(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7541365号
(P7541365)

(45)発行日　令和6年8月28日(2024.8.28)

(24)登録日　令和6年8月20日(2024.8.20)

(51)国際特許分類		FI		
C12Q	*1/6851(2018.01)*	C12Q	1/6851	Z ZNA
C12Q	*1/686(2018.01)*	C12Q	1/686	Z
C12Q	*1/6869(2018.01)*	C12Q	1/6869	Z
C12Q	*1/6886(2018.01)*	C12Q	1/6886	Z

請求項の数　11　（全86頁）

(21)出願番号　特願2021-571367(P2021-571367)
(86)(22)出願日　令和2年5月28日(2020.5.28)
(65)公表番号　特表2022-534315(P2022-534315A)
(43)公表日　令和4年7月28日(2022.7.28)
(86)国際出願番号　PCT/EP2020/064813
(87)国際公開番号　WO2020/239895
(87)国際公開日　令和2年12月3日(2020.12.3)
審査請求日　令和5年5月17日(2023.5.17)
(31)優先権主張番号　16/428,865
(32)優先日　令和1年5月31日(2019.5.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　521520692
ユニバーサル ダイアグノスティクス，エセ．アー
スペイン，４１０１３ セビーリャ，アヴェニーダ ディエゴ マルティネス バリオ １０，エディフィシオ インサー，プランタ ３アー，モデュロ １５
(74)代理人　110000338
弁理士法人 HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK
(72)発明者　ビテンク，マルコ
スロベニア，１０００ リュブリャナ，ツェスタ ナ ポリャネ，２４
(72)発明者　クルースマ，クリスティ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　大腸がんの検出

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
大腸がんのスクリーニングを補助するためのインビトロの方法であって、
（ａ）ＦＧＦ１４、ＰＤＧＦＤおよびＺＮＦ４７１の各々につき、少なくとも１つのＤＭＲのメチル化状態をヒト対象のＤＮＡにおいて決定する工程と、
（ｂ）得られたデータを、健常者から得られた参照値と比較する工程と、
（ｃ）参照試料と比較して、前記ＦＧＦ１４、前記ＰＤＧＦＤおよび前記ＺＮＦ４７１の各々につき、少なくとも１つのＤＭＲの高メチル化が検出されるか否かを判定する工程と、を含む、
方法。
【請求項２】
前記（ａ）において、さらに、ＡＤＡＭＴＳ２の少なくとも１つのＤＭＲのメチル化状態を決定し、
前記（ｃ）において、さらに、前記ＡＤＡＭＴＳ２の少なくとも１つのＤＭＲの高メチル化が検出されるか否かを判定する、
請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記（ａ）において、さらに、ＺＮＦ４９２およびＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５の各々につき、少なくとも１つのＤＭＲのメチル化状態を決定し、
前記（ｃ）において、さらに、前記ＺＮＦ４９２および前記ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５の各々

につき、少なくとも１つのＤＭＲの高メチル化が検出されるか否かを判定する、
請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記（ａ）において、さらに、ＬＯＮＲＦ２、ＺＮＦ５４２、ＺＮＦ１３２、ＣＮＲＩＰ１およびＡＬＫの各々につき、少なくとも１つのＤＭＲのメチル化状態を決定し、
前記（ｃ）において、さらに、前記ＬＯＮＲＦ２、前記ＺＮＦ５４２、前記ＺＮＦ１３２、前記ＣＮＲＩＰ１および前記ＡＬＫの各々につき、少なくとも１つのＤＭＲの高メチル化が検出されるか否かを判定する、
請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記（ａ）において、さらに、ＤＭＲＴ１、ＭＣＩＤＡＳ、ＧＳＧ１Ｌ、ＺＮＦ５６８およびＪＡＭ２の各々につき、少なくとも１つのＤＭＲのメチル化状態を決定し、
前記（ｃ）において、さらに、前記ＤＭＲＴ１、前記ＭＣＩＤＡＳ、前記ＧＳＧ１Ｌ、前記ＺＮＦ５６８および前記ＪＡＭ２の各々につき、少なくとも１つのＤＭＲの高メチル化が検出されるか否かを判定する、
請求項４に記載の方法。
【請求項６】
大腸がんのスクリーニングを補助するためのインビトロの方法であって、
（ａ’）ＬＯＮＲＦ２、ＦＧＦ１４、ＰＤＧＦＤ、ＡＬＫおよびＪＡＭ２の各々につき、少なくとも１つのＤＭＲのメチル化状態をヒト対象のＤＮＡにおいて決定する工程と、
（ｂ’）得られたデータを、健常者から得られた参照値と比較する工程と、
（ｃ’）参照試料と比較して、前記ＬＯＮＲＦ２、前記ＦＧＦ１４、前記ＰＤＧＦＤ、前記ＡＬＫおよび前記ＪＡＭ２の各々につき、少なくとも１つのＤＭＲの高メチル化が検出されるか否かを判定する工程と、を含む、
方法。
【請求項７】
前記ＤＮＡは、前記ヒト対象の血液、血漿、尿、唾液、または便から単離される、
請求項１または６に記載の方法。
【請求項８】
前記ＤＮＡは、前記ヒト対象のセルフリーＤＮＡである、
請求項１または６に記載の方法。
【請求項９】
前記方法は、少なくとも０．６の、大腸がんに対する感度を提供する、
請求項１または６に記載の方法。
【請求項１０】
前記方法は、少なくとも０．７の、大腸がんに対する特異度を提供する、
請求項１または６に記載の方法。
【請求項１１】
メチル化状態は、メチル化感応性制限酵素定量ポリメラーゼ連鎖反応（ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲ）、メチル化特異的ＰＣＲ、メチル化特異的ヌクレアーゼを用いた稀少アレル濃縮ＰＣＲ、および次世代シーケンシングからなる群より選択される１つ以上のメンバーを使用して決定される、
請求項１または６に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
〔背景〕
がんのスクリーニングは、がんの予防、診断および処置の重要な要素である。いくつかの報告によると、大腸がん（ＣＲＣ：colorectal cancer）は、世界で３番目に多いがんの種類であり、がん死亡率の原因として世界で２番目に多いと認識されている。いくつかの報告によると、大腸がんの新規症例は年間１８０万例以上、大腸がんによる死亡者は約

８８１，０００人であり、がんによる死亡の約１０人に１人を占めている。特に５０歳を超える個人には、定期的な大腸がんのスクリーニングが推奨される。さらに、５０歳未満の個人における大腸がんの発生率も、徐々に増加している。統計によると、現在の大腸がんのスクリーニング技術は不充分であることが示唆されている。

【０００２】

〔発明の概要〕

改善が進んでいるにもかかわらず、ステージが早く局所的な段階におけるスクリーニングによって検出されているのは、現在のところ、大腸がんの約４０～４４％に過ぎない。これは、少なくとも部分的には、現在のスクリーニング技術の感度および／または特異度が不充分であることに起因している。現在推奨されている技術の例としては、５０歳を超える個人に対する結腸内視鏡検査および／または血便検査が挙げられる。

【０００３】

本開示は、とりわけ、大腸がんスクリーニングのための方法、およびそれに関連する組成物を提供する。種々の実施形態において、本開示は、１つ以上のメチル化バイオマーカーのメチル化状態の分析を含む、大腸がんスクリーニングのための方法、およびそれに関連する組成物を提供する。種々の実施形態において、本開示は、ｃｆＤＮＡ、例えばｃｔＤＮＡにおいて、１つ以上のメチル化バイオマーカーのメチル化状態をスクリーニングすることを含む、大腸がんスクリーニングのための方法を提供する。種々の実施形態において、本開示は、ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲを使用して、ｃｆＤＮＡ、例えばｃｔＤＮＡにおいて、１つ以上のメチル化バイオマーカーのメチル化状態をスクリーニングすることを含む、大腸がんスクリーニングのための方法を提供する。本明細書に記載の種々の組成物および方法は、大腸がんスクリーニングにおける臨床応用のために十分な感度および特異度を提供する。本明細書に記載の種々の組成物および方法は、対象の採種可能な組織試料（例えば、血液または血液成分（例えばｃｆＤＮＡ、例えばｃｔＤＮＡ）、または便である、組織試料）の分析による大腸がんスクリーニングにおいて、有益である。

【０００４】

特定の態様において、本開示は、とりわけ、大腸がんをスクリーニングする方法を提供する。当該方法は：（ａ）１つ以上の、表１に記載の遺伝子（例えば、ＡＬＫ、ＬＯＮＲＦ２、ＡＤＡＭＴＳ２、ＦＧＦ１４、ＤＭＲＴ１、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５、ＭＣＩＤＡＳ、ＰＤＧＦＤ、ＧＳＧ１Ｌ、ＺＮＦ４９２、ＺＮＦ５６８、ＺＮＦ５４２、ＺＮＦ４７１、ＺＮＦ１３２、ＪＡＭ２、およびＣＮＲＩＰ１を含む）；および／または、（ｂ）１つ以上の、表７に記載のメチル化可変領域（ＤＭＲ）（例えば、ＡＬＫ‘４３４、ＣＮＲＩＰ１‘２３２、ＣＮＲＩＰ１‘２７２、ＬＯＮＲＦ２‘２８１、ＬＯＮＲＦ２‘３８７、ＡＤＡＭＴＳ２‘２５４、ＡＤＡＭＴＳ２‘２８４、ＡＤＡＭＴＳ２‘３２８、ＦＧＦ１４‘５７７、ＤＭＲＴ１‘９３４、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５‘４５６、ＭＣＩＤＡＳ‘８５５、ＭＣＩＤＡＳ‘００３、ＰＤＧＦＤ‘３８８、ＰＤＧＦＤ‘９２１、ＧＳＧ１Ｌ‘８６１、ＺＮＦ４９２’４９９、ＺＮＦ４９２‘０６９、ＺＮＦ５６８‘２５２、ＺＮＦ５６８‘４０５、ＺＮＦ５４２‘５２５、ＺＮＦ５４２‘５０２、ＺＮＦ４７１‘５２７、ＺＮＦ４７１‘５５８、ＺＮＦ４７１‘６６２、ＺＮＦ１３２‘２６８、、ＺＮＦ１３２‘４１５、およびＪＡＭ２‘３２０を含む）、より選択される１つ以上の大腸がんメチル化遺伝子座のメチル化状態をヒト対象のＤＮＡにおいて決定すること、ならびに、対象における大腸がんの診断を行うこと、を含む。例えば、いくつかの実施形態において、メチル化状態は、メチル化特異的制限酵素定量ポリメラーゼ連鎖反応（ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲ）、メチル化特異的ＰＣＲ、メチル化特異的ヌクレアーゼを用いた稀少アレル濃縮ＰＣＲ、および次世代シーケンシングからなる群より選択される１つ以上のメンバーを使用して決定され得る。種々の実施形態において、診断確認アッセイが、ヒト対象に対して行われ、例えば、スクリーニングまたは診断に続いて、本開示において提供される診断確認アッセイが行われる。場合によっては、診断確認アッセイは、結腸内視鏡検査である。場合によっては、診断確認アッセイは、スクリーニングもしくは診断から２週間以内、スクリーニングもしくは診断から１ヵ月以内、スクリーニングもしくは診断から２ヵ月以内、スクリーニングもしくは診断から３ヵ月以内、または

、スクリーニングもしくは診断から１年以内に行われる。
【０００５】
特定の態様において、本開示は、とりわけ、大腸がんスクリーニングのためのメチル化特異的制限酵素定量ポリメラーゼ連鎖反応（ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲ）の方法を提供する。当該方法は：（ａ）ヒト対象のＤＮＡを、１つ以上のメチル化特異的制限酵素と接触させること；ならびに、（ｂ）酵素消化ＤＮＡまたはそのアンプリコンのｑＰＣＲを行い、（ｉ）１つ以上の、表１に記載の遺伝子；および／または、（ｉｉ）１つ以上の、表７に記載のメチル化可変領域（ＤＭＲ）、より選択される１つ以上の大腸がんメチル化遺伝子座のメチル化状態を決定すること、を含む。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、ヒト対象のＤＮＡをメチル化特異的制限酵素と接触させて、例えば、非メチル化非腫瘍由来ＤＮＡを消化する。種々の実施形態において、消化されたＤＮＡ、および／または消化後に残留するＤＮＡは、選択された大腸がんメチル化遺伝子座のうち１つ以上のすべてまたは一部について、予備増幅される（例えば、ｑＰＣＲの前の増幅工程において増幅される）。特定の実施形態において、予備増幅は、増幅反応における、消化されたＤＮＡまたは消化後に残留するＤＮＡの１つ以上の試料の増幅を含む。当該増幅反応は、例えば、１つ以上の、表１３のアロオリゴヌクレオチドプライマー対を含む。ここで、オリゴヌクレオチドプライマーは、単一のプールで提供される。続くｑＰＣＲにおいて、当業者は、メチル化状態が個別のメチル化遺伝子座ごと（例えば、ＤＭＲそれぞれ）について、別々に、個別に決定されることを理解するのであろう。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、ＤＮＡは、試料のアリコートであり、その結果、メチル化特異的制限酵素と接触していない試料の分かれたアリコートは、ｑＰＣＲのためのＤＮＡの参照プールを提供することができる。このＤＮＡの参照プールは、消化されたＤＮＡと同一または類似のｑＰＣＲ条件に供することができる（例えば、同一のオリゴヌクレオチドプライマー対を使用する予備増幅、およびｑＰＣＲを用いた定量）。
【０００６】
特定の態様において、本開示は、とりわけ、大腸がん（例えば、ステージの早い大腸がんである大腸がん）を治療する方法を提供する。当該方法は：（ａ）ヒト対象のＤＮＡにおける（ｉ）１つ以上の、表１に記載の遺伝子；および／または、（ｉｉ）１つ以上の、表７に記載のメチル化可変領域（ＤＭＲ）、より選択される１つ以上の大腸がんメチル化遺伝子座のメチル化状態に基づいて、大腸がん（例えば、ステージの早い大腸がんである大腸がん）の診断を行うこと；および、（ｂ）大腸がん（例えば、ステージの早い大腸がんである大腸がん）を治療すること、を含む。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、診断確認アッセイが、ヒト対象に対して行われ、例えば、メチル化状態に基づく診断に続いて、本開示において提供される診断確認アッセイが行われる。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、診断確認アッセイは、結腸内視鏡検査である。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、診断確認アッセイは、メチル化状態に基づく診断から２週間以内、メチル化状態に基づく診断から１ヶ月以内、メチル化状態に基づく診断から２ヶ月以内、メチル化状態に基づく診断から３ヶ月以内、または、メチル化状態に基づく診断から１年以内に行われる。
【０００７】
特定の態様において、本開示は、とりわけ、ステージの早い大腸がんを治療する方法を提供する。当該方法は：（ａ）ヒト対象のＤＮＡにおける（ｉ）１つ以上の、表１に記載の遺伝子；および／または、（ｉｉ）１つ以上の、表７に記載のメチル化可変領域（ＤＭＲ）、より選択される１つ以上の大腸がんメチル化遺伝子座のメチル化状態に基づいて、ステージの早い大腸がんの診断を行うこと；および、（ｂ）ステージの早い大腸がんを治療すること、を含む。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、診断確認アッセイが、ヒト対象に対して行われ、例えば、メチル化状態に基づく診断に続いて、本開示において提供される診断確認アッセイが行われる。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、診断確認アッセイは、結腸内視鏡検査である。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、診断確認アッセイは

、メチル化状態に基づく診断から２週間以内、メチル化状態に基づく診断から１ヶ月以内、メチル化状態に基づく診断から２ヶ月以内、メチル化状態に基づく診断から３ヶ月以内、または、メチル化状態に基づく診断から１年以内に行われる。

【０００８】

特定の態様において、本開示は、大腸がんをスクリーニングするインビトロの方法において、メチル化感応性制限酵素消化ヒトＤＮＡ（例えば、メチル化感応性制限酵素消化ヒトｃｆＤＮＡ）を分析または使用する方法を提供する。当該方法は：（ａ）１つ以上の、表１に記載の遺伝子（例えば、ＡＬＫ、ＬＯＮＲＦ２、ＡＤＡＭＴＳ２、ＦＧＦ１４、ＤＭＲＴ１、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５、ＭＣＩＤＡＳ、ＰＤＧＦＤ、ＧＳＧ１Ｌ、ＺＮＦ４９２、ＺＮＦ５６８、ＺＮＦ５４２、ＺＮＦ４７１、ＺＮＦ１３２、ＪＡＭ２、およびＣＮＲＩＰ１を含む）；および／または、（ｂ）１つ以上の、表７に記載のメチル化可変領域（ＤＭＲ）（例えば、ＡＬＫ‘４３４、ＣＮＲＩＰ１‘２３２、ＣＮＲＩＰ１‘２７２、ＬＯＮＲＦ２‘２８１、ＬＯＮＲＦ２‘３８７、ＡＤＡＭＴＳ２‘２５４、ＡＤＡＭＴＳ２‘２８４、ＡＤＡＭＴＳ２‘３２８、ＦＧＦ１４‘５７７、ＤＭＲＴ１‘９３４、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５‘４５６、ＭＣＩＤＡＳ‘８５５、ＭＣＩＤＡＳ‘００３、ＰＤＧＦＤ‘３８８、ＰＤＧＦＤ‘９２１、ＧＳＧ１Ｌ‘８６１、ＺＮＦ４９２’４９９、ＺＮＦ４９２‘０６９、ＺＮＦ５６８‘２５２、ＺＮＦ５６８‘４０５、ＺＮＦ５４２‘５２５、ＺＮＦ５４２‘５０２、ＺＮＦ４７１‘５２７、ＺＮＦ４７１‘５５８、ＺＮＦ４７１‘６６２、ＺＮＦ１３２‘２６８、、ＺＮＦ１３２‘４１５、およびＪＡＭ２‘３２０を含む）、より選択される１つ以上の大腸がんメチル化遺伝子座のメチル化状態をＤＮＡにおいて決定すること、ならびに、対象における大腸がんの診断を行うこと、を含む。例えば、いくつかの実施形態において、メチル化状態は、メチル化特異的制限酵素定量ポリメラーゼ連鎖反応（ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲ）、メチル化特異的ＰＣＲ、メチル化特異的ヌクレアーゼを用いた稀少アレル濃縮ＰＣＲ、および次世代シーケンシングからなる群より選択される１つ以上のメンバーを使用して決定され得る。種々の実施形態において、診断確認アッセイが、ヒト対象に対して行われ、例えば、スクリーニングまたは診断に続いて、本開示において提供される診断確認アッセイが行われる。場合によっては、診断確認アッセイは、結腸内視鏡検査である。場合によっては、診断確認アッセイは、スクリーニングもしくは診断から２週間以内、スクリーニングもしくは診断から１ヵ月以内、スクリーニングもしくは診断から２ヵ月以内、スクリーニングもしくは診断から３ヵ月以内、または、スクリーニングもしくは診断から１年以内に行われる。

【０００９】

例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の一態様は、参照と比較して、１つ以上のメチル化遺伝子座が高メチル化されているかどうかを決定することを含むことができる。ここで、高メチル化は、大腸がんを示す。

【００１０】

例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の一態様は、ＺＮＦ４７１およびＦＧＦ１４それぞれの少なくとも１つのＤＭＲのメチル化状態を決定することを含むことができる。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の一態様は、ＺＮＦ４７１、ＦＧＦ１４、およびＰＤＧＦＤそれぞれの少なくとも１つのＤＭＲのメチル化状態を決定することを含むことができる。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の一態様は、ＺＮＦ４７１、ＦＧＦ１４、ＰＤＧＦＤ、およびＡＤＡＭＴＳ２それぞれの少なくとも１つのＤＭＲのメチル化状態を決定することを含むことができる。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の一態様は、ＺＮＦ４７１、ＦＧＦ１４、ＰＤＧＦＤ、ＡＤＡＭＴＳ２、ＺＮＦ４９２、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５それぞれの少なくとも１つのＤＭＲのメチル化状態を決定することを含むことができる。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の一態様は、ＺＮＦ４７１、ＦＧＦ１４、ＰＤＧＦＤ、ＡＤＡＭＴＳ２、ＺＮＦ４９２、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５、ＺＮＦ５４２、ＬＯＮＲＦ２、ＺＮＦ１３２、およびＣＮＲＩＰ１、ＡＬＫそれぞれの少なくとも１つのＤＭＲのメチル化状

態を決定することを含むことができる。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の一態様は、ＡＬＫ、ＬＯＮＲＦ２、ＡＤＡＭＴＳ２、ＦＧＦ１４、ＤＭＲＴ１、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５、ＭＣＩＤＡＳ、ＰＤＧＦＤ、ＧＳＧ１Ｌ、ＺＮＦ５６８、ＺＮＦ５４２、ＺＮＦ４７１、ＺＮＦ１３２、ＪＡＭ２、ＺＮＦ４９２、およびＣＮＲＩＰ１それぞれの少なくとも１つのＤＭＲのメチル化状態を決定することを含むことができる。

【００１１】

例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の一態様は、（ｉ）１つ以上の、表１に記載の遺伝子；および／または、（ｉｉ）１つ以上の、表７に記載のメチル化可変領域（ＤＭＲ）、より選択される１つ以上の大腸がんメチル化遺伝子座の使用を明示的に、および／または特別に排除することができる。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、本開示の一態様は、ＦＧＦ１４、ＺＮＦ４７１、ＰＤＧＦＤ、およびＡＬＫ、ならびにそれらの組み合わせより選択される１つ以上の大腸がんメチル化遺伝子座の使用を明示的に、および／または特別に排除することができる。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、本開示の一態様は、大腸がんをスクリーニングするためのメチル化遺伝子座としてのＦＧＦ１４の使用を明示的に、および／または特別に排除することができる。この排除は、ＦＧＦ１４単独の排除、またはＦＧＦ１４を含む複数のメチル化遺伝子座の排除であり得る。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、本開示の一態様は、大腸がんをスクリーニングするためのメチル化遺伝子座としてのＺＮＦ４７１の使用を明示的に、および／または特別に排除することができる。この排除は、ＺＮＦ４７１単独の排除、またはＺＮＦ４７１を含む複数のメチル化遺伝子座の排除であり得る。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、本開示の一態様は、大腸がんをスクリーニングするためのメチル化遺伝子座としてのＰＤＧＦＤの使用を明示的に、および／または特別に排除することができる。この排除は、ＰＤＧＦＤ単独の排除、またはＰＤＧＦＤを含む複数のメチル化遺伝子座の排除であり得る。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、本開示の一態様は、大腸がんをスクリーニングするためのメチル化遺伝子座としてのＡＬＫの使用を明示的に、および／または特別に排除することができる。この排除は、ＡＬＫ単独の排除、またはＡＬＫを含む複数のメチル化遺伝子座の排除であり得る。

【００１２】

例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の一態様は、ＺＮＦ４７１‘５５８およびＦＧＦ１４‘５７７のＤＭＲのメチル化状態を決定することを含むことができる。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の一態様は、ＺＮＦ４７１‘５５８、ＦＧＦ１４‘５７７、およびＰＤＧＦＤ‘３８８のＤＭＲのメチル化状態を決定することを含むことができる。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の一態様は、ＺＮＦ４７１‘５５８、ＦＧＦ１４‘５７７、ＰＤＧＦＤ‘３８８、ＺＮＦ４７１‘５２７、およびＡＤＡＭＴＳ２‘２８４のＤＭＲのメチル化状態を決定することを含むことができる。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の一態様は、ＺＮＦ４７１‘５５８、ＦＧＦ１４‘５７７、ＰＤＧＦＤ‘３８８、ＺＮＦ４７１‘５２７、ＡＤＡＭＴＳ２‘２８４、ＡＤＡＭＴＳ２‘２５４、ＺＮＦ４９２‘０６９、およびＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５‘４５６のＤＭＲのメチル化状態を決定することを含むことができる。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の一態様は、ＺＮＦ４７１‘５５８、ＦＧＦ１４‘５７７、ＰＤＧＦＤ‘３８８、ZNF471‘５２７、ADAMTS2‘２８４、ADAMTS2‘２５４、ＺＮＦ４９２‘０６９、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５‘４５６、ＺＮＦ５４２‘５０２、ＬＯＮＲＦ２‘２８１、ＺＮＦ１３２‘４１５、ＰＤＧＦＤ‘９２１、ＺＮＦ１３２‘２６８、ＣＮＲＩＰ１‘２７２、およびＡＬＫ‘４３４のＤＭＲのメチル化状態を決定することを含むのメチル化状態を決定することを含むことができる。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の一態様は、ＡＬＫ‘４３４、ＣＮＲＩＰ１‘２３２、ＣＮＲＩＰ１‘

２７２、ＬＯＮＲＦ２‘２８１、ＬＯＮＲＦ２‘３８７、ＡＤＡＭＴＳ２‘２５４、ＡＤＡＭＴＳ２‘２８４、ＡＤＡＭＴＳ２‘３２８、ＦＧＦ１４‘５７７、ＤＭＲＴ１‘９３４、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５‘４５６、ＭＣＩＤＡＳ‘８５５、ＭＣＩＤＡＳ‘００３、ＰＤＧＦＤ‘３８８、ＰＤＧＦＤ‘９２１、ＧＳＧ１Ｌ‘８６１、ＺＮＦ４９２’４９９、ＺＮＦ４９２‘０６９、ＺＮＦ５６８‘２５２、ＺＮＦ５６８‘４０５、ＺＮＦ５４２‘５２５、ＺＮＦ５４２‘５０２、ＺＮＦ４７１‘５２７、ＺＮＦ４７１‘５５８、ＺＮＦ４７１‘６６２、ＺＮＦ１３２‘２６８、ＺＮＦ１３２‘４１５、およびＪＡＭ２‘３２０のＤＭＲのメチル化状態を決定することを含むのメチル化状態を決定することを含むことができる。

【００１３】

例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の一態様は、表７より選択される１つ以上の大腸がんＤＭＲの使用を明示的に、および／または特別に排除することができる。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、本開示の一態様は、ＦＧＦ１４‘５７７、ＺＮＦ４７１‘５２７、ＺＮＦ４７１‘５５８、ＺＮＦ４７１‘６６２、ＰＤＧＦＤ‘３８８、ＰＤＧＦＤ‘９２１、およびＡＬＫ‘４３４、ならびにそれらの組み合わせより選択される１つ以上の大腸がんＤＭＲの使用を明示的に、および／または特別に排除することができる。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、本開示の一態様は、大腸がんをスクリーニングするためのＤＭＲとしてのＦＧＦ１４‘５７７の使用を明示的に、および／または特別に排除することができる。この排除は、ＦＧＦ１４‘５７７単独の排除、またはＦＧＦ１４‘５７７を含む複数のＤＭＲの排除であり得る。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、本開示の一態様は、大腸がんをスクリーニングするためのＤＭＲとしてのＺＮＦ４７１‘５２７、ＺＮＦ４７１‘５５８、および／またはＺＮＦ４７１’６６２の使用を明示的に、および／または特別に排除することができる。この排除は、ＺＮＦ４７１‘５２７、ＺＮＦ４７１‘５５８、および／またはＺＮＦ４７１‘６６２単独の排除、またはＺＮＦ４７１‘５２７、ＺＮＦ４７１‘５５８、および／またはＺＮＦ４７１‘６６２を含む複数のＤＭＲの排除であり得る。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、本開示の一態様は、大腸がんをスクリーニングするためのＤＭＲとしてのＰＤＧＦＤ‘３８８および／またはＰＤＧＦＤ‘９２１の使用を明示的に、および／または特別に排除することができる。この排除は、ＰＤＧＦＤ‘３８８および／またはＰＤＧＦＤ‘９２１単独の排除、またはＰＤＧＦＤ‘３８８および／またはＰＤＧＦＤ‘９２１を含む複数のＤＭＲの排除であり得る。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、本開示の一態様は、大腸がんをスクリーニングするためのＤＭＲとしてのＡＬＫ‘４３４の使用を明示的に、および／または特別に排除することができる。この排除は、ＡＬＫ‘４３４単独の排除、またはＡＬＫ‘４３４を含む複数のＤＭＲの排除であり得る。

【００１４】

例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の一態様は、表１３に記載のオリゴヌクレオチドプライマー対またはオリゴヌクレオチドプライマー対の組による１つ以上のＤＭＲの増幅を含むことができる。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の１つ以上の態様のうち、対象ＤＮＡは、ヒト対象の血液、血漿、尿、唾液、または便から単離される。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の１つ以上の態様のうち、ＤＮＡは、ヒト対象のセルフリーＤＮＡである。

【００１５】

例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の１つ以上の態様のうち、スクリーニングされた対象は、スクリーニング時に大腸がんについて無症状であった。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の１つ以上の態様のうち、スクリーニングされた対象は、以前に大腸がんについてスクリーニングされていた。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の１つ以上の態様のうち、スクリーニングされた対象は、過去１０年以内、過去５年以内、過去４年以内、過去３年以内、過去２年以内、または過去１年以内に、大腸がんについてス

クリーニングされていた。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、対象における大腸がんについて以前のスクリーニングは、対象が大腸がんを有さないと診断していた。例えば、ここで、対象が大腸がんを有さないと診断していた大腸がんについての以前のスクリーニングは、過去１年以内であり、および／または対象が大腸がんを有さないと診断していた大腸がんについての以前のスクリーニングは、結腸内視鏡検査であった。

【００１６】

例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の１つ以上の態様のうち、スクリーニングする方法は、ステージの早い大腸がんの診断を達成するか、または含み、任意に、大腸がんは、ステージ０、ステージＩ、ステージＩＩＡ、ステージＩＩＢ、またはステージＩＩＣの大腸がんである。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の１つ以上の態様のうち、スクリーニングする方法は、ステージの早い大腸がんの診断を達成するか、または含み、例えば、ここで、がんは、転移していない。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の１つ以上の態様のうち、スクリーニングする方法は、ステージが早くない大腸がんの診断を達成するか、または含み、任意に、大腸がんは、ステージＩＩＩＡ、ステージＩＩＩＢ、ステージＩＩＩＣ、ステージＩＶＡ、ステージＩＶＢ、またはステージＩＶＣの大腸がんである。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の１つ以上の態様のうち、スクリーニングする方法は、ステージが早くない大腸がんの診断を達成するか、または含み、例えば、ここで、がんは、転移している。

【００１７】

例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の１つ以上の態様のうち、スクリーニングする方法は、少なくとも０．６、例えば少なくとも０．７の、大腸がんに対する感度を達成するか、または提供する。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、本明細書に記載のスクリーニングする方法は、０．５、０．５５、０．６、０．６５、０．７、０．７５、０．８、０．８５、０．９、または０．９５以上の、大腸がんに対する感度を達成するか、または提供する。

【００１８】

例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の１つ以上の態様のうち、スクリーニングする方法は、少なくとも０．７、例えば少なくとも０．８の、大腸がんに対する特異度を達成するか、または提供する。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、本明細書に記載のスクリーニングする方法は、０．５、０．５５、０．６、０．６５、０．７、０．７５、０．８、０．８５、０．９、または０．９５以上の、大腸がんに対する特異度を達成するか、または提供する。

【００１９】

例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本発明の１つ以上の態様は、対象が発がん性突然変異を含むかどうかを決定することを含むことができる。例えば、例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、診断は、例えばｃｆＤＮＡ、細胞試料ＤＮＡ、または組織試料ＤＮＡの分析によって、対象における発がん性突然変異の有無を決定することを含むことができる。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、発がん性突然変異は、Ｋｒａｓ、ＮＲＡＳ、ＰＩＫ３ＣＡ、ＰＴＥＮ、ＴＰ５３、ＢＲＡＦ、およびＡＰＣにある。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、対象は、Ｋｒａｓ、ＮＲＡＳ、ＰＩＫ３ＣＡ、ＰＴＥＮ、ＴＰ５３、ＢＲＡＦ、およびＡＰＣのうちの２つ以上に発がん性突然変異を含み得る。

【００２０】

いくつかの態様において、本開示は、とりわけ、大腸がんスクリーニングにおいて使用するためのキットを提供する。当該キットは：（ａ）少なくとも１つの、表１３のオリゴヌクレオチドプライマー対、を含み、任意にさらに：（ｂ）少なくとも１つのメチル化特異的制限酵素および／または（ｃ）重亜硫酸水素塩試薬、を含む。いくつかの態様におい

て、本開示は、とりわけ、大腸がんのスクリーニングのための診断用ｑＰＣＲ反応を提供する。当該診断用ｑＰＣＲ反応は：（ａ）ヒトＤＮＡ；（ｂ）ポリメラーゼ；および、（ｃ）少なくとも１つの、表１３のオリゴヌクレオチドプライマー対、を含み、任意に、ヒトＤＮＡは、重亜硫酸水素塩処理ヒトＤＮＡ、またはメチル化特異的制限酵素消化ヒトＤＮＡである。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、オリゴヌクレオチドプライマー対は、ＺＮＦ４７１‘５５８およびＦＧＦ１４‘５７７のＤＭＲの増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマー対を含む。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、オリゴヌクレオチドプライマー対は、ＺＮＦ４７１‘５５８、ＦＧＦ１４‘５７７、およびＰＤＧＦＤ‘３８８のＤＭＲの増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマー対を含む。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、オリゴヌクレオチドプライマー対は、ＺＮＦ４７１‘５５８、ＦＧＦ１４‘５７７、ＰＤＧＦＤ‘３８８、ＺＮＦ４７１‘５２７、およびＡＤＡＭＴＳ２‘２８４のＤＭＲの増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマー対を含む。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、オリゴヌクレオチドプライマー対は、ＺＮＦ４７１‘５５８、ＦＧＦ１４‘５７７、ＰＤＧＦＤ‘３８８、ＺＮＦ４７１‘５２７、ＡＤＡＭＴＳ２‘２８４、ＡＤＡＭＴＳ２‘２５４、ＺＮＦ４９２‘０６９、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５‘４５６のＤＭＲの増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマー対を含む。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、オリゴヌクレオチドプライマー対は、ＺＮＦ４７１‘５５８、ＦＧＦ１４‘５７７、ＰＤＧＦＤ‘３８８、ＺＮＦ４７１‘５２７、ＡＤＡＭＴＳ２‘２８４、ＡＤＡＭＴＳ２‘２５４、ＺＮＦ４９２‘０６９、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５‘４５６、ＺＮＦ５４２‘５０２、ＬＯＮＲＦ２‘２８１、ＺＮＦ１３２‘４１５、ＰＤＧＦＤ‘９２１、ＺＮＦ１３２‘２６８、ＣＮＲＩＰ１‘２７２、およびＡＬＫ‘４３４のＤＭＲの増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマー対を含む。例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、オリゴヌクレオチドプライマー対は、ＡＬＫ‘４３４、ＣＮＲＩＰ１‘２３２、ＣＮＲＩＰ１‘２７２、ＬＯＮＲＦ２‘２８１、ＬＯＮＲＦ２‘３８７、ＡＤＡＭＴＳ２‘２５４、ＡＤＡＭＴＳ２‘２８４、ＡＤＡＭＴＳ２‘３２８、ＦＧＦ１４‘５７７、ＤＭＲＴ１‘９３４、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５‘４５６、ＭＣＩＤＡＳ‘８５５、ＭＣＩＤＡＳ‘００３、ＰＤＧＦＤ‘３８８、ＰＤＧＦＤ‘９２１、ＧＳＧ１Ｌ‘８６１、ＺＮＦ４９２’４９９、ＺＮＦ４９２‘０６９、ＺＮＦ５６８‘２５２、ＺＮＦ５６８‘４０５、ＺＮＦ５４２‘５２５、ＺＮＦ５４２‘５０２、ＺＮＦ４７１‘５２７、ＺＮＦ４７１‘５５８、ＺＮＦ４７１‘６６２、ＺＮＦ１３２‘２６８、ＺＮＦ１３２‘４１５、およびＪＡＭ２‘３２０のＤＭＲの増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマー対を含む。

【００２１】

例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の一態様は、表７より選択される１つ以上の大腸がんＤＭＲの増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマー対の使用を明示的に、および／または特別に排除することができる。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、本開示の一態様は、ＦＧＦ１４‘５７７、ＺＮＦ４７１‘５２７、ＺＮＦ４７１‘５５８、ＺＮＦ４７１‘６６２、ＰＤＧＦＤ‘３８８、ＰＤＧＦＤ‘９２１、およびＡＬＫ‘４３４、ならびにそれらの組み合わせより選択される１つ以上の大腸がんＤＭＲの増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマー対の使用を明示的に、および／または特別に排除することができる。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、本開示の一態様は、大腸がんをスクリーニングするためのＤＭＲとしてのＦＧＦ１４‘５７７の増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマー対の使用を明示的に、および／または特別に排除することができる。この排除は、ＦＧＦ１４‘５７７単独の排除、またはＦＧＦ１４‘５７７を含む複数のＤＭＲの排除であり得る。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、本開示の一態様は、大腸がんをスクリーニングするためのＤＭＲとしてのＺＮＦ４７１‘５２７、ＺＮＦ４７１‘５５８、および／またはＺＮＦ４７１’６６２の増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマー対の使用を明示的に、および／または特別に排除することができる。この排除は、ＺＮＦ４７１‘５２７、ＺＮＦ４７１‘５５８、および／またはＺＮＦ４７１‘６６２単独の排除、

またはＺＮＦ４７１‘５２７、ＺＮＦ４７１‘５５８、および／またはＺＮＦ４７１‘６６２を含む複数のＤＭＲの排除であり得る。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、本開示の一態様は、大腸がんをスクリーニングするためのＤＭＲとしてのＰＤＧＦＤ‘３８８および／またはＰＤＧＦＤ‘９２１の増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマー対の使用を明示的に、および／または特別に排除することができる。この排除は、ＰＤＧＦＤ‘３８８および／またはＰＤＧＦＤ‘９２１単独の排除、またはＰＤＧＦＤ‘３８８および／またはＰＤＧＦＤ‘９２１を含む複数のＤＭＲの排除であり得る。例えば上記で具体的に言及したようないくつかの実施形態において、本開示の一態様は、大腸がんをスクリーニングするためのＤＭＲとしてのＡＬＫ‘４３４の増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマー対の使用を明示的に、および／または特別に排除することができる。この排除は、ＡＬＫ‘４３４単独の排除、またはＡＬＫ‘４３４を含む複数のＤＭＲの排除であり得る。

【００２２】

例えば上記で具体的に言及したような種々の実施形態において、本開示の種々の態様の、方法、キット、または本開示の他の組成物は、１つ以上のメチル化遺伝子座の決定されたメチル化状態を使用し、下記（ｉ）～（ｉｖ）のうち少なくとも１つ：（ｉ）ヒト対象における大腸がんの存在；（ｉｉ）ヒト対象における大腸がんの素因；（ｉｉｉ）ヒト対象における大腸がんの増大したリスク；および、（ｉｖ）ヒト対象における大腸がんのステージ；を同定することをさらに含むか、または、これにおいて役立つことができる。

【００２３】

上記において記載されるか、または本明細書に記載のすべての態様および実施形態を含むがこれらに限定されない、種々の態様および実施形態において、本明細書に記載の大腸がん診断の方法は、インビトロの診断用の方法であり、大腸がん診断を使用するために本明細書に記載の組成物は、インビトロの使用のための組成物である。

【００２４】

種々の態様において、本発明の方法および組成物は、例えば米国特許第１０，００６，９２５号に開示されているように、当技術分野で公知のバイオマーカーと組み合わせて使用することができる。米国特許第１０，００６，９２５号は、参照によって、その全体が本明細書に組み込まれる。

【００２５】

〔定義〕

"a"または"an"：本明細書において用いられるとき、冠詞"a"および"an"は、当該冠詞の対象の１つまたは２つ以上（すなわち、少なくとも１つ）を表す。例えば、"an element"とは、１つまたは２つ以上のelementを表す。

【００２６】

約：値に関連して本明細書において用いられるとき、用語「約」は、文脈において参照されている値に類似している値を表す。一般的に、背景技術に詳しい当業者であれば、「約」により包含される妥当な分散の程度を理解するであろう。例えばいくつかの実施形態において、用語「約」に含まれる値は、参照されている値の２５％以内、２０％以内、１９％以内、１８％以内、１７％以内、１６％以内、１５％以内、１４％以内、１３％以内、１２％以内、１１％以内、１０％以内、９％以内、８％以内、７％以内、６％以内、５％以内、４％以内、３％以内、２％以内、１％以内、または、ほんのわずかであってもよい。

【００２７】

投与：本明細書において用いられるとき、用語「投与」は、通常、対象またはシステムに対する組成物の投与を表す。例えば、組成物である薬剤、組成物に含まれている薬剤、または組成物によって他の様式で送達される薬剤の送達が達成されることを表す。

【００２８】

薬剤：本明細書において用いられるとき、用語「薬剤」は、ある実体を表す（小分子、ペプチド、ポリペプチド、核酸、脂質、多糖類、複合体、組合せ、混合物、システムなど

。あるいは、熱、電流、電場、磁力、磁界などの現象）。
【００２９】
回復(Amelioration)：本明細書において用いられるとき、用語「回復」は、対象の状態の予防、軽減、一時的軽減または改善を表す。回復には、疾患、障害または状態の完全な回復または完全な予防が含まれるが、必須ではない。
【００３０】
アンプリコンまたはアンプリコン分子：本明細書において用いられるとき、用語「アンプリコン」または「アンプリコン分子」は、テンプレート核酸分子（あるいは、その相補的配列を有する核酸分子、またはこのような任意の核酸分子を含む２本鎖核酸）の転写によって生成される核酸分子を表す。転写は、プライマーから開始されうる。
【００３１】
増幅：本明細書において用いられるとき、用語「増幅」は、テンプレート核酸分子と種々の試薬とを組合せて使用して、当該テンプレート核酸分子からさらなる核酸分子を生成させることを表す。ここで、さらなる核酸分子は、テンプレート核酸分子および／またはその相補的配列の断片と同一であってもよいし、類似していてもよい。例えば、同一性は、７０以上である（７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上または１００％など）。
【００３２】
増幅反応混合物：本明細書において用いられるとき、用語「増幅反応混合物」または「増幅反応」は、テンプレート核酸分子と、当該テンプレート核酸分子の増幅に充分な試薬とを表す。
【００３３】
生体試料：本明細書において用いられるとき、用語「生体試料」は、通常、本明細書に記載の通り、所定の生物的ソース（組織、生物、培養細胞など）から得られる（または、これらに由来する）試料を表す。いくつかの実施形態において、生物的ソースは、生物（動物またはヒトなど）であるか、またはこれを含む。いくつかの実施形態において、生体試料は、生物組織または体液であるか、またはこれらを含む。いくつかの実施形態において、生体試料は、細胞、組織または体液であってもよいし、またはそれらを含んでもよい。いくつかの実施形態において、生体試料は、血液、血液細胞、セルフリーＤＮＡ、遊離核酸、腹水、生検試料、手術検体、細胞を含有する体液、痰、唾液、糞、尿、脳脊髄液、腹水、胸水、リンパ液、婦人科液、分泌物、排泄物、皮膚スワブ、膣スワブ、口腔スワブ、鼻スワブ、洗浄液（乳管洗浄液または気管支肺胞洗浄液など）、吸引液、剥離物、骨髄であってもよいし、またはそれらを含んでもよい。いくつかの実施形態において、生体試料は、１つ以上の対象から得られる細胞であるか、またはそれを含む。試料は、生物的ソースから直接得られる「未処理の試料」であってもよいし、「処理された試料」であってもよい。生体試料のことを「試料」と称することもある。
【００３４】
バイオマーカー：本明細書において用いられるとき、用語「バイオマーカー」は、本技術分野における用例と同じである。すなわち、実体であって、当該実体の存在、レベルまたは形態が、特定の生物学的事象または所定の状態と相関がある実体を表す。これにより、この実体は、事象または状態の「マーカー」と見做される。当業者であれば理解するであろうところによると、例えば「ＤＮＡバイオマーカー」の文脈においては、バイオマーカーは、遺伝子座（１つ以上のメチル化遺伝子座など）および／または遺伝子座の状態（１つ以上のメチル化遺伝子座の状態など）であってもよいし、またはそれを含んでもよい。バイオマーカーの一例をあげると、いくつかの実施形態において、バイオマーカーは、特定の疾患、障害または状態についてのマーカーであってもよいし、またはそれを含んでもよい。あるいは、対象などにおいて、特定の疾患、障害または状態が、発症、発生または再発しうる定量的な確率の定性的なマーカーであってもよい。いくつかの実施形態において、バイオマーカーは、特定の処置の結果のマーカー（または、その定量的な確率の定

性的なマーカー）であってもよいし、またはそれを含んでもよい。したがって、種々の実施形態において、バイオマーカーは、関連する生物学的事象または所定の状態の予測、予後および／または診断であってもよい。バイオマーカーは、任意の化学的クラスの実体でありうる。例えばいくつかの実施形態において、バイオマーカーは、核酸、ポリペプチド、脂質、炭水化物、小分子、無機物質（金属またはイオンなど）、またはこれらの組合せであってもよいし、またはそれらを含んでもよい。いくつかの実施形態において、バイオマーカーは、細胞表面にあるマーカーである。いくつかの実施形態において、バイオマーカーは、細胞内にある。いくつかの実施形態において、バイオマーカーは、細胞外に見られる。例えば、バイオマーカーは、細胞外に分泌されるか、細胞外に生成するか、または細胞外に存在する。細胞外の例としては、体液（血、尿、涙、唾液、脳脊髄液など）の中が挙げられる。いくつかの実施形態において、バイオマーカーは、メチル化遺伝子座のメチル化状態である。いくつかの例において、バイオマーカーを「マーカー」と称することもある。

【００３５】

バイオマーカーの一例を挙げると、いくつかの実施形態において、この用語は、遺伝子によってコードされている産物の発現を表す。その発現は、特定の腫瘍、腫瘍のサブクラス、腫瘍のステージなどに特徴的である。代替的または追加的に、いくつかの実施形態において、特定のマーカーの存在またはレベルは、特定のシグナル伝達経路の活性（または活性レベル）と相関していてもよい（特定の種類の腫瘍に特徴的な活性を有するシグナル伝達経路など）。

【００３６】

当業者であれば理解するであろうところによると、バイオマーカーは、それ自身として個別に、特定の生物学的事象または所定の状態を決定できるか、あるいは、特定の生物学的事象または所定の状態の統計的確率を表している（または確率の決定に寄与する）。当業者であれば理解するであろうところによると、関連する特定の生物学的事象または所定の状態によっては、マーカーの特異度および／または感度は異なっている。

【００３７】

血液成分：本明細書において用いられるとき、用語「血液成分」は、全血の任意の成分を表す（赤血球、白血球、血漿、血小板、内皮細胞、中皮細胞、上皮細胞およびセルフリーＤＮＡなど）。また、血液成分には、血漿の成分も含まれる。血漿の成分の例としては、タンパク質、代謝産物、脂質、核酸、炭水化物、および血中に存在しうる任意の他の細胞が挙げられる。これらの成分は、妊娠、臓器移植、感染、損傷または疾患などに起因する。

【００３８】

がん：本明細書において用いられるとき、用語「がん」「悪性腫瘍」「新生物」「腫瘍」および「癌腫」は、互換可能に用いられる。これらの用語は、異常な、制御できないおよび／または自律的な増殖を細胞が示し（または相対的に示し）、その結果、増殖速度の異常な亢進および／または異常に増殖する表現型を示している（または示していた）疾患、障害または状態を表す。いくつかの実施形態において、がんは、１つ以上の腫瘍を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、がんは、前がん性細胞（良性細胞）、悪性細胞、前転移性細胞、転移性細胞および／または非転移性細胞であってもよいし、またはそれらを含んでもよい。いくつかの実施形態において、がんは、固形腫瘍であってもよいし、またはそれらを含んでもよい。いくつかの実施形態において、がんは、血液腫瘍であってもよいし、またはそれを含んでもよい。一般的に、本技術分野で周知の異なる種類のがんの例としては、大腸がん、造血器がん（白血病、リンパ腫（ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫）など）、骨髄腫および骨髄増殖性疾患、肉腫、黒色腫、腺腫、固形組織の癌腫、扁平上皮細胞がん（口腔がん、咽頭がん、喉頭がんおよび肺がんなど）、肝臓がん、腎尿路生殖器がん（前立腺がん、子宮頸部がん、膀胱がん、子宮がん、および子宮内膜がんおよび腎細胞がんなど）、骨がん、膵臓がん、皮膚がん、皮膚または眼内の黒色腫、内分泌系のがん、甲状腺がん、副甲状腺がん、頭頸部がん、乳がん、胃腸がん、神

経系がん、良性病変（乳頭腫など）が挙げられる。

【００３９】

化学療法薬：本明細書において用いられるとき、用語「化学療法薬」は、本技術分野と同じよう例で用いられる。化学療法薬とは、がんを処置する（または、がんの処置に寄与する）１つ以上の公知の薬剤であるか、またはそのような特徴を有することが知られている１つ以上の薬剤である。特に、化学療法薬の例としては、アポトーシス促進剤、細胞増殖抑制剤、および／または細胞毒性剤が挙げられる。いくつかの実施形態において、化学療法薬は、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤（例えば、タキサン、メイタンシン、およびそれらのアナログなどの微小管を標的とする成分）、エポチロン、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（ＨＤＡＣ）、トポイソメラーゼ阻害剤（トポイソメラーゼＩおよび／またはトポイソメラーゼＩＩ阻害剤など）、キナーゼ阻害剤、ヌクレオチドアナログまたはヌクレオチド前駆体アナログ、ペプチド系抗生物質、白金系薬剤、レチノイド、ビンカアルカロイド、および／または、関連する抗増殖活性を有するアナログであってもよいし、またはそれらを含んでもよい。いくつかの特定の実施形態において、化学療法薬は、アクチノマイシン、オールトランスレチノイン酸、アウリスタチン、アザシチジン、アザチオプリン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、クルクミン、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イマチニブ、イリノテカン、メイタンシンおよび／またはそれらのアナログ（ＤＭ１など）、メクロレタミン、メチルカプトプリン、メトトレキサート、ミトキサントロン、メイタンシノイド、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、トポテカン、バルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン、もしくはこれらの組合せであってもよいし、またはそれらを含んでもよい。いくつかの実施形態においては、化学療法薬を、抗体－薬物複合体に関連して利用してもよい。いくつかの実施形態において、化学療法薬は、下記の抗体－薬物複合体からなる群より選択される１つである：ｈＬＬ１－ドキソルビシン、ｈＲＳ７－ＳＮ－３８、ｈＭＮ－１４－ＳＮ－３８、ｈＬＬ２－ＳＮ－３８、ｈＡ２０－ＳＮ－３８、ｈＰＡＭ４－ＳＮ－３８、ｈＬＬ１－ＳＮ－３８、ｈＲＳ７－Ｐｒｏ－２－Ｐ－Ｄｏｘ、ｈＭＮ－１４－Ｐｒｏ－２－Ｐ－Ｄｏｘ、ｈＬＬ２－Ｐｒｏ－２－Ｐ－Ｄｏｘ、ｈＡ２０－Ｐｒｏ－２－Ｐ－Ｄｏｘ、ｈＰＡＭ４－Ｐｒｏ－２－Ｐ－Ｄｏｘ、ｈＬＬ１－Ｐｒｏ－２－Ｐ－Ｄｏｘ、Ｐ４／Ｄ１０－ドキソルビシン、ゲムツズマブオゾガマイシン、ブレンツキシマブベドチン、トラスツズマブエムタンシン、イノツズマブオゾガマイシン、グレンバツムマブベドチン、ＳＡＲ３４１９、ＳＡＲ５６６６５８、ＢＩＩＢ０１５、ＢＴ０６２、ＳＧＮ－７５、ＳＧＮ－ＣＤ１９Ａ、ＡＭＧ－１７２、ＡＭＧ－５９５、ＢＡＹ－９４－９３４３、ＡＳＧ－５ＭＥ、ＡＳＧ－２２ＭＥ、ＡＳＧ－１６Ｍ８Ｆ、ＭＤＸ－１２０３、ＭＬＮ－０２６４、抗ＰＳＭＡ　ＡＤＣ、ＲＧ－７４５０、ＲＧ－７４５８、ＲＧ－７５９３、ＲＧ－７５９６、ＲＧ－７５９８、ＲＧ－７５９９、ＲＧ－７６００、ＲＧ－７６３６、ＡＢＴ－４１４、ＩＭＧＮ－８５３、ＩＭＧＮ－５２９、ボルセツズマブマホドチンおよびロルボツズマブメルタンシン。いくつかの実施形態において、化学療法薬は、ファルネシルチオサリチル酸（ＦＴＳ）、４－（４－クロロ－２－メチルフェノキシ）－Ｎ－ヒドロキシブタンアミド（ＣＭＨ）、エストラジオール（Ｅ２）、テトラメトキシスチルベン（ＴＭＳ）、δ－トコトリエノール、サリノマイシンまたはクルクミンであってもよいし、またはそれらを含んでもよい。

【００４０】

併用療法：本明細書において用いられるとき、用語「併用療法」は、２つ以上の薬剤またはレジメンを対象に投与し、これにより、当該２つ以上の薬剤またはレジメンが共に対象の疾患、状態または障害を処置することを表す。いくつかの実施形態においては、２つ以上の処置薬またはレジメンを、同時、連続または重複した投薬レジメンにおいて投与してもよい。当業者であれば理解するであろうところによると、併用療法には、２つの薬剤

またはレジメンを１つの組成物において共投与することを含むが、必須ではない。また、２つの薬剤またはレジメンを同時に投与することも含むが、必須ではない。

【００４１】

同等：本明細書において用いられるとき、用語「同等」は、２組以上の状態、環境、薬剤、実体、集団などの構成要素を表す。これらの構成要素は、互いに同一ではないかもしれないが、それらの間における比較が可能な程度には充分に類似している。それゆえ、当業者であれば理解するであろうところによると、観察された差異または類似性に基づいて結論を合理的に導出できる。いくつかの実施形態において、同等な状態、環境、薬剤、実体、集団などは、通常、複数の実質的に同一の特徴と、０個、１個または複数個の異なる特徴とによって特徴付けられる。当業者であれば、文脈において、複数の構成要素を同等と見做すためにはどの程度の同一性が必要とされるかを理解する。例えば、当業者であれば理解するであろうところによると、状態、環境、薬剤、実体、集団など構成要素が充分な数および種類の実質的に同一な特徴によって特徴付けられており、観察された差異の全部または一部が当該構成要素の同一でない特徴に起因しうると合理的に結論付けられるならば、構成要素が互いに同等である。

【００４２】

検出可能な部分：本明細書において用いられるとき、用語「検出可能な部分」は、任意の要素、分子、官能基、化合物、破片、または検出可能な他の部分を表す。いくつかの実施形態においては、検出可能な部分を、単独で提供または利用する。いくつかの実施形態においては、検出可能な部分を、他の薬剤と関連して（例えば、結合させて）提供および／または利用する。検出可能な部分の例としては、種々のリガンド、放射性核種（^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{18}Ｆ、^{19}Ｆ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{135}Ｉ、^{125}Ｉ、^{123}Ｉ、^{64}Ｃｕ、^{187}Ｒｅ、^{111}Ｉｎ、^{90}Ｙ、^{99m}Ｔｃ、^{177}Ｌｕ、^{89}Ｚｒなど）、蛍光色素、化学発光剤、生物発光剤、分光分解可能な無機蛍光半導体ナノ結晶（すなわち、量子ドット）、金属ナノ粒子、ナノクラスター、常磁性金属イオン、酵素、比色標識、ビオチン、ダイオキシゲニン、ハプテン、および抗血清またはモノクローナル抗体が利用可能なタンパク質が挙げられる（ただし、これらに限定されない）。

【００４３】

診断：本明細書において用いられるとき、用語「診断」は、対象が疾患、障害または状態を有している（または、これから発症する）か否か、および／または、その定量的な確率の性質を決定することを表す。例えば、がんの診断において、診断には、がんのリスク、種類、ステージ、悪性度または他のがん分類に関する決定が含まれていてもよい。いくつかの例において、診断は、１つ以上の一般的または特定の処置薬またはレジメンに対する予後および／または見込まれる反応に関する決定であってもよいし、またはそれを含んでもよい。

【００４４】

診断情報：本明細書において用いられるとき、用語「診断情報」は、診断の提供に有用な情報を表す。診断情報の例としては、バイオマーカーの状態の情報が挙げられる（ただし、これに限定されない）。

【００４５】

区別可能にメチル化されている：本明細書において用いられるとき、用語「区別可能にメチル化されている」とは、第１状態と第２状態との間でメチル化状態が異なっているメチル化部位を表す。区別が可能な状態でメチル化されているメチル化部位のことを、「メチル化可変部位」とも称する。いくつかの例において、ＤＭＲは、オリゴヌクレオチドプライマーを用いる増幅によって生成されるアンプリコンによって定義される（このプライマーは、例えば、ＤＭＲまたはアンプリコン内の所定のＤＮＡ領域の増幅用に選択されているオリゴヌクレオチドプライマー対である）。いくつかの例において、ＤＭＲは、オリゴヌクレオチドプライマー対によって増幅されるＤＮＡ領域として定義される（このＤＮＡ領域は、オリゴヌクレオチドプライマーの配列またはそれに相補的な配列を含む）。いくつかの例において、ＤＭＲは、オリゴヌクレオチドプライマー対によって増幅されたＤ

ＮＡ領域として定義される（このＤＮＡ領域は、オリゴヌクレオチドプライマーの配列またはそれに相補的な配列を含まない）。本明細書において用いられるとき、具体的に記載されているＤＭＲは、関連する遺伝子の名前と、それに続く開始位置（３桁）とによって明確に特定されうる。例えば、ＡＬＫの位置２９９２１４３４から開始するＤＭＲは、ＡＬＫ‘４３４と特定されうる。

【００４６】

メチル化可変領域(Differentially methylated region)：本明細書において用いられるとき、用語「メチル化可変領域（ＤＭＲ）」は、区別可能にメチル化されている部位の１つ以上を含むＤＮＡ領域を表す。選択された所定の条件下において（がん状態など）、メチル化部位の数または頻度が多いＤＭＲを、高メチル化ＤＭＲと称してもよい。選択された所定の条件下において（がん状態など）、メチル化部位の数または頻度が少ないＤＭＲを、低メチル化ＤＭＲと称してもよい。大腸がんのメチル化バイオマーカーであるＤＭＲを、大腸がんのＤＭＲと称してもよい。いくつかの例において（例えば、本明細書に記載の例において）、ＤＭＲは、１つのヌクレオチドで合ってもよく、この１つのヌクレオチドはメチル化部位である。

【００４７】

ＤＮＡ領域：本明細書において用いられるとき、「ＤＮＡ領域」は、より大きなＤＮＡ分子の中の任意の連続した部分を表す。当業者は、第１ＤＮＡ領域および第２ＤＮＡ領域が対応するかどうかを決定する技術に精通している。この対応は、例えば、第１ＤＮＡ領域および第２ＤＮＡ領域の配列の類似性（配列の同一性または相同性など）および／またはコンテクスト（第１ＤＮＡ領域および第２ＤＮＡ領域の上流および／または下流にある核酸配列の同一性または相同性など）に基づいて決定する。

【００４８】

本明細書中で特に明記しない限り、ヒトに見られる配列またはヒトに関連する配列（ヒトＤＮＡにハイブリダイズする配列など）は、例示的なヒトゲノム配列として当業者に周知であるHomo sapiens（ヒト）アセンブリＧＲＣｈ３８、ｈｇ３８および／またはGenome Reference Consortium Human Build 38に記載されているか、それに基づくか、および／または、それに由来する。さらに、当業者が理解するであろうところによると、ｈｇ３８のＤＮＡ領域は、特定のヌクレオチドの位置または範囲を同定する公知のシステムによって、割り振られた番号により表現できる。

【００４９】

投薬レジメン：本明細書において用いられるとき、用語「投薬レジメン」は、対象に投与する、１つ以上の同じまたは異なる単位用量の組合せを表しうる。通常、複数の単位用量のそれぞれの投与は、ある期間、互いに分かれている。種々の実施形態において、投薬レジメンの１つ以上または全ての単位投与は、同じであってもよいし、変化してもよい（例えば、経時的に増加させてもよいし、経時的に減少させてもよいし、対象および／または医師の決定に従って調節してもよい）。種々の実施形態において、各用量の間の期間の１つ以上または全ては、同じであってもよいし、変化してもよい（例えば、経時的に延長してもよいし、経時的に短縮してもよいし、対象および／または医師の決定に従って調節してもよい）。いくつかの実施形態において、所与の処置薬には推奨される投薬レジメンがあり、投与レジメンには１つ以上の用量が含まれうる。通常、市販薬の推奨される投与レジメンの１つ以上は、当業者とって周知である。いくつかの実施形態において、関連する集団を通じて投与する場合、投薬レジメンは所望のまたは有益な結果と相関している（すなわち、処置的な投薬レジメンである）。

【００５０】

下流：本明細書において用いられるとき、用語「下流」は、第１ＤＮＡ領域が第２ＤＮＡ領域よりも、第１ＤＮＡ領域および第２ＤＮＡ領域を含む核酸のＣ末端に近いことを意味する。

【００５１】

遺伝子：本明細書において用いられるとき、用語「遺伝子」は、１つのＤＮＡ領域を表

す（染色体中にあるものなど）。このＤＮＡ領域は、産物（ＲＮＡ産物および／またはポリペプチド産物など）をコードするコーディング配列に加えて、当該コーディング配列の発現の調節にその全部または一部が寄与する（あるいは、全体が発現の調節に寄与しない）ＤＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態において、遺伝子は、１つ以上の非コーディング配列を含む。ある特定の実施形態において、遺伝子は、エキソン配列およびイントロン配列を含む。いくつかの実施形態において、遺伝子は、１つ以上の調節要素を含む。この調節要素は、例えば、遺伝子の発現の１つ以上の側面を、制御したり影響を及ぼしたりできる（細胞型に特異的な発現、誘導性の発現など）。いくつかの実施形態において、遺伝子はプロモーターを含む。いくつかの実施形態において、遺伝子は、（ｉ）コーディング配列の上流に所定のヌクレオチド数にわたり位置するＤＮＡヌクレオチドと、（ｉｉ）コーディング配列の下流に所定のヌクレオチド数にわたり位置するＤＮＡヌクレオチドのうち、一方または両方を含む。種々の実施形態において、上述の所定のヌクレオチド数は、５００ｂｐ、１ｋｂ、２ｋｂ、３ｋｂ、４ｋｂ、５ｋｂ、１０ｋｂ、２０ｋｂ、３０ｋｂ、４０ｋｂ、５０ｋｂ、７５ｋｂまたは１００ｋｂでありうる。

【００５２】

相同性：本明細書において用いられるとき、用語「相同性」は、ポリマー分子間における全体的な関連性を表す。例えば、核酸分子（ＤＮＡ分子および／またはＲＮＡ分子など）および／またはポリペプチド分子の間における関連性である。当業者であれば理解するであろうところによると、相同性は、例えば、同一性パーセントまたはパーセント相同性（配列類似性）によって定義できる。いくつかの実施形態において、ポリマー分子が「相同」であると見做されるのは、それらの配列の２５％以上、３０％以上、３５％以上、４０％以上、４５％以上、５０％以上、５５％以上、６０％以上、６５％以上、７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上または９９％以上が同一であるときである。いくつかの実施形態において、ポリマー分子が「相同」であると見做されるのは、それらの配列の２５％以上、３０％以上、３５％以上、４０％以上、４５％以上、５０％以上、５５％以上、６０％以上、６５％以上、７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上または９９％以上が類似しているときである。

【００５３】

ハイブリダイズ：本明細書において用いられるとき、「ハイブリダイズ」とは、第１核酸と第２核酸とが会合して、２本鎖構造を形成することを表す。この会合は、相補的なヌクレオチドの対形成によって生じる。当業者が認識しているところによると、種々の配列の中でも相補的配列ならばハイブリダイズできる。種々の実施形態において、ハイブリダイゼーションは、例えば、７０％以上の相補性を有するヌクレオチド配列の間で生じうる（７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、または１００％の相補性）。さらに、当業者が理解するであろうところによると、第１核酸および第２核酸のハイブリダイゼーションが生じるか否かは、種々の反応条件によって変化しうる。ハイブリダイゼーションが生じうる条件は、本技術分野で周知である。

【００５４】

低メチル化：本明細書において用いられるとき、用語「低メチル化」は、参照状態と比較したときに、所定の状態におけるメチル化ヌクレオチドの数が１つ以上少ないメチル化遺伝子座の状態を表す。例えば、健常なコントロールと比べて、大腸がんの方がメチル化ヌクレオチドの数が１つ以上少ない状態を表す。

【００５５】

高メチル化：本明細書において用いられるとき、用語「高メチル化」は、参照状態と比較したときに、所定の状態におけるメチル化ヌクレオチドの数が１つ以上多いメチル化遺伝子座の状態を表す。例えば、健常なコントロールと比べて、大腸がんの方がメチル化ヌクレオチドの数が１つ以上多い状態を表す。

【００５６】

同一性：本明細書において用いられるとき、用語「同一性」は、ポリマー分子間の全体の関連性を表す。例えば、核酸分子間（ＤＮＡ分子および／またはＲＮＡ分子など）および／またはポリペプチド分子間の関連性を表す。所与の２つの配列間のパーセント同一性の計算方法は、本技術分野で周知である。２つの核酸またはポリペプチド配列のパーセント同一性の計算は、例えば、２つの配列（または、一方もしくは両方の配列の相補的配列）を、最適な比較のために整列させることによって実施してもよい。例えば、最適な整列のために、第１配列および第２配列の一方または両方にギャップを導入してもよい。また、比較のために、非同一配列を無視してもよい。次に、対応する位置のヌクレオチドまたはアミノ酸を比較する。第１配列中のある位置が、第２配列中の対応する位置と同じ残基（ヌクレオチドまたはアミノ酸など）によって占められる場合、分子はその位置において同一である。２つの配列間のパーセント同一性は、配列間において同一である位置の数の関数である。また、任意構成で、２つの配列の整列を最適化するために導入する必要があったギャップの数および長さを考慮に入れる。配列の比較および２つの配列間のパーセント同一性の決定は、コンピュータアルゴリズム（ＢＬＡＳＴ（basic local alignment search tool）など）により実施できる。

【００５７】

改善、増加または減少：本明細書において用いられるとき、これらの用語、または文法的に相当する語は、比較可能な参照測定値と比較した値を表す。例えば、いくつかの実施形態において、所定の薬剤により達成された評価値は、比較可能な参照薬剤（または、無薬剤）から得られた評価値と比較して、改善されることがある。代替的または追加的に、いくつかの実施形態において、所定の対象またはシステムにおける評価値は、異なる条件または時点（例えば、所定の薬剤の投与のような事象の前後に）にある同じ対象またはシステムから得られた評価値と比較して、改善されることがある。あるいは、異なる比較可能な対象から得られた評価値と比較して、改善されることもある（比較可能な対象またはシステムであって、注目する特定の疾患障害または状態の１つ以上の指標において所定の対象またはシステムと異なっている対象またはシステム、ある条件または薬剤に曝露する前の対象またはシステムなど）。いくつかの実施形態において、比較のための用語は、統計に関連する差異を表す。例えば、統計的関連性を有するのに充分な有病率および／または程度の差異を表す。所与のコンテクストにおいて、統計的有意性を有するのに必要または充分な差異の程度および／または有病率は、当業者であれば知っているか、または容易に決定できる。

【００５８】

メチル化：本明細書において用いられるとき、用語「メチル化」には、（ｉ）シトシンのＣ５位のメチル化、（ｉｉ）シトシンのＮ４位のメチル化、および（ｉｉｉ）アデニンのＮ６位のメチル化のいずれをも含む。さらに、メチル化には、（ｉｖ）ヌクレオチドのメチル化の他の類型も含まれる。メチル化されたヌクレオチドを、「メチル化ヌクレオチド」または「メチル化ヌクレオチド塩基」と称することがある。特定の実施形態において、メチル化は、特にシトシン残基のメチル化を表す。いくつかの例において、メチル化は、特にＣｐＧ領域に存在するシトシン残基のメチル化を表す。

【００５９】

メチル化アッセイ：本明細書において用いられるとき、用語「メチル化アッセイ」は、メチル化遺伝子座のメチル化状態の決定に使用できる任意の技術を表す。

【００６０】

メチル化バイオマーカー：本明細書において用いられるとき、用語「メチル化バイオマーカー」は、１つ以上のメチル化遺伝子座および／または１つ以上のメチル化遺伝子座のメチル化状態（高メチル化遺伝子座など）であるか、またはそれを含むバイオマーカーを表す。特に、メチル化バイオマーカーは、第１状態と第２状態との間（がん状態と非がん状態との間など）における、１つ以上の核酸遺伝子座のメチル化状態の変化によって特徴付けられるバイオマーカーである。

【００６１】

メチル化遺伝子座：本明細書において用いられるとき、用語「メチル化遺伝子座」は、メチル化可変領域の１つ以上を含むＤＮＡ領域を表す。選択された所定の条件（がん状態など）において、メチル化部位の数または頻度が大きいメチル化遺伝子座を、高メチル化遺伝子座と称してもよい。選択された所定の条件（がん状態など）において、メチル化部位の数または頻度が少ないメチル化遺伝子座を、低メチル化遺伝子座と称してもよい。

【００６２】

メチル化部位：本明細書において用いられるとき、メチル化部位は、少なくとも１つの条件においてメチル化されているヌクレオチドまたはヌクレオチドの位置を表す。メチル化状態においては、メチル化部位を、メチル化されている部位と称してもよい。

【００６３】

メチル化状態：本明細書において用いられるとき、「メチル化状態」または「メチル化プロファイル」は、メチル化遺伝子座の中にあるメチル化部位におけるメチル化の数、頻度またはパターンを表す。したがって、第１状態と第２状態と間におけるメチル化状態の変化は、メチル化部位の数、頻度またはパターンの増加であってもよいし、またはそれを含んでもよい。あるいは、メチル化状態の変化は、メチル化部位の数、頻度またはパターンの現象であってもよいし、またはそれを含んでもよい。種々の例において、メチル化状態の変化は、メチル化値の変化である。

【００６４】

メチル化値：本明細書において用いられるとき、用語「メチル化値」は、メチル化状態を数値で表現したものを表す。数値での表現とは、例えば、メチル化遺伝子座のメチル化の頻度または割合を表す数の形態である。いくつかの例においては、メチル化依存性制限酵素により試料を消化した後に、当該試料中に存在する未消化の核酸の量を定量する工程を含む方法からメチル化値を得る。いくつかの例においては、試料を重亜硫酸塩で反応させた後の増幅プロファイルを比較する工程を含む方法からメチル化値を得てもよい。いくつかの例においては、重亜硫酸塩処理した核酸と未処理核酸との配列を比較することによってメチル化値を得てもよい。いくつかの例において、メチル化価は、定量的ＰＣＲの結果であるか、それを含むか、またはそれに基づいている。

【００６５】

核酸：本明細書において用いられるとき、用語「核酸」は、オリゴヌクレオチド鎖に組み込まれるか（または、組み込まれうる）任意の化合物および／または物質を、最も広い意味において表す。いくつかの実施形態において、核酸は、ホスホジエステル結合を介してオリゴヌクレオチド鎖に組み込まれる（または、組み込まれうる）化合物および／または物質である。文脈から明らかである通り、いくつかの実施形態において、用語「核酸」は、個別のアミノ酸残基（ヌクレオチドおよび／またはヌクレオシドなど）を表す。いくつかの実施形態において、用語「核酸」は、個別の核酸残基を複数含んでいるポリヌクレオチド鎖を表す。核酸は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、もしくはこれらの組合せであってもよいし、またはそれらを含んでもよい。核酸は、天然の核酸残基、核酸アナログおよび／または合成の残基を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、核酸は、天然のヌクレオチドを含む（アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシンおよびデオキシシチジンなど）。いくつかの実施形態において、核酸は、１つ以上のヌクレオチドアナログであるか、またはそれを含む（２－アミノアデノシン、２－チオチミジン、イノシン、ピロロピリミジン、３－メチルアデノシン、５－メチルシチジン、Ｃ５プロピニル－シチジン、Ｃ５プロピニル－ウリジン、２－アミノアデノシン、Ｃ５－ブロモウリジン、Ｃ５－フルオロウリジン、Ｃ５－ヨードウリジン、Ｃ５－プロピニルウリジン、Ｃ５－プロピニルシチジン、Ｃ５－メチルシチジン、２－アミノアデノシン、７－デアザアデノシン、７－デアザグアノシン、８－オキソアデノシン、８－オキソグアノシン、０（６）－メチルグアニン、２－チオシチジン、メチル化塩基、インターカレーションされた塩基、およびこれらの組合せなど）。

【００６６】

いくつかの実施形態において、核酸は、機能性の遺伝子産物（ＲＮＡまたはタンパク質

など）をコードするヌクレオチド配列を有する。いくつかの実施形態において、核酸は、１つ以上のイントロンを含む。いくつかの実施形態において、核酸は、１つ以上の遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、核酸は、天然のソースからの単離、相補的テンプレートを用いた重合による酵素合成（インビボまたはインビトロ）、組換え細胞または組換え系における再生産、および化学合成のうちの１つ以上によって作製される。

【００６７】

いくつかの実施形態において、核酸アナログは、ホスホジエステル骨格を有していない点において核酸とは異なる。例えば、いくつかの実施形態において、核酸は、１つ以上のペプチド核酸を含んでいてもよい。ペプチド核酸は、本技術分野で周知であり、ホスホジエステル結合ではなくペプチド結合の骨格を有する。代替的または追加的に、いくつかの実施形態において、核酸は、ホスホジエステル結合の代わりに、ホスホロチオアート結合および／または５’－Ｎ－ホスホラミダイト結合の１つ以上を有する。いくつかの実施形態において、核酸は、天然の核酸と比較して、修飾された糖の１つ以上を有する（２’－フルオロリボース、リボース、２’－デオキシリボース、アラビノースおよびヘキソースなど）。

【００６８】

いくつかの実施形態において、核酸は、３個以上、４個以上、５個以上、６個以上、７個以上、８個以上、９個以上、１０個以上、１５個以上、２０個以上、２５個以上、３０個以上、３５個以上、４０個以上、４５個以上、５０個以上、５５個以上、６０個以上、６５個以上、７０個以上、７５個以上、８０個以上、８５個以上、９０個以上、９５個以上、１００個以上、１１０個以上、１２０個以上、１３０個以上、１４０個以上、１５０個以上、１６０個以上、１７０個以上、１８０個以上、１９０個以上、２０個以上、２２５個以上、２５０個以上、２７５個以上、３００個以上、３２５個以上、３５０個以上、３７５個以上、４００個以上、４２５個以上、４５０個以上、４７５個以上、５００個以上、６００個以上、７００個以上、８００個以上、９００個以上、１０００個以上、１５００個以上、２０００個以上、２５００個以上、３０００個以上、３５００個以上、４０００個以上、４５００個以上、５０００個以上、またはそれ以上の残基であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、核酸は、部分的または完全に１本鎖である。あるいは、核酸は、部分的または完全に２本鎖である。

【００６９】

核酸検出アッセイ：本明細書において用いられるとき、用語「核酸検出アッセイ」は、所定の核酸のヌクレオチド組成を決定する任意の方法を表す。核酸検出アッセイの例としては、ＤＮＡシーケンシング方法、ポリメラーゼ連鎖反応に基づく方法、プローブハイブリダイゼーションによる方法、リガーゼ連鎖反応が挙げられる（ただし、これらには限定されない）。

【００７０】

ヌクレオチド：本明細書において用いられるとき、用語「ヌクレオチド」は、ポリヌクレオチド（ＤＮＡポリマーおよび／またはＲＮＡポリマーなど）の構造成分またはビルディングブロックを表す。ヌクレオチドは塩基（アデニン、チミン、ウラシル、グアニンまたはシトシンなど）と、糖および１つ以上のリン酸基を有する分子を含む。本明細書において用いられるとき、ヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドであってもよいし、非メチル化ヌクレオチドであってもよい。当業者であれば理解するであろうところによると、核酸に関連の用語（遺伝子座またはヌクレオチドなど）は、１つの核酸分子の遺伝子座またはヌクレオチドを表しうる。あるいは、これらの用語は、複数の核酸（試料中に含まれる複数の核酸および／または対象を代表する複数の核酸）に含まれる遺伝子座またはヌクレオチドの集合をも表しうる。この遺伝子座またはヌクレオチドの集合は、代表的な遺伝子座またはヌクレオチドである（同一の核酸配列および／または核酸配列文脈を有している、実質的に同一の核酸配列および／または核酸配列文脈を有している、など）。

【００７１】

オリゴヌクレオチドプライマー：本明細書において用いられるとき、用語オリゴヌクレ

オチドプライマーまたはプライマーは、テンプレート核酸分子からアンプリコンを生成させるのに使用する（または、使用できる、使用するための）核酸分子を表す。転写が可能な条件（例えば、ヌクレオチドおよびＤＮＡポリメラーゼが存在し、かつ温度およびｐＨが適切である条件）において、オリゴヌクレオチドプライマーは、テンプレートからの転写開始点を提供できる（転写開始点において、オリゴヌクレオチドプライマーはハイブリダイズする）。通常、オリゴヌクレオチドプライマーは、５～２００ヌクレオチド長の１本鎖核酸である。当業者であれば理解するであろうところによると、テンプレート核酸分子からアンプリコンを産生させるのに最適なプライマーの長さは、条件によって変化しうる（温度パラメータ、プライマー組成、および転写または増幅の方法など）。本明細書において用いられるとき、オリゴヌクレオチドプライマー対は、テンプレートである２本鎖核酸分子の第１鎖および第２鎖に対してそれぞれ相補的である、２つのオリゴヌクレオチドプライマーの組合せを表す。オリゴヌクレオチドプライマー対の第１構成要素および第２構成要素のことを、テンプレート核酸鎖に対して、それぞれ、フォワードオリゴヌクレオチドプライマーおよびリバースオリゴヌクレオチドプライマーと称してもよい。フォワードオリゴヌクレオチドプライマーは、テンプレート核酸鎖に相補的な核酸鎖とハイブリダイズできる。リバースオリゴヌクレオチドプライマーは、テンプレート核酸鎖とハイブリダイズできる。テンプレート核酸鎖におけるフォワードオリゴヌクレオチドプライマーの位置は、テンプレート核酸鎖におけるリバースオリゴヌクレオチドプライマー配列の位置の、５’側である。当業者であれば理解するであろうところによると、フォワードオリゴヌクレオチドプライマーおよびリバースオリゴヌクレオチドプライマーとしての第１オリゴヌクレオチドプライマーおよび第２オリゴヌクレオチドプライマーの同定は、任意である（ただし、これらの識別子が、所与の核酸鎖またはその相補鎖がテンプレート核酸分子として利用されるかどうかに依存する限りにおいて）。

【００７２】

医薬組成物：本明細書において用いられるとき、用語「医薬組成物」は、有効成分および１種類以上の薬学的に許容可能な担体が一緒に製剤化されている組成物を表す。いくつかの実施形態において、有効成分は、対象に対する投与に適当な単位用量分だけ存在している。この単位用量は、例えば、関連する集団に投与したときに、所定の処置効果を統計的に有意な確率で得られる処置レジメンにおける単位用量である。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、投与のために特定の形態（固体形態または液体形態など）で製剤化されていてもよい。あるいは、例えば次のものに具体的に適合されていてもよい：経口投与（飲薬（水溶液、非水溶液または懸濁液）、錠剤、カプセル、大型丸剤、粉末、顆粒、ペーストなど）。これらは、頬側吸収、舌下吸収または全身性吸収などのために具体的に製剤化されていてもよい；非経口投与（無菌溶液、懸濁液または持続放出製剤などの、皮下注射、筋肉内注射、静脈内注射または硬膜外注射など）；局所適用（皮膚、肺または口腔などに適用される、クリーム、軟膏、パッチ剤または噴霧剤など）；膣内投与または直腸内投与（ペッサリー、坐剤、クリームまたは泡など）；眼内投与；鼻内投与または肺投与。

【００７３】

薬学的に許容可能：本明細書において用いられるとき、用語「薬学的に許容可能」は、本明細書に記載の組成物の製剤化に用いる一部または全部の成分について言及される場合には、各成分が組成物の他の成分と適合しており、受容者にとって有害でないことを意味する。

【００７４】

薬学的に許容可能な担体：本明細書において用いられるとき、用語「薬学的に許容可能な担体」は、薬学的に許容可能物質、組成物またはビヒクルを表す（液体または固体の充填剤、稀釈剤、賦形剤または溶媒封入剤など）。薬学的に許容可能な担体は、物質（薬剤など）の製剤化を容易にし、および／または、バイオアベイラビリティを変化させる。薬学的に許容可能な担体として機能しうる材料の例としては、糖（ラクトース、グルコースおよびスクロースなど）；デンプン（トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプンな

ど）；セルロースおよびその誘導体（カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロースなど）；トラガカント粉末；麦芽；ゼラチン；タルク；賦形剤（カカオ脂および坐剤ワックスなど）；油（落花生油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油および大豆油など）；グリコール（プロピレングリコールなど）；ポリオール（グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコールなど）；エステル（オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなど）；寒天；緩衝剤（水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなど）；アルギン酸；発熱物質を含まない水；等張な生理食塩水；リンゲル液；エチルアルコール；ｐＨ緩衝液；ポリエステル、ポリカーボネートおよび／またはポリ無水物；医薬製剤に使用される他の非毒性適合物質が挙げられる。

【００７５】

予防(Prevent or prevention)：疾患、障害または状態の発生に関連して本明細書において用いられるとき、用語「予防」は、疾患、障害または状態が発展するリスクを減少させること；疾患、障害または状態の発症を遅らせること；疾患、障害または状態の特徴または症状の１つ以上の発症を遅らせること；および／または、疾患、障害または状態の特徴または症状の１つ以上の頻度および／または重篤度を減少させることを表す。予防は、特定の対象における予防を表してもよいし、対象集団に対する統計的影響を表してもよい。疾患、障害または状態の発症が所定の期間遅れている場合には、予防が完了したと見做してもよい。

【００７６】

プローブ：本明細書において用いられるとき、用語「プローブ」は、１本鎖または２本鎖の核酸分子であって、相補的な標的とハイブリダイズでき、検出可能な部分を含んでいるものを表す。特定の実施形態において、プローブは、制限酵素の消化産物であるか、または合成された核酸である（組換えまたは増幅により生成する核酸など）。いくつかの例において、プローブは、捕捉プローブである。捕捉プローブは、標的配列（遺伝子配列など）の検出、同定および／または単離に有用である。種々の例において、プローブの検出可能な部分は、酵素（ＥＬＩＳＡおよび酵素に基づく組織化学アッセイなど）、蛍光部分、放射性部分、または発光シグナルに関連する部分などであってもよい。

【００７７】

予後：本明細書において用いられるとき、用語「予後」は、将来の可能な結果または事象の１つ以上の定性的な定量的確率を決定することを表す。本明細書において用いられるとき、予後は、対象における疾患、障害もしくは状態（がんなど）のありそうな経過の決定、対象の平均余命に関する決定、または、処置（特定の処置など）への反応に関する決定であってもよい。

【００７８】

予後情報：本明細書において用いられるとき、用語「予後情報」は、予後の提供に有用な情報を表す。予後情報の例としては、バイオマーカーの状態情報が挙げられる（ただし、これには限定されない）。

【００７９】

プロモーター：本明細書において用いられるとき、「プロモーター」は、直接または間接に（例えば、プロモーター結合タンパク質またはプロモーター結合物質を介して）ＲＮＡポリメラーゼと会合する、ＤＮＡ調節領域を表してもよい。プロモーターは、コーディング配列の転写開始に関与する。

【００８０】

参照：本明細書において用いられるとき、比較が行われる標準またはコントロールを表す。例えば、いくつかの実施形態においては、薬剤、対象、動物、個体、集団、試料、配列または所定の値を、参照またはコントロールの薬剤、対象、動物、個体、集団、試料、配列、または値と比較する。いくつかの実施形態においては、所定の試料における特徴の試験または決定と実質的に同時に、参照またはその特徴を試験および／または決定する。いくつかの実施形態において、参照は組織学的な参照である（任意構成で、有形なメディ

アにおいて実装されてもよい）。当業者であれば理解するであろうところによると、通常は、評価対象（試料など）と比較可能な条件または環境において、参照を決定または特徴付けられる。当業者であれば理解するであろうところによると、充分な類似性が存在する場合に、特定の可能な参照またはコントロールに対する信頼および／または比較が正当化される。

【００８１】

リスク：疾患、障害または状態に関連して本明細書において用いられるとき、用語「リスク」は、特定の個体が疾患、障害または状態を発展させる定性的な定量的確率を表す（百分率で表すこともあるし、そうではないこともある）。いくつかの実施形態においては、リスクを百分率で表す。いくつかの実施形態において、リスクは、定性的な定量的確率であり、０％以上、１％以上、２％以上、３％以上、４％以上、５％以上、６％以上、７％以上、８％以上、９％以上、１０％以上、２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、または１００％以上である。いくつかの実施形態においては、参照リスクまたは参照レベルと比較した（または、参照に起因する同じ結果のリスクと比較した）、リスクの定性的な定量的レベルとしてリスクを表現する。いくつかの実施形態において、参照試料と比較した相対リスクの増減は、１．１倍以上、１．２倍以上、１．３倍以上、１．４倍以上、１．５倍以上、１．６倍以上、１．７倍以上、１．８倍以上、１．９倍以上、２倍以上、３倍以上、４倍以上、５倍以上、６倍以上、７倍以上、８倍以上、９倍以上、１０倍以上、またはそれ以上である。

【００８２】

試料：本明細書において用いられるとき、用語「試料」は、通常、所定のソースから得られる（または、それに由来する）分取した物質を表す。いくつかの実施形態において、所定のソースは、生物的ソースまたは環境的ソースである。いくつかの実施形態において、試料は、所定のソースから直接に得られる「未処理の試料」である。いくつかの実施形態において、文脈上明らかであるとき、用語「試料」は、未処理の試料を加工して得られる調製物を表す。加工の例としては、未処理の試料の１つ以上の成分の除去および／または未処理の試料への１つ以上の薬剤の添加が挙げられる。このような「処理された試料」の例としては、細胞、核酸またはタンパク質が挙げられる。これらは、試料から抽出されたり、未処理の試料に何らかの技術（核酸の増幅または逆転写、特定成分の単離および／または精製など）を施したりして得られる。

【００８３】

特定の例において、処理された試料は、増幅されたＤＮＡ試料であってもよい（事前増幅したＤＮＡ試料など）。したがって、種々の例において、同定された試料は、未処理の試料であってもよいし、処理された試料であってもよい。いくつかの例において、酵素で消化されたＤＮＡの試料は、酵素消化されたＤＮＡそのもの（酵素による消化後すぐの産物）を表してもよい。あるいは、酵素で消化されたＤＮＡの試料は、さらに処理された試料を表してもよい。さらに処理された試料の例としては、増幅工程を経た酵素消化されたＤＮＡ（例えば、事前増幅などの増幅工程の中間体）、および／または、フィルタ工程、精製工程、もしくは試料を加工して追加工程を容易にする工程が挙げられる。追加工程の例としては、メチル化状態の決定工程が挙げられる（未処理のＤＮＡ試料および／または元々のソースの中に存在するＤＮＡのメチル化状態の決定工程など）。

【００８４】

スクリーニング：本明細書において用いられるとき、用語「スクリーニング」は、診断情報および／または予後情報を生み出すことが意図される任意の方法、技術、工程または仕事を表す。したがって、当業者であれば理解するであろうところによると、用語「スクリーニング」には、個体が疾患、障害または状態（大腸がんなど）を有しているかどうか、有している（または発展させる）可能性があるかどうか、または有している（または発展させる）リスクがあるかどうかを決定する、方法、技術、工程または仕事が含まれる。

【００８５】

特異度：本明細書において用いられるとき、バイオマーカーの「特異度」は、所定の事

象または状態が存在しないことにより特徴付けられる試料に対する、所定の事象または状態が存在しないことを正しく示したバイオマーカーの測定の割合を表す（真の陰性率）。種々の実施形態において、陰性である試料の特徴付けは、バイオマーカーとは独立している。この特徴付けは、関連する測定によって実施できる（当業者に周知の関連する測定など）。したがって、特異度は、所定の事象または状態によって特徴付けられていない試料を測定したときに、バイオマーカーが所定の事象または状態の存在を検出しない確率を反映している。とりわけ、所定の事象または状態が大腸がんである特定の実施形態において、特異度は、大腸がんではない対象において、バイオマーカーが大腸がんの存在を検出しない確率を表す。大腸がんでないことは、例えば、組織学的検査によって決定できる。

【００８６】

感度：本明細書において用いられるとき、バイオマーカーの「感度」は、所定の事象または状態が存在することにより特徴付けられる試料に対する、所定の事象または状態が存在することを正しく示したバイオマーカーの測定の割合を表す（真の陽性率）。種々の実施形態において、陽性である試料の特徴付けは、バイオマーカーとは独立している。この特徴付けは関連する測定によって実施できる（当業者に周知の関連する測定など）。したがって、感度は、所定の事象または状態によって特徴付けられている試料を測定したときに、バイオマーカーが所定の事象または状態の存在を検出する確率を反映している。とりわけ、所定の事象または状態が大腸がんである特定の実施形態において、感度は、大腸がんである対象において、バイオマーカーが大腸がんの存在を検出する確率を表す。大腸がんであることは、例えば、組織学的検査によって決定できる。

【００８７】

固形腫瘍：本明細書において用いられるとき、用語「固形腫瘍」は、組織の異常な塊であって、がん細胞を含むものを表す。種々の実施形態において、固形腫瘍は、嚢胞または液体面積を含まない組織の異常な塊であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、固形腫瘍は、良性であってもよい。いくつかの実施形態において、固形腫瘍は、悪性であってもよい。固形腫瘍の例としては、癌腫、リンパ腫および肉腫が挙げられる。いくつかの実施形態において、固形腫瘍は、副腎、胆管、膀胱、骨、脳、乳房、子宮頸部、結腸、子宮内膜、食道、眼球、胆嚢、消化管、腎臓、喉頭、肝臓、肺、鼻腔、咽頭鼻部、口腔、卵巣、陰茎、下垂体、前立腺、網膜、唾液腺、皮膚、小腸、胃、精巣、胸腺、甲状腺、子宮、膣および／または外陰部の腫瘍であってもよいし、それらを含んでもよい。

【００８８】

がんのステージ：本明細書において用いられるとき、用語「がんのステージ」は、がんの進行レベルの定性的評価または定量的評価を表す。いくつかの実施形態において、がんのステージの決定に使用する基準には、次のうちの１つ以上が含まれる（ただし、これらには限定されない）：がんが体内のどこに位置するか、腫瘍の大きさ、がんがリンパ節に転移しているか否か、がんが体内の１つ以上の異なった部分に転移しているか否か。いくつかの実施形態においては、がんのステージをいわゆるＴＮＭシステムによって分類してもよい。ＴＮＭシステムでは、Ｔは、主要な腫瘍（原発腫瘍と称することが多い）の大きさおよび程度を表す。Ｎは、近傍のリンパ節であってがんを有するものの数を表す。Ｍは、がんが転移しているか否かを表す。いくつかの実施形態においては、ステージ０（異常細胞が存在するが近傍の組織に転移していない（上皮内がんまたはＣＩＳとも称される）。ＣＩＳはがんではないが、がんになる場合がある）、ステージＩ～ＩＩＩ（がんが存在する。数が大きいほど、腫瘍が大きくなり、近傍の組織に転移している）、またはステージＩＶ（身体の遠隔部位にまでがんが転移している）とがんを称してもよい。いくつかの実施形態においては、以下からなる群から選択されるステージにがんを割り当ててもよい：インサイチュ（異常な細胞が存在するが、近傍組織には転移していない）；限局性（がんが発生した場所に限定され、転移している徴候はない）；局所性（がんが近傍のリンパ節、組織または臓器に転移している）：遠隔（遠隔部位にまでがんが転移している）；不明（がんのステージを同定するのに充分な情報がない）。

【００８９】

感受性：疾患、障害または状態に「感受性がある」個体は、疾患、障害または状態を発展させるリスクがある。いくつかの実施形態において、疾患、障害または状態に感受性がある個体は、疾患、障害または状態のいかなる症状をも示さない。いくつかの実施形態において、疾患、障害または状態に感受性がある個体は、疾患、障害および／または状態とは診断されていない。いくつかの実施形態において、疾患、障害または状態に感受性がある個体は、疾患、障害または状態の発展に関連する条件に曝露された個体である。あるいは、疾患、障害または状態に感受性がある個体は、当該疾患、障害または状態に関連するバイオマーカーの状態（メチル化状態など）を示している個体である。いくつかの実施形態において、疾患、障害および／または状態を発展させるリスクは、集団に基づくリスクである（疾患、障害または状態に罹患している個体の家族など）。

【００９０】

対象：本明細書において用いられるとき、「対象」という語は生物を表し、通常は哺乳動物（ヒトなど）を表す。いくつかの実施形態において、対象は、疾患、障害または状態を罹患している。いくつかの実施形態において、対象は疾患、障害または状態に対する感受性がある。いくつかの実施形態において、対象は、疾患、障害または状態の症状または特徴の１つ以上を示している。いくつかの実施形態において、対象は、疾患、障害または状態に罹患していない。いくつかの実施形態において、対象は疾患、障害または状態のいかなる症状または特徴をも示していない。いくつかの実施形態において、対象は、疾患、障害または状態に対する感受性またはリスクに特徴的な１つ以上の特徴を有するヒトである。いくつかの実施形態において、対象は、患者である。いくつかの実施形態において、対象は、診断を受けた個体および／または処置を施された個体である。いくつかの例においては、ヒト対象のことを、互換的に「個体」と称することがある。

【００９１】

処置薬：本明細書において用いられるとき、用語「処置薬」は、対象に投与したときに所望の薬理効果を誘導する任意の薬剤を表す。いくつかの実施形態において、ある薬剤が適切な集団を通じて統計的に有意な影響を示すならば、当該薬剤は処置薬であると見做される。いくつかの実施形態において、適切な集団は、モデル生物の集団またはヒト集団でありうる。いくつかの実施形態において、適切な集団は、種々の基準によって定義されうる（特定の年齢群、性別、遺伝的背景、既存の臨床症状など）。いくつかの実施形態において、処置薬は、疾患、障害または状態の処置に使用できる物質である。いくつかの実施形態において、処置薬は、政府機関によって承認されている薬剤であるか、ヒトに投与するために市販できるようになる前に政府機関の承認が必要とされる薬剤である。いくつかの実施形態において、処置薬は、ヒトへの投与に際して処方箋が必要となる薬剤である。

【００９２】

処置上有効な量：本明細書において用いられるとき、用語「処置上有効な量」は、投与することにより所望の効果を生じる量を表す。いくつかの例において、この用語は、疾患、障害または状態に罹患している集団（または、感受性がある集団）に対して処置投薬レジメンに従って投与して、当該疾患、障害または状態を処置するのに充分な量を表す。当業者であれば理解するであろうところによると、用語「処置上有効な量」は、特定の個体において実際に処置が成功することを必要としていない。そうではなく、処置上有効な量は、処置を必要とする個体に投与したときに、有意な数の対象に対して特定の所望の薬理反応を与える量でありうる。いくつかの実施形態において、処置上有効な量に対する言及は、１つ以上の特定の組織（疾患、障害または状態の影響を受ける組織など）または体液（血液、唾液、血清、汗、涙、尿など）において測定される量を表してもよい。当業者であれば理解するであろうところによると、いくつかの実施形態においては、特定の薬剤の処置上有効な量を、１回分の用量で製剤化および／または投与してもよい。いくつかの実施形態においては、処置に有効な薬剤を、複数回分の用量で製剤化および／または投与してもよい（例えば、複数回投与レジメンの一部として）。

【００９３】

処置(Treatment)：本明細書において用いられるとき、用語「処置(treatment, treat,

treating)」は、特定の疾患、障害または状態の症状、特徴および／または原因の１つ以上を、部分的または完全に緩和させ、改善させ、軽減させ、抑制させ、発症を遅延させ、重篤度を低下させ、および／または、発症率を低下させる療法の適用を表す。あるいは、上述の任意の結果を達成する目的のための療法の適用を表す。いくつかの実施形態において、処置は、関連する疾患、障害または状態の徴候を示していない対象の処置、および／または、疾患、障害または状態の初期徴候のみを示している対象の処置であってもよい。代替的または追加的に、処置は、関連する疾患、障害および／または状態の１つ以上の確立された徴候を示している対象の処置であってもよい。いくつかの実施形態において、処置は、関連する疾患、障害および／または状態に罹患していると診断された対象の処置であってもよい。いくつかの例において、処置は、関連する疾患、障害または状態の発展リスクの増加と統計的に相関している１つ以上の感受性因子を有することが判明している対象の処置であってもよい。種々の実施形態において、処置は、がんの処置である。

【００９４】

上流：本明細書において用いられるとき、用語「上流」は、第１ＤＮＡ領域が第２ＤＮＡ領域よりも、第１ＤＮＡ領域および第２ＤＮＡ領域を含む核酸のＮ末端に近いことを意味する。

【００９５】

単位用量：本明細書において用いられるとき、用語「単位用量」は、１回分の用量として投与される医薬組成物の量、および／または、物理的に別々の単位で投与される医薬組成物の量を表す。多くの実施形態において、単位投与量は、所定量の有効成分を含む。いくつかの実施形態において、単位投与量は、薬剤の１回分の投与量の全体を含む。いくつかの実施形態においては、２つ以上の単位用量を投与して、１回分の投与量の全体とする。いくつかの実施形態において、意図する効果を奏するためには、複数の単位用量が必要とされる（または、必要とされることが予想される）。単位用量は、例えば、１つ以上の処置部分の所定量を含むある体積の液体（許容可能な担体など）、固体形態である１つ以上の処置部分の所定量、１つ以上の処置部分の所定量を含む持続的放出製剤または薬物送達デバイスであってもよい。理解されるであろうことには、単位用量は、処置薬に加えて任意の種々の成分を含む製剤中に存在してもよい。例えば、許容可能な担体（薬学的に許容可能な担体など）、稀釈剤、安定剤、緩衝剤、防腐剤を含んでもよい。当業者が理解するであろうところによると、多くの実施形態において、特定の処置薬の１日あたりの適切な合計投与量は、単位用量の一部分であってもよいし、複数の単位用量であってもよい。例えば、通常の医学的判断の範囲内において、適切な合計投与量を医師が決定してもよい。いくつかの実施形態において、任意の特定の対象または生物に対する特定の有効投与量レベルは、種々の因子によって変化することがある。このような因子の例としては、処置する障害およびその重篤度；採用する特定の有効成分の活性；採用する特定の組成；対象の年齢、体重、全般的な健康状態、性別および食事；採用する特定の有効成分の投与時間および排出速度；処置の期間；採用する特定の化合物と組合せる（または、同時に使用する）薬物および／または追加の処置；医学分野で公知の類位した因子が挙げられる。

【００９６】

メチル化されていない：本明細書において用いられるとき、用語「メチル化されていない」および「非メチル化」は、互換可能に使用される。この用語は、同定されたＤＮＡ領域がメチル化されたヌクレオチドを含んでいないことを意味する。

【００９７】

変異体：本明細書において用いられるとき、用語「変異体」は、参照となる実体と顕著な構造同一性を示すが、参照となる実体と比較したときに、１つ以上の化学部分の存在、不存在またはレベルにおいて構造的に異なる実体を表す。いくつかの実施形態において、変異体は、参照となる実体とは機能的にも異なる。一般的に、特定の実体が参照となる実体の「変異体」であると見做すことが適切であるかどうかは、参照となる実体との構造同一性の程度が基準となる。変異体は、参照と比較可能であるが、同一ではない分子でありうる。例えば、変異体核酸と参照核酸との違いは、ヌクレオチド配列における１つ以上の

違いでありうる。いくつかの実施形態において、変異体核酸の参照核酸に対する全体的な配列同一性は、８５％以上、８６％以上、８７％以上、８８％以上、８９％以上、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上または９９％以上である。多くの実施形態において、所定の核酸の配列が参照の配列と同一であるが、特定の位置において少数の配列変化がある場合に、当該所定の核酸を参照核酸の「変異体」と見做す。いくつかの実施形態において、参照と比較したときの変異体の置換残基の数は、１０個、９個、８個、７個、６個、５個、４個、３個、２個または１個である。いくつかの実施形態において、参照と比較したときの変異体に付加、置換または欠失している残基は、５個、４個、３個、２個または１個未満である。種々の実施形態において、付加、置換または欠失の数は、約２５残基未満、約２０残基未満、約１９残基未満、約１８残基未満、約１７残基未満、約１６残基未満、約１５残基未満、約１４残基未満、約１３残基未満、約１０残基未満、約９残基未満、約８残基未満、約７残基未満、約６未満である（通常は、約５残基未満、約４残基未満、約３残基未満または約２残基未満である）。

【００９８】

〔図面の簡単な説明〕

図１は、例示的なＭＳＲＥ－ｑＰＣＲアプローチを示す模式図である。

【００９９】

図２は、第１対象群（７０人のヒト対象）の特徴を示す表である。図２には、対象における女性の割合、男性の割合、年齢範囲およびＢＭＩを示す。さらに、図２では、第１対象群において同定された大腸がんの種類を区別している。具体的には、組織学的な評価に基づいて限局性または進行性を区別し、結腸内視鏡検査の評価に基づいて近位または遠位を区別する。

【０１００】

図３は、第２対象群（６３人のヒト対象）の特徴を示す表である。図３には、対象における女性の割合、男性の割合、年齢範囲、ＢＭＩを示す。さらに、図３では、第２対象群において同定された大腸がんの種類を区別している。具体的には、組織学的な評価に基づいて限局性または進行性を区別し、結腸内視鏡検査の評価に基づいて近位または遠位を区別する。

【０１０１】

図４は、パネルＡおよびＢを含む。図４のパネルＡは、ＤＭＲの代表的な原理証明パネルを用いた、第２対象群に対する大腸がんのスクリーニングの性能を示すグラフである。第２対象群の全対象のＲＯＣ曲線およびＡＵＣを示す。図４のパネルＢは、確度の値を示すグラフである。左から右に、大腸がんの大腸スクリーニング全体の感度、限局性大腸がんの大腸スクリーニングの感度、進行性大腸がんの大腸スクリーニングの感度、近位大腸がんの大腸スクリーニングの感度、遠位大腸がんの大腸スクリーニングの感度、コントロール（健常者および非進行性腺腫の対象）の大腸スクリーニングの特異度である。

【０１０２】

図５は、ＡＬＫ‘４３４のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。対象は、大腸がんを有する対象およびコントロール対象（健常な対象および非進行性腺腫を有する対象）である。試験に用いた第２対象群（６３対象）のデータを示す。４５からＣｔ値を減算して表示している（４５－ｄＣｔ）。４５－ｄＣｔ値が高いほどメチル化状態が高く、大腸がんを有する対象における高メチル化を示している。

【０１０３】

図６は、ＦＧＦ１４‘５７７　ＤＭＲのＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。対象は、大腸がんを有する対象およびコントロール対象（健常な対象および非進行性腺腫を有する対象）である。試験に用いた第２対象群（６３対象）のデータを示す。４５からＣｔ値を減算して表示している（４５－ｄＣｔ）。４５－ｄＣｔ値が高いほどメチル化状態が高く、大腸がんを有する対象における高メチル化を示している。

【０１０４】

図７は、ＰＤＧＦＤ‘３８８のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。対象は、大腸がんを有する対象およびコントロール対象（健常な対象および非進行性腺腫を有する対象）である。試験に用いた第２対象群（６３対象）のデータを示す。４５からＣｔ値を減算して表示している（４５－ｄＣｔ）。４５－ｄＣｔ値が高いほどメチル化状態が高く、大腸がんを有する対象における高メチル化を示している。

【０１０５】

図８は、ＪＡＭ２‘３２０のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。対象は、大腸がんを有する対象およびコントロール対象（健常な対象および非進行性腺腫を有する対象）である。試験に用いた第２対象群（６３対象）のデータを示す。４５からＣｔ値を減算して表示している（４５－ｄＣｔ）。４５－ｄＣｔ値が高いほどメチル化状態が高く、大腸がんを有する対象における高メチル化を示している。

【０１０６】

図９は、ＬＯＮＲＦ２‘２８１のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。対象は、大腸がんを有する対象およびコントロール対象（健常な対象および非進行性腺腫を有する対象）である。試験に用いた第２対象群（６３対象）のデータを示す。４５からＣｔ値を減算して表示している（４５－ｄＣｔ）。４５－ｄＣｔ値が高いほどメチル化状態が高く、大腸がんを有する対象における高メチル化を示している。

【０１０７】

図１０は、第３対象群（８２人のヒト対象）の特徴を示す表である。図１０には、対象における女性の割合、男性の割合、年齢範囲およびＢＭＩを示す。本開示の２８個の大腸がんのＤＭＲを用いたスクリーニングにより、これらの対象を診断した。さらに、図１０では、第３対象群において同定された大腸がんの種類を区別している。具体的には、組織学的な評価に基づいて限局性または進行性を区別し、結腸内視鏡検査の評価に基づいて近位または遠位を区別する。

【０１０８】

図１１は、２８個のＤＭＲパネルを用いた、第３対象群に対する大腸がんのスクリーニングの性能を示すグラフである。第３対象群の全対象のＲＯＣ曲線およびＡＵＣを示す。ＲＯＣ曲線解析の結果、２８個のＤＭＲパネルでは、一般的な大腸がんの感度は７９％であり、限局性がん（ステージの早いがん）の感度は７５％であり、進行性がんの感度は８４％であった。特異度は８７％と非常に安定しており、ＡＵＣは８２％であった（表１５も参照）。

【０１０９】

図１２は、ＺＮＦ４７１‘５２７のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。対象は、大腸がんを有する対象およびコントロール対象（健常な対象および非進行性腺腫を有する対象）である。試験に用いた第３対象群（８２対象）のデータを示す。４５からＣｔ値を減算して表示している（４５－ｄＣｔ）。４５－ｄＣｔ値が高いほどメチル化状態が高く、大腸がんを有する対象における高メチル化を示している。

【０１１０】

図１３は、ＦＧＦ１４‘５７７のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。対象は、大腸がんを有する対象およびコントロール対象（健常な対象および非進行性腺腫を有する対象）である。試験に用いた第３対象群（８２対象）のデータを示す。４５からＣｔ値を減算して表示している（４５－ｄＣｔ）。４５－ｄＣｔ値が高いほどメチル化状態が高く、大腸がんを有する対象における高メチル化を示している。

【０１１１】

図１４は、ＰＤＧＦＤ‘３８８のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。対象は、大腸がんを有する対象およびコントロール対象（健常な対象および非進行性腺腫を有する対象）である。試験に用いた第３対象群（８２対象）のデータを示す。４５からＣｔ値を減算して表示している（４５－ｄＣｔ）。４５－ｄＣｔ値が高いほどメチル化状態が高く、大腸がんを有する対象における高メチル化を示している。

【０１１２】

図１５は、ＡＤＡＭＴＳ２‘２５４のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。対象は、大腸がんを有する対象およびコントロール対象（健常な対象および非進行性腺腫を有する対象）である。試験に用いた第３対象群（８２対象）のデータを示す。４５からＣｔ値を減算して表示している（４５－ｄＣｔ）。４５－ｄＣｔ値が高いほどメチル化状態が高く、大腸がんを有する対象における高メチル化を示している。

【０１１３】

図１６は、ＺＮＦ４７１‘５５８（本明細書では、このＤＭＲをＺＮＦ４７１＿２と称する）のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。対象は、大腸がんを有する対象およびコントロール対象（健常な対象および非進行性腺腫を有する対象）である。試験に用いた第３対象群（８２対象）のデータを示す。４５からＣｔ値を減算して表示している（４５－ｄＣｔ）。４５－ｄＣｔ値が高いほどメチル化状態が高く、大腸がんを有する対象における高メチル化を示している。

【０１１４】

図１７は、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５‘４５６のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。対象は、大腸がんを有する対象およびコントロール対象（健常な対象および非進行性腺腫を有する対象）である。試験に用いた第３対象群（８２対象）のデータを示す。４５からＣｔ値を減算して表示している（４５－ｄＣｔ）。４５－ｄＣｔ値が高いほどメチル化状態が高く、大腸がんを有する対象における高メチル化を示している。

【０１１５】

図１８は、ＺＮＦ５４２‘５２５のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。対象は、大腸がんを有する対象およびコントロール対象（健常な対象および非進行性腺腫を有する対象）である。試験に用いた第３対象群（８２対象）のデータを示す。４５からＣｔ値を減算して表示している（４５－ｄＣｔ）。４５－ｄＣｔ値が高いほどメチル化状態が高く、大腸がんを有する対象における高メチル化を示している。

【０１１６】

図１９は、ＬＯＮＲＦ２‘２８１のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。対象は、大腸がんを有する対象およびコントロール対象（健常な対象および非進行性腺腫を有する対象）である。試験に用いた第３対象群（８２対象）のデータを示す。４５からＣｔ値を減算して表示している（４５－ｄＣｔ）。４５－ｄＣｔ値が高いほどメチル化状態が高く、大腸がんを有する対象における高メチル化を示している。

【０１１７】

図２０は、正常細胞のメチル化状態とがん細胞のメチル化状態との間における、例示的なメチル化の変化を示す模式図である。さらに、図２０は、正常細胞とがん細胞の遺伝子発現の差異に対して、メチル化状態の変化がどのように影響を及ぼしうるかを示している。

【０１１８】

〔詳細な説明〕

〔大腸がんのスクリーニング〕

改良された大腸がんのスクリーニング方法が必要とされている。この方法には、ステージの早い大腸がんを診断するスクリーニングも含まれている。例えば５０歳以上の個々人のスクリーニングが推奨されているにもかかわらず、大腸がんのスクリーニングプログラムは、往々にして効果が低いか、または満足の行くものではない。大腸がんのスクリーニングを改良することにより、診断を改良し、大腸がんの死亡率を低下させる。

【０１１９】

ＤＮＡのメチル化（高メチル化、低メチル化など）により、遺伝子は活性化または不活性化されうる。この遺伝子には、がんの発症に影響を及ぼす遺伝子も含まれている（例えば図２０を参照）。したがって、例えば、高メチル化により、通常はがんを抑制している１つ以上遺伝子が不活性化されることがある。これにより、試料または対象においてがんが発生したり、がんの発生が誘導されたりされる。

【０１２０】

本開示には、次の発見が包含されている。すなわち、本明細書に記載の１つ以上のメチ

ル化遺伝子座のメチル化状態、本明細書に記載の１つ以上のＤＭＲのメチル化状態、および／または、本明細書に記載の１つ以上のメチル化部位のメチル化状態を決定することにより、大腸がんをスクリーニングできるという発見である。例えば、このスクリーニングは高感度および／または高特異度である。本開示は、大腸がんのメチル化バイオマーカーを含んでいる組成物およびこれに関連する方法を提供する。このバイオマーカーは、それ自身として（または２つ以上大腸がんのメチル化バイオマーカーを含む種々のパネルにおいて）、大腸がんをスクリーニングできる。例えば、このスクリーニングは高特異度および／または高感度である。

【０１２１】

種々の実施形態において、本開示の大腸がんのメチル化バイオマーカーは、メチル化遺伝子座から選択される。このメチル化遺伝子座は、ＡＬＫ、ＬＯＮＲＦ２、ＡＤＡＭＴＳ２、ＦＧＦ１４、ＤＭＲＴ１、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５、ＭＣＩＤＡＳ、ＰＤＧＦＤ、ＧＳＧ１Ｌ、ＺＮＦ４９２、ＺＮＦ５６８、ＺＮＦ５４２、ＺＮＦ４７１、ＺＮＦ１３２、ＪＡＭ２およびＣＮＲＩＰ１であるか、これらを含んでいる（例えば、表１を参照）。種々の実施形態において、大腸がんのＤＭＲは、ＡＬＫ‘４３４、ＣＮＲＩＰ１‘２３２、ＣＮＲＩＰ１‘２７２、ＬＯＮＲＦ２‘２８１、ＬＯＮＲＦ２‘３８７、ＡＤＡＭＴＳ２‘２５４、ＡＤＡＭＴＳ２‘２８４、ＡＤＡＭＴＳ２‘３２８、ＦＧＦ１４‘５７７、ＤＭＲＴ１‘９３４、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５‘４５６、ＭＣＩＤＡＳ‘８５５、ＭＣＩＤＡＳ‘００３、ＰＤＧＦＤ‘３８８、ＰＤＧＦＤ‘９２１、ＧＳＧ１Ｌ‘８６１、ＺＮＦ４９２’４９９、ＺＮＦ４９２‘０６９、ＺＮＦ５６８‘２５２、ＺＮＦ５６８‘４０５、ＺＮＦ５４２‘５２５、ＺＮＦ５４２‘５０２、ＺＮＦ４７１‘５２７、ＺＮＦ４７１‘５５８、ＺＮＦ４７１‘６６２、ＺＮＦ１３２‘２６８、ＺＮＦ１３２‘４１５およびＪＡＭ２‘３２０から選択される（例えば、表７を参照）。

なんらの疑いもなく、本明細書に記載の任意のメチル化バイオマーカーは、とりわけ、大腸がんのメチル化バイオマーカーでありうるか、またはそれに含まれうる。

【０１２２】

いくつかの実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは、１つのメチル化遺伝子座でありうるか、または１つのメチル化遺伝子座を含みうる。いくつかの実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは、２つ以上のメチル化遺伝子座でありうるか、またはそれを含みうる。いくつかの実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは、１つのメチル化可変領域（ＤＭＲ）でありうるか、またはそれを含みうる。いくつかの実施形態において、メチル化遺伝子座は、２つ以上のＤＭＲでありうるか、またはそれを含みうる。いくつかの実施形態において、メチル化バイオマーカーは、１つのメチル化部位でありうるか、または１つのメチル化部位を含みうる。他の実施形態において、メチル化バイオマーカーは、２つ以上のメチル化部位でありうるか、またはそれを含みうる。いくつかの実施形態において、メチル化遺伝子座は、２つ以上のＤＭＲを含んでいてもよい。また、メチル化遺伝子座に含まれているＤＭＲの１つ以上に隣接しているＤＮＡ領域をさらに含んでいてもよい。

【０１２３】

いくつかの例において、メチル化遺伝子座は遺伝子であるか（表１に記載の遺伝子など）、またはそれを含む。いくつかの例において、メチル化遺伝子座は、遺伝子の一部であるか（表１に記載の遺伝子の一部など）、またはそれを含む。いくつかの例において、メチル化遺伝子座は、遺伝子の同定された核酸境界を含む（ただし、これには限定されない）。

【０１２４】

いくつかの例において、メチル化遺伝子座は、遺伝子のコーディング領域であるか（表１に記載の遺伝子のコーディング領域など）、またはそれを含む。いくつかの例において、メチル化遺伝子座は遺伝子のコーディング領域の一部であるか（表１に記載の遺伝子のコーディング領域の一部など）、またはそれを含む。

【０１２５】

いくつかの例において、メチル化遺伝子座は、遺伝子のプロモーターおよび／または他の調節領域であるか（表１に記載の遺伝子のプロモーターおよび／または他の調節領域など）、またはそれを含む。いくつかの例において、メチル化遺伝子座は、遺伝子のプロモーターおよび／または調節領域の一部であるか（表１に記載の遺伝子のプロモーターおよび／または調節領域の一部）、またはそれを含む。いくつかの例において、メチル化遺伝子座は、遺伝子のプロモーターおよび／または他の調節領域の同定された核酸境界を含む（ただし、これらには限定されない）。いくつかの実施形態において、メチル化遺伝子座は、ＣｐＧ密度が高いプロモーター（またはその一部）であるか、またはそれを含む。

【０１２６】

いくつかの実施形態において、メチル化遺伝子座は、非コーディング配列であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、メチル化遺伝子座は、１つ以上のエキソンおよび／または１つ以上のイントロンであるか、またはそれを含む。

【０１２７】

いくつかの実施形態において、メチル化遺伝子座は、コーディング配列の上流に位置する所定のヌクレオチド数のＤＮＡ領域、および／または、コーディング配列の下流に位置する所定のヌクレオチド数のＤＮＡ領域を含む。種々の例において、上流および／または下流に位置する所定のヌクレオチド数は、例えば、５００ｂｐ、１ｋｂ、２ｋｂ、３ｋｂ、４ｋｂ、５ｋｂ、１０ｋｂ、２０ｋｂ、３０ｋｂ、４０ｋｂ、５０ｋｂ、７５ｋｂもしくは１００ｋｂであるか、またはそれらを含む。当業者であれば理解するであろうところによると、コーディング配列の発現に影響を及ぼしうるメチル化バイオマーカーは、通常、当該コーディング配列の上流および／または下流に上述の距離のいずれかだけ離れて位置している。

【０１２８】

当業者であれば理解するであろうところによると、メチル化バイオマーカーとして同定されるメチル化遺伝子座は、１つの実験、反応またはアンプリコンにおいてアッセイされる必要性は必ずしもない。例えば、あるメチル化遺伝子座（１つ以上の別々のまたは重複するＤＭＲなど）内の別々のまたは重複するＤＮＡ領域の１つ以上を別々に増幅させる方法によって（あるいは、増幅に充分なオリゴヌクレオチドプライマーおよび条件を準備する方法によって）、大腸がんのメチル化バイオマーカーとして同定された１つのメチル化遺伝子座をアッセイしてもよい。また、当業者であれば理解するであろうところによると、メチル化バイオマーカーとして同定されたメチル化遺伝子座のそれぞれのヌクレオチド（またはＣｐＧ）について、メチル化状態を分析する必要性は必ずしもない。むしろ、メチル化バイオマーカーであるメチル化遺伝子座の分析は、例えば、メチル化遺伝子座内の１つのＤＮＡ領域の分析によって行える（メチル化遺伝子座内の１つのＤＭＲの分析など）。

【０１２９】

本開示のＤＭＲは、メチル化遺伝子座でありうるか、またはメチル化遺伝子座の一部を含みうる。いくつかの例において、ＤＭＲは、メチル化遺伝子座を含むＤＮＡ領域であって、その長さは例えば１～５，０００ｂｐである。種々の実施形態において、ＤＭＲは、メチル化遺伝子座を含むＤＮＡ領域であって、その長さは５０００ｂｐ以下、４，０００ｂｐ以下、３，０００ｂｐ以下、２，０００ｂｐ以下、１，０００ｂｐ以下、９５０ｂｐ以下、９００ｂｐ以下、８５０ｂｐ以下、８００ｂｐ以下、７５０ｂｐ以下、７００ｂｐ以下、６５０ｂｐ以下、６００ｂｐ以下、５５０ｂｐ以下、５００ｂｐ以下、４５０ｂｐ以下、４００ｂｐ以下、３５０ｂｐ以下、３００ｂｐ以下、２５０ｂｐ以下、２００ｂｐ以下、１５０ｂｐ以下、１００ｂｐ以下、５０ｂｐ以下、４０ｂｐ以下、３０ｂｐ以下、２０ｂｐ以下または１０ｂｐ以下である。いくつかの実施形態において、ＤＭＲの長さはｂｐ、１ｂｐ、２ｂｐ、３ｂｐ、４ｂｐ、５ｂｐ、６ｂｐ、７ｂｐ、８または９ｂｐである。

【０１３０】

メチル化バイオマーカー（本明細書に記載のメチル化遺伝子座およびＤＭＲを含むが、

これらに制限されない）は、大腸がんのメチル化バイオマーカーであるメチル化部位の１つ以上を有していてもよい。

【０１３１】

明確化のために、当業者であれば理解するであろうところによると、用語「メチル化バイオマーカー」は広義に用いられる。メチル化遺伝子座は、１つ以上のＤＭＲを含むメチル化バイオマーカーであってもよい。ＤＭＲの各々は、それ自体としてもメチル化バイオマーカーでありうる。ＤＭＲの各々は、１つ以上のメチル化部位を含んでいてもよい。メチル化部位の各々は、それ自体としてもメチル化バイオマーカーでありうるさらに、メチル化バイオマーカーは、２つ以上のメチル化遺伝子座を含んでいてもよい。したがって、メチル化バイオマーカーの状態は、バイオマーカーに含まれる核酸の連続性によって定まるのではない。そうではなく、第１状態および第２状態（大腸がんおよびコントロールなど）の間における、含まれているＤＮＡ領域のメチル化状態の変化の存在によって定まる。

【０１３２】

本明細書に記載の通り、メチル化遺伝子座は、１つ以上の任意のメチル化遺伝子座であって、当該メチル化遺伝子座は、表１に記載の遺伝子であってもよいし、表１に記載の遺伝子を含んでもよい。いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは１つのメチル化遺伝子座を含み、当該メチル化遺伝子座は、表１に記載の遺伝子であるか、または表１に記載の遺伝子を含む。例えば種々の実施形態においては、大腸がんのメチル化バイオマーカーは１つのメチル化遺伝子座を含んでいてもよく、当該メチル化遺伝子座は、ＬＯＮＲＦ２、ＡＤＡＭＴＳ２、ＦＧＦ１４、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５、ＰＤＧＦＤ、ＺＮＦ４９２、ＺＮＦ５４２、ＺＮＦ４７１、ＪＡＭ２、ＧＳＧ１Ｌ、ＤＭＲＴ１およびＭＣＩＤＡＳから選択される遺伝子であるか、または当該遺伝子を含む。

【０１３３】

いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは２つ以上のメチル化遺伝子座を含み、その各々は、表１に記載の遺伝子であるか、または表１に記載の遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個または１６個のメチル化遺伝子座を含み、その各々は、表１に記載の遺伝子であるか、または表１に記載の遺伝子を含む。

【０１３４】

いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは２つ以上のメチル化遺伝子座を含み、２つ以上のメチル化遺伝子座の各々は、表表１～６のいずれかに記載の遺伝子であるか、または当該遺伝子を含む。それぞれ、表２～６の１つに記載の遺伝子であるか、または当該遺伝子を含む、２つ以上のメチル化遺伝子座の限定されることない組合せを含む。いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは２つのメチル化遺伝子座を含み、２つ以上のメチル化遺伝子座は、表２に記載の遺伝子であるか、または当該遺伝子を含むメチル化遺伝子座を含む。いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは３つのメチル化遺伝子座を含み、３つのメチル化遺伝子座は、表３に記載の遺伝子であるか、または当該遺伝子を含むメチル化遺伝子座を含む。いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは４つのメチル化遺伝子座を含み、４つのメチル化遺伝子座は、表４に記載の遺伝子であるか、または当該遺伝子を含むメチル化遺伝子座を含む。いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは６つのメチル化遺伝子座を含み、６つのメチル化遺伝子座は、表５に記載の遺伝子であるか、または当該遺伝子を含むメチル化遺伝子座を含む。いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは１１個のメチル化遺伝子座を含み、１１個のメチル化遺伝子座は、表６に記載の遺伝子であるか、または当該遺伝子を含むメチル化遺伝子座を含む。種々の特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーまたは大腸がんのメチル化バイオマーカーパネルは、本開示の１つ以上のメチル化遺伝子座を含む（ただし、ＦＧＦ１４、ＺＮＦ４７１、ＰＤＧＦＤおよびＡＬＫのうちの１つ以上であるか、またはこれらすべてもしくは一

部を含むメチル化遺伝子座は含まない）。

【０１３５】

【表１】

表1：遺伝子名によって特定されるﾒﾁﾙ化遺伝子座

遺伝子	ﾋﾄｹﾞﾉﾑｱｾﾝﾌﾞﾘGRCh38(hg38)の例示的なDNA領域		配列番号
ZNF132	ZNF132 chr19,	bp 58439728～58440994	配列番号1
DMRT1	DMRT1 chr9,	bp 841340～968090	配列番号2
ALK	ALK chr2,	bp 29193215～29922286	配列番号3
JAM2	JAM2 chr21,	bp 25637848～25714704	配列番号4
FGF14	FGF14 chr13,	bp 101919879～102403137	配列番号5
MCIDAS	MCIDAS chr5,	bp 55220951～55221051	配列番号6
ST6GALNAC5	ST6GALNAC5 chr1,	bp 76866255～77063388	配列番号7
LONRF2	LONRF2 chr2,	bp 100285667～100323015	配列番号8
PDGFD	PDGFD chr11,	bp 104163499～104164026	配列番号9
GSG1L	GSG1L chr16,	bp 27920615～28064275	配列番号10
ZNF492	ZNF492 chr19,	bp 22633051～22666433	配列番号11
ZNF568	ZNF568 chr19,	bp 36916312～36943940	配列番号12
ADAMTS2	ADAMTS2 chr5,	bp 179118114～179344392	配列番号13
ZNF542	ZNF542 chr19,	bp 56367838～56370986	配列番号14
ZNF471	ZNF471 chr19,	bp 56507245～56508589	配列番号15
CNRIP1	CNRIP1 chr2,	bp 68293114～68320928	配列番号16

【０１３６】

【表２】

表2：2個のﾒﾁﾙ化遺伝子座の組合せ

ZNF471
FGF14

【０１３７】

【表３】

表3：3個のﾒﾁﾙ化遺伝子座の組合せ

ZNF471
FGF14
PDGFD

【０１３８】
【表４】
表4：4個のﾒﾁﾙ化遺伝子座の組合せ

ZNF471
FGF14
PDGFD
ADAMTS2

【０１３９】
【表５】
表5：6個のﾒﾁﾙ化遺伝子座の組合せ

ZNF471
FGF14
PDGFD
ADAMTS2
ZNF492
ST6GALNAC5

【０１４０】
【表６】
表6：11個のﾒﾁﾙ化遺伝子座の組合せ

ZNF471
FGF14
PDGFD
ADAMTS2
ZNF492
ST6GALNAC5
ZNF542
LONRF2
ZNF132
CNRIP1
ALK

【０１４１】
本明細書に記載の通り、ＤＭＲは、任意のＤＭＲの１つ以上であってもよく、ＤＭＲの各々が存在するメチル化遺伝子座は、表１に記載の遺伝子であるか、または当該遺伝子のを含む。いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは１つのＤＭＲであるか、または１つのＤＭＲを含む。当該１つのＤＭＲは、表１に記載の遺伝子全部もしくは一部を含むか、または当該遺伝子内に存在している。例えば種々の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは、１つのＤＭＲを含んでいてもよく、当該ＤＭＲは、ＡＬＫ、ＬＯＮＲＦ２、ＡＤＡＭＴＳ２、ＦＧＦ１４、ＤＭＲＴ１、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５、ＭＣＩＤＡＳ、ＰＤＧＦＤ、ＧＳＧ１Ｌ、ＺＮＦ５６８、ＺＮＦ５４２、ＺＮＦ４７１、ＺＮＦ１３２、ＪＡＭ２、ＺＮＦ４９２およびＣＮＲＩＰ１から選択される遺伝子であるか、当該遺伝子の全部もしくは一部を含んでいるか、または当該遺伝子内に存在している。
【０１４２】
いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは２つ以上の

ＤＭＲを含み、その各々は、表１に記載の遺伝子であるか、当該遺伝子の全部もしくは一部を含むか、または当該遺伝子内に存在している。いくつかの実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個または１６個のＤＭＲを含み、その各々は、表１に記載の遺伝子であるか、当該遺伝子の全部もしくは一部を含むか、または当該遺伝子内に存在している。

【０１４３】

いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは２つ以上のＤＭＲを含み、２つ以上のＤＭＲの各々は、表１～６のいずれかに記載の遺伝子であるか、当該遺伝子の全部もしくは一部を含むか、または当該遺伝子内に存在している。いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは２つのＤＭＲを含み、当該２つのＤＭＲは、表２に記載の遺伝子であるか、当該遺伝子の全部もしくは一部を含むか、または当該遺伝子内に存在している。いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは３つのＤＭＲを含み、当該３つのＤＭＲは、表３に記載の遺伝子であるか、当該遺伝子の全部もしくは一部を含むか、または当該遺伝子内に存在している。いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは４つのＤＭＲを含み、当該４つのＤＭＲは、表４に記載の遺伝子であるか、当該遺伝子の全部もしくは一部を含むか、または当該遺伝子内に存在している。いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは６つのＤＭＲを含み、当該６つのＤＭＲは、表５に記載の遺伝子であるか、当該遺伝子の全部もしくは一部を含むか、または当該遺伝子内に存在している。いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは１１個のＤＭＲを含み、当該１１個のＤＭＲは、表６に記載の遺伝子であるか、当該遺伝子の全部もしくは一部を含むか、または当該遺伝子内に存在している。種々の特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーまたは大腸がんのメチル化バイオマーカーパネルは、１つ以上のＤＭＲを含む（ただし、当該１つ以上のＤＭＲは、ＦＧＦ１４、ＺＮＦ４７１、ＰＤＧＦＤおよびＡＬＫのうちの１つ以上であるか、当該遺伝子の全部もしくは一部を含むか、または当該遺伝子内に存在しているＤＭＲを含んでいない）。

【０１４４】

本明細書に記載の通り、ＤＭＲは、任意のＤＭＲの１つ以上であってもよく、ＤＭＲの各々は、表７に記載のＤＭＲの全部または一部を含む（ただし、表７に記載の具体的なＤＭＲには限定されない）。いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは１つのＤＭＲであり（あるいは１つのＤＭＲを含み）、当該ＤＭＲは表７に記載のＤＭＲであるか、または当該ＤＭＲの全部もしくは一部を含む（ただし、表７に記載の具体的なＤＭＲには限定されない）。表Ｑに記載のＤＭＲの例としては、ＬＫ‘４３４、ＣＮＲＩＰ１‘２３２、ＣＮＲＩＰ１‘２７２、ＬＯＮＲＦ２‘２８１、ＬＯＮＲＦ２‘３８７、ＡＤＡＭＴＳ２‘２５４、ＡＤＡＭＴＳ２‘２８４、ＡＤＡＭＴＳ２‘３２８、ＦＧＦ１４‘５７７、ＤＭＲＴ１‘９３４、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５‘４５６、ＭＣＩＤＡＳ‘８５５、ＭＣＩＤＡＳ‘００３、ＰＤＧＦＤ‘３８８、ＰＤＧＦＤ‘９２１、ＧＳＧ１Ｌ‘８６１、ＺＮＦ４９２’４９９、ＺＮＦ４９２‘０６９、ＺＮＦ５６８‘２５２、ＺＮＦ５６８‘４０５、ＺＮＦ５４２‘５２５、ＺＮＦ５４２‘５０２、ＺＮＦ４７１‘５２７、ＺＮＦ４７１‘５５８、ＺＮＦ４７１‘６６２、ＺＮＦ１３２‘２６８、ＺＮＦ１３２‘４１５およびＪＡＭ２‘３２０から選択されるＤＭＲが挙げられる（ただし、これらには限定されない）。例えば種々の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは１つのＤＭＲを含んでいてもよく、当該ＤＭＲは、ＬＯＮＲＦ２‘２８１、ＬＯＮＲＦ２‘３８７、ＡＤＡＭＴＳ２‘２５４、ＡＤＡＭＴＳ２‘２８４、ＡＤＡＭＴＳ２‘３２８、ＦＧＦ１４‘５７７、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５‘４５６、ＰＤＧＦＤ‘３８８、ＰＤＧＦＤ‘９２１、ＺＮＦ４９２’４９９、ＺＮＦ４９２‘０６９、ＺＮＦ５４２‘５２５、ＺＮＦ５４２‘５０２、ＺＮＦ４７１‘５２７、ＺＮＦ４７１‘５５８およびＺＮＦ４７１‘６６２から選択されるＤＭＲであるか、または当該ＤＭＲの全部もしくは一部を含む。

【０１４５】
いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは２つ以上のＤＭＲを含み、各々のＤＭＲは、表７に記載のＤＭＲであるか、または当該ＤＭＲの全部もしくは一部を含む（ただし、表７に記載の具体的なＤＭＲには限定されない）。いくつかの実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、２１個、２２個、２３個、２４個、２５個、２６個、２７個または２８個のＤＭＲを含み、各々のＤＭＲは、表７に記載のＤＭＲであるか、または当該ＤＭＲの全部もしくは一部を含む（ただし、表７に記載の具体的なＤＭＲには限定されない）。
【０１４６】
いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは２つ以上のＤＭＲを含み、２つ以上のＤＭＲの各々は、表７～１２のいずれかに記載のＤＭＲであるか、または当該ＤＭＲの全部または一部を含む（ただし、表８～１２に記載の具体的なＤＭＲまたはその組合せに限定されない）。いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは２つのＤＭＲを含み、当該２つのＤＭＲは、表８に記載のＤＭＲである。いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは３つのＤＭＲを含み、当該３つのＤＭＲは、表９に記載のＤＭＲである。いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは５つのＤＭＲを含み、当該５つのＤＭＲは、表１０に記載のＤＭＲである。いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは８つのＤＭＲを含み、当該８つのＤＭＲは、表１１に記載のＤＭＲである。いくつかの特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは１５個のＤＭＲを含み、当該１５個のＤＭＲは、表１２に記載のＤＭＲである。種々の特定の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーまたは大腸がんのメチル化バイオマーカーパネルは、表７に記載の１つ以上のＤＭＲを含む（ただし、当該１つ以上のＤＭＲは、ＦＧＦ１４、ＺＮＦ４７１、ＰＤＧＦＤおよびＡＬＫのうち一部または全部を含まない。例えば、表７に記載のＦＧＦ１４、ＺＮＦ４７１、ＰＤＧＦＤおよびＡＬＫのうち一部または全部のＤＭＲを含まない）。
【０１４７】

【表７】

表7：大腸がんのDMR

遺伝子名	chr	開始	終了	長さ	配列番号
ALK	2	29921434	29921541	108	配列番号 :17
CNRIP1	2	68319232	68319342	111	配列番号 :18
LONRF2	2	100321281	100321395	115	配列番号 :19
LONRF2	2	100322387	100322463	77	配列番号 :20
ADAMTS2	5	179344254	179344348	95	配列番号 :21
ADAMTS2	5	179344284	179344383	100	配列番号 :22
FGF14	13	102394577	102394651	75	配列番号 :23
DMRT1	9	841934	842046	113	配列番号 :24
ST6GALNAC5	1	76868456	76868525	70	配列番号 :25
MCIDAS	5	55220855	55220971	117	配列番号 :26
MCIDAS	5	55221003	55221122	120	配列番号 :27
PDGFD	11	104163388	104163503	116	配列番号 :28
PDGFD	11	104163921	104164058	138	配列番号 :29
GSG1L	16	28063861	28063964	104	配列番号 :30
ZNF492	19	22634499	22634596	98	配列番号 :31
ZNF568	19	36916252	36916371	120	配列番号 :32
ZNF568	19	36916405	36916476	72	配列番号 :33
ZNF542	19	56368525	56368610	86	配列番号 :34
ZNF542	19	56368502	56368591	90	配列番号 :35
ZNF471	19	56507527	56507675	149	配列番号 :36
ZNF471	19	56507558	56507675	118	配列番号 :37
ZNF471	19	56507662	56507750	89	配列番号 :38
ZNF132	19	58440268	58440435	168	配列番号 :39
ZNF132	19	58440415	58440523	109	配列番号 :40
JAM2	21	25640320	25640399	80	配列番号 :41
ZNF492	19	22634069	22634174	106	配列番号 :42
CNRIP1	2	68319272	68319342	71	配列番号 :43
ADAMTS2	5	179344328	179344412	85	配列番号 :44

【０１４８】

【表８】

表8：2個のDMRの組合せ

遺伝子名	chr	開始位置	終了位置
ZNF471	19	56507558	56507675
FGF14	13	102394577	102394651

【０１４９】

【表９】

表9：3個のDMRの組合せ

遺伝子名	chr	開始位置	終了位置
ZNF471	19	56507558	56507675
FGF14	13	102394577	102394651
PDGFD	11	104163388	104163503

【０１５０】

【表１０】

表10：5個のDMRの組合せ

遺伝子名	chr	開始位置	終了位置
ZNF471	19	56507558	56507675
FGF14	13	102394577	102394651
PDGFD	11	104163388	104163503
ZNF471	19	56507527	56507675
ADAMTS2	5	179344284	179344383

【０１５１】

【表１１】

表11：8個のDMRの組合せ

遺伝子名	chr	開始位置	終了位置
ZNF471	19	56507558	56507675
FGF14	13	102394577	102394651
PDGFD	11	104163388	104163503
ZNF471	19	56507527	56507675
ADAMTS2	5	179344284	179344383
ADAMTS2	5	179344254	179344348
ZNF492	19	22634069	22634174
ST6GALNAC5	1	76868456	76868525

【０１５２】

【表１２】

表12：15個のDMRの組合せ

遺伝子名	chr	開始位置	終了位置
ZNF471	19	56507558	56507675
FGF14	13	102394577	102394651
PDGFD	11	104163388	104163503
ZNF471	19	56507527	56507675
ADAMTS2	5	179344284	179344383
ADAMTS2	5	179344254	179344348
ZNF492	19	22634069	22634174
ST6GALNAC5	1	76868456	76868525
ZNF542	19	56368502	56368591
LONRF2	2	100321281	100321395
ZNF132	19	58440415	58440523
PDGFD	11	104163921	104164058
ZNF132	19	58440268	58440435
CNRIP1	2	68319272	68319342
ALK	2	29921434	29921541

【０１５３】

種々の実施形態において、メチル化バイオマーカーは、本明細書に記載の１つ以上のメチル化遺伝子座（１つ以上のＤＭＲなど）内に存在する、１つ以上の個別のヌクレオチドであってもよいし（ＣｐＧ内における１つの個別のシステイン残基など）、当該ヌクレオチドを含んでいてもよい。あるいは、メチル化バイオマーカーは、複数の個別のシステイン残基であってもよいし（複数のＣｐＧのシステイン残基など）、当該システイン残基を含んでいてもよい。したがって、特定の実施形態において、メチル化バイオマーカーは、複数の個別のメチル化部位のメチル化状態であるか、または当該メチル化部位のメチル化状態を含む。

【０１５４】

種々の実施形態において、メチル化バイオマーカーは、メチル化状態の変化であるか、メチル化状態の変化を含むか、またはメチル化状態の変化によって特徴付けられる（ここで言うメチル化状態の変化とは、１つ以上のメチル化遺伝子座（１つ以上のＤＭＲなど）内にある１つ以上のメチル化部位のメチル化における変化のことである）。種々の実施形態において、メチル化バイオマーカーは、メチル化状態の変化であるか、またはメチル化状態の変化を含む（ここで言うメチル化状態の変化とは、１つ以上のメチル化遺伝子座（１つ以上のＤＭＲなど）内にあるメチル化部位の数の変化のことである）。種々の実施形態において、メチル化バイオマーカーは、メチル化状態の変化であるか、またはメチル化状態の変化を含む（ここで言うメチル化状態の変化とは、１つ以上のメチル化遺伝子座（１つ以上のＤＭＲなど）内のメチル化部位の頻度の変化のことである）。種々の実施形態において、メチル化バイオマーカー、メチル化状態の変化であるか、またはメチル化状態の変化を含む（ここで言うメチル化状態の変化とは、１つ以上のメチル化遺伝子座（１つ以上のＤＭＲなど）内のメチル化部位のパターンの変化のことである）。

【０１５５】

種々の実施形態においては、１つ以上のメチル化遺伝子座（１つ以上のＤＭＲなど）のメチル化状態を、試料中に含まれておりメチル化されている当該１つ以上のメチル化遺伝子座（１つ以上のＤＭＲなど）の割合または百分率として表現する。例えば、試料中のＤＮＡのうち、１つ以上の特定のメチル化遺伝子座（１つ以上の特定のＤＭＲなど）がメチル化されている個々のＤＮＡ鎖の数の割合として表現する。当業者であれば理解するであろうところによると、いくつかの例においては、分析対象である１つ以上のＤＭＲにおける（試料中のＤＭＲなど）メチル化されているＤＭＲに対するメチル化されていないＤＭＲの比率から、メチル化の割合または百分率を計算してもよい。

【０１５６】

種々の実施形態においては、１つ以上のメチル化遺伝子座（１つ以上のＤＭＲなど）のメチル化状態を、参照試料中の参照メチル化状態の値および／または参照試料中の１つ以上のメチル化遺伝子座（１つ以上のＤＭＲなど）のメチル化状態と比較する。特定の例において、参照は、例えば、同じソースに由来する非同時的試料である。例えば、同じソースの過去の試料である（同じ対象に由来する試料など）。特定の例において、１つ以上のメチル化遺伝子座（１つ以上のＤＭＲなど）のメチル化状態に関する参照は、１つ以上の試料（対象に由来する試料など）中における当該１つ以上のメチル化遺伝子座（１つ以上のＤＭＲなど）のメチル化状態であって、特定の状態（がん状態または非がん状態など）を表すことが知られている。したがって、参照は、１つ以上の所定の閾値であってもよいし、または当該閾値を含んでいてもよい。この閾値は、定量的であってもよいし（メチル化の値など）または定性的であってもよい。特定の例において、ＤＭＲのメチル化状態に関する参照は、ＤＭＲのヌクレオチドを含んでいない同一試料中に存在する１つ以上のヌクレオチドのメチル化状態である（複数の連続するオリゴヌクレオチドなど）。当業者であれば理解するであろうところによると、参照の測定は、通常、非参照の測定方法と同一、類似または同等の方法を用いる測定によってなされる。

【０１５７】

図２０は、ある一つの機構の模式図であって、この機構では遺伝子の調節配列の高メチル化または低メチル化が発現に影響しうる（ただし、いかなる特定の科学理論にも拘束されることを意図しない）。図２０に示すように、低メチル化により発現が増加され、および／または、高メチル化により発現が抑制されうる。種々の例において、発現調節領域（プロモーター領域およびエンハンサー領域など）におけるメチル化の増加は、参照と比較すると、作動可能に連結されている遺伝子の発現（作動可能に連結されており、通常はがんを抑制している遺伝子の発現など）を抑制または消失させうる。種々の実施形態において、発現調節領域（プロモーター領域およびエンハンサー領域など）におけるメチル化の現象は、参照と比較すると、作動可能に連結されている遺伝子の発現（作動可能に連結されており、がん化に寄与する活性を有している遺伝子の発現など）を増加させうる。ＤＮＡのメチル化は、ＲＮＡまたはタンパク質の発現よりも、化学的および生物学的に安定な

がん状態の指標となりうる（ただし、いかなる特定の科学理論にも拘束されることを意図しない）。

【０１５８】

通常、メチル化は、組織特異的が高いと考えられており、ＤＮＡ配列の分析では得られるとは限らない性質の情報が得られる。

【０１５９】

がん化に実質的に寄与するメチル化は、例えば、がん関連遺伝子（通常はがんを抑制する遺伝子など）と作動可能に連結されているＤＮＡの発現調節領域（プロモーター領域、エンハンサー領域、転写因子結合部位、ＣＴＣＦ結合部位、ＣｐＧアイランド、または他の配列）において発生しうる。したがって、通常はがんを抑制する遺伝子の不活性化によりがんが発生するか、またはがん化に寄与する。また、高メチル化は、通常はＣｐＧアイランドにて見出される。

【０１６０】

〔がん〕

本開示の方法および組成物は、がん（とりわけ大腸がん）のスクリーニングに有用である。大腸がんには、結腸がん、大腸がん、およびこれらの組合せが含まれる（ただし、これらには限定されない）。大腸がんには、転移性大腸がんおよび非転移性大腸がんが含まれる。大腸がんには、結腸がんの近位部に位置するがんと、結腸の遠位部に位置するがんとが含まれる。

【０１６１】

大腸がんには、本技術分野で周知である種々の任意のステージの大腸がんが含まれる。この例としては、ステージＩ、ステージＩＩ、ステージＩＩＩ、ステージＩＶの大腸がんが挙げられる（ステージ０、ステージＩ、ステージＩＩＡ、ステージＩＩＢ、ステージＩＩＣ、ステージＩＩＩＢ、ステージＩＩＩＣ、ステージＩＶＡ、ステージＩＶＢ、ステージＩＶＣなど）。大腸がんには、原発腫瘍・所属リンパ節・遠隔転移による病期分類システム（ＴＮＭ分類）における、全てのステージが含まれる。大腸がんに関して、Ｔは、腫瘍が結腸または直腸の壁内まで増殖しているかどうか、増殖している場合は何層であるかを表しうる。Ｎは、腫瘍がリンパ節に転移しているかどうか、転移している場合にはリンパ節の数および位置を表しうる。Ｍは、がんが体の他の部分に転移しているかどうか、どの部分ににどの程度転移しているかを表しうる。Ｔ、ＮおよびＭの特定の段階は、本技術分野で周知である。Ｔのステージとしては、ＴＸ、Ｔ０、Ｔｉｓ、Ｔ１、Ｔ２、Ｔ３、Ｔ４ａ、Ｔ４ｂが挙げられる。Ｎのステージとしては、ＮＸ、Ｎ０、Ｎ１ａ、Ｎ１ｂ、Ｎ１ｃ、Ｎ２ａ、Ｎ２ｂが挙げられる。Ｍのステージとしては、Ｍ０、Ｍ１ａ、Ｍ１ｂが挙げられる。さらに、大腸がんのグレードとして、ＧＸ、Ｇ１、Ｇ２、Ｇ３、Ｇ４が挙げられる。がん（とりわけ大腸がん）の病期を分類する種々の方法は、例えば、cancer.net/cancer-types/colorectal-cancer/stagesに要約されている。

【０１６２】

特定の例において、本開示には、ステージの早い大腸がんのスクリーニングが含まれる。ステージの早い大腸がんの例としては、対象において限局化している大腸がん（対象のリンパ節にまだ転移していないがんなど）が挙げられる。具体例としては、近傍のリンパ節に転移していないがん（ステージＮ０）、離れた箇所に転移していないがん（ステージＭ０）が挙げられる。ステージの早いがんの例としては、ステージ０～ＩＩＣである大腸がんが挙げられる。

【０１６３】

したがって、本開示における大腸がんには、とりわけ、前悪性大腸がんおよび悪性大腸がんが含まれる。本明細書に記載または本技術分野で周知であるあらゆる形態およびステージ（さらに、これらの全てのサブセット）にある大腸がんのスクリーニングに関して、本開示の方法および組成物は有用である。したがって、当業者が理解するであろうところによると、本明細書における大腸がんに関する言明は全て、特段に制限されることなく、本明細書に記載または本技術分野で周知であるあらゆる形態およびステージ（さらに、こ

れらの全てのサブセット）にある大腸がんを表している。

【０１６４】

〔対象および試料〕

本明細書に記載の方法および組成物により分析する試料は、任意の生体試料および／または核酸を含む任意の試料であってよい。種々の特定の実施形態において、本明細書に記載の方法および組成物により分析する試料は、哺乳動物由来の試料であってもよい。種々の特定の実施形態において、本明細書に記載の方法および組成物により分析する試料は、ヒト対象由来の試料であってもよい。種々の特定の実施形態において、本明細書に記載の方法および組成物により分析する試料は、マウス、ラット、ブタ、ウマ、ニワトリまたはウシ由来の試料であってもよい。

【０１６５】

種々の例において、ヒト対象は、「大腸がんなどのがんを有している」「大腸がんなどのがんである」「大腸がんなどのがんのおそれがある」および／または「大腸がんなどのがんを直ちに有するおそれがある」と診断された（または、そのような診断を求める）対象である。種々の例において、ヒト対象は、大腸がんのスクリーニングを必要とする対象として特定された対象である。特定の例において、ヒト対象は、大腸がんのスクリーニングを必要とすることが医療者により特定された対象である。種々の例において、ヒト対象は、５０歳以上（例えば、５０歳以上、５５歳以上、６０歳以上、６５歳以上、７０歳以上、７５歳以上、８０歳以上、８５歳以上または９０歳以上）であるなど、年齢のために大腸がんのスクリーニングを必要とすると特定される。種々の例において、ヒト対象は、「大腸がんなどのがんを有していない」「大腸がんなどのがんを有しているおそれがない」「大腸がんなどのがんをただちに有するおそれがない」「大腸がんなどのがんでない」および／または「大腸がんなどのがんの診断を求めていない」診断されたか、またはそれらの任意の組合せである対象である。

【０１６６】

対象由来の試料（ヒト対象または他の哺乳動物対象由来の試料など）は、例えば、血液、血液成分、ｃｆＤＮＡ、ｃｔＤＮＡ、便または結腸直腸組織の試料であってもよい。いくつかの特定の実施形態において、試料は、対象の排泄物または体液（対象の便、血液、リンパ液または尿など）または大腸がん組織試料である。対象由来の試料は、例えば、細胞試料または組織試料（例えば、がん組織またはがん細胞を含む組織であって、腫瘍組織または転移組織）であってもよい。種々の実施形態において、対象（ヒト対象または他の哺乳類対象）由来の試料は、生検（細針吸引または組織生検など）または外科手術によって得られる。

【０１６７】

種々の特定の実施形態において、試料は、セルフリーＤＮＡ（ｃｆＤＮＡ）試料である。ｃｆＤＮＡは、通常、ヒトの生体液中に見られ（血漿、血清または尿など）、短い２本鎖断片である。通常、ｃｆＤＮＡの濃度は低いが、特定の条件下（妊娠、自己免疫障害、心筋梗塞、がんなどが挙げられるが、これらに限定されない）において有意に増加しうる。循環腫瘍ＤＮＡ（ｃｔＤＮＡ）は、循環ＤＮＡの一つであり、がん細胞に特異的に由来する。ｃｔＤＮＡは、ヒトの生体液中において、白血球および赤血球に結合した状態で存在することもあるし、結合していないこともある。腫瘍由来ｃｆＤＮＡを検出する種々の試験は、がんに特徴的な遺伝的またはエピジェネティックな修飾の検出に基づいている（がんに関連する修飾など）。がんに特徴的な遺伝的またはエピジェネティックな修飾の例としては、腫瘍抑制遺伝子におけるがん化またはがん関連突然変異、がん遺伝子の活性化、高メチル化、および／または、染色体障害が挙げられる（ただし、これらに限定されない）。がんに特徴的な遺伝的またはエピジェネティックな修飾を検出することにより、検出されたｃｆＤＮＡがｃｔＤＮＡであると確認できる。

【０１６８】

ｃｆＤＮＡおよびｃｔＤＮＡにより、組織のリアルタイム（またはほぼリアルタイム）なメチル化状態を測定できる。ｃｆＤＮＡおよびｃｔＤＮＡの血中における半減期は、約

２時間である。そのため、ある時点で採取された試料は、組織の状態をかなり正確なタイミングで反映している。

【０１６９】

試料から核酸を単離する種々の方法（血漿または血漿からｃｆＤＮＡを単離する方法など）が、本技術分野において知られている。核酸は、例えば、直接的に遺伝子を回収する標準的なＤＮＡ精製技術によって単離できる（ただし、これには限定されない）。例えば、試料を清澄化してアッセイを阻害する物質を除去し、標的核酸を捕捉する。場合によっては、清澄化した試料に捕捉剤を加えて捕捉複合体を形成させ、当該捕捉複合体を単離して標的核酸を回収する。

【０１７０】

〔メチル化状態の測定方法〕

本技術分野で周知および／または本明細書に記載の種々の方法によって、メチル化状態を測定できる。当業者であれば理解するであろうところによると、メチル化状態の測定方法は、一般的に、任意の由来かつ任意の種類の試料に適用できる。また、所与の測定方法において適当な形態に試料を改変するための処理工程を設けてもよい。メチル化状態の測定方法の例としては、メチル化状態に特異的なポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を含む方法、核酸シーケンシングを含む方法、質量分析を含む方法、メチル化特異的ヌクレアーゼを含む方法、質量による分離を含む方法、標的特異的な捕捉を含む方法、メチル化特異的オリゴヌクレオチドプライマーを含む方法が挙げられる（ただし、これらには限定されない）。メチル化のための特定のアッセイにおいては、重亜硫酸塩試薬（亜硫酸水素イオンイオンなど）を利用する。

【０１７１】

重亜硫酸塩試薬の例としては、重亜硫酸塩、二亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、またはこれらの組合せが挙げられる。これらの試薬は、メチル化核酸と非メチル化核酸との区別に有用でありうる。重亜硫酸塩とシトシンとの相互作用と、重亜硫酸塩と５－メチルシトシンとの相互作用とは、異なっている。重亜硫酸塩に基づく典型的な方法において、ＤＮＡを重亜硫酸塩と接触させると、非メチル化シトシンは脱アミノ化されてウラシルとなるが、メチル化シトシンは変化しない。つまり、メチル化シトシンは選択的に保存されるが、非メチル化シトシンは保存されない。したがって、重亜硫酸塩処理した試料においては、メチル化されていないシトシン残基の代わりにウラシル残基が存在し、これにより同定信号を与える。一方、残りのメチル化されているシトシン残基は、メチル化されているシトシン残基の同定信号を与える。重亜硫酸塩処理した試料は、例えば、ＰＣＲによって分析できる。

【０１７２】

種々のメチル化アッセイ手法と重亜硫酸塩処理とを組合せて、標的配列（ＤＭＲなど）のメチル化状態を決定してもよい。このようなアッセイの例としては、メチル化特異的制限酵素を用いるｑＰＣＲ、重亜硫酸塩処理した核酸のシーケンシング、ＰＣＲ（例えば、配列特異的な増幅を伴うもの）、メチル化特異的ヌクレアーゼを用いた稀少アレル濃縮ＰＣＲ、メチル化感受性ＨＲＭ（High Resolution Melting）が挙げられる。いくつかの実施形態においては、重亜硫酸塩処理したＤＮＡ試料からＤＭＲを増幅し、Illuminaプロトコルまたはトランスポソームによる**Nextera XT**プロトコルなどのためにＤＮＡシーケンシングライブラリを作成する。特定の実施形態においては、ハイスループット技術および／または次世代シーケンシング技術を使用して、ＤＮＡ配列を塩基対レベルの分解能で解析し、これによりメチル化状態が分析できる。

【０１７３】

種々の実施形態において、メチル化状態の検出は、メチル化特異的オリゴヌクレオチドプライマー（ＭＳＰ法）によるＰＣＲ増幅を含む方法によってなされる（例えば、Herman 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9821-9826を参照。この文献は、メチル化状態の決定方法に関して参照により本明細書に組み込まれる）。この方法は、例えば、重亜硫酸塩処理した試料に適用される。重亜硫酸塩処理したＤＮＡを増幅するためにメチル化

状態に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを使用すると、メチル化核酸と非メチル化核酸とを区別できる。ＭＳＰ法で使用するオリゴヌクレオチドプライマー対は、メチル化部位（ＣｐＧなど）を有する配列とハイブリダイズできる１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを含んでいる。シトシン残基に相補的な位置にＴ残基を有するオリゴヌクレオチドプライマーは、重亜硫酸塩処理する前のシトシンがメチル化されていないテンプレートに対して、選択的にハイブリダイズする。一方、シトシン残基に相補的な位置にＧ残基を有するオリゴヌクレオチドプライマーは、重亜硫酸塩処理する前のシトシンがメチル化シトシンであるテンプレートに対して、選択的にハイブリダイズする。ＭＳＰの結果は、シーケンシングアンプリコンの有無にかかわらず、ゲル電気泳動などによって得られる。ＭＳＰ（メチル化特異的ＰＣＲ）によれば、重亜硫酸塩処理したＤＮＡをＰＣＲ増幅することにより、遺伝子座特異的なＤＮＡのメチル化を高感度で検出できる（アレル検出レベルは０．１％であり、完全に特異的である）。

【０１７４】

重亜硫酸塩処理した試料のメチル化状態の決定に使用できる他の方法として、メチル化感応性ＨＲＭ（ＭＳ－ＨＲＭ）ＰＣＲがある（例えば、Hussmann 2018 Methods Mol Biol. 1708:551-571を参照。この文献は、メチル化状態の決定方法に関して参照により本明細書に組み込まれる）。ＭＳ－ＨＲＭは、ＰＣＲに基づくインチューボの方法で、ハイブリダイゼーション・メルティングによって目的とする特定の遺伝子座のメチル化レベルを検出する。ＭＳ－ＨＲＭの前にＤＮＡを重亜硫酸塩処理すると、メチル化しているＤＮＡとメチル化していないＤＮＡとは異なる塩基組成になる。このことを利用して、ＨＲＭによって得られるアンプリコンを分離する。固有のプライマーを設計すれば、高感度なアッセイを容易に実行でき、非メチル化バックグラウンドにおいて０．１～１％のメチル化アレルを検出できるようになる。ＭＳ－ＨＲＭアッセイ用のオリゴヌクレオチドプライマーは、メチル化アレルに相補的に設計される。特定のアニーリング温度において、このプライマーは、メチル化アレルおよび非メチル化アレルの両方にアニーリングでき、これによりアッセイの感度を向上させる。

【０１７５】

重亜硫酸塩処理した試料のメチル化状態の決定に使用できる他の方法として、定量的多重メチル化特異的ＰＣＲ（ＱＭ－ＭＳＰ）がある。ＱＭ－ＭＳＰは、メチル化に特異的なプライマーを使用して、ＤＮＡのメチル化を高感度で定量する（例えば、Fackler 2018 Methods Mol Biol. 1708:473-496を参照。この文献は、メチル化状態の決定方法に関して参照により本明細書に組み込まれる）。ＱＭ－ＭＳＰは、２ステップのＰＣＲを用いた方法である。第１ステップでは、遺伝子に特異的な１対のプライマー（フォワードおよびリバース）により、１つのＰＣＲ反応において、同じ遺伝子のメチル化コピーおよび非メチル化コピーを同時にかつ多重に増幅する。このメチル化に依存しない増幅ステップにより、３６サイクルのＰＣＲの後、１μＬあたり最大で10^9コピーのアンプリコンが生成される。第２ステップでは、リアルタイムＰＣＲおよび２種類の独立な蛍光体（例えば、６ＦＡＭおよびＶＩＣ）を用いて、第１ステップにおけるアンプリコンを検量線で定量する。これにより、同じウェル内にある遺伝子のメチル化しているＤＮＡおよびメチル化していないＤＮＡを検出する。１００，０００の参照遺伝子コピーの中から、１つのメチル化コピーが検出できる。

【０１７６】

重亜硫酸塩処理した試料のメチル化状態の決定に使用できる他の方法には、メチル化特異的ヌクレアーゼを用いた稀少アレル濃縮（ＭＳ－ＮａＭＥ）がある（例えば、Liu 2017 Nucleic Acids Res. 45(6):e39を参照。この文献は、メチル化状態の決定方法に関して参照により本明細書に組み込まれる）。Ｍｓ－ＮａＭＥは、２本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）に特異的なＤＮＡヌクレアーゼ（ＤＳＮ）の存在下における、標的配列に対するプローブの選択的ハイブリダイゼーションに基づいている。ハイブリダイゼーションの結果、２本鎖ＤＮＡの領域が生じ、これに引き続いてＤＳＮにより消化される。したがって、非メチル化配列を標的とするオリゴヌクレオチドプローブにより、局所的な２本鎖領域が生じ、

メチル化されていない標的は消化される。メチル化配列とハイブリダイズできるオリゴヌクレオチドプローブにより、局所的な２本鎖領域が生じ、メチル化されている標的は消化される。しかし、メチル化された標的は影響を受けない。さらに、オリゴヌクレオチドプローブによれば、重亜硫酸水素塩で処理したＤＮＡに含まれている複数の標的に対して同時にＤＳＮの作用を向けることができる。引続いて増幅させれば、消化されなかった配列を濃縮できる。Ｍｓ－ＮａＭＥは、独立して使用してもよいし、本明細書に記載の他の技術と組合せて使用してもよい。

【０１７７】

重亜硫酸塩処理した試料のメチル化状態の決定に使用できる他の方法として、メチル化感応性一ヌクレオチドプライマー伸長（Ｍｓ－ＳＮｕＰＥ(TM)）がある（例えば、Gonzalgo 2007 Nat Protoc. 2(8):1931-6を参照。この文献は、メチル化状態の決定方法に関して参照により本明細書に組み込まれる）。Ｍｓ－ＳＮｕＰＥでは、ストランド特異的ＰＣＲによりＤＮＡテンプレートを作製し、これをＭｓ－ＳＮｕＰＥによる定量的メチル化解析に用いる。次に、調査対象となるＣｐＧ部位のすぐ上流に対してハイブリダイズするように設計されているオリゴヌクレオチドを用いて、ＳＮｕＰＥを実施する。蛍光画像分析による可視化および定量化のために、反応生成物をポリアクリルアミドゲルで電気泳動してもよい。また、直接または間接に検出可能なラベルをアンプリコンに付与してもよい（蛍光ラベル、放射性核種、着脱な可能分子断片、質量分析によって区別できる質量を有する他の対象など）。例えば、マトリクス支援レーザ脱離／イオン化質量分析（ＭＡＬＤＩ）またはエレクトロスプレー質量分析（ＥＳＩ）により、検出を行ったり、視覚化したりできる。

【０１７８】

重亜硫酸処理した試料のメチル化状態の決定に使用できる特定の方法では、第１オリゴヌクレオチドプライマー、第２オリゴヌクレオチドプライマーおよびオリゴヌクレオチドプローブを、増幅を用いた方法において利用する。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブを、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）またはドロップレットデジタルＰＣＲ（ｄｄＰＣＲ）に使用してもよい。種々の例において、第１オリゴヌクレオチドプライマー、第２オリゴヌクレオチドプライマーおよび／またはオリゴヌクレオチドプローブは、メチル化したＤＮＡおよび／またはメチル化していないＤＮＡに対して選択的にハイブリダイズする。これによって、増幅またはプローブシグナルが試料のメチル化状態を示すようになる。

【０１７９】

メチル化状態（５－メチルシトシンのレベルの存在など）を検出するための重亜硫酸塩を用いた他の方法が公開されている。例えば、Frommer (1992 Proc Natl Acad Sci USA. 1;89(5):1827-31を参照（この文献は、メチル化状態の決定方法に関して参照により本明細書に組み込まれる）。

【０１８０】

メチル化状態の決定に使用できる特定の方法は、試料の重亜硫酸塩処理を含まない。例えば、ＰＣＲを用いた方法によってメチル化状態の変化を検出できる。この方法では、（ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲなどによる）ＰＣＲ増幅の前に、１つ以上のメチル化感応性制限酵素（ＭＳＲＥ）でＤＮＡを消化する。通常、ＭＳＲＥは、１つ以上のＣｐＧモチーフを含む認識部位を有している。この認識部位が５－メチルシトシンを含んでいる場合、ＭＳＲＥの活性が阻害され切断されない（例えば、Beikircher 2018 Methods Mol Biol. 1708:407-424を参照。この文献は、メチル化状態の決定方法に関して参照により本明細書に組み込まれる）。したがって、ＭＳＲＥは、ＭＳＲＥ認識部位のメチル化状態に応じて、核酸を選択的に消化する。メチル化されていないＭＳＲＥ認識部位では、ＭＳＲＥはＤＮＡを消化できる。しかし、メチル化されているＭＳＲＥ認識部位では、ＭＳＲＥはＤＮＡを消化できない。特定の実施形態においては、分取した試料をＭＳＲＥで消化処理した試料を得てもよい。消化処理した試料においては、メチル化していないＤＮＡがＭＳＲＥによって切断される。そのため、ＭＳＲＥ認識部位内に１つ以上のメチル化部位（例えば、Ｄ

ＮＡのＭＳＲＥ認識部位内の１つ以上のメチル化部位）を有している切断されていないＤＮＡおよび／または増幅できるＤＮＡの割合は、ＭＳＲＥ認識部位内に１つ以上のメチル化部位（例えば、ＤＮＡのＭＳＲＥ認識部位内の１つ以上のメチル化部位）を有していない切断されていないＤＮＡおよび／または増幅できるＤＮＡの割合よりも相対的に増加する。次に、制限酵素で消化試料のうち切断されていない配列を、予備増幅し（ＰＣＲなどにより）、定量できる（ｑＰＣＲ、リアルタイムＰＣＲ、デジタルＰＣＲなどにより）。ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲ用のオリゴヌクレオチドプライマーは、１つ以上のＭＳＲＥ切断部位および／または複数のＭＳＲＥ切断部位を有している領域を増幅する。複数のＭＳＲＥ切断部位を有しているアンプリコンは、一般的に、ロバストな結果を生じる可能性が高い。ＤＭＲアンプリコン中に（１つのみの認識部位ではなく）複数のＭＳＲＥ認識部位を含むようにＤＭＲを設計すれば、ＤＭＲアンプリコン内の切断部位の数（および、いくつかの例においては、その結果として生じるＤＭＲのメチル化状態の決定に関するロバスト性）を増加させられる。種々の例においては、複数のＭＳＲＥを同じ試料に適用できる（例えば、ＡｃｉＩ、Ｈｉｎ６Ｉ、ＨｐｙＣＨ４ＩＶおよびＨｐａＩＩのうちの２つ以上（ＡｃｉＩ、Ｈｉｎ６ＩおよびＨｐｙＣＨ４ＩＶなど））。複数のＭＳＲＥ（例えば、ＡｃｉＩ、Ｈｉｎ６Ｉ、ＨｐｙＣＨ４ＩＶおよびＨｐａＩＩの組合せ；あるいは、ＡｃｉＩ、Ｈｉｎ６ＩおよびＨｐｙＣＨ４ＩＶの組合せ）により、ＤＭＲアンプリコン内のＭＳＲＥ認識部位の頻度を増加させられる。

【０１８１】

ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲは、ＭＳＲＥによる試料の消化の後かつｑＰＣＲの前に、事前の増幅工程を含んでもよい。これにより、利用可能な試料の量を改善できる（血中におけるｃｆＤＮＡの量は少ないため）。

【０１８２】

特定のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲの実施形態においては、ＤＮＡの総量を、通常の形態（例えば、消化されていない形態）にある分取した試料から測定する。この測定には、例えば、リアルタイムＰＣＲまたはデジタルＰＣＲを使用する。

【０１８３】

種々の増幅技術は、単独使用してもよいし、メチル化状態の検出に関して本明細書に記載の他の技術と組合せて使用してもよい。本明細書を検討した当業者であれば、本技術分野で周知および／または本明細書に記載の各種増幅技術と、本技術分野で周知および／または本明細書に記載のメチル化状態を決定する他の種々の技術とを、どのように組合せればよいかを理解するであろう。増幅技術の例としては、ＰＣＲ、定量ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）、リアルタイムＰＣＲおよび／またはデジタルＰＣＲが挙げられる（ただし、これらには限定されない）。当業者であれば理解するであろうところによると、ポリメラーゼ増幅によれば、１つの反応において複数の標的を多重に増幅できる。ＰＣＲアンプリコンの長さは、通常、１００～２０００塩基対である。種々の例において、増幅技術は、メチル化状態の決定に充分である。

【０１８４】

デジタルＰＣＲ（ｄＰＣＲ）を用いた方法は、例えばマイクロ流体デバイスを用いて、プレートのウェル（９６ウェル、３８４ウェル、またはそれ以上）または個々のエマルション液滴（ｄｄＰＣＲ）に試料を分割および分配する工程を含む。これにより、いくつかのウェルはテンプレートの１つ以上のコピーを含み、他のウェルはテンプレートのコピーを含まないようなる。したがって、増幅前においては、１ウェルあたりのテンプレート分子の平均数は１未満である。テンプレートが増幅されたウェルの数により、テンプレート濃度の尺度が与えられる。試料をＭＳＲＥと接触させた場合、テンプレートが増幅されたウェルの数により、メチル化されたテンプレートの濃度の尺度が与えられる。

【０１８５】

種々の実施形態においては、蛍光を用いたリアルタイムＰＣＲアッセイ（MethyLight(TM)など）によってメチル化状態を測定する（例えば、Campan 2018 Methods Mol Biol. 1708:497-513を参照。この文献は、メチル化状態の決定方法に関して参照により本

明細書に組み込まれる）。MethyLightは、蛍光を用いた定量的なリアルタイムＰＣＲであり、ゲノムの候補領域におけるＤＮＡのメチル化を高感度で検出・定量する。MethyLightは、高度にメチル化していないＤＮＡのバックグラウンドに低頻度で現れる、メチル化したＤＮＡ領域の検出に特に適している。これは、メチル化に特異的なプライマーおよびメチル化に特異的な蛍光プローブを組合せて用いるためである。さらに、疾患を検出およびスクリーニングするのに加えて、個々のメチル化分子を高感度で検出するために、MethyLightとデジタルＰＣＲとを組合せてもよい。

【０１８６】

メチル化状態の決定に使用するリアルタイムＰＣＲを用いた方法は、通常、外部標準の分析に基づいて、メチル化していないＤＮＡの較正曲線を作成する工程を含む。較正曲線は、２点以上の点から作成できる。較正曲線により、消化されたＤＮＡのリアルタイムのＣｔ値および／または消化されていないＤＮＡのリアルタイムのＣｔ値と、所与の定量標準とを比較できる。特定の例においては、ＭＳＲＥで消化されたおよび／またはＭＳＲＥで消化されていない試料（または分取した試料）について、試料のＣｔ値を決定してもよい。その上で、ＤＮＡのゲノム等価量を較正曲線から計算してもよい。ＭＳＲＥで消化されたＤＮＡおよびＭＳＲＥで消化されていないＤＮＡのＣｔ値を評価して、消化されたアンプリコンを同定してもよい（例えば、効率的に消化されたときのＣｔ値は４５である）。消化または未消化の条件下において増幅されなかったアンプリコンを同定してもよい。次に、所定のアンプリコンに関する補正後のＣｔ値を、条件の間で直接比較して、当該条件の間におけるメチル化状態の相対的差異を導出してもよい。代替的または追加的に、消化されたＤＮＡと消化されていないＤＮＡとのＣｔ値の差分によって、条件の間におけるメチル化状態の相対的な差を導出してもよい。

【０１８７】

メチル化状態の測定方法の例としては、メチル化状態を決定するための大規模並行シーケンシング（次世代シーケンシングなど）が挙げられる（ただし、これらには限定されない）。その例としては、合成によるシーケンシング、リアルタイムシーケンシング（単一分子シーケンシングなど）、ビーズエマルションシーケンシング、ナノポアシーケンシング、または本技術分野で周知の他のシーケンシング技術が挙げられる。いくつかの実施形態において、メチル化状態を測定する方法は、全ゲノムシーケンシングを含んでもよい（例えば、塩基対レベルの分解能のもの）。

【０１８８】

特定の実施形態において、ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲは、他の技術の中でも特に、１つのメチル化遺伝子座である（または、それを含む）大腸がんのメチル化バイオマーカーのメチル化状態の決定に使用されうる。特定の実施形態において、ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲは、他の技術の中でも特に、２つ以上のメチル化遺伝子座である（または、それを含む）大腸がんのメチル化バイオマーカーのメチル化状態の決定に使用されうる。特定の実施形態において、ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲは、他の技術の中でも特に、１つのメチル化可変領域（ＤＭＲ）である（または、それを含む）大腸がんのメチル化バイオマーカーのメチル化状態の決定に使用されうる。特定の実施形態において、ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲは、他の技術の中でも特に、２つ以上のＤＭＲである（または、それを含む）大腸がんのメチル化バイオマーカーのメチル化状態の決定に使用されうる。特定の実施形態において、ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲは、他の技術の中でも特に、１つのメチル化部位であるか（または、それを含む）大腸がんのメチル化バイオマーカーのメチル化状態の決定に使用されうる。特定の実施形態において、ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲは、他の技術の中でも特に、２つ以上のメチル化部位である（または、それを含む）大腸がんのメチル化バイオマーカーのメチル化状態の決定に使用されうる。種々の実施形態において、大腸がんのメチル化バイオマーカーは、本明細書に記載の任意の大腸がんのメチル化バイオマーカーでありうる。本発明は、特に、ＤＭＲの増幅用のオリゴヌクレオチドプライマー対を含む（表７に記載のＤＭＲの増幅用のものなど）。

【０１８９】

特定の実施形態において、ｃｆＤＮＡ試料は対象の血漿に由来し、ＭＳＲＥに接触させ

られる。このＭＳＲＥは、ＡｃｉＩ、Ｈｉｎ６Ｉ、ＨｐｙＣＨ４ＩＶおよびＨｐａＩＩのうちの１つ以上であるか、またはそれを含む（例えば、ＡｃｉＩ、Ｈｉｎ６ＩおよびＨｐｙＣＨ４ＩＶ）。１つ以上のＤＭＲのオリゴヌクレオチドプライマー対（表１３に記載の１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマー対など）によって、消化された試料を事前に増幅してもよい。１つ以上のＤＭＲのオリゴヌクレオチドプライマー対（表１３に記載の１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマー対など）によって、消化されたＤＮＡ（事前に増幅した消化されたＤＮＡなど）を、ｑＰＣＲで定量してもよい。決定されたｑＰＣＲのｃｔ値を、ＤＭＲアンプリコンのメチル化状態の決定に利用できる。

【０１９０】

当業者が理解するであろうところによると、表１３に記載のオリゴヌクレオチドプライマー対は、本明細書に記載の大腸がんのメチル化バイオマーカーとの任意の組合せにおいて使用できる。当業者が認識するであろうところによると、特定の所望のＤＲＭの組合せを分析するための所与の分析において、表２のオリゴヌクレオチドプライマー対は、それぞれ含まれていてもよいし、含まれていなくてもよい。

【０１９１】

さらに、当業者が理解するであろうところによると、他のオリゴヌクレオチドプライマー対を使用してもよい。オリゴヌクレオチドプライマーを選抜およびペアリングして有用なＤＭＲアンプリコンを産生させることは、自明ではなく、実質的な寄与を表している。

【０１９２】

さらに、当業者が理解するであろうところによると、ｑＰＣＲのための方法、試薬およびプロトコルが本技術分野で周知である。従来のＰＣＲとは異なり、ｑＰＣＲは、増幅中における経時的なアンプリコンの産生を検出できる（例えば、各増幅サイクルの終わりにおいて検出できる）。多くの場合、この検出には、増幅応答性の蛍光システムを使用する（例えば、蛍光検出能力を有するサーモサイクラーと組合せて使用する）。ｑＰＣＲに使用される２種類の一般的な蛍光レポーターとしては、（ｉ）結合しているときの蛍光の方が結合していないときの蛍光よりもに実質的に明るくなる２本鎖ＤＮＡ結合色素；（ｉｉ）ラベル化されているオリゴヌクレオチド（ラベル化されているオリゴヌクレオチドプライマーまたはラベル化されているオリゴヌクレオチドプローブなど）が挙げられる。

【０１９３】

当業者であれば理解するであろうところによると、本明細書に記載の大腸がんのスクリーニング方法において複数のメチル化遺伝子座（複数のＤＭＲなど）のメチル化状態を解析する実施形態においては、各メチル化遺伝子座のメチル化状態を、種々の形式によって測定または表現してもよい。また、複数のメチル化遺伝子座のメチル化状態（好ましくは、それぞれが、同じ様式、類似した様式または対比的な様式で測定および／または表現されている）は、一緒にまたは累積的に、種々の形式によって分析または表現される。種々の実施形態において、各メチル化遺伝子座のメチル化状態は、ｃｔ値として測定してもよい。種々の実施形態において、各メチル化遺伝子座のメチル化状態は、測定された試料と参照との間のｃｔ値の差として表してもよい。種々の実施形態において、各メチル化遺伝子座のメチル化状態は、参照との定性的な比較として表してもよい（例えば、各メチル化遺伝子座を高メチル化されているものと、高メチル化されていないものとに識別することによって）。

【０１９４】

１つのメチル化遺伝子座を分析するいくつかの実施形態において、１つのメチル化遺伝子座が高メチル化されている場合は、対象が大腸がんを患っている（または、おそらく患っている）と診断される。一方、１つのメチル化遺伝子座が高メチル化していない場合は、対象が大腸がんを患っていない可能性が高いと診断される。いくつかの実施形態において、複数のメチル化遺伝子座を分析したうち１つのメチル化遺伝子座（１つのＤＭＲなど）が高メチル化している場合は、対象が大腸がんに罹患している（または、おそらく罹患している）と診断される。一方、複数のメチル化遺伝子座を分析したうち、任意のメチル化遺伝子座が高メチル化されていない場合は、対象が大腸がんに罹患していない可能性が

高いと診断される。いくつかの実施形態において、複数のメチル化遺伝子座を分析したうち決定された割合（例えば、所定の割合）のメチル化遺伝子座が高メチル化している場合は（例えば、１０％以上、２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、または１００％以上）、対象が大腸がんに罹患している（または、おそらく罹患している）と診断される。一方、複数のメチル化遺伝子座を分析したうち決定された割合（例えば、所定の割合）のメチル化遺伝子座が高メチル化していない場合は（例えば、１０％以上、２０％以上、３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上または１００以上）、対象が大腸がんに罹患していない可能性が高いと診断される。いくつかの実施形態において、複数のメチル化遺伝子座を分析したうちの（例えば、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、１０個、１１個、１２個、２３個、２４個、２５個、２６個、２７個、または２８個のＤＭＲ）、決定された数が高メチル化している場合は（例えば、２個以上、３個以上、４個以上、５個以上、６個以上、７個以上、８個以上、９個以上、１０個以上、１１個以上、１２個以上、１３個以上、１４個以上、１５個以上、１６個以上、１７個以上、１８個以上、１９個以上、２０個以上、２１個以上、２２個以上、２３個以上、２４個以上、２５個以上、２６個以上、２７個以上または２８個以上のＤＭＲ）、対象が大腸がんに罹患している（または、おそらく罹患している）と診断される。一方、複数のメチル化遺伝子座を分析したうちの（例えば、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、１０個、１１個、１２個、２３個、２４個、２５個、２６個、２７個、または２８個のＤＭＲ）、決定された数が高メチル化していない場合は（例えば、２個以上、３個以上、４個以上、５個以上、６個以上、７個以上、８個以上、９個以上、１０個以上、１１個以上、１２個以上、１３個以上、１４個以上、１５個以上、１６個以上、１７個以上、１８個以上、１９個以上、２０個以上、２１個以上、２２個以上、２３個以上、２４個以上、２５個以上、２６個以上、２７個以上または２８個以上のＤＭＲ）、対象が大腸がんに罹患していない可能性が高いと診断される。

【０１９５】

いくつかの実施形態においては、複数のメチル化遺伝子座（複数のＤＭＲなど）のメチル化状態を定性的または定量的に測定し、複数のメチル化遺伝子座の各々に関する測定値を組合せて診断を下す。いくつかの実施形態においては、複数のメチル化遺伝子座について定量的に測定したメチル化状態のうち、定性的なものを個別に重み付けする。重み付けした値を組合せて、診断のために参照と比較可能な１つの値を与える。このようなアプローチの一例として、サポートベクターマシン（ＳＶＭ）アルゴリズムを利用して本開示の複数のメチル化遺伝子座のメチル化状態を分析し、診断を下せる。サポートベクターマシンアルゴリズムの目的の少なくとも一つには、データポイントを明確に分類するようなＮ次元空間上の超平面を特定することがある（Ｎ：特徴の数）。これは、マージンが最大となる（各クラスのデータポイントとの距離が最大となる）平面を見付けることによりなされる。本願実施例で検討している通り、予測が行われるベクトル値を支持するように変換された訓練用試料群（例えば、第１対象群および／または第２対象群）から導出されるマーカー値（Ｃｔ値など）により、ＳＶＭモデルは構築される。新しい試料に対してＳＶＭモデルを適用する際には、モデルのベクトル空間上に試料をマッピングし、第１状態または第２状態に属する可能性を有するものとして分類する（例えば、２つの状態の間隙に対する新しい試料の位置に基づいて）。当業者であれば理解するであろうところによると、関連する組成および方法が一度特定されたならば、ベクトル値と、R-packageのpredict()関数によって定義されるＳＵＶアルゴリズムとを組合せて用いて、新しい試料についての予測を容易になしうる（https://cran.r-project.org/web/packages/e1071/index.htmlを参照。このＳＵＶは、参照により本明細書に組み込まれる）。したがって、本明細書に記載の大腸がんの診断のための組成物および方法が手許にあれば、アルゴリズムへの入力情報と、R-packageのpredict()関数とを組合せて利用して予測モデルを生成し、大腸

がんを容易に診断できるであろう（https://cran.r-project.org/web/packages/e1071/index.htmlを参照。このＳＵＶは、参照により本明細書に組み込まれる）。例示として、本明細書に記載の複数のＤＭＲのメチル化状態の解析による大腸がんの診断に使用するためのＳＶＭベクトルの非限定的な一例を、表１７に示す。当業者であれば理解するであろうところによると、本開示に基づけば、本明細書に記載の方法（あるいは、本技術分野で周知の方法）に従ってＳＶＭベクトルを生成できる。

【０１９６】

【表１３】

表13：大腸がんのDMRｵﾘｺﾞﾇｸﾚｵﾁﾄﾞﾌﾟﾗｲﾏｰ対（MSRE-qPCR用のものなど）

遺伝子名	Fp_Seq	Rp_Seq	Fp 配列番号	Rp 配列番号
ALK	CCTCCTCACCCATCATCAGCGCCC	GGTACCTCCCGCCGCCTCTGTTC	45	46
CNRIP1	GCGTGCTGGGTTTAATCTTCACCTCAA	ACGGCCCGGTCTTTTACAAGGTGG	47	48
LONRF2	AGGAAGCAAAGTGACCCCTAAGCCT	GGTCCGCCTCCCCTACACCT	49	50
LONRF2	CTCTCAGTCCCGCCGGCTTAGGTA	GCAAGAGACGCGGACCTGGAGC	51	52
ADAMTS2	CCACTGCGAAGGGAAGGGGCA	CCCTGTTAACGCCCCTTCCCGGTT	53	54
ADAMTS2	GCGACCCCAGAAGCCAGCCT	AACGGCTGGGGAGTGGCGGA	55	56
FGF14	CAACGGAAACTTCCCGCGCTAC	CTCGCCGGGGGCTTCGCTAC	57	58
DMRT1	CAAAGCGTCTGGGGCGCTAGT	ACTTCTTGCTCCCGGCACCCAGGTC	59	60
ST6GALNAC5	CGCTCAGCCGCTCTCCTCTTCTCT	AGCGCTAAACACACTGCCAGACCA	61	62
MCIDAS	GGGTTCGGAGCGTGCAAAAGGTGA	GAACAGTTCAGTGCATCCCCGCCC	63	64
MCIDAS	GCGCCCCACTTACATCCAGCACC	ACGTGACATTGACCCAGAAACAGGAGGA	65	66
PDGFD	AACGTCTATCACCCAGGGAAAGCT	TCCCGGAGTTGGCGAAAGTTGCAA	67	68
PDGFD	GGTGCATTTGGGATCAGCGACTAGAGAC	GATTAGCACAGCGACCCGGGCCAG	69	70
GSG1L	CCGAAAGAAATCCGAGCCAGGGTGA	GGTTTTGTTGCCCCACGTCC	71	72
ZNF492	CGAGAGAGGGGAAGGGGCTGGTTG	CGAACTTGGGGCGCAGATTGTGG	73	74
ZNF568	GCCCAAGCCTCACCCTCACACAG	CGAACCATCCCTCCGCGCCA	75	76
ZNF568	GGTCGCCTTCACCCAGCATCTCAG	CAGCGTCACCTGCCGGAAACACC	77	78
ZNF542	CCAGAGGCCCAGGGATCCGTTCAG	ACGCGAGCATTCTTGTAAGGCACCC	79	80
ZNF542	GGGAGGAGTGGGCGGCTGAATGG	GCACCCGCCACCTCCAAACTCAG	81	82
ZNF471	CCCCACGCGTACTCACACCGAAG	GCGGGTAAGAGCAGGAGTGTG	83	84
ZNF471	GTCGCGCGTTTCCCTCCCAG	GCGGGTAAGAGCAGGAGTGTG	85	86
ZNF471	CTGCTCTTACCCGCCGGAACCCTG	GAGGGACCTTAGAGCAGAGCGGGC	87	88
ZNF132	CTACTGCTAGGTCGTTGCCAAGG	TGATTGGCCAGCGTCTTACACTCCG	89	90
ZNF132	GTGTAAGACGCTGGCCAATCACA	ACAACGCGGTCCCTTCAGAAGCAG	91	92
JAM2	CCGCGTGGTCTGGGCTCTGTAG	GAATTCCCTCCACCTCCGCCCCAC	93	94
ZNF492	CAACGTTAAAGGCAAACACCTTCTGC	GGCCGAATGAGGACAGAGTGACAG	95	96
CNRIP1	GCCGGTGAGCAGCTTGATGGT	ACGGCCCGGTCTTTTACAAGG	97	98
ADAMTS2	CGGGAAGGGGCGTTAACAGGGC	TCTTGGCAGGCAAGGTCTCCGGAG	99	100

【０１９７】

〔用途〕

本開示の方法および組成物は、種々の用途のいずれにおいても使用できる。例えば、本開示の方法および組成物は、大腸がんのスクリーニングに（または、大腸がんのスクリーニングの補助に）使用できる。種々の例において、本開示の方法および組成物を使用する

スクリーニングは、任意のステージの大腸がん（ステージの早い大腸がんが含まれるが、これには限定されない）を検出できる。いくつかの実施形態においては、本開示の方法および組成物を使用する大腸がんのスクリーニングを、５０歳以上の個体に適用する（５０歳以上、５５歳以上、６０歳以上、６５歳以上、７０歳以上、７５歳以上、８０歳以上、８５歳以上または９０歳以上など）。いくつかの実施形態においては、本開示の方法および組成物を使用する大腸がんのスクリーニングを、２０歳以上の個体に適用する（２０歳以上、２５歳以上、３０歳以上、３５歳以上、４０歳以上、４５歳以上、５０歳以上、５５歳以上、６０歳以上、６５歳以上、７０歳以上、７５歳以上、８０歳以上、８５歳以上または９０歳以上など）。いくつかの実施形態においては、本開示の方法および組成物を使用する大腸がんのスクリーニングを、２０～５０歳の個体に適用する（２０～３０歳、２０～４０歳、２０～５０歳、３０～４０歳、３０～５０歳または４０～５０歳など）。種々の実施形態においては、本開示の方法および組成物を使用する大腸がんのスクリーニングを、例えば、腹痛または不快感を有する個体（診断されていない腹痛もしくは不快感、または、不完全にしか診断されていない腹痛もしくは不快感を有する個体など）に適用する。種々の実施形態においては、本開示の方法および組成物を使用する大腸がんのスクリーニングを、大腸がんに関連する可能性が高い症状を有していない個体に適用する。したがって、特定の実施形態において、本開示の方法および組成物を使用する大腸がんのスクリーニングは、少なくともステージの遅い大腸がん（または、ステージが早くない大腸がん）に対して、完全にまたは部分的に予防的である。

【０１９８】

種々の実施形態においては、本開示の方法および組成物を使用する大腸がんのスクリーニングを、無症状であるヒト対象に適用してもよい。本明細書において用いられるとき、非侵襲的に観測できる証拠（デバイスを用いるプロービング、組織試料分析、体液分析、外科手術または大腸がんのスクリーニングのうち、１つ、複数または全てを伴わない証拠）を対象が報告または提示していない場合、当該対象を「無症状である」と称してもよい。あるいは、対象が大腸がんに罹患している可能性が高いという医学的に合理的な疑いを支持するのに充分な大腸がんの特徴を対象が報告または提示していない場合、当該対象を「無症状である」と称してもよい。あるいは、対象ががんを報告または提示していない場合、当該対象を「無症状である」と称してもよい。ステージの早い大腸がんの検出は、本開示の方法および組成物に従ってスクリーニングされた症状のない個体において、特に可能性が高い。

【０１９９】

種々の実施形態においては、本開示の方法および組成物を使用する大腸がんのスクリーニングを、症状のあるのヒト対象に適用してもよい。本明細書において用いられるとき、非侵襲的に観測できる証拠（デバイスを用いるプロービング、組織試料分析、体液分析、外科手術または大腸がんのスクリーニングのうち、１つ、複数または全てを伴わない証拠）を対象が報告または提示している場合、当該対象を「症状のある」と称してもよい。あるいは、対象が大腸がんに罹患している可能性が高いという医学的に合理的な疑いを支持するのに充分な大腸がんの特徴を対象が報告または提示している場合、当該対象を「症状のある」と称してもよい。あるいは、対象ががんを報告または提示している場合、当該対象を「症状のある」と称してもよい。大腸がんの症状の例としては、長期にわたる（例えば、３日間以上続く）排便習慣の変化（下痢、便秘または便の狭窄など）、便通がなくとも便意があるという感覚、直腸の出血（鮮血が混じるなど）、血便（便が濃く見えることがある）、腹部痙攣、腹痛、衰弱、疲労、意図しない体重減少、貧血、およびこれらの組合せが挙げられる（ただし、これらには限定されない）。当業者であれば理解するであろうところによると、それぞれ単独では大腸がんの疑いを示唆または惹起しない症状であっても、組合せで示される場合には大腸がんの疑いを示唆または惹起することがある（例えば、腹部痙攣および血便の組合せがあるが、これには限定されない）。

【０２００】

当業者であれば理解するであろうところによると、定期的および／または予防的な大腸

がんのスクリーニングにより、大腸がんの診断が改善される。この大腸がんには、ステージの早いがんが含まれるか、あるいはステージの早いがんである。上述の通り、ステージの早いがんには、がんのステージ分類体系のいずれか１つ以上における、ステージ０～ＩＩＣの大腸がんが含まれる。したがって、本開示は、ステージの早い大腸がんの診断および処置に特に有用な方法および組成物を提供する。本開示の大腸がんスクリーニングが毎年実施される（あるいは、スクリーニング時において対象が無症状である）一般的かつ特定の実施形態においては、本発明の方法および組成物がステージの早い大腸がんを検出する可能性は特に高い。

【０２０１】

種々の実施形態においては、本開示の大腸がんのスクリーニングを、所与の対象について１回または複数回実施する。種々の実施形態においては、本開示の大腸がんのスクリーニングを定期的に実施する（６ヶ月ごと、１年ごと、２年ごと、３年ごと、４年ごと、５年ごとまたは１０年ごとなど）。

【０２０２】

種々の実施形態において、本明細書に記載の方法および組成物を使用する大腸がんのスクリーニングは、大腸がんの診断を提供する。他の例において、本明細書に記載の方法および組成物を使用する大腸がんのスクリーニングは、大腸がんの診断を示すが、確定診断ではない。本開示の方法および組成物を大腸がんのスクリーニングに使用する種々の例においては、本開示の方法および組成物を使用するスクリーニングに引き続いて、追加の診断確定アッセイを行ってもよい。この追加のアッセイは、以前のスクリーニング（本開示のスクリーニングなど）から生じる診断を、確認、支持、反対または否定することがある。本明細書において用いられるとき、診断確定アッセイとは、医師にとって確定的であると認識される診断（結腸内視鏡検査に基づく診断など）を提供する大腸がんアッセイでありうる。あるいは、以前の診断（本開示スクリーニングに基づく診断など）が正しい可能性を実質的に増加または減少させる大腸がんアッセイでありうる。診断確定アッセイには、既存のスクリーニング技術が含まれていてもよい。ただし、既存のスクリーニング技術は、とりわけステージの早い大腸がんの検出においては、感度、特異度および非侵襲性のうち１つ以上に関して、一般的に改善が必要である。

【０２０３】

いくつかの例において、診断確定アッセイは、対象組織の視覚的または構造的な検査である（または、それを含む）試験である（結腸内視鏡検査など）。いくつかの実施形態において、結腸内視鏡検査は、組織学分析を含む（または、それに引き続く）。大腸がんに関する視覚的および／または構造的なアッセイは、任意の病理組織および／または病理構造に関する結腸および／または直腸の構造的な検査を含んでいてもよい。視覚的および／または構造的な検査は、例えば、経直腸的なスコープの使用またはＣＴスキャンによって実施できる。いくつかの例において、診断確定アッセイは、結腸内視鏡検査である（例えば、組織学的解析を含むか、またはそれに引き続く）。いくつかの報告によると、結腸内視鏡検査は現在主流であり、最も信頼されている診断確定アッセイである。

【０２０４】

コンピュータ断層撮影（ＣＴ）に基づく他の視覚的および／または構造的な診断確定アッセイとして、ＣＴコロノグラフィがある（仮想結腸内視鏡検査と呼ばれることもある）。ＣＴスキャンでは、結腸および／または直腸の多数のＸ線画像を利用して、結腸の立体的な表示を作成する。ＣＴコロノグラフィは診断確定アッセイとして有用であるが、一部の報告が示唆するところによると、結腸内視鏡検査に取って代わるには充分でない。これは、少なくとも部分的には、対象の結腸に医師が物理的にアクセスできず、組織学分析用の組織が得られないためである。

【０２０５】

他の診断確定アッセイとして、Ｓ状結腸内視鏡検査がある。Ｓ状結腸内視鏡検査においては、Ｓ状結腸内視鏡を直腸経由で使用して、結腸および／または直腸の一部を画像化する。一部の報告によると、Ｓ状結腸内視鏡検査は広く用いられていない。

【０２０６】
いくつかの例において、診断確定アッセイは、便に基づくアッセイである。便に基づくアッセイを視覚的検査または構造的検査の代わりに使用する場合は、通常、視覚的検査または構造的検査の場合に必要とされるよりも高頻度で実施することが推奨されている。いくつかの例において、診断確定アッセイは、グアヤックによる便潜血検査または便免疫化学検査（ｇＦＯＢＴ／ＦＩＴ）である（例えば、Navarro 2017 World J Gastroenterol. 23(20):3632-3642を参照。この文献は、大腸がんアッセイに関して参照により本明細書に組み込まれる）。ＦＯＢＴおよびＦＩＴは、大腸がんの診断に頻繁に使用されている（例えば、Nakamura 2010 J Diabetes Investig. Oct 19;1(5):208-11を参照。この文献は、大腸がんアッセイに関して参照により本明細書に組み込まれる）。ＦＩＴは、便潜血の検出に基づいており、便潜血は大腸がんを示唆することもある。しかし、便潜血は、肉眼で識別できるほど充分な量ではないこともある。例えば、典型的なＦＩＴでは、ヘモグロビンに特異的な試薬を用いて便試料中の潜血を検査する。種々の例において、ＦＩＴキットは、在宅中の個人による使用に適している。他の診断確定アッセイがない場合に使用する場合は、ＦＩＴを年１回行うことが推奨されることもある。一般的に、ＦＩＴは、大腸がんの確定診断に充分な診断情報を提供するとは信頼されていない。
【０２０７】
診断確定アッセイには、ｇＦＯＢＴも含まれる。この検査は、化学反応によって便潜血を検出するように設計されている。他の診断確定アッセイがない場合に使用する場合は、ＦＩＴと同じく、ｇＦＯＢＴを年１回行うことが推奨されることもある。一般的に、ｇＦＯＢＴは、大腸がんの確定診断に充分な診断情報を提供するとは信頼されていない。
【０２０８】
診断確定アッセイには、便ＤＮＡ検査も含まれる。大腸がん用の便ＤＮＡ検査は、便検体中のがんに特徴的なＤＮＡ配列を同定するように設計されていてもよい。他の診断確定アッセイがない場合には、３年ごとに便ＤＮＡ検査を実施することが推奨される。一般的に、便ＤＮＡ検査は、大腸がんの確定診断に充分な診断情報を提供するとは信頼されていない。
【０２０９】
ある特定のスクリーニング技術として、便に基づくスクリーニング検査がある（Cologuard(R), Exact Sciences Corporation, Madison, WI, United States）。この検査は、ＦＩＴアッセイと、異常修飾されたＤＮＡ（変異およびメチル化など）の分析とを組合せている。Cologuard(R)検査は、ＦＩＴアッセイ単独と比較すると感度が改善されている。しかし、遵守率が低いために、臨床上実用的でないか、効果がない可能性がある。遵守率が低いのは、少なくとも部分的には、便に基づくアッセイの使用を対象が好まないためである（例えば、doi: 10.1056/NEJMc1405215; 2014 N Engl J Med. 371(2):184-188を参照）。Cologuard(R)検査では、スクリーニングプログラムの適格集団のうち、ほぼ半分が残されているようである（例えば、van der Vlugt 2017 Br J Cancer. 116(1):44-49参照）。本明細書に記載のスクリーニングは、例えば血液に基づく分析によるので、大腸がんのスクリーニングを選択する個人の数が増えるかもしれない（例えば、Adler 2014 BMC Gastroenterol. 14:183; Liles 2017 Cancer Treatment and Research Communications 10: 27-31を参照）。現在の知見によると、既存の大腸がんのスクリーニング技術のうち、ＦＤＡの承認を受け、ＣＥ－ＩＶＤマークを付与され、血液に基づくものは、Epiprocolonのみである。Epiprocolonは、ＳＥＰＴ９遺伝子の高メチル化を利用している。Epiprocolon検査は、感度が６８％（進行性腺腫の感度に至っては２２％）であり、大腸がん検出の確度が低い（例えば、Potter 2014 Clin Chem. 60(9):1183-91を参照）。対象による遵守率が高い可能性があり、特異度および／または感度が高いおよび／または向上した、非侵襲性の大腸がんのスクリーニングが本技術分野で必要とされている。
【０２１０】
種々の実施形態において、本開示の方法および組成物によるスクリーニングにより、大

腸がんの死亡率が低下する（例えば、大腸がんの早期診断によって）。大腸がんのスクリーニングにより大腸がんの死亡率が低下することをデータは支持しており、その効果は３０年以上に及んでいる（例えば、Shaukat 2013 N Engl J Med. 369(12):1106-14を参照）。さらに、大腸がんは、少なくとも部分的には特に処置が困難である。これは、大腸がんには適切な時期のスクリーニングがなく、早いステージを過ぎるまで検出されない可能性があるためである。少なくとも上記の理由から、大腸がんの処置は成功しないことが多い。集団全体の大腸がんの処置成績を最大限に向上させるために、本開示のスクリーニングの利用と、例えば広範なスクリーニングを確実に実施するための適格な対象の募集とを組合せてもよい。

【０２１１】

種々の実施形態においては、本明細書に記載の１つ以上の方法および／または組成物を含む大腸がんのスクリーニングに続いて、大腸がんを処置する（例えば、ステージの早い大腸がんを処置する）。種々の実施形態において、大腸がん（ステージの早い大腸がんなど）の処置には、外科手術、放射線療法および化学療法のうち１つ以上を含む処置レジメンの適用が含まれる。種々の実施形態において、大腸がん（ステージの早い大腸がんなど）の処置には、ステージ０の大腸がん、ステージＩの大腸がんおよび／またはステージＩＩの大腸がんを処置するための、本明細書に記載の処置の１つ以上を含む処置レジメンの適用が含まれる。

【０２１２】

種々の実施形態において、大腸がんの処置は、ステージの早い大腸がん（ステージ０の大腸がんまたはステージＩの大腸がんなど）の処置を含む。この処置は、がん性組織の外科的切除（例えば、結腸内視鏡による局所切除、結腸部分切除、または結腸完全切除）の１つ以上による処置である。

【０２１３】

種々の実施形態において、大腸がんの処置は、ステージの早い大腸がん（ステージＩＩの大腸がんなど）の処置を含む。この処置は、がん組織の外科的除去（例えば、結腸内視鏡による局所切除、結腸部分切除、または結腸完全切除）、同定された大腸がん組織に近いリンパ節の外科的除去、および化学療法（５－ＦＵおよびロイコボリン、オキサリプラチンまたはカペシタビンの１つ以上の投与など）のうち１つ以上による処置である。

【０２１４】

種々の実施形態において、大腸がんの処置は、ステージＩＩＩの大腸がんの処置を含む。この処置は、外科的切除（例えば、局所切除（結腸内視鏡検査による切除など）、結腸部分切除、または結腸完全切除）、同定された大腸がん組織に近いリンパ節の外科的除去、化学療法（５－ＦＵ、ロイコボリン、オキサリプラチン、カペシタビンの１つ以上の投与など。例えば、（ｉ）５－ＦＵおよびロイコボリンの組合せ、（ｉｉ）５－ＦＵ、ロイコボリンおよびオキサリプラチンの組合せ（ＦＯＬＦＯＸなど）、（ｉｉｉ）カペシタビンおよびオキサリプラチンの組合せ（ＣＡＰＥＯＸなど））、および放射線療法のうち１つ以上による処置である。

【０２１５】

種々の実施形態において、大腸がんの処置は、ステージＩＶの大腸がんの処置を含む。この処置は、がん組織の外科的除去（例えば、結腸内視鏡による局所切除、結腸部分切除、または結腸完全切除）、同定された大腸がん組織に近いリンパ節の外科的除去、転移がんの外科的除去、化学療法（例えば、５－ＦＵ、ロイコボリン、カペシタビン、イリノテカン、ＶＥＧＦ標的処置薬（ベバシズマブ、ジブ－アフリベルセプトまたはラムシルマブなど）、ＥＧＦＲ標的処置薬（セツキシマブまたはパニツムマブなど）、レゴラフェニブ、トリフルリジンおよびチピラシルのうち１つ以上の投与。例えば、以下の組合せまたは以下を含む組合せ：（ｉ）５－ＦＵおよびロイコボリン；（ｉｉ）５－ＦＵ、ロイコボリンおよびオキサリプラチン（ＦＯＬＦＯＸなど）；（ｉｉｉ）カペシタビンおよびオキサリプラチン（ＣＡＰＥＯＸなど）；（ｉｖ）ロイコボリン、５－ＦＵ、オキサリプラチンおよびイリノテカン（ＦＯＬＦＯＸＩＲＩ）；（ｖ）トリフルリジンおよびチピラシル（

Ｌｏｎｓｕｒｆ））、放射線療法、肝動脈注入（がんが肝転移した場合など）、腫瘍の焼灼、腫瘍塞栓術、結腸ステント、結腸切除、人工肛門造設術（回腸における人工肛門造設術など）、および免疫療法（ペムブロリズマブなど）のうち１つ以上による処置である。

【０２１６】

当業者であれば、単独または任意の組合せで、任意の順序、レジメンおよび／または処置において、本明細書に記載の大腸がんの処置を利用できる（例えば、医師により決定されるように）。さらに、当業者が理解するであろうところによると、以前にがんまたは大腸がんに罹患していた対象（再発大腸がんと診断された対象など）におけるステージの早いがんにとっては、一歩進んだ処置オプションが適切である場合がある。

【０２１７】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の大腸がんのスクリーニングのための方法および組成物は、処置および／または（例えば、スクリーニングまたは処置などの医療費の補償または還元のための）支払の、決定および／または行為に関する情報を与えてもよい。この決定および／または行為の主体の例としては、個人、医療施設、医療従事者、健康保険提供者、政府機関または医療費に利害のある他の当事者が挙げられる。

【０２１８】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の大腸がんのスクリーニングのための方法および組成物は、医療費の支払者または受給者に健康保険提供者が補償するかしないかの意思決定に関する情報を与えてもよい。補償の例としては、（１）スクリーニングそれ自体に対する補償（例えば、他の方法では利用できないスクリーニング、周期的／定期的スクリーニングとしてのみ利用できるスクリーニング、一時的にのみ利用できるスクリーニング、および／または、偶発的動機によるスクリーニング）；および／または、（２）例えば、スクリーニング結果に基づく処置（処置の開始、継続および／または変更を含む）に対する補償が挙げられる。例えば、いくつかの実施形態においては、本明細書に記載の大腸がんのスクリーニングのための方法および組成物を、保健医療費の支払者または受給者に対する補償を行うか否か、あるいは費用を減免するか否かに関する決定の根拠、決定の要因または決定に対する支持として用いる。いくつかの例において、補償または費用の減免を求める当事者は、本明細書にしたがって行われるスクリーニングの結果を、医療費の補償または費用の減免の申請書と併せて提出してもよい。いくつかの例において、医療費の補償または費用の減免を行うか否かを決定する当事者は、本明細書にしたがって行われるスクリーニング結果の診療報酬明細書および／または審査結果に基づいて、全体的または一部の決定を下す。

【０２１９】

疑いを避けるために、当業者であれば本開示に基づき理解するであろうところによると、本明細書に記載の大腸がん診断のための方法および組成物は、少なくともインビトロにおける使用のためのものである。したがって、本開示の態様および実施形態はいずれも、少なくともインビトロにおいて実施および／または使用できる。

【０２２０】

〔キット〕

本開示には、とりわけ、本明細書に記載の大腸がんのスクリーニングにおいて使用するための組成物の１つ以上を含むキットが含まれる。任意で、大腸がんのスクリーニングにおいてキットを使用するための説明書も、併せて含まれる。種々の実施形態において、大腸がんのスクリーニング用キットは、次のうち１つ以上を含んでいてもよい：（ｉ）１つ以上オリゴヌクレオチドプライマー（例えば、１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマー対。表１３に記載のものなど）、（ｉｉ）１つ以上のＭＳＲＥ、（ｉｉｉ）ｑＰＣＲ用の１つ以上の試薬（例えば、ｑＰＣＲ反応混合物の完成に充分な試薬。ｄＮＴＰおよびポリメラーゼが挙げられるが、これらに限定されない）、（ｉｖ）大腸がんのスクリーニング用キットに含まれる１つ以上の要素の使用説明書。種々の実施形態において、大腸がんのスクリーニング用キットは、次のうち１つ以上を含んでいてもよい：（ｉ）１つ以上オリゴヌクレオチドプライマー（例えば、１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマー対。表１

３に記載のものなど）、（ｉｉ）１つ以上の重亜硫酸塩試薬、（ｉｉｉ）ｑＰＣＲ用の１つ以上の試薬（例えば、ｑＰＣＲ反応混合物の完成に充分な試薬。ｄＮＴＰおよびポリメラーゼが挙げられるが、これらに限定されない）、（ｉｖ）大腸がんのスクリーニング用キットに含まれる１つ以上の要素の使用説明書。

【０２２１】

特定の実施形態において、本開示のキットは、本明細書に記載のメチル化遺伝子座および／またはＤＭＲを増幅するための、１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマー対を含む。

【０２２２】

いくつかの例において、本開示のキットは、本開示の１つ以上のメチル化遺伝子座を増幅するための１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマー対を含む。いくつかの例において、本開示のキットは、１つ以上のメチル化遺伝子座であって、表１に記載の１つ以上の遺伝子のである（または、その全部または一部を含む）遺伝子座を増幅するための１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマー対を含む。いくつかの特定の例において、本開示のキットは、複数のメチル化遺伝子座であって、いずれも表１に記載の遺伝子のである（または、その全部または一部を含む）遺伝子座のためのオリゴヌクレオチドプライマー対を含む。ここで言う複数のメチル化遺伝子座には、例えば、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個または１６個のメチル化遺伝子座が含まれる（表１～６のいずれかに記載されているものなど）。

【０２２３】

いくつかの例において、本開示のキットは、本開示の１つ以上のＤＭＲを増幅するための１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマー対を含む。いくつかの例において、本開示のキットは、１つ以上のＤＭＲであって、表１に記載の遺伝子である（または、当該遺伝子の全部または一部を含む、もしくは当該遺伝子内にある）ＤＭＲを増幅するための１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマー対を含む。いくつかの例において、本開示のキットは、複数のＤＭＲであって、表１に記載の遺伝子である（または、当該遺伝子の全部または一部を含む、もしくは当該遺伝子内にある）ＤＭＲ用のオリゴヌクレオチドプライマー対を含む。ここで言う複数のＤＭＲには、例えば、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個または１６個のＤＭＲが含まれる（表１～６のいずれかに記載されているものなど）。

【０２２４】

いくつかの例において、本開示のキットは、表７に記載の１つ以上のＤＭＲを増幅するための１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマー対を含む。いくつかの特定の例において、本開示のキットは、表７に記載の複数のＤＭＲのためのオリゴヌクレオチドプライマー対を含む。ここで言う複数のＤＭＲには、例えば、表７に記載のＤＭＲのうち、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、２１個、２２個、２３個、２４個、２５個、２６個、２７個または２８個のＤＭＲを含む（表８～１２のいずれかに記載のＤＭＲなど）。

【０２２５】

種々の実施形態において、本開示のキットは、表１３に記載の１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマー対を含む。当業者であれば理解するであろうところによると、表１３に記載のオリゴヌクレオチドプライマー対は、１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマー対の任意の組合せにおいて提供されうる（表１～１２のいずれかに記載の組合せなど）。

【０２２６】

種々の特定の実施形態において、本開示のキットは、ＦＧＦ１４、ＺＮＦ４７１、ＰＤＧＦＤおよびＡＬＫのうちの１つ以上の全部または一部を増幅するオリゴヌクレオチドプライマー対を含まない。

【０２２７】

本開示のキットは、１つ以上のＭＲＳＥをさらに含んでいてもよい。ＭＲＳＥは、それぞれ別々に用意されていてもよいし、１つの溶液に含まれていてもよい。種々の実施形態

において、１つ以上ＭＳＲＥは、ＡｃｉＩ、Ｈｉｎ６Ｉ、ＨｐｙＣＨ４ＩＶおよびＨｐａＩＩを含むＭＳＲＥ群から選択される（例えば、キットは、ＡｃｉＩ、Ｈｉｎ６ＩおよびＨｐｙＣＨ４ＩＶを、それぞれ別々に含むか、あるいは１つの溶液中に含む）。特定の実施形態において、本開示のキットは、ｑＰＣＲ用の１つ以上の試薬を含む（ｑＰＣＲ反応混合物の完成に充分な試薬。ｄＮＴＰおよびポリメラーゼなどであるが、これらに限定されない）。

【０２２８】

〔実施例〕

本実施例によって確認されるところによると、本開示は、とりわけ、大腸がんのスクリーニングおよび処置のための方法および組成物を提供する。本実施例がさらに実証するところによると、本明細書に記載の組成物および方法は、大腸がんのスクリーニングおよび／または処置における感度および特異度が顕著に高い。また、大腸がんを有すると診断された対象由来の試料中のバイオマーカーのメチル化と、コントロール対象由来の試料中のバイオマーカーのメチル化とを比較する臨床研究も提供される。さらに、本開示の方法および／または組成物を含む、大腸がんのスクリーニングを実証する。特に明記しない限り、本実施例の試料は、ヒトまたはヒト起源のものである。実施例１を除いて、全ての実験は、血漿試料を用いて行った。

【０２２９】

〔実施例１：大腸がんに関連するメチル化バイオマーカーの同定〕

本実施例は、健常なコントロールと比較したときに、結腸がんおよび直腸がんのうち１つ以上において高メチル化されているＣｐＧ遺伝子座の同定を含む。特に、本実施例の実験では、次の試料におけるＣｐＧのメチル化を検討した：（ｉ）以前に結腸がんに罹患していると診断された３４１人の対象であって、化学療法または放射線療法によって処置されたことがない対象の結腸がん；（ｉｉ）以前に直腸がんに罹患していると診断された１１８人の対象であって、化学療法または放射線療法によって処置されたことがない対象の直腸がん；（ｉｉｉ）大腸がんに罹患していると診断されていない４０人の健常なコントロール対象の結腸；（ｉｖ）大腸がんに罹患していると診断されていない１０人の健常なコントロール対象の白血球。組織試料は、新鮮な凍結組織であった。

【０２３０】

グローバルメチロミクス分析プラットフォーム（Infinium HumanMethylation450(HM450)ビーズアレイ）によって、試料のＤＮＡのメチル化を分析した。Infinium HumanMethylation450アレイは、ゲノム全体に位置する４５０，０００個超のＣｐＧのメチル化状態を評価する。全ての組織試料から、ＤＮＡのメチル化プロファイルを得た。

【０２３１】

大腸がんと健常なコントロール群との間でメチル化状態に実質的な差がないＣｐＧのメチル化部位を同定し、検討の対象から外した（全群のうち５検体以下が平均ｂ値＜０．２５かつｂ値＞０．３）。このフィルタ処理により、大腸がんと健常なコントロール者との間でメチル化状態が実質的に異なるＣｐＧのメチル化部位のリストを作成した。次に、得られたＣｐＧのメチル化部位の群から、平均ｂ値の差が０．１以下であるＣｐＧのメチル化部位を除外してさらにフィルタ処理した。こうして、２５３個のＣｐＧのメチル化部位を得た。２５３個のＣｐＧのメチル化部位はいずれも、コントロールと比較した大腸がん状態において、高メチル化状態と関連していた。

【０２３２】

したがって、本実施例により、大腸がんのメチル化バイオマーカーである２５３個のＣｐＧのメチル化部位の群が得られた。２５３個のメチル化バイオマーカーは、３６個の遺伝子の中（すなわち、３６個のメチル化遺伝子座の中）に見られる、複数のＤＭＲを表している。３６個のＤＭＲはいずれも、健常なコントロールと比較した大腸がんにおいて、高メチル化されている。

【０２３３】

〔実施例２：ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲを用いたメチル化バイオマーカーのセルフリーＤＮＡ

アッセイの開発〕

本実施例においては、大腸がんのメチル化バイオマーカーのメチル化状態を決定するアッセイを開発する。このアッセイは、循環しているセルフリーＤＮＡ（ｃｆＤＮＡ）に基づくものである。ｃｆＤＮＡは、不完全で断片化されている。ｃｆＤＮＡが、（循環腫瘍ＤＮＡと呼ばれる部分として）がん細胞から血中に移動するメカニズムは知られていない。実施例１における２５３個のメチル化バイオマーカーは組織試料から同定されている。少なくともこのために、同定された大腸がんのメチル化バイオマーカーをｃｆＤＮＡから充分に分析して、大腸がんである対象または試料の同定を可能にするｃｔＤＮＡの部分を首尾よく捕捉できるかどうかは、本実施例の実験の前の段階では不明であった。

【０２３４】

実施例１で同定された大腸がんのメチル化バイオマーカーをｃｆＤＮＡから充分に分析して、大腸がんである対象または試料の同定を可能にするｃｔＤＮＡの部分を首尾よく捕捉できるかどうかを決定する重要な段階として、これらのバイオマーカーをスクリーニングするための高感度アッセイを開発した。具体的には、メチル化感受性制限酵素（ＭＳＲＥ）－ｑＰＣＲを開発した。ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲを開発して、血液試料中の（とりわけ、血中に含まれる腫瘍のセルフリーＤＮＡ（ｃｆＤＮＡ）中の）同定されたＣｐＧ部位を含むＤＭＲのメチル化を測定した。

【０２３５】

ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲの開発は、少なくとも部分的には有意義であった。なぜならば、試料の非腫瘍ＤＮＡバックグラウンドと比較すると、血中を循環する腫瘍由来ＤＮＡの濃度は低いため（０．１～１％）、腫瘍組織に由来するＣｐＧのメチル化バイオマーカーをｃｆＤＮＡの分析によって分析することは困難であったからである。つまり、容易に入手可能な試料（血液、尿または便など）を用いるバイオマーカー分析を開発することが、一般的には好ましい。その一方で、血液を使用して腫瘍由来のメチル化バイオマーカーを分析することは困難である。このように、上述したように組織における大腸がんに特徴的なメチル化バイオマーカーが同定された後であっても、ｃｔＤＮＡに関する我々の理解が断片的で充分なものではないため、組織において同定されたメチル化バイオマーカーを用いるスクリーニングが成功するかどうかは予測できない。

【０２３６】

ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲには、オリゴヌクレオチドプライマー（ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲ用のオリゴヌクレオチドプライマー対）の設計が必要である。このプライマーは、いずれも、１つ以上の大腸がんＭＳＲＥ切断部位を含む遺伝子座を増幅するプライマーである。大腸がんＭＳＲＥ切断部位とは、１つ以上の大腸がんのメチル化バイオマーカー部位をカバーしているＭＳＲＥ切断部位であって、当該ＭＳＲＥ切断部位における切断が、１つ以上の大腸がんのメチル化バイオマーカー部位のうちの全てがメチル化されていない核酸分子では許容され、１つ以上の大腸がんのメチル化バイオマーカー部位のうちの少なくとも１つがメチル化されている核酸分子では許容されないＭＲＳＥ切断部位である。ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲアッセイは、複数の制限酵素を利用することにより、単一のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲ反応によってアッセイできる大腸がんのメチル化バイオマーカー部位の範囲を増やせる。なぜならば、１つのＭＳＲＥでは、全てのメチル化バイオマーカー部位を同時に含む箇所を切断する可能性が低いからである。本実施例に係るＭＳＲＥ－ｑＰＣＲアッセイは、ＭＳＲＥとして、ＡｃｉＩ、Ｈｉｎ６ＩおよびＨｐｙＣＨ４ＩＶを利用する。これらを一緒に用いることにより、充分な範囲をカバーできることが判明した。

【０２３７】

例示的なＭＳＲＥ－ｑＰＣＲのフローの概略を、図１に示す。本実施例のように、対象の血液（通常は約４ｍＬの血漿試料）から、QIAamp MinElute ccfDNA Kitを用い、製造者のプロトコル（QIAamp MinElute ccfDNA Handbook 08/2018, Qiagene）に従って、循環するセルフリー腫瘍ＤＮＡを抽出した。図１に示すように、単離されたｃｆＤＮＡを２つの部分に分け、第１部分をｑＰＣＲ品の質管理分析に使用し、第２部分をＭＳＲＥ－ｑＰＣＲに使用した。

【０２３８】
ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲでは、溶出させたｃｆＤＮＡのうち体積比で２／３を、ＭＳＲＥで消化した。メチル化していないＤＮＡは選択的に切断されるので、ｃｆＤＮＡとＭＳＲＥとを接触させると、メチル化由来シグナルの試料が濃縮される。メチル化ＤＮＡは消化されずに残り、定量できる。溶出させたｃｆＤＮＡの残り（体積比で１／３）を、ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲ用のオリゴヌクレオチドプライマーを用いたｑＰＣＲに使用して、アンプリコンがｃｆＤＮＡから首尾よく増幅されたことを確認した。この増幅によってテンプレートの存在が確認され、技術的な品質管理ができる。
【０２３９】
本明細書に記載の通り、ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲ用のオリゴヌクレオチドプライマー対は、実施例１で同定された２５３個のＣｐＧのメチル化バイオマーカー部位のうち、１８０個をカバーするＤＭＲを増幅するために首尾よく開発された。ＤＭＲは、典型的には１～１５個のＭＳＲＥ切断部位を含んでいる。これらのＭＳＲＥ切断部位は、１８０個のメチル化バイオマーカー部位をカバーしている。本明細書に記載の通り、６つの遺伝子（ＪＵＢ、Ｈ１９、ＴＢＰ、ＴＣＥＢ２、ＳＮＲＰＮ、ＩＲＦ４）のメチル化状態は、メチル化を制御する。この制御により、アッセイのロバスト性および再現性をモニタリングできるようになった。
【０２４０】
〔実施例３：ｃｆＤＮＡのＭＳＲＥ－ｑＰＣＲは大腸がん状態により対象を首尾よく識別する〕
同定されたメチル化バイオマーカーの臨床診断力および予後予測力を検討するために、ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲ用のオリゴヌクレオチドプライマー対で増幅した１８０個のメチル化バイオマーカー部位をカバーするＤＭＲおよび適当なコントロールを、ヒト対象の血漿から抽出したｃｆＤＮＡにおいてアッセイした。大腸がんの可能性に関して診断を求めている（または、診断中の）未診断の個人を対象とした。こうすることにより、従前の大腸がんの診断検査の前にメチル化バイオマーカーによる分析を実施し、その後、従前の診断と比較できるようにした。具体的には、２０１７～２０１８年にかけて、スペインおよびアメリカのスクリーニングセンターおよび腫瘍クリニックにおいて、大腸がんの可能性に関して診断を求めている（または、診断中の）未診断の個人からｃｆＤＮＡをサンプリングした。第１対象群には、７０人の個人が含まれる（図２の第１対象群に関する説明を参照）。第２対象群には、６３人の個人が含まれる（図３の第２対象群の説明を参照）。最初に、第２対象群において表１４に記載の遺伝子のＤＭＲを検査した小パネルのＭＳＲＥ－ｑＰＣＲ分析の結果に基づいて、大腸がん診断の原理証明を行った。その結果、大腸がんの全体的な診断感度は８０％であり、早期限局性大腸がんの診断感度は最大で７５％に及び、特異度は９０％であった（図４）。ＤＭＲの代表的な原理証明パネルは、近位がんおよび遠位がんのいずれに対しても、同様に（あるいは統計上同等に）良好に機能した（図４）。また、ＤＭＲの原理証明パネルは、限局性がんおよび進行性がんのいずれに対しても、同様に（あるいは統計上同等に）良好に機能した（図４）。さらに、ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲ用コントロール遺伝子および未消化ＤＮＡのコントロールのメチル化をＭＳＲＥ－ｑＰＣＲ分析したところ、開発されたＭＳＲＥ－ｑＰＣＲアッセイは、血漿中のｃｆＤＮＡにおける大腸がんのバイオマーカーのメチル化状態の測定について、高い技術的信頼性を示した。
【０２４１】
大腸がんのＤＭＲのメチル化状態と大腸がんとの関連を、図５～９に示す。４５からＭＳＲＥ－ｑＰＣＲのＣｔ値を減算した値（４５－Ｃｔ値）を結果として表示している。
結果が示すところによると、本開示の個々の大腸がんのメチル化バイオマーカー（または、わずか３つの個々の大腸がんのメチル化バイオマーカー）の大腸がんに対する予測力（例えば、対象における大腸がんのスクリーニングの決定に使用するための予測力）は、驚くほど高い。
【０２４２】

【表１４】

表14：原理証明DMRﾊﾟﾈﾙ

遺伝子	chr	開始	終了	長さ	uid
PDGFD	chr11	104163499	104164026	528	PDGFD_chr11_104163499_104164026
FGF14	chr13	101919879	102403137	483259	FGF14_chr13_101919879_102403137
ALK	chr19	58439728	58440994	1267	ALK_chr19_58439728_58440994
LONRF2	chr2	29193215	29922286	729072	LONRF2_chr2_29193215_29922286
JAM2	chr2	68293114	68320928	27815	JAM2_chr2_68293114_68320928

【０２４３】

〔実施例４：メチル化バイオマーカーのＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによる追加検証〕

メチル化バイオマーカーＤＭＲの大腸がんに対する予測力を検証するために、実施例３で同定した第１対象群および第２対象群の対象１３３人に由来する試料のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲ分析から得られたデータ（図２および図３を参照）をさらに分析した。モンテカルロ交差検証を５０ランにわたって実行し、ランダムフォレストアルゴリズムを特徴ランキングに使用した。ＶＩＰ＞２であるマーカーを使用して、サポートベクターマシン（ＳＶＭ）アルゴリズムに基づく分類モデルを構築した。ＳＶＭモデルにおいて良好な予測を与えたマーカーのいくつかのサブセットが、この分析により同定された（表７～１２に記載の、２個、３個、５個、８個、１５個、２８個のサブセット）。

【０２４４】

全てのモデル（２個、３個、５個、８個、１５個および２８個の大腸がんのＤＭＲパネル）を、第３対象群の血漿から抽出したｃｆＤＮＡに適用した。第３対象群には、８２人の対象が含まれていた。これらの対象は、結腸内視鏡検査スクリーニングによって、大腸がんであると既に確定診断されているか、または大腸がんではないことが判明しているコントロール対象（過形成性ポリープおよび／または非進行性腺腫を有するが、大腸がんではない対象を含むコントロール群）であるかのいずれかであった。８２人の対象は、大腸がんのスクリーニングを受け腫瘍科に通院している、スペインおよびアメリカの対象であった。第３対象群に関するさらなる説明を図１０に示す。

【０２４５】

ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲにおける２８個のＤＲＭの増幅用オリゴヌクレオチドプライマー対（表１３）は、１つ以上のＭＳＲＥ切断部位（典型的には３～１５個のＭＳＲＥ切断部位）をカバーしている。ＭＳＲＥ－ｑＰＣＲは、実施例２に記載の方法に従って実施した。

【０２４６】

試験したパネルはいずれも大腸がんのスクリーニングのために充分かつ有用であるが、それにもかかわらず当業者であれば理解するであろうところによると、２８個ＤＭＲパネルは、表１５に示される他の全てのＤＭＲパネルと比較して、感度が向上し特異度が同程度であった。疑いを避けるために、試験したパネルは全て、それぞれ単独で、大腸がんの臨床スクリーニングのために、例えば感度および特異度の両方において、充分かつ有用である（例えば、表７～表１４を参照）。２８個の大腸がんのＤＭＲパネルを用いて第３対象群を分析したところ、大腸がんの診断に対する一般的な感度は７９％であり、限局性（早期）がんに対する感度は７５％であり、進行性がんに対する感度は８４％であった。また、データによると、ＡＵＣは８２％であり、特異度は８７％であった（図１１）。ＳＶＭモデルによって同定された２８個のマーカーパネルに基づく第２検証群のデータのＲＯＣ曲線分析を、図１１に示す。

【０２４７】

したがって、２８個の大腸がんのＤＭＲパネルおよびそのサブセットの性能を評価すると、２８個の大腸がんのＤＭＲのフルパネルも、２個、３個、５個、８個および１５個の種々の各サブセットも、いずれも、大腸がんの臨床スクリーニングに充分であることが明らかになる（表７～１４を参照）。例えば、一例をあげると、３個のＤＭＲサブセット（表９）は、コントロール対象から大腸がん対象を良好に区別した。このサブセットは、少なくとも部分的には、大腸がんの臨床スクリーニングに充分な性能を示した。決定された

感度は６０％であり、特異度は８７％であった（表１５）。

【０２４８】

ＳＶＭモデルの特性を、表１６に示す。入力サポートＳＶＭベクトルおよびそれらの係数（重み）値を、表１７に示す（表１７は長大なので複数の部分に分けて示し、参照用として各部分では係数および遺伝子名を繰返している）。予測のために、提供された情報をR-packageのpredict()関数と組合せて使用した（https://cran.r-project.org/web/packages/e1071/index.htmlを参照）。

【０２４９】

【表１５】

表15: 28個の大腸がんDMRﾊﾟﾈﾙおよびそのｻﾌﾞｾｯﾄを
第3対象群に適用するための確度距離

	2	3	5	8	15	28
AUC	0.77	0.82	0.83	0.83	0.82	0.82
AUC_CI_LOW	0.67	0.73	0.73	0.74	0.73	0.72
AUC_CI_HIGH	0.87	0.91	0.92	0.92	0.92	0.92
感度	0.63	0.60	0.65	0.53	0.72	0.79
特異度	0.79	0.87	0.82	0.87	0.79	0.87

【０２５０】

【表１６】

表16: SVMﾓﾃﾞﾙの入力特性

vars	値
type	0
kernel	2
cost	1
degree	3
gamma	0.035714
coef0	0
nu	0.5
epsilon	0.1
nclasses	2
rho	-0.73551
probA	-2.14936
probB	-0.10114
sigma	0

【０２５１】

【表１７】

表17: SVMﾍﾞｸﾄﾙ

coefs	GSG1L	ZNF492_2	ZNF568_2	ZNF568_1	ZNF542_2
	GSG1L '861	ZNF492 '499	ZNF568 '252	ZNF568 '405	ZNF542 '525
1	0.166333806	0.423405118	-0.939531248	0.275236404	-0.052862411
1	0.183718034	-2.19255911	-0.092363545	-0.327541264	0.309450278
0.160992568	-0.094429617	-2.19255911	-0.939531248	-0.413652359	0.137466406
1	0.475386751	0.318930431	-0.147777884	0.019978514	0.164983826
1	-0.152377044	0.473593938	1.146062978	0.429006217	0.574305439
1	0.315065536	0.442866089	0.835406834	0.041506288	0.55940017
0.539110203	-0.428593114	0.344536972	0.864793226	-0.0507556	0.174156299
1	0.143154835	-2.19255911	0.848840613	-0.373672208	0.025103611
0.228841426	-0.16396653	0.392677269	-0.939531248	-0.0507556	0.161544148
1	0.691723813	0.288202582	-0.939531248	0.232180856	0.641952428
1	0.152812739	0.548365038	0.897538063	0.321367348	0.6259006
0.086502196	0.152812739	0.413162502	-0.939531248	-0.318315075	0.260148235
1	0.058165275	0.455157229	-0.939531248	-0.035378619	0.421813073
0.022981588	-0.055797999	-2.19255911	-0.939531248	-0.469009492	0.310596837
0.199753156	0.029191561	0.425453641	-0.939531248	-0.192223828	0.392002536
0.640672506	0.401986676	0.512515881	0.731295044	-0.352144434	-2.050168434
0.488436741	0.11224954	-2.19255911	-0.939531248	-0.327541264	-2.050168434
0.290813367	0.038849466	0.455157229	0.842963334	0.038430892	0.370217912
0.93438076	-0.165898111	0.292299628	0.996612184	-0.293711905	0.182182213
1	0.34597083	0.531976852	-0.939531248	0.622756182	0.534175869
0.177133374	0.291886565	0.201140342	0.931122511	0.312141159	0.439011461
0.363673626	-0.252819252	0.199091819	-0.939531248	-0.232203979	0.408054364
0.372869951	-0.022961123	-2.19255911	-0.939531248	-0.438255529	-2.050168434
0.180416799	-0.0152348	0.246207854	-0.939531248	-0.247580961	0.130587052
1	1.837151292	1.131169911	-0.939531248	1.084065621	1.180835225
0.236974727	-4.54286045	0.032137172	-0.240135117	-0.619703909	-2.050168434
0.433173404	-4.54286045	-2.19255911	-0.939531248	-0.40442617	0.427545869
0.037394649	0.15474432	-2.19255911	-0.939531248	-0.204525413	0.471115116
1	0.245528623	0.455157229	-0.939531248	-0.207600809	0.380536944
0.263636311	-4.54286045	-2.19255911	-0.939531248	-1.72992196	-2.050168434
1	0.682065908	0.557583393	1.034394689	0.828807731	0.838014042
1	-0.042276933	0.55553487	0.775794438	0.158371346	0.349579848
1	0.025328399	0.467448369	0.848001002	-0.524366624	0.018224256
0.26169536	-4.54286045	-2.19255911	-0.939531248	-7.963750185	-2.050168434

表17の続き: SVMﾍﾞｸﾄﾙ

coefs	GSG1L	ZNF492_2	ZNF568_2	ZNF568_1	ZNF542_2
	GSG1L '861	ZNF492 '499	ZNF568 '252	ZNF568 '405	ZNF542 '525
0.1799778	0.295749727	0.267717349	-0.939531248	0.226030064	0.467675439
0.898868481	-0.18521392	0.324051739	-0.939531248	-0.023077034	0.29339845
0.042908076	0.019533657	0.191921987	-0.939531248	-0.622779305	0.275053503
0.140898434	-4.54286045	0.204213127	-0.939531248	-0.567422172	0.123707697
0.140415448	0.293818146	-2.19255911	-0.939531248	-0.699664211	0.061793503
1	0.166333806	0.135587597	-0.939531248	-0.044604807	0.459649525
0.108835219	-0.378372011	0.333270094	-0.939531248	-0.604326927	-2.050168434
1	0.608665834	0.370143513	0.901736119	0.641208559	0.750875547
-1	0.322791859	-2.19255911	1.066299914	0.186049912	0.550227697
-1	0.025328399	-2.19255911	-0.497895756	0.026129307	0.433278665
-1	0.311202374	0.387555961	-0.939531248	-0.182997639	0.5192706
-1	-0.059661161	0.322003216	1.020121298	0.422855425	0.403468127
-1	0.403918257	0.612893521	0.959669292	0.468986368	0.589210708
-1	0.172128548	0.145830214	0.701908652	0.182974516	0.491753181
-1	-0.16396653	0.411113978	-0.939531248	-0.336767452	0.473408235
-1	0.336312926	0.694834453	-0.939531248	0.819581542	0.740556515
-0.27309104	1.360050807	0.923244798	1.68509337	2.378807448	1.22669759
-1	2.101777876	1.346264856	1.939495565	3.255295383	1.550027268
-1	0.712971203	0.404968409	0.776634049	0.475137161	-2.050168434
-0.675668601	0.382670867	0.677422005	1.048668079	0.579700634	0.674056084
-1	0.245528623	0.403944147	-0.939531248	-0.545894398	-2.050168434
-0.228886868	1.516508861	0.993918852	1.713640151	2.252716201	1.264534042
-1	0.523676274	0.505346049	0.922726399	0.272161008	0.602969418
-0.253709663	0.53719734	0.671276435	-0.939531248	0.186049912	0.764634257
-1	-0.007508476	-2.19255911	-0.939531248	-0.284485716	0.336967697
-1	0.465728846	0.297420936	-0.939531248	0.075335647	0.648831783
-1	0.206897005	0.52480702	0.981499183	0.066109458	0.583477912
-1	0.626050062	0.583189934	-0.939531248	0.804204561	0.654564579
-1	0.094865312	0.356828111	0.968065404	0.112240402	0.397735331
-1	0.04850737	-2.19255911	-0.939531248	-1.041033197	0.29339845
-1	-0.241229766	-2.19255911	0.913490675	-0.14916828	0.136319847
-1	0.419370905	-2.19255911	-0.939531248	0.099938817	0.659150816
-1	0.228144395	0.438769043	0.834567222	0.413629236	0.549081138
-1	0.45220778	0.585238457	0.886623117	-0.103037336	0.838014042
-1	0.237802299	0.444914613	-0.939531248	0.078411043	0.295691568

表17の続き：SVMﾍﾞｸﾄﾙ

coefs	ZNF542_1	ZNF471_2	ZNF471_1	ZNF471_3	ZNF132_2
	ZNF542 '502	ZNF471 '527	ZNF471 '558	ZNF471 '662	ZNF132 '268
1	0.210023302	0.448781467	0.381358009	0.276869984	-0.079808848
1	0.096511033	-1.701659498	0.111027436	0.245615084	0.220719423
0.160992568	0.011755205	0.491015986	0.192253523	0.011882788	0.004011962
1	0.075322076	0.362552655	0.179561947	0.342097602	0.355650484
1	0.438561338	0.531490735	0.353436542	0.351609963	0.275918493
1	0.322022075	0.502454502	0.314092655	0.193976554	0.091921593
0.539110203	0.007214715	0.395108431	0.091990071	0.143696932	-0.206562268
1	0.010241709	0.604521258	0.298862764	0.238820541	0.200275323
0.228841426	0.010241709	-1.701659498	-0.009542539	-3.291624259	0.120543333
1	0.477912258	0.220891037	0.146563849	0.172234015	0.333161974
1	0.228185265	0.381030258	0.097066702	0.160003836	0.380183404
0.086502196	0.116186493	-1.701659498	-0.38775151	-0.122649173	-0.237228418
1	0.194888333	0.592202857	0.357244014	0.299971432	0.053077803
0.022981588	-0.13808099	-1.701659498	-0.060308843	-3.291624259	-0.186118168
0.199753156	0.15705091	0.495415416	0.260788035	0.227949271	-0.034831828
0.640672506	0.120726984	-1.701659498	0.215098361	0.210283458	0.183920043
0.488436741	0.05867361	-1.701659498	0.02853219	0.007806062	-0.341493329
0.290813367	0.063214101	0.449661352	0.10848912	0.248332902	0.433338064
0.93438076	0.043538641	0.359912998	0.034877978	-0.051985921	0.051033393
1	0.211536799	-1.701659498	-0.187224606	-0.012577568	0.482403904
0.177133374	0.264509192	0.375750943	0.046300397	-3.291624259	-7.69E-05
0.363673626	0.073808579	0.258726128	0.171947002	-0.049268103	-0.204517858
0.372869951	-3.407234345	0.527971191	0.279825399	0.138261297	-0.406914449
0.180416799	-3.407234345	-1.701659498	-0.136458301	-3.291624259	-0.406914449
1	1.345145995	1.182606248	1.282459921	1.285180239	1.347189337
0.236974727	-3.407234345	-1.701659498	-2.980640533	-0.383559643	-0.085942078
0.433173404	0.001160727	0.382790029	0.060261131	-0.069651734	-0.110474998
0.037394649	-0.468023319	0.373111285	0.013302299	-0.008500842	-0.257672518
1	0.455209804	0.5957224	0.409279477	0.446733572	0.001967552
0.263636311	-3.407234345	-1.701659498	-2.980640533	0.049932232	-5.066124854
1	0.721585263	0.52181199	0.325515074	0.344815419	0.791109815
1	0.060187107	0.342315281	0.10848912	-0.046550286	0.071477493
1	-0.038190193	0.419745234	0.317900128	0.173592923	-0.413047679
0.26169536	-3.407234345	0.529730963	0.213829203	-0.096829908	-0.366026249

表17の続き: SVMﾍﾞｸﾄﾙ

coefs	ZNF542_1	ZNF471_2	ZNF471_1	ZNF471_3	ZNF132_2
	ZNF542 '502	ZNF471 '527	ZNF471 '558	ZNF471 '662	ZNF132 '268
0.1799778	0.155537413	-1.701659498	-0.034925691	0.191258736	-5.066124854
0.898868481	0.278130664	0.655554636	0.5463485	0.405966311	-0.192251398
0.042908076	0.079862567	0.491895872	0.225251622	0.179028558	0.020367243
0.140898434	0.051106125	-1.701659498	-0.243067541	-3.291624259	-5.066124854
0.140415448	-0.074514119	-1.701659498	-2.980640533	0.154568201	-0.304693949
1	0.128294469	0.220011151	-0.135189143	0.202130006	0.106232463
0.108835219	-3.407234345	-1.701659498	-2.980640533	-3.291624259	0.026500473
1	0.526344159	-1.701659498	-0.140265774	0.233384906	0.603024094
-1	0.368940479	0.572845368	0.377550536	0.036343145	0.177786813
-1	0.31445459	0.503334388	0.298862764	0.181746375	0.132809793
-1	0.240293241	0.61683966	0.287440345	0.473911746	0.378138994
-1	0.134348456	0.407426833	0.248096459	0.279587802	-0.165674068
-1	0.424939866	0.570205711	0.39151127	0.305407067	0.523292104
-1	0.347751522	0.558767195	0.404202846	0.324431789	0.210497373
-1	0.325049069	0.280723273	0.102143332	0.295894706	-0.286294258
-1	0.577803055	0.540289593	0.434662629	0.505166646	0.881063855
-0.27309104	1.379956424	0.847369747	0.820486547	0.710361859	1.046661066
-1	1.806762557	1.486166858	1.711435198	1.720031023	2.25286297
-1	0.343211032	0.614200002	0.400395374	0.426349941	0.654134345
-0.675668601	0.455209804	0.547328679	0.424509368	0.408684128	0.776798945
-1	-0.012460745	0.328237108	-0.031118218	-0.007141934	0.077610723
-0.228886868	1.384496915	1.151810244	1.269768345	1.328665317	1.330834057
-1	0.391642933	0.754981735	0.631382061	-3.291624259	0.118498923
-0.253709663	0.741260723	1.184366019	1.220271198	1.031064312	0.367916944
-1	-0.147161972	-1.701659498	-0.187224606	-0.133520443	0.065344263
-1	0.536938638	0.610680459	0.408010319	0.446733572	0.425160424
-1	0.188834345	-1.701659498	0.259518877	0.237461632	0.480359494
-1	0.421912872	0.484856786	0.344552438	0.318996154	0.692978135
-1	0.190347842	0.604521258	0.31663097	0.270075441	-0.024609778
-1	0.060187107	0.410946376	0.26332635	0.282305619	0.108276873
-1	0.043538641	0.546448794	0.279825399	0.100211854	-0.063453568
-1	0.443101829	0.402147518	0.429585999	0.274152167	0.055122213
-1	0.446128822	0.451421124	0.211290888	0.308124884	0.220719423
-1	0.774557655	0.410946376	0.221444149	0.145055841	0.717511055
-1	0.110132505	0.549968337	0.243019828	-0.111777904	0.273874083

表17の続き: SVMﾍﾞｸﾄﾙ

coefs	ZNF132_1	JAM2	MCIDAS_1	MCIDAS_2	PDGFD_1
	ZNF132 '415	JAM2 '320	MCIDAS '855	MCIDAS '003	PDGFD '388
1	0.238896666	0.406419198	0.492859834	0.416450063	0.046762915
1	-0.397730773	-2.423671354	0.320276073	0.121123394	-0.124572283
0.160992568	-0.170552517	-2.423671354	-2.052243039	0.091026409	-0.261640442
1	0.347202579	0.464995238	0.485753444	0.245273459	0.426555938
1	0.120024323	0.545266109	0.761887461	0.544362251	-0.027482338
1	0.006435195	0.297945048	0.524330991	0.190722673	0.235231633
0.539110203	-0.693590827	0.228521593	0.262409754	0.038356684	-0.53577676
1	-0.550944015	0.287097633	0.044142056	-0.183608583	0.20382018
0.228841426	-0.352823443	0.214419954	0.199467441	0.028951376	0.121008168
1	0.299653641	0.447639374	0.58219731	0.501097835	0.423700352
1	0.26795435	0.317470395	0.572045325	0.252797705	0.266643087
0.086502196	-0.487545432	0.333741518	0.359868819	0.213295412	-0.16169491
1	0.088325031	0.395571783	0.40961355	0.333683353	0.126719341
0.022981588	-1.155872162	-2.423671354	-2.052243039	0.019546069	-0.669989332
0.199753156	-0.231309492	-2.423671354	0.225862604	0.043999869	-0.17882843
0.640672506	0.407959554	0.378215919	0.320276073	0.141815072	0.152419621
0.488436741	-0.410938811	-0.105578787	0.311139286	-4.590935879	-0.375863908
0.290813367	-0.049038566	0.15367443	-2.052243039	0.168149934	0.358021859
0.93438076	-0.614342598	0.187301416	-0.001541881	-0.078269134	-0.624299946
1	0.415884377	0.216589437	0.588288502	0.241511336	0.469389738
0.177133374	0.135873968	0.230691076	0.443115103	0.15122038	0.132430514
0.363673626	-0.025264097	0.130894859	0.318245676	0.072215793	-0.247362509
0.372869951	-0.281500037	0.267572287	0.200482639	-0.042528964	-0.190250776
0.180416799	-6.542110115	0.37930066	0.199467441	-0.245683615	-0.435831227
1	1.855560534	1.410889819	1.44105532	1.953277379	1.120463492
0.236974727	-0.71208208	-2.423671354	-2.052243039	-4.590935879	-0.344452455
0.433173404	0.104174677	-0.128358358	0.297941704	-0.078269134	0.292343366
0.037394649	-0.226026277	0.150420206	-2.052243039	0.049643054	-0.104583177
1	-0.424146849	0.275165477	-2.052243039	0.072215793	0.063896435
0.263636311	-6.542110115	-0.08605344	-2.052243039	-0.591798947	-7.103626036
1	0.69061157	0.407503939	0.605546878	0.314872738	1.134741426
1	-0.038472135	0.309877205	0.161905093	-0.241921492	0.295198953
1	-0.014697667	0.199233573	0.256318562	-0.24004043	-0.407275361
0.26169536	-0.878503361	0.122216927	0.038050865	-4.590935879	-0.415842121

表17の続き: SVMﾍﾞｸﾄﾙ

coefs	ZNF132_1	JAM2	MCIDAS_1	MCIDAS_2	PDGFD_1
	ZNF132 '415	JAM2 '320	MCIDAS '855	MCIDAS '003	PDGFD '388
0.1799778	-0.125645187	0.492113775	0.581182112	0.352493969	-7.103626036
0.898868481	0.101533069	-2.423671354	0.41671994	0.02142713	-0.470098267
0.042908076	-0.281500037	-2.423671354	0.402507159	-0.345379879	-0.235940162
0.140898434	-0.532452762	0.177538743	-2.052243039	-0.040647902	-0.707111958
0.140415448	-0.136211617	-2.423671354	0.160889894	0.143696133	-0.147416977
1	0.006435195	0.180792967	0.542604565	0.326159107	-0.304474242
0.108835219	-0.292066467	-2.423671354	0.051248446	-0.388644296	-0.632866706
1	0.574380834	0.446554633	0.667473992	0.598913037	0.812060135
-1	0.196630944	0.384724368	0.345656038	0.218938597	0.363733032
-1	0.180781298	0.228521593	0.117236355	-0.119652489	0.546490577
-1	0.471358137	0.249131681	0.483723047	-0.149749474	0.483667671
-1	-0.022622489	0.469334204	0.406567954	0.145577195	-0.007493231
-1	0.574380834	0.309877205	0.617729261	0.132409764	0.466534151
-1	0.030209663	0.205742022	0.451236692	-0.003026671	-0.010348818
-1	0.02228484	0.213335212	0.123327546	0.237749213	0.078174368
-1	0.970621979	0.511639122	0.606562077	0.311110614	0.689269909
-0.27309104	0.981188409	1.000857535	1.309079503	1.5507302	1.465989476
-1	2.840880179	1.538889315	1.185225275	1.65795071	2.031395631
-1	0.574380834	0.560452489	0.650215616	0.561291805	0.777793095
-0.675668601	1.139684867	0.64072336	0.720264319	0.572578175	0.892016561
-1	-0.178477339	0.079912009	0.120281951	0.008259699	0.123863754
-0.228886868	1.945375193	1.1646535	1.014671911	1.069178434	1.683014061
-1	0.064550562	0.462825755	0.547680558	0.290418937	0.395144485
-0.253709663	0.79099266	0.783909237	0.578136516	0.538719066	0.709259016
-1	-0.276216822	-2.423671354	0.205558632	-0.010550917	-0.298763069
-1	0.36833544	0.443300408	0.530422182	0.094788532	0.400855659
-1	0.36833544	0.212250471	0.372051202	0.143696133	0.226664874
-1	0.761934976	0.514893347	0.615698864	0.350612908	0.717825776
-1	0.283803995	0.427029286	0.48169265	0.243392397	0.149564034
-1	-0.659249928	0.18296245	0.281698527	-0.371714741	0.118152581
-1	-0.241875922	0.190555641	0.327382464	-0.001145609	-0.116005524
-1	0.149082006	0.290351858	0.572045325	0.388234139	0.452256218
-1	0.347202579	0.420520837	0.494890231	0.164387811	0.466534151
-1	1.055153423	0.579977836	0.862392122	0.811472996	0.186686661
-1	-0.123003579	-2.423671354	0.184239462	0.29418106	0.443689458

表17の続き：SVMﾍﾞｸﾄﾙ

coefs	PDGFD_2	ST6GALNAC5	ZNF492_1	CNRIP1_1	LONRF2_1
	PDGFD '921	ST6GALNAC5 '456	ZNF492 '069	CNRIP1 '272	LONRF2 '281
1	1.302789852	0.466406944	-0.240707793	-0.064165795	0.182108844
1	-0.682617737	0.569041467	-0.17761095	-0.307307386	-0.063816882
0.160992568	-0.682617737	0.705281983	-0.150569446	0.093547669	-0.189987472
1	-0.682617737	0.569041467	0.176933218	0.189928119	0.325387311
1	1.475318586	0.828806718	-0.132541776	0.498783653	0.197078236
1	-0.682617737	-1.277471664	0.08679487	0.38268902	0.201355206
0.539110203	-0.682617737	-1.277471664	-0.210661677	0.019071866	0.100846431
1	-0.682617737	0.367405503	0.056748754	-0.149593922	0.090154008
0.228841426	-0.682617737	0.246605578	0.194960887	0.161452077	-0.098032635
1	1.096640133	0.76522781	0.480398989	0.178975795	0.534958799
1	-0.682617737	0.792475913	0.065762589	0.119833246	0.338218218
0.086502196	1.281555546	-1.277471664	-0.327841529	-0.079499049	-0.207095348
1	-0.682617737	0.638978265	0.149891714	0.369546231	0.333941249
0.022981588	-0.682617737	-1.277471664	-0.360892257	-3.744146627	-0.585607118
0.199753156	-0.682617737	-1.277471664	-0.162587892	-0.042261148	-5.029378066
0.640672506	-0.682617737	0.586298599	0.23702545	-0.07073719	-0.22634171
0.488436741	1.209005001	-1.277471664	0.017688804	-0.348926217	-0.160048688
0.290813367	-0.682617737	0.638069995	0.110831763	-0.007213711	0.165000968
0.93438076	1.368262294	0.469131755	-0.57421968	-0.379592724	-0.014631737
1	-0.682617737	-1.277471664	0.423311368	0.316975076	0.498604562
0.177133374	-0.682617737	0.554509145	0.243034673	0.222785091	0.154308545
0.363673626	-0.682617737	0.566316656	-0.369906092	-0.186831823	-0.068093851
0.372869951	-0.682617737	-1.277471664	-0.231693959	-0.06635626	-0.435913198
0.180416799	-0.682617737	-1.277471664	-1.154109717	-2.41672497	-0.136525357
1	-0.682617737	1.508192759	1.468916202	2.071537366	0.917747538
0.236974727	-0.682617737	-1.277471664	-0.330846141	-4.848140877	-5.029378066
0.433173404	-0.682617737	0.542701634	0.056748754	-0.243783907	0.263371258
0.037394649	-0.682617737	-1.277471664	0.149891714	-0.362069006	-0.068093851
1	-0.682617737	0.620812863	0.336177632	0.045357444	-0.311881093
0.263636311	-0.682617737	-1.277471664	-7.154319065	-0.734448018	-5.029378066
1	1.438158551	-1.277471664	1.072307472	0.660878047	0.791576948
1	1.220506917	0.624445943	0.131864044	-0.048832542	-0.016770221
1	-0.682617737	0.609913622	-0.204652454	-0.160546246	-0.269111401
0.26169536	-0.682617737	-1.277471664	-7.154319065	0.207451837	-5.029378066

表17の続き：SVMﾍﾞｸﾄﾙ

coefs	PDGFD_2	ST6GALNAC5	ZNF492_1	CNRIP1_1	LONRF2_1
	PDGFD '921	ST6GALNAC5 '456	ZNF492 '069	CNRIP1 '272	LONRF2 '281
0.1799778	-0.682617737	-1.277471664	0.534481997	0.062881162	0.607667275
0.898868481	-0.682617737	0.698015822	-0.021371147	0.268784851	-0.040293551
0.042908076	-0.682617737	-1.277471664	-0.339859976	-0.567972695	-0.326850485
0.140898434	-0.682617737	-1.277471664	-0.571215068	-0.537306188	-0.442328652
0.140415448	-0.682617737	-1.277471664	-0.144560222	-3.146149742	0.111538853
1	-0.682617737	-1.277471664	-0.021371147	0.178975795	0.505020015
0.108835219	-0.682617737	-1.277471664	-0.318827695	-4.848140877	-0.463713497
1	-0.682617737	-1.277471664	0.429320592	0.560116667	0.757361195
-1	1.29571175	-1.277471664	0.092804093	-0.136451133	0.107261884
-1	-0.682617737	0.76613608	0.393265253	-0.094832302	0.220601567
-1	-0.682617737	-1.277471664	0.324159186	0.260022992	0.415203663
-1	1.442582365	0.811549586	-0.108504883	0.424307851	0.248401866
-1	-0.682617737	0.770677431	0.579551171	0.380498555	0.637606059
-1	1.147071609	-1.277471664	-0.084467991	-0.241593443	0.094430977
-1	-0.682617737	0.633528644	0.342186855	0.216213697	0.081600069
-1	-0.682617737	0.821540557	0.792878594	0.619259216	0.872839362
-0.27309104	2.042451502	1.427356719	1.264602614	1.732015325	1.51224625
-1	-0.682617737	1.5981115	2.0127509	2.529344505	2.128129808
-1	1.308983191	0.435525761	0.480398989	0.316975076	0.733837865
-0.675668601	-0.682617737	0.837889419	0.726777139	0.551354808	0.63332909
-1	-0.682617737	-1.277471664	0.083790259	-0.06635626	-0.040293551
-0.228886868	1.923893295	1.317456036	1.381782466	1.839348099	1.349721423
-1	-0.682617737	0.856963091	0.315145351	0.343260654	0.259094289
-0.253709663	1.235547883	1.01500209	0.964141455	1.026685666	0.729560896
-1	1.354106091	-1.277471664	-0.048412651	-0.099213232	-0.076647789
-1	-0.682617737	0.617179782	0.393265253	0.303832288	0.505020015
-1	1.269168867	0.629895564	0.342186855	0.481259935	0.421619117
-1	1.248819324	0.831531528	0.315145351	0.308213217	0.673960297
-1	1.336410836	0.788842833	-0.168597115	0.371736696	0.188524298
-1	1.133800168	0.567224926	-0.126532553	-0.134260668	-0.001800829
-1	-0.682617737	-1.277471664	-0.105500272	-0.090451373	0.216324598
-1	-0.682617737	0.717997765	0.390260641	0.411165062	0.513573954
-1	-0.682617737	0.735254897	0.231016227	0.384879485	0.541374253
-1	-0.682617737	1.01681863	0.231016227	1.147161228	0.703899081
-1	1.284209834	-1.277471664	0.158905548	-0.103594161	-0.574914695

表17の続き: SVMﾍﾞｸﾄﾙ

coefs	LONRF2_2	ADAMTS2_2	ADAMTS2_1	ADAMTS2_3	ALK
	LONRF2 '387	ADAMTS2 '254	ADAMTS2 '284	ADAMTS2 '328	ALK '434
1	0.816278101	-1.226540092	0.479237716	0.308464228	1.224961864
1	0.707526931	0.608032885	0.377972809	0.108720604	-0.67135809
0.160992568	-1.17952336	-1.226540092	-1.402761026	-3.569757964	-0.67135809
1	0.644016248	0.715511247	0.413319994	0.342021157	-0.67135809
1	1.028560383	0.889956898	0.805960341	0.757487893	-0.67135809
1	0.704916903	0.774210969	0.512674242	0.359598595	-0.67135809
0.539110203	-1.17952336	0.74444773	0.34931293	-0.159734825	-0.67135809
1	-1.17952336	-1.226540092	-1.344485938	-0.001537876	1.290071562
0.228841426	-1.17952336	0.651850986	0.265243951	0.155061125	-0.67135809
1	0.849338456	0.647717203	0.611073161	0.319649871	1.311232214
1	0.788437801	0.675826929	0.455354484	0.27330935	-0.67135809
0.086502196	0.548315219	-1.226540092	0.357910894	0.155061125	1.30146576
1	0.564845397	0.690708548	-1.172526662	0.340423208	1.271352524
0.022981588	-1.17952336	-1.226540092	-1.818329276	-0.437777949	-0.67135809
0.199753156	0.650976323	0.717164761	0.579547294	0.310062177	-0.67135809
0.640672506	-1.17952336	0.763463132	0.44580119	0.290886789	-0.67135809
0.488436741	-1.17952336	0.617127208	0.287216525	-0.153343029	-0.67135809
0.290813367	0.570935463	0.735353407	0.491656997	0.316453973	-0.67135809
0.93438076	-1.17952336	0.666732606	0.444845861	0.169442666	-0.67135809
1	-0.840219712	0.793226371	0.47350574	0.389959626	-0.67135809
0.177133374	-1.17952336	-1.226540092	0.355044906	0.129493941	-0.67135809
0.363673626	0.538745116	-1.226540092	0.304412453	-0.142157387	-0.67135809
0.372869951	-1.17952336	-1.226540092	0.354089577	0.111916502	-0.67135809
0.180416799	0.499594695	-1.226540092	-1.818329276	-3.569757964	-0.67135809
1	0.880658793	1.437269791	1.395398525	1.705071643	1.21519541
0.236974727	-1.17952336	-1.226540092	-1.818329276	-3.569757964	-0.67135809
0.433173404	-1.17952336	-1.226540092	0.347402271	0.057586237	-0.67135809
0.037394649	-1.17952336	-1.226540092	-1.818329276	-3.569757964	-0.67135809
1	-1.17952336	0.671693146	0.532736158	-0.081435325	-0.67135809
0.263636311	-1.17952336	-1.226540092	-1.818329276	-3.569757964	-0.67135809
1	0.846728428	0.660118553	0.491656997	0.417124759	1.282746721
1	0.650106314	-1.226540092	0.401856042	-0.322725622	-0.67135809
1	0.640536211	-1.226540092	0.567128013	0.254133962	-0.67135809
0.26169536	0.519604911	-1.226540092	0.536557475	0.284494993	-0.67135809

表17の続き: SVMﾍﾞｸﾄﾙ

coefs	LONRF2_2	ADAMTS2_2	ADAMTS2_1	ADAMTS2_3	ALK
	LONRF2 '387	ADAMTS2 '254	ADAMTS2 '284	ADAMTS2 '328	ALK '434
0.1799778	0.525694976	0.613820181	0.533691487	0.266917554	-0.67135809
0.898868481	-1.17952336	0.719645031	0.407588018	-0.172518417	1.353553518
0.042908076	0.605735837	0.541065597	0.508852925	0.28928884	-0.67135809
0.140898434	-1.17952336	-1.226540092	-1.818329276	-3.569757964	-0.67135809
0.140415448	-1.17952336	-1.226540092	-1.818329276	-0.332313316	-0.67135809
1	0.771037614	-1.226540092	0.249958682	-0.099012764	-0.67135809
0.108835219	0.456094228	0.611339911	-1.818329276	-0.242828173	-0.67135809
1	0.865868634	-1.226540092	0.373196163	0.410732963	-0.67135809
-1	-1.17952336	0.717991517	0.575725977	0.27330935	1.293327047
-1	-0.466985698	0.596458292	0.295814489	0.17903036	-0.67135809
-1	0.741457296	0.675000172	0.399945384	0.287690891	-0.67135809
-1	0.838898344	0.763463132	0.587189928	0.35160885	-0.67135809
-1	0.764077539	0.795706641	0.609162503	0.4315063	-0.67135809
-1	0.920679223	-1.226540092	0.530825499	0.139081635	1.257516713
-1	-1.17952336	0.608859641	0.236584071	0.044802645	-0.67135809
-1	0.706656922	0.8155488	0.656928968	0.760683791	1.349484162
-0.27309104	1.371344069	1.329791428	1.262607751	1.433420315	1.942796285
-1	1.875079486	1.591046526	1.560670496	2.013475797	2.200793463
-1	0.539615126	0.697322601	0.524138194	0.247742166	-0.67135809
-0.675668601	0.845858419	0.760982862	0.572859989	0.501816055	1.410524504
-1	-1.17952336	0.765943402	0.286261196	-0.031898906	1.241239289
-0.228886868	1.433114734	1.358727911	1.26451841	1.481358784	1.862223034
-1	0.513514845	0.884996358	0.706606092	0.567331964	1.322626411
-0.253709663	1.074670879	0.993301477	0.790675072	0.69996173	1.619689409
-1	-1.17952336	0.583230186	0.338804308	0.166246768	-0.67135809
-1	0.977229831	0.713030978	0.603430527	0.370784238	-0.67135809
-1	0.684036679	0.742794216	0.471595082	0.263721656	-0.67135809
-1	0.950259541	0.777517995	0.650241663	0.568929913	1.333206737
-1	0.843248391	0.738660433	0.582413282	0.319649871	-0.67135809
-1	-1.17952336	-1.226540092	0.244226706	-0.234838428	-0.67135809
-1	0.717097034	-1.226540092	0.458220472	0.107122655	-0.67135809
-1	0.689256735	-1.226540092	0.342625625	0.242948319	-0.67135809
-1	0.864128615	0.785785562	0.597698551	0.452279637	-0.67135809
-1	1.023340327	-1.226540092	0.275752573	0.006451869	1.64085006
-1	-1.17952336	0.702283141	0.516495559	0.334031412	-0.67135809

表17の続き：SVMﾍﾞｸﾄﾙ

coefs	FGF14	DMRT1	CNRIP1_2
	FGF14 '577	DMRT1 '934	CNRIP1 '232
1	0.955300844	1.131612847	0.296394201
1	-0.93950462	-0.701307401	0.101966839
0.160992568	0.846924723	-0.701307401	-2.336804129
1	-0.93950462	-0.701307401	0.230086604
1	1.296419127	1.516680127	0.443619546
1	0.974844079	-0.701307401	0.407656103
0.539110203	-0.93950462	1.17300758	0.203114022
1	-0.93950462	-0.701307401	0.261554616
0.228841426	-0.93950462	1.199962289	0.268297762
1	-0.93950462	-0.701307401	0.368321087
1	0.734106957	-0.701307401	0.228962746
0.086502196	0.761645152	-0.701307401	0.236829749
1	-0.93950462	-0.701307401	0.536899725
0.022981588	-0.93950462	-0.701307401	-2.336804129
0.199753156	0.771416769	-0.701307401	0.216600313
0.640672506	0.814944884	-0.701307401	0.384055093
0.488436741	-0.93950462	-0.701307401	0.073870399
0.290813367	-0.93950462	-0.701307401	0.268297762
0.93438076	-0.93950462	-0.701307401	0.027792238
1	0.960630817	-0.701307401	0.3997891
0.177133374	-0.93950462	-0.701307401	0.092975978
0.363673626	0.769640112	-0.701307401	0.317747496
0.372869951	-0.93950462	-0.701307401	0.225591173
0.180416799	-0.93950462	1.108508811	-2.336804129
1	1.728146955	1.533045486	1.467453809
0.236974727	-0.93950462	-0.701307401	-2.336804129
0.433173404	-0.93950462	-0.701307401	0.284031768
0.037394649	-0.93950462	-0.701307401	-2.336804129
1	0.834488119	-0.701307401	0.25031604
0.263636311	-0.93950462	-0.701307401	-2.336804129
1	0.798066635	-0.701307401	0.540271298
1	-0.93950462	-0.701307401	-0.045258506
1	0.853143025	1.17300758	-2.336804129
0.26169536	-0.93950462	-0.701307401	0.450362691

表17の続き：SVMﾍﾞｸﾄﾙ

coefs	FGF14	DMRT1	CNRIP1_2
	FGF14 '577	DMRT1 '934	CNRIP1 '232
0.1799778	-0.93950462	1.108508811	0.412151533
0.898868481	-0.93950462	-0.701307401	0.412151533
0.042908076	-0.93950462	-0.701307401	0.205361737
0.140898434	-0.93950462	-0.701307401	-2.336804129
0.140415448	0.748320219	-0.701307401	-2.336804129
1	0.726111997	-0.701307401	0.384055093
0.108835219	-0.93950462	-0.701307401	-2.336804129
1	-0.93950462	1.12487417	0.598711893
-1	0.830046474	-0.701307401	0.314375923
-1	-0.93950462	-0.701307401	0.078365829
-1	-0.93950462	-0.701307401	0.552633732
-1	0.867356287	1.072890087	0.532404295
-1	1.115200039	-0.701307401	0.452610406
-1	0.632837467	1.202850294	0.307632777
-1	0.974844079	-0.701307401	0.05476482
-1	0.946417555	-0.701307401	0.585225602
-0.27309104	1.777893371	2.092355709	1.213461994
-1	1.891599465	2.29451603	1.66750046
-1	0.822939843	-0.701307401	-2.336804129
-0.675668601	0.790071676	-0.701307401	0.593092605
-1	-0.93950462	-0.701307401	0.252563755
-0.228886868	1.602004256	1.983574202	1.266283301
-1	1.124971657	1.209588971	0.542519013
-0.253709663	1.057458663	-0.701307401	0.829102699
-1	1.010377234	-0.701307401	0.017677519
-1	0.846924723	1.254834377	0.354834796
-1	1.049463703	1.121023497	0.557129162
-1	-0.93950462	-0.701307401	0.488573849
-1	0.948194213	0.985287281	0.479582988
-1	-0.93950462	-0.701307401	-2.336804129
-1	-0.93950462	-0.701307401	0.325614499
-1	0.225094519	-0.701307401	0.389674381
-1	0.870909602	1.213439644	0.285155626
-1	-0.93950462	1.568664209	0.829102699
-1	-0.93950462	-0.701307401	0.224467316

【０２５２】

〔実施例５：種々の個別のメチル化バイオマーカーは、それぞれ多くの情報を与える〕

２８個の大腸がんのＤＭＲパネルの中の大腸がんのＤＭＲの性能を個別に評価したところ、種々の個別の大腸がんのＤＭＲはそれぞれ、大腸がんのスクリーニングに充分であることが判明した（図１２～１９を参照）。図１２～１９は、選択した大腸がんのＤＭＲに関して、大腸がん試料およびコントロール試料における当該ＤＭＲのメチル化状態を示す。４５からＭＳＲＥ－ｑＰＣＲのＣｔ値を減算した値（４５－Ｃｔ値）を結果として表示している。本実施例のデータと、上述の実施例にに記載のデータ（図５～９など）とが共に示すところによると、それぞれの大腸がんのＤＭＲにおいて、メチル化状態シグナルは対象群を通じて充分に安定しており、臨床スクリーニングが可能である。結果を図１２～１９に示す。これにより、本明細書に記載の大腸がんのメチル化マーカーから、大腸がんのスクリーニングのための強力なシグナルが得られることが分かる。さらに、当業者であれば理解するであろうところによると、大腸がんのスクリーニングにおいてそれぞれ独立して有用であるメチル化バイオマーカーを、本開示は提供する。具体的には、本明細書に記載のメチル化バイオマーカーは、個別にも有用であるし、組合せても有用である。

【０２５３】

〔配列〕
配列番号１（ＺＮＦ１３２）（表１を参照）
ＺＮＦ１３２　ｃｈｒ１９、ｈｇ３８のｂｐ　５８４３９７２８～５８４４０９９４
【０２５４】
配列番号２（ＤＭＲＴ１）（表１を参照）
ＤＭＲＴ１　ｃｈｒ９、ｈｇ３８のｂｐ　８４１３４０～９６８０９０
【０２５５】
配列番号３（ＡＬＫ）（表１を参照）
ＡＬＫ　ｃｈｒ２、ｈｇ３８のｂｐ　２９１９３２１５～２９９２２２８６
【０２５６】
配列番号４（ＪＡＭ２）（表１を参照）
ＪＡＭ２　ｃｈｒ２１、ｈｇ３８のｂｐ　２５６３７８４８～２５７１４７０４
【０２５７】
配列番号５（ＦＧＦ１４）（表１を参照）
ＦＧＦ１４　ｃｈｒ１３、ｈｇ３８のｂｐ　１０１９１９８７９～１０２４０３１３７
【０２５８】
配列番号６（ＭＣＩＤＡＳ）（表１を参照）
ＭＣＩＤＡＳ　ｃｈｒ５、ｈｇ３８のｂｐ　５５２２０９５１～５５２２１０５１
【０２５９】
配列番号７（ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５）（表１を参照）
ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５　ｃｈｒ１、ｈｇ３８のｂｐ　７６８６６２５５～７７０６３３８８
【０２６０】
配列番号８（ＬＯＮＲＦ２）（表１を参照）
ＬＯＮＲＦ２　ｃｈｒ２、ｈｇ３８のｂｐ　１００２８５６６７～１００３２３０１５
【０２６１】
配列番号９（ＰＤＧＦＤ）（表１を参照）
ＰＤＧＦＤ　ｃｈｒ１１、ｈｇ３８のｂｐ　１０４１６３４９９～１０４１６４０２６
【０２６２】
配列番号１０（ＧＳＧ１Ｌ）（表１を参照）
ＧＳＧ１Ｌ　ｃｈｒ１６、ｈｇ３８のｂｐ　２７９２０６１５～２８０６４２７５
【０２６３】
配列番号１１（ＺＮＦ４９２）（表１を参照）
ＺＮＦ４９２　ｃｈｒ１９、ｈｇ３８のｂｐ　２２６３３０５１～２２６６６４３３
【０２６４】
配列番号１２（ＺＮＦ５６８）（表１を参照）
ＺＮＦ５６８　ｃｈｒ１９、ｈｇ３８のｂｐ　３６９１６３１２～３６９４３９４０
【０２６５】
配列番号１３（ＡＤＡＭＴＳ２）（表１を参照）
ＡＤＡＭＴＳ２　ｃｈｒ５、ｈｇ３８のｂｐ　１７９１１８１１４～１７９３４４３９２
【０２６６】
配列番号１４（ＺＮＦ５４２）（表１を参照）
ＺＮＦ５４２　ｃｈｒ１９、ｈｇ３８のｂｐ　５６３６７８３８～５６３７０９８６
【０２６７】
配列番号１５（ＺＮＦ４７１）（表１を参照）
ＺＮＦ４７１　ｃｈｒ１９、ｈｇ３８のｂｐ　５６５０７２４５～５６５０８５８９
【０２６８】
配列番号１６（ＣＮＲＩＰ１）（表１を参照）
ＣＮＲＩＰ１　ｃｈｒ２、ｈｇ３８のｂｐ　６８２９３１１４～６８３２０９２８
【０２６９】
配列番号１７（表７を参照）

CCTCCTCACCCATCATCAGCGCCCGCGGCTTTGGGTGGCCGACCAGAGGGCGGCCGGAA
AGCACCTCGGTGCCCCGCGACCCTCCGAACAGAGGCGGCGGGAGGTACC
【０２７０】
配列番号１８（表７を参照）
GCGTGCTGGGTTTAATCTTCACCTCAACCTTGTAGGAGGAGCCGGTGAGCAGCTTGATG
GTGCGGTTCTGGCCGAAGCGCTGCCCGTCCACCTTGTAAAAGACCGGGCCGT
【０２７１】
配列番号１９（表７を参照）
AGGAAGCAAAGTGACCCCTAAGCCTAGACAAAGCTCTCGAAAGCCCAAAGCCTCGGGCC
CACCGGCCAGCTCCCCACCCCGCTGCTGGGCCGGACAGGTGTAGGGGAGGCGGACC
【０２７２】
配列番号２０（表７を参照）
CTCTCAGTCCCGCCGGCTTAGGTAACCCAGGTCGCTGCGGTAACGCAGTGACCGCGCTC
CAGGTCCGCGTCTCTTGC
【０２７３】
配列番号２１（表７を参照）
CCACTGCGAAGGGAAGGGGCATTCCGCCAGGCGACCCCAGAAGCCAGCCTGCACCTCCC
CGGCTTTCCTGCAACCGGGAAGGGGCGTTAACAGGG
【０２７４】
配列番号２２（表７を参照）
GCGACCCCAGAAGCCAGCCTGCACCTCCCCGGCTTTCCTGCAACCGGGAAGGGGCGTTA
ACAGGGCCACCACTCCGGGGCTCCGCCACTCCCCAGCCGTT
【０２７５】
配列番号２３（表７を参照）
CAACGGAAACTTCCCGCGCTACGGCGGCTCCAACGGGCCGCTTCCGCCGCATTGCGTAG
CGAAGCCCCCGGCGAG
【０２７６】
配列番号２４（表７を参照）
CAAAGCGTCTGGGGCGCTAGTGGGGGCGGCCAGCGGCTCGAGCGCCGGGGGCAGCAGCA
GAGGAGGCGGCTCCGGCTCCGGGGCGTCGGACCTGGGTGCCGGGAGCAAGAAGT
【０２７７】
配列番号２５（表７を参照）
CGCTCAGCCGCTCTCCTCTTCTCTCTCCCGCCCGCCCGCAGCGCCATGGTCTGGCAGTGT
GTTTAGCGCT
【０２７８】
配列番号２６（表７を参照）
GGGTTCGGAGCGTGCAAAAGGTGACCTAGGCGCGCTACGCACCACGCACTCAGCGGTAC
TCTCCTCTCCCGGGCCCCCACGGGTCCCGATGCTGGGCGGGGATGCACTGAACTGTTC
【０２７９】
配列番号２７（表７を参照）
GCGCCCCACTTACATCCAGCACCGAGGCCAGGTGCCGGGTTCGGCTGGCGAGTTCCTTC
AGCTGCACGTTCCGCTCCTTGAGCGAGGCGATCTCCTCCTGTTTCTGGGTCAATGTCAC
GT
【０２８０】
配列番号２８（表７を参照）
AACGTCTATCACCCAGGGAAAGCTACTCTTGACTCCTTCCACCTATCAAAATTGCCTAA
GAAAGGTTGAGTCTGACCAAGGGGCGGCGCAGCTTGCAACTTTCGCCAACTCCGGGA
【０２８１】
配列番号２９（表７を参照）
GGTGCATTTGGGATCAGCGACTAGAGACAGCGTCGCTCCAAGAAAAAGCCGGGTTCTGC

TCCCGGGACCGACGCCGCGCCGCCCTGCGCTCTCGCCGCCTGCGCTCGCCCTGCGCTGG
CCCGGGTCGCTGTGCTAATC

【０２８２】

配列番号３０（表７を参照）

CCGAAAGAAATCCGAGCCAGGGTGAGGGTCTGAGACGCAAGGAGAATCCCAGGCAAGGC
GCTCCTGAGAAAAGATCCCCACGGCGGACGTGGGGCAACAAAACC

【０２８３】

配列番号３１（表７を参照）

CGAGAGAGGGGAAGGGGCTGGTTGGAACCGGTGGCAAGAGGCTGTGGCGGGACTCAGG
CCTCCCCGCAGTCGGCTCCACAATCTGCGCCCCAAGTTCG

【０２８４】

配列番号３２（表７を参照）

GCCCAAGCCTCACCCTCACACAGGAAAGCAGATGTGTTCTGGCCGGAAGTTGAGTGGGG
CCGCGGGGCCTGCTGGGAGGTGTTGTCCTCGGAAACGTCGCTGGCGCGGAGGGATGGTT
CG

【０２８５】

配列番号３３（表７を参照）

GGTCGCCTTCACCCAGCATCTCAGAAACTGCGCGCGGGATGAACATTCGGGTGTTTCCG
GCAGGTGACGCTG

【０２８６】

配列番号３４（表７を参照）

CCAGAGGCCCAGGGATCCGTTCAGGTCAGCGCTGGCGTCCGGGCCTGAGTTTGGAGGTG
GCGGGTGCCTTACAAGAATGCTCGCGT

【０２８７】

配列番号３５（表７を参照）

GGGAGGAGTGGGCGGCTGAATGGCCAGAGGCCCAGGGATCCGTTCAGGTCAGCGCTGGC
GTCCGGGCCTGAGTTTGGAGGTGGCGGGTGC

【０２８８】

配列番号３６（表７を参照）

CCCCACGCGTACTCACACCGAAGGCTCAGCCGTCGCGCGTTTCCCTCCCAGGCCCCAGG
AACTAGTAACTAGGGACGCTTCTGGTCTCTAGGCGAGGAGAGGGGGAGAGCGCAATCTT
TGCGCCTGCGCACACTCCTGCTCTTACCCGC

【０２８９】

配列番号３７（表７を参照）

GTCGCGCGTTTCCCTCCCAGGCCCCAGGAACTAGTAACTAGGGACGCTTCTGGTCTCTA
GGCGAGGAGAGGGGGAGAGCGCAATCTTTGCGCCTGCGCACACTCCTGCTCTTACCCGC

【０２９０】

配列番号３８（表７を参照）

CTGCTCTTACCCGCCGGAACCCTGGGCCACGCCCGGCTCGCGTAATCACGCACTGCGCA
GGCACCGCCCGCTCTGCTCTAAGGTCCCTC

【０２９１】

配列番号３９（表７を参照）

CTACTGCTAGGTCGTTGCCAAGGTGATTGAGGAATGGCGTTTATTGCGTCGCTGCTCAG
GCAACGCAAACTACATTATCCAGAAGGACCCTCGCGGTGCCTCAGGGCTGGCCATTGGC
AGCCGAGGAGACAGGCACTTCCGGGCGGAGTGTAAGACGCTGGCCAATCA

【０２９２】

配列番号４０（表７を参照）

GTGTAAGACGCTGGCCAATCACAGCCTGGCAGCGGGACTTCCGTCGTCGTCCTCGGACC
ATCACTTTGGCATTTCTCGATTTTGTCTGCTTCTGAAGGGACCGCGTTGT

【０２９３】

配列番号４１（表７を参照）
CCGCGTGGTCTGGGCTCTGTAGCGTCCCAGCTGAGCCGGCGATATGCAGCGCACTTGTG
GGGCGGAGGTGGAGGGAATTC
【０２９４】
配列番号４２（表７を参照）
CAACGTTAAAGGCAAACACCTTCTGCGGTGTGCTTGGCTCAGCTCAGGCAGGAAGCCCT
GCCTGAAAAGGCTGCACCTTCGGCTGTCACTCTGTCCTCATTCGGCC
【０２９５】
配列番号４３（表７を参照）
GCCGGTGAGCAGCTTGATGGTGCGGTTCTGGCCGAAGCGCTGCCCGTCCACCTTGTAAA
AGACCGGGCCGT
【０２９６】
配列番号４４（表７を参照）
CGGGAAGGGGCGTTAACAGGGCCACCACTCCGGGGCTCCGCCACTCCCCAGCCGTTCCC
TCCTCCGGAGACCTTGCCTGCCAAGA
【０２９７】
配列番号４５（表１３を参照）
CCTCCTCACCCATCATCAGCGCCC
【０２９８】
配列番号４６（表１３を参照）
GGTACCTCCCGCCGCCTCTGTTC
【０２９９】
配列番号４７（表１３を参照）
GCGTGCTGGGTTTAATCTTCACCTCAA
【０３００】
配列番号４８（表１３を参照）
ACGGCCCGGTCTTTTACAAGGTGG
【０３０１】
配列番号４９（表１３を参照）
AGGAAGCAAAGTGACCCCTAAGCCT
【０３０２】
配列番号５０（表１３を参照）
GGTCCGCCTCCCCTACACCT
【０３０３】
配列番号５１（表１３を参照）
CTCTCAGTCCCGCCGGCTTAGGTA
【０３０４】
配列番号５２（表１３を参照）
GCAAGAGACGCGGACCTGGAGC
【０３０５】
配列番号５３（表１３を参照）
CCACTGCGAAGGGAAGGGGCA
【０３０６】
配列番号５４（表１３を参照）
CCCTGTTAACGCCCCTTCCCGGTT
【０３０７】
配列番号５５（表１３を参照）
GCGACCCCAGAAGCCAGCCT
【０３０８】
配列番号５６（表１３を参照）

AACGGCTGGGGAGTGGCGGA
【０３０９】
配列番号５７（表１３を参照）
CAACGGAAACTTCCCGCGCTAC
【０３１０】
配列番号５８（表１３を参照）
CTCGCCGGGGGCTTCGCTAC
【０３１１】
配列番号５９（表１３を参照）
CAAAGCGTCTGGGGCGCTAGT
【０３１２】
配列番号６０（表１３を参照）
ACTTCTTGCTCCCGGCACCCAGGTC
【０３１３】
配列番号６１（表１３を参照）
CGCTCAGCCGCTCTCCTCTTCTCT
【０３１４】
配列番号６２（表１３を参照）
AGCGCTAAACACACTGCCAGACCA
【０３１５】
配列番号６３（表１３を参照）
GGGTTCGGAGCGTGCAAAAGGTGA
【０３１６】
配列番号６４（表１３を参照）
GAACAGTTCAGTGCATCCCCGCCC
【０３１７】
配列番号６５（表１３を参照）
GCGCCCCACTTACATCCAGCACC
【０３１８】
配列番号６６（表１３を参照）
ACGTGACATTGACCCAGAAACAGGAGGA
【０３１９】
配列番号６７（表１３を参照）
AACGTCTATCACCCAGGGAAAGCT
【０３２０】
配列番号６８（表１３を参照）
TCCCGGAGTTGGCGAAAGTTGCAA
【０３２１】
配列番号６９（表１３を参照）
GGTGCATTTGGGATCAGCGACTAGAGAC
【０３２２】
配列番号７０（表１３を参照）
GATTAGCACAGCGACCCGGGCCAG
【０３２３】
配列番号７１（表１３を参照）
CCGAAAGAAATCCGAGCCAGGGTGA
【０３２４】
配列番号７２（表１３を参照）
GGTTTTGTTGCCCCACGTCC
【０３２５】

配列番号７３（表１３を参照）
CGAGAGAGGGGAAGGGGCTGGTTG
【０３２６】
配列番号７４（表１３を参照）
CGAACTTGGGGCGCAGATTGTGG
【０３２７】
配列番号７５（表１３を参照）
GCCCAAGCCTCACCCTCACACAG
【０３２８】
配列番号７６（表１３を参照）
CGAACCATCCCTCCGCGCCA
【０３２９】
配列番号７７（表１３を参照）
GGTCGCCTTCACCCAGCATCTCAG
【０３３０】
配列番号７８（表１３を参照）
CAGCGTCACCTGCCGGAAACACC
【０３３１】
配列番号７９（表１３を参照）
CCAGAGGCCCAGGGATCCGTTCAG
【０３３２】
配列番号８０（表１３を参照）
ACGCGAGCATTCTTGTAAGGCACCC
【０３３３】
配列番号８１（表１３を参照）
GGGAGGAGTGGGCGGCTGAATGG
【０３３４】
配列番号８２（表１３を参照）
GCACCCGCCACCTCCAAACTCAG
【０３３５】
配列番号８３（表１３を参照）
CCCCACGCGTACTCACACCGAAG
【０３３６】
配列番号８４（表１３を参照）
GCGGGTAAGAGCAGGAGTGTG
【０３３７】
配列番号８５（表１３を参照）
GTCGCGCGTTTCCCTCCCAG
【０３３８】
配列番号８６（表１３を参照）
GCGGGTAAGAGCAGGAGTGTG
【０３３９】
配列番号８７（表１３を参照）
CTGCTCTTACCCGCCGGAACCCTG
【０３４０】
配列番号８８（表１３を参照）
GAGGGACCTTAGAGCAGAGCGGGC
【０３４１】
配列番号８９（表１３を参照）
CTACTGCTAGGTCGTTGCCAAGG

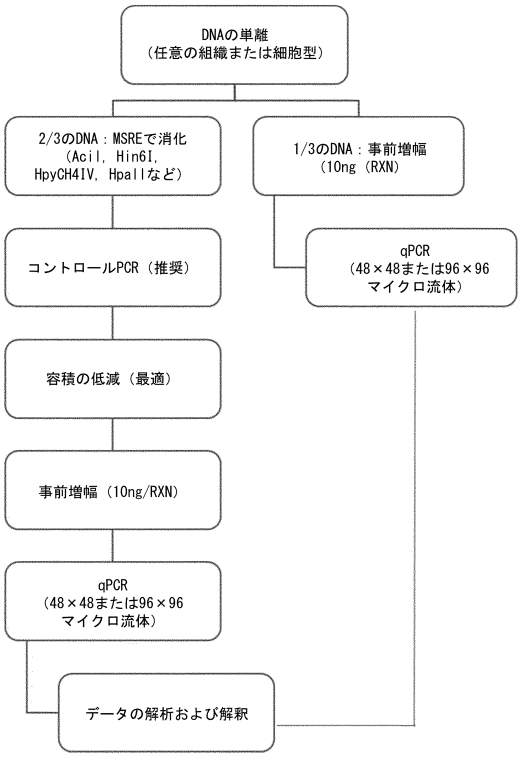
【０３４２】
配列番号９０（表１３を参照）
TGATTGGCCAGCGTCTTACACTCCG
【０３４３】
配列番号９１（表１３を参照）
GTGTAAGACGCTGGCCAATCACA
【０３４４】
配列番号９２（表１３を参照）
ACAACGCGGTCCCTTCAGAAGCAG
【０３４５】
配列番号９３（表１３を参照）
CCGCGTGGTCTGGGCTCTGTAG
【０３４６】
配列番号９４（表１３を参照）
GAATTCCCTCCACCTCCGCCCCAC
【０３４７】
配列番号９５（表１３を参照）
CAACGTTAAAGGCAAACACCTTCTGC
【０３４８】
配列番号９６（表１３を参照）
GGCCGAATGAGGACAGAGTGACAG
【０３４９】
配列番号９７（表１３を参照）
GCCGGTGAGCAGCTTGATGGT
【０３５０】
配列番号９８（表１３を参照）
ACGGCCCGGTCTTTTACAAGG
【０３５１】
配列番号９９（表１３を参照）
CGGGAAGGGGCGTTAACAGGGC
【０３５２】
配列番号１００（表１３を参照）
TCTTGGCAGGCAAGGTCTCCGGAG
【図面の簡単な説明】
【０３５３】
【図１】図１は、例示的なＭＳＲＥ－ｑＰＣＲアプローチを示す模式図である。
【図２】図２は、第１対象群（７０人のヒト対象）の特徴を示す表である。
【図３】図３は、第２対象群（６３人のヒト対象）の特徴を示す表である。
【図４】図４は、パネルＡおよびＢを含む。
【図５】図５は、ＡＬＫ‘４３４のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。
【図６】図６は、ＦＧＦ１４‘５７７　ＤＭＲのＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。
【図７】図７は、ＰＤＧＦＤ‘３８８のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。
【図８】図８は、ＪＡＭ２‘３２０のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。
【図９】図９は、ＬＯＮＲＦ２‘２８１のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。
【図１０】図１０は、第３対象群（８２人のヒト対象）の特徴を示す表である。
【図１１】図１１は、２８個のＤＭＲパネルを用いた、第３対象群に対する大腸がんのス

クリーニングの性能を示すグラフである。
【図１２】図１２は、ＺＮＦ４７１‘５２７のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。
【図１３】図１３は、ＦＧＦ１４‘５７７のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。
【図１４】図１４は、ＰＤＧＦＤ‘３８８のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。
【図１５】図１５は、ＡＤＡＭＴＳ２‘２５４のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。
【図１６】図１６は、ＺＮＦ４７１‘５５８（本明細書では、このＤＭＲをＺＮＦ４７１＿２と称する）のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。
【図１７】図１７は、ＳＴ６ＧＡＬＮＡＣ５‘４５６のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。
【図１８】図１８は、ＺＮＦ５４２‘５２５のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。
【図１９】図１９は、ＬＯＮＲＦ２‘２８１のＭＳＲＥ－ｑＰＣＲによるＣｔ値を示すグラフである。
【図２０】図２０は、正常細胞のメチル化状態とがん細胞のメチル化状態との間における、例示的なメチル化の変化を示す模式図である。

【図面】

【図１】

図 1



【図２】

図 2

		訓練用（n＝70）		
		大腸がん	健常＋非進行性腺腫	健常	非進行性腺腫
女性（%）		15 (21.4)	20 (28.6)	15 (21.4)	5 (7.1)
男性（%）		15 (21.4)	20 (28.6)	15 (21.4)	5 (7.1)
年齢（年齢幅）		64 (41-80)	60 (46-84)	60 (46-77)	60 (46-84)
BMI (sd)		25.0 (± 4.4)	26.7 (± 4.3)	26.7 (± 4.7)	27.2 (± 3.0)
		全大腸がん	近位	遠位	
限局性		17	6	11	
進行性		13	9	4	

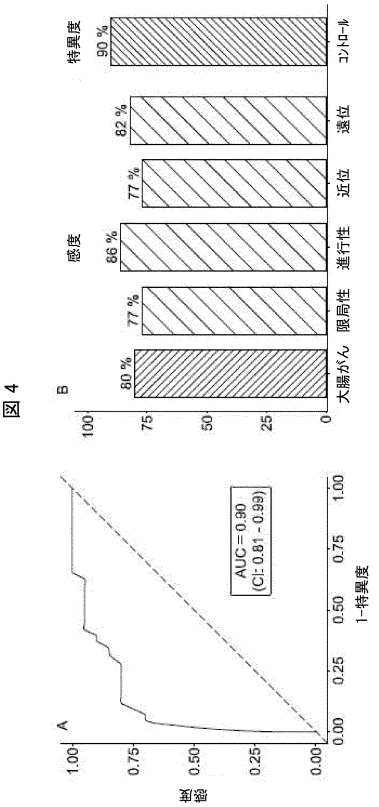
【図３】

図 3

		検証用（n＝63）			
		大腸がん	健常＋非進行性腺腫	健常	非進行性腺腫
女性（%）		11 (17.5)	25 (39.7)	20 (31.7)	5 (7.9)
男性（%）		9 (14.3)	16 (26.6)	11 (17.5)	7 (11.1)
年齢（年齢幅）		61 (45-84)	57 (47-80)	55 (47-80)	63 (55-70)
BMI (sd)		25.4 (± 3.6)	26.3 (± 4.0)	26.3 (± 4.0)	26.7 (± 4.0)
		全大腸がん	近位	遠位	
限局性		13	5	8	
進行性		7	4	3	

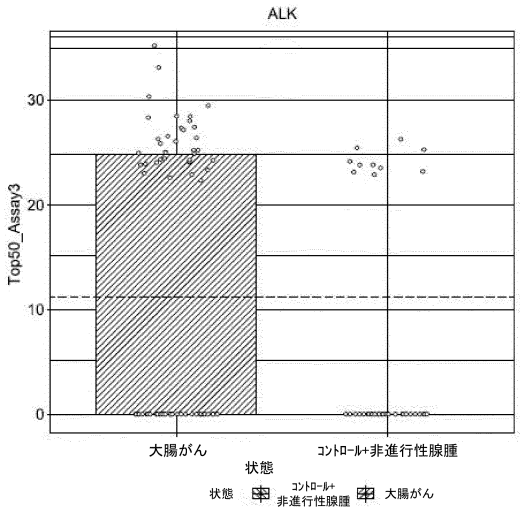
【図４】

図 4



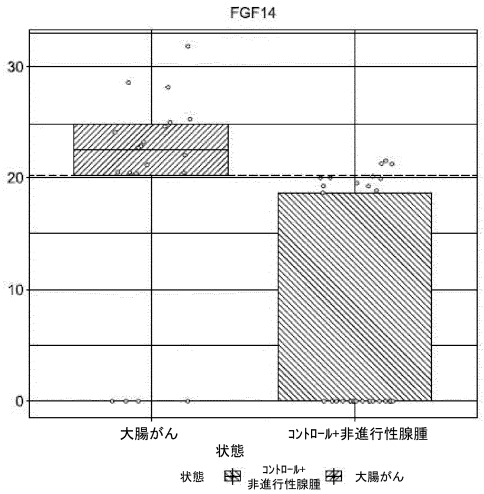
【図５】

図 5



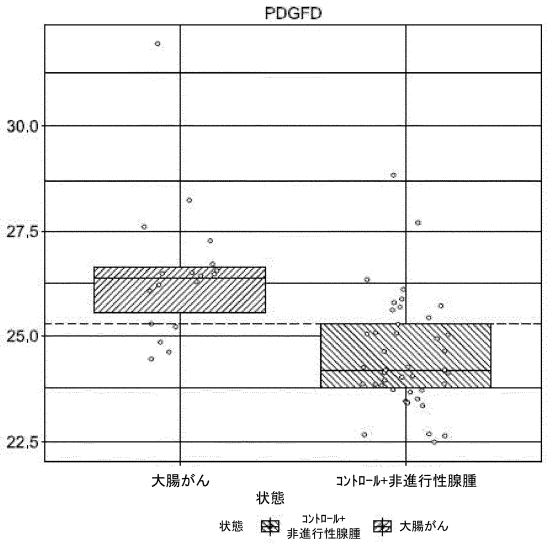
【図６】

図 6



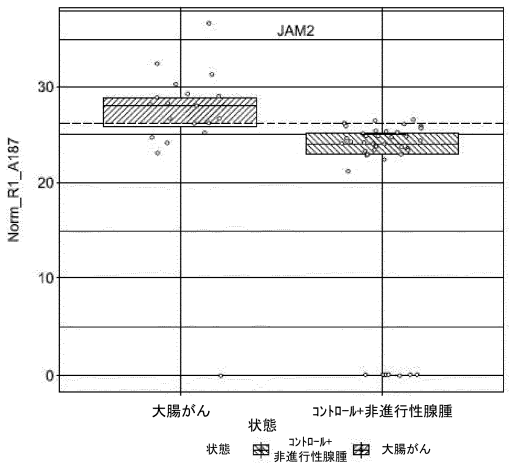
【図７】

図 7



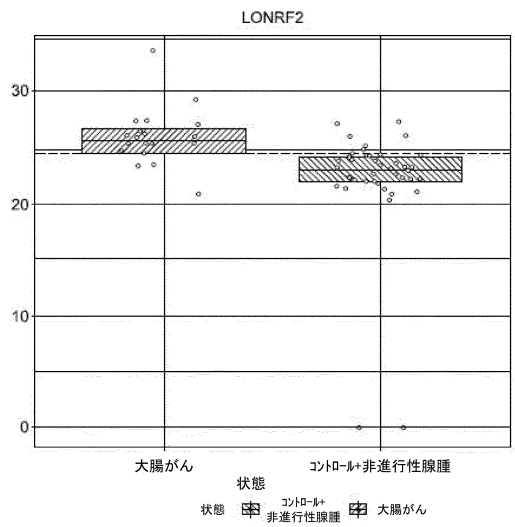
【図８】

図 8



【図９】

図 9



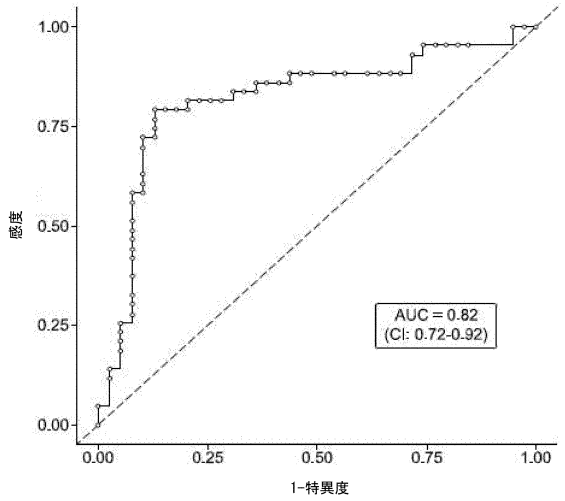
【図１０】

図 10

検証用（82個の試料）		大腸がん	コントロール+非進行性腺腫	コントロール	非進行性腺腫
	女性	20	14	11	3
	男性	23	25	19	6
	年齢（年齢幅）	63 (36-84)	65 (45-83)	64 (45-79)	66 (55-83)
	BMI (sd)	27.2 (± 5)	26.04 (± 3.3)	26 (± 3.4)	27.5 (± 2.5)
		全大腸がん	近位	遠位	
	限局性	24	12	12	
	進行性	19	9	10	

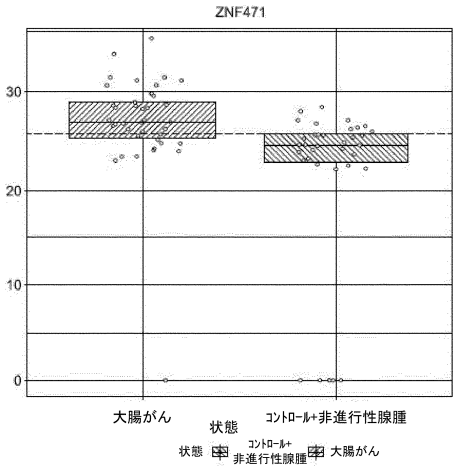
【図１１】

図 11



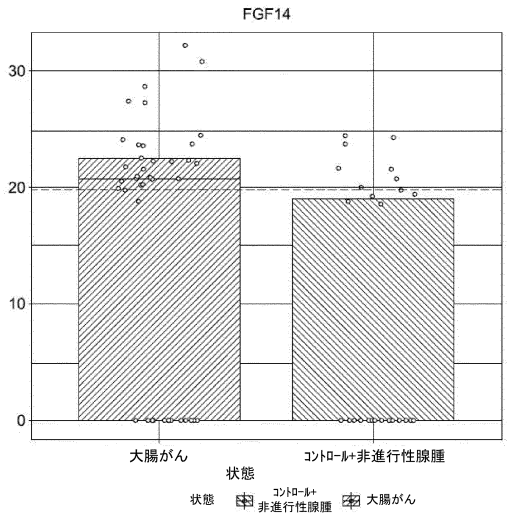
【図１２】

図 12



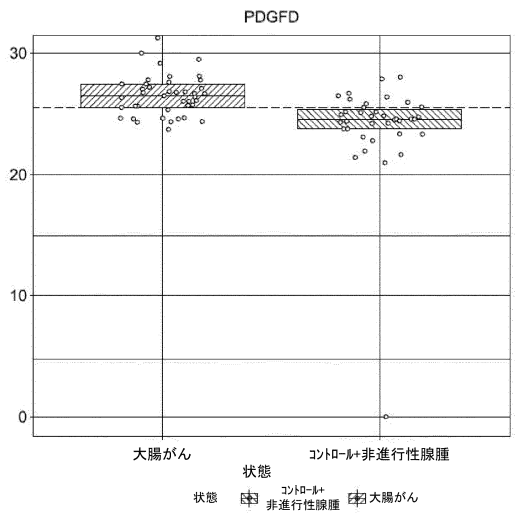
【図１３】

図 13



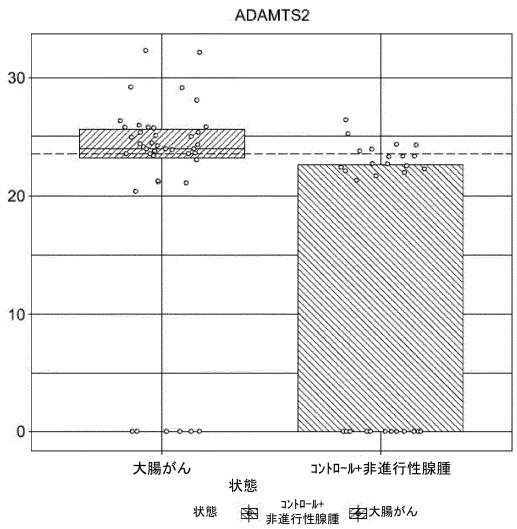
【図１４】

図 14



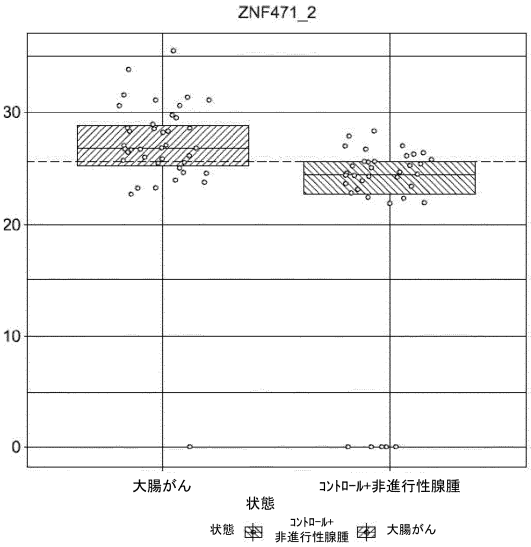
【図１５】

図 15



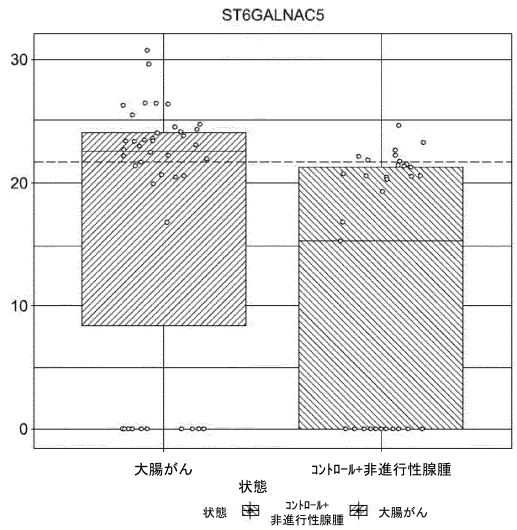
【図１６】

図 16



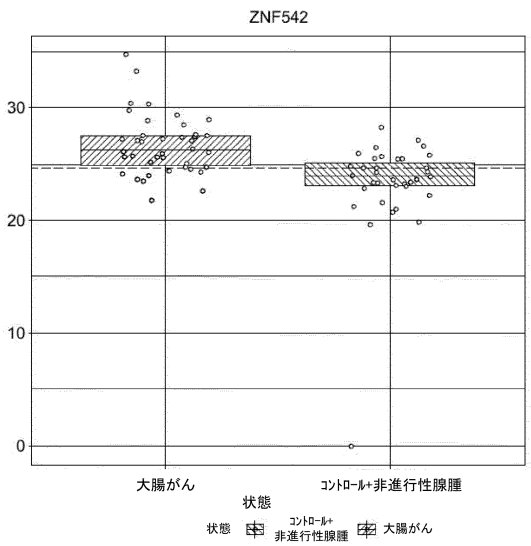
【図１７】

図 17



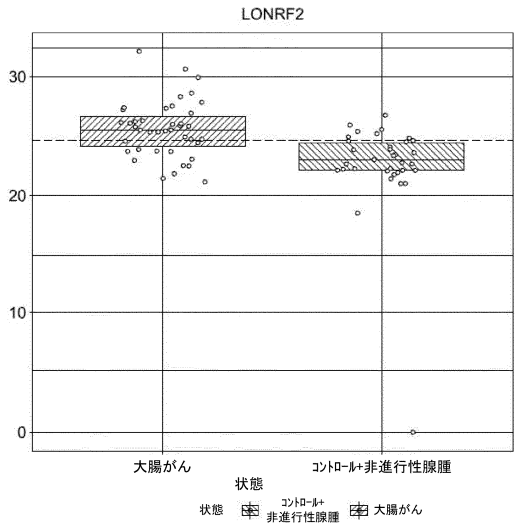
【図１８】

図 18



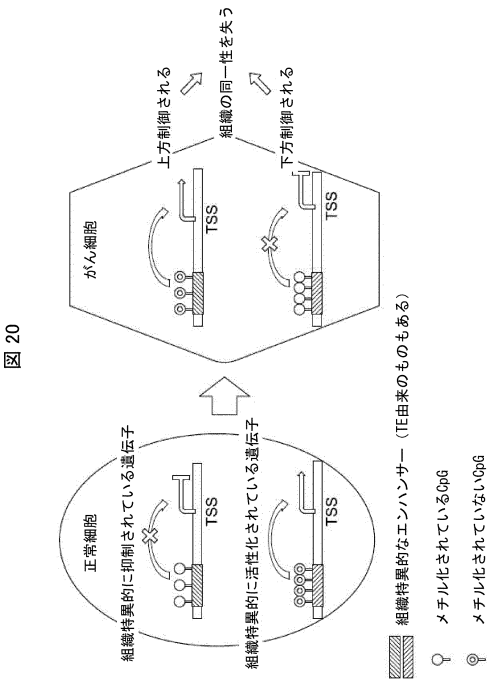
【図１９】

図 19



【図２０】

図 20



【配列表】
0007541365000001.app

フロントページの続き

スロベニア，１０００ リュブリャナ，ツェスタ ナ ポリャネ，２４
(72)発明者 マルティネス－バレア，ジュアン
スペイン，４１０１３ セビーリャ，アヴェニーダ ディエゴ マルティネス バリオ １０，エディフィシオ インサー，プランタ ３アー，モデュロ １５
(72)発明者 ヘンス，クリスティアン
スペイン，４１０１３ セビーリャ，アヴェニーダ ディエゴ マルティネス バリオ １０，エディフィシオ インサー，プランタ ３アー，モデュロ １５
(72)発明者 チェルシコラ，マルコ
スロベニア，１０００ リュブリャナ，ツェスタ ナ ポリャネ，２４
(72)発明者 ナップ，プリモシュ
スロベニア，１０００ リュブリャナ，ツェスタ ナ ポリャネ，２４

審査官 松田 芳子

(56)参考文献
特開２０１５－００６１６４（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１８／１４０７８１（WO，Ａ１）
特表２０１３－５４５４３７（ＪＰ，Ａ）
United European Gastroenterology Journal，2017年，vol.5, suppl.5，A763, P1754
BMC Cancer，2018年，vol.18, article no.796
Int. J. Cancer，vol.129，2011年，p.2855-2866

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｑ １／６８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）