

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年3月9日(09.03.2017)



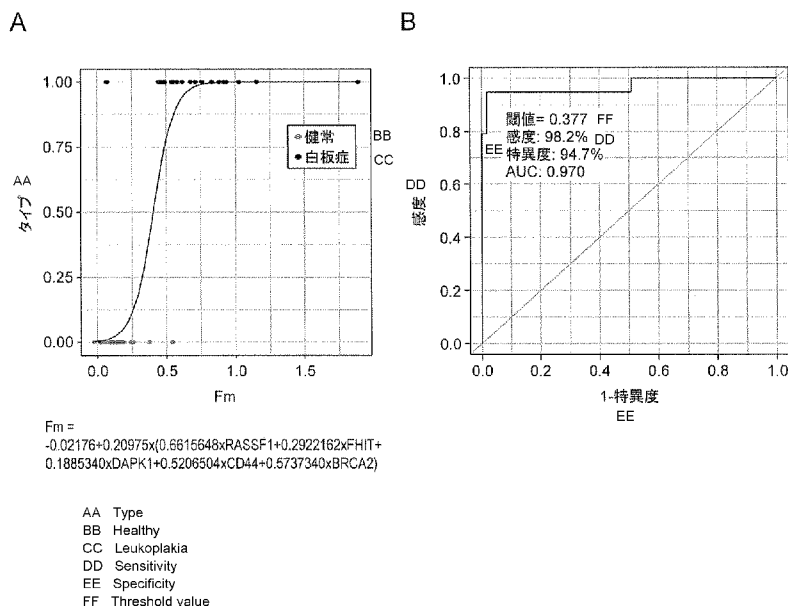
(10) 国際公開番号
WO 2017/038939 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/075667
- (22) 国際出願日: 2016年9月1日(01.09.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-172327 2015年9月1日(01.09.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人鹿児島大学(KAGOSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 Kagoshima (JP).
- (72) 発明者: ▲濱▼田 倫史(HAMADA Tomofumi); 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR DETECTING PRECANCEROUS ORAL LESION

(54) 発明の名称: 口腔前癌病変の検出方法



(57) Abstract: Provided is a non-invasive method that enables the early detection, via large-scale screening, of a precancerous lesion that has a chance of developing oral cancer. This method, in which data for diagnosing a precancerous oral lesion in a patient is acquired by detecting the methylation of DNA in a gargled solution collected from the patient, is characterized in that said DNA is the DNA of a promoter region of the DNA of at least one of the following genes: RASSF1, DAPK1, CD44, BRCA2, FHIT, CDKN2A, HIC1, CASP8, RAR β , CDKN2B, CHFR, ATM, CDKN1B, BRCA1, and CADM1.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2017/038939 A1



-
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

口腔癌を発症する可能性のある前癌病変を大規模なスクリーニングで早期発見することを可能とする非侵襲的な方法を提供する。被験者から採取したうがい液中の DNA のメチル化を検出することによって被験者における口腔前癌病変の診断のためのデータを取得する方法であって、DNA が以下の群の遺伝子
： RASSF1 、 DAP-
K1、CD44、BRCA2、FHIT、CDKN2A、HIC1、CASP8、RAR β 、CDKN2B、CHFR、ATM、CDKN1B、BRCA1、
及び CADM1 から選択される 1 種以上の DNA のプロモーター領域の DNA であることを特徴とする、上記方法を提供する。

明 細 書

発明の名称： 口腔前癌病変の検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、口腔前癌病変の検出方法に関し、より具体的には、含嗽液（うがい液）中に含まれるDNAの解析によって口腔前癌病変を非侵襲的に検出する方法に関する。

背景技術

[0002] 口腔は、人間の生存及び生活に欠かせない咀嚼・嚥下・構音といった重要な機能を有する器官であるにもかかわらず、一般には口腔癌に対する認識は低く、初期では自覚症状が乏しいこと、また類似した臨床症状を呈する粘膜疾患も多いこと等から、口腔癌の早期発見は満足できる状況ではない。口腔癌の5年生存率は65%程度である。

[0003] 口腔癌では、大腸癌のための便潜血検査や胃癌のためのX線検査、乳癌のためのマンモグラフィー検査等のような、非侵襲的な検診方法は確立されていない。口腔前癌病変の発見も含む口腔癌検診のためには専門医による診察が必要であり、現時点において、大規模の検診は事実上不可能である。また、トリイジンブルー等の色素を用いた染色によるスクリーニング検査も知られているが、診断精度は必ずしも満足できるものではない。

[0004] 一方、白板症は、頬粘膜、舌、歯肉等に見られる白い角化性の比較的頻度の高い口腔癌の前癌病変である。白板症の発症原因としては、喫煙やアルコールによる刺激、義歯等による機械的刺激、ビタミン不足等が知られているが、原因不明の症例も多い。また、病変部が隆起する場合や痛みを伴う場合もあるが、隆起せず、痛みもない場合には発症しても気づかないことが多い。しかしながら、特に舌にできた場合には悪性化する可能性が高く、前癌病変の代表的なものとされている。白板症の治療としては、切除が最も確実なものであるが、病変が広範囲である場合には切除によって機能障害が生じる等の理由から、病変を早期に発見し、経過を観察しながら治療法を決定する

ことが適切と考えられている。

[0005] 口腔癌の検出のための方法として、唾液中の口腔疾患代謝産物あるいはトランスクリプトームパターンを検出する方法が提案されている（特許文献1及び2）。

[0006] また、DNAのメチル化、具体的には例えばシトシンのピリミジン環の5位炭素原子へのメチル基の付加反応がエピジェネティクスに関与しており、発癌にも関わっていることが報告されてきている。本発明者等は先に、口腔癌に特異的な異常メチル化を示す遺伝子群を見出し、報告している（非特許文献1及び2）。非特許文献1及び2に記載の方法は、被験者のうがい液中に含まれる特定の腫瘍関連遺伝子の異常メチル化を検出することで、口腔扁平上皮癌の非侵襲的な検出が可能であることを報告したものである。

しかしながら、これまでに前癌病変の検出方法についての報告はなされていない。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2011-229532号公報

特許文献2：特表2013-505428号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：J. Oral. Maxillofac Surg., Vol.70, Issue 6, p.1486-1494, August 6, 2011

非特許文献2：Cancer, September 1, 2012, DOI: 10.1002/cncr.27417

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 上記の通り、口腔は重要な機能を有する器官であり、異変があった場合には早急に対応することが必要である。また、口腔癌患者の生存率を劇的に向上させる治療法が見出されていない現状では、早期発見及び早期治療が最も確実かつ現実的な対処法である。より良好な予後及び機能の温存の観点から

、口腔前癌病変を早期に発見することが非常に重要である。

課題を解決するための手段

[0010] 上記の課題に鑑み、本発明者等は、口腔癌を発症する可能性のある白板症等の前癌病変を大規模なスクリーニングで早期発見することを可能とする非侵襲的な方法が実現できないかと検討した。

[0011] その結果、本発明者等は、うがい液を試料として特異的なメチル化異常を示す癌抑制遺伝子を同定し、それらを用いた高精度の口腔前癌病変の検出システムを確立することができた。

[0012] すなわち、本発明は以下を提供するものである。

1. 被験者から採取したうがい液中のDNAのメチル化を検出することによって被験者における口腔前癌病変の診断のためのデータを取得する方法であって、DNAが以下の群の遺伝子：

RASSF1 (Ras関連ドメインファミリーメンバー1 : Ras association domain family member 1、NM_170714.1) 、

DAPK1 (細胞死関連タンパク質キナーゼ1 : death-associated protein kinase 1、NM_004938.2) 、

CD44 (NM_001001391.1) 、

BRCA2 (乳癌感受性遺伝子2 : breast cancer susceptibility gene 2、NM_000059.3) 、

FHIT (脆弱ヒスチジン三連残基遺伝子 : fragile histidine triad gene、NM_002012.2) 、

CDKN2A (サイクリン依存性キナーゼ阻害因子2A : cyclin-dependent kinase inhibitor 2A、NM_058195.3) 、

HIC1 (hypermethylated in cancer 1、NM_006497.3) 、

CASP8 (カスパーゼ8 : caspase 8、NM_001080125) 、

RAR β (レチノイン酸受容体 β : retinoic acid receptor beta、NM_000965.3) 、

CDKN2B (サイクリン依存性キナーゼ阻害因子2B : cyclin-dependent kina

se inhibitor 2B、NM_078487.2) 、

CHFR (有糸分裂チェックポイント遺伝子 : checkpoint with forkhead and ring finger domains, E3 ubiquitin protein ligase、NM_001161344.1)

、

ATM (毛細血管拡張性運動失調症関連遺伝子変異型 : ataxia telangiectasia mutated、NM_000051.3) 、

CDKN1B (サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 1B : cyclin-dependent kinase inhibitor 1B、NM_004064.3) 、

BRCA1 (乳癌感受性遺伝子1 : breast cancer susceptibility gene 1、NM_007294.3) 、及び

CADM1 (細胞接着分子1 : cell adhesion molecule 1、NM_001098517.1) から選択される1種以上の遺伝子のプロモーター領域のDNAであることを特徴とする、上記方法。

2. 検出されたDNAのメチル化を、対照サンプルにおけるDNAのメチル化と比較することを含む、上記1記載の方法。

3. DNAがRASSF1、DAPK1、CD44、BRCA2、FHIT、CDKN2A、及びHIC1遺伝子のプロモーター領域のDNAから選択される1種以上のDNAである、上記1又は2記載の方法。

4. DNAがRASSF1、DAPK1、CD44、及びBRCA2遺伝子のプロモーター領域のDNAから選択される1種以上のDNAである、上記1又は2記載の方法。

5. DNAがRASSF1、CD44、BRCA2、DAPK1、及びFHIT遺伝子のプロモーター領域のDNAから選択される1種以上のDNAである、上記1又は2記載の方法。

6. DNAのメチル化が、配列番号1～30に示されるヌクレオチド配列を有するプローブを用いて検出可能なものである、上記1～5のいずれか記載の方法。

7. 口腔前癌病変が白板症である、上記1～6のいずれか記載の方法。

8. RASSF1、DAPK1、CD44、BRCA2、FHIT、CDKN2A、HIC1、CASP8、RAR β 、CDKN2B、CHFR、ATM、CDKN1B、BRCA1、及びCADM1遺伝子のプロモーター領域のDNA

から選択されるDNAの異常メチル化を検出するためのプライマー又はプローブを含む、口腔前癌病変の検出のためのキット。

9. 配列番号1～30に示されるヌクレオチド配列を有する1以上のプローブを含む、上記8記載のキット。

10. 口腔前癌病変が白板症である、上記8又は9記載のキット。

[0013] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2015-172327号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0014] 本発明により、白板症等の口腔前癌病変を、うがい液を用い、非侵襲的かつ簡便に検出することができる。DNAはタンパク質及びRNAと比較して安定であることから保存や輸送に優れ、また、DNAメチル化の異常は病変の早期や発症前から見られることから、本発明者等が見出したDNAの異常メチル化は、口腔癌の早期検出及び発癌リスクの評価のためのマーカーとしても有用である。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]15種の遺伝子のプロモーター領域におけるDNA異常メチル化の分布を健常群と白板症群とで比較して示す。縦軸は各遺伝子プロモーター領域における各群のメチル化の平均パーセンテージを示す。記載の全ての遺伝子において、白板症群に統計学的に有意な高メチル化がみられた。

[図2]表2に示す遺伝子群のうちAUC値が特に高かった7種の遺伝子のプロモーター領域のDNAのメチル化について、白板症検出の精度をROC曲線にて示す。全てAUC>0.85であり、良好な検出率を示した。

[図3]7種の遺伝子のプロモーター領域のそれぞれについての異常メチル化の分布状況を白板症群及び健常群で示す。それぞれの区画が白板症群又は健常群での一被験者を示し、白い区画は異常メチル化の不存在を、黒い区画は異常メチル化の存在を示す。白板症群と健常者群の間には明らかな差異が存在することが示された。

[図4]A : RASSF1、FHIT、DAPK1、CD44、BRCA2遺伝子のプロモーター領域のメ

チル化についてのロジスティック分析の結果を示す。B : RASSF1、FHIT、DAPK1、CD44、BRCA2遺伝子での結果に基づくROC曲線を示す。いずれの結果も良好な検出精度を示している。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明は、被験者から採取したうがい液中の特定遺伝子のDNAのメチル化を検出することによって、被験者における口腔前癌病変の診断のためのデータを取得する方法を提供する。「うがい液」は、口腔全体の粘膜の剥離細胞が含まれること、採取の容易さ、検出のための処理の簡便さ等から、非侵襲的な診断のために特に好適である。本発明において、被験者は、ヒト被験者であり、口腔内に異常を有する可能性のある患者、及び健康診断等の広範なスクリーニングの対象となり得る被験者を含む。

[0017] 本明細書において、「うがい液」とは、被験者が適量の水又は水性溶液による含嗽（うがい）をしたのちの液体サンプルをいう。水性溶液としては、特に限定するものではないが、例えば生理食塩水、蒸留水、あるいは一般的な水道水等が挙げられる。

[0018] 含嗽の方法は、特に限定するものではないが、DNAの確実な採取、及び被験者の負担等を考慮すれば、例えば10～50mL、好ましくは20～30mL程度の生理食塩水等を口に含み、20～90秒間、好ましくは30～60秒間のうがいとするのが良い。

[0019] 本明細書において、「口腔前癌病変」としては、限定するものではないが、白板症、紅板症、扁平苔癬等が挙げられる。

[0020] 本発明の方法において、口腔前癌病変の検出のために好適であるメチル化検出対象のDNAは、以下の群の遺伝子：

RASSF1（Ras関連ドメインファミリーメンバー1：Ras association domain family member 1）、

DAPK1（細胞死関連タンパク質キナーゼ1：death-associated protein kinase 1）、

CD44、

BRCA2 (乳癌感受性遺伝子2 : breast cancer susceptibility gene 2) 、
FHIT (脆弱ヒスチジン三連残基遺伝子 : fragile histidine triad gene) 、
CDKN2A (サイクリン依存性キナーゼ阻害因子2A : cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) 、
HIC1 (hypermethylated in cancer 1) 、
CASP8 (カスパーゼ8 : caspase 8) 、
RAR β (レチノイン酸受容体 β : retinoic acid receptor beta) 、
CDKN2B (サイクリン依存性キナーゼ阻害因子2B : cyclin-dependent kinase inhibitor 2B) 、
CHFR (有糸分裂チェックポイント遺伝子 : checkpoint with forkhead and ring finger domains, E3 ubiquitin protein ligase) 、
ATM (毛細血管拡張性運動失調症関連遺伝子変異型 : ataxia telangiectasia mutated) 、
CDKN1B (サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 1B : cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) 、
BRCA1 (乳癌感受性遺伝子1 : breast cancer susceptibility gene 1) 、
及び
CADM1 (細胞接着分子1 : cell adhesion molecule 1)

のプロモーター領域のDNAから選択される1種以上のDNAである。

[0021] 表 1 に、上記の遺伝子のそれぞれについて、遺伝子名及びシンボル、染色体上の位置、及びNCBI登録番号を示す。

[0022]

[表1]

シンボル	遺伝子名	位置	NCBI登録番号
CDKN2A	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)	9p21.3	NM_058195.3
DAPK1	細胞死関連タンパク質キナーゼ1 (death-associated protein kinase 1)	9q21.31	NM_004938.2
CD44	CD44分子	11p13	NM_001001391.1
RASSF1	Ras関連ドメインファミリーメンバー1 (Ras association domain family member 1)	3p21.31	NM_170714.1
ATM	毛細血管拡張性運動失調症関連遺伝子変異型 (ataxia telangiectasia mutated)	11q22.3	NM_000051.3
CADM1	細胞接着分子 (cell adhesion molecule)	11q23.3	NM_001098517.1
CHFR	有糸分裂チェックポイント遺伝子 (checkpoint with forkhead and ring finger domains, E3 ubiquitin protein ligase)	12q24.33	NM_001161344.1
FHIT	脆弱ヒスチジン三連残基遺伝子 (fragile histidine triad gene)	3p14.2	NM_002012.2
CDKN1B	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子1B (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B)	12p13.1	NM_004064.3
BRCA2	乳癌感受性遺伝子2 (breast cancer susceptibility gene 2)	13q12.3	NM_000059.3
HIC1	hypermethylated in cancer 1	17p13.3	NM_006497.3
BRCA1	乳癌感受性遺伝子1 (breast cancer susceptibility gene 1)	17q21.31	NM_007294.3
CASP8	カスパーゼ8 (caspase 8)	2q33.1	NM_001080125
RARB	レチノイン酸受容体β (retinoic acid receptor beta)	3p24.2	NM_000965.3
CDKN2B	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子2B (cyclin-dependent kinase inhibitor 2B)	9p21.3	NM_078487.2

[0023] 本発明は、被験者由来の上記の表1に記載された遺伝子から選択される1種以上の遺伝子のプロモーター領域のDNAのメチル化の有無を検出し、それによって、被験者における口腔前癌病変の診断のためのデータを取得するものである。上記DNAがメチル化されている場合、その被験者は口腔前癌病変を有している可能性が高く、メチル化されていない場合にはその可能性は低いと判定することができる。診断のために利用されるデータは、上記の遺伝子の2種以上、3種以上、4種以上、5種以上、10種以上、あるいは全部の遺伝子のデ

一タであって良い。

[0024] 本発明の一実施形態は、DNAがRASSF1、DAPK1、CD44、BRCA2、FHIT、CDKN2A、及びHIC1遺伝子のプロモーター領域のDNAから選択される1種以上のDNAにおけるメチル化を検出することを含む、上記の方法である。

[0025] 本発明の別の実施形態は、DNAがRASSF1、DAPK1、CD44、及びBRCA2遺伝子のプロモーター領域のDNAから選択される1種以上のDNAにおけるメチル化を検出することを含む、上記の方法である。

[0026] 本発明の更に別の実施形態は、DNAがRASSF1、CD44、BRCA2、DAPK1、及びFHIT遺伝子のプロモーター領域のDNAから選択される1種以上のDNAにおけるメチル化を検出することを含む、上記の方法である。

[0027] 本発明はまた、被験者から採取したうがい液中の特定遺伝子のDNAのメチル化を検出することによって、被験者における口腔前癌病変の存在又は口腔前癌病変への罹患可能性を診断する方法を提供する。本方法によって、被験者が白板症、紅板症、扁平苔癬等の口腔前癌病変に罹患しているか、または罹患するリスクが高いか否かを診断することができる。また、本方法によって、口腔癌への罹患可能性を診断することができる。

[0028] より具体的には、本方法は、

以下の15種の遺伝子：RASSF1、DAPK1、CD44、BRCA2、FHIT、CDKN2A、HIC1、CASP8、RAR β 、CDKN2B、CHFR、ATM、CDKN1B、BRCA1、及びCADM1のプロモーター領域のDNAから選択される1種以上のDNAにおけるメチル化の有無を検出し、

検出されたDNAのメチル化を、対照サンプルにおけるDNAのメチル化と比較することを含む。

[0029] 本方法の一実施形態は、RASSF1、DAPK1、CD44、BRCA2、FHIT、CDKN2A、及びHIC1遺伝子のプロモーター領域のDNAから選択される1種以上のDNAにおけるメチル化を検出することを含む。

[0030] 本方法の別の実施形態は、RASSF1、DAPK1、CD44、及びBRCA2遺伝子のプロ

モーター領域のDNAから選択される1種以上のDNAにおけるメチル化を検出することを含む。

[0031] 本方法の更に別の実施形態は、RASSF1、CD44、BRCA2、DAPK1、及びFHIT遺伝子のプロモーター領域のDNAから選択される1種以上のDNAにおけるメチル化を検出することを含む。

[0032] ヒトゲノムに含まれる遺伝子等のDNA配列は、現在では種々のデータベースの構築により、遺伝子名又はデータベースにおける登録番号（参照番号）等によって検索することで、容易に入手できるようになっている。本発明は、目的のDNA配列中におけるメチル化の検出を目的とするものであり、メチル化した塩基を有する配列とメチル化していない配列とを識別できる方法によってメチル化を検出する。

[0033] 例えば、サンプルを予めバイサルファイトで処理することで、メチル化されていないシトシンはウラシルに変換され、メチル化されているシトシンを含む配列と異なる配列を生じる。これを利用して、メチル化シトシンを含む配列と非メチル化シトシンを含む配列とをそれぞれ増幅可能な2セットのプライマーを設計し、PCR反応を行うことで増幅の有無又は増幅されるDNAの配列を決定することができる。この方法に使用できる市販のキットとして、例えばEpiScope MSP Kit（タカラバイオ株式会社製）が挙げられる。プライマーの長さは、特に限定するものではないが、例えば20～45個の長さのものを使用して、メチル化する可能性のある塩基部位を含む80～500個の塩基長の増幅産物を得るようにすれば良い。

[0034] あるいはまた、標的の領域にハイブリダイズ可能なプローブを設定し、プローブがハイブリダイズした場合にのみPCR産物が得られるMS-MLPA（Methylation Specific-Multiplex Ligation Probe Amplification）法を用いることもできる。プローブは、標的の塩基配列に対応して設計することができる。例えば、市販されているMS-MLPAキット（MRC-Holland社）には、26種の癌抑制遺伝子のプロモーター領域における異常メチル化を検出することが可能なプローブが含まれている。このキットでは、5'側プローブと3'側プローブを

使用して標的の配列にハイブリダイズさせた後でライゲーションを行い、その後、プローブの両側に結合させたユニバーサルプライマーを用いてPCR反応を行って増幅することができる。標的配列中にはDNAのメチル化が生じている可能性があるため、上記のライゲーションと同時にメチル化感受性制限酵素を用いて、例えばメチル化していないハイブリダイゼーション産物を切断することができる。これにより、メチル化が生じた場合にのみ増幅産物が得られることとなる。メチル化感受性制限酵素としては種々の酵素が知られており、例えばAccII、HhaI、HapII、HaeIII等を挙げることができる。これらの酵素は、例えばタカラバイオ株式会社等から入手することができる。

[0035] プローブの長さは、特に限定するものではないが、例えばメチル化する可能性のある塩基部位を含む領域にハイブリダイズし得る80～500個の長さのものを使用するようにすれば良い。

[0036] 本発明の方法において好適に使用することができるプローブとして、限定するものではないが、例えば配列番号1～30に示されるヌクレオチド配列を有するプローブを挙げることができる。従って、一実施形態において、本発明の方法は、DNAのメチル化を、配列番号1～30に示されるヌクレオチド配列を有するプローブを用いて検出することを含む。

[0037] PCR反応の後、例えばキャピラリー電気泳動を行って、各増幅産物の有無を検出することができる。

[0038] 従って、特に限定するものではないが、本発明の方法は、上記の特定のDNAのメチル化を、メチル化感受性制限酵素、例えばHhaIによる該DNAの切断の有無を指標として決定することを含む。HhaIは、ヘモフィラス・ヘモリティカス (*Haemophilus haemolyticus*) (ATCC 10014)由来の制限酵素であり、HhaIによって切断された場合にはそのDNAにおいてメチル化が生じておらず、HhaIによって切断されない場合にはそのDNAにおいてメチル化が生じているものと判定することができる。尚、上記の表1に記載した遺伝子のプロモーター領域にはいずれもHhaIの切断部位であるGCGC配列が含まれており、プローブはその配列を含むように作製することができる。

- [0039] 尚、DNAのメチル化の検出は、上記の方法に限定されるものではなく、当分野で用いられているいずれの手段を用いて行っても良い。
- [0040] 本発明の方法は、上記の特定の遺伝子のプロモーター領域のDNAにおけるメチル化の異常を検出し、それによって口腔前癌病変を有するか否かを診断するためのデータを提供するものである。本明細書において、「メチル化の異常」又は「異常メチル化」とは、健常者由来の正常サンプル（対照サンプル）では検出されないメチル化を意味するものとする。
- [0041] 癌抑制遺伝子の場合、正常な状態では遺伝子が発現していなければならず、一方メチル化によって癌抑制遺伝子の発現に抑制がかかると、結果として発癌してしまうことから、健常者の癌抑制遺伝子のプロモーター部位はメチル化していないと考えられる。しかしながら、正常な状態でメチル化が生じている場合があり得、更に健常者であっても疾患とは関連しない潜在的なメチル化が生じている場合があり得る。その場合、その部位のメチル化は「異常」とは判定されない。従って、検出されたDNAのメチル化は、対照サンプルにおけるDNAのメチル化と比較することが好ましい。
- [0042] 従って、本発明の方法は、被験者から採取したうがい液中の上記遺伝子のプロモーター領域のDNAのメチル化を検出するステップと、検出されたメチル化を、対照サンプルにおける同じ領域のDNAのメチル化（の有無）と比較するステップを含み得る。対照サンプルと異なるメチル化が存在する場合に、口腔前癌病変が存在する可能性が示される。しかしながら、正常サンプル（対照サンプル）におけるメチル化のデータは予め取得することが可能であるため、ある被験者における口腔前癌病変の診断のために、対照サンプルにおけるメチル化の情報を同時に取得する必要はないことは理解されるであろう。
- [0043] 本発明者等が口腔前癌病変において有意にメチル化されていることを見出したDNAは、代表的な口腔前癌病変である白板症患者及び健常者から取得したうがい液を用いて特定された。健常者と比較した有意なメチル化の上昇は、当分野で通常行われる統計的な手法を使用することで確認することができる。そのような手法としては、限定するものではないが、例えばt検定、Mann-W

hitney U検定、ROC曲線（Receiver Operatorating Characteristic curve、受信者動作特性曲線）の作成、ロジスティック回帰分析等が挙げられる。

[0044] 被験者から採取したうがい液中の上記で特定したDNAのメチル化が、対照サンプルにおけるメチル化と比較して有意に上昇している場合に、被験者が口腔前癌病変に罹患しているか、または罹患するリスクが高いことが示唆される。ここで、「有意に」上昇しているとは、各統計手法において帰無仮説を棄却する有意水準が5%以下、好ましくは1%以下のものを言う。

[0045] 本発明はまた、RASSF1、DAPK1、CD44、BRCA2、FHIT、CDKN2A、HIC1、CASP8、RAR β 、CDKN2B、CHFR、ATM、CDKN1B、BRCA1、及びCADM1遺伝子のプロモーター領域のDNAから選択されるDNAの異常メチル化を検出するためのプライマー又はプローブを含む、口腔前癌病変の検出のためのキットを提供する。検出対象のDNAに応じて、キット中の特定のプライマー又はプローブのみを使用することができ、また、そうした特定のプライマー又はプローブのみを含むキットを提供することもできる。

[0046] 例えば、RASSF1、DAPK1、CD44、及びBRCA2遺伝子のプライマー領域のDNAのメチル化の検出のためには、配列番号3～8、19及び20に示すヌクレオチド配列をそれぞれ有するプローブをキットに含めることができる。

[0047] キットは、口腔前癌病変の診断のために特に適したプライマー又はプローブを含めることが好ましい。従って、本発明のキットは、例えばRASSF1、DAPK1、CD44、BRCA2、FHIT、CDKN2A、及びHIC1遺伝子のプロモーター領域のDNAから選択される1種以上のDNAの異常メチル化を検出するためのプライマー又はプローブを含むものであれば良い。また、本発明のキットは、RASSF1、CD44、及びBRCA2遺伝子のプロモーター領域のDNAから選択される1種以上のDNAの異常メチル化を検出するためのプライマー又はプローブを含むものであれば良い。更に、本発明のキットは、RASSF1、CD44、BRCA2、DAPK1、及びFHIT遺伝子のプロモーター領域のDNAから選択される1種以上のDNAの異常メチル化を検出するためのプライマー又はプローブを含むものであれば良い。

[0048] 本発明のキットに含めることができるプローブとしては、例えば配列番号

1～30に示されるヌクレオチド配列を有する1以上のプローブが挙げられる。

- [0049] キットにはまた、うがい液に含めるための水性溶液、例えば生理食塩水、DNAの抽出操作、ハイブリダイゼーション及びライゲーション、PCR反応等のための各種試薬、制限酵素等を適宜含めることができる。

実施例

- [0050] 臨床的に白板症が疑われ、組織学的な確定診断が得られた白板症症例患者（n=19）及び対照群として口腔内診査で異常のみられなかった健常者55名を被験者とした。
- [0051] 被験者に生理食塩水20mlで30秒間含嗽させ、うがい液を全量採取した。得られたサンプル5mlを2,000rpmで5分間遠心分離し（KUBOTA6800（久保田商事株式会社製））、生理食塩水で洗浄した後、再度2,000rpmで5分間遠心分離する操作を2回繰り返してペレットとし、使用まで-80℃に保存した。
- [0052] DNeasy Blood and Tissue Kits（Qiagen, Valencia, CA）でDNAを抽出後、MS-MLPAキット（MRC-Holland社）を用いて常法によりMS-PLPAを行った。プローブセットとしては、キットに含まれるME001-C1 Tumor suppressor-1のうち、HhaI切断部位を有する26種の遺伝子に対応するプローブを用いた。1種の遺伝子に対してそれぞれ2種のプローブを用い、これらのプローブはそのいずれかあるいは双方にHhaIの切断部位を1個又は2個有している。ハイブリダイゼーション及びライゲーションと共にHhaI（Promega社製）による切断を行った後にPCRを行い、3130 Genetic Analyser（ABI社）を用いてフラグメント解析し、Gene Mapper（v4.1、ABI社）を用いてピーク面積を算出後、統計処理を行った。
- [0053] [DNA異常メチル化の分布及び白板症群と健常群との比較]
- MS-MLPAキットに含まれる26種の癌抑制遺伝子のメチル化状態を検討した。定量化された各遺伝子のメチル化レベルをt検定又はMann-Whitney U検定で比較検討した。
- [0054] 表2に、健常群と比較して白板症群でプロモーター領域の異常メチル化が

上昇していることが見出された15種の遺伝子のシンボル及び検出に用いたプローブの配列番号を示す。また、これらの遺伝子のプロモーター領域におけるDNA異常メチル化の分布を健常群と白板症群とで比較して箱ひげ図として図1に示す。

[0055] [表2]

シンボル	プローブ	位置	開始位置	終了位置
CDKN2A	配列番号1及び2	9p21.3	21985276	21985349
DAPK1	配列番号3及び4	9q21.31	89303075	89303130
CD44	配列番号5及び6	11p13	35117389	35117448
RASSF1	配列番号7及び8	3p21.31	50353347	50353403
ATM	配列番号9及び10	11q22.3	107599044	107599105
CADM1	配列番号11及び12	11q23.3	114880585	114880649
CHFR	配列番号13及び14	12q24.33	131974372	131974433
FHIT	配列番号15及び16	3p14.2	61211918	61211970
CDKN1B	配列番号17及び18	12p13.1	12761863	12761918
BRCA2	配列番号19及び20	13q12.3	31787722	31787786
HIC1	配列番号21及び22	17p13.3	1905107	1905162
BRCA1	配列番号23及び24	17q21.31	38530811	38530871
CASP8	配列番号25及び26	2q33.1	201830871	201830935
RARB	配列番号27及び28	3p24.2	25444559	25444621
CDKN2B	配列番号29及び30	9p21.3	21998808	21998864

[0056] [ROC解析]

表1及び図1に示す15種の遺伝子についての結果に基づいて、 $P \geq 0.01$ の結果となった遺伝子は対象から除外し、 $P < 0.01$ の結果となった各遺伝子のプロモーター領域のメチル化について、白板症の検出をエンドポイントとしてROC曲線を作成し、曲線下面積 (Area Under the Curve、AUC) 値 (%) を求めた。また、ROC曲線により得られた感度及び特異度から、診断法として用いる際のカットオフ値を設定した。表3は、15種の遺伝子について、これらの数値をAUC値の高い順に示したものである。

[0057]

[表3]

遺伝子	カットオフ値	AUC
RASSF1	0.65	<u>0.917</u>
DAPK1	1.57	<u>0.902</u>
CD44	1.36	<u>0.944</u>
BRCA2	0.61	<u>0.926</u>
FHIT	0.59	<u>0.899</u>
CDKN2A	1.48	<u>0.819</u>
HIC1	1.17	<u>0.867</u>
CASP8	1.07	0.730
RAR β	1.74	0.741
CDKN2B	9.93	0.739
CHFR	0.43	0.734
ATM	1.00	0.756
CDKN1B	0.87	0.728
BRCA1	0.55	0.727
CADM1	0.38	0.658

[0058] 表3に示した遺伝子の中でAUC値 >0.8 の結果が得られた7種の遺伝子（RASSF1、DAPK1、CD44、BRCA2、FHIT、CDKN2A、及びHIC1）のプロモーター領域のDNAのメチル化についてのROC曲線を図2に示す。図2から明らかなように、これらの遺伝子プロモーター領域が白板症の検出のためにより有用なマーカー候補であることが判明した。

[0059] [白板症検出精度の検討]

ROC解析で良好なAUC値を示した7種の遺伝子プロモーター領域の異常メチル化の結果に基づいて、白板症検出の正準判別解析を行った。結果を図3に示す。この結果から明らかな通り、7種の遺伝子プロモーター領域のDNAはいずれも白板症群と健常群とで異常メチル化の傾向が明確に異なっていた。

[0060] また、白板症の検出に対する指標としてのこれらのDNAの有用性をフィッシャー検定、感度及び特異度を用いて検討した。各遺伝子についてプロモーター領域のメチル化の有無を表4にまとめる。

[0061]

[表4]

異常メチル化を指標とした白板症の検出精度						
遺伝子	症例群	非メチル化	メチル化	P 値	感度(%)	特異度(%)
RASSF1	健常群(n=55)	52	3	<0.001	<u>84.2</u>	<u>84.2</u>
	白板症群(n=19)	3	16			
CD44	健常群	53	2	<0.001	<u>89.5</u>	<u>89.5</u>
	白板症群	2	17			
BRCA2	健常群	52	3	<0.001	<u>84.2</u>	<u>84.2</u>
	白板症群	3	16			
DAPK1	健常群	46	9	<0.001	<u>89.5</u>	65.4
	白板症群	2	17			
FHIT	健常群	48	7	<0.001	<u>84.2</u>	69.6
	白板症群	3	16			
HIC1	健常群	53	2	<0.001	63.2	<u>85.7</u>
	白板症群	7	12			
CDKN2A	健常群	44	11	<0.001	73.7	56.0
	白板症群	5	14			

[0062] 表4の結果から明らかな通り、いずれの遺伝子のプロモーター領域のDNAも、健常群と白板症群とを単独で有意に識別し得ることが確認された。その中でも、感度及び特異度を考慮すると、いずれも80%以上であるRASSF1、CD44及びBRCA2の3種の遺伝子が特に有用であることが明らかとなった。

[0063] [複数の遺伝子の組み合わせに基づく診断法の検討]

単独で良好な検出感度及び検出特異度を示したRASSF1、CD44及びBRCA2の3種の遺伝子の結果を用い、それらの遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化の検出を組み合わせた診断法の確立が可能か否かを検討した。表5に示す通り、健常群では異常メチル化がほとんど検出されないのに対して、白板症群では複数の遺伝子で異常メチル化が生じている場合が多いことが明らかとなった。

[0064]

[表5]

遺伝子の組み合わせ	症例群	異常メチル化		感度(%)	特異度(%)
		1 個以下	2 個以上		
RASFF1+CD44	健常群(n=55)	55	0	78.9	<u>100</u>
	白板症群(n=19)	4	15		
RASFF1+BRCA2	健常群	54	1	<u>84.2</u>	<u>94.1</u>
	白板症群	3	16		
CD44+BRCA2	健常群	55	0	78.8	<u>100</u>
	白板症群	4	15		
RASFF1+CD44+BRCA2	健常群	54	1	68.4	<u>92.9</u>
	白板症群	6	13		

[0065] 一方、表5の結果に示す通り、単独で80%以上の感度及び特異度を示すRASFF1、CD44及びBRCA2は、いずれの2種の組み合わせにおいても、特異度は上昇するものの、感度は同程度か又は低下する傾向が見られた。これは3種の遺伝子の組み合わせにおいても同様であり、上記で設定したカットオフ値を用いて解析した場合、遺伝子の組み合わせによる判定を行うことで偽陰性となる場合があり、必ずしも精度の向上にはつながらないことが明らかとなった。

[0066] [5種の遺伝子による組合せに基づく診断法の確立]

RASSF1、CD44及びBRCA2に加えて単独での検出精度が高かったDAPK1及びFHITを用い、これら5種の遺伝子のプロモーター領域のメチル化を指標として用いる白板症検出の正準判別解析を行った。

[0067] RASSF1、FHIT、DAPK1、CD44、BRCA2を用いたロジスティック分析を行い、下記の式：

$$f_m = 0.6615648 \times \text{RASSF1} + 0.2922162 \times \text{FHIT} + 0.1885340 \times \text{DAPK1} + 0.5206504 \times \text{CD44} + 0.5737340 \times \text{BRCA2}$$

を得ることができた。これを用いて判別すると、5種の遺伝子のプロモーター領域のメチル化を統合した評価（Fm）：

$$F_m = -0.02176 + 0.20975 \times (0.6615648 \times \text{RASSF1} + 0.2922162 \times \text{FHIT} + 0.1885340 \times \text{DAPK1} + 0.5206504 \times \text{CD44} + 0.5737340 \times \text{BRCA2})$$

は、白板症群と健常群で大きく異なっていた。

[0068] 図4に結果を示す。より詳細には、白板症群及び健常群でそれぞれ不一致は1例のみであり、感度は98.2%、特異度は94.7%と非常に高い検出精度を得ることができた。

産業上の利用可能性

[0069] うがい液は非侵襲的で安価かつ簡便に採取できることから、検査のための理想的な試料であり、一般的な健康診断の評価項目に含めることもできる。また、DNAメチル化の異常は病変の早期や発症前から見られることから、口腔癌の早期検出及び発癌リスクの評価が可能となり、被験者自身が発癌リスクを認識することで、生活習慣の改善や予防医療に貢献することができる。

[0070] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

[請求項1] 被験者から採取したうがい液中のDNAのメチル化を検出することによって被験者における口腔前癌病変の診断のためのデータを取得する方法であって、DNAが以下の群の遺伝子：

RASSF1 (Ras関連ドメインファミリーメンバー1 : Ras association domain family member 1、NM_170714.1) 、

DAPK1 (細胞死関連タンパク質キナーゼ1 : death-associated protein kinase 1、NM_004938.2) 、

CD44 (NM_001001391.1) 、

BRCA2 (乳癌感受性遺伝子2 : breast cancer susceptibility gene 2、NM_000059.3) 、

FHIT (脆弱ヒスチジン三連残基遺伝子 : fragile histidine triad gene、NM_002012.2) 、

CDKN2A (サイクリン依存性キナーゼ阻害因子2A : cyclin-dependent kinase inhibitor 2A、NM_058195.3) 、

HIC1 (hypermethylated in cancer 1、NM_006497.3) 、

CASP8 (カスパーゼ8 : caspase 8、NM_001080125) 、

RAR β (レチノイン酸受容体 β : retinoic acid receptor beta、NM_000965.3) 、

CDKN2B (サイクリン依存性キナーゼ阻害因子2B : cyclin-dependent kinase inhibitor 2B、NM_078487.2) 、

CHFR (有糸分裂チェックポイント遺伝子 : checkpoint with fork head and ring finger domains, E3 ubiquitin protein ligase、NM_001161344.1) 、

ATM (毛細血管拡張性運動失調症関連遺伝子変異型 : ataxia telangiectasia mutated、NM_000051.3) 、

CDKN1B (サイクリン依存性キナーゼ阻害因子1B : cyclin-dependent kinase inhibitor 1B、NM_004064.3) 、

BRCA1（乳癌感受性遺伝子1: breast cancer susceptibility gene 1、NM_007294.3）、及び

CADM1（細胞接着分子1: cell adhesion molecule 1、NM_001098517.1）

から選択される1種以上の遺伝子のプロモーター領域のDNAであることを特徴とする、上記方法。

[請求項2] 検出されたDNAのメチル化を、対照サンプルにおけるDNAのメチル化と比較することを含む、請求項1記載の方法。

[請求項3] DNAがRASSF1、DAPK1、CD44、BRCA2、FHIT、CDKN2A、及びHIC1遺伝子のプロモーター領域のDNAから選択される1種以上のDNAである、請求項1又は2記載の方法。

[請求項4] DNAがRASSF1、DAPK1、CD44、及びBRCA2遺伝子のプロモーター領域のDNAから選択される1種以上のDNAである、請求項1又は2記載の方法。

[請求項5] DNAがRASSF1、CD44、BRCA2、DAPK1、及びFHIT遺伝子のプロモーター領域のDNAから選択される1種以上のDNAである、請求項1又は2記載の方法。

[請求項6] DNAのメチル化が、配列番号1～30に示されるヌクレオチド配列を有するプローブを用いて検出可能なものである、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

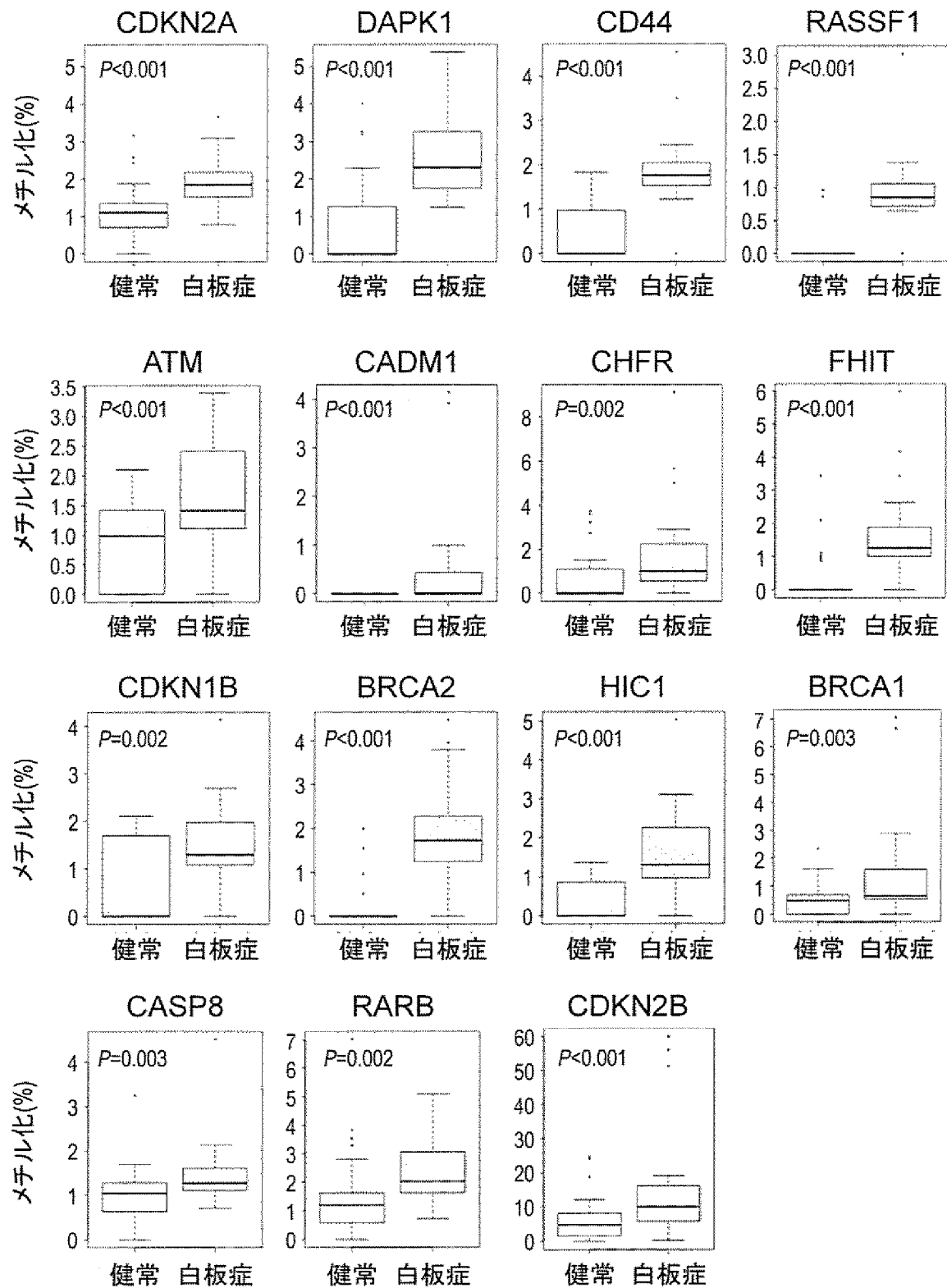
[請求項7] 口腔前癌病変が白板症である、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

[請求項8] RASSF1、DAPK1、CD44、BRCA2、FHIT、CDKN2A、HIC1、CASP8、RAR β 、CDKN2B、CHFR、ATM、CDKN1B、BRCA1、及びCADM1遺伝子のプロモーター領域のDNAから選択されるDNAの異常メチル化を検出するためのプライマー又はプローブを含む、口腔前癌病変の検出のためのキット。

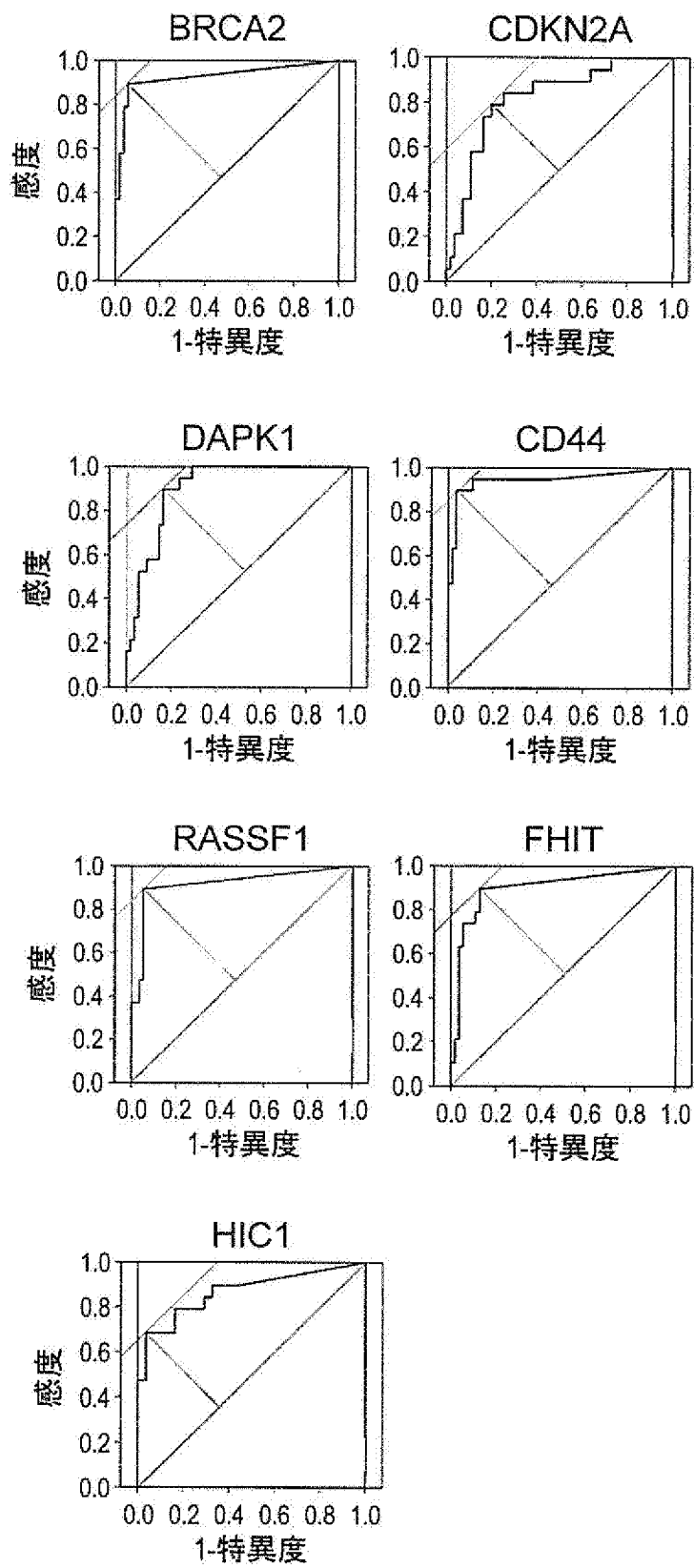
[請求項9] 配列番号1～30に示されるヌクレオチド配列を有する1以上のプローブを含む、請求項8記載のキット。

[請求項10] 口腔前癌病変が白板症である、請求項8又は9記載のキット。

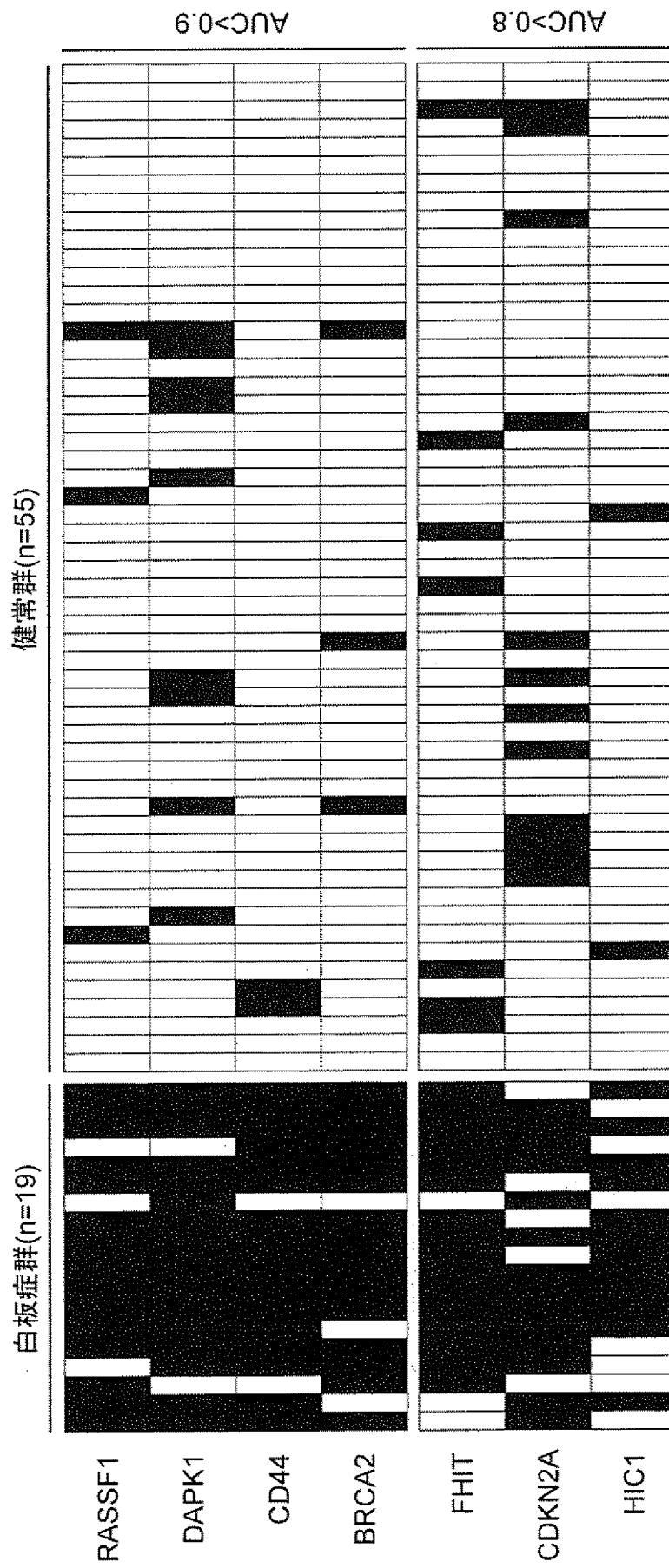
[図1]



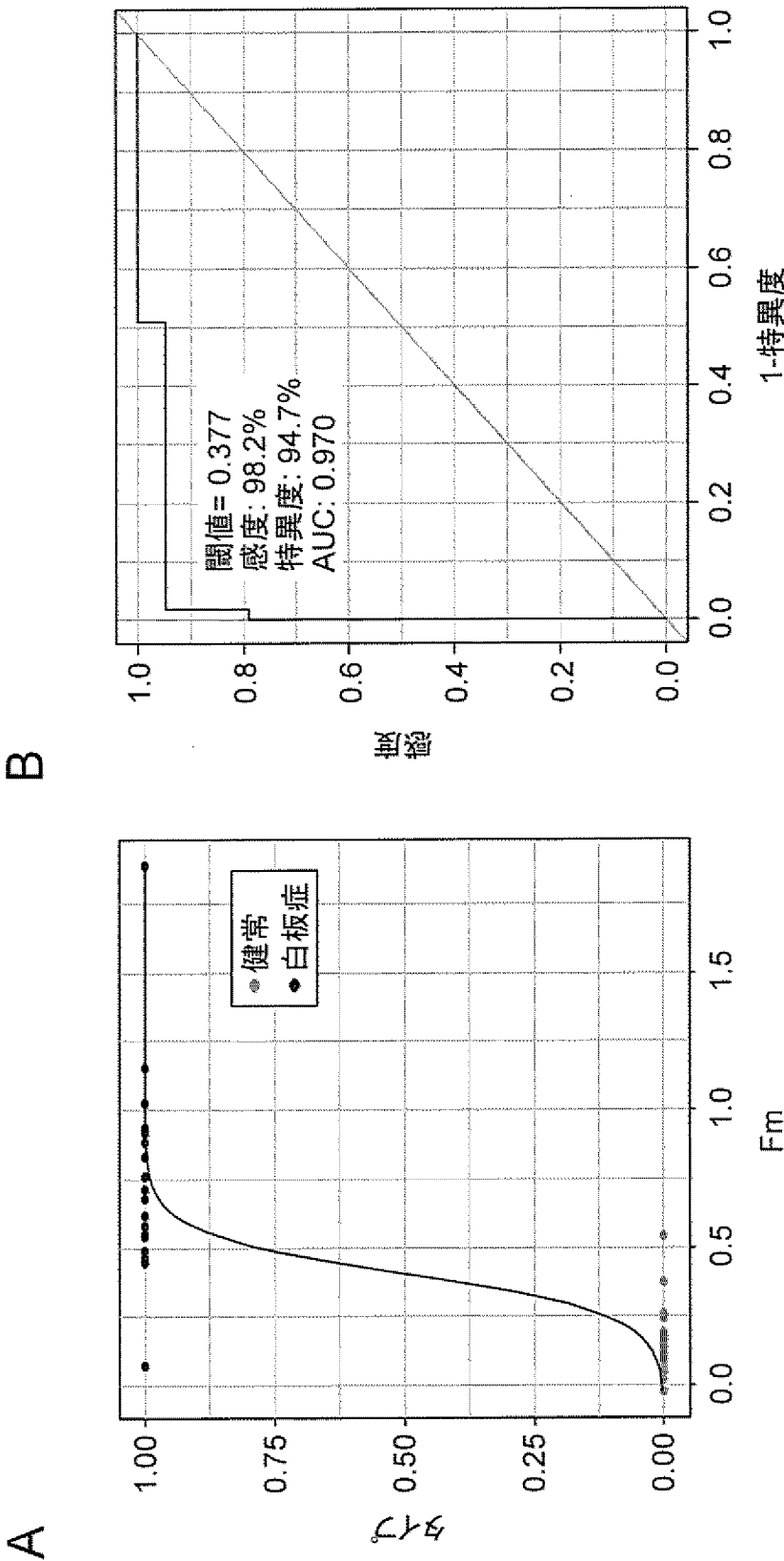
[図2]



[図3]



[図4]



$$Fm = -0.02176 + 0.20975 \times (0.6615648 \times RASSF1 + 0.2922162 \times FHIT + 0.1885340 \times DAPK1 + 0.5206504 \times CD44 + 0.5737340 \times BRCA2)$$

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/075667

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68, G01N33/50, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/032205 A1 (NATIONAL DEFENSE MEDICAL CENTER), 06 March 2014 (06.03.2014), claims 33 to 34; example 8 & US 2015/0361502 A1 claims 33 to 34; paragraph [0005]; example 8 & JP 2015-526096 A & EP 2891720 A1	1-10
Y	Kenji OKAMI et al., "Daekichu Gan Saibo no p16 Idenshi Ijo Methyl-ka o Bunshi Seibutsugakuteki Shindan ni Oyo Dekiru ka", Proceedings of the Japanese Cancer Association, 25 August 2004 (25.08.2004), vol.63, page 177, column of [P-0477], ISSN 0546-0476, particularly, columns of (Method), (Result and Conclusion)	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 November 2016 (15.11.16)

Date of mailing of the international search report
06 December 2016 (06.12.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/075667

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TRAN T. N. et al., "Frequent promoter hypermethylation of RASSF1A, p16INK4A but infrequent allelic loss other than 9p21 in betel-associated oral carcinoma.", J. ORAL BIOSCI., 2004.09.01, Vol.46, No.5, p.387, column of [047 1D1000], ISSN 1349-0079, particularly, main text, lines 7 to 8, 11 to 21	1-10
Y	Keizo KATO et al., "Koku Ryoiki ni Okeru p16•MGMT Idenshi no Promoter Ryoiki no Methylation Ijo", Proceedings of the Japanese Cancer Association, 25 August 2004 (25.08.2004), vol.63, page 177, column of [P-0479], ISSN 0546-0476, particularly, column of [Conclusion]	1-10
Y	CHUANG, C.Y. et al., "Methylation status of PRKCB, RARbeta and p16 genes promoter and global methylation in oral cancer.", Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology, 2015.07.16, Vol.13, P1-9-3, particularly, entire text of Results	1-10
Y	JP 2010-161984 A (Chie MIYAMOTO), 29 July 2010 (29.07.2010), claims 9, 13 (Family: none)	1-10
Y	WO 2010/001933 A1 (Nihon University), 07 January 2010 (07.01.2010), claim 18 & US 2011/0160399 A1 claim 18 & EP 2311494 A1	1-10
Y	WO 2006/079014 A2 (INTROGEN THERAPEUTICS, INC.), 27 July 2006 (27.07.2006), claim 18 & JP 2008-528508 A & US 2007/0066552 A1 & EP 1838353 A2	1-10
A	WO 2013/074793 A1 (UNIVERSITY OF MIAMI), 23 May 2013 (23.05.2013), claims 1 to 13 & JP 2014-533372 A & US 2014/0329230 A1 & EP 2780714 A	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/075667

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claim 1 describes a method for acquiring data for diagnosing an oral precancerous lesion, said method comprising detecting DNA methylation in a promoter region of one or more genes selected from among 15 genes.

The inventions set forth in claim 1 have a common technical feature of "a method for acquiring data for diagnosing an oral precancerous lesion, said method comprising detecting DNA methylation in a promoter region of a gene".
(Continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

However, the above-said technical feature cannot be considered to be a special technical feature, since the technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in the document 1 (WO 2014/032205 A1).

Further, there is no other same or corresponding special technical feature between these inventions.

Consequently, each invention set forth in claim 1 cannot be classified into one invention.

The above-said opinion may be also applied to claims 2-10.

(Invention 1) In the inventions set forth in claims 1-10, the parts relating to RASSF1.

These inventions, which have a special technical feature of detecting DNA methylation in a promoter region of RASSF1, are identified as Invention 1.

(Invention 2) In the inventions set forth in claims 1-10, the parts relating to DAPK1.

These inventions, which have a special technical feature of detecting DNA methylation in a promoter region of DAPK1, are identified as Invention 2.

(Invention 3) In the inventions set forth in claims 1-10, the parts relating to CD44.

These inventions, which have a special technical feature of detecting DNA methylation in a promoter region of CD44, are identified as Invention 3.

(Invention 4) In the inventions set forth in claims 1-10, the parts relating to BRCA2.

These inventions, which have a special technical feature of detecting DNA methylation in a promoter region of BRCA2, are identified as Invention 4.

(Invention 5) In the inventions set forth in claims 1-10, the parts relating to FHIT.

These inventions, which have a special technical feature of detecting DNA methylation in a promoter region of FHIT, are identified as Invention 5.

(Invention 6) In the inventions set forth in claims 1-10, the parts relating to CDKN2A.

These inventions, which have a special technical feature of detecting DNA methylation in a promoter region of CDKN2A, are identified as Invention 6.

(Invention 7) In the inventions set forth in claims 1-10, the parts relating to HIC1.

These inventions, which have a special technical feature of detecting DNA methylation in a promoter region of HIC1, are identified as Invention 7.

(Invention 8) In the inventions set forth in claims 1-10, the parts relating to CASP8.

These inventions, which have a special technical feature of detecting DNA methylation in a promoter region of CASP8, are identified as Invention 8.

(Invention 9) In the inventions set forth in claims 1-10, the parts relating to RAR β .

These inventions, which have a special technical feature of detecting DNA methylation in a promoter region of RAR β , are identified as Invention 9.

(Continued to next extra sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/075667

(Invention 10) In the inventions set forth in claims 1-10, the parts relating to CDKN2B.

These inventions, which have a special technical feature of detecting DNA methylation in a promoter region of CDKN2B, are identified as Invention 10.

(Invention 11) In the inventions set forth in claims 1-10, the parts relating to CHFR.

These inventions, which have a special technical feature of detecting DNA methylation in a promoter region of CHFR, are identified as Invention 11.

(Invention 12) In the inventions set forth in claims 1-10, the parts relating to ATM.

These inventions, which have a special technical feature of detecting DNA methylation in a promoter region of ATM, are identified as Invention 12.

(Invention 13) In the inventions set forth in claims 1-10, the parts relating to CDKN1B.

These inventions, which have a special technical feature of detecting DNA methylation in a promoter region of CDKN1B, are identified as Invention 13.

(Invention 14) In the inventions set forth in claims 1-10, the parts relating to BRCA1.

These inventions, which have a special technical feature of detecting DNA methylation in a promoter region of BRCA1, are identified as Invention 14.

(Invention 15) In the inventions set forth in claims 1-10, the parts relating to CADM1.

These inventions, which have a special technical feature of detecting DNA methylation in a promoter region of CADM1, are identified as Invention 15.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68, G01N33/50, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2014/032205 A1 (NATIONAL DEFENSE MEDICAL CENTER) 2014.03.06, 請求項33-34、実施例8 & US 2015/0361502 A1, 請求項33-34、段落5、実施例8 & JP 2015-526096 A & EP 2891720 A1	1-10
Y	大上研二、外1名, 「唾液中癌細胞のp16遺伝子異常メチル化を 分子生物学的診断に応用できるか」, 日本癌学会総会記事, 2004.08.25, Vol.63, p.177, [P-0477]欄, ISSN 0546-0476, 特に(方 法)欄、(結果および結論)欄	1-10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

15.11.2016

国際調査報告の発送日

06.12.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

野村 英雄

4B

4155

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	TRAN T. N. et al., "Frequent promoter hypermethylation of RASSF1A, p16INK4A but infrequent allelic loss other than 9p21 in betel-associated oral carcinoma.", J. ORAL BIOSCI., 2004.09.01, Vol.46, No.5, p.387, [047 1D1000]欄, ISSN 1349-0079, 特に本文7-8、11-21行	1-10
Y	加藤恵三、外6名, 「口腔領域における p16・MGMT 遺伝子のプロモーター領域のメチル化異常」, 日本癌学会総会記事, 2004.08.25, Vol.63, p.177, [P-0479]欄, ISSN 0546-0476, 特に【まとめ】欄	1-10
Y	CHUANG, C.Y. et al., "Methylation status of PRKCB, RARbeta and p16 genes promoter and global methylation in oral cancer.", 日本臨床腫瘍学会学術集会, 2015.07.16, Vol.13, P1-9-3, 特に Results 欄全文	1-10
Y	JP 2010-161984 A (宮本千絵) 2010.07.29, 請求項9、13 (ファミリーなし)	1-10
Y	WO 2010/001933 A1 (学校法人日本大学) 2010.01.07, 請求項18 & US 2011/0160399 A1, 請求項18 & EP 2311494 A1	1-10
Y	WO 2006/079014 A2 (INTROGEN THERAPEUTICS, INC.) 2006.07.27, 請求項18 & JP 2008-528508 A & US 2007/0066552 A1 & EP 1838353 A2	1-10
A	WO 2013/074793 A1 (UNIVERSITY OF MIAMI) 2013.05.23, 請求項1-13 & JP 2014-533372 A & US 2014/0329230 A1 & EP 2780714 A	1-10

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求項1には15個の遺伝子から選択される1種以上の遺伝子のプロモーター領域のDNAのメチル化を検出することを含む、口腔前癌病変の診断のためのデータを取得する方法が記載されている。請求項1に記載された各発明は、「遺伝子のプロモーター領域のDNAのメチル化を検出することを含む、口腔前癌病変の診断のためのデータを取得する方法」に関するという共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献1（WO 2014/032205 A1）の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。したがって、請求項1に記載された各発明は一つの発明に区分できない。請求項2-10についても同様である。

（特別ページに続く。）

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

(第Ⅲ欄の続き。)

(発明 1) 請求項 1-10 に記載された発明のうち、RASSF1 に関する部分

RASSF1 のプロモーター領域の DNA メチル化を検出するという特別な技術的特徴を有しているので、発明 1 に区分する。

(発明 2) 請求項 1-10 に記載された発明のうち、DAPK1 に関する部分

DAPK1 のプロモーター領域の DNA メチル化を検出するという特別な技術的特徴を有しているので、発明 2 に区分する。

(発明 3) 請求項 1-10 に記載された発明のうち、CD44 に関する部分

CD44 のプロモーター領域の DNA メチル化を検出するという特別な技術的特徴を有しているので、発明 3 に区分する。

(発明 4) 請求項 1-10 に記載された発明のうち、BRCA2 に関する部分

BRCA2 のプロモーター領域の DNA メチル化を検出するという特別な技術的特徴を有しているので、発明 4 に区分する。

(発明 5) 請求項 1-10 に記載された発明のうち、FHIT に関する部分

FHIT のプロモーター領域の DNA メチル化を検出するという特別な技術的特徴を有しているので、発明 5 に区分する。

(発明 6) 請求項 1-10 に記載された発明のうち、CDKN2A に関する部分

CDKN2A のプロモーター領域の DNA メチル化を検出するという特別な技術的特徴を有しているので、発明 6 に区分する。

(発明 7) 請求項 1-10 に記載された発明のうち、HIC1 に関する部分

HIC1 のプロモーター領域の DNA メチル化を検出するという特別な技術的特徴を有しているので、発明 7 に区分する。

(発明 8) 請求項 1-10 に記載された発明のうち、CASP8 に関する部分

CASP8 のプロモーター領域の DNA メチル化を検出するという特別な技術的特徴を有しているので、発明 8 に区分する。

(発明 9) 請求項 1-10 に記載された発明のうち、RAR β に関する部分

RAR β のプロモーター領域の DNA メチル化を検出するという特別な技術的特徴を有しているので、発明 9 に区分する。

(発明 10) 請求項 1-10 に記載された発明のうち、CDKN2B に関する部分

CDKN2B のプロモーター領域の DNA メチル化を検出するという特別な技術的特徴を有しているので、発明 10 に区分する。

(発明 11) 請求項 1-10 に記載された発明のうち、CHFR に関する部分

CHFR のプロモーター領域の DNA メチル化を検出するという特別な技術的特徴を有しているので、発明 11 に区分する。

(発明 12) 請求項 1-10 に記載された発明のうち、ATM に関する部分

ATM のプロモーター領域の DNA メチル化を検出するという特別な技術的特徴を有しているので、発明 12 に区分する。

(発明 13) 請求項 1-10 に記載された発明のうち、CDKN1B に関する部分

CDKN1B のプロモーター領域の DNA メチル化を検出するという特別な技術的特徴を有しているので、発明 13 に区分する。

(発明 14) 請求項 1-10 に記載された発明のうち、BRCA1 に関する部分

BRCA1 のプロモーター領域の DNA メチル化を検出するという特別な技術的特徴を有しているので、発明 14 に区分する。

(発明 15) 請求項 1-10 に記載された発明のうち、CADM1 に関する部分

CADM1 のプロモーター領域の DNA メチル化を検出するという特別な技術的特徴を有しているので、発明 15 に区分する。