの割合と異なるかどうかを判定する工程を含む。発現レベルにおける差または発現レベルの割合は、増加または減少であり得る。

10

20

30

40

50

### 【 0 0 6 0 】

本明細書に開示される組成物は、大腸癌の検出、診断、および治療に一般的かつ様々に有用である。検出の方法は、図6(パネルA)または図13(パネルB)のうちのいずれかに列挙されたバイオマーカーから選択される2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカーの糞便試料中の発現レベルを測定する工程と、試料中の2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の測定された発現レベルを、対照中の2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の測定された発現レベルと比較する工程と、を含み得る。対照中の2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の測定された発現レベルに対する、患者の試料中の2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の測定された発現レベルにおける差は、患者が大腸癌を有することの指標である。いくつかの実施形態では、対照中の2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の測定された発現レベルに対する、患者の試料中の2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の測定された発現レベルにおける差は、患者が前癌性病変を有し、かつ／または大腸癌の危険性があることの指標である。これらの方法は、結腸直腸新生物、例えば、大腸癌もしくは前癌性病変を有するかまたは結腸直腸新生物を発症する危険性がある対象(例えば、患者、より具体的には、ヒト患者)を同定する工程をさらに含み得る。

10

### 【 0 0 6 1 】

結腸直腸新生物は、任意の形態の大腸癌を含み得る。結腸直腸新生物はまた、ポリープ、例えば前癌性病変を含み得る。大腸癌は、典型的には、ポリープと呼ばれる、結腸または直腸の内腔内膜における増殖として始まる。結腸直腸ポリープは、一般に、2つのカテゴリー：腺腫とも呼ばれる腺腫性ポリープ、および過形成性かつ炎症性ポリープに分類される。腺腫性ポリープは、大腸癌を引き起こす可能性がある。大腸癌の最も一般的な形態である腺癌は、結腸および／または直腸の内側に並ぶ腸管細胞から発生する。腺癌は、有茎性茎上の腺癌である尿細管腺癌、および結腸の表面に平らに存在する腺癌である絨毛腺癌を含み得る。他の大腸癌は、それらの起源となる組織によって区別される。これらには、カハール間質細胞から生じる消化管間質腫瘍(GIST)、血液細胞から生じる原発性結腸直腸リンパ腫、結合組織または平滑筋から生じる肉腫である平滑筋肉腫、メラノサイトから生じるメラノーマ、重層扁平上皮組織から生じ、かつ直腸に限局している扁平上皮癌、および一般的に予後不良と関連する上皮癌である粘液癌が含まれる。

20

### 【 0 0 6 2 】

大腸癌の症状には、下痢もしくは便秘を含む排便習慣の変化、または4週間を超えて続く糞便の硬さの変化、直腸出血もしくは糞便中の血液、けいれん、ガス、もしくは痛みなどの持続性腹部不快感、腸が完全に空にならないという感覚、脱力感もしくは疲労、および原因不明の体重減少が含まれるが、これらに限定されない。大腸癌を有すると疑われる患者は、全血球計算(CBC)、便潜血検査(FOBT)、肝機能分析、便免疫化学検査(FIT)、ならびに／または特定の腫瘍マーカーの他の分析、例えば、癌胎児性抗原(CEA)およびCA19-9を含む、末梢血検査を受ける場合がある。大腸癌は、結腸鏡検査に基づいて診断されることが多い。結腸鏡検査の間、ポリープが大腸癌細胞または前癌性変化を受けた細胞を含有するかどうかを判定するために、注目されるいかかるポリープも除去、生検、および分析される。上記に列挙された特定の癌のそれぞれは、内視鏡を通して見たときに異なって見える可能性がある。絨毛腺腫メラノーマ、および扁平上皮癌は、典型的には、平らであるか、または固着性であり、管状腺腫、リンパ腫、平滑筋肉腫、およびGIST腫瘍は、典型的には、有茎性である。しかしながら、結腸鏡検査の間に、平らで固着性の腺腫は、消化器科医が見逃す可能性がある。生検試料は、特定の遺伝子の遺伝的变化またはマイクロサテライト不安定性に基づいてさらなる分析を受ける可能性がある。

30

### 【 0 0 6 3 】

他の診断方法としては、S状結腸鏡検査、画像検査、例えば、コンピュータ断層撮影(CTまたはCAT)スキャン、超音波、例えば、腹部、直腸内、または術中超音波、磁気共鳴画像法(MRI)スキャン、例えば、直腸内MRIが含まれ得る。大腸癌が転移した

40

50

かどうかを判断するために、血管造影法および胸部X線検査などの他の検査を実行することができる。

#### 【0064】

大腸癌を病期分類するための様々な方法が開発されている。最も一般的に使用されているシステムであるTNMシステムは、3つの要因：1) 原発性腫瘍(T)が腸壁および近くの領域へと増殖した距離、2) 腫瘍が近くの所属リンパ節(N)に拡がっているかどうか、3) 癌が他の臓器(M)に転移しているかどうかに基づく。他の病期分類法には、デューケス病期分類およびAstler-Cole分類が含まれる。

#### 【0065】

TNMシステムは、大腸癌の4段階分類を提供する。ステージ1(T1)の大腸癌では、腫瘍は結腸壁の層にまで増殖しているが、結腸壁の外側またはリンパ節には拡がっていない。癌が尿細管腺腫ポリープの一部である場合、単純切除が実施され、患者は将来の癌の発症のために日常的な検査を受け続けることができる。癌が高悪性度または平らな/固着性ポリープの一部である場合、より多くの手術が必要となる可能性があり、より大きなマージンが取られ、これには、結腸の切片を切除した部分結腸切除術が含まれる。ステージ2(T2)の大腸癌では、腫瘍は結腸壁にまで増殖しており、潜在的に近くの組織にまで増殖するが、近くのリンパ節には拡がっていない。腫瘍の外科的切除および部分結腸切除術が、一般に実施される。補助療法、例えば、5-フルオロウラシル、ロイコボリン、またはカペシタビンなどの薬剤を用いた化学療法を施すことができる。そのような腫瘍は再発する可能性は低いが、患者のスクリーニングを増やすことが一般に必要である。ステージ3(T3)の大腸癌では、腫瘍は近くのリンパ節に拡がっているが、体の他の部分には拡がっていない。結腸の切片およびすべての罹患リンパ節を除去する手術が必要となるであろう。オキサリプラチニンと組み合わされた5-フルオロウラシル、ロイコボリン、オキサリプラチニン、またはカペシタビンなどの薬剤による化学療法が、典型的に推奨される。放射線療法はまた、患者の年齢および腫瘍の悪性に応じて使用され得る。ステージ4(T4)の大腸癌では、血液を通して結腸から遠隔の臓器に腫瘍が拡がっている。大腸癌は、最も頻繁には、肝臓、肺、および/または腹膜に転移する。手術によってこれらの癌が治癒する可能性は低く、化学療法およびまたは放射線療法は、一般に、生存率の向上のために必要である。

#### 【0066】

本明細書に開示される方法は、一般に、大腸癌の診断および治療に有用である。2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のレベルは、生物学的試料、すなわち、対象由来の試料において測定される。対象は、患者が大腸癌の危険性があることを示すであろう、上記に記載される症状のうちの1つ以上を有する患者であり得る。対象はまた、症状がないが、年齢(例えば、50歳超)、家族歴、肥満、食事、アルコール摂取、タバコ使用、結腸直腸ポリープの以前の診断、人種および民族的背景、炎症性腸疾患、ならびに大腸癌の危険性がより高いことに関連する、家族性腺腫性ポリポーシス、ガードナー症候群、リンチ症候群、ターコット症候群、ポイツ・イエガース症候群、およびMUTYH関連ポリポーシスなどの遺伝的症候群に基づいて大腸癌の危険性があり得る患者でもあり得る。本明細書に開示される方法はまた、寛解を監視し、かつ癌の再発を検出するために、以前に大腸癌について診断および治療された患者を監視するにも有用である。

#### 【0067】

いくつかの実施形態では、対象、すなわち、ヒトまたは非ヒト動物の患者の病状は、病理学的評価によって判定される。例えば、大腸癌などの1つの種類の疾患では、疾患の程度は、ステージ1(T1)、ステージ2(T2)、ステージ3(T3)、およびステージ4(T4)として分類される。大腸癌は、尿細管腺癌、絨毛腺癌、胃腸間質腫瘍、原発性結腸直腸リンパ腫、平滑筋肉腫、黒色腫、扁平上皮癌、または粘液癌であり得る。炎症性腸疾患などの別の種類の疾患では、疾患状態は、腸管に沿った疾患の場所、ならびに肉芽腫、白血球浸潤、および/または陰窩膿瘍などの組織学的特徴によって判定される。医師の判定、身体症状、便潜血検査、便免疫化学検査、S状結腸鏡検査、FIT-DNA、C

10

20

30

40

50

Tコロノグラフィ、または結腸鏡検査などの他の病状を判定するための方法もまた、本明細書に開示される方法と併せて使用することができる。

#### 【0068】

対象に腸疾患の危険性があるかどうかを判定する方法も提供される。腸疾患には、腸癌、大腸癌、前癌性変化を示す腺腫性ポリープ、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、または他の腸疾患が含まれ得る。対象に腸疾患の危険性があるかどうかを判定する方法は、本発明を使用して、a) デオキシリボ核酸(DNA)の配列、b) リボ核酸(RNA)の配列、c) タンパク質の骨格を含む予測アミノ酸配列、d) リボ核酸バイオマーカーの発現レベル、e) アミノ酸中の配列の変化における予測、またはf) 上記のいずれかの組み合わせを検出することによって判定することができ、対照と実験試料との間の差は、対象が腸疾患の危険性があることを示し得る。

10

#### 【0069】

方法および組成物はまた、腸疾患を罹患している対象についての臨床計画を選択するためにも有用である。この方法を通して、臨床計画は、さらなる診断手順の投与を含み得る。いくつかの実施形態では、臨床計画は、治療方法を含み得る。

#### 【0070】

図6(パネルA)または図13(パネルB)から選択される2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のレベルは、大腸癌の危険性があるか、またはこれを有する対象において分析することができる。いくつかの実施形態では、図6(パネルA)または図13(パネルB)から選択される1つ、2つまたはそれ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のレベルは、大腸癌の危険性があるか、またはこれを有する対象において分析することができる。図6(パネルA)または図13(パネルB)に列挙された結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子は、パネルを形成し得る。いくつかの実施形態では、2つ以上のバイオマーカーは、図6(パネルA)または図13(パネルB)のマーカーのうちの2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180個またはそれ以上の組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態では、マーカーは、示差的に発現される転写物クラスターおよび/または大腸癌に関連する共通経路内に含まれ得る。例示的な経路には、マイクロサテライト不安定性(MSI)、染色体不安定性(CIN)、およびCpGアイランドメチル化剤表現型(CIMP)が含まれる。いくつかの実施形態では、経路は、細胞成分経路、ストレスに対する細胞応答、ストレス、およびRNA結合経路であり得る。

20

#### 【0071】

診断、状態、または治療に対する反応を判定するためのアルゴリズムは、例えば、特定の臨床状態について判定することができる。本明細書で提供される方法において使用されるアルゴリズムは、限定されないが、医療デバイス、臨床評価スコア、または生物学的試料の生物学的/化学的/物理的試験を使用して定量化することができる複数のパラメータを組み込んだ数学関数であり得る。各数学関数は、選択された臨床状態に関連すると判定されたパラメータのレベル(例えば、測定されたレベル)の重み付け調整された表現であり得る。複数のマーカーパネルの重み付けおよび評価に関連する技術のために、合理的な計算能力を有するコンピュータを使用してデータを分析することができる。

30

#### 【0072】

したがって、診断方法は、大腸癌の危険性があるか、またはその疑いがある患者から糞便試料を採取することと、図6(パネルA)または図13(パネルB)から選択される2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の発現を判定することと、予め定義された係数を有する結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のパネルのうちのいずれかから選択される複数の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子を組み込んだ機械学習アルゴリズムによって試験値を提供することと、を含み得る。例示的な機械学習アルゴリズムには、サポートベクターマシン、グラジエントブースト、アダブティブブースト、ランダムフォレスト、ナイーブベイズ、ディシジョンツリー、およびk最近傍が含まれる。対照、例えば健康

40

50

な個体の集団に対する複数の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の発現の有意な変化は、患者が大腸癌および／または前癌性病変を有する可能性が高いことを示す。いくつかの実施形態では、試料中で測定された発現レベルを使用して、確率または信頼性スコアを導出または計算する。この値は、発現レベルから導出することができる。代替的に、または加えて、値は、発現値と他の要因、例えば、患者の病歴、年齢、および遺伝的背景との組み合わせから導出することができる。いくつかの実施形態では、本方法は、検査値を患者に伝達する工程をさらに含み得る。

#### 【0073】

本明細書に記載される方法を実施するために、例えば、本明細書に記載される値を判定するために必要な計算を実施するために、標準的なコンピューティングデバイスおよびシステムを使用および実装する、例えば、好適にプログラムすることができる。コンピューティングデバイスには、ラップトップ、デスクトップ、モバイルデバイス、ワークステーション、パーソナルデジタルアシスタント、サーバ、ブレードサーバ、メインフレーム、および他の適切なコンピュータなどの様々な形態のデジタルコンピュータが含まれる。いくつかの実施形態では、コンピューティングデバイスは、携帯情報端末、携帯電話、スマートフォン、タブレット、または他の同様のコンピューティングデバイスなどのモバイルデバイスである。

#### 【0074】

いくつかの実施形態では、コンピュータを使用して、例えば医療従事者に情報を伝達することができる。情報は、その情報を電子的に利用可能にすることによって（例えば、安全な様式で）専門家に伝達することができる。例えば、健康管理専門家が情報にアクセスできるように、情報をコンピュータデータベースに配置することができる。加えて、情報は、専門家の代理人として働く病院、診療所、または研究施設に伝達することができる。オープンネットワーク（例えば、インターネットまたは電子メール）を介して転送される情報は、暗号化することができる。患者の遺伝子発現データおよび分析は、暗号化してクラウド内に保存することができる。改ざん防止機能を備えた256ビットAES方式は、ディスクの暗号化に使用することができ、SSLプロトコルは、データ転送における保護を確実にすことができ、鍵管理技術SHA2-HMACは、データへの認証されたアクセスを許可することができる。他の安全なデータ記憶手段も、使用することができる。

#### 【0075】

上記のそのような分析の結果は、担当臨床医による追跡および治療の基礎となり得る。図6（パネルA）または図13（パネルB）から選択される2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の発現レベルが、対照における同じ2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカーの発現レベルと有意に異なる場合、臨床医は、患者が現在大腸癌または前癌性病変の危険性がないと判定し得る。そのような患者は、再スクリーニングのために将来来訪することを奨励される可能性がある。本明細書に開示される方法を使用して、結腸直腸新生物マーカーのレベルの経時的な任意の変化を監視することができる。対象は、最初のスクリーニングおよび／または診断後の任意の期間にわたって監視され得る。例えば、対象は、少なくとも2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、もしくは60ヶ月もしくはそれ以上、または少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20年もしくはそれ以上の間監視され得る。

#### 【0076】

本明細書に開示される方法および組成物は、結腸直腸新生物の危険性があるか、またはそれを罹患している対象についての臨床計画を選択するために有用である。臨床計画は、さらなる診断手順の投与、例えば、便潜血検査、便免疫化学検査、またはポリープもしくは前癌性病変を除去するための結腸鏡検査を含み得る。いくつかの実施形態では、臨床計画は、治療方法を含み得る。いくつかの実施形態では、本方法は、大腸癌を有する対象についての治療を選択する方法を含む。図6（パネルA）または図13（パネルB）から選択される2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の発現レベルが、対照中の同じ

10

20

30

40

50

2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の発現レベルと有意に異なる場合、患者は大腸癌を有する可能性がある。これらの例では、さらなるスクリーニング、例えば、本明細書に開示される方法を使用したスクリーニングの頻度の増加、ならびに胎児潜血検査、便免疫化学検査、および／または結腸鏡検査が推奨され得る。いくつかの実施形態では、例えば、ポリープの除去を伴う結腸鏡検査、化学療法、または腸切除などの手術を含む治療が推奨され得る。したがって、本方法を使用して、2つ以上の結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子の発現レベルを判定し、次に、治療方針を判定することができる。対象、すなわち患者は、臨床的に有益な結果が起こるときはいつでも効果的に治療される。これは、例えば、疾患の症状の完全な解消、疾患の症状の重症度の低下、または疾患の進行の遅延を意味し得る。これらの方法はさらに、a) 大腸癌を有する対象（例えば、患者、より具体的にはヒト患者）を同定する工程と、b) 抗癌治療、例えば、治療薬、外科手術、または放射線療法を対象に提供する工程と、を含み得る。疾患の症状の完全な解消、疾患の症状の重篤度の低下、または疾患の進行の遅延をもたらす対象に提供される治療薬の量は、治療上効果的な量と見なされる。本方法はまた、投薬およびスケジューリングを最適化し、ならびに結果を予測するのを助けるための監視工程を含み得る。監視を使用して、薬物耐性の発症を検出し、応答性の患者を非応答性の患者から迅速に区別し、または癌の再発を評価することもできる。抵抗性もしくは無反応性の徵候がある場合、臨床医は、腫瘍が追加の逃避機構を発症する前に代替もしくは補助剤を選択し得る。

#### 【0077】

本明細書に開示される方法はまた、大腸癌の診断および治療に対する従来の方法と組み合わせて使用することもできる。したがって、診断方法は、大腸癌の標準的な診断方法と一緒に使用することができる。例えば、本方法は、便潜血検査、便免疫化学検査、または結腸鏡検査と組み合わせて使用することができる。本方法はまた、他の大腸癌マーカー、例えば、K R A S、N R A S、B R A F、C E A、C A 1 9 - 9、p 5 3、M S L、D C C、およびM M Rと共に使用することもできる。

#### 【0078】

本明細書に開示される診断方法はまた、大腸癌治療と組み合わせて使用することもできる。大腸癌の治療法は、いくつかの一般的なカテゴリー：外科手術、化学療法、放射線療法、標的指向化療法、および免疫療法に分類される。外科手術には、結腸切除術、部分肝切除術を伴う人工肛門形成術、または保護術が含まれ得る。化学療法は、全身化学療法、または化学療法剤が罹患臓器に直接近接して配置される局所化学療法であり得る。例示的な化学療法剤には、5-フルオロウラシル、オキサリプラチンもしくはその誘導体、イリノテカシンもしくはその誘導体、ロイコボリン、またはカペシタビン、マイトイシンC、シスプラチニン、およびドキソルビシンが含まれ得る。放射線療法は、放射線を癌に向けるための機械を使用する外部放射線療法、または放射性物質を大腸癌の中に直接または近くに配置する内部放射線療法であり得る。標的薬としては、ベバシズマブもしくはE G F R阻害剤モノクローナル抗体（セツキシマブ、パニツムマブ）、ラムシルマブ（抗V E G F R 2）、アフリベルセプト、レゴラフェニブ、トリフルリジン-チピラシルなどの血管新生剤、またはそれらの組み合わせが挙げられ得る。標的薬はまた、標準的な化学療法薬と組み合わせることもできる。免疫療法は、特異的抗体、例えば、抗P D - 1抗体、抗P D - L - 1抗体、およびt i m e - C T L A - 4抗体、抗C D 2 7抗体、癌ワクチン、養子細胞療法、腫瘍溶解性ウイルス療法、アジュvant免疫療法、ならびにサイトカインベースの療法の投与を含み得る。他の治療方法としては、幹細胞移植、温熱療法、光線力学療法、血液製剤の提供および輸血、またはレーザー治療が挙げられる。

#### 【0079】

本発明者らは、「増加された」、「増加」、または「上方調節された」という用語を、一般に、統計的に有意な量によるバイオマーカーのレベルの増加を意味するために使用する場合がある。いくつかの実施形態では、増加は、対照と比較して少なくとも10%の増加、例えば、少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、もしくは少なくとも約40%、もしくは少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくと

10

20

30

40

50

も約 70 %、もしくは少なくとも約 80 %、もしくは少なくとも約 90 %、もしくは最大 100 %を含む増加、または対照と比較して 10 ~ 100 %の間の任意の増加、または少なくとも約 0.5 倍、もしくは少なくとも約 1.0 倍、もしくは少なくとも約 1.2 倍、もしくは少なくとも約 1.5 倍、もしくは少なくとも約 2 倍、もしくは少なくとも約 3 倍、もしくは少なくとも約 4 倍、もしくは少なくとも約 5 倍、もしくは少なくとも約 10 倍の増加、あるいは 1.0 倍 ~ 10 倍またはそれ以上の間の任意の増加であり得る。

#### 【0080】

本発明者らは、「減少」、「減少された」、「低下された」、「低下」、または「下方調節された」という用語を、統計学的に有意な量による真核生物バイオマーカーのレベルの減少を指す。いくつかの実施形態では、減少は、対照と比較して少なくとも 10 % の減少、例えば、少なくとも約 20 %、もしくは少なくとも約 30 %、もしくは少なくとも約 40 %、もしくは少なくとも約 50 %、もしくは少なくとも約 60 %、もしくは少なくとも約 70 %、もしくは少なくとも約 80 %、もしくは少なくとも約 90 %、もしくは最大 100 %を含む減少（すなわち、対照と比較して存在しないレベル）、または対照と比較して 10 ~ 100 %の間の任意の減少、または少なくとも約 0.5 倍、もしくは少なくとも約 1.0 倍、もしくは少なくとも約 1.2 倍、もしくは少なくとも約 1.5 倍、もしくは少なくとも約 2 倍、もしくは少なくとも約 3 倍、もしくは少なくとも約 4 倍、もしくは少なくとも約 5 倍、もしくは少なくとも約 10 倍の減少、あるいは対照と比較して 1.0 倍 ~ 10 倍の間の任意の減少であり得る。

10

#### 【0081】

真核生物バイオマーカーの増加または真核生物バイオマーカーの減少の統計的有意性は、p 値として表現することができる。特定の真核生物バイオマーカーに応じて、p 値は、0.05 未満、0.01 未満、0.005 未満、0.002 未満、0.001 未満、または 0.0005 未満であり得る。

20

#### 【0082】

対照は、患者または患者群から得られた生物学的試料であり得る。いくつかの実施形態では、対照は、基準値であり得る。対照は、健康であると診断された個体または個体の集団から得ることができる。健康な個体には、例えば、前年以内に便寄生虫検査、便細菌検査、または内視鏡検査で陰性と判定された個体が含まれ得る。対照は、罹患していると診断された個体または個体の集団から得ることができる。罹患している個体には、例えば、前年以内に便寄生虫検査、便細菌検査、または内視鏡検査で陽性と判定された個体が含まれ得る。対照は、先に罹患していると診断されたが、現在は寛解しているか、または現在は疾患を罹患していない個体または個体の集団から得ることができる。対照は、一つ、二つまたはそれ以上の時点で個体から得ることができる。例えば、対照は、より以前の時点で対象から得られた生物学的試料であり得る。対照は、特定のバイオマーカーに対する標準的な基準値であり得る。標準的な基準値は、同年齢、性、性別、体格、種族、民族的背景、または一般的な健康状態の個人を評価することに基づいて導出することができる。

30

#### 【0083】

実験試料は、対象から得られた生物学的試料であり得る。実験試料は、既知または未知の健康状態を有する対象から得られ得る。いくつかの実施形態では、対象の健康状態は、例えば、実験試料の分析、生検、身体検査、臨床検査結果、目視検査、または遺伝子分析によって判定され得る。実験試料を介して判定され得る対象の健康状態は、罹患しているか、疾患の危険性があるか、または健康であり得る。

40

#### 【0084】

##### 製造品

生物学的試料、例えば糞便試料中の選択された結腸直腸新生生物バイオマーカーを検出および定量化するためのキットも提供する。したがって、包装された製品（例えば、本明細書に記載される組成物のうちの 1 つ以上を含み、かつ濃縮または使用準備の整った濃度で貯蔵、出荷、または販売用に包装されている滅菌容器）およびキットも、本発明の範囲内である。製品は、本発明の 1 つ以上の組成物を含有する容器（例えば、バイアル、ジャー

50

、ボトル、バッグ、マイクロプレート、マイクロチップ、またはビーズ)を含み得る。加えて、製品は、例えば、包装材料、使用説明書、注射器、送達デバイス、緩衝液、または他の制御試薬をさらに含み得る。

#### 【0085】

キットは、生物学的試料中の、図6(パネルA)もしくは図13(パネルB)から選択される結腸直腸新生物バイオマーカー遺伝子のうちの2つ以上に対応するRNAを検出することができる化合物もしくは薬剤、標準器、および任意選択的に、検出、定量化、もしくは増幅を実施するために必要な1つ以上の試薬を含み得る。いくつかの実施形態では、キットは、生物学的試料中のB細胞マーカー、T細胞マーカー、もしくは免疫グロブリンのうちの2つ以上に対応するRNAを検出することができる化合物もしくは薬剤、標準器、および任意選択的に、検出、定量化、もしくは増幅を実施するために必要な1つ以上の試薬を含み得る。化合物、薬剤、および/または試薬は、好適な容器に包装され得る。キットはさらに、核酸を検出および定量化するためにキットを使用するための説明書を含み得る。例えば、キットは、(1)図6(パネルA)もしくは図13(パネルB)から選択される結腸直腸バイオマーカー遺伝子のうちの2つ以上、またはB細胞マーカー、T細胞マーカー、もしくは免疫グロブリンに対応する核酸配列にハイブリダイズする、プローブ、例えば、オリゴヌクレオチド、例えば、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチド、あるいは(2)図6(パネルA)もしくは図13(パネルB)から選択される結腸直腸バイオマーカー遺伝子のうちの2つ以上、またはB細胞マーカー、T細胞マーカー、もしくは免疫グロブリンに対応する核酸分子を増幅させるのに有用な一対のプライマーを含み得る。キットはさらに、1つ以上のハウスキーピング遺伝子を増幅させるのに有用なプローブおよびプライマーを含み得る。キットはまた、緩衝剤、保存料、および/または核酸もしくはタンパク質安定化剤を含み得る。キットはまた、検出可能な薬剤(例えば、酵素または基質)を検出するのに必要な成分を含み得る。キットはまた、アッセイされ得、かつ含有された試験試料と比較され得る、対照または一連の対照を含み得る。キットを使用して実施されたアッセイの結果を解釈するための説明書と共に、キットの各構成要素を個々の容器内に封入することができ、様々な容器のうちのすべてを単一のパッケージ内に入れることができる。いくつかの実施形態では、キットは、1つ以上の対照マーカーに特異的なプライマーまたはオリゴヌクレオチドプローブを含み得る。いくつかの実施形態では、キットは、図6(パネルA)もしくは図13(パネルB)から選択される結腸直腸バイオマーカーのうちの2つ以上、またはB細胞マーカー、T細胞マーカー、もしくは免疫グロブリンの定量化に特異的な試薬を含む。

#### 【0086】

いくつかの実施形態では、キットは、細菌細胞および他の糞便成分からのヒト細胞の分離、ならびに患者の糞便試料からのヒトmRNAの抽出に特異的な試薬を含み得る。したがって、キットは、緩衝液、エマルジョンビーズ、シリカビーズ、安定化試薬、および遠心分離用の様々なフィルタおよび容器を含み得る。キットはまた、試料の汚染を最小限に抑え、かつ糞便試料中のヒトmRNAの安定性を確実にするための糞便取り扱いのための説明書を含み得る。キットはまた、試料の保存を確実にするためのアイテム、例えば、冷却剤またはヒートパックを含み得る。いくつかの実施形態では、キットは、糞便回収デバイスを含み得る。

#### 【0087】

製品はまた、説明文(例えば、印刷された標識もしくは挿入物、または製品の使用を記載する他の媒体(例えば、音声もしくはビデオテープまたはコンピュータ読み取り可能媒体))を含み得る。説明文は、容器に関連付けられ(例えば、容器に固定され)、試薬が使用され得る様式を記載することができる。試薬は、使用準備の整っている(例えば、適切な単位で存在する)ことができ、かつ1つ以上の追加のアジュバント、担体、または他の希釈剤を含み得る。代替的に、試薬は、希釈剤および希釈のための説明書と共に濃縮形態で提供され得る。

#### 【実施例】

10

20

30

40

50

## 【0088】

## 実施例1：ヒト糞便試料調達

ヒト糞便回収：患者は、便座の上に適合するバケツ内に排便するように依頼され、得られた試料は、それらがハリコフ国立医学大学（ウクライナ国ハリコフ）に輸送されるまで冷凍庫に保存された。糞便を50mLコニカルチューブに分注し、-80°Cで保存した。試料は、ドライアイス上でハリコフ国立医科大学からCapital Biosciences（米国メリーランド州ゲーサーズバーグ）に出荷され、すぐに-80°Cの冷凍庫に移された。そこから、試料は、それらが抽出まで-80°Cの冷凍庫に保存されたBioGenerator Labs（米国ミズーリ州セントルイス）にドライアイス上で出荷された。

10

## 【0089】

ヒト試料の種類：直腸結腸癌患者195人（ステージI～IV）、前癌性腺腫患者126人、結腸鏡検査で陰性の所見患者125人、良性ポリープ患者8人から糞便試料を得、結果として454の集約試料を得た。健康な個体は、大腸癌、炎症性腸疾患、セリック病、過敏性腸症候群、過去20日以内の下痢、または任意の他の胃腸疾患の病歴のない患者であった。罹患している個体は、大腸癌および前癌性ポリープと診断された患者であった。大腸癌患者は、前月内に結腸鏡検査およびその後の生検によりI期～IV期の大腸癌と診断されており、かつ化学療法、放射線療法、および/または外科手術を含み得るいかななる生検後治療をまだ受けていない。結腸鏡検査を受ける前に、ポリープ患者は糞便試料を提供し、医師は、その後の生検および組織学的評価によって前癌性であると考えられたポリープを検出した。健康な個体は、性別および年齢の階層（50～60歳、60～70歳、70～80歳、および80～90歳）に基づいて、ポリープおよび癌患者とマッチングされた。この研究に使用された患者は、Capital Biosciencesによって同意された。Schulman Internal Review Boardは、この研究の倫理的監督を提供した。

20

## 【0090】

## 実施例2：ヒト核酸抽出

総核酸抽出：各糞便試料を50mLコニカルチューブ内に置いた。各チューブに、約1,000～25,000mgの糞便を添加した。追加の20～40mLの溶液を各チューブに添加した。この溶液は、0.05%Tween-20（Sigma-Aldrich）および0.0002%RNase阻害剤（Sigma-Aldrich）とハンクス平衡塩類溶液（HBSS）（Sigma-Aldrich）との混合物を含有した。糞便を溶液中に懸濁し、0～10分間、約0～10°Cで回転させた。溶液を10分間4,000rpmで遠心分離し、上清を廃棄した。約4～10mLのEasyMag（登録商標）溶解緩衝液（bioMérieux）をペレットに添加し、ペレットを溶液に再懸濁した。溶液を、10～15分間20～25°Cにて2500～3500rpmで遠心分離した。分画遠心分離の間に、溶液は3層に分離した。最下層は固体の細胞破片を含み、中間層はヒト核酸に富む親水性層であり、最上層は疎水性脂質層であった。上部の2層は、新しい1.5mLコニカルチューブに移し、溶液を再び10分間20～25°Cにて2500rpmで遠心分離した。この遠心分離工程による結果は、3層への分離であった：最下層は固体の細胞破片であり、中間層はヒト核酸に富む親水性層であり、最上層は疎水性脂質層であった。溶液から大きな破片をふるい分けるために、20μLピペットチップを1mLピペットチップ上に置き、2mLの親水性層を1.5mLチューブからピペットで移し、EasyMag（登録商標）使い捨てカートリッジ（bioMérieux）に移した。加えて、60μLのEasyMag（登録商標）磁性シリカ（bioMérieux）をカートリッジに添加した。ピペットを使用して、ビーズを0.5～1分間溶液中に混合した。ビーズに結合された核酸を、製造元の指示に従って、Specific A Protocolを使用して緩衝液中に溶出した。溶出された核酸の量は70μLであった。この核酸溶液を1.5mLチューブにピペットで移し、氷上に置いた。次に、前の工程で使用されたものと同じEasyMag（登録商標）使い捨てカートリッジ（bioMérieux）

30

40

50

)に、同じ大きな破片をふるい落とす技術を使用して、前に使用された1.5 mLチューブ中の同じ溶液からの2 mLの追加の親水性層を再装填した。追加の20  $\mu$ LのE asy Mag (登録商標)磁性シリカ(bioMerieux)をカートリッジに添加した。ピペットを使用して、ビーズを0.5~1分間溶液中に混合した。上記に記載されるように、ビーズに結合された核酸を、製造元の指示に従って、Specific A Protocolを使用して緩衝液中に溶出した。溶出された核酸の量は70  $\mu$ Lであった。この核酸溶液を、最初の70  $\mu$ Lの溶出液を既に含有している元の1.5 mLチューブにピペットで移し、合わせた溶液を氷上に置いた。

#### 【0091】

DNAse処理: 140  $\mu$ Lの溶液を、ベースラインゼロDNase(Epicenter)を用いて35~40℃で20~40分間処理した。E asy Mag (登録商標)溶解緩衝液の1~2 mLアリコートをDNAse処理溶液に添加し、試料を新しいE asy Mag (登録商標)使い捨てカートリッジに移した。溶液全体を60  $\mu$ LのE asy Mag (登録商標)磁性シリカと共に新しいカートリッジに添加した。ビーズに結合された核酸を、製造元の指示に従ってE asy Mag (登録商標)ジェネリックプロトコルを使用して緩衝液中に溶出した。溶出された核酸の量は25  $\mu$ Lであった。この核酸溶液を1.5 mLチューブにピペットで移し、0~6℃で保存した。

#### 【0092】

実施例3:ヒト糞便試料中のヒト核酸レベルの測定

抽出結果: 上記で抽出された試料を使用して、Agilent 2100 Bioanalyzerを使用して、総核酸およびRNA完全性について1  $\mu$ Lを評価した。試料を定性的および定量的に分析した。電気泳動分析を使用して、抽出されたRNAの質を調べた。Bioanalyzerの出力の結果を、図1および図2に示されるように、ゲル電気泳動によって分析した。電気泳動ファイル(図1)は、各試料のバンドをRNAラダーのサイズマーカーで表されるバンド(電気泳動図の最初のレーンに示される)と比較し、かつ18Sおよび28SのリボソームRNAバンドを同定することによって読み取られた。リボソームRNA(rRNA)は、標準化ラダー上の2,000個のヌクレオチドマーカーの周りの2つの大きく目立つバンドである。定性的には、適切なバンド形成およびより暗いバンド強度は、十分な無傷の核酸が、マイクロアレイ配列決定、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、核酸配列決定、分子バーコード化、またはプローブ捕捉などのさらなる分析に利用可能であることを示した。図2は、電気泳動図の例を示す。電気泳動図は、総RNA質量、RIN、および総rRNA質量の定量化を伴う各電気泳動のグラフ表示である。ゲル電気泳動分析は、総核酸およびRNA完全性についての情報を提供した。試料が下流の分析に適格であるかどうかを判定するために、電気泳動ダイヤグラムおよび電気泳動図を各試料について分析した。一例では、本発明に記載される方法を使用して抽出された120個の試料を、分析された120個の試料のうちの110個がRNA完全性およびRNA質量に関して品質チェックに合格するようにRNA品質について分析した(図3)。

#### 【0093】

電気泳動図および電気泳動トレースを使用して、文献に記載されたRNA抽出方法と比較して、本発明に記載されるRNA抽出方法を使用して品質チェックに合格した試料を比較した。文献に記載されたプロトコルと比較して、上記に記載される核酸抽出法は、4.88( $n=168$ )まで平均RINを増加させた。加えて、プロトコルを完了するために必要な合計時間は、3日間~5時間に短縮された。総RNA抽出法は、文献に記載されるような50%からのトランスクリプトーム解析に適格な試料の数を、リボソームRNA完全性および質量によって測定されるような記載されるプロトコル( $n=168$ ,  $p < 0.0001$ )において98.2%まで増加させた(図4)。

#### 【0094】

実施例4:RNA転写物の分析

総RNA抽出に供された454個の試料のうち、これらの試料のうちの399個の試料は、Agilent Bioanalyzerを使用したリボソームRNAバンドの直接

10

20

30

40

50

可視化に基づくトランスクリプトーム分析に適格であった。続いて、*Affymetrix GeneChip*（商標）*Human Transcriptome Array 2.0*（米国カリフォルニア州サンタクララ）を使用して全トランスクリプトーム分析を行うために、399個の利用可能な試料から342個の試料を無作為に選択した。これらの342個の試料のうち、4個の試料は増幅に失敗し、8人のポリープ患者は、その後の生検で過形成良性ポリープを有すると判定された。これら12個の試料を分析から除外し、最終分析用に330個の試料を得た。

#### 【0095】

製造者のプロトコルに従って、その後の*Affymetrix GeneChip*（商標）*Human Transcriptome Array 2.0*へのハイブリダイゼーションと共に、約100ngのDNaseを含まない便RNAをAmbio WT-picoキットで増幅させた。*Affymetrix Expression Console*（商標）を用いた信号スペーストランスマーケーションロバストマルチアレイ分析（SST-RMA）を使用して、すべての試料を正規化した。

10

#### 【0096】

*Affymetrix Microarray*中の70,523個の転写物クラスターのうち、3,977個の遺伝子に対応する5,149個の転写物クラスターのサブセットを予め選択して、示差的発現について評価した。この最初の選択は、誤った発見率を減らし、癌の発症および進行において既知の機能を持たない遺伝子を除外した。結腸直腸新生物の検出のために、7つの機械学習分類器（サポートベクターマシン、グラジエントブースト、アダプティブブースト、ランダムフォレスト、ナイーブベイズ、ディシジョンツリー、およびk最近傍）を調べた。

20

#### 【0097】

330人の個人を265人の個人の訓練セットと65人の個人の試験セットに分けた。訓練セットを使用して、示差的に発現される遺伝子を同定し、かつ計算モデルを構築し、試験セットを使用して、計算モデルの検出精度を判定した。標準的なLIMMAパッケージを使用して、前癌性腺腫またはCRCのいずれかを有する個体と結腸鏡検査で所見がない個体との間で示差的に発現されるRNA転写物クラスターのサブセットを同定した。すべてのバイオマーカーを対数オッズスコアに従ってランク付けし、200個の最高ランクのバイオマーカー（ $p < 0.05$ ）を、機械学習モデルを構築する際の特徴として役立てた（図4）。これらの遺伝子の階層的クラスター化を記載するヒートマップを図5Aに要約し、示差的に発現される遺伝子に関連する重要な経路を図5Bに要約する。結腸直腸新生物を有する個体を健康な個体から分離するために、3つの集団内で示差的に発現される転写物に関連する5つの遺伝子クラスターがあった。示差的に発現される経路は、大部分（77.7%）が細胞成分経路の上方調節である22個の一般的なGeneGO標準経路についての濃縮を示した。最も注目に値するのは、ストレスに対する細胞応答、ストレスに対する応答、およびRNA結合の上方調節であった。疾患に関連する一般的な経路を、GAGEソフトウェアを用いて、示差的に発現される上位200個の転写物クラスターを分析することによって同定した。この疾患に関連する経路を図5Bに示す。サポートベクターマシンモデル（-SVM）とRBFカーネルを、モデル開発のために選択した。カーネル関数は、明示的に計算されていない、より高次元の空間に特徴を拡張することによって、個人間の距離の計算を可能にする。SVMは、標識グループを区切る最大マージン超平面を見つける。パラメータ $\gamma$ は、最大マージンを判定するために使用される個人の割合の下限を規定する。SVMモデルは、訓練セット内の265人すべての個体からの200個の転写物についての発現レベルを使用して訓練された。この複数標的RNAバイオマーカーアルゴリズムは、試験セット内の65人の個人に使用され、スクリーニング結腸鏡検査で陽性所見を示した全個人の79%（43人中34人）を検出した。このアルゴリズムは、5mm～12mmの範囲のサイズの前癌性腺腫を有する個体の95%、I期の大腸癌を有する個体の57%、II期の大腸癌を有する個体の75%、III期の大腸癌を有する個体の66%、およびIV期の大腸癌を有する個体の83%を正確に予測した。大腸癌

30

40

40

50

に対するモデルの感度は、サイズと直接相関しており、そのため、3.5 cm以下の腫瘍の60%が正確に検出され、一方、5.0 cm以上の腫瘍の83%が正確に検出された。このモデルは59%の特異度を達成し、それによって結腸鏡検査で陰性の所見を有する22人の個人のうちの13人がモデルによって正確に同定された。全体として、このモデルは、79%の結腸直腸新生物に対する感度、95%の前癌性腺腫に対する感度、および59%の特異度を達成した。

#### 【0098】

技術的および生物学的複製物は、すべての遺伝子について発光レベルに関して高い一致を示した(図10)。RNAを単離し、同じ日に評価したところ、完璧な技術的複製物は、最高レベルの一一致( $R^2 > 0.990$ )を示した(図10A)。時間的に分離された技術的複製物もまた、高レベルの一一致( $R^2 > 0.989$ )を示した。これらの複製物は、同じ日に両方の複製物についてRNAを抽出することによって得られたが、1つの複製物は0日目に分析され、2つ目の複製物は6ヶ月後に分析された(図10B)。最後に、生物学的複製物もまた、高レベルの一一致( $R^2 > 0.986$ )を示した。これらの生物学的複製物は、同じ個体に由来する糞便の異なるセグメントから試料を採取することによって開発された(図10C)。RNAを別々に抽出し、異なる日に分析した。

10

#### 【0099】

大腸癌の発症または進行に関与している5,149個の遺伝子のみを分析すると、全トランスクリプトームのサブセット、調整されたR<sub>2</sub>乗値は、3つの複製物のコホートすべてについて改善された。これらの複製物は、上記に記載されるような同程度のレベルの一一致を示した(図11A~C)。

20

#### 【0100】

##### 実施例5：動物糞便試料調達

糞便回収：試料は、ネコおよびイヌの飼い主によって米国ミズーリ州セントルイスの地元で回収された。ネコがトイレに排便後、ネコの所有者は、-20で50 mLコニカルチューブ中に試料を移し、チューブを保存するように依頼された。イヌが屋外で排便後、イヌの所有者は、-20で50 mLコニカルチューブ中に試料を移し、チューブを保存するように依頼された。回収の一週間以内に、試料を回収し、それらを抽出まで-80の冷凍庫に保存されたBioGenerator Labs(米国ミズーリ州セントルイス)に手動で移した。

30

#### 【0101】

試料の種類：糞便試料はすべて、年齢、品種、および性別の異なる健康な動物から採取された。4匹の異なるネコから4つの試料を採取し、4匹の異なるイヌから追加の4つの試料を採取し、8つの凝集体試料を得た。1匹のネコが最近白癬と診断されたが、他のすべての動物は無症候性であり、最後の30日以内に胃腸の苦痛の徴候を全く示さなかった。

#### 【0102】

##### 実施例6：動物核酸抽出

総核酸抽出：各糞便試料を50 mLコニカルチューブ内に置いた。各チューブに、約1,000~25,000 mgの糞便を添加した。追加の20~40 mLの溶液を各チューブに添加した。この溶液は、0.05% Tween-20(Sigma-Aldrich)および0.0002% RNase阻害剤(Sigma-Aldrich)とハンクス平衡塩類溶液(HBSS)(Sigma-Aldrich)との混合物を含有した。糞便を溶液中に懸濁し、0~10分間、約0~10で回転させた。溶液を10分間4にて1000 rpmで遠心分離し、上清を廃棄した。約4~10 mLのEasyMag(登録商標)溶解緩衝液(bioMerieux)をペレットに添加し、ペレットを溶液に再懸濁した。溶液を、10~15分間20~25にて2500~3500 rpmで遠心分離した。分画遠心分離の間に、溶液は3層に分離した。最下層は固体の細胞破片を含み、中間層は動物核酸に富む親水性層であり、最上層は疎水性脂質層であった。上部の2層は、新しい15 mLコニカルチューブに移し、溶液を再び10分間20~25にて2500 rpmで遠心分離した。この遠心分離工程による結果は、3層への分離であった：最下層は固

40

50

体の細胞破片であり、中間層は動物核酸に富む親水性層であり、最上層は疎水性脂質層であった。溶液から大きな破片をふるい分けるために、 $20\text{ }\mu\text{L}$  ピペットチップを $1\text{ mL}$  ピペットチップ上に置き、 $2\text{ mL}$  の親水性層を $15\text{ mL}$  チューブからピペットで移し、Easy Mag (登録商標) 使い捨てカートリッジ (biomerieux) に移した。加えて、 $60\text{ }\mu\text{L}$  のEasy Mag (登録商標) 磁性シリカ (biomerieux) をカートリッジに添加した。ピペットを使用して、ビーズを $0.5\sim1$  分間溶液中に混合した。ビーズに結合された核酸を、製造元の指示に従って、Specific A Protocol 01 を使用して緩衝液中に溶出した。溶出された核酸の量は $70\text{ }\mu\text{L}$  であった。この核酸溶液を $1.5\text{ mL}$  チューブにピペットで移し、氷上に置いた。次に、前の工程で使用されたものと同じEasy Mag (登録商標) 使い捨てカートリッジ (biomerieux) に、同じ大きな破片をふるい落とす技術を使用して、前に使用された $15\text{ mL}$  チューブ中の同じ溶液からの $2\text{ mL}$  の追加の親水性層を再装填した。追加の $20\text{ }\mu\text{L}$  のEasy Mag (登録商標) 磁性シリカ (biomerieux) をカートリッジに添加した。ピペットを使用して、ビーズを $0.5\sim1$  分間溶液中に混合した。上記に記載されるように、ビーズに結合された核酸を、製造元の指示に従って、Specific A Protocol 01 を使用して緩衝液中に溶出した。溶出された核酸の量は $70\text{ }\mu\text{L}$  であった。この核酸溶液を、最初の $70\text{ }\mu\text{L}$  の溶出液を既に含有している元の $1.5\text{ mL}$  チューブにピペットで移し、合わせた溶液を氷上に置いた。

#### 【0103】

DNAse 处理： $140\text{ }\mu\text{L}$  の溶液を、ベースラインゼロ DNase (Epicerter) を用いて $35\sim40$  度 $20\sim40$  分間処理した。Easy Mag (登録商標) 溶解緩衝液の $1\sim2\text{ mL}$  アリコートをDNAse 处理溶液に添加し、試料を新しいEasy Mag (登録商標) 磁性シリカと共に新しいカートリッジに添加した。ビーズに結合された核酸を、製造元の指示に従ってEasy Mag (登録商標) ジェネリックプロトコルを使用して緩衝液中に溶出した。溶出された核酸の量は $25\text{ }\mu\text{L}$  であった。この核酸溶液を $1.5\text{ mL}$  チューブにピペットで移し、 $0\sim6$  度で保存した。

#### 【0104】

##### 実施例 7：動物糞便試料中の核酸レベルの測定

抽出結果：上記で抽出された試料を使用して、Agilent 2100 Bioanalyzer を使用して、それぞれ $1\text{ }\mu\text{L}$  の総核酸およびRNA完全性について評価した。試料を定性的および定量的に分析した。Bioanalyzer の出力の結果を、図7に示されるように、ゲル電気泳動によって分析した。図7のパネルは、Agilent RNA 6000ナノキットを使用して実験された8つの試料からの $1\text{ }\mu\text{L}$  のRNAのBioanalyzerトレースを示す。ゲル電気泳動分析は、総核酸ならびにRNA完全性および質量に関する情報を提供した。電気泳動ファイルは、各試料のバンドをRNAラダー内のサイズマーカーによって表されるバンド（電気泳動図の最初のレーンに示される）と比較し、かつ $18S$ および $28S$ 真核生物リボソームRNAバンドを同定することによって読み取られた。定性的には、適切なバンド形成およびより暗いバンド強度は、十分な無傷の核酸が、マイクロアレイ配列決定、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 、核酸配列決定、分子バーコード化、またはプローブ捕捉などのさらなる分析に利用可能であることを示した。試料の品質も、RNA完全性数を使用して定性的に分析した。図7Bは、Agilent RNA 6000ナノキットを使用して実験された同じ8つの試料それぞれのRNA完全性値を示す。試料質量も定量的に分析した。図7Cは、Agilent RNA 6000ナノキットを使用して実験された同じ8つの試料からの推定真核生物RNA濃度 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) を示す。真核生物のRNA濃度を、Bioanalyzerトレースの曲線下面積を使用して推定した。図7B～Cに示されるように、すべての試料についての平均RINは $4.2$ であり、すべての試料についての平均真核生物質量は $61.4\text{ ng}/\mu\text{L}$ であった。定量的および定性的測定は、すべての試料がバイオマーカー発現分析に適格である ( $n=8$ ) ことを示した。

10

20

30

40

50

## 【0105】

## 実施例8：動物糞便試料中のRNA転写物の分析

バイオマーカー発現分析に適格である( $n = 4$ )すべてのイヌ試料を、RT-qPCRを使用して評価した。これら4つのイヌ試料について、5つのプライマーを設計して、イヌゲノムの一部分を評価した。イヌT細胞上のIgMの重鎖を評価することによって陽性対照として作用するように2つのプライマーを設計した。3つの追加のプライマーを設計し、イヌリンパ球前駆体において起こり得る2つの別々の再配列を評価してT細胞特異的RNAを検出した。各RT-PCR反応は、10μLの2X Master Mix (New England Biolabs)、1μLの20X Enzyme Mix (New England Biolabs)、0.8μLの10μMフォワードプライマー (Eurofins Genomics)、0.8μLの10μMリバースプライマー (Eurofins Genomics)、1μLの20X SYBR Green I、2μLのRNA、および4.4μLの分子生物学グレードH<sub>2</sub>O (Thermo Scientific)を含んだ。Applied Biosystems Quant Studio 5 qPCR装置を使用して、核酸を増幅させた。サーモサイクラープロトコルは以下のとおりであった：RNAをDNAに逆転写するために55度25分、95度1分間の逆転写酵素不活性化、増幅および信号回収のために95度10秒および60度45秒の60サイクル、ならびに次に、70度～95度の融解曲線。総RNA抽出に供された4つのイヌ試料のうち、75%の試料が陽性対照(C-mu IgM)の増幅を示した(図8A)。陽性対照の増幅を示した個体のうち、100%(n=3)が両方のT細胞特異的RNA転写物の増幅を示した。T細胞特異的転写物の一方は35サイクルで増幅し、他方のT細胞特異的転写物は50サイクルで増幅した(図8B)。

10

20

20

## 【0106】

バイオマーカー発現分析に適格であった( $n = 5$ )すべてのネコ試料を、RT-qPCRを使用して評価した。これら4つのネコ試料について、2つのプライマーを陽性対照として作用するように設計した。これらのプローブは、ネコアクチンBを評価して、核酸抽出物中にネコRNAが存在するかどうかを判定した。各反応は以下を含んだ：10μLの2X Master Mix (New England Biolabs)、1μLの20X Enzyme Mix (New England Biolabs)、0.8μLの10μMフォワードプライマー (Eurofins Genomics)、0.8μLの10μMリバースプライマー (Eurofins Genomics)、1μLの20X SYBR Green I、2μLのRNA、および4.4μLの分子生物学グレードH<sub>2</sub>O (Thermo Scientific)。溶液をApplied Biosystems Quant Studio 5 qPCR装置を用いて増幅させた。サーモサイクラープロトコルは以下のとおりであった：RNAをDNAに逆転写するために55度25分、95度1分間の逆転写酵素不活性化、増幅および信号回収のために95度10秒間および次に60度45秒間の60サイクル。総RNA抽出に供された4つのネコ試料のうち、75%の試料(n=4)が陽性対照(ネコアクチンB)の増幅を示した(図9)。

30

## 【0107】

## 実施例9：イヌB細胞転写物の分析

バイオマーカー発現分析に適格である( $n = 4$ )すべてのイヌ試料を、RT-qPCRを使用して評価した。これら4つのイヌ試料について、6つのプライマーセットを設計して、リンパ球に関連するイヌゲノムの一部分を評価した(図15A)。設計された6つのプライマーセットのうち、1つのプライマーセットを使用して、イヌリンパ球前駆体において起こり得る2つの別々の再配列を評価してB細胞特異的RNAを検出した。各反応は、10μLの2X Master Mix (New England Biolabs)、1μLの20X Enzyme Mix (New England Biolabs)、0.8μLの10μMフォワードプライマー (Eurofins Genomics)、0.8μLの10μMリバースプライマー (Eurofins Genomics)、1μLの20X SYBR Green I、2μLのRNA、および4.4μLの分子生物学

40

50

グレードH<sub>2</sub>O(Thermo Scientific)を含んだ。Applied Biosystems Quant Studio 5 qPCR装置を使用して、溶液を増幅させた。サーモサイクループロトコルは以下のとおりであった：RNAをDNAに逆転写するために55で25分、95で1分間の逆転写酵素不活性化、増幅および信号回収のために95で10秒および60で45秒の60サイクル、ならびに次に70～95の融解曲線。これらの増幅反応の例を図16Aに示す。各試料について2つのB細胞特異的RT-qPCR反応があり( $n=8$ )、これらの反応のうち、87.5%(8つのうちの7つ)がB細胞関連転写物の増幅を示した。B細胞特異的転写物は、30～35サイクルの間に増幅した(図16A)。

## 【0108】

10

## 実施例10：ネコ試料複製物の抽出

**糞便回収：**試料は、ネコの飼い主によってミズーリ州セントルイスの地元で回収された。ネコがトイレに排便後、ネコの所有者は、-20で50mLコニカルチューブ中に試料を移し、チューブを保存するように依頼された。產生の一週間以内に、試料を回収し、それらを抽出まで-80°Cの冷凍庫に保存されたBioGenerator Labs(米国ミズーリ州セントルイス)に手動で移した。

## 【0109】

**試料の種類：**糞便試料はすべて、年齢、品種、および性別の異なる健康な動物から採取された。4匹の異なるネコから8つの試料を回収した。一部のネコでは、最大3つの生物学的複製物を回収した。我々は、生物学的複製物を別々の腸の動きから回収された同じネコ由来の糞便試料と呼ぶ。1匹のネコが最近白癬と診断されたが、他のすべての動物は無症候性であり、最後の30日以内に胃腸の苦痛の徴候を全く示さなかった。

20

## 【0110】

**総核酸抽出：**各糞便試料を50mLコニカルチューブ内に置いた。各チューブに、約1,000～25,000mgの糞便を添加した。追加の20～40mLの溶液を各チューブに添加した。この溶液は、0.05%Tween-20(Sigma-Aldrich)および0.0002%RNase阻害剤(Sigma-Aldrich)とハンクス平衡塩類溶液(HBSS)(Sigma-Aldrich)との混合物を含有した。糞便を溶液中に懸濁し、0～10分間、約0～10で回転させた。溶液を10分間4にて1000rpmで遠心分離し、上清を廃棄した。約4～10mLのEasyMag(登録商標)溶解緩衝液(bioMerieux)をペレットに添加し、ペレットを溶液に再懸濁した。溶液を、10～15分間20～25にて2500～3500rpmで遠心分離した。分画遠心分離の間に、溶液は3層に分離した。最下層は固体の細胞破片を含み、中間層はヒト核酸に富む親水性層であり、最上層は疎水性脂質層であった。上部の2層は、新しい1.5mLコニカルチューブに移し、溶液を再び10分間20～25にて2500rpmで遠心分離した。この遠心分離工程による結果は、3層への分離であった：最下層は固体の細胞破片であり、中間層はヒト核酸に富む親水性層であり、最上層は疎水性脂質層であった。溶液から大きな破片をふるい分けるために、20μLピペットチップを1mLピペットチップ上に置き、2mLの親水性層を1.5mLチューブからピペットで移し、EasyMag(登録商標)使い捨てカートリッジ(bioMerieux)に移した。加えて、60μLのEasyMag(登録商標)磁性シリカ(bioMerieux)をカートリッジに添加した。ピペットを使用して、ビーズを0.5～1分間溶液中に混合した。ビーズに結合された核酸を、製造元の指示に従って、Specific A Protocol 01を使用して緩衝液中に溶出した。溶出された核酸の量は70μLであった。この核酸溶液を1.5mLチューブにピペットで移し、氷上に置いた。次に、前の工程で使用されたものと同じEasyMag(登録商標)使い捨てカートリッジ(bioMerieux)に、同じ大きな破片をふるい落とす技術を使用して、前に使用された1.5mLチューブ中の同じ溶液からの2mLの追加の親水性層を再装填した。追加の20μLのEasyMag(登録商標)磁性シリカ(bioMerieux)をカートリッジに添加した。ピペットを使用して、ビーズを0.5～1分間溶液中に混合した。上記に記載されるように、

30

40

50

ビーズに結合された核酸を、製造元の指示に従って、*Specific A Protocol* を使用して緩衝液中に溶出した。溶出された核酸の量は 70 μL であった。この核酸溶液を、最初の 70 μL の溶出液を既に含有している元の 1.5 mL チューブにピペットで移し、合わせた溶液を氷上に置いた。

#### 【0111】

D N Ase 处理：140 μL の溶液を、ベースラインゼロ DNase ( Epicenter ) を用いて 35 ~ 40 ℃ で 20 ~ 40 分間処理した。EasyMag ( 登録商標 ) 溶解緩衝液の 1 ~ 2 mL アリコートを DNase 处理溶液に添加し、試料を新しい EasyMag ( 登録商標 ) 使い捨てカートリッジに移した。溶液全体を 60 μL の EasyMag ( 登録商標 ) 磁性シリカと共に新しいカートリッジに添加した。ビーズに結合された核酸を、製造元の指示に従って EasyMag ( 登録商標 ) ジェネリックプロトコルを使用して緩衝液中に溶出した。溶出された核酸の量は 25 μL であった。この核酸溶液を 1.5 mL チューブにピペットで移し、0 ~ 6 ℃ で保存した。

#### 【0112】

##### 実施例 11：ネコ試料複製物中の核酸レベルの測定

抽出結果：上記で抽出された試料を使用して、Agilent 2100 Bioanalyzer を使用して、それぞれ 1 μL の総核酸および RNA 完全性について評価した。試料を定性的および定量的に分析した。Bioanalyzer の出力の結果を、図 14 に示されるようにゲル電気泳動によって分析した。図 14 は、Agilent RNA 6000 ナノキットを使用して実験された 8 つの試料からの 1 μL の RNA Bioanalyzer トレースを示す。これは 4 匹の個々のネコを含んだ。ゲル電気泳動分析は、総核酸ならびに RNA 完全性および質量に関する情報を提供した。電気泳動ファイルは、各試料のバンドを RNA ラダー内のサイズマーカーによって表されるバンド（電気泳動図の最初のレーンに示される）と比較し、かつ 18S および 28S 真核生物リボソーム RNA バンドを同定することによって読み取られた。定性的には、適切なバンド形成およびより暗いバンド強度は、十分な無傷の核酸が、マイクロアレイ配列決定、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 、核酸配列決定、分子バーコード化、またはプローブ捕捉などのさらなる分析に利用可能であることを示した。試料のうちの 100 % が、RNA 完全性数および真核生物細胞質量の量に基づく分析に適合であった。真核生物の濃度は、Bioanalyzer トレースの 18S および 28S の真核生物のリボソーム RNA バンド下の面積に基づいて推定された。図 14 は、4 匹の個々のネコについての生物学的複製物を示す。生物学的複製物と個々のネコについての明確なバンド形成との間に同様のバンド形成があった（図 14）。

#### 【0113】

##### 実施例 12：ネコ試料複製物中の RNA 転写物の分析

バイオマーカー発現分析に適合であった (n = 5) すべての個々のネコ試料を、RT-qPCR を使用して評価した。合計 4 つのプライマーセットを設計して、リンパ球関連転写物および上皮細胞関連対照を評価した（図 15B）。1 つのプライマーセットを設計し、ネコリンパ球前駆体において起こり得る再配列を評価して T 細胞特異的 RNA を検出した。各反応は、10 μL の 2X Master Mix (New England Biolabs) 、1 μL の 20X Enzyme Mix (New England Biolabs) 、0.8 μL の 10 μM フォワードプライマー (Eurofins Genomics) 、0.8 μL の 10 μM のリバースプライマー (Eurofins Genomics) 、1 μL の 20X SYBR Green I 、2 μL の RNA 、および 4.4 μL の分子生物学グレード H<sub>2</sub>O (Thermo Scientific) を含んだ。Applied Biosystems Quant Studio 5 qPCR 装置を使用して、溶液を増幅させた。サーモサイクラープロトコルは以下のとおりであった：RNA を DNA に逆転写するために 55 ℃ で 25 分、95 ℃ で 1 分間の逆転写酵素不活性化、増幅および信号回収のために 95 ℃ で 10 秒間および次に 60 ℃ で 45 秒間の 60 サイクル。これらの増幅事象の例を図 16B に示す。選択された T 細胞再配列について分析された 5 つ

のネコ試料のうち、合計 12 個の反応において、75 % の反応が T 細胞関連転写物の増幅を示した。試験されたすべての T 細胞再配列は、少なくとも 1 匹のネコにおいて増幅を示した（図 16 B）。

#### 【0114】

##### 実施例 13：ナノストリング分析

ヒト大腸癌および前癌性腺腫に関連する遺伝子をさらに分析するために、追加の 70 個のヒト試料を上記に記載される RNA 抽出法に供した。抽出された RNA は、遺伝子発現の直接多重測定に基づくデジタルカラーコードバーコード技術を利用するナノストリング n Counter 分析システムを使用して分析された。70 個の試料のうち、48 個を、MAPK、STAT、PI3K、RAS、細胞周期、アポトーシス、Hedgehog、Wnt、DNA Damage Control、転写調節、クロマチン修飾、および TG F-<sup>10</sup> を含む 13 個の癌関連標準経路からの 770 個の遺伝子を含む、n Counter（登録商標）PanCancer 経路パネルを使用して分析した。残りの 22 個の試料を、血管新生、細胞外マトリックスリモデリング（ECM）、上皮間葉転換（EMT）、および転移を含む癌進行プロセスの各段階からの 770 個の遺伝子を含む、n Counter（登録商標）PanCancer 進行パネルを使用して分析した。これら 22 個の試料を、ACTB、B2M、BMP3、CD274、CD8A、GAPDH、HPRT1、N-BLR、NDRG4、および RNU2-1 を含む 10 個の「スパイクイン」遺伝子についても評価した。

#### 【0115】

上位 200 個の示差的に発現される遺伝子である、図 6（パネル A）で同定された遺伝子のリストに加えて、我々はまた、大腸癌および前癌性腺腫に関連する追加の遺伝子も分析した。我々はまた、ナノストリング n Counter 分析システム上で高度に発現されるか、または示差的に発現されると同定されたすべての遺伝子を分析した。この分析には、n Counter（登録商標）PanCancer 経路パネル、n Counter（登録商標）PanCancer 進行パネル、および「スパイクイン」遺伝子の使用が含まれた。我々は、この上方を使用して、大腸癌および前癌性腺腫（図 13（パネル B））のための 400 個の遺伝子の RNA バイオマークー指標を開発した。<sup>20</sup>

20

30

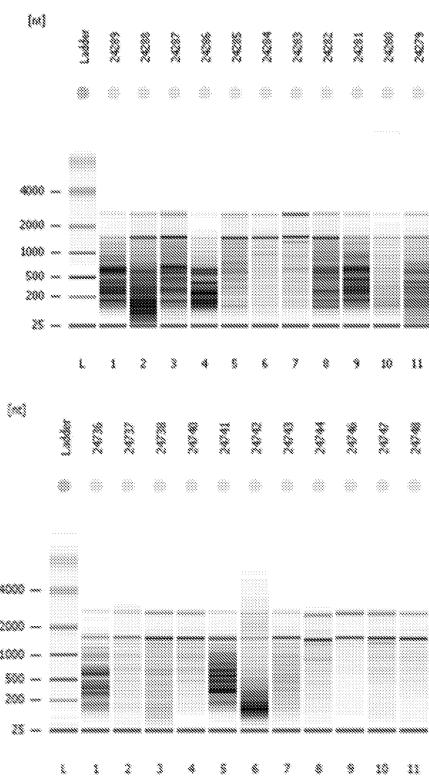
40

50

## 【図面】

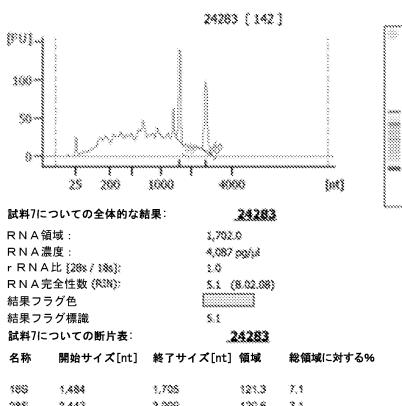
## 【図 1】

電気泳動ファイル実験



## 【図 2】

試料電気泳動図



10

20

30

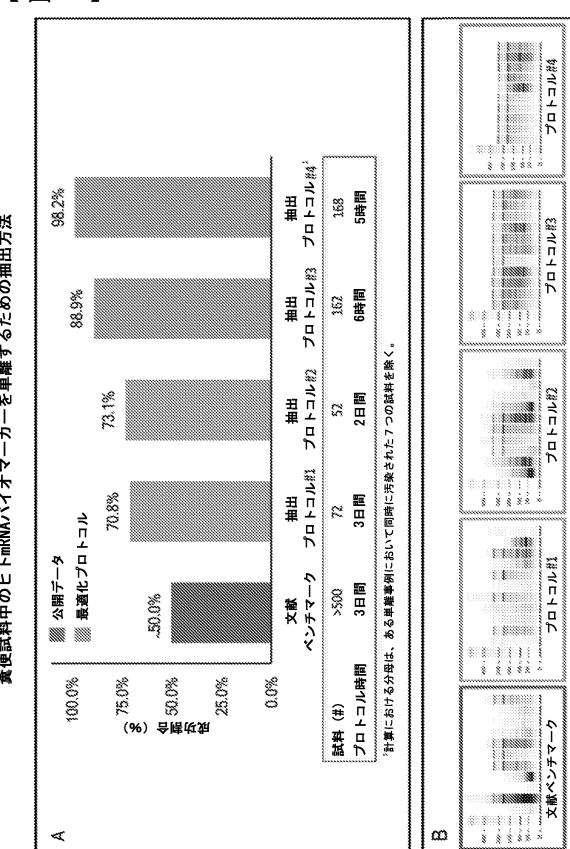
40

## 【図 3】

抽出要約

研究における試料数	120
品質管理に合格した試料数	110
品質管理に不合格の試料数	10
品質管理に合格した試料のパーセント	91.7%

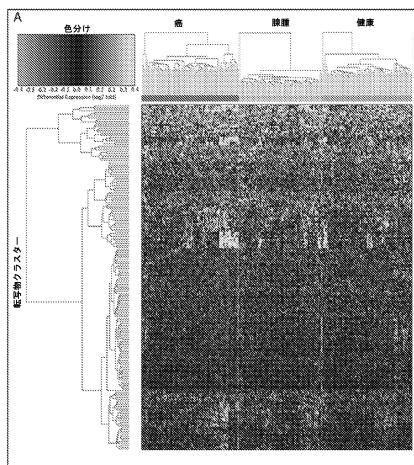
## 【図 4】



50

【図5】

示差的に発現される遺伝子の注釈

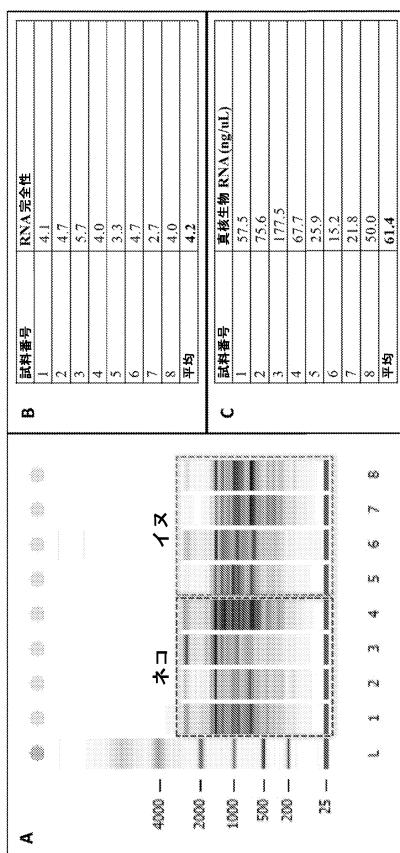


【図6】

示差的に発現される遺伝子。結腸直腸新生物中で示差的に発現された ( $p < 0.05$ )

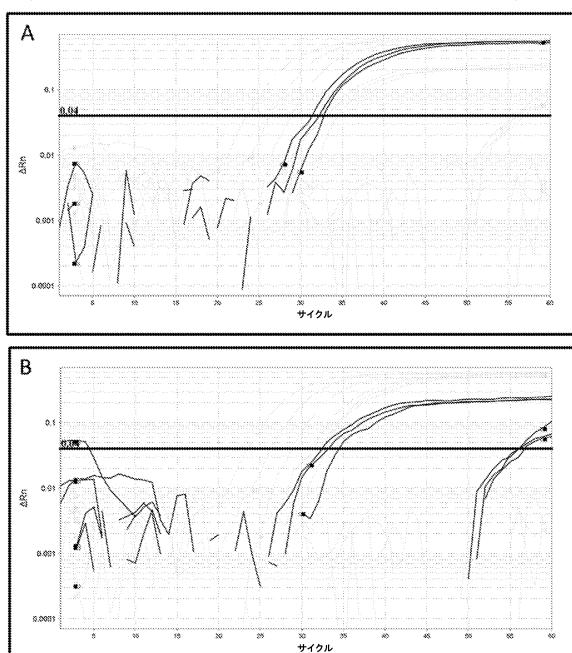
HUGO命名法に基づく遺伝子名のリスト。				
COMP	GOLPH3	FGF6	CYP1B1	MAGED4
SACS	KLK4	TTL3	MVB	CHD7
PPP2CB	JAG2	NCRUPAR	LTA	ID2
ERCC2	GLRX3	TFDP1	CLEC3B	SPARCL1
TAC1	TNFSF9	CISH	KISS1R	TUBB3
LRRP5	AIM3	ASCL1	FCGR3A	CD151
EPOR	KALRN	PTGER2	PML	IFNAR1
PARP11	CCNB1	POLD1	TMPRSS4	FRMPD2
CLDN4	BVES	SLC25A46	PLCD1	OLR1
SCGB2A1	ERBB3	CDH22	MHS6	GSTA4
IL23A	PTPRS	TLR2	CDC20	BAGALT3
GNB2	MDK	CSRNP3	RPIA	HMGCR
PRKCDB	VTCN1	BRSS3	NCK1	OTX1
HHEX	ADCY1	ARID18	ARL4C	HOXA5
FDPS	PER3	CITED1	DHX16	RPRM
GNG8	THBD	MNX1	STK11	RALGDS
TMEM158	IL20RB	PYCR1	HIST1H2BM	WDR49
ROR1	TENM1	CEBPA	PLA2G2A	S100A14
CD276	TSPEAR	SPINK5	CDC25C	COL3A1
MIR129-2	SFRP5	PEA15	HK1	MAPK3
TLR3	HLA-DOB1	ZNF135	NFB1	WNT3A
PTGES2	CSE3R	MYNN	CDHR5	TNC2
WTN10A	SALL3	BMP3	BDNF	BOLL
EPH47	MUC6	HLA-DRB1	CLX1	MCM5
MAP2K3	NR4A3	SHROOM2	ACY1	PRMT8
SHC2	FASN	HK2	TNS4	RFX1
NGF	DNAJC14	CASC2	ATP1B1	MDC1
ATP11A	TMEFF2	CXL13	HSPB8	GDNF
SLC12A5	CSF1R	CCDC129	TWS1	ROBO1
EN01	COMT	DPP6	IGFBP3	PKMYT1
CD84	UBD	FNTB	MIR148B	CABLES1
CNCG2	SALL4	WNT9A	PTPRU	KDM5C
MGST1	LGR5	AM01	EHM72	NID1
ADCY5	UHRF1	FDFT1	EMP1	SMC1A
DHR59	MIR223	PGGT1B	FNTA	CKB
FOXL2	CBLN4	SPARC	CST1	PSMB8
GAS5	NAT10	SATB1	THBS2	ADAMTS9
YY1	ESRP1	LMBN2	ACRBP	C15orf52
HP	MTHFD1	TDG	FBXL2	EPHB3
ZGMF2	PVR	SLC35E5	FEAR4	B3GNT8

( 7 )

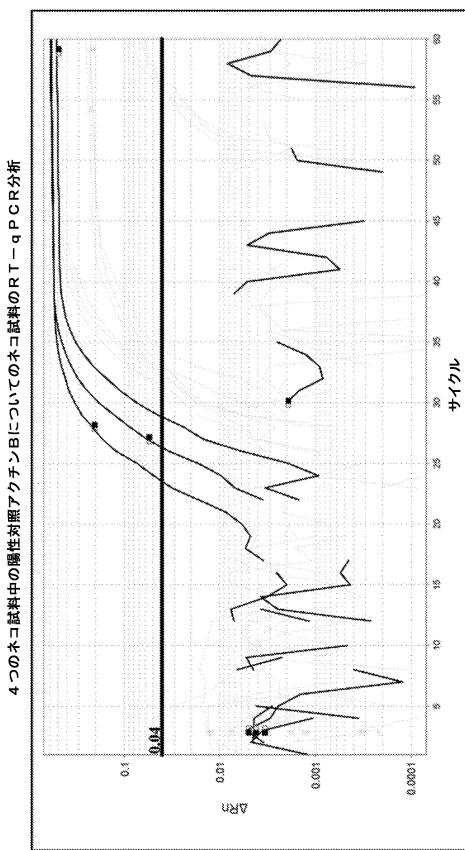


〔 8 〕

イヌ試料のRT-qPCR結果。A. 4つのイヌ試料中の陽性対照C-muについてのRT-qPCR結果、B. 4つのイヌ試料中のT細胞変異型RNAについてのRT-qPCR結果

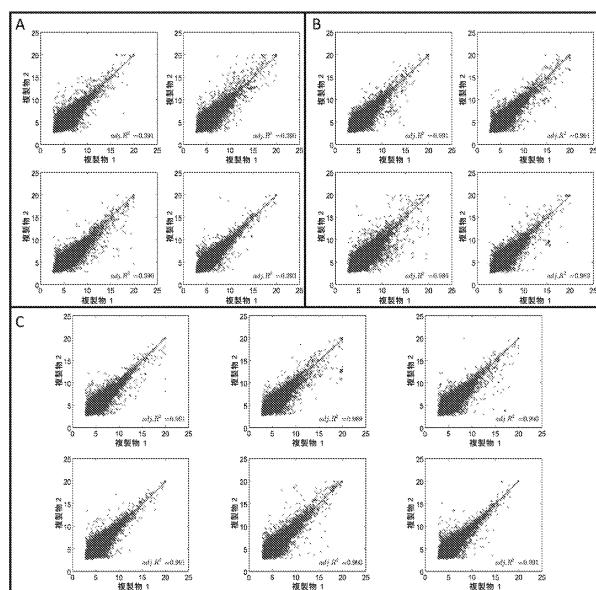


【図 9】



【図 10】

70、524個すべての転写物クラスターについての複製分析  
A) 4つの技術的複製物の相関。B) 4つの生物学的複製物の相関。C) 時間で区切られた技術的複製物の相関。

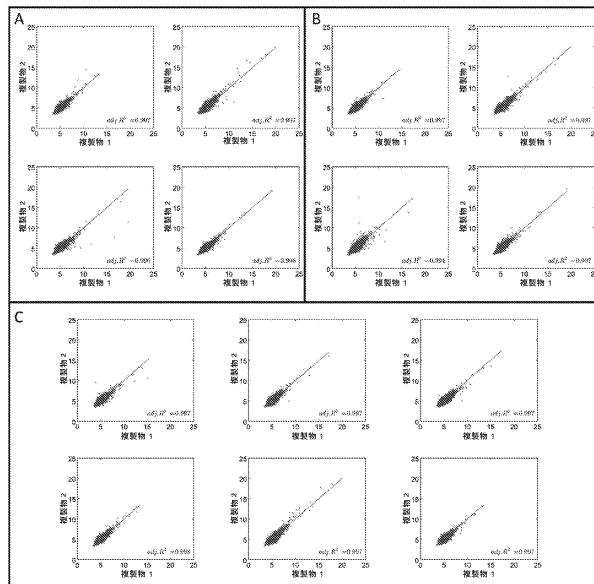


10

20

【図 11】

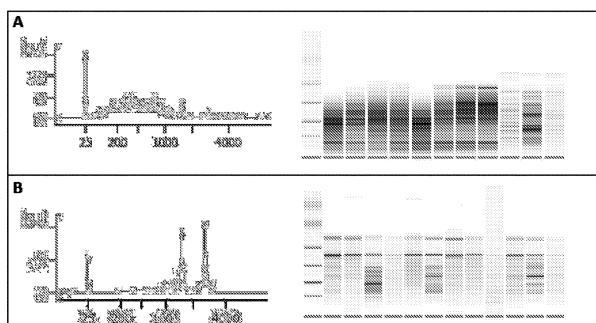
文献調査を使用した、予め通過された5、149個の転写物クラスターについての複製の分析  
A) 4つの技術的複製物の相関。B) 4つの生物学的複製物の相関。C) 時間に区切られた技術的複製物の相関。左上から右下：健康試料#70、腺腫試料#92、腺腫試料#98、腺腫試料#105、ステージIIの大腸癌試料#34、ステージIVの大腸癌試料#36。



【図 12】

糞便試料中のヒトmRNAバイオマーカーを単離するための抽出方法。

- A. 文献中に記載される核酸抽出方法についてのBioAnalyzerトレース。  
B. 本発明に記載される核酸抽出方法についてのBioAnalyzerトレース。



30

40

50

## 【図 13】

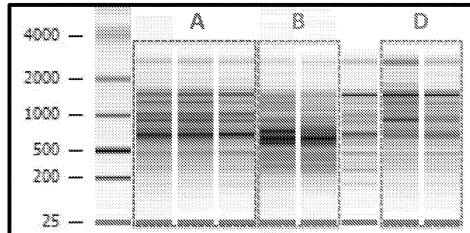
大腸癌および前癌性ポリープの診断についての400個の遺伝子指標

ABCBL1	CD151	DDIAS	GAST	KIF2C	NOS2	RALGDS	TCF20
ABCG2	CD24	DDIT3	GDNF	KISS1R	NUP88	RARB	TGF7
ACHE	PDL1	DHSR5	GLR2	KLF4	OAS1	RASA12	TGF12
ACRB1	CD276	DPP6	GLRX3	KLK4	ODC1	RASSF1	TGN2
ACTB	CD3D	DPYD	GNB2	KMT2C	OGG1	RBM47	TG
ACY1	CD8A	DRD4	GNG12	KRAS	OLR1	RFC3	TENN1
ADAMTS9	CDC20	DSC2	GNG8	KRT19	OTX1	RGCC	TERT
ADCY1	CDC42	DST	GOLPH3	KRT20	PARP1	RHOA	TGFA
ADCV5	CDC73	EDN1	GSN	LAMP2	PARP11	RNU2-1	THBD
AGR2	CDH1	EGFR	GSTA4	LAMP2	PDCD1LG2	ROCK2	TIAM1
AHNAK	CDH22	EGLN2	GSTM1	LBR	PDGFA	RO1	TJP3
AIM2	CDHR5	EGLN3	GSTP1	LDHA	PDGFRB	RPIA	TLR2
AKT1	CDK1	EHM72	HDAC1	LGR4	PEA15	RPL19	TLR3
AKT2	CDK12	ELAVL1	HDAC11	LGR5	PER3	RPLPO	TMEFF2
ALDOA	CDKN1A	ELF3	HDAC5	LIN28A	PGGT1B	RPRM	TMEM158
ALK	CDKN2A	EMP1	HDHD3	LMNB2	PK3CB	RPS27A	TMRSS2
AMDI1	CDKN2B	EPCAM	HGF	LPCAT1	PLAZC2A	RRA52	TNF
ANPEP	CEACAM1	EPHA2	HIF1A	LRP5	PLAUR	RRM2	TNFRSF10B
ANXA2P2	CEACAM5	EPHA7	HIST1H2BM	LRPAP1	PLCD1	RTTN	TNFRSF1A
APC	CEACAM6	EPHB2	HK1	LTA	PLCG1	S100A14	TNFSF10
APTX	CGN	EPOR	HK2	LY96	PLN2	SAL3	TNFSF9
AREG	CHD7	EPSS1	HIA-DQB1	MAGED4	PLS1	SALL4	TNS4
ARL4C	ERBB3	HIF1A	MAP2K3	PMS2	SATB1	TOP1	
ASCL1	CHRNA7	ERBB2IP	HMGAI	MAP3K3	POLD1	SCGB2A1	TP73
ATM	CIB1	ERCC1	HMG2A1	MDK	POLE	SCNN1A	TPSAN1
ATP11A	CISH	ESR1	HMGCR	MET	POU2F1	SCNN1B	TSPER
ATP1B1	CITED1	ESR2	HMOX1	METAP2	PPARGC1A	SEMA4A	TTLL3
ATP1F1	CLDN3	ESRP1	HOXA10	MK167	PP1BP2	SEMG1	TUBB3
ATRX	CLDN4	FASN	HOXA9	MKRN3	PPM1D	SETD2	TXNIP
AURKA	CLDN7	FBXL2	HP	MUHL1	PPP2CB	SFN	TYMP
B2M	CNTN1	FBXJ20	HRH2	MUHL3	PPP2R1B	SRP5	TYMS
B3GNT3	COL5A1	FGR83A	HSO17B1	MNX1	PRICKLE2	SHROOM2	UBA52
B4GALT3	COMT	FCN2	HSPB6	MPO	PRKAR1A	SKP1	UBD
BAD	CREB5	FDP1	ID1	MSH5	PROK2	SLC12A5	UGCG
BCR	CREBBP	FDPS	IFNA1	MT-CO1	PRSS22	SIC25A46	UGTB7
BIRC5	CSF1R	FFAR4	IFNAR1	MTA1	PSMB8	SIC35F5	UHRF1
BMP3	CSF3R	FGF4	IGF2	MTHFD1	PSMD10	SMAD7	VEGFA
BRAF	CSRNIP3	FHT	IGF2R	MUC1	PTEN	SNK1	VEZF1
BRCA1	CST1	FLCN	IGFBP3	MUC2	PTGER2	SPATA2	VTCN1
BUB1	CITA4	FNTA	IL1B	MUC6	PTGES2	SPINT1	WDH49
BVES	CTNNA1	FNTB	IL1RN	MYNN	PTGS2	SPON	WNT3A
C21orf33	CTNNB1	FOS	IL2	MYO1B8	PTK2B	SRC	WNT6
C46	CTNND1	FOXA2	IL23A	NAPSA	PTK7	SRGN	WNT7A
CABLOE1	CUX1	FOXH1	IRF6	NAT3D	PTPN11	SSTR2	WNT9A
CAMK2D	CXCL8	FOXO4	ITCH	NAT2	PTPRS	ST14	WRN
CASC2	CXR2	FRMPD2	ITGA3	NCK1	PTPRU	STAB1	YY1
CBRN4	CXR4	FUT3	ITGB8	NDOR1	PVR	STAT3	ZNF135
CCDC129	CYCS	GADD45A	JAK1	NEUROG1	PYCR1	STK11	ZNF492
CCNB1	CYP1A1	GAPDH	KALRN	NF1B	PYGO1	SUZ12	ZNF560
CCNG2	DBP	GAS5	KIF26B	NFKBIA	RAC1	TAC1	ZSCAN16

## 【図 14】

4つの異なるネコ試料についての生物学的複製物の Bio Analyzer トレース。

1～3列は、ネコ「A」由来のものであり、4および5列は、ネコ「B」由来のものであり、6列は、ネコ「C」由来のものであり、7および8列は、ネコ「D」由来のものである。



10

## 【図 15 A】

イヌ試料の RT-qPCR について設計および使用されるプライマーを示す表

生成物名	標的	プライマー名	配列 (5-3')
ActB	上皮細胞 陽性対照	ActBFwd	AGACCGCG1CCACCCCCGC
		ActBrev	CGAACCGGGCTTGACATG
GAPDH	正常化対照	GDHFwd	ATGGTGAAGGTCGGAGTCAC
		GDHrev	GTGGGTAGAACATACGGAAACA
IgA	I g A 重鎖 保存領域	IgAfwd	AGTGACCTAGCGTCACTCTG
		IgArv	GCTGTCGGACCCCTACA1G
Cp	I g M 重鎖	Cp1	TCCCCCTCATCACCTGTGA
		Cp2	GGTGTGCACTGACAGCAGG
I g H メジャー	B 細胞 免疫グロブリン	IgH1	CAGCTGAGAGCCGAGGACAC
		IgH2	TGAGGAGACGGTGGACCGGGT
		IgH3	CAGCTGAGAGCCGAGGACAC
		IgH4	GGAGGACACAAAGAGTCAGG
TCRy	T 細胞受容体 ガンマ領域	TCRy3	ACCCCTGAGAATITGCGCAGG
		TCRy2	GTTACTA1AAACCTGG1AAC
		TCRy1	TCTGGGRTGAYTACTGCTGCTGG

## 【図 15 B】

ネコ試料の RT-qPCR について設計および使用されるプライマーを示す表

B	生成物名	標的	プライマー名	配列 (5-3')
ActB	上皮細胞 対照	ActBFwd	GCC AAC CGT GAG AGG ATG AC	
		ActBrev	GGAGAA GAA CAG AAC CCT GG	
GAPDH	正常化 対照	GDHFwd	GGG ATT TGG CGG TAT TGG GCG C	
		GDHrev	GGT GGA ATC ATA CTG GM CAT GTAGAC CA	
T 細胞受容体 ガンマ領域	V 領域 プライマー	ftrgv1-2	GGS AGA AGA GCG AGC AGG GCG TG	
		ftrgv3	GGG CGA AGA GCG ATG AGG GAG TG	
		ftrgv4	GTA GTG AGG AGR ATG CTG GTC TG	
		ftrgv5	GGC AGA AGC ATG ACA AGG GCA TG	
		定常領域 プライマー	feline TCR unrev AGK TTT MYT TCA GCA ATT GAA GG	
J 領域 TaqMan プローブ	[FAM] CCC TGAGCA GTG TGCCAG SAC [BHQ1]	ftrgv1	[FAM] CCC TGAGCA GTG TGCCAG SAC [BHQ1]	
		ftrgv2	[CY3] GGG GGAGTT ACK ATG AGC TTATT CC [BHQ1]	
		ftrgv3	[JOE] ATC CAG ATC TCA GGT TTG GGAGGAGG [BHQ1]	
B 細胞 相補性 決定領域 3	V H 領域 プライマー	fCDR3f1	CCA GGC TCC AGG GAA GGG	
		fCDR3f2	TCC AGA GAC AAC GCC AGG AAC	
	定常領域 プライマー	fCDR3unrev	GTT CGG KCG RCT RET SGT TTC	
		fCDR3j1	[FAM] ACA CGG TCA CCA GGG CTC C [BHQ1]	
	J H 領域 TaqMan プローブ	fCDR3j2	[CY3] TGA GGACAC TGT GACTAT GGT TCC [BHQ1]	
		fCDR3j3	[JOE] GGA CAC CGT CAC YAK GVV TCC [BHQ1]	

30

40

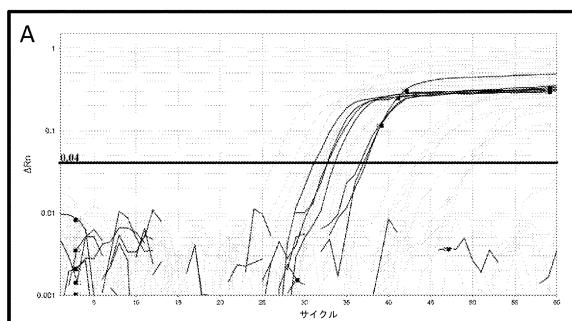
50

## 【図 1 6】

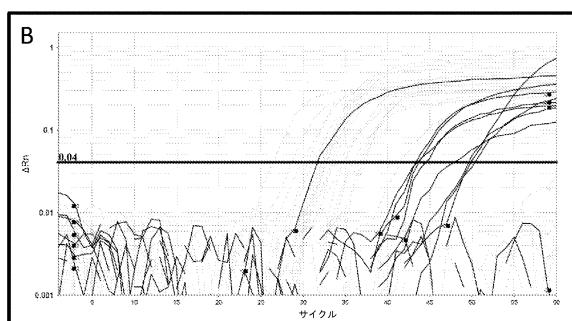
リンパ球間連転写物のPCR増幅。

A) 4つのイヌ試料中のB細胞再配列特異的RNAについてのRT-qPCR結果。

B) 4つのネコ試料中のT細胞再配列特異的RNAについてのRT-qPCR結果。



10



20

## 【配列表】

0007109462000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F I		
C 1 2 Q	1/6851(2018.01)	C 1 2 Q	1/6851
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09
C 1 2 Q	1/6876(2018.01)	C 1 2 Q	1/6876

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/547,046

(32)優先日 平成29年8月17日(2017.8.17)

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 バーネル エリカ

アメリカ合衆国 6 3 1 2 4 ミズーリ州 セント ルイス クレイトン ロード 9 3 0 0

(72)発明者 バーネル アンドリュー

アメリカ合衆国 6 3 1 2 4 ミズーリ州 セント ルイス クレイトン ロード 9 3 0 0

(72)発明者 カン イーミン

アメリカ合衆国 6 3 1 0 5 ミズーリ州 セント ルイス ウィットバーン ドライブ 8 1 6 6 アパートメント # 5

(72)発明者 ワーツラー エリザベス

アメリカ合衆国 6 3 1 1 2 ミズーリ州 セント ルイス パーシング アベニュー 5 3 9 0 アパートメント # 2 0 8

審査官 平林 由利子

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 0 / 1 3 4 2 4 6 ( WO , A 1 )

再公表特許第2 0 0 8 / 0 9 3 5 3 0 ( JP , A 1 )

再公表特許第2 0 1 0 / 0 1 0 9 1 4 ( JP , A 1 )

国際公開第2 0 1 0 / 1 3 4 2 4 5 ( WO , A 1 )

YU J. et al. , Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology , 2016年03月 , Vol. 2, No. 2 , p.158-174.e1

MAEDA S. et al. , J Vet Intern Med , 2013年 , 27 , p.47-55

NucliSENS Lysis Buffer , BIOMERIEUX , REF.200292 , 2015年01月 , Retrieved from the Internet , URL: [https://pr.vwr.com/assetsvc/asset/en\\_US/id/18715711/contents](https://pr.vwr.com/assetsvc/asset/en_US/id/18715711/contents)

STAUBER J. et al. , Cellular Immunology , 2016年04月06日 , 303 , p.43-49

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

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 )