(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5341506号
(P5341506)
(45)発行日　平成25年11月13日(2013.11.13)　(24)登録日　平成25年8月16日(2013.8.16)

(51)Int.Cl.　　F I
C12N 15/09 (2006.01)　　C12N 15/00 A
C12Q 1/68 (2006.01)　　C12Q 1/68 ZNAZ

請求項の数 22　(全 122 頁)

(21)出願番号　特願2008-506752 (P2008-506752)
(86)(22)出願日　平成18年4月17日 (2006.4.17)
(65)公表番号　特表2008-538497 (P2008-538497A)
(43)公表日　平成20年10月30日 (2008.10.30)
(86)国際出願番号　PCT/US2006/014131
(87)国際公開番号　WO2006/113466
(87)国際公開日　平成18年10月26日 (2006.10.26)
審査請求日　平成20年6月20日 (2008.6.20)
(31)優先権主張番号　60/672,242
(32)優先日　平成17年4月15日 (2005.4.15)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/676,997
(32)優先日　平成17年5月2日 (2005.5.2)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(73)特許権者　500247105
エピゲノミクス　アーゲー
ドイツ国、１０１７８　ベルリン、クライネ　プレジデンテンシュトラーセ　１
(74)代理人　100088904
弁理士　庄司　隆
(74)代理人　100124453
弁理士　資延　由利子
(74)代理人　100135208
弁理士　大杉　卓也
(72)発明者　ディストラー，ユルゲン
ドイツ，１０８２５　ベルリン，ヘーワルドシュトラーセ．２

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細胞増殖性疾患分析のための方法および核酸

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
被検者から単離された生物学的試料中の配列番号１～配列番号３のいずれかに示されるセプチン９遺伝子のＣｐＧメチル化を決定することにより、肝細胞または結腸直腸の細胞増殖性疾患の検出および／または悪性か良性の分類をするための情報を提供する方法であって、
該試料中の配列番号１～配列番号３に示されるセプチン９遺伝子のＣｐＧメチル化を決定する工程を含み、
ＣｐＧメチル化は、
（ｉ）被検者の肝細胞のまたは結腸直腸の細胞増殖性疾患の存在の指標であり、および／または
（ｉｉ）被検者の肝細胞のまたは結腸直腸の細胞増殖性疾患の分類を可能にするものであって、ＣｐＧメチル化の存在が被検者の悪性の細胞増殖性疾患の存在の指標であり、ＣｐＧメチル化の非存在が被検者の良性の細胞増殖性疾患の指標である、方法。
【請求項２】
細胞増殖性疾患が癌である、請求項１記載の方法。
【請求項３】
被検者から単離された生物学的試料中のセプチン９遺伝子のＣｐＧメチル化を決定することにより、肝細胞または結腸直腸の細胞増殖性疾患の検出および／または悪性か良性の分類をするための情報を提供する方法であって、

ゲノムＤＮＡの少なくとも１つの標的領域内のメチル化および非メチル化ＣｐＧジヌクレオチドを区別する少なくとも１つの試薬または一連の試薬に、被検者から得た生物学的試料から単離されたゲノムＤＮＡを接触させることを含み、

前記標的領域は少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチド配列を含むものであって、配列番号１～配列番号３からなる群から選択される少なくとも１つの配列のうちの少なくとも１６個の近接するヌクレオチド配列を含むかまたは前記ヌクレオチド配列と相補的な配列であり、

ＣｐＧメチル化を決定し、ＣｐＧメチル化が、

（ｉ）被検者の肝細胞のまたは結腸直腸の細胞増殖性疾患の存在の指標であり、および／または

（ｉｉ）被検者の肝細胞のまたは結腸直腸の細胞増殖性疾患の分類を可能にするものであって、ＣｐＧメチル化の存在が被検者の悪性の細胞増殖性疾患の存在の指標であり、ＣｐＧメチル化の非存在が被検者の良性の細胞増殖性疾患の指標である、方法。

【請求項４】

被検者から単離された生物学的試料中の配列番号１～配列番号３のいずれかに示されるセプチン９遺伝子のＣｐＧメチル化状態またはレベルを決定することにより、肝細胞または結腸直腸の細胞増殖性疾患の検出および／または悪性か良性の分類をするための情報を提供する方法であって、

下記工程を含む：

ａ）被検者から単離された生物学的試料からゲノムＤＮＡを抽出またはそうでなければ単離し；

ｂ）ａ）におけるゲノムＤＮＡを、その５－位で非メチル化されているシトシン塩基をウラシルまたはハイブリダイゼーション特性においてシトシンと区別して検出できる他の塩基に変換する１つまたは複数の試薬で処理し；

ｃ）処理されたゲノムＤＮＡを、増幅酵素および配列番号４～配列番号１５からなる群から選択される配列または前記配列に相補的である配列のうち、少なくとも１５個の近接するヌクレオチド配列を含む少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチドを含む配列の増幅に適したプライマーと接触させ、処理されたゲノムＤＮＡは少なくとも１つの増幅産物を生成するように増幅されるか、あるいは増幅されず、そして

ｄ）前記増幅産物の存否または特性に基づいて、配列番号１～配列番号３からなる群から選択される配列の少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチドのメチル化状態またはレベル、または配列番号１～配列番号３からなる群から選択される配列の複数のＣｐＧジヌクレオチドの平均メチル化状態またはレベル、または平均メチル化状態またはレベルを反映する値を決定し、

ＣｐＧメチル化またはＣｐＧメチル化レベルの増加が、

（ｉ）被検者の肝細胞のまたは結腸直腸の細胞増殖性疾患の存在の指標であり、および／または

（ｉｉ）被検者の肝細胞のまたは結腸直腸の細胞増殖性疾患の分類を可能にするものであって、ＣｐＧメチル化の存在が被検者の悪性の細胞増殖性疾患の存在の指標であり、ＣｐＧメチル化の非存在が被検者の良性の細胞増殖性疾患の指標である、方法。

【請求項５】

ｂ）において、ゲノムＤＮＡを処理することは、重亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、二亜硫酸塩およびこれらの組合せからなる群から選択される試薬の使用を含む、請求項４記載の方法。

【請求項６】

ｃ）において、接触または増幅することは、増幅酵素としての耐熱性ＤＮＡポリメラーゼの使用；５'－３'エキソヌクレアーゼ活性を欠くポリメラーゼの使用；ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）の使用；検出可能な標識を有する増幅産物核酸分子の生成を含む群から選択される少なくとも１つの方法の使用を含む、請求項４記載の方法。

【請求項７】

被検者から単離された生物学的試料は、セルライン、組織学スライド、生検、パラフィン包埋組織、体液、糞便、結腸溶出液、尿、血漿、血清、全血、単離された血球、血液から単離された細胞およびこれらの組合せを含む群から選択される、請求項１～６のいずれかに記載の方法。

【請求項８】

ｃ）において、さらに配列番号４～配列番号１５からなる群から選択される配列または前記配列に相補的である配列のうち、少なくとも１５個の近接するヌクレオチド配列を含む少なくとも１つの核酸分子またはペプチド核酸の使用を含み、前記核酸分子またはペプチド核酸分子はそれがハイブリダイズする核酸の増幅を抑制する、請求項４記載の方法。

【請求項９】

ｄ）において決定することは、配列番号４～配列番号１５からなる群から選択される配列または前記配列に相補的である配列のうち、少なくとも長さ１５個の近接するヌクレオチド配列を含む少なくとも１つの核酸分子またはペプチド核酸のハイブリダイゼーションを含む、請求項４記載の方法。

【請求項１０】

ハイブリダイズする少なくとも１つの核酸分子またはペプチド核酸分子は固相に結合されている、請求項９記載の方法。

【請求項１１】

さらに少なくとも１つのヌクレオチド塩基単位で、ハイブリダイズする少なくとも１つの核酸分子を伸長することを含む、請求項９記載の方法。

【請求項１２】

ｄ）において決定することは、増幅産物の配列決定を含む、請求項４記載の方法。

【請求項１３】

ｃ）において接触または増幅することは、メチル化特異的プライマーの使用を含む、請求項４記載の方法。

【請求項１４】

被検者から単離された生物学的試料中の配列番号１～配列番号３のいずれかに示されるセプチン９遺伝子のＣｐＧメチル化状態またはレベルを決定することにより、肝細胞または結腸直腸の細胞増殖性疾患の検出および／または悪性か良性の分類をするための情報を提供する方法であって、

下記工程を含む：

ａ）被検者から単離された生物学的試料からゲノムＤＮＡを抽出またはそうでなければ単離し；

ｂ）ａ）におけるゲノムＤＮＡを１つまたは複数のメチル化感受性制限酵素で消化し；ｂ）のＤＮＡ制限酵素消化物を増幅酵素および配列番号１～配列番号３から選択される配列の少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチドを含む配列の増幅に適した少なくとも２つのプライマーと接触させ；そして、

ｃ）増幅産物の存否に基づいて、配列番号１～配列番号３からなる群から選択される配列の少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを決定し、

ＣｐＧメチル化またはＣｐＧメチル化レベルの増加が、

（ｉ）被検者の肝細胞のまたは結腸直腸の細胞増殖性疾患の存在の指標であり、および／または

（ｉｉ）被検者の肝細胞のまたは結腸直腸の細胞増殖性疾患の分類を可能にするものであって、ＣｐＧメチル化の存在が被検者の悪性の細胞増殖性疾患の存在の指標であり、ＣｐＧメチル化の非存在が被検者の良性の細胞増殖性疾患の指標である、方法。

【請求項１５】

増幅産物の存否は配列番号１～配列番号３から選択される配列の少なくとも長さ１６塩基長の近接するヌクレオチド配列と同一であるかまたは相補的である、少なくとも１つの核酸またはペプチド核酸へのハイブリダイゼーションによって決定される、請求項１４記載の方法。

【請求項１６】
配列番号１～配列番号３のいずれかに示されるゲノムＤＮＡから誘導された処理核酸からなる肝細胞または結腸直腸の腫瘍細胞検出剤であって、該処理は前記ゲノムＤＮＡ配列の少なくとも１つのＣｐＧ非メチル化シトシン塩基をウラシルまたはハイブリダイゼーションにおいてシトシンと区別して検出できる他の塩基に変換する、腫瘍細胞検出剤。
【請求項１７】
配列番号４～配列番号１５からなる群から選択される処理されたゲノムＤＮＡ配列または前記処理されたゲノムＤＮＡ配列に相補的な配列の少なくとも１６個の近接するヌクレオチド配列を含む核酸からなる肝細胞または結腸直腸の腫瘍細胞検出剤であって、該処理は前記ゲノムＤＮＡ配列の少なくとも１つのＣｐＧ非メチル化シトシン塩基をウラシルまたはハイブリダイゼーションにおいてシトシンと区別して検出できる他の塩基に変換する、腫瘍細胞検出剤。
【請求項１８】
配列番号４～配列番号１５からなる群から選択される処理されたゲノムＤＮＡ配列または前記処理されたゲノムＤＮＡ配列に相補的な配列の少なくとも５０個の近接するヌクレオチド配列を含む核酸からなる肝細胞または結腸直腸の腫瘍細胞検出剤であって、該処理は前記ゲノムＤＮＡ配列の少なくとも１つのＣｐＧ非メチル化シトシン塩基をウラシルまたはハイブリダイゼーションにおいてシトシンと区別して検出できる他の塩基に変換する、腫瘍細胞検出剤。
【請求項１９】
近接するヌクレオチド配列は少なくとも１つのＣｐＧ、ＴｐＧまたはＣｐＡジヌクレオチド配列を含む、請求項１６～１８のいずれかに記載の腫瘍細胞検出剤。
【請求項２０】
配列番号１～配列番号３からなる群から選択される少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチドを含む核酸配列または前記核酸配列に相補的な配列の少なくとも１６個の近接するヌクレオチド配列を含む核酸からなる肝細胞または結腸直腸の細胞増殖性疾患診断剤。
【請求項２１】
（ａ）重亜硫酸塩試薬；
（ｂ）前記重亜硫酸塩試薬および患者の生物学的試料を収容するのに適した容器；
（ｃ）配列番号４～配列番号１５から選択される配列の１５塩基長または１８塩基長の近接するヌクレオチド配列と同一であるか、または相補的である、少なくとも１つのＣｐＧを増幅可能な２つのオリゴヌクレオチドを含む少なくとも１セットのオリゴヌクレオチドを含む、請求項３記載の方法を実施するのに適したキット。
【請求項２２】
（ａ）メチル化感受性制限酵素試薬；
（ｂ）前記試薬および患者の生物学的試料を収容するのに適した容器；
（ｃ）配列番号１～配列番号３から選択される配列の少なくとも１５塩基長の近接するヌクレオチド配列と同一であるか、または相補的である、１つまたは複数の核酸またはペプチド核酸を含む少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチドを含む配列の増幅に適した少なくとも１セットのオリゴヌクレオチドを含む、請求項３記載の方法を実施するのに適したキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は正常状態に対して疾患状態で変化する発現パターンを示すゲノムＤＮＡ配列に関する。具体的な実施態様は、特に細胞増殖性疾患を検出するか、あるいは検出して、それらを区別するために有用な新規な方法、核酸、核酸アレーおよびキットを提供する。好ましくは、細胞増殖性疾患の検出および診断のための方法、核酸、核酸アレーおよびキットは癌、特に結腸直腸癌および／または肝臓癌の診断に使用される。
【０００２】

本願は２００５年４月１５日付け出願の米国仮特許出願６０／６７２，２４２号；２００５年５月２日付け出願６０／６７６，９９７号；２００５年７月８日付け出願６０／７０４，８６０号；２００５年８月１日付け出願６０／７０４８６０号；２００５年８月１７日付け出願６０／７０９，３１８号；２００５年１０月４日付け出願６０／７２３，６０２号；および２００６年３月３０日付け出願６０／７８７，４０２号の優先権の利点を主張する。これらの全てはその全体を本明細書中に参考として導入する。

【０００３】

３７Ｃ．Ｆ．Ｒ§１．５２（ｅ）（５）に準拠した配列表は、表題が「47675-187 Sequence Listing.txt」である１．８２ＭＢテキストファイルとして、コンパクト・ディスク（１／１）で提出されている。これはその全体を本明細書中に参考として導入する。

【背景技術】

【０００４】

癌の発生と診断　癌は米国の主な死亡原因の第２番目である。死亡率はもしも現在のスクリーニング方法は患者のコンプライアンス、スクリーニングの感度および容易性の点から改善されるなら、有意に改善されるであろう。癌の診断において現在、推奨される方法は、しばしば高価であり、人口全般のスクリーニングテストとしての用途に適していない。

【０００５】

肝細胞性癌（ＨＣＣ）は、世界中で第４番目のもっとも一般的な癌であり、その発生率は北アメリカでは１００，００人当たり２．１人から中国では１００，０００人当たり８０人へと変動する。米国では２００５年に診断された新規な事例１７，５５０件およびこの疾患による死亡１５，４２０件が存在するであろうと推定される。肝臓の超音波、α－フェトプロテイン濃度および通常のＣＴスキャンが、ＨＣＣ（肝細胞性癌または原発性肝臓癌）の診断評価において通常、得られるが、これらはしばしば多病巣の小病変を検出し、治療計画を行うには余りに非感受性である。

【０００６】

米国では、結腸直腸癌の年間発生率は約１５０，０００人であり、毎年、結腸直腸癌で死亡する個人は５６，６００人である。総人口における結腸直腸癌の生涯リスクは約５～６％である。近年、結腸癌のスクリーニングおよび早期検出の集中的努力にもかかわらず、今日まで、ほとんどのケースは領域内または遠位へ転移した進行状態で診断されている。治療の選択肢としては、外科手術および術後補助化学療法または緩和的化学療法が含まれるが、ほとんどの患者は数ケ月以内にその癌の進行により死亡する。結腸癌発症の根底にある分子変化を確認することが、これらの患者の全体的に不幸な病後を改善することができる新規なモニタリング、スクリーニング、診断および治療選択肢を開発するのに役立つであろう。

【０００７】

アメリカ癌学会による結腸直腸スクリーニングのための現在のガイドラインは、５０歳以上の平均リスクをもつ個人におけるスクリーニングのための５つの異なった選択肢のうちの１つを使用する。これらの選択肢としては、１）毎年の糞便潜血検査（ＦＯＢＴ）、２）５年毎の柔軟なＳ字結腸鏡検査、３）毎年のＦＰＢＴおよび５年毎の柔軟なＳ字結腸鏡検査、４）５年毎のバリウム注腸二重撮像法（ＤＣＢＥ）または５）１０年毎の結腸内視術が挙げられる。これらの検査手法は医療社会では十分に受け入れられているけれども、結腸直腸癌のための広く行き渡ったスクリーニングの実行は実現化されていない。患者のコンプライアンスは、その手法に伴う不快感または不便さにゆえに、限定された用途において大きな要因となる。ＦＯＢＴは非侵襲性手法であるが、検査前に３～５日の食事制限および他の制限を必要とする。この検査の感度レベルはまたその治験に依存して広い変化をもつ結腸直腸腺腫において非常に低い。腺腫の検出のための感度測定はほとんどの腺腫が出血しないから、なおも低い。反対に、Ｓ字結腸鏡検査および結腸内視術などのより非侵襲性手法の感度は、結腸管腔の直接的可視化ゆえに非常に高い。無作為治験はこれらの技術の効率を評価しない。しかし、症例対照法のデータおよびナショナルポリープスタ

ディ（米国）のデータを使用して、腺腫性ポリープの除去はＣＲＣ発生率が７６～９０％減少となることが示されている。Ｓ字結腸鏡検査は右結腸に病変を未検出のまま残し、結腸の左側のみを可視化するという限界を有している。両方の鏡検査法は高価であり、瀉下薬を必要とし、罹患および死亡のリスクが増大する。大きな感度、特異性、使用の容易さおよびコスト低下を有する改良された検査が、結腸直腸癌の一般的に広範なスクリーニングが日常的になる前に明らかに必要である。

【０００８】

早期結腸直腸癌の検出は、一般的には無症候性である個人に毎年行う糞便潜血検査に基づく。アメリカ癌学会を含むいくつかの保険医療機構が行っている現在の勧告は、年齢５０歳で糞便潜血検査を開始し、患者がもはやスクリーニングから利益を得なくなるまで毎年繰り返すことを呼びかけている。陽性ＦＯＢＴは、腸管の結腸鏡検査；高価で非侵襲性手法につながり、検査５，０００件当たり、１件の重度合併症を起こす確率を有する。結腸鏡検査のときに、ヘム陽性糞便患者のたった１２％が癌または大きなポリープを有すると診断されているにすぎない。多くの研究はＦＯＢＴスクリーニングが癌関連死亡率または全体的な生存を改善していないことを示す。糞便潜血検査によるコンプライアンスは、貧弱であり；人口の２０％以下に提供されて、推奨されるＦＯＢＴを達成するにすぎない。もしもＦＯＢＴが適当になされるなら、患者は３回の連続した便通から糞便試料を採取する。試料は、患者が食事ガイドラインを堅く守り、潜在的消化管の出血を誘発すると知られている薬剤を避けて採取される。実際には、医者はしばしば患者を適切に指導せず、患者はしばしばプロトコールを堅く守らず、何人かの患者は糞便試料を採取する課題を困難または不快に思い、それゆえ、毎年の糞便潜血検査を遵守することがうまくいかない。もしも検査の感度や特異性が現在の方法よりも改善されるなら、検査の頻度が低下し、連続した試料採取が排除され、食事および投薬の予定変更も排除され、そして、患者のコンプライアンスが向上するであろう。コンプライアンスの問題が急速に増すと、結腸癌を検出するＦＯＢＴの感度や特異性は低くなる。低い検査特異性は不必要な結腸鏡検査につながり、結腸癌スクリーニングにかなりの費用を追加する。

【０００９】

ＦＯＢＴの特異性は、感度４３％（腺腫）および５０％（結腸直腸癌）であり、よくても９６％であると計算されている。感度は、商標名「ＩｎＳｕｒｅ（商標）」の下に生産されたものなど免疫測定ＦＯＢＴを使用すると改善され、感度７７％（腺腫）および８８．９％（結腸直腸癌）と改善され得る。

【００１０】

分子疾患マーカー：分子疾患マーカーは他のタイプのマーカーよりいくつかの利点をもたらし、１つの利点は非常に小さなサイズの試料および／またはその組織構造が維持されていない試料ですら、全く効率的に分析され得る。ここ数十年の間に多くの遺伝子が正常と結腸癌との間で異なって発現されると示されている。しかしながら、マーカーの１つまたは組合せが結腸癌の診断には十分であるとは示されていない。高次ｍＲＮＡに基づくアプローチは近年、異なった腫瘍タイプと良性および悪性病変を区別するためのより良い手段を提供できると示されている。しかしながら、臨床環境で日常的診断道具として、それを応用することはｍＲＮＡがきわめて不安定であることにより妨害され、急速に生じる発現の変化はあるトリガー（例えば試料採取）を付随し、および最も重要なことに、分析に大量のｍＲＮＡを必要とする（非特許文献１，非特許文献２）。これはしばしば日常の生検から得ることができない。

【００１１】

ＦＯＢＴの感度および特異性をさらに改善するために生物学的マーカーを使用することが示唆されている。このような検査の例としては、ＥＸＡＣＴ Ｓｃｉｅｎｃｅから入手可能なＰｒｅＧｅｎ－Ｐｌｕｓ（商標）糞便分析が挙げられる。これは感度が２０％（腺腫）および５２％（結腸直腸癌）であり、特異性が両ケースで９５％である。この検査は結腸新生物の発生に関連する２３ＤＮＡ変異の存在について分析する。結腸癌マーカーとしてＤＮＡメチル化を使用することが知られている。例えば、非特許文献３は、結腸癌患

者の９８％で末梢血にＴＰＥＦ、ＨＩＣ１、ＤＡＰＫおよびＭＧＭＴからなる遺伝子パネルの過剰メチル化を検出した。しかしながら、このような検査の特異性は十分に高くなければならないから、これは市場性の高い検査として適した基礎を提供するにすぎない。

【００１２】

結腸直腸病因の現在のモデルは、腺腫の段階的な進行を支持し、これは形成異常の発生および最終的に侵襲性癌の徴候を含む。この腺腫－癌の続発を根底とする分子的変化は、腫瘍抑制遺伝子（ＡＰＣ、ｐ５３、ＤＣＣ）の遺伝的および後生的変化、発癌遺伝子（Ｋ－ｒａｓ）の活性化およびＤＮＡミスマッチ修復遺伝子の不活性化を含む。近年、さらなる分子的変化および遺伝子欠損が明らかにされている。すなわち、Ｗｎｔシグナル伝達回路の活性化はＡＰＣ遺伝子の変異のみならず、β－カテニン変異からも得られるであろう。さらに、そのシグナルトランスデューサー、ＳＭＡＤ４およびＳＭＡＤ２とともに、ＴＧＦ－βシグナル伝達回路での変異は、結腸癌の発生にリンクしている。

【００１３】

結腸の腺腫および癌の病原およびその遺伝的および分子的変化の理解における最近の進歩にもかかわらず、転移の発生の根底にある遺伝的および後生的変化は、十分に理解されていない。しかしながら、一般的には細胞外マトリックスの侵襲およびタンパク分解の過程、ならびに血管基底膜の浸潤は、インテグリン受容体、カドヘリン、免疫グロブリンスーパーファミリー、ラミニン結合タンパクおよびＣＤ４４受容体のファミリーメンバーなどの接着性タンパクを含むことが一般的に十分に認められている。接着のほかに、転移形成の過程もまた脈管形成の誘発と制御（ＶＥＧＦ、ｂＦＧＦ）、細胞増殖の誘発（ＥＧＦ、ＨＧＦ、ＩＧＦ）およびタンパク分解酵素の活性化（ＭＭＰ、ＴＩＭＰ、ｕＰＡＲ）、ならびにアポトーシスの抑制（Ｂｃｌ－２、Ｂｃｌ－Ｘ）を含む。より最近、他のグループは原発性結腸直腸癌に見出された変化と転移病変における遺伝的および分子的変化を比較した。すなわち、Kleeffらは原発性および転移結腸直腸癌の両方での候補腫瘍抑制遺伝子、ＤＯＣ－２の欠損を報告した。さらに、Zauberらは４２の結腸直腸癌系列で、原発性癌のＫｉ－ｒａｓ変異が４２対の原発性および同調的転移病変の全てにおいて同じであったことを報告した。同様に、ＡＰＣ遺伝子座での異型接合性の欠損は３９対の癌および同調性転移において同じであった。著者はＫｉ－ｒａｓおよびＡＰＣ遺伝子において、転移の遺伝的変化は原発性結腸直腸癌と同じであると結論を下した。しかしながら、他のグループは原発性癌に存在しない転移直腸癌における遺伝的および分子的変化を見出している。すなわち、結腸直腸転移で染色体３ｐのＬＯＨの発生が報告されている。さらに、比較ゲノムハイブリダイゼーションを使用して、これらは転移病変に独特のものである数種の変化が肝臓転移で見出された（－９ｑ、－１１ｑ、－１７ｑ）。

【００１４】

ＣｐＧアイランドのメチル化

変異とは別に、ＣｐＧアイランドの異常なメチル化は種々の癌の病原性に既に結びついている、ある種の遺伝子の転写性サイレンシングにつながると示されている。ＣｐＧアイランドはＣｐＧジヌクレオチドが豊富である短い配列であり、通常、ヒト遺伝子全ての約５０％の５'領域に見出され得る。これらのアイランドのシトシンのメチル化は遺伝子発現の減少につながり、Ｘ染色体の不活性化およびゲノムインプリンティングとなると報告されている。

【００１５】

近年、いくつかのグループはまた、結腸直腸癌の種々の遺伝子のメチル化を分析し、特に、ｐ１６ＩＮＫ４、ｐ１４ＡＲＦ、ｐ１５ＩＮＫ４ｂ、ＭＧＭＴ、ｈＭＬＨ１、ＧＳＴＰ１、ＤＡＰＫ、ＣＤＨ１、ＴＩＭＰ－３およびＡＰＣにおけるプロモーターメチル化による転写性サイレンシングを報告している。すなわち、ある遺伝子の変異的不活性化とは別に、これらの遺伝子の高メチル化もまた、この疾患の病原性に有意に寄与している。

【００１６】

近年、結腸癌でメチル化されたいくつかの遺伝子がＭＳ－ＡＰＰＣＲにより同定されている。とりわけ、この遺伝子グループは結腸癌で頻繁にメチル化されていて、ＭＳ－ＡＰ

ＰＣＲ法を使用して、２つの異なったグループとして独立して同定されたＴＰＥＦ／ＨＰＰ１を含む（例えば、非特許文献４）。

【００１７】

多因子性アプローチ

癌診断は伝統的に１つの分子マーカー（例えば、遺伝子変異、高いＰＳＡレベル）の検出に依存している。残念ながら、癌は１つの遺伝子マーカーがその疾患の多くの形態を概して検出または区別することができない疾患状態である。すなわち、１つのマーカーのみを認識する分析は限定された適中率であると示されている。本発明の基本的態様は、メチル化に基づく癌診断学およびスクリーニング、およびこのような疾患の診断および治療モニタリングは、複数のマーカー選択を使用して、１つのマーカー分析を使用する先行技術よりも有意な改善をもたらすであろう。癌は単純な疾患でないから、多様な分析アプローチが特に癌診断に適している。この複数要因の「パネル」アプローチは細胞学的および臨床学的にも癌の不均一な性質と一致している。

【００１８】

メチル化に基づく診断検査へのパネルアプローチを成功裏に実行する鍵は、疾患状態を特性化および区別できるマーカーの最適パネルの設計と開発である。本発明は特に有効かつ特殊な複数の遺伝子パネルを記載する。このパネルメンバーの１つまたは組合せのメチル化分析は、特に高い感度、特異性および／または適中率を有する直腸細胞増殖性疾患の検出を可能とする。

【００１９】

医療検査の開発

医療スクリーニングまたは診断検査の２つの主要な評価的基準は、その感度と特異性であり、これらはその検査が例外なく、かつ、標的疾患を有していない個人を誤って含まずに、病気に冒された個人全てを正確に検出することをいかに十分に実行するかを決定する（適中率）。歴史的には、多くの診断検査が貧弱な感度と特性ゆえに批判されている。

【００２０】

真陽性（ＴＰ）結果とは検査が陽性であり、その状態が存在することである。偽陽性（ＦＰ）結果とは検査が陽性であるが、その状態が存在しないことである。真陰性（ＴＮ）結果とは検査が陰性であり、その状態が存在しないことである。偽陰性（ＦＮ）結果とは検査が陰性であるが、その状態が存在することである。ここで、感度＝ＴＰ／（ＴＰ＋ＦＮ）；特異性＝ＴＮ／（ＦＰ＋ＴＮ）；および適中率＝ＴＰ／（ＴＰ＋ＦＰ）である。

【００２１】

感度とは検査される個人で標的疾患を正しく検出する検査能力の基準である。低い感度を有する検査は、偽陰性、すなわち疾患を有するが、その特定疾患をもっていないとして誤って同定される個人の割合が高くなる。偽陰性の潜在的危険性は、疾患が後期状態まで進行する間、疾患のある個人は診断されず、ある期間、治療されないままとなり、たとえ治療されたとしても、その効力はより低いであろう。低い感度を有する検査の例としてはＨＩＶのタンパクに基づく血液検査がある。このタイプの検査は疾患が十分に確立されるまでウイルスの存在を検出することができないから、低い感度を示し、ウイルスはかなりの数で血流に侵入する。反対に、高感度を示す検査の例としては、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用するウイルスロード検出(viral-load detection)がある。このタイプの検査は極めて少量のウイルスを検出できるから、高感度が達成される。高感度は特に診断を誤る結果が高い場合、特に重要である。

【００２２】

他方、特異性はその疾患状態を有しない患者を正確に同定する検査能力の基準である。貧弱な特異性を有する検査は偽陽性、すなわち、疾患を有するとして誤って同定される個人の割合が高くなる。偽陽性の欠点は、それらが付随するリスク、情動的および経済的ストレスを伴う不必要な医療手法を患者に強いて受けさせることであり、患者の健康に有害な作用をもたらすであろう。高い特異性を有する診断検査を開発することを難しくさせる疾患の態様は、疾患、特に癌におけるメカニズムがしばしば複数の遺伝子およびタンパク

に関与することである。さらに、ある種のタンパクは疾患状態に無関係の理由で上昇するであろう。高い特異性を有する検査の例としては、ｐ５３変異を検出することができる遺伝子に基づく検査がある。特異性はさらなる診断手法やさらなる医療処置に関連する費用やリスクが非常に高い場合、重要である。

【００２３】

当該技術分野での明白な必要性

癌の改善されたスクリーニングおよび初期検出における当該技術分野では明白な必要性が存在することが一般的に受け入れられている。例えば、もしも結腸癌スクリーニングの特異性が増加するなら、不必要な結腸直腸鏡試験につながる偽陽性検査結果の問題が減少され、費用節約および改善された安全性につながる。

【００２４】

癌の一般的な発生率およびより具体的には現在の結腸直腸および肝細胞性の細胞増殖性疾患のスクリーニング法に関連する欠点から見て、目下、利用可能な検査に加えて、またはその代替として使用される癌、特に結腸癌の早期検出の改善された方法の実質的な必要性が当該技術分野には存在する。

【００２５】

本発明の遺伝子の背景

ヒトセプチン９遺伝子（ＭＬＬセプチン様融合タンパク、ＭＬＬセプチン様融合タンパクＭＳＦ－Ａ、Ｓｌｐａ、Ｅｓｅｐｔｉｎ、Ｍｓｆ、セプチン様タンパク卵巣／乳房セプチン（Ｏｖ／Ｂｒセプチン）およびセプチンＤ１としても公知である）は、コンティグ(contig)ＡＣ０６８５９４．１５．１．１６８５０１内の染色体１７ｑ２５上に位置し、セプチン遺伝子ファミリーの１メンバーである。図１はセプチン９遺伝子のアンサンブルアノテーションを提供し、４つの転写変異体、セプチン９変異体およびＱ９ＨＣ７４変異体（これらはセプチン９転写物の切断変形である）を示す。配列番号１はセプチン９およびＱ９ＨＣ７４転写物の両方の領域およびプロモーター領域を含む前記遺伝子の配列を提供する。配列番号２および３はそれぞれセプチン９およびＱ９ＨＣ７４転写物のＣｐＧリッチプロモーター領域の配列を提供する、そのサブ領域である。

【００２６】

セプチン遺伝子ファミリーのメンバーが小胞輸送から細胞質分裂へ及ぶ複数の細胞性機能に関連していることが推定されている。セプチン９の作用破壊は不完全な細胞分割となる（非特許文献５参照）。セプチン９および他のタンパクは、腫瘍形成においてある役割を示唆する原癌遺伝子ＭＬＬの融合パートナーであることが示されている（非特許文献６参照）。Burrowsらは卵巣癌でのセプチン９遺伝子の複数のアイソフォーム発現の徹底的な研究を報告し、種々の転写物の組織特異的発現を示した（非特許文献７参照）。

【００２７】

７０００以上の正常および腫瘍組織についての最近の研究（優先権主張日以後に発行された先行技術）は、多くの腫瘍組織にセプチン９アイソフォームの一貫した過剰発現が存在することを示している（非特許文献８参照）。著者らは、この遺伝子はＲＮＡ転写物プロセッシングの変化が異なったタンパク産物の制御を規制し、これらの変異タンパクアイソフォームのレベルが悪性度における遺伝子の役割に回答を与えるタイプII癌遺伝子であろうと推測している。

【００２８】

ＦＮ１遺伝子から転写されたＭＳＦ（遊走刺激因子）タンパクも発癌に関係している（ＷＯ９９／３１２３３参照）。しかしながら、このタンパクは本願の主題でなく、またセプチン９／ＭＳＦ遺伝子およびそれらの転写産物に関連していると目下、知られていないことに注目すべきである。

【００２９】

上記引用文献から、腫瘍形成に関連する前記遺伝子の生物学的メカニズムは未確定なままであることが明らかである。特許文献１では、この遺伝子のコピー数の増加および過剰発現が癌のマーカーであり、この知見による癌の診断および治療の手段が提供されること

を特許請求している。したがって、特許文献１は本発明の方法および核酸に共通する最も多数の態様を有し、それは同じ分野（癌診断）に関連するから、最も近接する先行技術である。本発明と特許文献１の発明との大きな相違点は、本発明はまず、セプチン９遺伝子の過小発現が癌に関連していることを示すことにある。より具体的には、これはメチル化分析の手法で説明される。発現とＤＮＡメチル化の相関関係およびＤＮＡメチル化を決定する方法は当該技術分野で公知である（特許文献２参照）。けれども、過小発現が癌の発生にも関連しているであろうことは当業者には自明でないであろう。特に、特許文献１は癌の潜在的治療法としてより低いレベルにその発現を調節することを記載する。

【００３０】

配列番号２８は、ビトロネクチン（ＶＴＮ、ＯＭＩＭ１９３１９０、受託番号ＮＭ＿０００６３８）とＳＡＲＭ遺伝子（Steril Alpha And Heat/Armadillo Motifs-Containing Protein, ＯＭＩＭ６０７７３２）の重複プロモーター領域内の染色体１７ｑ上に位置するＣｐＧリッチ配列を提供する。

【００３１】

ＶＴＮ遺伝子は、動物細胞のインビトロでの付着および伝播を促進し、補体Ｃ５ｂ－９複合体による細胞溶解を阻止し、そして血液凝固のアンチトロンビンIII－トロンビン作用を調節する７５－ｋＤグリコプロテイン（血清伝播性因子または補体Ｓ－タンパクとも呼ばれる）をコードする。ビトロネクチンのより高い発現は結腸癌細胞中に観察されている（非特許文献９）。さらに、この遺伝子の発現は癌細胞の進行および侵襲性に関連している。ＶＴＮは腫瘍中で活性化され、特異的ペプチドによるビトロネクチン受容体のブロッキングが腫瘍の大きさを減少させることが示唆されている（非特許文献１０；非特許文献１１）。

【００３２】

ＳＡＲＭタンパクは６９０個のアミノ酸からなり、短いＨＥＡＴ／アルマジロ繰り返し配列に囲まれた６５個のアミノ酸のステライルαモチーフ（ＳＡＭ）ドメインを含む。ノザンブロット分析は、ＳＡＲＭアンチセンスＲＮＡが組織起源または潜在的転移にかかわりなく、癌セルラインで高いレベルに検出可能であることを示している（非特許文献１２）。さらに、この研究はタンパクコードＳＡＲＭ転写物が研究したもののうち、前立腺腫のセルラインのみに発現したことを証明した。

【００３３】

配列番号２４はフォークヘッド転写因子Ｌ２遺伝子（ＦＯＸＬ２、下垂体フォークヘッド因子、ＯＭＩＭ６０５５９７）の下流、染色体３ｑ２３上に位置するＣｐＧリッチ配列を提供する。配列番号１はこれまでいかなるタイプの癌とも関連していなかった。ＦＯＸＬ２コード領域は哺乳動物中に高度に保存されている。免疫組織化学的証拠はＦＯＸＬ２が眼瞼中および胎児および成人の卵巣の濾胞性細胞中に特異的に発現した核酸タンパクであることを示す。これは、ＦＯＸＬ２が卵巣体細胞分化およびさらに濾胞発生および／または維持において、ある役割を果たすことを示唆する（非特許文献１３）。

【００３４】

さらに、ＦＯＸＬ２遺伝子の変異は瞼裂縮小／眼瞼下垂／眼角贅皮逆位症候群（ＢＰＥＳ）、眼瞼および卵巣に影響する症候群に関連している（非特許文献１４；非特許文献１５）。ＦＯＸＬ２遺伝子はこれまで癌に関連していなかったが、ＦＯＸファミリーの他のメンバーが発癌に関係している。ＦＯＸＡ１遺伝子は食道癌および肺癌で増幅および過剰発現され、ＦＯＸＭ１遺伝子は膵臓癌および基底細胞癌中でソニックヘッジホッグ（ＳＨＨ）経路による転写制御のために上方制御されている。

【００３５】

配列番号２７は同義語がホメオドメインタンパクＯＰＴＸ２、視覚性ホメオボックス２、ＯＰＴＸ２、Sine oculisホメオボックスホモログ６、ショウジョウバエsine oculisホメオボックスホモログ６、Ｓｉｘ９、ＳＩＸ９を含む、染色体１４ｑ上に位置するＳｉｘ６（ホメオボックスタンパクＳＩＸ６）遺伝子の一部を示す。Ｓｉｘ６遺伝子は発生経路に関連し、その異常な発現はＴ細胞の急性リンパ芽球白血病の腫瘍形成にリンクしている

。
【００３６】
配列番号２５は染色体１７ｑ２１．３１上に位置し、ＮＧＦＲ遺伝子のプロモーター領域ならびにＮＧＦＲ遺伝子自体の一部分も含む（ｐ７５としても公知である神経成長因子受容体、ＯＭＩＭ１６２０１０）。ＮＧＦＲはニューロトロフィンおよび神経突起成長抑制因子へ単独であるいは他の受容体とともに結合する。ＮＧＦＲはアポトーシス、抹消神経の髄鞘形成、および軸索病変後の中枢神経系再生抑制において、ある役割を果たすことが示されている（非特許文献１６；非特許文献１７；非特許文献１８）。ＮＧＦＲ遺伝子のメチル化はすでに結腸癌の発生に関連している（特許文献３）。
【００３７】
配列番号２６は染色体１７ｑ２１．３１上に位置し、遺伝子ＴＭＥＦＦ２のプロモーター領域を含む。ＴＭＥＦＦ２のメチル化は結腸癌にリンクしている（非特許文献１９）。
【特許文献１】国際公開第ＷＯ２００４０７４４４１号パンフレット
【特許文献２】国際公開第ＷＯ９９／２８４９８号パンフレット
【特許文献３】ＰＣＴ／ＵＳ０４／０２０３３６
【非特許文献１】Lipshutz, R.J.ら、Nature Genetics 21:20-24 1999
【非特許文献２】Bowtell, D.D.L. Nature genetics suppl. 21:25-32, 1999
【非特許文献３】Sabbioniら、Molecular Diagnosis 7:201-207, 2003
【非特許文献４】Young J, Biden KG, Simms LA, Huggard P, Karamatic R, Eyre HJ, Sutherland GR, Herath N, Barker M, Anderson GJ, Fitzpatrick DR, Ramm GA, Jass JR, Leggett BA, HPP1：「結腸直腸ポリープおよび癌で共通してメチル化されている膜貫通性タンパクコード遺伝子」、Proc Natl Acad Sci USA 98:265-270, 2001
【非特許文献５】Surka, M.C., Tsang, C.W.,およびTrimble, W.S. Mol Biol Cell, 13: 3532-45, 2002
【非特許文献６】Osaka, M, Rowley, J.D.およびZeleznik-Le, N.J. PNAS, 96: 6428-6433, 1999
【非特許文献７】Burrows, J.F., Chanduloyら、S.E.H. Journal of Pathology, 201: 581-588, 2003
【非特許文献８】Scott, M., Hyland, P.L.ら、Oncogene, 24: 4688-4700, 2005
【非特許文献９】Exp Cell Res. 1994 Sep;214(1): 303-12
【非特許文献１０】Bloemendal HJ, de Boer HC, Koop EA, van Dongen AJ, Goldschmeding R, Landman WJ, Logtenberg T, Gebbink MF, Voest EE, Cancer Immunol Immunother. 2004 Sept;53(9): 799-808
【非特許文献１１】Haier J, Goldmann U, Hotz B, Runkel N, Keilholz U. Clin Exp Metastasis, 2002; 19(8): 665-72
【非特許文献１２】Mink, M.; Fogelgren B.; Olszewski, K.; Maroy, P.; Csiszar, K. Genomics 74; 234-244, 2001
【非特許文献１３】J. Med. Genet, 39; 916-922, 2002
【非特許文献１４】Am. J. Hum. Genet, 72: 478-487, 2003
【非特許文献１５】Hum. Mutat. 24: 189-193, 2004
【非特許文献１６】Dobrowsky R. T.; Werner, M. H.; Castellino, A. M.; Chao. M.V.; Hannun, Y. A. Science 265: 1596-1599, 1994
【非特許文献１７】Cosgaya, J. M.; Chan, J. R.; Shooter, E. M. Science 298; 1245-1248, 2002
【非特許文献１８】Wang, K. C.; Kim, J. A.; Sivasankaran, R.; Segal. R.; He, Z. Nature 420: 74-78, 2002
【非特許文献１９】Cancer Res. 2000 Sep 1; 60(17): 4907-12
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【００３８】

本発明は、被検者から単離された生物学的試料中のセプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列の発現レベルを決定することを含む被検者の細胞増殖性疾患を検出および／または分類する方法を提供する。ここで、過小発現および／またはＣｐＧメチル化は前記疾患の存在またはクラスの指標である。本発明の種々の態様は効率的でかつ特殊な遺伝子マーカーを提供し、このマーカーの発現分析は、特に高い感度、特異性および／または適中率でもって細胞増殖性疾患の検出を可能とする。さらに、このマーカーは良性細胞増殖性疾患と新生物細胞増殖性疾患（前癌状態を含む）の差別化を可能とする。本発明のマーカーは特に、結腸直腸癌腫および肝細胞性癌腫の検出に適している。結腸直腸癌腫では、本発明の検査方法は罹病危険をもつ母集団のスクリーニングにおいて特に有用性を示す。本発明の方法は改善された感度、特異性および患者のコンプライアンスの可能性ゆえに、先行技術の方法（企業基準ＦＯＢＴを含む）に対して利点を有する。

【００３９】

本発明の方法および核酸は、最も好ましくは肝臓癌の検出または他の肝臓細胞増殖性疾患との区別または結腸直腸癌腫または前癌性結腸直腸細胞増殖性疾患を検出するために使用される。

【課題を解決するための手段】

【００４０】

１つの実施態様では、本発明は被検者の細胞増殖性疾患を検出および／または分類する方法であって、被検者から単離された生物学的試料中のセプチン９（その転写変異体の全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列の発現レベルを決定することを含む方法を提供する。ここで、過小発現および／またはＣｐＧメチル化は前記疾患の存在またはクラスの指標である。１つの実施態様では、前記発現レベルは前記遺伝子から転写されたｍＲＮＡの存在、非存在またはレベルを検出することによって決定される。別な実施態様では、前記発現レベルは前記遺伝子またはその配列がコードするポリペプチドの存在、非存在またはレベルを検出することによって決定される。

【００４１】

さらなる好ましい実施態様では、前記発現は前記遺伝子内のＣｐＧメチル化の存在または非存在を検出することによって決定される。ここで、メチル化の存在は細胞増殖性疾患の存在を示す。前記方法は少なくとも一部に以下の工程：ｉ）被検者から得た生物学的試料（好ましくは、血漿、血清、全血、単離された血球、血液から採取された細胞からなる群から選択される）から単離したゲノムＤＮＡを、ゲノムＤＮＡの少なくとも１つの標的領域内のメチル化および非メチル化ＣｐＧジヌクレオチドを区別する少なくとも１つの試薬または一連の試薬と接触させ（ここで、前記標的領域のヌクレオチド配列はセプチン９（その転写変異体の全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列の少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチド配列を含む）、そして、ii）細胞増殖性疾患を検出および／または分類することを含む。好ましくは、標的領域は、配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択される少なくとも１つの配列の少なくとも１６個の近接したヌクレオチドの配列を含むか、あるいはストリンジェントな条件下にこれにハイブリダイズする。

【００４２】

好ましくは、前記検出感度は約７５％～約９６％、または約８０％～約９０％、または約８０％～約８５％である。好ましくは、特異性は約７５％～約９６％、または約８０％～約９０％、または約８０％～約８５％である。

【００４３】

この方法は、商業上、利用可能であって、かつ、規制団体で認可された分析法に使用するのに十分に高い感度と特異性を有する体液分析による癌検出を可能とする方法が現在、存在しないことから新規である。例えば、結腸直腸癌腫を検出および診断するために使用される現在の方法としては、結腸鏡検査、Ｓ字結腸鏡検査、および糞便潜血結腸癌検査が挙げられる。これらの方法に比べて、開示される発明は結腸鏡検査より侵襲性が小さく、そして、そうでなくてもＳ字結腸鏡検査およびＦＯＢＴよりも感度が大きい。体液分析の開発は当該技術分野で公知である現在の方法以上に明白な技術的利点を示す。ここで、結腸直腸癌腫スクリーニングでの少なくとも１つの体液に基づく検査の患者コンプライアンスは、ＦＯＢＴにおいて現在、推奨されている糞便の３重分析よりも高いであろうことが期待される。

【００４４】

さらなる説明として、肝臓癌を検出および診断するために使用される現在の方法としては、ＰＥＴおよびＭＲＩ画像処理および吸引液の細胞学的スクリーニングまたは生検が挙げられる。放射線スクリーニング法は通常、初期段階で癌を検出せず、そして実施するには高価であり、時間がかかる。細胞学的スクリーニングは生検（内部出血）、および吸引（針跡接種、および出血、胆汁性腹膜炎および気胸）に関連するリスクをもたらす。したがって、初期段階での肝臓癌の検出は現在、可能でない。さらに、患者の予後が初期検出で大きく改善されるなら、このようなスクリーニング検査の必要性が当該技術分野には存在する。

【００４５】

具体的な実施態様として、この方法は細胞増殖性疾患の検出または区別のためのマーカーとして、セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列の使用を含む。本発明は特に、新生物細胞性増殖疾患（前新生物段階を含む）の検出に適している。さらに、本発明の方法と核酸は良性細胞増殖性疾患と悪性のものを区別することができる。本発明の方法と核酸は結腸直腸または肝臓の新生物疾患および前新生物疾患の検出において特に有効である。さらに、それらは新生物と良性の細胞増殖性結腸直腸疾患および肝細胞疾患を区別することにおいて有用性を示す。

【００４６】

遺伝子の前記使用は遺伝子の発現のいかなる分析、ｍＲＮＡ発現分析またはタンパク発現分析によっても可能であろう。しかしながら、本発明の最も好ましい実施態様では、結腸直腸または肝臓の細胞増殖性疾患の検出、分化および区別は、セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列およびそのプロモーターまたは制御要素のメチル化状態の分析によって可能である。

【００４７】

本発明は細胞増殖性疾患の発生に関連する態様における生物学的試料の分析方法を提供し、この方法は配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択される少なくとも１つの核酸、またはそれらの断片を問題のゲノム配列内のメチルおよび非メチル化ＣｐＧジヌクレオチドを区別することが可能な１つの試薬または一連の試薬と接触させることを特徴とする。

【００４８】

本発明は新生物の細胞増殖性疾患（例えば、癌）の発生に関連するゲノムＤＮＡの後生的パラメーターを確認する方法を提供する。この方法は前記疾患の改善された診断、治療およびモニタリングにおいて有用性を示す。

【００４９】

好ましくは、検査試料の起源は細胞またはセルライン、組織学的スライド、生検、パラフィン包埋組織、体液、射精液、糞便、尿、血液およびこれらの組合せからなる群から選

択される。さらに好ましくは、その起源は糞便、血漿、血清、全血、単離された血球、被検者から得た血液から単離された細胞からなる群から選択される。

【００５０】

具体的には、本発明は初期前癌状態で新生物細胞増殖性疾患（好ましくは結腸直腸および／または肝細胞）を検出する方法および新生物および良性細胞増殖性疾患を区別する方法であって、ゲノム核酸を含む生物学的試料を得て；被検者の核酸の少なくとも１つの標的配列内のメチル化および非メチル化ＣｐＧジヌクレオチドを区別するのに十分な１つの試薬または複数の試薬に核酸またはその断片を接触させ；ここで、標的配列は配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択される少なくとも１６個の近接するヌクレオチドを含む配列を含むか、あるいはストリンジェンな条件下にこれにハイブリダイズし、前記近接するヌクレオチドは少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチド配列を含み、そして、その区別に基づき、少なくとも１つの標的ＣｐＧジヌクレオチド配列のメチル化状態、または複数の標的ＣｐＧジヌクレオチド配列の平均メチル化状態、または平均メチル化状態を反映する値を決定することを少なくとも部分的に含む方法を提供する。

【００５１】

好ましくは、標的配列内のメチル化および非メチル化ＣｐＧジヌクレオチド配列を区別することは、配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３からなる群から選択される配列内の対応する変換または非変換ジヌクレオチド配列、および標的配列に対応するその近接する領域への少なくとも１つのこのようなＣｐＧジヌクレオチド配列のメチル化状態依存性変換または非変換を含む。

【００５２】

別の実施態様は新生物細胞増殖性疾患、最も好ましくは結腸直腸または肝細胞の疾患の検出（またはそれらと良性細胞増殖性疾患との区別）のための方法であって、被検者のゲノムＤＮＡを有する生物学的試料を得て；ゲノムＤＮＡを抽出し；ゲノムＤＮＡまたはその断片を５－位の非メチル化シトシン塩基をウラシルまたはハイブリダイゼーション特性においてシトシンと区別して検出できる他の塩基に変換する１つまたは複数の試薬で処理し；処理されたゲノムＤＮＡまたはその処理断片を、増幅酵素および各ケースで配列番号１０～１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３からなる群から選択される配列およびその相補鎖に相補的であるか、あるいは中程度にストリンジェントまたはストリンジェントな条件下にハイブリダイズする長さ少なくとも９個のヌクレオチドの近接する配列を含む少なくとも２つのプライマーに接触させ；ここで、処理されたＤＮＡまたはその断片は増幅して増幅産物を生成するか、あるいは増幅せず；そして、前記増幅産物の存否またはその特性に基づき、配列番号１～３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択される配列の少なくとも１つ、しかし、より好ましくは複数のＣｐＧジヌクレオチドのメチル化状態、またはメチル化レベルの平均値、またはメチル化レベルの平均を反映する値を決定することを含む方法を提供する。

【００５３】

好ましくは、決定することは、ｉ）配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３からなる群から選択される配列およびその相補鎖に相補的であるか、あるいは中程度にストリンジェントまたはストリンジェントな条件下にハイブリダイズする長さ少なくとも９個のヌクレオチドの近接する配列を含む少なくとも１つの核酸分子とハイブリダイズさせ；ii)配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号

５１、配列番号１６８～配列番号２０３からなる群から選択される配列およびその相補鎖に相補的であるか、あるいは中程度にストリンジェントまたはストリンジェントな条件下にハイブリダイズする長さ少なくとも９個のヌクレオチドの固相に結合した近接する配列を含む少なくとも１つの核酸分子とハイブリダイズさせ；iii）配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３からなる群から選択される配列およびその相補鎖に相補的であるか、あるいは中程度にストリンジェントまたはストリンジェントな条件下にハイブリダイズする長さ少なくとも９個のヌクレオチドの近接する配列を含む少なくとも１つの核酸分子とハイブリダイズさせ、そして少なくとも１つのヌクレオチド塩基によって、このようにハイブリダイズした少なくとも１つの核酸分子を伸長し；そして、iv)増幅産物を配列決定することからなる群から選択される少なくとも１つの方法を使用する。

【００５４】

さらなる実施態様は、被検者のゲノムＤＮＡを有する生物学的試料を得て、ゲノムＤＮＡを抽出し、配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択される１つまたは複数の配列を含む、ゲノムＤＮＡまたはその断片、またはストリンジェントな条件下でそれらにハイブリダイズする配列を１つまたは複数のメチル化感受性制限酵素と接触させ（ここで、ゲノムＤＮＡはそれによって消化断片を生じるか、あるいはそれによって消化されない）、そして、配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択される少なくとも１つのゲノム配列の少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチドのメチル化状態、または複数のＣｐＧジヌクレオチド配列の平均メチル化状態または平均メチル化状態を反映する値を、少なくとも１つのこのような断片の存否または特性に基づいて決定することを含む、細胞増殖性疾患の分析（すなわち、検出および／または分類）のための方法を提供する。好ましくは、消化または未消化のゲノムＤＮＡは前記決定前に増幅される。

【００５５】

別な実施態様は、配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択される配列内のシトシンメチル化パターンの分析のための新規なゲノムおよび化学的変性核酸配列、ならびにオリゴヌクレオチドおよび／またはＰＮＡ－オリゴマーを提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【００５６】

定義

「観察／期待比」（「Ｏ／Ｅ比」）との用語は、特定ＤＮＡ配列内のＣｐＧジヌクレオチドの頻度を言い、各断片において、[ＣｐＧ部位の数／（Ｃ塩基の数×Ｇ塩基の数）]／バンド長に相当する。

【００５７】

「ＣｐＧアイランド」との用語は、（１）「観察／期待比」＞０．６に相当するＣｐＧジヌクレオチドの頻度を有し、かつ、（２）「ＣｐＧ含有量」＞０．５を有する基準を満足するゲノムＤＮＡの近接する領域を呼ぶ。ＣｐＧアイランドは典型的には、長さ約０．２～約１ＫＢ、または約２ｋｂであるが常ではない。

【００５８】

「メチル化状態」または「メチル化状況」との用語は、ＤＮＡ配列内の１つまたは複数のＣｐＧジヌクレオチドでの５－メチルシトシン（「５－ｍＣｙｔ」）の存否をいう。ＤＮＡ配列内の１つまたは複数の特定ＣｐＧメチル化部位（それぞれは２つのＣｐＧジヌクレオチド配列を有する）のメチル化状態としては、「非メチル化」、「完全－メチル化」および「半－メチル化」が挙げられる。

【００５９】

「半－メチル化」または「半メチル化」との用語は、その１本鎖のみがメチル化された

２本鎖ＤＮＡのメチル化状態をいう。

【００６０】

本明細書で使用する「ＡＵＣ」との用語は、曲線下の領域の略語である。特に、受信者操作特性（ＲＯＣ）曲線下の境域をいう。ＲＯＣ曲線は診断検査の異なった可能性あるカットポイントにおいて偽陽性率に対する真陽性率のプロットである。これは選択されたカットポイントに依存する感度と特異性の間の交換を示す（感度の増加は特異性の減少をともなうであろう）。ＲＯＣ曲線下の領域（ＡＵＣ）は、診断検査の正確性の基準である（領域が大きくなればなるほど良く、最適は１であり、ランダム検査は領域０．５の対角線上に位置するＲＯＣを有する。(参考：J.P. Egan,「シグナル検出理論とＲＯＣ分析」、Academic Press, New York,1975）。

【００６１】

「高メチル化」との用語は、正常コントロールＤＮＡ試料内の対応するＣｐＧジヌクレオチドで見出される５－ｍＣｙｔの量に対して、検査するＤＮＡ試料のＤＮＡ配列内の１つまたは複数のＣｐＧジヌクレオチドでの５－ｍＣｙｔの増加した存在に対応する平均メチル化状態をいう。

【００６２】

「低メチル化」との用語は、正常コントロールＤＮＡ試料内の対応するＣｐＧジヌクレオチドで見出される５－ｍＣｙｔの量に対して、検査するＤＮＡ試料のＤＮＡ配列内の１つまたは複数のＣｐＧジヌクレオチドでの５－ｍＣｙｔの減少した存在に対応する平均メチル化状態をいう。

【００６３】

「マイクロアレー」との用語は、当該技術分野で認められているように、「ＤＮＡマイクロアレー」および「ＤＮＡチップ」の両方をいう。技術的に認識された固相全てを包含し、核酸分子をそれに固定するか、またはその上で核酸を合成する全ての方法を包含する。

【００６４】

「遺伝子パラメーター」とは、遺伝子およびさらにその制御を必要とする配列の変異および多型である。変異と指定されるものは、特に、挿入、欠失、点変異、反転および多型および特に好ましくは、ＳＮＰ（一塩基多型）である。

【００６５】

「後生的パラメーター」とは、特にシトシンメチル化である。さらに、後生的パラメーターとしては、例えばヒストンのアセチル化があり、これは記述した方法を使用して直接に分析できないが、代わって、ＤＮＡメチル化と相互に関連する。

【００６６】

「重亜硫酸塩試薬」との用語は、メチル化および非メチル化ＣｐＧジヌクレオチド配列を区別するために、本明細書に記載されるように有用である重亜硫酸塩、二亜硫酸塩、亜硫酸水素塩およびこれらの組合せを含む試薬をいう。

【００６７】

「メチル化分析」との用語は、ＤＮＡ配列内の１つまたは複数のＣｐＧジヌクレオチド配列のメチル化状態を決定する全ての方法をいう。

【００６８】

「ＭＳ．ＡＰ－ＰＣＲ」（メチル化－感受性任意－プライムドポリメラーゼ連鎖反応）との用語は、ＣｐＧジヌクレオチドを多分含むであろう領域上に焦点を合わせるために、ＣＧ－リッチプライマーを使用してゲノムの全体的スキャンを可能とする技術的に認識された技術をいい、Gonzalgoら、Cancer Research 57: 594-599 1997に記載されている。

【００６９】

「ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）」との用語は、Eadsら、Cancer Res. 59: 2302-2306, 1999に記載される技術的に認識された蛍光系リアルタイムＰＣＲ技術をいう。

【００７０】

本明細書で実施される実施態様中の「ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ（商標）」分析との用語は

、増幅プラマー間のＣｐＧ位置を包囲するか、あるいはそれに包囲されるメチル化特異的ブロッキングプローブ（ここでは、ブロッカーとも呼ぶ）が核酸試料のメチル化特異的選択増幅が可能である分析をいう。

【００７１】

本明細書で実施される実施態様中の「ＨｅａｖｙＭｅｔｙｌ（商標） ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）」との用語は、ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）分析の変形であるＨｅａｖｙＭｅｔｙｌ（商標） ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）分析をいう。ここで、ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）分析は、増幅プライマー間のＣｐＧ位置を包囲するメチル化特異的ブロッキングプローブと組合わされる。

【００７２】

「Ｍｓ－ＳＮｕＰＥ」（メチル化感受性一塩基プライマー伸長）との用語は、Gonzalgo & Jones, Nucleic Acids Res. 25: 2529-2531, 1997に記載される技術的に認識された分析をいう。

【００７３】

「ＭＳＰ」（メチル化特異的ＰＣＲ）との用語は、Hermanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9821-9826, 1996および米国特許第５，７８６，１４６号 に記載される技術的に認識されたメチル化分析をいう。

【００７４】

「ＣＯＢＲＡ」（Combined Bisulfite Restriction Analysis）との用語は、Xiong & Laird, Nucleic Acids Res. 25: 2532-2534,1997に記載される技術的に認識されたメチル化分析をいう。

【００７５】

「ＭＣＡ」（メチル化ＣｐＧアイランド増幅）との用語は、Toyotaら、Cancer Res. 59: 2307-12, 1999およびＷＯ００／２６４０１Ａ１に記載されるメチル化分析をいう。

【００７６】

「ハイブリダイゼーション」との用語は、ワトソン－クリック塩基対に従って、試料ＤＮＡ中で相補配列にオリゴヌクレオチドが結合して二重構造を形成することと理解されるべきである。

【００７７】

本明細書中に規定される「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、５×ＳＳＣ／５×デンハルト溶液／１．０％ＳＤＳ中、６８℃でハイブリダイズし、そして０．２×ＳＳＣ／０．１％ＳＤＳ中、室温で洗浄するか、あるいはその技術的に認識された均等（例えば、２．５×ＳＳＣ緩衝液中、６０℃でハイブリダイゼーションを行ない、次いで、低緩衝濃度にて３７℃で数回の洗浄し、安定な状態とする条件）を含む。本明細書中で規定される中程度にストリンジェントな条件とは、３×ＳＳＣ中、４２℃で洗浄することを含むか、あるいはその技術的に認識された均等を含む。塩濃度および温度のパラメーターはプローブと標的核酸の間を確認する最適レベルを達成するためには変化され得る。このような条件に関する手引き書は当該技術分野で入手可能であり、例えば、Sambrookら、1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.;およびAusubelら（編）、1995, Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, N.Y.)のUnit2.10がある。

【００７８】

「メチル化特異的制限酵素」または「メチル化感受性制限酵素」との用語は、その認識部位のメチル化状態に依存して核酸を選択的に消化する酵素を意味するとされる。認識部位がメチル化されていないかあるいは半メチル化されているなら特異的に切断するこのような制限酵素の場合、もしも認識部位がメチル化されているなら、切断は行われないか、あるいは有意に低い効率でもって行われるであろう。認識部位がメチル化されているなら、特異的に切断するこのような制限酵素の場合、もしも認識部位がメチル化されていないなら、切断は行われないか、あるいは有意に低い効率でもって行われるであろう。メチル化特異的制限酵素が好ましく、その認識配列はＣＧジヌクレオチド（例えば、ｃｇｃｇま

たはｃｃｃｇｇｇ）を含む。さらに、いくつかの実施態様では、もしもこのジヌクレオチドのシトシンが炭素原子Ｃ５でメチル化されているなら、切断しない制限酵素が好ましい。

【００７９】

「非メチル化特異制限酵素」または「非メチル化感受性制限酵素」とは、メチル化状態に関係なく、ほぼ同じ効率で核酸配列を切断する制限酵素である。これらはまた、「メチル化非特異的制限酵素」とも呼ばれる。

【００８０】

「遺伝子」との用語は、その転写変異体全て（例えば、「セプチン９」との用語は、例えばその切断された転写物Ｑ９ＨＣ７４を含むであろう）および全プロモーターおよびその制御要素を含むと解釈される。さらに、複数のＳＮＰが前記遺伝子内で公知であることから、この用語はその配列の変異体全てを含むと解釈される。

【００８１】

「前癌性」または「前新生物」との用語とその均等物は、悪性形質転換を生じている細胞増殖性疾患全てを意味すると解釈される。このような状態の例としては、結腸直腸細胞増殖性疾患の場合、高度の形成異常を有する細胞増殖性疾患および下記クラスの腺腫が挙げられる。

レベル１：ポリープ頭部内で粘膜下組織中へ筋粘膜を通る悪性腺の浸透；
レベル２：同じ粘膜下組織の浸潤、しかし、頭部から茎部への接合部に存在する；
レベル３：茎部への浸潤；および
レベル４：結腸壁への結合部での茎部基底の浸潤（このレベルはデュークス分類Ａに対応する）

【００８２】

概要

本発明は被検者から単離した生物学的試料中のセプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列の発現レベルを決定することを含む被検者の細胞増殖性疾患を検出および／または分類する方法を提供する。ここで、過小発現および／またはＣｐＧメチル化が前記疾患の存在またはクラスの指標である。前記マーカーは疾患の前癌状態中の早期検出を含む、新生物の細胞増殖性疾患の診断、およびさらに、良性細胞増殖性疾患と新生物細胞増殖性疾患の区別において使用される。本発明は新生物細胞増殖性疾患が良性細胞増殖性疾患と区別される方法であって、ＣｐＧメチル化の過小発現および／または存在が新生物細胞増殖性疾患または前新生物疾患の存在の指標であり、その非存在は良性細胞増殖性疾患の存在の指標である。

【００８３】

本発明のマーカーは、特に肝細胞増殖性疾患を検出または区別すること、または結腸直腸細胞増殖性疾患を検出または区別することにおいて特に優れていて、前記疾患の早期検出、分類および治療において改善された手段を提供する。

【００８４】

セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列のメチル化分析が分析される上記実施態様に加えて、本発明はさらに、癌、特に肝臓癌および／または結腸直腸癌の検出において新規な有用性を有するセプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列を含む遺伝子のパネルを提供する。

【００８５】

さらに、第１実施態様では本発明はセプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～１

６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列のＣｐＧメチル化状態の分析に基づく。さらに、前記遺伝子の配列は表３に記載されるものであることが好ましい。

【００８６】

ＤＮＡの重亜硫酸塩変異は、ＣｐＧメチル化状態を評価するために使用される技術的に認識された手段である。５－メチルシトシンは真核細胞のＤＮＡで最も頻度の高い共有結合塩基変異である。これは例えば、転写制御、遺伝子インプリンティング、および腫瘍形成においてある役割を果たす。したがって、遺伝子情報の１構成成分として、５－メチルシトシンを同定することは、かなり興味深いことである。しかしながら、５－メチルシトシン位置は５－メチルシトシンがシトシンと同じ塩基対挙動を示すから、配列決定では同定できない。さらに、５－メトルシトシンによる後生的情報は、例えばＰＣＲ増幅中に完全に失われる。

【００８７】

５－メチルシトシンの存在についてＤＮＡを分析する最も頻繁に使用される方法は、重亜硫酸塩とシトシンとの特異的反応に基づく。それによって、続いてのアルカリ加水分解時に、シトシンはその塩基対挙動でチミンに対応するウラシルに変換される。しかしながら、有意にも、５－メチルシトシンはこれらの条件下で未変性のまま残存する。その結果、もとのＤＮＡは、そのハイブリダイゼーション挙動で元来、シトシンと区別され得ないメチルシトシンが標準的な技術的に認識された分子生物学的技術、例えば、増幅およびハイブリダイゼーション、または配列決定を使用して唯一、残存するシトシンとして検出され得るように変換される。これらの技術の全ては異なった塩基対特性に基づき、現在、十分に利用されている。

【００８８】

感度に関して、先行技術は分析されるＤＮＡをアガロースマトリックス中に封入し、それによってＤＮＡ（重亜硫酸塩は１本鎖ＤＮＡのみに反応する）の拡散と再生を防ぎ、そして、沈殿と精製工程の全てを高速透析に代替することを含む方法と定義される（Olek Aら、「重亜硫酸塩に基づくシトシンメチル化分析における変更および改良された方法」、Nucleic Acids Res. 24: 5064-6, 1996）。すなわち、メチル化状態における個人の細胞を分析し、その方法の有用性および感度を例証することが可能である。５－メチルシトシンを検出する技術的に認識された方法の概観は、Rein, T.ら、Nucleic Acids Res. 26: 2255, 1998に提供されている。

【００８９】

いくつかの例外を除いて、重亜硫酸塩技術（例えば、Zeschnigk M.ら、Eur J Hum Genet. 5: 94-98, 1997）は現在、研究においてのみ使用されている。全ての実例では、公知遺伝子の短い特定断片が、重亜硫酸塩処理に続いて増幅され、完全に配列決定され（Olek & Walter, Nat Genet. 1997 17: 275-6, 1997）、１つまたは複数のプライマーの伸長反応に付して（Gonzalgo & Jones, Nucleic Acids Res. 25: 2529-31 1997, ＷＯ９５／００６６９；米国特許第６，２５１，６９４号）、個人のシトシン位置を分析するか、あるいは酵素消化によって処理される（Xiong & Laird, Nucleic Acids Res. 25: 2532-4, 1997）。ハイブリダイゼーションによる検出はまた、先行技術（Olekら、ＷＯ９９／２８４９８）に記載されている。さらに、個人の遺伝子に関するメチル化検出における重亜硫酸塩技術の使用も記載されている（Grigg & Clark, Bioessays, 16: 431-6, 1994; Zeschnigk M.ら、Hum Mol Genet, 6: 387-95, 1997, Feil R.ら、Nucleic Acids Res. 22: 695-, 1994; Martin V.ら、Gene, 157: 261-4, 1995;ＷＯ９７４６７０５およびＷＯ９５１５３７３）。

【００９０】

本発明は配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択される少なくとも１つの配列内のＣｐＧジヌクレオチド配列のメチル化状態の決定のための１つまたは複数のメチル化分析を組み合わせた重亜硫酸塩技術の使用を提供する。ゲノムＣｐＧジヌクレオチドはメチル化されるか、あるいは

非メチル化され得る（あるいは、それぞれ、アップメチル化およびダウンメチル化として公知である）。しかしながら、本発明の方法は不均一な性質の生物学的試料、例えば、血液または糞便内の低濃度の腫瘍細胞の分析に適している。したがって、このような試料中のＣｐＧ位置のメチル化状態を分析する際、当業者はメチル化状態とは別に、特定のＣｐＧ位置でのメチル化のレベル（例えば、パーセント、画分、割合、比率または程度）を決定するために定量的分析を使用する。したがって、メチル化状態またはメチル化状況との用語は、またＣｐＧ位置でのメチル化の程度を反映する値を意味するとも解釈されるべきである。もしも具体的に述べられないなら、「超メチル化」または「アップメチル化」との用語は、特定のカットオフポイントのメチル化レベル以上のものを意味すると解釈される。その際、前記カットオフは所与の集合体における平均または中間的メチル化レベルを表示する値であるか、あるいは好ましくは最適カットオフレベルである。「カットオフ」はまた、「許容限界」とも呼ばれる。本発明では、「メチル化」、「超メチル化」または「アップメチル化」との用語は、セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～１６５からなる群から選択される遺伝子またはゲノム配列内およびそれに関連する全てのＣｐＧ位置（例えば、プロモーターまたは制御領域内）におけるメチル化がゼロ（０）％（またはその均等）であるカットオフ以上のメチル化レベルを含むと解釈される。

【００９１】

本発明では、配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７内のＣｐＧジヌクレオチド配列のメチル化状態を決定することは、細胞増殖性疾患の診断および特性化の両方において有用性を有する。

【００９２】

メチル化分析手法

種々のメチル化分析手法が当該技術分野で公知であり、本発明と関連して使用され得る。これらの分析はＤＮＡ配列内の１つまたは複数のＣｐＧジヌクレオチド（例えば、ＣｐＧアイランド）のメチル化状態の決定を可能とする。このような分析は他の多くの技術の中でも、重亜硫酸塩処理ＤＮＡのＤＮＡ配列決定、ＰＣＲ（配列特異的増幅）、サザンブロット分析およびメチル化感受性制限酵素の使用を含む。

【００９３】

例えば、ゲノム配列決定は重亜硫酸塩処理によるＤＮＡメチル化パターンおよび５－メチルシトシン配置の分析において単純化されている（Frommerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1827-1831. 1992）。さらに、重亜硫酸塩変換ＤＮＡから増幅されたＰＣＲ産物の制限酵素消化が使用され、例えば、Sadri & Hornsby（Nucleic Acids Res. 24: 5058-5059, 1996）に記載される方法またはＣＯＢＲＡ(Combined Bisulfite Restriction Analysis)(Xiong & Laird, Nucleic Acids Res. 25: 2532-2534, 1997）がある。

【００９４】

ＣＯＢＲＡ

ＣＯＢＲＡ（商標）分析は少量のゲノムＤＮＡの特定遺伝子座位のＤＮＡメチル化レベルを決定するために有用な定量的メチル化分析である（Xiong & Laird, Nucleic Acids Res. 25: 2532-2534, 1997）。簡単には、制限酵素消化は重亜硫酸ナトリウム処理ＤＮＡのＰＣＲ産物におけるメチル化依存配列の相違を明らかにするために使用される。メチル化依存配列の相違は、まずFrommerら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1827-1831, 1992）が記載する方法に従う標準的重亜硫酸塩処理によって、ゲノムＤＮＡ中に導入される。次いで重亜硫酸塩変換ＤＮＡのＰＣＲ増幅は、目的のＣｐＧアイランドに特異的なプライマーを使用して行い、次いで、制限エンドヌクレアーゼ消化、ゲル電気泳動、および特定標識ハイブリダイゼーションプローブによる検出が続く。最初のＤＮＡ試料中のメチル化レベルはＤＮＡメチル化レベルの高範囲のスペクトルを越えて、直線的定量方法で消化および未消化ＰＣＲ産物の相対的量で表される。さらに、この技術は顕微解剖されたパラフィン包埋組織試料から得たＤＮＡに確実に適用され得る。

【００９５】

ＣＯＢＲＡ（商標）分析のための典型的な試薬（例えば、典型的ＣＯＢＲ（商標）系キットに見られるであろう）としては、特定遺伝子のためのＰＣＲプライマー（または重亜硫酸塩処理ＤＮＡ配列またはＣｐＧアイランド）；制限酵素および適当な緩衝液：遺伝子ハイブリダイゼーションオリゴヌクレオチド；コントロールハイブリダイゼーションオリゴヌクレオチド；オリゴヌクレオチドプローブのためのキナーゼ標識キット；および標識ヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、重亜硫酸塩試薬としてはＤＮＡ変性緩衝液；スルホン化緩衝液；ＤＮＡ回収試薬またはキット（例えば、沈殿、限外濾過、親和性カラム）；脱スルホン化緩衝液；およびＤＮＡ回収成分が挙げられる。

【００９６】

好ましくは、「ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）」（蛍光系リアルタイムＰＣＲ技術）（Eadsら、Cancer Res. 59: 2302-2306, 1999）、Ｍｓ－ＳＮｕＰＥ（商標）（メチル化感受性１本鎖ヌクレオチドプライマー伸長）反応（Gonzalgo & Jones, Nucleic Acids Res. 25: 2529-2531, 1997）、メチル化特異的ＰＣＲ（「ＭＳＰ」、Hermanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9821-9826, 1996; 米国特許第５，７８６，１４６号）およびメチル化ＣｐＧアイランド増幅（「ＭＣＡ」、Toyotaら、Cancer Res. 59: 2307-12, 1999）を単独で、あるいはこれらの方法の他のものと組合わせて使用される。

【００９７】

「ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ（商標）」分析技術は、重亜硫酸塩処理ＤＮＡのメチル化特異的増幅に基づくメチル化の相違を評価するための定量的方法である。増幅プライマー間のＣｐＧ位置をカバーするか、あるいはこれらによってカバーされるメチル化特異的ブロッキングプローブ（ここでは、ブロッカーとも呼ぶ）は、核酸試料のメチル化特異的選択増幅を可能とする。

【００９８】

本明細書中で実行される実施態様中で、「ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ（商標）、ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）」分析との用語は、ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）分析の変形であるＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ（商標）　ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）分析をいう。ここで、ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）分析は増幅プライマー間のＣｐＧ位置をカバーするメチル化特異的ブロッキングプローブと組合わされる。ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ（商標）分析はメチル化特異的増幅プライマーとともに使用してもよい。

【００９９】

ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ（商標）分析のための典型的な試薬（例えば、典型的ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）系キットに見出されるであろう）としては、；特定遺伝子（または重亜硫酸塩処理ＤＮＡ配列またはＣｐＧアイランド）のためのＰＣＲプライマー；ブロッキングオリゴヌクレオチド；最適ＰＣＲ緩衝液およびデオキシヌクレオチド；およびＴａｑポリメラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１００】

ＭＳＰ　ＭＳＰ（メチル化特異的ＰＣＲ）はメチル化感受性制限酵素の使用と無関係に、ＣｐＧアイランド内のＣｐＧ部位のいかなる群のメチル化状態をも評価することを可能とする（Hermanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9821-9826, 1996; 米国特許第５，７８６，１４６号）。簡単には、ＤＮＡはメチル化シトシンでなく、非メチル化シトシン全てをウラシルに変換する重亜硫酸ナトリウムで変性され、その後、メチル化ＤＮＡ対非メチル化ＤＮＡに特異的なプライマーで増幅される。ＭＳＰは少量のＤＮＡのみを必要とし、所与のＣｐＧアイランド座位の０．１％メチル化アレル体に感受性を有し、パラフィン包埋試料から抽出されたＤＮＡ上で実施され得る。ＭＳＰ分析のための典型的な試薬（例えば、典型的ＭＳＰ系キットで見出されるであろう）としては、特定遺伝子（または重亜硫酸塩処理ＤＮＡ配列またはＣｐＧアイランド）のためのメチル化および非メチル化ＰＣＲプライマー、最適ＰＣＲ緩衝液およびデオキシヌクレオチドおよび特定プローブが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０１】

ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）

ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）分析は、ＰＣＲ工程後、さらなる操作を必要としない蛍光系リアルタイムＰＣＲ（ＴａｑＭａｎ（登録商標））技術を使用する高処理能力の定量的メチル化分析である（Eadsら、Cancer Res. 59: 2302-2306, 1999）。簡単には、ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）法は、重亜硫酸ナトリウム反応で、標準的手法によりメチル化依存性配列の相違した混合物へ変換されるゲノムＤＮＡの混合試料でもって始める（重亜硫酸塩法は非メチル化シトシン残基をウラシルに変換する）。次いで、蛍光系ＰＣＲは「バイアスド(biased)」（公知ＣｐＧジヌクレオチドと重複するＰＣＲプライマーによる）反応中で達成される。配列の判別は増幅工程のレベルおよび蛍光検出工程のレベルの両方で生じ得る。

【０１０２】

ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）分析はゲノム試料のメチル化パターンの定量的検査として使用される。その際、配列判別がプローブハイブリダイゼーションのレベルで生じる。この定量的検査では、ＰＣＲ反応が推定上の特定メチル化部位と重複する蛍光プローブの存在下でメチル化特異的増幅を行う。インプットＤＮＡ量のアンバイアスド(unbiased)コントロールは、プライマーまたはプローブのいずれもＣｐＧジヌクレオチドと重複しない反応によってもたらされる。あるいは、ゲノムメチル化の定量的検査は公知メチル化部位を「カバー」しないコントロールオリゴヌクレオチド（ＨｅａｖｙＭｅｈｔｙｌ（商標）の蛍光系バージョンおよびＭＳＰ技術）、あるいは潜在的メチル化部位をカバーするオリゴヌクレオチドのいずれかでバイアスド(biased)ＰＣＲプールをプロービングして達成される。

【０１０３】

ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）法は好適なプローブ、例えば「ＴａｑＭａｎ（登録商標）」、Ｌｉｇｈｔｃｙｃｌｅ（登録商標）などを使用することができる。例えば、２本鎖ゲノムＤＮＡは重亜硫酸ナトリウムで処理し、ＴａｑＭａｎ（登録商標）プローブを使用して２セットのＰＣＲ反応のうちの１つに付し；例えば、ＭＳＰプライマーおよび／またはＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌブロッカーオリゴヌクレオチドおよびＴａｑＭａｎ（登録商標）プローブを使用する。ＴａｑＭａｎ（登録商標）プローブは蛍光「レポーター」と「失活剤」分子で二重標識し、フォワードプライマーまたはリバースプライマーよりもＰＣＲサイクルで約１０℃以上高い温度で融解するように、相対的に高いＧＣ含量領域に特異的であるように設計する。これはＴａｑＭａｎ（登録商標）プローブがＰＣＲアニーリング／伸長工程中に完全にハイブリダイズしたままとすることができる。Ｔａｑポリメラーゼが酵素としてＰＣＲ中に新規な鎖を合成するから、これは最終的にはアニールされたＴａｑＭａｎ（登録商標）プローブに達するであろう。次いで、Ｔａｑポリメラーゼの５'→３'エンドヌクレアーゼ活性はそれを消化することによって、ＴａｑＭａｎ（登録商標）プローブを置換し、リアルタイム蛍光検出系を使用する未消光シグナルの定量的検出のための蛍光レポーター分子を放出する。

【０１０４】

ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）分析のための典型的な試薬（例えば、典型的なＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）系キットで見出されるであろう）としては、特定遺伝子（または重亜硫酸塩処理ＤＮＡ配列またはＣｐＧアイランド）のためのＰＣＲプライマー；ＴａｑＭａｎ（登録商標）またはＬｉｇｈｔｃｙｃｌｅｒ（登録商標）プローブ；最適ＰＣＲ緩衝液およびデオキシヌクレオチド；およびＴａｑポリメラーゼを挙げることができるが、これらに限定されない。

【０１０５】

ＱＭ（商標）（定量的メチル化）分析は、ゲノム試料中のメチル化パターンの別な定量的検査であり、ここで、配列判別がプローブハイブリダイゼーションのレベルで生じる。この定量的検査では、ＰＣＲ反応が特定の推定メチル化部位と重複する蛍光プローブの存在下にアンバイアスド増幅をもたらす。インプットＤＮＡ量のためのアンバイアスドコントロールは、プライマーまたはプローブがいかなるＣｐＧジヌクレオチド上にも横たわらない反応でもって提供される。あるいは、ゲノムメチル化のための定量的検査は、公知メ

チル化部位を「カバー」しないコントロールオリゴヌクレオチド（ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ（商標）の蛍光検査またはＭＳＰ技術）あるいは潜在的メチル化部位をカバーするオリゴヌクレオチドのいずれかでバイアスドＰＣＲプールをプロービングして達成される。

【０１０６】

ＱＭ（商標）法は、増幅工程で好適なプローブ、例えば「ＴａｑＭａｎ（登録商標）」、Ｌｉｇｈｔｃｙｃｌｅｒ（登録商標）などを使用して行われる。例えば、２本鎖ゲノムＤＮＡは重亜硫酸ナトリウムで処理され、アンバイアスドプライマーおよびＴａｑＭａｎ（登録商標）プローブに付される。ＴａｑＭａｎ（登録商標）プローブは蛍光「レポーター」と「失活剤」分子で二重標識し、フォワードプライマーまたはリバースプライマーよりもＰＣＲサイクルで約１０℃以上高い温度で融解するように、相対的に高いＧＣ含量領域に特異的であるように設計する。これはＴａｑＭａｎ（登録商標）プローブがＰＣＲアニーリング／伸長工程中に完全にハイブリダイズした状態とすることができる。Ｔａｑポリメラーゼが酵素としてＰＣＲ中に新規な鎖を合成するから、これは最終的にはアニールされたＴａｑＭａｎ（登録商標）プローブに達するであろう。Ｔａｑポリメラーゼの５'→３'エンドヌクレアーゼ活性はそれを消化することによって、ＴａｑＭａｎ（登録商標）プローブを置換し、リアルタイム蛍光検出系を使用する未消光シグナルの定量的検出のための蛍光レポーター分子を放出する。ＱＭ（商標）分析のための典型的な試薬（例えば、典型的なＱＭ（商標）系キットで見出されるであろう）としては、特定遺伝子（または重亜硫酸塩処理ＤＮＡ配列またはＣｐＧアイランド）のためのＰＣＲプライマー；ＴａｑＭａｎ（登録商標）またはＬｉｇｈｔｃｙｃｌｅｒ（登録商標）プローブ；最適ＰＣＲ緩衝液およびデオキシヌクレオチド；およびＴａｑポリメラーゼを挙げることができるが、これらに限定されない。

【０１０７】

Ｍｓ－ＳＮｕＰＥ

Ｍｓ－ＳＮｕＰＥ（商標）技術は、ＤＮＡの重亜硫酸塩処理、次いで一塩基プライマー伸長に基づく特定ＣｐＧ部位でのメチル化の相違を評価する定量法である（Gonzalgo & Jones, Nucleic Acids Res. 25: 2529-2531, 1997）。簡単には、ゲノムＤＮＡを重亜硫酸ナトリウムと反応させ、非メチル化シトシンをウラシルに変換し、一方、５－メチル化シトシンを変化させないままとする。所望標的配列の増幅は、次いで重亜硫酸塩変換ＤＮＡに特異的なＰＣＲプライマーを使用して実行し、得られた産物を単離し、目的のＣｐＧ部位でのメチル化分析のための鋳型として使用する。少量のＤＮＡが分析され（例えば、顕微解剖された病理学セクション）、そしてＣｐＧ部位のメチル化状態を決定するための制限酵素の使用を避ける。

【０１０８】

Ｍｓ－ＳＮｕＰＥ（商標）分析のための典型的な試薬（例えば、典型的なＭｓ－ＳＮｕＰＥ（商標）系キット中に見出されるであろう）としては、特定遺伝子（または重亜硫酸塩処理ＤＮＡ配列またはＣｐＧアイランド）のためのＰＣＲプライマー；最適ＰＣＲ緩衝液およびデオキシヌクレオチド；ゲル抽出キット；ポジティブコントロールプライマー；特定遺伝子のためのＭｓ－ＳＮｕＰＥ（商標）プライマー；反応緩衝液（Ｍｓ－ＳＮｕＰＥ反応のための）および標識ヌクレオチドを挙げることができるが、これらに限定されない。さらに、重亜硫酸塩変換試薬は、ＤＮＡ変性緩衝液；スルホン化緩衝液；ＤＮＡ回収試薬またはキット（例えば、沈殿、限外ろ過、親和性カラム）；脱スルホン化緩衝液；およびＤＮＡ回収成分を挙げることができるが、これらに限定されない。

【０１０９】

配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７のゲノム配列、および配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３の非天然処理変異体は細胞増殖性疾患、特に結腸直腸および／または肝臓の細胞増殖性疾患の早期検出、分類および／または治療のための新規な有用性を有すると決定された。

【０１１０】
１つの実施態様では、本発明の方法は、次の工程；ｉ）被検者から得たゲノムＤＮＡ（好ましくは体液から単離された）をセプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５（そのプロモーターおよび制御領域を含む）からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列内のメチル化および非メチル化ＣｐＧジヌクレオチド間を区別する少なくとも１つの試薬、または一連の試薬に接触させ；そしてii）８０％以上または同等の感度および８０％以上または同等の特異性でもって、結腸または肝臓の細胞増殖性疾患を検出し、または検出して区別することを含む。
【０１１１】
好ましくは、感度は約７５％～約９６％、または約８０％～約９０％、または約８０％～約８５％である。好ましくは、特異性は約７５％～約９６％、または約８０％～約９０％、または約８０％～約８５％である。
【０１１２】
ゲノムＤＮＡは市販キットの使用を含む当該技術分野で標準的な手段により単離する。簡単には、目的のＤＮＡが細胞膜で被包されている場合、生物学的試料は酵素的、化学的または機械的手段で破壊または溶解しなければならない。次いで、ＤＮＡ溶液から例えばプロテナーゼＫによりタンパクおよび他の不純物を取り去る。次いで、ゲノムＤＮＡをその溶液から回収する。これは塩析、有機溶媒抽出または固相担体へのＤＮＡの結合を含む種々の方法によって実施される。方法の選択は時間、費用およびＤＮＡの必要量を含むいくつかの要素に影響されるであろう。新生物または前新生物を含む臨床試料の全てのタイプ、好ましくは、セルライン、病理学的スライド、生検、パラフィン包埋組織、体液、糞便、結腸流出液、尿、血漿、血清、全血、単離された血球、血液から単離された細胞、およびこれらの組合せが、本方法に使用するのに適している。体液はＤＮＡの好ましい原料であり、特に好ましいものは血漿、血清、全血、単離された血球および血液から単離された細胞である。
【０１１３】
次いで、ゲノムＤＮＡ試料はゲノムＤＮＡの少なくとも1つの標的領域内のメチル化および非メチル化ＣｐＧジヌクレオチドを区別する少なくとも１つの試薬または一連の試薬で処理する。ここで、標的領域はそれぞれ配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択される少なくとも1つの配列の少なくとも１６個の近接するヌクレオチドを含むか、あるいはこれにストリンジェンな条件でハイブリダイズする。この近接するヌクレオチドは少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチド配列を含む。
【０１１４】
前記試薬は５'－位置でメチル化されていないシトシン塩基をウラシル、チミンまたはハイブリダイゼーション挙動においてシトシンと異なる他の塩基に変換することが、特に好ましい。しかしながら、他の実施態様では前記試薬はメチル化感受性制限酵素である。
【０１１５】
ここで、ゲノム試料は５'－位置でメチル化されていないシトシン塩基をウラシル、チミンまたはハイブリダイゼーション挙動においてシトシンと異なる他の塩基に変換する方法で処理する。この処理は重亜硫酸塩（亜硫酸水素塩、二亜硫酸塩）およびそれに続くアルカリ加水分解で実施することが好ましい。このような処理は（それぞれ）配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７を配列番号１０～配列番号１５、配列番号３０～配列番号３１、配列番号３８～配列番号３９、配列番号１６８～配列番号１８５（ここで前記ＣｐＧジヌクレオチドはメチル化されている）、あるいは配列番号２８～配列番号３３、配列番号４２～配列番号４３、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１８６から配列番号２０３（ここで前記ＣｐＧジヌクレオチドはメチル化されていない）に変換する結果となる。
【０１１６】

次いで、処理されたＤＮＡは標的遺伝子配列（この処理前のセプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列）のメチル化状態を決定するために分析される。標的領域はセプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列の少なくとも１６個の近接するヌクレオチドを含むか、あるいはこれにストリンジェントな条件下にハイブリダイズすることが特に好ましい。配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７の前記遺伝子の配列が分析されることが好ましい。分析方法は上記したものを含めて当該技術分野で公知であるものから選択される。特に、ここに記載されるようなＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）、ＭＳＰおよびブロッキングオリゴヌクレオチド（ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ（商標））の使用が好ましい。さらに、このような分析に使用されるいかなるオリゴヌクレオチド（プライマー、ブロッキングオリゴヌクレオチドおよび検出プローブ）も配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３の１つまたは複数の塩基配列およびその相補鎖の少なくとも１６塩基対長セグメントに逆相補的であるか、同一であるか、またはこれにストリンジェント、または高度にストリンジェントな条件下にハイブリダイズすべきことが好ましい。

【０１１７】

セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列（そのプロモーターおよび／または制御領域を含む）の異常なメチル化、より具体的には超メチル化は新生物細胞増殖性疾患の存在に関連し、特に結腸直腸および肝細胞性癌腫の存在に関連している。したがって、生物学的試料がいかなる程度のメチル化を示すとしても、その試料は新生物として決定されるべきである。

【０１１８】

セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列の分析は、まず、８０％以上または同等の感度および８０％以上または同等の特異性でもって、結腸および肝臓の細胞増殖性疾患を検出、または検出して区別することが可能である。感度は（検出された新生物／全ての新生物）；例えば、（検出された結腸直腸新生物／全ての結腸直腸新生物）として計算され、特異性は、（非検出陰性／全陰性）として計算される。

【０１１９】

好ましくは、感度は約７５％～約９６％、または約８０％～約９０％、または約８０％～約８５％である。好ましくは、特異性は約７５％～約９６％、または約８０％～約９０％、または約８０％～約８５％である。

【０１２０】

結腸新生物はここでは１ｃｍ以上の大きさの結腸悪性腫瘍および腺腫およびそのサブセットとして定義される。陰性は健康な個人として定義され得る。

【０１２１】

１つの実施態様では、本方法は細胞増殖性疾患（特に、新生物、結腸または肝臓の疾患）の分化、検出および区別のためのマーカーとして、セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列（またはそのプロモーターおよび／または制御領域）の使用を記載する。

【０１２２】

前記方法はそれらから転写されたＲＮＡまたは前記ＲＮＡから翻訳されたポリペプチドまたはタンパクの発現分析によって、好ましくはｍＲＮＡ発現分析またはポリペチド発現分析によって可能になる。したがって、本発明はまた、被検者のセプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列の発現を検出し、前記被検者の癌の存否に基づいて決定する定量的または定性的診断分析および方法を提供する。

【０１２３】

セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される遺伝子またはゲノム配列から転写されたｍＲＮＡの異常な発現は、被検者の癌の存在に関連している。本発明では、過小発現（および／またはメチル化の存在）は癌の存在に関連し、逆に過剰発現（および／またはメチル化の非存在）は癌の非存在に関連している。セプチン９遺伝子の配列番号１６～配列番号１９に記載される転写変異体の少なくとも１つの発現が決定されることが特に好ましい。

【０１２４】

遺伝子またはゲノム配列をコードするｍＲＮＡの存在を検出するために、試料は患者から得る。試料は腫瘍の細胞性物質を含む好ましい試料である。好適な試料のタイプとしては、セルライン、病理学的スライド、生検、パラフィン包埋組織、体液、糞便、結腸流出液、尿、血漿、血清、全血、単離された血液細胞、血液から単離された細胞およびこれらの組合せ全体が挙げられる。前記試料タイプは結腸流出液、尿、血漿、血清、全血、血液から単離された細胞からなる群から選択される糞便または体液であることが好ましい。

【０１２５】

試料はここに含まれるＲＮＡを抽出して処理される。試料から得られた核酸は次いで分析される。多くの技術が遺伝子発現の絶対的および相対的レベルを決定するために当該技術分野で公知である。本発明で使用するのに適した一般的に使用される技術としては、インサイチュハイブリダイゼーション（例えば、ＦＩＳＨ）、ノザン分析、ＲＮａｓｅ保護分析（ＲＰＡ）、マイクロアレーおよび定量的ＰＣＲおよびディファレンシャルディスプレイＰＣＲなどのＰＣＲに基づく技術または他の核酸検出法が挙げられる。

【０１２６】

逆転写／ポリメラーゼ連鎖反応技術（ＲＴ－ＰＣＲ）の使用が特に好ましい。ＲＴ－ＰＣＲ法は当該技術分野で周知である（例えば、Watson and Fleming、上掲参照）。

【０１２７】

ＲＴ－ＰＣＲ法は以下のように実施され得る。細胞性ＲＮＡ全体は例えば、標準的グアニジニウムイソチオシアネート法で単離され、ＲＮＡ全体は逆転写される。逆転写法は逆転写酵素および３'末端オリゴヌクレオチドｄＴプライマーおよび／またはランダムヘキサマープライマーを使用するＲＮＡ鋳型上でのＤＮＡ合成を含む。すなわち、生成されたｃＤＮＡは次いでＰＣＲにより増幅される（Belyavskyら、Nucl Acid Res 17: 2919-2932, 1989; Krug およびBerger, Methods in Enzymology, Academic Press, N.Y. Vol. 152, pp. 316-325, 1987、これらは参考として導入される ）。さらに、ＰＣＲ産物がハイブリダイゼーションプローブ（例えば、ＴａｑＭａｎ、Ｌｉｇｈｔｃｙｃｌｅｒ、Molecular Beacons & Scorpion）またはＳＹＢＲグリーンで検出されるＲＴ－ＰＣＲの「リアルタイム」変異体が好ましい。プローブまたはＳＹＢＲグリーンから検出されたシグナルは、次いで標準曲線を参照して、あるいは検量標準のものとＣｔ値を比較して定量化される。ハウスキーピング遺伝子分析がしばしば、その結果を規準化するために使用される。

【０１２８】

ノザンブロット分析では、全またはポリ（Ａ）＋ｍＲＮＡを変性アガロースゲル上に流し、乾燥されたゲル自体中または膜上の標識プローブにハイブリダイズして検出される。得られたシグナルはＲＮＡ集団中の標的ＲＮＡ量に比例している。

【０１２９】

２つまたはそれ以上の細胞集団または組織からのシグナルを比較することは、遺伝子発現レベルでの相対的相違を明らかにする。絶対的定量は標的ＲＮＡに対応するインビトロ転写物の公知量を使用して得た標準曲線とシグナルを比較して実施され得る。その発現レベルが条件にかかわりなく、相対的に一定であると期待されるハウスキーピング遺伝子の分析は、その結果を規準化するためにしばしば使用され、膜に対するＲＮＡの不均等な移動やゲル上のＲＮＡの不均等な負荷による生じる明白な相違を避ける。

【０１３０】

ノザン分析の第１工程は目的の細胞または組織から純粋で無処置のＲＮＡを単離することである。ノザンブロットはＲＮＡを大きさで区別するから、試料の完全性はシグナルが単一バンド中に局在化する程度に影響を与える。部分的に分解されたＲＮＡ試料は、いくつかのバンドを越えてなすりつけたように尾を引くか、あるいは分布して、感度において全体的な損失となり、多分、誤ったデータの解釈となるであろう。ノザンブロット分析ではＤＮＡ、ＲＮＡおよびオリゴヌクレオチドプローブが使用され、これらのプローブは好ましくは標識化される（例えば、放射性標識、質量標識または蛍光標識）。プローブでなく、標的ＲＮＡの大きさが検出バンドの大きさを決定し、それゆえ種々の長さのプローブを生じるランダムープライム標識などの方法がプローブ合成に適している。プローブの比活性は感度のレベルを決定し、それゆえ高い比活性を有するプローブを使用することが好ましい。

【０１３１】

ＲＮａｓｅ保護分析では、ＲＮＡ標識および規定された長さのＲＮＡプローブが溶液中でハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションに続いて、ＲＮＡは１本鎖核酸に特異的なＲＮａｓｅで消化し、ハイブリダイズされない１本鎖標的ＲＮＡとプローブを除去する。ＲＮａｓｅは不活性化し、ＲＮＡは例えば、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動でもって分離する。無処置ＲＮＡプローブの量はＲＮＡ集団中の標的ＲＮＡの量に比例する。ＲＰＡは遺伝子発現の相対的および絶対的定量およびイントロン／エクソン境界および転写開始部位などのＲＮＡ構造のマッピングに使用され得る。ＲＮａｓｅ保護分析は、一般的に検出限界が低いから、ノザンブロット分析において好ましい。

【０１３２】

ＲＰＡに使用されるアンチセンスＲＮＡプローブは規定されたエンドポイントを有するＤＮＡ鋳型のインビトロ転写で生成され、通常、５０～６００ヌクレオチドの範囲である。標的ＲＮＡに同質でない付加的配列を含むＲＮＡプローブの使用は、保護された断片が完全長のプローブから区別されることを可能とする。ＲＮＡプローブは通常、１本鎖ＲＮＡプローブを生成する容易さおよびＲＮａｓｅによるＲＮＡ：ＲＮＡ２本鎖消化の再現性および信頼性ゆえにＤＮＡプローブに代わって使用され（Ausubelら、2003）、特に高い比活性を有するプローブが好ましい。

【０１３３】

マイクロアレーの使用が特に好ましい。マイクロアレー分析法は２つの主たる部分に分けられ得る。第１は、ガラススライドまたは他の固体支持体上に公知遺伝子配列を固定化し、続いてガラススライド（または他の固相）上に固定化された公知遺伝子に蛍光標識されたｃＤＮＡ（求めようとする配列を含む）のハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーションの後、分析は蛍光マイクロアレースキャナーを使用して走査する。異なった遺伝子の相対的蛍光強度を分析することは、遺伝子発現における相違の程度を提供する。

【０１３４】

ＤＮＡアレーは準備されたガラススライドまたは他の固体表面上に前もって合成されたオリゴヌクレオチドを固定化して生成し得る。この場合、代表的遺伝子配列が製造され、標準的オリゴヌクレオチド合成および精製法を使用して準備される。これらの合成された遺伝子配列は、目的の遺伝子（この場合、セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される遺伝子またはゲノム配列）のＲＮＡ転写物に

相補的であり、２５～７０ヌクレオチドの範囲のより短い配列になりがちである。好ましい実施態様では、前記オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは配列番号１６～配列番号１９からなる群から選択される少なくとも１つの配列およびそれらに相補的な配列に相補的であるか、あるいはハイブリダイズする、少なくとも９、１８または２５塩基配列を含む。あるいは、固定化されたオリゴはスライド表面上で、インサイチュにて化学的に合成され得る。インサイチュオリゴヌクレオチド合成は、マイクロアレー上のスポットへの適当なヌクレオチドの近接的付加を含み、ヌクレオチドを受け入れないスポットは物理的または実質的なマスクを使用して、その方法の各工程中に保護される。好ましくは、前記合成された核酸はロックされた核酸である。

【０１３５】

発現をプロファイルするマイクロアレー実験では、使用されるＲＮＡ鋳型が研究している細胞または組織の転写プロファイルの代表である。ＲＮＡはまず、比較されるべき細胞集団または組織から単離される。各ＲＮＡ試料は次いで、逆転写反応を経て蛍光標識されたｃＤＮＡを生成する鋳型として使用される。ｃＤＮＡの蛍光標識は直接または間接標識法のいずれかで達成され得る。直接標識中、蛍光変性ヌクレオチド（例えば、Ｃｙ３（登録商標）－またはＣｙ５（登録商標）－ｄＣＴＰ）は逆転写中にｃＤＮＡに直接に導入される。また、間接標識はｃＤＮＡ合成中にアミノアリル変性ヌクレオチドを導入し、逆転写反応が完了した後、アミノアリル変性ｃＤＮＡにＮ－ヒドロキシサクシンイミド（ＮＨＳ）－エステルを結合することによって達成され得る。また、プローブは標識されないが、直接または間接に、標識されたリガンドに特異的に結合して検出可能である。好適な標識およびリガンド（およびプローブ）を標識する方法は当該技術分野で公知であり、例えば、公知方法（例えば、ニックトランスレーションまたはキナーゼ法）によって導入される放射活性標識を含む。他の好適な標識としては、ビオチン、蛍光性基、化学発光性基（例えば、ジオキセタン、特に誘発されたジオキセタン）、酵素、抗体などが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１３６】

差別的遺伝子発現分析を行うには、異なったＲＮＡ試料から生成したｃＤＮＡはＣｙ３（登録商標）で標識され、得られた標識ｃＤＮＡは精製して導入されていないヌクレオチド、遊離染料および残存ＲＮＡを除去する。精製に続いて、標識ｃＤＮＡ試料はマイクロアレーにハイブリダイズさせる。ハリブリダイゼーションのストリンジェンシーはハイブリダイゼーションおよび洗浄工程での温度、イオン強度、時間、およびホルムアミド濃度を含む多くの要因によって決定される。これら要因は例えば、Sambrookら(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. 1989）に概要が記載される。マイクロアレーは蛍光マイクロアレースキャナーを使用してポストハイブリダイゼーションを走査する。各スポットの蛍光強度は分析された遺伝子の発現レベルを示し、明るいスポットは強く発現した遺伝子に対応し、一方、かすかなスポットは弱い発現を示す。

【０１３７】

一旦、画像が得られると、生データを分析しなければならない。まず、背景の蛍光は各スポットの蛍光から減じなければならない。次いで、データは外因的に付加された核酸（好ましくはＲＮＡまたはＤＮＡ）などのコントロール配列、またはハウスキーピング遺伝子パネルに規準化されて、非特異的ハイブリダイゼーション、アレーセットアップのアレー不完全または可変性、ｃＤＮＡ標識、ハイブリダイゼーションまたは洗浄を説明する。データ規準化は比較されるべき複数のアレーの結果を示す。

【０１３８】

本発明の他の態様は、本発明の方法による被検者の癌の診断に使用するキットに関する。このキットはセプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される遺伝子またはゲノム配列の転写レベルを測定するための手段を含む。好ましい実施態様では、転写レベルを測定する手段はセプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番

号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される遺伝子またはゲノム配列の転写産物にストリンジェント、または中程度にストリンジェントな条件下にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを含む。好ましくは、このオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、配列番号１６～配列番号１９に示されるように、セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される遺伝子またはゲノム配列の転写産物の少なくとも１つに、ストリンジェント、または中程度にストリンジェントな条件下にハイブリダイズすることができる。１つの実施態様では、このオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、配列番号１６～配列番号１９からなる群から選択される少なくとも１つの配列およびそれらに相補的な配列に、相補的であるか、またはハイブリダイズする少なくとも９、１８または２５塩基配列を含む。

【０１３９】

もっとも好ましい実施態様では、転写レベルはノザンブロット分析、逆転写酵素ＰＣＲ、リアルタイムＰＣＲ、ＲＮａｓｅ保護、およびマイクロアレーの群から選択される技術によって決定される。本発明の他の実施態様では、キットはさらに、患者の生物学的試料を得る手段を含む。さらに、キットはもっとも好ましくは転写レベルを測定する手段および患者の生物学的試料を入れるのに適した容器を含み、最も好ましくはさらに、使用指示書およびキット結果の解説書を含む。

【０１４０】

好ましい実施態様では、キットは（ａ）セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列の転写産物にストリンジェント、または中程度にストリンジェントな条件下にハイブリダイズすることができる複数のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、（ｂ）オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドおよび転写産物を含む患者の生物学的試料を入れるのに適した容器、（ここでオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドはストリンジェント、または中程度にストリンジェントな条件下に転写産物にハイブリダイズできる）；（ｃ）（ｂ）のハイブリダイゼーションを検出する手段、および所望により、（ｄ）使用指示書およびキット結果の解説書を含む。さらに、（ａ）のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは各ケースで配列番号１６～配列番号１９からなる群から選択される少なくとも１つの配列およびそれらに相補的な配列に相補的であるか、あるいはハイブリダイズする少なくとも９、１８または２５塩基の配列を含む。

【０１４１】

キットはまた、別な容器中に包装されたハイブリダイゼーション緩衝液（ここでオリゴヌクレオチドはプローブとして使用される）などの他の成分を含む。また、オリゴヌクレオチドが標的領域を増幅するために使用される場合、キットは、別な容器に包装されたポリメラーゼおよびＰＣＲなどのポリメラーゼにより仲介されるプライマー伸長を最適化する反応緩衝液を含む。好ましくは、前記ポリメラーゼは逆転写酵素である。さらに、前記キットはＲＮａｓｅ試薬を含むことが好ましい。

【０１４２】

本発明は、さらに患者から得た試料中の前記遺伝子配列がコードするポリペプチドの存在を検出するための方法を提供する。

【０１４３】

セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される遺伝子またはゲノム配列がコードするポリペプチドのポリペプチド発現の異常なレベルが癌の存在に関連している。

【０１４４】

本発明では、前記ポリペプチドの過小発現は癌の存在に関連している。前記ポリペプチドは配列番号２０～配列番号２３に示されるアミノ酸配列の少なくとも１つによるセプチ

ン９遺伝子から転写されたポリペプチドであることが特に好ましい。

【０１４５】

ポリペプチドを検出する当該技術分野で公知である方法が使用され得る。このような方法としては、質量分析、免疫拡散、免疫電気泳動、免疫化学法、バインダー・リガンド分析、免疫組織化学技術、凝集および補体分析（例えば、Basic and Clinical Immunology, Sites and Terr, eds. Appleton & Lange, Nowalk, Conn. pp 217-262 1991参照、これは参考として導入される）が挙げられるが、これらに限定されない。エピトープと抗体を反応させ、標識ポリペプチドまたはその誘導体に競合的に置換えるバインダー・リガンド免疫分析が好ましい。

【０１４６】

本発明のある実施態様は、セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される遺伝子またはゲノム配列がコードするポリペプチドに特異的な抗体の使用を含む。前記ポリペプチドは配列番号２０～配列番号２３に示されるアミノ酸配列の少なくとも１つによるものであることが特に好ましい。

【０１４７】

このような抗体は癌診断に有用である。ある実施態様では、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の産生は、抗原として配列番号２０～配列番号２３のポリペプチドがコードするエピトープの使用によって誘導され得る。このような抗体は癌診断のためのマーカーとして発現したポリペプチドを検出するために、順に使用される。存在するこのようなポリペプチドのレベルは、従来の方法で定量化してもよい。抗体－ポリペプチド結合は蛍光または放射活性リガンド標識などの当該技術分野の種々の手段で検出および定量化してもよい。本発明はさらに上記手法を実施するためのキットを含む。このようなキットは調査するポリペプチドに特異的な抗体を含む。

【０１４８】

多くの競合的または非競合的ポリペプチド結合免疫分析は、当該技術分野で周知である。このような分析で使用される抗体は、例えば凝集検査で使用するように非標識されるか、あるいは広範囲の分析法を使用するために標識化される。使用され得る標識としては、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、酵素基質またはコファクター、酵素阻害剤、粒子、染料などが挙げられる。好ましい分析法としては、放射免疫分析法（ＲＩＡ）、酵素免疫分析法、例えば酵素結合免疫吸収分析法（ＥＬＩＳＡ）、蛍光免疫分析法などが挙げられるが、これらに限定されない。ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体またはそれらのエピトープが当該技術分野で公知である多くの方法のいずれかによる免疫分析法に使用され得る。

【０１４９】

本方法の別な実施態様では、タンパクはウェスタンブロット分析によって検出してもよい。この分析は当該技術分野で標準的であり、簡単にはタンパクは電気泳動、例えばＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離される。分離されたタンパクは次いで、電気泳動で達成される空間的分離を保持する適当な膜（または紙）、例えばニトロセルロースに移送される。膜は次いで、膜上に粘着性箇所を残して結合するブロッキング剤とともに加熱される。共通して使用されるブロッキング剤は一般的なタンパク（例えば、乳タンパク）を含む。目的のタンパクに特異的な抗体が次いで添加され、前記抗体は、例えば染料または酵素的手段（例えば、アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ）で検出可能に標識されている。膜上の抗体の位置が次いで検出される。

【０１５０】

本方法の別な実施態様では、タンパクは免疫組織化学的手段（試料中の特異的抗原をプローブする抗体の使用）によって検出してもよい。この分析は当該技術分野で標準的であり、組織中の抗原の検出は免疫組織化学として公知であり、一方、培養細胞中の検出は一般的に免疫細胞化学と呼ばれる。簡単には、一次抗体はその特異的抗原に結合することによって検出される。抗体－抗原複合体は次いで、二次酵素結合抗体に結合される。必要な

基質および色原体の存在下で、結合酵素は抗体－抗原結合部位での着色沈着物によって検出される。広範囲の好適な試料タイプ、抗原－抗体親和性、抗体タイプおよび検出強化法が存在する。したがって、免疫組織学または免疫細胞化学検出の最適条件は各個人の事例において当業者が決定しなければならない。

【０１５１】

ポリペプチドに対する抗体を調製する１つのアプローチは、そのポリペプチドの全てまたは部分のアミノ酸配列の選択と調製であり、アミノ酸配列の化学的合成およびそれを適当な動物、通常、ウサギまたはマウスに注射することである（Milstein and Kohler, Nature 256: 495-497, 1975; Gulfre and Milstein, Methods in Enzymology: Immunochemical Techniques 73: 1-46, Langone and Banatis eds., Academic Press, 1981、これらは全体を参考として導入する）。ポリペプチドまたはそのエピトープの調製法としては、化学合成、リコンビナントＤＮＡ技術または生物学的試料からの単離が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１５２】

本方法の最終工程では、患者の診断が決定される。ここで、（セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列の）過小発現が癌の存在の指標である。過小発現との用語は、平均、中間または最適の許容限界値からなる群から選択される所定のカットオフ以下の検出レベルでの発現を意味すると解釈される。

【０１５３】

本発明の他の態様は、本発明の方法による被検者の癌の診断のために使用するキットを提供する。これはセプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列のペプチドを検出する手段を含む。好ましくは、このポリペプチドの配列は配列番号２０～配列番号２３に示されている。ポリペプチドを検出する手段は、好ましくは抗体、抗体誘導体、または抗体断片を含む。ポリペプチドは最も好ましくは標識抗体を使用するウェスタンブロッティングの手段で検出される。本発明の他の実施態様では、キットはさらに、患者の生物学的試料を得る手段を含む。キットはさらに患者の生物学的試料中のポリペプチドを検出するための手段を入れるのに適した容器を含み、最も好ましくは、さらに使用するための指示書およびキット結果の解説書を含む。好ましい実施態様では、キットは（ａ）セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列のポリペプチドを検出する手段、（ｂ）前記手段およびポリペプチドを含む患者の生物学的試料を入れるのに適した容器（ここでその手段は、該ポリペプチドと複合体を形成することができる）、（ｃ）（ｂ）の複合体を検出する手段、および所望により、（ｄ）使用のための指示書およびキット結果の解説書を含む。セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列のポリペプチドを検出するための前記手段は、配列番号２０～配列番号２３から選択されるポリペプチド配列の少なくとも１つに特異的である。キットはまた、緩衝液またはブロッキング、洗浄または被覆に適した溶液などの他の成分を含み、別の容器に包装される。

【０１５４】

本発明の具体的な実施態様は、正確な検出、特性化および／または肝臓および／または結腸直腸の細胞増殖性疾患の治療を可能とする前記配列内のメチル化レベルおよび／またはパターン分析の新規な応用を提供する。癌の早期検出は直接に疾患進行に連結し、ここに記載される方法は医者ならびに患者がより良い多くの情報に基づく治療を決定することを可能とする。

【０１５５】
さらなる改良
本発明は配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７のゲノム配列のための新規な用途を提供する。さらなる実施態様は、配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７の変性された変異体、ならびに配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７内のシトシンメチル化パターンの分析のためのオリゴヌクレオチドおよび／またはＰＮＡ－オリゴマーを提供する。
【０１５６】
本発明の目的は配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択される少なくとも１つの配列、およびこれらの相補的配列の１つまたは複数のＣｐＧジヌクレオチドのメチル化状態の分析を含む。
【０１５７】
開示される発明は、ゲノムの配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７のゲノムから誘導される処理された核酸を提供する。ここで、処理はゲノム配列の少なくとも１つの非メチル化シトシン塩基をウラシルまたはハイブリダイゼーションにおいてシトシンと区別して検出できる他の塩基に変換するのに適している。問題のゲノム配列は、１つまたは複数の近接したメチル化ＣｐＧ位置を含む。前記処理は好ましくは重亜硫酸塩、硫酸水素塩、二硫酸塩およびこれらの組合せからなる群から選択される試薬の使用を含む。本発明の好ましい実施態様では、本発明は配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３からなる群から選択される配列の長さ少なくとも１６個の近接したヌクレオチドの配列を含む非天然変性核酸を提供する。本発明のさらに好ましい実施態様では、前記核酸は配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３に記載される核酸配列のセグメントの長さが少なくとも５０、１００、１５０、２００、２５０または５００塩基対である。配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３に記載される配列の全部または一部と同一または相補的でないが、配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７または他の天然ＤＮＡでない核酸分子が特に好ましい。
【０１５８】
前記配列は少なくとも１つのＣｐＧ、ＴｐＡまたはＣｐＡジヌクレオチドおよびこれらに相補的な配列を含むことが好ましい。配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３の配列は、配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７の核酸の非天然変性配列を提供する。ここで、各ゲノム配列の変性は下記のように特殊であり、前記ゲノム配列と区別される配列を有する核酸の合成となる。各センス鎖ゲノムＤＮＡ、例えば配列番号１では、４つの変換バージョンが記載される。「Ｃ」は「Ｔ」に変換するが、「ＣｐＧ」は「ＣｐＧ」のままである第１バージョン（すなわち、ゲノム配列において、ＣｐＧジヌクレオチド配列の全ての「Ｃ」残基がメチル化され、したがって変換されない）：記載されるゲノムＤＮＡ配列の相補鎖（すなわちアンチセンス鎖）を記載する第２バージョン、ここで「Ｃ」は「Ｔ」に変換するが、「ＣｐＧ」は「ＣｐＧ」のままで残る（すなわち、ＣｐＧジヌクレオチド配列の全ての「Ｃ」残基においてメチル化され、したがって変換されないケースに対応する）。配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７の「過剰メチル化」変換配列

は、配列番号１０～配列番号１５、配列番号３０～配列番号３１、配列番号３８～配列番号３９、配列番号１６８～配列番号１８５に相当する。「Ｃ」が「ＣｐＧ」ジヌクレオチド配列のものを含めて、全ての「Ｃ」残基において「Ｔ」に変換される各ゲノム配列の第３化学的変換バージョンが提供される（すなわち、ゲノム配列においてＣｐＧジヌクレオチド配列の全ての「Ｃ」残基が非メチル化される）。各配列の最終化学的変換バージョンは、記載されるゲノムＤＮＡ配列の相補鎖（すなわちアンチセンス鎖）を記載する。ここで、「Ｃ」は「ＣｐＧ」ジヌクレオチド配列のものを含めて、全ての「Ｃ」残基において「Ｔ」に変換される（すなわち、各ゲノム配列の相補鎖（アンチセンス鎖）において、ＣｐＧジヌクレオチド配列の全ての「Ｃ」残基が非メチル化される場合に相当する）。配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７の「過小メチル化」変換配列は、配列番号２８～配列番号３３、配列番号４２～配列番号４３、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１８６～配列番号２０３に対応する。

【０１５９】

これまで、有意に配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３の核酸配列および分子は細胞増殖性疾患の検出、分類または治療に関係あるいは関連していなかった。

【０１６０】

別の好ましい実施態様では、本発明はさらにゲノムまたは処理（化学的変性）ＤＮＡ内のシトシンメチル化状態を検出するための本発明の方法に使用するのに適した、配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７、配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３に記載されるオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーを提供する。前記オリゴヌクレオチドまたはオリゴマー核酸は、新規な診断手段を提供する。前記オリゴヌクレオチドまたはオリゴマーは、配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３に記載される処理された核酸配列および／またはそれに相補的な配列、または配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７に記載のゲノム配列および／またはその相補的な配列と同一であるか、または中程度にストリンジェント、またはストリンジェントな条件下にハイブリダイズする長さ少なくとも９個のヌクレオチドを有する核酸配列を含む。

【０１６１】

すなわち、本発明は配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７、配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３からなる群から選択される配列の全てまたは一部またはその相補鎖に、中程度にストリンジェントおよび／またはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下にハイブリダイズする核酸分子（例えば、オリゴヌクレオチドおよびペプチド核酸（ＰＮＡ）分子（ＰＮＡ－オリゴマー）を含む。配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３であるが、配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７または他のヒトゲノムＤＮＡでない配列の全てまたは一部に中程度にストリンジェントおよび／またはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下にハイブリダイズする核酸分子が特に好ましい。

【０１６２】

ハイブリダイズする核酸の同一部分またはハイブリダイズする部分は通常、長さ少なくとも９、１６、２０、３０または３５個のヌクレオチドである。しかしながら、より長い

分子は発明性ある用途を有し、すなわち本発明の範囲内にある。

【０１６３】

好ましくは、本発明のハイブリダイズする核酸のハイブリダイズする部分は、配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７、配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３からなる群から選択される配列、またはその配列の一部、またはその相補鎖と少なくとも９５％、または少なくとも９８％、または１００％同一である。

【０１６４】

本明細書に記載されるタイプのハイブリダイズする核酸は、例えばプライマー（例えばＰＣＲプライマー）、または診断および／または予後徴候のプローブまたはプライマーとして使用され得る。好ましくは、核酸試料へのオリゴヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションはストリンジェントな条件下に実施され、プローブは標的配列と１００％同一である。核酸２本鎖またはハイブリッドの安定性は融点またはＴｍで表現され、これはプローブが標的ＤＮＡから解離する温度である。この融点は要求されるストリンジェンシー条件を規定するために使用される。

【０１６５】

配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７に対応する配列（アレル変異体およびＳＮＰなど）に関連し、同一であるよりむしろ、実質的に同一である標的配列において、相同的ハイブリダイゼーションのみが特定濃度の塩（たとえばＳＳＣまたはＳＳＰＥ）で生じる最低温度をまず確立することが有用である。次いで、１％ミスマッチがＴｍを１℃減少させる結果となると仮定して、ハイブリダイゼーション反応の最終洗浄温度を低下させる（例えば、もしもプローブと９５％以上の同一性を有する配列が求められるなら、最終洗浄温度を５℃低下させる）。実際に、Ｔｍの変化は１％ミスマッチ当たり、０．５℃と１．５℃の間である。

【０１６６】

例えば、配列番号１に関連して、ポリヌクレオチド位置で示されるように、長さＸ（ヌクレオチド中）の本発明のオリゴヌクレオチドの例は、近接して重複する長さＸのオリゴヌクレオチドのセット（センスおよびアンチセンスセット）に対応するものを含む。ここで、各継続して重複するセット（所与のＸ値に対応する）内のオリゴヌクレオチドはヌクレオチド位置からＺ個のオリゴヌクレオチドの有限セットとして規定される：

ｎ～（ｎ＋（Ｘ－１））；

ここで、ｎ＝１，２，３，．．．（Ｙ－（Ｘ－１））；

Ｙは配列番号１（２１９９０８）の長さ（ヌクレオチドまたは塩基対）に等しい；

Ｘはセット内の各オリゴヌクレオチドの共通長さ（ヌクレオチド）（例えば、継続して重複する２０マーの１セットでは、Ｘ＝２０）；および

長さＹの所与の配列番号において、継続して重複する長さＸのオリゴマーの数（Ｚ）はＹ－（Ｘ－１）に等しい。例えば、配列番号１のセンスまたはアンチセンスセットのいずれにおいても、Ｚ＝２１９９０９－１９＝２１９８９０、ここでＸ＝２０である。

【０１６７】

好ましくは、このセットは少なくとも１つのＣｐＧ、ＴｐＧまたはＣｐＡジヌクレオチドを含むこれらのオリゴマーに限定される。

【０１６８】

本発明の２０マーのオリゴヌクレオチドの例としては、配列番号１においてポリヌクレオチドの位置で示され、２１９８９０オリゴマーの下記セット（およびそれに相補的なアンチセンスセット）が挙げられる；

１－２０、２－２１、３－２２、４－２３、５－２４．．．．．．および２１９８９０－２１９９０９

【０１６９】

好ましくは、このセットは少なくとも１つのＣｐＧ、ＴｐＧまたはＣｐＡジヌクレオチドを含むこれらのオリゴマーに限定される。

【０１７０】

同様に、本発明の２５マーオリゴヌクレオチドの例としては、配列番号１において、ポリヌクレオチドの位置で示される２１９８８５オリゴマーの下記セット（およびこれに相補的なアンチセンスセット）が挙げられる：

１－２５、２－２６、３－２７、４－２８、５－２９．．．．．および２１９８８５－２１９９０９

【０１７１】

好ましくは、このセットは少なくとも１つのＣｐＧ、ＴｐＧまたはＣｐＡジヌクレオチドを含むこれらのオリゴマーに限定される。

【０１７２】

本発明は配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７、配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３（センスおよびアンチセンス）のそれぞれにおいて、長さＸのオリゴヌクレオチドまたは変性オリゴヌクレオチドが近接して重複する複数のセットを包含する。ここで、例えば、Ｘ＝９、１０、１７、２０、２２、２３、２５、２７、３０または３５ヌクレオチドである。

【０１７３】

本発明のオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーは、配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択されるゲノム配列の遺伝的および後成的パラメーターを確かめるために有用な効率的な手段を構成する。長さＸのこのようなオリゴヌクレオチドまたは変性オリゴヌクレオチドの好ましいセットは、配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７、配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３（およびこれらの相補鎖）に対応するオリゴマーに近接して重複するセットである。好ましくは、前記オリゴマーは少なくとも１つのＣｐＧ、ＴｐＧまたはＣｐＡジヌクレオチドを含む。

【０１７４】

本発明の特に好ましいオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーは、ＣｐＧジヌクレオチド（または対応する変換されたＴｐＧまたはＣｐＡジヌクレオチド）配列のシトシンがオリゴヌクレオチドの３分の１の中央範囲内にあるものである。すなわち、オリゴヌクレオチドが、例えば長さ１３塩基である場合、ＣｐＧ、ＴｐＧまたはＣｐＡジヌクレオチドは５'－末端から５番目から９番目内に位置する。

【０１７５】

本発明のオリゴヌクレオチドはまた、オリゴヌクレオチドを化学的に１つまたは複数の分子または共役体に結合して変性し、オリゴヌクレオチドの活性、安定性または検出を高めることができる。このような分子または共役体としては、色原体、蛍光物質、コレステロールなどの脂質、コール酸、チオエーテル、脂肪鎖、リン脂質、ポリアミン、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、パルミチル分子および例えば、米国特許第５，５１４，７５８号、５，５６５，５５２号、５，５６７，８１０号、５，５７４，１４２号、５，５８５，４８１号、５，５８７，３７１号、５，５９７，６９６号および５，９５８，７７３号に記載されるものが挙げられる。プローブもまた、特に好ましい対特性を有するＰＮＡ（ペプチド核酸）の形態で存在してもよい。すなわち、オリゴヌクレオチドはペプチドなどの他の補足基を含み、ハイブリダイゼーション－誘引開裂剤（Krolら、Bio Techniques 6: 958-976, 1988）または挿入剤（Zon Pharm. Res. 5: 539-549, 1988）を含む。この目的には、オリゴヌクレオチドは他の分子、例えば、色原体、蛍光物質、ペプチド、ハイブリダイゼーション－誘引架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション－誘引開裂剤などに

結合していてもよい。

【０１７６】

オリゴヌクレオチドはまた、少なくとも１つの技術的に認識されている変性糖および／または塩基分子を含むか、あるいは変性バックボーンまたは非天然インターヌクレオシド結合を含む。

【０１７７】

本発明の具体的な実施態様のオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーは、通常、配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択されるゲノム配列またはその相補的な配列のＣｐＧジヌクレオチド、または配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３の処理された核酸の配列およびその相補的配列内の対応するＣｐＧ、ＴｐＧまたはＣｐＡジヌクレオチドのそれぞれの分析のための少なくとも１つのオリゴマーを含む「セット」として使用される。しかしながら、経済的または他の要因から、前記配列内のＣｐＧジヌクレオチドの有限の選択を分析することが好ましく、そしてオリゴヌクレオチドのセットの内容はしたがって変化されると予測される。

【０１７８】

したがって、具体的な実施態様では、本発明は処理されたゲノムＤＮＡ（配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３）、またはゲノムＤＮＡ（配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７およびその相補的な配列）のシトシンメチル化状態を検出するのに有用である少なくとも２つ（オリゴヌクレオチドおよび／またはＰＮＡ－オリゴマー）のセットを提供する。これらのプローブは肝臓および／または結腸直腸の細胞増殖性疾患の遺伝的および後生的パラメーターの診断、分類および／または治療を可能とする。オリゴマーのセットはまた、処理されたゲノムＤＮＡ（配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３）、またはゲノムＤＮＡ（配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７およびその相補的な配列）の一塩基多型（ＳＮＰ）を検出するために使用される。

【０１７９】

好ましい実施態様では、オリゴヌクレオチドの少なくとも１つおよび複数、好ましくは全てのセットは固相に結合される。

【０１８０】

別な実施態様では、本発明は配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７、配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３の１つおよびこれらに相補的な配列またはこれらのセグメントのＤＮＡ配列を増幅するための「プライマー」オリゴヌクレオチドとして使用される少なくとも２つのオリゴヌクレオチドセットを提供する。

【０１８１】

オリゴヌクレオチドは「ＤＮＡチップ」の「アレー」（すなわち、固相に結合した異なったオリゴヌクレオチドおよび／またはＰＮＡ－オリゴマーの配列）の全てまたは一部を構成すると予想される。このような異なったオリゴヌクレオチドおよび／またはＰＮＡオリゴマー配列のアレーは、例えば、四角形または六角形の格子形態の固相上に配置されることを特徴とする。固相表面は、シリコーン、ガラス、ポリスチレン、アルミニウム、スチール、鉄、銅、ニッケル、銀または金から構成される。ペレット形態または樹脂マトリックスとしてニトロセルロースならびにナイロンなどのプラスチックも使用される。オリ

ゴマーアレー製造の先行技術の概要は、Nature Geneticsの特集版(Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999およびそこに引用される文献)から集めることができる。蛍光標識プローブはしばしば固定化ＤＮＡアレーのスキャニングに使用される。Ｃｙ３およびＣｙ５染料の特別なプローブの５'－Ｏへの単純な結合は、蛍光標識に特に適している。ハイブリダイズしたプローブの蛍光を検出することは、例えば共焦点顕微鏡でもって実施され得る。Ｃｙ３およびＣｙ５染料は、多くの他のものに加えて商業的に入手可能である。

【０１８２】

オリゴヌクレオチドまたはその特定配列は「仮想アレー」の全てまたは一部を構成するとも予期される。ここで、オリゴヌクレオチドまたはその特定配列は、例えば分析物の複合体混合物を分析するための特殊な標識プローブの多種多様な集団の一部、またはそれと組合せた「指定子(specifiers)」として使用される。このような方法は、例えば米国特許公開公報第２００３／００１３０９１号（米国特許出願番号０９／８９８，７４３、２００３年１月１６日公開）に記載されている。このような方法では、十分な標識が生成され、複合体混合物（すなわち各分析物）の各核酸は特殊な標識に独自に結合され、検出され得る（各標識は直接にカウントされ、混合物中の各分子種のデジタル出力となる）。

【０１８３】

本発明のオリゴマーは、肝臓および／または結腸直腸の細胞増殖性疾患の検出；検出およびサブクラス間の区別；診断；予後；治療；モニタリング；および治療とモニタリングのうちの少なくとも１つに使用される。これは以下のクラスの組織：結腸直腸癌、結腸癌腫、炎症性結腸組織、段階２の１ｃｍ以下の形成異常結腸腺腫、段階３の１ｃｍ以上の形成異常結腸癌腫、正常結腸組織、非結腸健康組織および非結腸癌組織の１つまたは複数の検出または検出と区別のための前記セットを使用して可能となる。

【０１８４】

特に、実施例のオリゴマーのセットが好ましい。

本方法の最も好ましい実施態様では、細胞増殖性疾患、最も好ましくは新生物細胞増殖の存否または良性疾患との区別が決定される。これは、少なくとも１つのＣｐＧ位置を含む少なくとも１つの標的配列のメチル化状態の分析によって達成される。前記配列は配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択される配列およびその相補鎖の少なくとも１６個の近接するヌクレオチドを含むか、あるいはストリンジェントな条件下にハイブリダイズする。本発明はさらに、シトシンメチル化および一塩基多型を分析して被検者の配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７のゲノム配列の遺伝的および／または後生的パラメーターを確認する方法を提供する。前記方法は被検者から得た生物学的試料中の配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７を含む核酸を、少なくとも１つの試薬または一連の試薬と接触させることを含む。ここで前記試薬または一連の試薬とは標的核酸内のメチル化および非メチル化ＣｐＧジヌクレオチド間を区別する。

【０１８５】

好ましい実施態様では、前記方法は以下の工程を含む。第１工程では、分析されるべき組織試料を得る。その起源は、セルライン、組織学的スライド、生検、パラフィン包埋組織、体液、糞便、結腸流出液、尿、血漿、血清、全血、単離された血球、血液から単離された細胞、およびこれらの組合せの全てなどのあらゆる好適な起源である。ＤＮＡの前記起源は糞便または結腸流出液、尿、血漿、血清、全血、単離された血球、血液から単離された細胞からなる群から選択される体液であることが好ましい。

【０１８６】

次いでゲノムＤＮＡは試料から単離する。ゲノムＤＮＡは市販のキットの使用を含む当該技術分野で標準的な手段で単離する。簡単には、目的のＤＮＡが細胞膜で覆われている場合、生物学的試料は酵素的、化学的または機械的手段によって破壊して、溶解しなければならない。ＤＮＡ溶液は次いで、例えばプロテアーゼＫによる消化によってタンパクお

よび他の不純物を取り去る。次いで、ゲノムＤＮＡを溶液から回収する。これは塩析、有機溶媒抽出または固相支持体へのＤＮＡの結合を含む種々の方法の手段で実施する。方法の選択は時間、費用および必要なＤＮＡの性質を含むいくつかの要因に影響されるであろう。

【０１８７】

試料ＤＮＡが膜に包括されていない場合（例えば、血液試料からの循環ＤＮＡ）、ＤＮＡの単離および／または精製のために当該技術分野で標準的な方法が使用される。このような方法としてはタンパク変性試薬、例えばカオトロピック塩、例えばグアニジン塩酸塩または尿素；または界面活性剤、例えばドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、臭化シアンの使用が挙げられる。別な方法としてはエタノール沈殿またはプロパノール沈殿、遠心分離機によるとりわけ真空濃縮が挙げられるが、これらに限定されない。当業者はフィルター装置、例えば限外濾過、シリカ表面または膜、磁性粒子、ポリスチロール粒子、ポリスチロール表面、正電荷表面および正電荷膜、荷電膜、荷電表面、荷電交換膜、荷電交換表面などの装置を利用してもよい。

【０１８８】

一旦、核酸を抽出し、そのゲノム２本鎖ＤＮＡを分析に使用する。

【０１８９】

この方法の第２工程では、ゲノムＤＮＡは５'－位置で非メチル化されているシトシン塩基がウラシル、チミンまたはハイブリダイゼーション挙動においてシトシンと異なる他の塩基に変換するような方法で処理する。これは本明細書中、「前処理」または「処理」として理解されるであろう。

【０１９０】

これは好ましくは、重亜硫酸塩試薬で処理することによって達成される。「重亜硫酸塩試薬」との用語は、メチル化および非メチル化ＣｐＧジヌクレオチド配列の間を区別するために、本明細書に記載されるように有用である重亜硫酸塩、二亜硫酸塩、亜硫酸水素塩およびこれらの組合せを含む試薬をいう。前記処理方法は当該技術分野で公知である（例えば、ＰＣＴ／ＥＰ２００４／０１１７１５、これは全体を参考として挿入する）。重亜硫酸塩処理はｎ－アルキレングリコール、特にジエチレングリコールジメチルエーテル（ＤＭＥ）などの変性溶媒の存在下に、あるいはジオキサンまたはジオキサン誘導体の存在下に行うことが好ましいが、これらに限定されない。好ましい実施態様では、変性溶媒は濃度１％～３５％(v/v)で使用する。重亜硫酸塩反応はクロマン誘導体、例えば６－ヒドロキシ－２，５，７，８－テトラメチルクロマン２－カルボン酸またはトリヒドロキシ安息香酸およびその誘導体、例えば没食子酸（ＰＣＴ／ＥＰ２００４／０１１７１５参照、これは全体を参考として挿入する）などの捕捉剤の存在下に実施することが好ましい。重亜硫酸塩変換は好ましくは反応温度３０℃～７０℃で実施する。その際、温度は反応中、短時間、８５℃以上に増加させる（ＰＣＴ／ＥＰ２００４／１１７１５参照、これは全体を参考として挿入する）。重亜硫酸塩処理ＤＮＡは好ましくは定量前に精製する。これは限外濾過などの当該技術分野で公知である手段で実施する。好ましくはＭｉｃｒｏｃｏｎ（商標）カラム（Millipore （商標)製造）でもって実施するが、これらに限定されない。精製は変更された製造者のプロトコールに従って実施する（ＰＣＴ／ＥＰ２００４／０１１７１５参照、これは全体を参考として挿入する）。

【０１９１】

本方法の第３工程では、処理されたＤＮＡ断片は本発明のプライマーオリゴヌクレオチドのセットおよび増幅酵素を使用して増幅する。いくつかのＤＮＡセグメントの増幅は、１つおよび同じ反応容器中で同時に実施することができる。典型的には、増幅はポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用して実施する。好ましくは、前記増幅産物は長さ１００～２，０００塩基対である。プライマーオリゴヌクレオチドのセットは、その配列がそれぞれ配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３の１つの塩基配列およびそれらに相補的な配

列の少なくとも１６塩基対長セグメントと逆相補的であるか、同一であるか、あるいはストリンジェント、または高度にストリンジェントな条件下にこれらにハイブリダイズする少なくとも２つのオリゴヌクレオチドを含む。

【０１９２】

本方法の別の実施態様では、配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択される少なくとも１つの核酸内の前選択されたＣｐＧ位置のメチル化状態は、メチル化特異性プライマーオリゴヌクレオチドを使用して検出してもよい。この技術（ＭＳＰ）は米国特許第６，２６５，１７１号（Herman）に記載されている。重亜硫酸塩処理ＤＮＡの増幅のためのメチル化状態特異的プライマーの使用は、メチル化および非メチル化核酸の区別を可能とする。ＭＳＰプライマー対は重亜硫酸塩処理ＣｐＧジヌクレオチドにハイブリダイズする少なくとも１つのプライマーを含む。したがって、前記プライマーの配列は少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチドを含む。非メチル化ＤＮＡに特異的なＭＳＰプライマーは、ＣｐＧのＣ位置に「Ｔ」を含む。したがって、好ましくは前記プライマーの塩基配列は、配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３のうちの１つの処理核酸にハイブリダイズする長さ少なくとも９個のヌクレオチドを有する配列およびその相補的配列を含むことを要する。ここで、前記オリゴヌクレオチドの塩基配列は少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチドを含む。本方法のさらに好ましい実施態様は、ブロッカーオリゴヌクレオチド（ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ（商標）分析）の使用を含む。このようなブロッカーオリゴヌクレオチドの使用は、Yuら、Bio Techniques 23: 714-720, 1997に記載されている。ブロッキングプローブオリゴヌクレオチドは、ＰＣＲプライマーと同時に重亜硫酸塩処理核酸にハイブリダイズする。核酸のＰＣＲ増幅はブロッキングプローブの５'位置で終結して、核酸の増幅がブロッキングプローブに相補的な配列が存在するところで抑制される。プローブはメチル化状態に特異的な方法で重亜硫酸塩処理核酸にハイブリダイズするように設計される。例えば、非メチル化核酸の集団内でのメチル化核酸の検出においては、もしもメチル化核酸の増幅抑制が望まれるなら、問題の位置で非メチル化されている核酸の増幅抑制はＣｐＧではなく、「ＣｐＡ」または「ＴｐＡ」を問題の位置に含むブロッキングプローブを使用することによって実施されるであろう。

【０１９３】

ブロッカーオリゴヌクレオチドを使用するＰＣＲ法では、ポリメラーゼ仲介増幅の効果的な破壊は、ブロッカーオリゴヌクレオチドがポリメラーゼによって伸長しないことを必要とする。好ましくは、これは３'－デオキシヌクレオチドか、または「遊離」ヒドロキシル基以外のものが３'位置に誘導されたオリゴヌクレオチドであるブロッカーの使用により達成される。例えば、３'－Ｏ－アセチルオリゴヌクレオチドが好ましいクラスのブロッカー分子の代表である。

【０１９４】

さらに、ブロッカーオリゴヌクレオチドのポリメラーゼ仲介分解は防止されるべきである。好ましくは、このような防止は５'－３'エキソヌクレアーゼ活性を欠くポリメラーゼを使用するか、あるいは例えばブロッカー分子をヌクレアーゼ抵抗性とする、その５'－末端にチオエート架橋を有する変性ブロッカーオリゴヌクレオチドを使用する。具体的な応用はブロッカーのこのような５'変性を必要としない。例えば、もしもブロッカーおよびプライマー結合部位が重複するなら、プライマーの結合を防止して（例えば、過剰なブロッカーを使用して）、ブロッカーオリゴヌクレオチドの分解は実質的に防止されるであろう。これは、ポリメラーゼがプライマーをブロッカーの方へ、およびブロッカー中を（５'－３'方向で）伸長しないからである。すなわち、通常、ハイブリダイズしたブロッカーオリゴヌクレオチドの分解となる方法である。

【０１９５】

本発明の目的では、ここに実行されるように特に好ましいブロッカー／ＰＣＲ実施態様

は、ブロッキングオリゴヌクレオチドとしてペプチド核酸（ＰＮＡ）オリゴマーの使用を含む。このようなＰＮＡブロッカーオリゴヌクレオチドはそれらがポリメラーゼで分解も伸長もしないから理想的に適している。

【０１９６】

したがって、好ましくは前記ブロッキングオリゴヌクレオチドの塩基配列は、配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３の１つの処理された核酸配列およびその相補的な配列にハイブリダイズする長さ少なくとも９個のヌクレオチドを有する配列を含むことを必要とする。その際、前記オリゴヌクレオチドの塩基配列は少なくとも１つのＣｐＧ、ＴｐＧまたはＣｐＡジヌクレオチドを含む。

【０１９７】

増幅手段によって得られた断片は直接または間接に検出可能な標識を保有することができる。蛍光標識、放射性核種または質量分析計で検出され得る典型的な質量を有する検出可能な分子断片形態の標識が好ましい。前記標識が質量標識である場合、標識増幅産物は１つの陽および陰ネット電荷を有して、質量分析計でより良い信頼度が可能となる。この検出は例えばマトリックス支援レーザ脱離イオン化質量分析法（ＭＡＬＤＩ）により、またはエレクトロンスプレーイオン化質量分析法（ＥＳＩ）を使用して実施し、可視化してもよい。

【０１９８】

マトリックス支援レーザ脱離イオン化質量分析法（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ）は生体分子の分析において非常に効率的な開発である（Karas & Hillenkamp, Anal Chem. 60: 2299-301, 1988）。分析物は光吸収性マトリックス中に包埋する。マトリックスは短時間のレーザーパルスによって気化し、分析物分子を断片化されない状態で蒸気相中へ輸送する。分析物はマトリックス分子と衝突してイオン化する。適用される電圧はイオンを電場のない飛行管中へ加速する。それらの質量の相違により、イオンが異なった速度で加速される。より小さなイオンはより大きいものよりも速く検出器に到達する。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ分析は、ペプチドおよびタンパクの分析に十分に適している。核酸分析はいくぶんより困難である（Gut & Beck, Current Innovations and Future Trends, 1: 147-57, 1995）。核酸分析における感度はペプチドの約１００倍も低く、フラグメントの大きさが増加するにつれて、不釣合いにも減少する。さらに、幹に複数のマイナス電荷をもつ核酸では、マトリックスを経由したイオン化過程は、かなり効率が低い。ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ分析では、マトリックスの選択が著しく重要な役割を果たす。ペプチドの脱離では、いくつかの非常に効率的なマトリックスが見出されていて、非常に微細な結晶化を生じる。今やＤＮＡではいくつかの反応性あるマトリックスが存在するが、ペプチドと核酸との間の感度の相違は減少していない。しかしながら、核酸がペプチドにもっと類似するような方法で、ＤＮＡを化学的に変性すると、この感度の相違は減少されうる。例えば、幹の通常のリン酸塩がチオリン酸塩に置換されたホスホロチオエート核酸は、単純なアルキル化化学を使用して、電荷が中性であるＤＮＡに変換され得る（Gut & Beck, Nucleic Acids Res. 23: 1367-73, 1995）。この変性ＤＮＡに電荷タグを結合すると、ペプチドで見出される感度と同じレベルにまでＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ感度を増加させることとなる。電荷タギングのさらなる有利な点は不純物に対する分析の大きな安定性である。これは未変性基質の検出をかなりより困難なものとする。

【０１９９】

本方法の第４工程では、本方法の第３工程中で得られた増幅産物は、処理前のＣｐＧジヌクレオチドのメチル化状態を確認するために分析する。

【０２００】

増幅産物がＭＳＰ増幅によって得られる実施態様では、増幅産物の存否は前記プライマーの塩基配列に基づいてプライマーが包囲するＣｐＧ位置のメチル化指標自体中に存在する。

【０２０１】
標準およびメチル化特異的ＰＣＲの両者で得られた増幅産物は、アレー技術およびプローブに基づく技術ならびに配列決定および鋳型指向性伸長などの技術によって、さらに分析してもよいが、これらに限定されない。
【０２０２】
本方法の１つの実施態様では、第３工程で合成された増幅産物はその後、オリゴヌクレオチドおよび／またはＰＮＡプローブのアレーまたはセットにハイブリダイズする。ここでは、ハイブリダイゼーションは次の方法で行う；ハイブリダイゼーション中に使用したプローブセットは好ましくは、少なくとも２つのオリゴヌクレオチドまたはＰＮＡ－オリゴマーから構成される；増幅産物は先に固相に結合されたオリゴヌクレオチドにハイブリダイズするプローブとして作用する；次いで非ハイブリダイズ断片は除去される；前記オリゴヌクレオチドは本発明の配列表に特定される塩基配列のセグメントと逆相補的であるか、あるいは同一である長さ少なくとも９個のヌクレオチドを有する少なくとも１つの塩基配列を含む；そしてセグメントは少なくとも１つのＣｐＧ、ＴｐＧまたはＣｐＡジヌクレオチドを含む。ハイブリダイズする核酸のハイブリダイズする部分は、通常、長さ少なくとも９、１５、２０、２５、３０または３５個のヌクレオチドである。しかしながら、これより長い分子も進歩性ある有用性を有し、したがって、本発明の範囲内にある。
【０２０３】
好ましい実施態様では、前記ジヌクレオチドはオリゴマーの３分の１の中央範囲内にある。例えば、オリゴマーが１つのＣｐＧジヌクレオチドを含む場合、前記ジヌクレオチドは好ましくは、１３マーの５'－末端から５～９番目のヌクレオチドである。１つのオリゴヌクレオチドは、配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択される配列、および配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３内のその均等な位置の各ＣｐＧジヌクレオチド分析のために存在する。
【０２０４】
前記オリゴヌクレオチドはまた、ペプチド核酸の形態で存在していてもよい。次いで、非ハイブリダイズ増幅産物は除去される。その後、ハイブリダイズした増幅産物は検出される。ここでは、増幅産物に結合した標識はオリゴヌクレオチド配列が位置する固相の各位置で確認することが好ましい。
【０２０５】
本方法のなおも別な実施態様では、ＣｐＧ位置のゲノムメチル化状態は、ＰＣＲ増幅プライマー（ここで、前記プライマーはメチル化特異的または標準のいずれであってもよい）とともに同時に重亜硫酸塩処理ＤＮＡにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ（上記詳述した）で確認してもよい。
【０２０６】
この方法の特に好ましい実施態様は、２重蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブ（ＴａｑＭａｎ（商標）ＰＣＲ、ＡＢＩプリズム７７００配列検出システム、Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, Californiaを使用する）を用いる蛍光系リアルタイム定量ＰＣＲ（Heidら、Genome Res. 6: 986-994 1996;米国特許第６，３３１，３９３号）の使用である。ＴａｑＭａｎ（商標）ＰＣＲ反応は、ＴａｑＭａｎ（商標）プローブと称する非伸張性インターロゲイティングオリゴヌクレオチドを用いる。好ましい実施態様では、これはフォワード増幅プライマーとリバース増幅プライマーの間に位置するＣｐＧリッチ配列にハイブリダイズするように設計されている。さらに、ＴａｑＭａｎ（商標）プローブはＴａｑＭａｎ（商標）オリゴヌクレオチドのヌクレオチドに結合されたリンカー部分（例えば、ホスホロアミダイト）に共有結合された蛍光「レポーター部分」および「クエンチャー部分」を含む。重亜硫酸塩処理に続いて核酸内のメチル化を分析するには、米国特許第６，３３１，３９３号に記載され、ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）分析としても公知であるように、プローブはメチル化特異的であることを要する。本発明で使用するの

に適しているＴａｑＭａｎ（商標）検出法の変形は、２重プローブ技術（Ｌｉｇｈｔｃｙｃｌｅｒ（商標））または蛍光増幅プライマー（Ｓｕｎｒｉｓｅ（商標）技術）の使用を含む。これらの両技術は重亜硫酸塩処理ＤＮＡとの併用、さらにＣｐＧジヌクレオチド内のメチル化分析に適した方法に使用してもよい。

【０２０７】

本方法のさらに好ましい実施態様では、本方法の第４工程はGonzalgo & Jones, Nucleic Acids Res. 25: 2539-2531, 1997に記載されるＭＳ－ＳＮｕＰＥなどの鋳型指向性オリゴヌクレオチド伸長の使用を含む。

【０２０８】

本方法のなおも別な実施態様では、本方法の第４工程は本方法の第３工程で生成した増幅産物の配列決定および続いての配列分析を含む（Sanger F.ら、Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467, 1977）。

【０２０９】

ベストモード

本方法の最も好ましい実施態様では、ゲノム核酸は単離され、上記概要した方法の最初の３工程に従って処理される：すなわち、

ａ）被検者から被検者のゲノムＤＮＡを有する生物学的試料を得る；

ｂ）ゲノムＤＮＡを抽出またはそうでなければ単離する；

ｃ）ｂ）のゲノムＤＮＡまたはその断片を、その５－位置の非メチル化されているシトシン塩基をウラシルまたはハイブリダイゼーション特性においてシトシンと区別して検出できる他の塩基に変換する１つまたは複数の試薬で処理し；そして、ここで、

ｄ）ｃ）の処理に続く増幅は、メチル化特異的方法、すなわちメチル化特異的プライマーまたはブロッキングオリゴヌクレオチドを使用して実施し、そして、ここで、

ｅ）増幅産物の検出は、上記したようにリアルタイム検出プローブによって実施する。

【０２１０】

好ましくは、ｄ）の続いての増幅が上記したように、メチル化特異的プライマーによって実施される場合、前記メチル化特異的プライマーは配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３の１つおよびその相補的配列の処理核酸配列にハイブリダイズする長さ少なくとも９個のヌクレオチドを有する配列を含む。ここで、前記オリゴマーの塩基配列は少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチドを含む。

【０２１１】

本方法の工程ｅ）、すなわち配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７を含む群の少なくとも１つの配列の１つまたは複数のＣｐＧ位置のメチル化状態の指標である特異的増幅産物の検出は、上記したようにリアルタイム検出法によって実施する。

【０２１２】

本発明のさらなる実施態様は、重亜硫酸塩変換の必要がなく、本発明のゲノムＤＮＡ（配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７およびその相補鎖）のメチル化状態の分析法を提供する。標的領域内のメチル化および非メチル化ＣｐＧジヌクレオチドを区別するメチル化感受性制限酵素試薬、またはメチル化感受性制限酵素試薬を含む一連の制限酵素試薬が、メチル化決定、例えばＤＭＨ（これに限定されない）に使用されることが当該技術分野で公知である。

【０２１３】

このようなさらなる実施態様の第１工程では、ゲノムＤＮＡ試料は組織または細胞性起源から単離する。ゲノムＤＮＡは市販キットを使用することを含む当該技術分野の標準的手段で単離してもよい。簡単には、目的のＤＮＡが細胞性膜で被包されている場合、生物学的試料は酵素的、化学的または機械的手段によって破壊および溶解しなければならない。ＤＮＡ溶液は次いで、例えばプロテアーゼＫによる消化によりタンパクおよび他の不純

物を取り去る。ゲノムＤＮＡは次いで、この溶液から回収する。これは塩析、有機溶媒抽出または固相支持体へのＤＮＡの結合を含む種々の方法によって実施してもよい。方法の選択は時間、費用およびＤＮＡの必要量を含むいくつかの要因に影響されるであろう。新生物または潜在的新生物様物質を含む臨床試料タイプの全ては、本発明の方法で使用するのに適して、好ましくはセルライン、組織学的スライド、生検、パラフィン包埋組織、体液、糞便、結腸溶出液、尿、血漿、血清、全血、単離された血球、血液から単離された細胞およびこれらの組合せである。体液はＤＮＡの好ましい起源であり、特に血漿、血清、全血、単離された血球および血液から単離された細胞が特に好ましい。

一旦、核酸が抽出されると、ゲノム２本鎖ＤＮＡが分析に使用される。

【０２１４】

好ましい実施態様では、ＤＮＡはメチル化感受性制限酵素で処理する前に切断してもよい。このような方法は当該技術分野で公知であり、物理的および酵素的手段の両方を含む。メチル化感受性でない１つまたは複数の制限酵素の使用が特に好ましい。その認識部位はＡＴリッチであり、ＣＧジヌクレオチドを含まない。このような酵素の使用は、ＣｐＧアイランドおよび断片化ＤＮＡ中のＣｐＧリッチ領域の保存を可能とする。非メチル化特異的制限酵素は、好ましくはＭｓｅＩ、ＢｆａＩ、Ｃｓｐ６１、Ｔｒｕ１Ｉ、Ｔｖｕ１Ｉ、Ｔｒｕ９Ｉ、Ｔｖｕ９Ｉ、ＭａｅＩおよびＸｓｐＩからなる群から選択される。このような酵素の２つまたは３つの使用が特に好ましい。ＭｓｅＩ、ＢｆａＩおよびＣｓｐＩを組合せて使用することが特に好ましい。

【０２１５】

次いで、断片化ＤＮＡは続いての酵素的増幅を促進するためにアダプターオリゴヌクレオチドと連結してもよい。平滑および粘着末端ＤＮＡ断片にオリゴヌクレオチドを連結することは、当該技術分野で公知であり、末端の脱リン酸化（例えば、子牛またはエビ由来アルカリホスファターゼを使用する）、そしてｄＡＴＰの存在下にリガーゼ酵素（例えば、Ｔ４ＤＮＡリガーゼ）を使用するその後の連結によって実施される。アダプターオリゴヌクレオチドは通常、長さ少なくとも１８塩基対である。

【０２１６】

第３工程では、ＤＮＡ（またはその断片）は次いで１つまたは複数のメチル化感受性制限酵素で消化する。この消化は、制限部位のＤＮＡの加水分解がセプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列の特異的ＣｐＧジヌクレオチドのメチル化状態の指標であるように実施する。

【０２１７】

好ましくは、メチル化特異的制限酵素は、ＢｓｉＥ１、ＨｇａＩ、ＨｉｎＰＩ、Ｈｐｙ９９Ｉ、ＡｖａＩ、ＢｃｅＡＩ、ＢｓａＨＩ、ＢｉｓＩ、ＢｓｔＵＩ、Ｂｓｈｌ２３６Ｉ、ＡｃｃＩＩ、ＢｓｔＦＮＩ、ＭｃｒＢＣ、ＧｌａＩ、ＭｖｎＩ、ＨｐａＩＩ（ＨａｐＩＩ）、ＨｈａＩ、ＡｃｉＩ、ＳｍａＩ、ＨｉｎＰ１Ｉ、ＨｐｙＣＨ４ｌＶ、ＥａｇＩおよび前記酵素の２つまたはそれ以上の混合物からなる群から選択される。制限酵素ＢｓｔＵＩ、ＨｐａＩＩ、ＨｐｙＣＨ４ｌＶおよびＨｉｎＰ１Ｉを含む混合物が好ましい。

【０２１８】

任意であるが、好ましい実施態様である第４工程では、制限断片が増幅される。これは好ましくはポリメラーゼ連鎖反応を使用して実施し、前記増幅産物は上記したように好適な検出可能な標識、すなわち蛍光標識、放射性核種および質量標識を保有する。増幅酵素および少なくとも２つのプライマーによる増幅が特に好ましい。プライマーは各ケースで配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択される配列、およびそれらの相補鎖に相補的であるか、あるいは中程度にストリンジェント、またはストリンジェントな条件下でハイブリダイズする長さ少なくとも１６個のヌクレオチドの近接配列を含む。好ましくは、前記近接配列は長さ少なくとも１６、２０または２５個のヌクレオチドである。別の実施態様では、前記プライマ

ーは断片に連結したいかなるアダプターにも相補的であってもよい。

【０２１９】

第５工程では、増幅産物が検出される。検出法としては当該技術分野で標準的な手段、例えばゲル電気泳動分析、ハイブリダイゼーション分析、ＰＣＲ産物内の検出可能なタグの導入、ＤＮＡアレー分析、ＭＡＬＤＩまたはＥＳＩ分析があるが、これらに限定されない。好ましくは、前記検出は配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択される配列、およびそれらの相補鎖に相補的であるか、あるいは中程度にストリンジェント、またはストリンジェントな条件下でハイブリダイズする長さ少なくとも１６個のヌクレオチドの近接配列を含む少なくとも１つの核酸またはペプチド核酸へのハイブリダイゼーションによって実施される。好ましくは、前記近接配列は長さ少なくとも１６、２０または２５個のヌクレオチドである。

【０２２０】

メチル化状態またはゲノム核酸レベルの決定に続いて、細胞増殖性疾患の存否またはクラスは配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択される少なくとも１つの配列の少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチドのメチル化状態またはレベル、または配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択される少なくとも１つの配列の複数のＣｐＧジヌクレオチドの平均メチル化状態、または平均メチル化状態を反映する値に基づいて演繹される。ここでメチル化は新生物または前新生物の細胞増殖性疾患に関連している。前記メチル化は定量手段で決定される場合、前記メチル化の存在を決定するカットオフポイントは、好ましくはゼロ（すなわち、試料がいかなる程度のメチル化を示しても、分析されるＣｐＧ位置でメチル化状態を有するとして決定される）である。けれども、特に好ましい感度または特異性をもつ分析とするために、当業者は前記カットオフ値を調整することを望むと予想される。したがって、前記カットオフ値は、増加し（したがって、感度が増加する）、前記カットオフ値は０％～５％、５％～１０％、１０％～１５％、１５％～２０％、２０％～３０％および３０％～５０％からなる群から選択される範囲内である。特に好ましくは、カットオフ値は、１０％、１５％、２５％および３０％である。

【０２２１】

遺伝子パネルがセプチン９またはその切断型転写物Ｑ９ＨＣ７４およびＦＯＸＬ２、ＮＧＦＲ、ＴＭＥＦＦ２、ＳＩＸ６、ＶＴＮおよびＺＤＨＨＣ２２からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子を含み、続いてゲノム核酸のメチル化状態を決定する本方法の別な実施態様では、細胞増殖性疾患の存否またはサブクラス、特に肝臓および／または結腸直腸の細胞増殖性疾患は、配列番号１の少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチド配列および配列番号２４～配列番号２９の少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチド配列、またはその複数のＣｐＧジヌクレオチド配列の平均メチル化状態または平均メチル化状態を反映する値のメチル化状態に基づいて推論される。ここで、高メチル化は癌、特に肝臓および／または結腸直腸癌に関連している。

【０２２２】

細胞増殖性疾患の診断および予後分析

本発明はセプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～１６５からなる群から選択された少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列内の重要な遺伝的および／または後成的なパラメーターがマーカーとして用いられ得る、患者または個人に不利益である事象の診断を可能にする。本発明により得られた前記パラメーターは、遺伝的および／または後成的パラメーターのもう１つのセットと比較され得、その相違は患者または個人に不利益である事象の診断および／または予後の基準として働く。

【０２２３】

さらに具体的には、本発明は癌、最も好ましくは肝臓癌および／または結腸直腸癌腫の早期検出のためのリスクを有する集団のスクリーニングを可能にする。さらに本発明は、

良性（すなわち非癌性）の細胞増殖性疾患と新生物（例えば悪性）の区別を可能にする。例えば本発明は小さな結腸腺腫またはポリープからの結腸直腸癌腫の区別を可能にする。新生物細胞増殖性疾患は、セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～１６５からなる群から選択された少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列内のメチル化の減少（すなわち発現低下）を示すが、対照的なことに前記良性疾患は示さない。

【０２２４】

具体的には、本発明は１つもしくは複数のＣｐＧジヌクレオチド配列を含む配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択される少なくとも１つの配列の１つまたは複数のＣｐＧジヌクレオチド配列の特異な発現（好ましくはメチル化）の測定に基づく癌の診断および分類分析を提供する。かかる分析は典型的には、被検者から試料を得ること、好ましくは対照試料または公知の標準と比較して、試料に由来した配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７からなる群から選択される少なくとも１つの配列のメチル化状態を測定することにより、セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～１６５からなる群から選択された少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列の発現を測定する分析を行うこと、およびそれらに基づいて診断を行うことを含む。

【０２２５】

特に好ましい実施態様において、本発明のオリゴマーは配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７、配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３に基づくものなど、またはそれらのアレーならびにそれらに基づくキットにおいて、ＣｐＧジヌクレオチドのメチル化状態を評価するために用いられ、細胞性増殖性疾患の診断および／または分類に有用である。

【０２２６】

キット

さらに、本発明の別の態様はセプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～配列番号１６５からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列のメチル化を決定する手段を含むキットである。メチル化を決定する手段は、好ましくは重亜硫酸塩試薬；配列が各ケースで配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３から選択される９またはより好ましくは１８塩基長のセグメントと同一であるか、相補的であるか、あるいはストリンジェントまたは高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含む１つまたは複数のオリゴヌクレオチド；および所望により、記載されたメチル化分析の方法を実行および評価するための指示書を含む。１つの態様において、前記オリゴヌクレオチドの塩基配列は少なくとも１つのＣｐＧ、ＣｐＡ、またはＴｐＧジヌクレオチドを含む。

【０２２７】

さらなる実施態様において、前記キットはさらにＣｐＧ位置特異的メチル化分析を行うための標準試薬を含み、前記分析は１もしくはそれ以上の下記技術：ＭＳ－ＳＮｕＰＥ，ＭＳＰ，ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標），ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ，ＣＯＢＲＡおよび核酸配列決定を含む。しかしながら、本発明の方針に沿ったキットはまた前記構成要素の一部のみを含むこともできる。

【０２２８】

好ましい実施態様において、キットはＤＮＡ変性緩衝液；スルホン化緩衝液；ＤＮＡ回収試薬またはキット（例えば、沈殿、限外ろ過、アフィニティーカラム）；脱スルホン化緩衝液；およびＤＮＡ回収成分からなる群から選択される追加の重亜硫酸塩変換試薬を含

んでも良い。

【０２２９】

さらなる別の実施態様において、当該キットは別個の容器に収容されて、ポリメラーゼおよびＰＣＲのようなポリメラーゼにより媒介されるプライマー伸張に最適化された反応緩衝液を含む。本発明の別の実施態様において、キットはさらに患者の生物学的試料を得るための手段を含む。好ましくは、患者の生物学的試料においてセプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～１６５からなる群から選択された少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列のメチル化を決定する手段を収容するのに適した容器をさらに含むキットであり、最も好ましくは使用のための指示書およびキット結果の解説書をさらに含む。好ましい実施態様においてキットは：（ａ）重亜硫酸塩試薬；（ｂ）前記重亜硫酸塩試薬および患者の生物学的試料を収容するのに適した容器；（ｃ）配列が各ケースで配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３から選択される配列の９またはより好ましくは１８塩基長のセグメントと同一であるか、相補的であるか、あるいはストリンジェントまたは高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする２つのオリゴヌクレオチドを含む少なくとも１セットのプライマーオリゴヌクレオチド；および所望により（ｄ）使用のための指示書およびキット結果の解説書を含む。別の好ましい実施態様において、キットは（ａ）重亜硫酸塩試薬；（ｂ）前記重亜硫酸塩試薬および患者の生物学的試料を収容するのに適した容器；（ｃ）配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３の１つに記載される前処理済み核酸配列およびそれらに相補的な配列に同一であるか、またはハイブリダイズする長さ少なくとも９個または１６個のヌクレオチドを有する少なくとも１つのオリゴヌクレオチドおよび／またはＰＮＡオリゴマー；および所望により（ｄ）使用のための指示書およびキット結果の解説書を含む。

【０２３０】

別の実施態様において、キットは（ａ）重亜硫酸塩試薬；（ｂ）前記重亜硫酸塩試薬および患者の生物学的試料を収容するのに適した容器；（ｃ）配列が各ケースで配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３から選択される配列の９またはより好ましくは１８塩基長のセグメントと同一であるか、相補的であるか、あるいはストリンジェントまたは高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする２つのオリゴヌクレオチドを含む少なくとも１セットのプライマーオリゴヌクレオチド；（ｄ）配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３の１つに記載される前処理済み核酸配列およびそれらに相補的な配列と同一であるか、またはハイブリダイズする少なくとも９個または１６個のヌクレオチドの長さを有する少なくとも１つのオリゴヌクレオチドおよび／またはＰＮＡオリゴマー；および所望により（ｅ）使用のための指示書およびキット結果の解説書を含む。

【０２３１】

当該キットはまた、ブロッキング、洗浄、またはコーティングに適した緩衝液または溶液などの他の成分を別個の容器に封入されて含んでいてもよい。

【０２３２】

ＣＯＢＲＡ（商標）分析のための典型的な試薬（例えば、典型的なＣＯＢＲＡ（商標）ベースのキットにおいて見られるもの）は、セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～１６５からなる群から選択された少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列のための

ＰＣＲプライマー；制限酵素および適切な緩衝液；遺伝子ハイブリダイゼーションオリゴ；対照ハイブリダイゼーションオリゴ；オリゴプローブのためのキナーゼ標識化キット；および標識化ヌクレオチド：を含んでいてもよいが、これらに限定されるものではない。ＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）分析のための典型的な試薬（例えば、典型的なＭｅｔｈｙＬｉｇｈｔ（商標）ベースのキットにおいて見られるもの）は、セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～１６５からなる群から選択された少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列の重亜硫酸塩変換された配列のためのＰＣＲプライマー；重亜硫酸塩特異的プローブ（例えばＴａｑＭａｎ（商標）またはＬｉｇｈｔｃｙｃｌｅｒ（商標））；最適化されたＰＣＲ緩衝液およびデオキシヌクレオチド；およびＴａｑポリメラーゼを含んでいてもよいが、これらに限定されるものではない。

【０２３３】

Ｍｓ－ＳＮｕＰＥ（商標）分析のための典型的な試薬（例えば、典型的なＭｓ－ＳＮｕＰＥ（商標）ベースのキットにおいて見られるもの）は、特定の遺伝子（または重亜硫酸塩処理されたＤＮＡ配列もしくはＣｐＧアイランド）のためのＰＣＲプライマー；最適化されたＰＣＲ緩衝液およびデオキシヌクレオチド；ゲル抽出キット；陽性対照プライマー；セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～１６５からなる群から選択された少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列の重亜硫酸塩変換された配列のためのＭｓ－ＳＮｕＰＥ（商標）プライマー；（Ｍｓ－ＳＮｕＰＥ反応のための）反応緩衝液；および標識化されたヌクレオチド；を含んでいてもよいが、これらに限定されるものではない。

【０２３４】

ＭＳＰ分析のための典型的な試薬（例えば、典型的なＭＳＰベースのキットにおいて見られるもの）は、セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～１６５からなる群から選択されたゲノム配列の重亜硫酸塩変換された配列のためのメチル化および非メチル化ＰＣＲプライマー；最適化されたＰＣＲ緩衝液およびデオキシヌクレオチド、および特異的プローブ；を含んでいてもよいが、これらに限定されるものではない。

【０２３５】

さらに、本発明の追加の態様は、セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～１６５からなる群から選択された少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列のメチル化を決定する手段を含む別のキットであり、前記手段は好ましくは少なくとも１つのメチル化特異的制限酵素；配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７から選択される配列の少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチドを含む配列の増幅に適した１つまたは複数のプライマーオリゴヌクレオチド（好ましくは１つもしくは複数のプライマーペア）；および所望により、記載されたメチル化分析の方法を実行および評価するための指示書を含む。１つの実施態様において、前記オリゴヌクレオチドの塩基配列は配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７から選択される配列の少なくとも１８塩基長のセグメントと同一であるか、相補的であるか、あるいはストリンジェントまたは高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするものである。

【０２３６】

さらなる実施態様において前記キットは消化断片の分析のための１つもしくは複数のオリゴヌクレオチドプローブを含んでも良く、好ましくは前記オリゴヌクレオチドが配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７から選択される配列の少なくとも１６塩基長のセグメントと同一であるか、相補的であるか、あるいはストリンジェントまたは高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする。

【０２３７】

好ましい実施態様において、キットは緩衝液（例えば、制限酵素、ＰＣＲ、貯蔵または洗浄用緩衝液）；ＤＮＡ回収試薬もしくはキット（例えば、沈殿、限外ろ過、アフィニティーカラム）およびＤＮＡ回収成分からなる群から選択される追加の試薬を含んでいてもよい。

【０２３８】

さらなる別の実施態様において、キットは別個の容器に封入されて、ポリメラーゼおよびＰＣＲのようなポリメラーゼにより媒介されるプライマー伸張のために最適化された反応緩衝液を含んでいてもよい。本発明の別の実施態様において、キットはさらに患者の生物学的試料を得る手段を含む。好ましい実施態様において、キットは（ａ）メチル化感受性制限酵素試薬；（ｂ）前記試薬および患者の生物学的試料を収容するのに適した容器；（ｃ）配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７から選択される配列の少なくとも９塩基長のセグメントと同一であるか、相補的であるか、あるいはストリンジェントまたは高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする１つもしくは複数の核酸もしくはペプチド核酸の少なくとも１セットのオリゴヌクレオチド；および所望により（ｄ）使用のための指示書およびキット結果の解説書を含む。

【０２３９】

別の好ましい実施態様において、キットは（ａ）メチル化感受性制限酵素試薬；（ｂ）前記試薬および患者の生物学的試料を収容するのに適した容器；（ｃ）配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７から選択される配列の少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチドを含む配列の増幅に適した少なくとも１セットのプライマーオリゴヌクレオチド；および所望により（ｄ）使用のための指示書およびキット結果の解説書を含む。

【０２４０】

別の好ましい実施態様において、キットは（ａ）メチル化感受性制限酵素試薬；（ｂ）前記試薬および患者の生物学的試料を収容するのに適した容器；（ｃ）配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７から選択される配列の少なくとも１つのＣｐＧジヌクレオチドを含む配列の増幅に適した少なくとも１セットのプライマーオリゴヌクレオチド；（ｄ）配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７から選択される配列の少なくとも９塩基長のセグメントと同一であるか、相補的であるか、あるいはストリンジェントまたは高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする１つもしくは複数の核酸もしくはペプチド核酸の少なくとも１セットのオリゴヌクレオチド；および所望により（ｅ）使用のための指示書およびキット結果の解説書を含む。

【０２４１】

当該キットはまた、ブロッキング、洗浄、またはコーティングに適した緩衝液または溶液などの他の成分を、別個の容器に封入して含んでいてもよい。

【０２４２】

本発明はさらにメチル化感受性制限酵素分析による被検者における細胞増殖性疾患の有無の診断の提供に使用するためのキットに関する。前記キットは容器およびＤＮＡマイクロアレー構成要素を含む。前記ＤＮＡマイクロアレー構成要素は、指定された位置に複数のオリゴヌクレオチドが固定化された表面であり、オリゴヌクレオチドは少なくとも１つのＣｐＧメチル化部位を含む。前記オリゴヌクレオチドの少なくとも１つは、セプチン９（その転写変異体全てを含む）、ＦＯＸＬ２、ＳＡＲＭ１、ＶＴＮ、ＰＲＤＭ６、ＮＲ２Ｅ１、ＦＡＴおよび配列番号１６０～１６５からなる群から選択された少なくとも１つの遺伝子またはゲノム配列に特異的であり、配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７の１つに記載される配列の少なくとも長さが１５塩基対であるが２００塩基対未満である配列を含む。好ましくは、前記配列は配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７の１つに記載される配列の長さが少なくとも１５塩基対であるが８０塩基対未満のものである

。さらに好ましくは、前記配列は配列番号１～配列番号３、配列番号２４、配列番号２８、配列番号１５９～配列番号１６７の１つに記載される配列の長さが少なくとも２０塩基対であるが３０塩基対未満のものである。

【０２４３】

前記試験キットは好ましくは、１つもしくは複数のメチル化感受性制限酵素を含む制限酵素成分をさらに含む。

【０２４４】

さらなる実施態様において、前記試験キットは少なくとも１つのメチル化特異的制限酵素を含むことをさらに特徴とし、オリゴヌクレオチドは前記少なくとも１つのメチル化特異的制限酵素の制限部位を含む。

【０２４５】

キットはさらに、ＤＮＡ濃縮の技術において公知である以下の成分：タンパク質成分、前記タンパク質はメチル化ＤＮＡに選択的に結合する；三重らせん形成核酸成分、１つもしくは複数のリンカー、所望により好適な溶液中に存在する；例えばリガーゼ、緩衝液などのライゲーションを行う物質もしくは溶液；カラムクロマトグラフィーを行う物質もしくは溶液；免疫学ベースの濃縮（例えば免疫沈降）を行う物質もしくは溶液；例えばＰＣＲのような核酸増幅を行う物質もしくは溶液；一種類の色素もしくは複数種の色素、適用可能であればカップリング試薬とともに、適用可能であれば溶液中に存在する；ハイブリダイゼーションを行う物質または溶液；および／または洗浄工程を行う物質または溶液の１つもしくは複数を含む。

【０２４６】

記載された本発明はさらに、結腸細胞増殖性疾患の検出、分類、および当該疾患間の区別に有用な問題の組成物を提供する。前記組成物は、配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３に開示された核酸配列の長さが１８塩基対のセグメントの少なくとも１つの核酸、および以下の群から選択される１つもしくはそれ以上の物質を含む：１～５ｍＭ塩化マグネシウム、１００～５００μＭ　ｄＮＴＰ、０．５～５単位のｔａｑポリメラーゼ、牛血清アルブミン、オリゴマー、特にオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸（ＰＮＡ）オリゴマー、前記オリゴマーは各ケースで配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３の１つに記載される前処理されたゲノムＤＮＡに相補的であるか、あるいはストリンジェントまたは高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする少なくとも９ヌクレオチドの長さを有する少なくとも１つの塩基配列ならびにそれらに相補的な配列を含む。前記問題の組成物は水溶液中での前記核酸の安定化に適しており、前記溶液内でのポリメラーゼに基づく反応を可能にする緩衝溶液を含むことが好ましい。好適な緩衝液は当該技術で公知であり市販されている。

【０２４７】

本発明のさらに好ましい実施態様において、前記少なくとも１つの核酸は配列番号１０～配列番号１５、配列番号２８～配列番号３３、配列番号３０～配列番号３１、配列番号４２～配列番号４３、配列番号３８～配列番号３９、配列番号５０～配列番号５１、配列番号１６８～配列番号２０３に開示の核酸配列の長さが少なくとも５０，１００，１５０，２００，２５０，または５００塩基対のセグメントである。

【０２４８】

本発明は特定の好ましい実施態様に従って具体的に記載されているが、以下の実施例は本発明を説明するためにだけ作用し、原理および最も広い解釈およびそれらに等価な構成の範囲内に本発明を限定することを意図するものではない。

【実施例１】

【０２４９】

以下の実施例において、下記に列挙された配列がＭＳＰおよび／またはＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ分析により分析された。分析はＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒプラットフォーム（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）で作動するよう設計されるが、当該技術分野で通常使用されるこれ以外の器具もまた好適である。

ＭＳＰ増幅産物はＴａｑｍａｎ式の蛍光標識化検出プローブにより検出され、ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ増幅産物はＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ式二重プローブにより検出される。

【０２５０】

目的のゲノム領域：
配列番号１６５
分析型：ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ
プライマー：
配列番号２４９
配列番号２５０
ブロッカー：
配列番号２５１
プローブ：
配列番号２５２
配列番号２５３

温度サイクリングプログラム：
活性化：９５℃　１０分
５５サイクル：９５℃　１０秒（２０℃／ｓ）
　　５６℃　３０秒（２０℃／ｓ）
　　７２℃　１０秒（２０℃／ｓ）
融解
　　９５℃　１０秒　２０
　　３５℃　２０秒　２０　検出
　　９５℃　　０秒　０，１

【０２５１】

目的のゲノム領域：
配列番号２４
分析型：ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ
プライマー：
配列番号２５４
配列番号２５５
ブロッカー：
配列番号２５６
プローブ：
配列番号２５７（蛍光標識されている）
配列番号２５８（Ｒｅｄ６４０標識されている）

温度サイクリングプログラム：
９５℃での変性
９５℃　１０分
５５サイクル：
９５℃での変性　　１０秒（２０℃／ｓ）
アニーリング５６℃　３０秒（２０℃／ｓ）
伸張　　７２℃　１０秒（２０℃／ｓ）
融解
　　９５℃　１０秒　２０

３５℃　２０秒　２０
９５℃　　０秒　０，１
【０２５２】
目的のゲノム領域：
配列番号２４
分析型：ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ
プライマー：
配列番号２６４
配列番号２６５
ブロッカー：
配列番号２６６
プローブ：
配列番号２６７（蛍光標識されている）
配列番号２６８（Ｒｅｄ６４０標識されている）

温度サイクリングプログラム：
９５℃での変性
９５℃　１０分
５５サイクル：
９５℃での変性　　１０秒（２０℃／ｓ）
アニーリング５６℃　３０秒（２０℃／ｓ）
伸張　　７２℃　１０秒（２０℃／ｓ）
融解
９５℃　１０秒　２０
３５℃　２０秒　２０
９５℃　　０秒　０，１
【０２５３】
目的のゲノム領域：
配列番号２８
分析型：ＭＳＰ
プライマー：
配列番号２７４
配列番号２７５
Ｔａｑｍａｎプローブ：
配列番号：　２７６

温度サイクリングプログラム：
活性化：９５℃　１０分
５５サイクル：９５℃　１５秒（２０℃／ｓ）
６２℃　４５秒（２０℃／ｓ）
冷却：　　４０℃　５秒
【０２５４】
目的のゲノム領域：
配列番号１
分析型：ＭＳＰ
プライマー：
配列番号２７７
配列番号２７８
Ｔａｑｍａｎプローブ：
配列番号２７９

温度サイクリングプログラム：
活性化：９５℃　１０分
５５サイクル：９５℃　１５秒（２０℃／ｓ）
　　６２℃　４５秒（２０℃／ｓ）
冷却：　　４０℃　５秒
【０２５５】
目的のゲノム領域：
配列番号２８
分析型：ＭＳＰ
プライマー：
配列番号２８０
配列番号２８１
Ｔａｑｍａｎプローブ：
配列番号２８２

温度サイクリングプログラム：
活性化：９５℃　１０分
５５サイクル：９５℃　１５秒（２０℃／ｓ）
　　６２℃　４５秒（２０℃／ｓ）
【０２５６】
目的のゲノム領域：
配列番号１
分析型：ＭＳＰ
プライマー：
配列番号２８３
配列番号２８４
Ｔａｑｍａｎプローブ：
配列番号２８５

温度サイクリングプロファイル：
活性化：９５℃　１０分
５５サイクル：９５℃　１５秒（２０℃／ｓ）
　　６２℃　４５秒（２０℃／ｓ）
【０２５７】
目的のゲノム領域：
配列番号２８
分析型：ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ
プライマー：
配列番号２８６
配列番号２８７
ブロッカー：
配列番号２８８
プローブ：
配列番号２８９
配列番号２９０

温度サイクリングプロファイル：
９５℃での活性化：
９５℃　１０分

５０サイクル：
９５℃での変性　　１０秒（２０℃／ｓ）
アニーリング５６℃　３０秒（２０℃／ｓ）
伸張　　７２℃　１０秒（２０℃／ｓ）
融解
　　９５℃　１０秒　２０
　　４０℃　１０秒　２０
　　７０℃　　０秒　０，１
冷却
　　４０℃　５秒

【０２５８】
目的のゲノム領域：
配列番号１
分析型：ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ
プライマー：
配列番号２９１
配列番号２９２
ブロッカー：
配列番号２９３
プローブ：
配列番号２９４
配列番号２９５

温度サイクリングプロファイル：
９５℃での活性化：
９５℃　１０分
５０サイクル：
９５℃での変性　　１０秒（２０℃／ｓ）
アニーリング５６℃　３０秒（２０℃／ｓ）
伸張７２℃　　１０秒（２０℃／ｓ）
融解
９５℃　１０秒　２０
４０℃　１０秒　２０
７０℃　　０秒　０，１
冷却
４０℃　５秒

【０２５９】
目的のゲノム領域
配列番号１
分析型：ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ
プライマー：
配列番号２９６
配列番号２９７
ブロッカー：
配列番号２８９
プローブ：
配列番号２９９
配列番号３００

温度サイクリングプロファイル：

９５℃での活性化：
９５℃　１０分
５０サイクル：
９５℃での変性　　１０秒（２０℃／ｓ）
アニーリング５６℃　３０秒（２０℃／ｓ）
伸張７２℃　　１０秒（２０℃／ｓ）
融解
９５℃　１０秒　２０
４０℃　１０秒　２０
７０℃　　０秒　０，１
冷却
４０℃　５秒
【０２６０】
目的のゲノム領域：
配列番号１６６
分析型：ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ
プライマー：
配列番号２５９
配列番号２６０
ブロッカー：
配列番号２６１
プローブ：
配列番号２６２
配列番号２６３

温度サイクリングプロファイル：
活性化：９５℃　１０分
５５サイクル：９５℃　１０秒
　　５８℃　３０秒
　　７２℃　１０秒
融解曲線：　９５℃　１０秒
　　３５℃　２０秒
　　９５℃　　０秒
冷却：　　４０℃　　５秒
【０２６１】
目的のゲノム領域：
配列番号１６７
分析型：ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ
プライマー：
配列番号２６９
配列番号２７０
ブロッカー：
配列番号２７１
プローブ：
配列番号２７２
配列番号２７３

温度サイクリングプロファイル：
９５℃での変性：
９５℃　１０分

５５サイクル：
９５℃での変性　　１０秒
アニーリング５６℃　３０秒
伸張７２℃　　１０秒
融解：
９５℃　１０秒
４０℃　１０秒
【実施例２】
【０２６２】
以下の分析は、全血中のＤＮＡメチル化分析に基づく結腸直腸癌腫のスクリーニングおよび／または診断に適した好ましいパネルを選択するために実施された。
各マーカーの性能は分析プラットフォーム（Ｌｉｇｈｔｃｙｃｌｅｒ）とリアルタイム分析（ＭＳＰおよび／またはＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ）を用いて分析された。これらは文献や臨床検査室の設定において用いるのに好適であるからである。各マーカーの性能は各マーカーの正確さの指標を提供するために結腸直腸癌腫組織と全血において独立に試験された。
【０２６３】
パネルは以下のマーカーの群から選択された：
配列番号３７６
配列番号３７８
配列番号２７
配列番号２６
配列番号２４
配列番号１
配列番号１６５
配列番号２５
配列番号２８
配列番号３７８
配列番号１６３
【０２６４】
各マーカーは表４に示されるように、少なくとも１つのメチル化特異的分析、すなわちＭＳＰおよび／またはＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌにより分析された。
【０２６５】
さらなる分析（メチル化特異的ではない）、本明細書にて以下Ｃ３分析と称するものが各試料中の全量ＤＮＡを定量するために行われた。Ｃ３分析はメチル化状態に関係なく全ＤＮＡを検出する重亜硫酸塩ＤＮＡ分析である。以下のプライマーおよびプローブが用いられた。
プライマー：ＧＧＡＧＴＧＧＡＧＧＡＡＡＴＴＧＡＧＡＴ　配列番号６２
プライマー：ＣＣＡＣＡＣＡＡＣＡＡＡＴＡＣＴＣＡＡＡＡＣ　配列番号６３
プローブ：ＴＧＧＧＴＧＴＴＴＧＴＡＡＴＴＴＴＴＧＴＴＴＴＧＴＧＴＴＡＧＧＴＴ　配列番号　６４
【０２６６】
各分析は表５に示すように、結腸直腸癌腫、正常隣接組織および／または全血試料において２回繰り返して実施された。
【０２６７】
ＤＮＡ抽出は市販のキットを用いて行われ、そして重亜硫酸塩変換は0lekら（1996）に記載される方法に従って微細に変更して実施された。
【０２６８】
全ての分析（Ｃ３およびメチル化特異的）はＬｉｇｈｔｃｙｃｌｅｒプラットフォームを用いて行われた。

【０２６９】
データ解釈
ＤＮＡ濃度の算出
Ｌｉｇｈｔｃｙｃｌｅｒ機器ソフトウェアにより計算されたＣｐ（交差点値）および強度曲線はＤＮＡ濃度を測定するために使用された。ＤＮＡ濃度はメチル化分析とＣ３分析の両方の標準曲線に対して各ウェルのＣＰ値を参照することにより算出された。
【０２７０】
試料の反復実験
多くの場合、各分析は１試料につき２回行われ、１試料につき複数の測定結果を得た。各試料についてスコアは以下のように算出される：
１．全ての試料ペアについて比ｖ１／ｖ２を算出する。
２．もし両方が０．１ｎｇの閾値以下であれば、比は＝に設定され、もし一方が＝で他方が閾値以上であれば、比は１００に設定される。
３．各分析について比が２．５を超える試料はさらに分析されない。
４．厳密に２回の反復実験値がない試料については、スコアを得ることなしに平均を得る。
【０２７１】
メチル化百分率
Ｃ３分析を用いて１ｎｇＤＮＡ未満と測定された試料は全て、さらなる検討はなされなかった。各試料について、検出されたメチル化百分率はメチル化分析を用いてＤＮＡ定量された測定濃度をＣ３分析により定量された試料中におけるＤＮＡ濃度で割って算出された。
【０２７２】
メチル化の検出は３つの異なる閾値レベルで（表を参照）、ならびに全てのメチル化レベルで（すなわち、メチル化が検出された試料は全て陽性とみなされた）決定された。
【０２７３】
各分析の感受性は結腸直腸癌腫試料の陽性検出率から決定され、当該感受性はメチル化が陽性と検出された試料の％として測定された（すなわち真陽性）。
各分析の特異性は全血試料の陰性検出率（すなわち真陰性検出率）から決定され、擬陽性は分析された試料の全数より削減された。
【０２７４】
結果
個々の分析によりメチル化が様々な閾値内と測定された分析済み試料の割合を表６（結腸直腸癌腫組織）、表７（正常隣接組織）、および表８（全血）に示す。
【０２７５】
図３０～３７は２次元分布プロット（図の上部左側）を示し、メチル化レベルが特定のカットオフ点（Ｘ軸）以上と測定された試料の結腸直腸癌腫組織および全血（および正常隣接組織の場合もある）の割合（Ｙ軸）の関連複数分類分布プロット（図の下部左側）を示す。各図の右側は特異性に対する感受性のＲＯＣプロットである。ＲＯＣ曲線は診断試験の種々の可能性のあるカット点についての擬陽性率に対する真陽性率のプロットである。選択されたカット点に応じた、感受性と特異性の間のトレードオフを示す（感受性の増加は特異性の減少を伴う）。ＲＯＣ曲線の下部の領域（ＡＵＣ）は診断試験の正確さのものさしである（領域は広いほどよく、最適値は１、無作為試験は０．５の領域を有する斜線に存在するＲＯＣ曲線を有する；参照：J. P. Egan. Signal Detection Theory and ROC Analysis, Academic Press, New York, 1975）。各ＲＯＣプロットのＡＵＣとウィルコクスンｐ値は、表１４に示されている。
【０２７６】
段階
癌腫の段階に応じた結腸直腸癌腫の結果の更なる分析が表９に示されている。前記表において、２種の異なるメチル化閾値（＞１０％および＞２０％）に基づくマーカーの感受

性がＣＲＣの全段階について見られた。大部分のマーカーについて感受性が全てのＣＲＣ段階にまたがって一様であり、したがって、これらのマーカーはスクリーニングまたはモニタリング試験においてＣＲＣの全段階の検出に適している。段階IIの癌において感受性が高い傾向が見られる。感受性が低く特異性が高いマーカーは、より早い段階の癌を識別する傾向があり（例えば配列番号２５（分析３））、およびスクリーニング／モニタリング試験の感受性を増大させ得るが他の応用（生検、検便など）にも有用であろう。

【０２７７】

パネル

結腸直腸癌腫と全血における分析を組合せて種々の閾値内に測定されたメチル化をもつ分析された試料の割合は表１０～１３に示されている。各々の場合、表は所定の閾値内での試料の割合、およびさらには最初のマーカーのみとは対照的に両方のマーカーを用いて検出された試料における獲得（gain）を示す。

【実施例３】

【０２７８】

以下の分析は大量の試料セットにおける分析の実績を評価することにより、全血中のＤＮＡメチル化分析に基づく結腸直腸癌腫のスクリーニングおよび／または診断についての好適なマーカーとしての、遺伝子セプチン９（その転写変異体Ｑ９ＨＣ７４を含む）およびそれらのパネルを確認するために行われた。

【０２７９】

マーカーの実績は、分析プラットフォーム（Ｌｉｇｈｔｃｙｃｌｅｒ）とリアルタイム分析（ＭＳＰおよび／またはＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ）を用いて分析された。これらは文献もしくは臨床検査室設定において用いられるのに好適であるからである。各マーカーの実績はマーカーの正確さの指標を提供するために、結腸直腸組織（正常隣接組織）、結腸直腸癌腫組織および全血において独立に試験された。

【０２８０】

以下のプライマーおよびプローブが用いられた：

表４に記載されるＬｉｇｈｔｃｙｃｌｅｒプローブを用いた配列番号１（分析７）が、以下のプロコトルを用いて行われた：

水　最終容量１０μｌまで満たす
$MgCl_2$　３，５
プライマー　フォワード　０，３
プライマー　リバース　０，３
ブロッカー　４
検出プローブ（蛍光）　０，１５
検出プローブ（赤）　０，１５
１ａ＋１ｂ試薬ＦａｓｔＳｔａｒｔ混合物　１
ＤＮＡ

ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒプログラム：
活性化：　９５℃　１０分
５５サイクル：　９５℃　１０秒（２０℃／ｓ）
　　５６℃　３０秒（２０℃／ｓ）検出
　　７２℃　１０秒（２０℃／ｓ）
融解曲線：９５℃　１０秒　２０
　　４０℃　１０秒　２０
　　７０℃　０秒　０，１
冷却：　４０℃　５秒

【０２８１】

表４によるＴａｑｍａｎプローブを用いた配列番号１（分析７）は、以下のプロトコールを用いて行われた：

プロトコール：
水　最終容量１０μｌまで満たす
$MgCl_2$　　３，５
プライマー１　０，３
プライマー２　０，３
ブロッカー　　４
Ｔａｑｍａｎプローブ　０，１５
１ａ＋１ｂ試薬（ＦａｓｔＳｔａｒｔ）　１
ＤＮＡ　１０μｌ

サイクリング条件：
活性化：　９５℃　１０分
５０サイクル：　９５℃　１０秒（２０℃／ｓ）
　　５６℃　３０秒（２０℃／ｓ）検出
　　７２℃　１０秒　（２０℃／ｓ）
融解曲線：　９５℃　１０秒　２０
　　４０℃　１０秒　２０
　　７０℃　０秒　０，１
冷却：　　４０℃　５秒

【０２８２】
　Ｃ３分析が各試料においてＤＮＡの全量を定量するために行われた。Ｃ３分析は、実施例２にて上述のように行われた。

【０２８３】
　各分析は、結腸直腸癌腫、正常隣接組織および／または全血試料において２回繰り返して行われた。２セットの試料が分析された。試料セット１が表１５に示され、試料セット２が表１６に示されている。

【０２８４】
　試料セット１は表４に詳述された以下の分析を用いて分析された：
配列番号１（分析２）
配列番号２６（分析６）
配列番号２４（分析５）
配列番号２５（分析３）

【０２８５】
　試料セット２は表４に詳述された以下の分析を用いて分析された：配列番号１（分析７）ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（ＬＣ）およびＴａｑｍａｎ（Ｔａｑ）変異体の両方、および以下の分析
配列番号２８（分析２）
配列番号２４（分析５ｂ）
配列番号２９（分析２ｂ）
表１９に詳述したとおり

【０２８６】
　ＤＮＡを４ｎｇより多く有する試料のみが分析された。試料セット１において２７血液試料と９１結腸直腸癌腫試料が分析された。試料セット２において２６血液試料と２２非隣接結腸直腸組織試料と８１結腸直腸癌腫試料が分析された。

【０２８７】
　全ての分析（Ｃ３およびメチル化特異的）がＬｉｇｈｔｃｙｃｌｅｒプラットフォームを用いて行われた。

【０２８８】
ＤＮＡ抽出および重亜硫酸塩処理
　ＤＮＡは製造者の指示書にしたがって、ＭａｇｎａＰｕｒｅ法（Ｒｏｃｈｅ）により全

試料から単離された。精製物から生じる抽出物はその後、以下の重亜硫酸塩反応により変換された。抽出物は３５４μｌの重亜硫酸塩溶液（５．８９ｍｏｌ／ｌ）およびラジカルスカベンジャーを含む１４６μｌのジオキサン（２．５ｍｌのジオキサン中の６－ヒドロキシ－２，５，７，８－テトラメチルクロマン２－カルボン酸、９８．６ｍｇ）と混合された。反応混合物は９９℃で３分間変性され、引き続いて全７時間分５０℃で以下の温度プログラムにてインキュベートされた；１つのサーモスパイク（９９．９℃）３分間；１．５時間５０℃；１つのサーモスパイク（９９℃）３分間；３時間５０℃。反応混合物は引き続いてＭｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｍｉｃｒｏｃｏｎ（商標）カラムを用いて限外ろ過により精製された。精製物は本質的には製造者の指示書により実施された。この目的のために反応混合物は３００μｌの水と混合され、限外ろ過膜に負荷され、１５分間遠心分離され、続いて１×ＴＥ緩衝液により洗浄された。ＤＮＡはこの処理で膜状に残る。その後、脱スルホンが行われる。この目的のために０．２ｍｏｌ／ｌＮａＯＨが添加され、１０分間インキュベートされた。遠心分離（１０分間）がその後、実施され、１×ＴＥ緩衝液による洗浄工程が続いた。この後、ＤＮＡが抽出された。この目的のために膜は７５μｌの温１×ＴＥ緩衝液（５０℃）と１０分間混合された。膜は製造者の指示書に従って反転された。続いて遠心分離が繰り返して行われ、それによりＤＮＡは膜から除去された。１０μｌの抽出物はＬｉｇｈｔｃｙｃｌｅｒＲｅａｌＴｉｍｅＰＣＲ分析に用いられた。

【０２８９】

反応溶液および温度サイクリング条件

配列番号２６　分析６（ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ分析）

反応溶液：

水	
$MgCl_2$	３，５０ｍＭ（１ｍＭの緩衝液を含む）
プライマー混合物	０，３０μＭ（各々）
ブロッカー	４，００μＭ
検出プローブ混合物	０，１５μＭ（各々）
１ａ＋１ｂ試薬ＦａｓｔＳｔａｒｔ混合物	１，００×

温度サイクリング条件：

活性化：	９５℃	１０分
５５サイクル：	９５℃	１０秒（２０℃／ｓ）
	５６℃	３０秒（２０℃／ｓ）検出
	７２℃	１０秒（２０℃／ｓ）
融解曲線：	９５℃	１０秒　２０
	４０℃	１０秒　２０
	７０℃	０秒　０，１
冷却：	４０℃	５秒

【０２９０】

配列番号２５　分析３（ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ分析）

反応溶液：

水	
$MgCl_2$	３，５０ｍＭ（１ｍＭの緩衝液を含む）
プライマー混合物	０，３０μＭ（各々）
ブロッカー	４，００μＭ
検出プローブ混合物	０，１５μＭ（各々）
１ａ＋１ｂ試薬ＦａｓｔＳｔａｒｔ混合物	１，００×

温度サイクリング条件：

活性化：	９５℃	１０分
５５サイクル：	９５℃	１０秒（２０℃／ｓ）

５６℃　３０秒（２０℃／ｓ）検出
７２℃　１０秒（２０℃／ｓ）
融解曲線：　９５℃　１０秒　２０
４０℃　１０秒　２０
７０℃　０秒　０，１
冷却：　４０℃　５秒

【０２９１】
配列番号２４　分析５Ｂ（ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ分析）
反応溶液：
水
$MgCl_2$　３，００ＭＭ＊
プライマー　フォワード　０，３０μＭ
プライマー　リバース　０，３０μＭ
ブロッカー　４，００μＭ
検出プローブ蛍光　０，１５μＭ
検出プローブ赤　０，１５μＭ
１ａ＋１ｂ試薬混合物　１，００×

温度サイクリング条件：
９５℃での変性　９５℃　１０分
５５サイクル：
９５℃での変性　１０秒（２０℃／ｓ）
アニーリング５８℃　３０秒（２０℃／ｓ）検出
伸張７２℃　１０秒（２０℃／ｓ）
融解
９５℃　１０秒　２０
３５℃　２０秒　２０
９５℃　０秒　０，１

【０２９２】
配列番号２４　分析５（ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ分析）
反応溶液：
水
$MgCl_2$　３，００ｍＭ（１ｍＭの緩衝液を含む）
プライマー　フォワード　０，３０μＭ
プライマー　リバース　０，３０μＭ
ブロッカー　４，００μＭ
ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒプローブ　０，１５μＭ
ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒプローブ　０，１５μＭ
１ａ＋１ｂ試薬混合物　１，００×

温度サイクリング条件：
９５℃での変性
９５℃　１０分
５５サイクル：
９５℃での変性　１０秒（２０℃／ｓ）
アニーリング５８℃　３０秒（２０℃／ｓ）　検出
伸張　７２℃　１０秒（２０℃／ｓ）
融解
９５℃　１０秒　２０
３５℃　２０秒　２０

９５℃　０秒　０，１

【０２９３】

配列番号１　分析２（ＭＳＰ分析）

反応溶液：

水（３３１５９３２）

$MgCl_2$（２２３９２７２）　３，５０　ＭＭ（＊）

プライマー　フォワード　０，６０　μＭ

プライマー　リバース　０，６０　μＭ

検出プローブ　０，３０　μＭ

１ａ＋１ｂ試薬　ＦａｓｔＳｔａｒｔ混合物　１，００×

温度サイクリング条件：

活性化：　９５℃　１０分

５０サイクル：９５℃　１５秒

６２℃　４５秒

冷却：　４０℃　５秒

【０２９４】

配列番号１　分析７（ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒプローブ　ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ分析）

反応溶液：

水

$MgCl_2$　３，５０ｍＭ（１ｍＭの緩衝液を含む）

プライマー１　０，３０μＭ

プライマー２　０，３０μＭ

ブロッカー　４，００μＭ

検出プローブ（蛍光）　０，１５μＭ

検出プローブ（赤）　０，１５μＭ

１ａ＋１ｂ試薬（ＦａｓｔＳｔａｒｔ）　１，００×

温度サイクリング条件：

活性化：　９５℃　１０分

５０サイクル：９５℃　１０秒（２０℃／ｓ）

５６℃　３０秒（２０℃／ｓ）検出

７２℃　１０秒（２０℃／ｓ）

融解曲線：　９５℃　１０秒　２０

４０℃　１０秒　２０

７０℃　０秒　０，１

冷却：　４０℃　５秒

【０２９５】

配列番号１　分析７（Ｔａｑｍａｎ　ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ分析）

反応溶液：

水

$MgCl_2$　３，５０ｍＭ（１ｍＭの緩衝液を含む）

プライマー１　０，３０μＭ

プライマー２　０，３０μＭ

ブロッカー　４，００μＭ

検出プローブ１　０，１５μＭ

検出プローブ２　０，１５μＭ

１ａ＋１ｂ試薬混合物　１，００×

温度サイクリング条件：

活性化：　　９５℃　１０分
５０サイクル：９５℃　１０秒（２０℃／ｓ）
　　５６℃　３０秒（２０℃／ｓ）検出
　　７２℃　１０秒（２０℃／ｓ）
融解曲線：　９５℃　１０秒　２０
　　４０℃　１０秒　２０
　　７０℃　０秒　０，１
冷却：　　４０℃　５秒

【０２９６】

配列番号２８　分析２（ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ分析）
反応溶液：
水
$MgCl_2$　　３，５０ｍＭ（１ｍＭの緩衝液を含む）
プライマー１　　０，３０μＭ
プライマー２　　０，３０μＭ
ブロッカー　　４，００μＭ
検出プローブ１　　０，１５μＭ
検出プローブ２　　０，１５μＭ
１ａ＋１ｂ試薬混合物　１，００×

温度サイクリング条件：
活性化：　　９５℃　１０分
５０サイクル：９５℃　１０秒（２０℃／ｓ）
　　５６℃　３０秒（２０℃／ｓ）検出
　　７２℃　１０秒（２０℃／ｓ）
融解曲線：　９５℃　１０秒　２０
　　４０℃　１０秒　２０
　　７０℃　０秒　０，１
冷却：　　４０℃　５秒

【０２９７】

配列番号２９　分析２Ｂ（ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ分析）
反応溶液：
水
$MgCl_2$　　３，００ｍＭ（１ｍＭの緩衝液を含む）
プライマー１　　０，３０μＭ
プライマー２　　０，３０μＭ
ブロッカー　　４，００μＭ
検出プローブ（蛍光）　　０，１５μＭ
検出プローブ（赤）　　０，１５μＭ
１ａ＋１ｂ試薬（ＦａｓｔＳｔａｒｔ）　１，００×

温度サイクリング条件：
活性化：９５℃　　１０分
５０サイクル：９５℃　１０秒（２０℃／ｓ）
　　５８℃　３０秒（２０℃／ｓ）検出
　　７２℃　１０秒（２０℃／ｓ）
融解曲線：　９５℃　１０秒　２０
　　４０℃　１０秒　２０
　　７０℃　０秒　０，１

【０２９８】

配列番号２９　分析２（ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ分析）
反応溶液：
水
$MgCl_2$　　３，５０ｍＭ（１ｍＭの緩衝液を含む）
プライマー１　　０，３０μＭ
プライマー２　　０，３０μＭ
ブロッカー　　４，００μＭ
検出プローブ１　　０，１５μＭ
検出プローブ２　　０，１５μＭ
１ａ＋１ｂ試薬混合物　１，００×

温度サイクリング条件：
活性化：　９５℃　１０分
５５サイクル：９５℃　１０秒（２０℃／ｓ）
　　５６℃　３０秒（２０℃／ｓ）検出
　　７２℃　１０秒（２０℃／ｓ）
融解曲線：　９５℃　１０秒　２０
　　４０℃　１０秒　２０
　　７０℃　０秒　０，１
冷却：　４０℃　５秒

【０２９９】
データ解釈
ＤＮＡ濃度の算出
　Ｌｉｇｈｔｃｙｃｌｅｒ機器ソフトウェアにより計算されたＣｐ（交差点値）がＤＮＡ濃度を決定するために使用された。ＤＮＡ濃度はメチル化分析とＣ３分析の両方の標準曲線に対して各ウェルのＣＰ値を参照することにより算出された。
【０３００】
　ほとんどの場合、各分析が１試料につき２回行われ、１試料につき複数の測定結果を得た。
【０３０１】
メチル化の百分率
　Ｃ３分析を用いて４ｎｇＤＮＡ未満と測定された全試料は、さらなる検討がなされなかった。各試料について検出されたメチル化百分率はメチル化分析を用いてＤＮＡ定量された測定濃度をＣ３分析により定量された試料中におけるＤＮＡ濃度で割って算出された。
【０３０２】
　メチル化検出は、複数の異なる閾値レベルで（表を参照）、ならびに全てのメチル化レベルで（すなわちメチル化が検出された試料は全て陽性とみなされた）測定された。
【０３０３】
　各分析の感度は結腸直腸癌腫試料の陽性検出率から決定され、当該感度はメチル化が陽性に検出された試料（すなわち真陽性）の％として決定された。
　各分析の特異性は全血試料の陰性検出率（すなわち真陰性検出率）から測定され、擬陽性は分析された試料の全数より削減された。
【０３０４】
結果
　個々の分析によりメチル化が所定の閾値内と測定された分析済みの試料の割合または数は、表１７（試料セット１）と表１８（試料セット２）に示されている。所定の閾値内で陽性と判定された２つの反復実験のうち少なくとも１つが陽性と考えられた。パネルデータはパネルの少なくとも１つの分析を用いてメチル化が所定の閾値内と測定された分析済み試料の割合もしくは数を測定することによりまとめられた。所定の閾値内で陽性と判定された２つの反復実験の少なくとも１つの試料が陽性と考えられた。

【０３０５】
配列番号１分析２は、１セットの１４乳房癌腫患者の試料、１２結腸直腸癌腫試料および１０全血試料（試料セット３）においてさらに試験された。個々の分析によりメチル化が所定の閾値内と測定された分析済み試料の割合もしくは数は表２０に示されている。
【実施例４】
【０３０６】
他の癌
以下の分析は、多数の試料セットにおける分析の実績を実証することにより、全血中におけるＤＮＡメチル化の分析に基づく他の癌のスクリーニングおよび／または診断のための好適なマーカーとしての、遺伝子セプチン９（その転写変異体Ｑ９ＨＣ７４を含む）およびそのパネルを確認するために行われた。
【０３０７】
マーカーの実績は表４に記載される配列番号１のＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ分析７を用いて分析され、反応条件は実施例２に従った。
【０３０８】
表２２は各分類において試験された試料の数を示し、および両方の反復実験がメチル化陽性と判定された試料の数を示す。図３は他の癌で測定されたメチル化レベルを示し、遺伝子が複数の癌の種類にまたがってメチル化されているのを見ることができる。しかしながら肝臓癌のみが結腸直腸癌腫と等しくもしくは高い割合でメチル化されている。図４は他の非癌性疾患において測定されたメチル化レベルを示し、腎盂腎炎のみが結腸直腸癌腫と等しくもしくは高い割合でメチル化されているのを見ることができる。
【実施例５】
【０３０９】
重亜硫酸塩配列決定
セプチン９遺伝子の配列決定
遺伝子セプチン９は、４から（アンサンブルデータベースに関する先の考察を参照）少なくとも６の異なる転写変異体（at the 51 end, see Russell et al. Oncogene, 2001 Sep 13;20(41):5930-9）を持つと仮定されている。Russellらにて言及される変異物のうち増幅産物は４変異物（アルファ、ベータ、ガンマおよびイプシロン）を重複するＣｐＧアイランドもしくはＣｐＧリッチ領域を含むように設計された。イプシロンとガンマの２つの変異物に重複するＣｐＧアイランドが２つある。ベータ変異物はガンマＣｐＧアイランドにより調節されているようである。
【０３１０】
１２名の患者からの試料が分析され、上述のとおりＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ分析によりセプチン９のメチル化のレベルが予め定量された。２試料が２０％より高いメチル化を有し（試料Ｃ集団）、４試料が１０％～２０％のメチル化を有し（試料Ｂ集団）、そして６試料が１０％までのメチル化を予め示した（試料Ａ集団）。
【０３１１】
さらにまた、疾患の見られない被検者からの３つの全血試料のＤＮＡがアルファおよびベータ単位複製配列(amplicon)のために用いられた（試料Ｎ集団）。
【０３１２】
ＤＮＡ抽出および重亜硫酸塩処理
ＤＮＡは、ＱＩＡＧＥＮ　Ｇｅｎｏｍｉｃ－Ｔｉｐ５００／Ｇまたは１００／Ｇにより製造者の指示書にしたがって単離された。精製されたゲノムＤＮＡはその後、以下の重亜硫酸塩反応により変換された。
【０３１３】
１００μｌ中の２μｇのＤＮＡを、３５４μｌの重亜硫酸塩溶液（２２ｍｌ中のヌクレアーゼなしの水中１０．３６ｇ重亜硫酸ナトリウム及び２．４９ｇ亜硫酸ナトリウム）およびラジカルスカベンジャーを含むジオキサン１４６μｌ（８．２ｍｌのジオキサン中の６－ヒドロキシ－２，５，７，８－テトラメチルクロマン２－カルボン酸、３２３ｍｇ）

と混合した。重亜硫酸塩反応は以下の通りである：

【０３１４】

【表１】

時間	速度	操作
3分		水浴　９９．９℃
３0分	１０００ｒｐｍ	サーモミキサー　６０℃
3分		水浴　９９．９℃
１．５時間	１０００ｒｐｍ	サーモミキサー　６０℃
3分		水浴　９９．９℃
3時間	１０００ｒｐｍ	サーモミキサー　６０℃

【０３１５】

反応混合物はＭｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｍｉｃｒｏｃｏｎ（商標）カラムを用いて限外ろ過により引き続き精製された。精製は製造者の指示書に従って行われた。脱スルホンおよび洗浄についてのさらなる詳細：

【０３１６】

【表２】

時間	容量	速度	操作
	200μｌ		滅菌水を重亜硫酸塩反応物へ混合、攪拌および回転
	400μｌ		重亜硫酸塩混合物をＭｉｃｒｏｃｏｎカラムへ
20分		14000ｇ	流出物とともにチューブを廃棄；新しいチューブに交換
	400μｌ		残った重亜硫酸塩混合物を同じＭｉｃｒｏｃｏｎフィルターへ
20分		14000g	流出物とともにチューブを廃棄；新しいチューブに交換
	400μｌ		０．２Ｍ　ＮａＯＨ
12分		14000g	流出物とともにチューブを廃棄；新しいチューブに交換
	400μｌ		０．１Ｍ　ＮａＯＨ
12分		14000g	流出物とともにチューブを廃棄；新しいチューブに交換
	400μｌ		ｄｄH_2O
12分		14000g	流出物とともにチューブを廃棄；新しいチューブに交換
	400μｌ		ｄｄH_2O
12分		14000g	流出物とともにチューブを廃棄；新しいチューブに交換

【０３１７】

その後、５０μｌの重亜硫酸塩ＴＥ緩衝液（予め５０℃に温めておく：１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ中の０．１ｍＭＥＤＴＡ）を膜に添加し、攪拌下（１０００ｒｐｍ）で１０分間インキュベートした。カラムを１．７ｍｌ低定着チューブに逆さに置き、１０００ｇで７分間回転させてＤＮＡを抽出した。ＤＮＡ濃度は対照配列（ＨＢ１４）のリアルタイムＰＣＲ分析により測定した。

【０３１８】

増幅

増幅産物およびＰＣＲプライマーについては表２３を参照されたい。名称中「ｒｃ」を有する増幅産物はＢｉｓ２鎖から増幅されたものであり、その他はＢｉｓ１鎖からのものである。

【０３１９】

目的の断片は２５μｌの反応液中にて以下の条件を用いて増幅された。

【０３２０】

ＰＣＲ反応：

	１×容量（μｌ）	最終濃度
１０×ＤｙＮＡｚｙｍｅＥＸＴ緩衝液ｗ／$MgCl_2$	２．５	１×
２ｍＭ　ｄＮＴＰｓ	２．５	２００μＭ各々
Ｒｅｖ／Ｆｏｒプライマー組み合わせ（１０μＭストック）	１．２５	０．５μＭ各々
ＤｙＮＡｚｙｍｅ　ＥＸＴポリメラーゼ１Ｕ／μｌ	０．５	０．５単位全
重亜硫酸処理済みＤＮＡ（@１０ｎｇ／μｌ）	２．５－５	２５－５０ｎ

ｇ 全
ＤＭＳＯ １００％ ０－０．５ ０－２％
【０３２１】
サイクリング条件：
３分 ９４℃；２０秒 ９４℃；３０秒 ５４℃；４５秒 ７２℃（３８－４２サイクル）；１０分 ７２℃
【０３２２】
ＰＣＲ産物の精製
ＰＣＲ産物はＭｏｎｔａｇｅ（商標）ＤＮＡゲル抽出キットを用いて製造者の指示書に従って精製された。簡潔に述べると、ＰＣＲ反応物を１％改変ＴＡＥ（標準ＴＡＥにおける１．０ｍＭＥＤＴＡの変わりに０．１ｍＭＥＤＴＡを含む）アガロースゲルにて泳動させた。目的のＤＮＡバンドが切り取られた。ゲル片をＭｏｎｔａｇｅＤＮＡゲル抽出装置に置き、５０００ｇで１０分間回転させてＤＮＡ溶液を回収した。精製されたＤＮＡはさらに１０μｌまで濃縮された。
【０３２３】
ＴＡクローニング
ＰＣＲ産物はＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ ＴＯＰＯ（登録商標）ＴＡクローニングキットにより製造者の指示書に従ってクローン化され増殖された。簡潔に述べると、２μｌの精製および濃縮されたＰＣＲ産物がＴＯＰＯクローニング反応に用いられてベクターｐＣＲ（登録商標）２．１－ＴＯＰＯにクローン化された。形質転換は化学的に有効なＥ．Ｃｏｌｉ株ＴＯＰＯ１０により行われた。
【０３２４】
配列決定
個々のコロニーが選択され、ＬＢ（選択用の５０μｇカルベニシリン／ｍｌＬＢ）にて培養された。１μｌの一晩の培養物が２０μｌの容量でコロニーＰＣＲのために用いられた。
【０３２５】
ＰＣＲ混合物
２．５μｌ １０×ＤｙＮＡｚｙｍｅ緩衝液
２．５μｌ ２ｍＭ ｄＮＴＰｓ
１．２５μｌ Ｍ１３Ｆプライマー （１０μＭ）
１．２５μｌ Ｍ１３Ｒプライマー （１０μＭ）
０．２５μｌ ＤｙＮＡｚｙｍｅポリメラーゼ
１２．２５μｌ ddH_2O
【０３２６】
サイクリング条件：
３分 ９４℃；１分 ９４℃；１分 ５５℃；１分 ７２℃（３６サイクル）；１０分 ７２℃
【０３２７】
コロニーＰＣＲ増幅産物の精製および配列決定は標準プロトコールを用いて行われた。用いた配列決定プライマーは、Ｍ１３リバースプライマーまたは最初のＰＣＲ産物を発生した増幅産物特異的プライマーの１つのいずれかである。
【０３２８】
結果
図５～２９は出願人開発のソフトウェア（更なる情報についてはＷＯ２００４／０００４６３を参照）により分析されたガンマ単位複製配列の重亜硫酸塩配列決定データより作成されたマトリックスを提供する。マトリックスの各カラムは１試料の反復実験についての配列決定データを示し、各試料の全ての反復実験は１つのブロックに共にグループ化されている。マトリックスの各列は断片内の単一ＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧの数はマトリックスの左側に見られる。

【０３２９】
各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は淡灰色（０％メチル化）から中灰色（５０％メチル化）へ、濃灰色（１００％メチル化）へ色によって表されている。配列決定が成功しなかった増幅産物、試料もしくはＣｐＧ位置もあり、これらは白色で示されている。
【０３３０】
図５～２９は実施例５による重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各カラムは１試料の反復実験についての配列決定データを示し、各試料の全ての反復実験は１つのブロックに共にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の単一ＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧの数はマトリックスの左側に見られる。
【０３３１】
各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は淡灰色（０％メチル化）から中灰色（５０％メチル化）へ、濃灰色（１００％メチル化）へ色によって表されている。配列決定が成功しなかった増幅産物、試料もしくはＣｐＧ位置もあり、これらは白色で示されている。
【０３３２】
図５～１２は、１０％～２０％のメチル化を有すると（ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ分析によって）予め定量された４試料における表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換済み増幅産物の配列決定の全体像を提供する。
【０３３３】
図１３～２０は、２０％より大きいメチル化を有すると（ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ分析によって）予め定量された２試料における表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換済み増幅産物の配列決定の全体像を提供する。
【０３３４】
図２１～２２は、３人の健康な被検者からの血液試料における表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換済み増幅産物の配列決定の全体像を提供する。
【０３３５】
図２３～２９は、１０％未満（しかし、０％よりは大きい）のメチル化を有すると（ＨｅａｖｙＭｅｔｈｙｌ分析によって）予め定量された６試料における表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換済み増幅産物の配列決定の全体像を提供する。
【実施例６】
【０３３６】
配列番号１５９～配列番号１６３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩処理されたゲノム配列の変異物の分析に好適なさらなる分析が表２４に示される。ゲノムＤＮＡの重亜硫酸塩処理は、当該技術において公知のプロトコールにより実行され得る（例えば、Olek A, et al. A modified and improved method for bisulfite based cytosine methylation analysis, Nucleic Acids Res. 24:5064-6, 1996）。好適なサイクリング条件は当業者に公知となり、表２４に示されるようなオリゴマーの融解温度から推定されうる。

【０３３７】

【表３－１】

配列表によるゲノム配列

配列番号	アンサンブルデータベース※の位置	アンサンブルデータベース※のゲノム位置	関連する遺伝子転写物※	メチル化重亜硫酸塩変換済み配列（センス）	メチル化重亜硫酸塩変換済み配列（アンチセンス）	非メチル化重亜硫酸塩変換済み配列（センス）	非メチル化重亜硫酸塩変換済み配列（アンチセンス）
1	AC068594.15.1.168501 150580 ～ 151086(+) ～ AC111170.11.1.158988 137268 ～ 138151	17 72789082 ～ 73008258 (+)	セプチン９及びQ9HC74	4	5	10	11
2	AC068594.15.1.168501 150580 ～ 151255(+)	17 72789082 ～ 72789757 (+)	セプチン９	6	7	12	13
3	AC111182.20.1.171898 127830 ～ 129168 (+)	17 72881422 ～ 72882760 (+)	Q9HC74	8	9	14	15
24	AC092947.12.1.72207 58709 ～ 60723 (+)	3 140138862 ～ 140140876 (+)	FOXL2	30	31	42	43
25	AC015656.9.1.147775 12130 ～ 12961(+)	17 44929475 ～ 44930306 (-)	NGFR	32	33	44	45

【表３－２】

26	AC092644.3.1.171 099 148656 ～ 149604(+)	2 192884909 ～ 192885857 (+)	TMEFF2	34	35	46	47
27	AL049874.3.1.193 047 183 ～ 2782(+)	Chr14 60045491 ～ 60048090 (+)	SIX6	36	37	48	49
28	AC002094.1.1.167 101 27574 ～ 28353(+)	Chr17 23723867 ～ 23724646 (-)	SARM1 及び VTN	38	39	50	51
29	AC007375.6.1.180 331 23232 ～ 24323(+)	Chr14 76676531 ～ 76677622 (+)	ZDHHC22	40	41	52	53
159	AC107050.3.1.167 699 73453 ～ 74793(+)	4 188021715 ～ 188023055 (+)	FAT	168	169	186	187
160		18 58498722 ～ 58498782 (+)	ATP8B1/Q 96N33	170	171	188	189
161		20 30533783 ～ 30537106 (+)	CT112	172	173	190	191

【表３－３】

162		4 2384588 ～ 2389018 (+)	Q726J3/ZF YVE28	174	175	192	193
163		18 46060107 ～ 46063463 (+)	MBD1/CX XC1	176	177	194	195
164		22 16223947 ～ 16226116 (+)	該当なし	178	179	196	197
165			プロスタグランジンE2受容体	180	181	198	199
166			PRDM6	182	183	200	201
167			NR2E1	184	185	202	203
376			ONE CUT DOMAIN FAMILY MEMBER 2；ONC2	379	380	385	386
377			NM_003299	381	382	387	388
378			NM_000484	383	384	390	391

*アンサンブルデータベース

【表４－１】

Genomic SEQ ID NO:	Assay	Primer	Primer	Blocker	Probe	Probe
SEQ ID NO: 26(Assay 2)	HM	Gtagtagtagtagggtagagag (SEQ ID NO: 301)	Catccccctacaacctaaa (SEQ ID NO: 302)	Caacctaaacaacacactcccacacactaaaaaca c (SEQ ID NO: 303)	Cgcgggagaggcgtt (SEQ ID NO: 304)	Tgttggcgatcggcgtttt (SEQ ID NO: 305)
SEQ ID NO: 376(Assay 2)	MSP	GCGGTTTCGGAGTGGTT (SEQ ID NO: 306)	CCTCCCGAACCTAAAACGA (SEQ ID NO: 307)	Not applicable	ACGCCCGACGAACGCCAA (SEQ ID NO: 308)	Not applicable
SEQ ID NO: 378 (Assay 21)	MSP	TTTATGTTTTTCGTTTTTCGTTCG (SEQ ID NO: 309)	GAATCCTCACACCTCCAACCG (SEQ ID NO: 310)	Not applicable	CGCCCACTACACCGCAAACAAATC (SEQ ID NO: 311)	Not applicable
SEQ ID NO: 378 (Assay 1)	MSP	TTACGTGTGAGGGGTTCG (SEQ ID NO: 312)	ACGAAAATCCACCAATCGAAAC (SEQ ID NO: 313)	Not applicable	TCCAAATACGATAACCGATACCCGAAACG (SEQ ID NO: 314)	Not applicable
SEQ ID NO: 163 (Assay 1)	MSP	Ggtattaggtcggtatttttcgt (SEQ ID NO: 315)	Ctattaaaaacacgcgacatcga (SEQ ID NO: 316)	Not applicable	Tcgttttcgcggttgttcgttgt (SEQ ID NO: 317)	Ttcggaatcggaagttcgttgtttg (SEQ ID NO: 318)
SEQ ID NO: 378 (Assay 1)	MSP	gcgatttcgacgtcggt(SEQ ID NO: 319)	Ctacgttctccgcctcgtt (SEQ ID NO: 320)	Not applicable	Agggtcgtatttaggttgtcgtcgtta (SEQ ID NO: 321)	Tagtcgcgaaaagaggttggagtaag (SEQ ID NO: 322)

【表４－２】

SEQ ID NO: 27 (Assay 1)	MSP	Gggtttcgggcg ggta (SEQ ID NO: 323)	Atatcgcactcg ctatcgcta (SEQ ID NO: 324)	Not applicable	gagggcgacgg tacgttagaggt(SEQ ID NO: 325)	ttgggcgtcgttat tagttcggtc(SE Q ID NO: 326)
SEQ ID NO: 27 (Assay 2)	MSP	gtcgggttggag ggacgta(SEQ ID NO: 327)	atatcgcactcg ctatcgcta(SE Q ID NO: 328)	Not applicable	gagggcgacgg tacgttagaggt(SEQ ID NO: 329)	ttgggcgtcgttat tagttcggtc(SE Q ID NO: 330)
SEQ ID NO: 28 (Assay 2)	HM	GttTttTttAttA GTTGGAAG AttT(SEQ ID NO: 331)	aAaCTaCAa CAaaCCTTa TC(SEQ ID NO: 332)	CCTTaTCCA CACTaAAaC AaaCAaaCA aCACACAaa C(SEQ ID NO: 333)	CGtttACGGtt CGCGCG(S EQ ID NO: 334)	CGttCGttTGt TTtAGCGCG (SEQ ID NO: 335)
SEQ ID NO: 26 (Assay 2)	HM	gaggtgttagag gagtagtag (SEQ ID NO: 336)	tccccctacaac ctaaa(SEQ ID NO: 337)	Acctaaacaac acactcccacac actaaaacacc aat(SEQ ID NO: 338)	Cgagtcggcgc ggga(SEQ ID NO: 339)	agggcgttttgttg gcgatc(SEQ ID NO: 340)
SEQ ID NO: 26 (Assay 6)	HM	aaaaaaaaaa aactcctctacat ac(SEQ ID NO: 341)	ggttattgtttggg ttaataaatg(S EQ ID NO: 342)	Acatacaccac aaataaattacc aaaaacatcaa ccaa (SEQ ID NO: 343)	ttttttttttcggacg tcgtt (SEQ ID NO: 344)	tcggtcgatgtttt cggtaa(SEQ ID NO: 345)
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)	HM	tgagagagaga gggttgaaa(S EQ ID NO: 346)	Tctaaataacaa aatacctccatt (SEQ ID NO: 347)	Ccattaccaaca caacccaccaa ccaa (SEQ ID NO: 348)	CgaccCGcca acCGac (SEQ ID NO: 349)	CGcCGaaaC GCGctc (SEQ ID NO: 350)
SEQ ID NO: 165 (Assay 1)	HM	Tggttattaattat gtttatttttatag (SEQ ID NO: 351)	Accaaatatcta aatactacaacc (SEQ ID NO: 352)	Tacaaccacaa actaccaaaac ccatattaaaca acacac(SEQ ID NO: 353)	tatgcgtttaacgt gttttttgcg(SE Q ID NO: 354)	tggcgggttttac gttttttgtagt(S EQ ID NO: 355)
SEQ ID NO: 1 (Assay 7)	HM	GtAGtAGttA GtttAGtAtttAtt TT(SEQ ID NO: 356)	CCCACCAa CCATCATaT (SEQ ID NO: 357)	CATCATaTC AaACCCCA CAaTCAACA CACAaC(SE Q ID NO: 358)	GaACCCCG CGaTCAAC GCG(SEQ ID NO: 359)	Not applicable
SEQ ID NO: 1 (Assay 7)	HM	GtAGtAGttA GtttAGtAtttAtt TT(SEQ ID NO: 360)	CCCACCAa CCATCATaT (SEQ ID NO: 361)	CATCATaTC AaACCCCA CAaTCAACA CACAaC(SE Q ID NO: 362)	GTtCGAAAT GATtttATttA GtTGC(SEQ ID NO: 14844363	CGTTGAtCG CGGGGTtC(SEQ ID NO: 364)
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)	HM	ccaaaacctaa acttacaac(SE Q ID NO: 365)	Ggaaatttgagg ggtaa(SEQ ID NO: 366)	Tacaacaccac caacaaaccca aaaacacaa(S EQ ID NO: 367)	GTtAATTGC GGGCGAtC GA(SEQ ID NO: 368)	CGtCGttAGC GGGTGGG(SEQ ID NO: 369)
SEQ ID NO: 28 (Assay 1)	MSP	cggttgttgtagg cgtc(SEQ ID NO: 370)	gcaaaacacac gaaaacg(SE Q ID NO: 371)	Not applicable	Cgcgtgtgtagg tcgcgcgt(SE Q ID NO: 372)	Not applicable
SEQ ID NO: 1 (Assay 2)	MSP	aaaatcctctcc aacacgtc(SE Q ID NO: 373)	cgcgattcgttgtt tattag(SEQ ID NO: 374)	Not applicable	CGgatttCGC GgttaaCGCG tagtt (SEQ ID NO: 375)	Not applicable

【表５】

実施例２により分析された試料

分析	全試料数	結腸直腸癌腫	正常隣接組織	血液
SEQ ID NO: 165 (Assay 1)	33	26	0	7
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)	106	79	0	27
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)	109	82	0	27
SEQ ID NO: 26 (Assay 6)	113	86	0	27
SEQ ID NO: 1 (Assay 2)	115	87	0	28
MSP SEQ ID NO: 376 (Assay 2)	127	91	16	20
SEQ ID NO: 378 (Assay 1)	118	78	16	24
SEQ ID NO: 378 (Assay 21)	118	78	16	24
SEQ ID NO: 378 (Assay 1)	118	78	16	24
SEQ ID NO: 163 (Assay 1)	118	78	16	24
SEQ ID NO: 26 (Assay 2) HM	132	92	16	24
MSP SEQ ID NO: 27 (Assay 2)	128	89	15	24

【表６】

種々の閾値内のメチル化を有する結腸直腸癌腫試料の割合

分析	0.01 以上	0.1 以上	0.3 以上	0.5 以上
SEQ ID NO: 165 (Assay 1)	0,269	0,077	0	0
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)	0,911	0,557	0,152	0,076
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)	0,573	0,402	0,232	0,073
SEQ ID NO: 26 (Assay 6)	0,919	0,756	0,43	0,186
SEQ ID NO: 1 (Assay 2)	0,885	0,816	0,506	0,218
MSP SEQ ID NO: 376 (Assay 2)	0,11	0	0	0
SEQ ID NO: 378 (Assay 1)	0	0	0	0
SEQ ID NO: 378 (Assay 21)	0	0	0	0
SEQ ID NO: 378 (Assay 1)	0	0	0	0
SEQ ID NO: 163 (Assay 1)	0	0	0	0
SEQ ID NO: 26 (Assay 2) HM	0,924	0,739	0,446	0,228
MSP SEQ ID NO: 27 (Assay 2)	0,843	0,551	0,169	0,056

【表７】

種々の閾値内のメチル化を有する正常隣接組織試料の割合

分析	0.001 以上	0.01 以上	0.1 以上	0.3 以上
MSP SEQ ID NO: 376 (Assay 2)	0,938	0,25	0	0
SEQ ID NO: 378 (Assay 1)	0	0	0	0
SEQ ID NO: 378 (Assay 21)	0	0	0	0
SEQ ID NO: 378 (Assay 1)	0,25	0	0	0
SEQ ID NO: 163 (Assay 1)	0	0	0	0
SEQ ID NO: 26 (Assay 2) HM	0,938	0,938	0	0
MSP SEQ ID NO: 27 (Assay 2)	0,933	0,533	0,067	0

【表８】

種々の閾値内のメチル化を有する全血試料の割合

分析	0.0001 以上	0.001 以上	0.01 以上	0.1 以上
SEQ ID NO: 165 (Assay 1)	0,286	0,143	0,143	0,143
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)	0,074	0	0	0
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)	0	0	0	0
SEQ ID NO: 26 (Assay 6)	0,148	0,037	0	0
SEQ ID NO: 1 (Assay 2)	0,071	0	0	0
MSP SEQ ID NO: 376 (Assay 2)	0,4	0,2	0	0
SEQ ID NO: 378 (Assay 1)	0	0	0	0
SEQ ID NO: 378 (Assay 21)	0	0	0	0
SEQ ID NO: 378 (Assay 1)	0	0	0	0
SEQ ID NO: 163 (Assay 1)	0	0	0	0
SEQ ID NO: 26 (Assay 2) HM	0,292	0,083	0	0
SEQ ID NO: 27 (Assay 2 MSP)	0,083	0,042	0	0

【表９】

疾患の段階による種々のメチル化閾値内の結腸直腸癌腫試料の割合

	Stage I		Stage II		Stage III		Stage IV	
Assay	>10%	>20%	>10'%	>20%	>10%	>20%	>10%	>20%
SEQ ID NO: 24 (Assay 5 HM)	38.5	23.1	90	60	53.8	23.1	57.1	42.9
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)	53.8	46.2	50	40	44.4	37	12.5	12.5
SEQ ID NO: 26 (Assay 6)	64.3	64.3	90	70	86.2	62.1	66.7	66.7
SEQ ID NO: 1 (Assay 2 MSP)	71.4	64.3	100	80	79.3	58.6	88.9	88.9
SEQ ID NO: 26 (Assay2)	66.7	66.7	92.3	76.9	75	53.6	72.7	72.7
SEQ ID NO: 27 (Assay2)	55.6	33.3	69.2	38.5	44.4	18. 5	80	50

【表１０－１】

閾値１%～１０%メチル化内で検出された結腸直腸癌腫試料の割合

Panel	N samples	1% methylation	1% methylation gain	5% methylation	5% methylation gain	10% methylation	10% methylation gain
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/SEQ ID NO: 25 (Assay 3)	73	0,917808219	0,006415814	0,767123288	0,070920756	0,643835616	0,086873591
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/SEQ ID NO: 26 (Assay 6)	78	0,961538462	0,04293361	0,833333333	0,042635659	0,794871795	0,039057841
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/SEQ ID NO: 1 (Assay 2)	78	0,987179487	0,075787082	0,884615385	0,045534925	0,884615385	0,068523431
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/SEQ ID NO: 26(Assay 2 HM)	72	0,986111111	0,062198068	0,847222222	0,042874396	0,805555556	0,066425121
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/MSP SEQ ID NO: 27(Assay 2)	69	0,956521739	0,045129334	0,855072464	0,15844325	0,710144928	0,153182902
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)/SEQ ID NO: 26 (Assay 6)	80	0,9125	0,006104651	0,8	0,009302326	0,7625	0,006686047
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)/SEQ ID NO: 1 (Assay 2)	81	0,938271605	0,053214134	0,901234568	0,062154108	0,888888889	0,072796935
SEQ ID NO:	74	0,945945946	0,022032902	0,837837838	0,033490012	0,797297297	0,058166863

【表１０－２】

25 (Assay 3)/SEQ ID NO: 26(Assay 2 HM)							
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)/MSP SEQ ID NO: 27(Assay 2)	72	0,916666667	0,073970037	0,791666667	0,095037453	0,680555556	0,129993758
SEQ ID NO: 26 (Assay 6)/SEQ ID NO: 1 (Assay 2)	85	0,976470588	0,057865937	0,894117647	0,055037187	0,882352941	0,066260987
SEQ ID NO: 26 (Assay 6)/SEQ ID NO: 26(Assay 2 HM)	78	0,974358974	0,050445931	0,871794872	0,067447046	0,833333333	0,07751938
SEQ ID NO: 26 (Assay 6)/ MSP SEQ ID NO: 27.2)	75	1	0,081395349	0,893333333	0,102635659	0,853333333	0,09751938
SEQ ID NO: 1 (Assay 2)/ SEQ ID NO: 26(Assay 2 HM)	79	0,974683544	0,050770501	0,898734177	0,059653717	0,886075949	0,069983995
SEQ ID NO: 1 (Assay 2)/MSP SEQ ID NO: 27(Assay 2)	76	0,960526316	0,075468845	0,921052632	0,081972172	0,881578947	0,065486993
SEQ ID NO: 26.2 HM)/MSP SEQ ID NO: 27(Assay 2)	87	0,954022989	0,030109945	0,850574713	0,046226887	0,793103448	0,053973013

【表１１－１】

閾値１５%～２５%メチル化内で検出された結腸直腸癌腫試料の割合

Panel	N samples	15% methylation	15% methylation gain	20% methylation	20% methylation gain	25% methylation	25% methylation gain
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/SEQ ID NO: 25 (Assay 3)	73	0,589041096	0,146003121	0,493150685	0,163882392	0,410958904	0,130471099
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/SEQ ID NO: 26 (Assay 6)	78	0,730769231	0,07960644	0,679487179	0,051580203	0,58974359	0,043231962
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/SEQ ID NO: 1 (Assay 2)	78	0,820512821	0,061892131	0,717948718	0,039787798	0,602564103	0,027851459
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/SEQ ID NO: 26(Assay 2 HM)	72	0,75	0,065217391	0,666666667	0,036231884	0,583333333	0,050724638

【表１１－２】

SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/MSP SEQ ID NO: 27(Assay 2)	69	0,652173913	0,180263801	0,492753623	0,176297927	0,362318841	0,134470739
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)/SEQ ID NO: 26 (Assay 6)	80	0,6875	0,036337209	0,6625	0,034593023	0,575	0,028488372
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)/SEQ ID NO: 1 (Assay 2)	81	0,839506173	0,080885483	0,740740741	0,062579821	0,629629630	0,054916986
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)/SEQ ID NO: 26(Assay 2 HM)	74	0,743243243	0,058460635	0,702702703	0,07226792	0,594594595	0,061985899
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)/MSP SEQ ID NO: 27(Assay 2)	72	0,611111111	0,139200999	0,5	0,170731707	0,402777778	0,122289973
SEQ ID NO: 26 (Assay 6)/SEQ ID NO: 1 (Assay 2)	85	0,835294118	0,076673428	0,776470588	0,098309669	0,729411765	0,154699121
SEQ ID NO: 26 (Assay 6)/SEQ ID NO: 26(Assay 2 HM)	78	0,756410256	0,071627648	0,730769231	0,100334448	0,653846154	0,107334526
SEQ ID NO: 26 (Assay 6)/ MSP SEQ ID NO: 27.2)	75	0,72	0,068837209	0,693333333	0,065426357	0,586666667	0,040155039
SEQ ID NO: 1 (Assay 2)/ SEQ ID NO: 26(Assay 2 HM)	79	0,835443038	0,076822348	0,797468354	0,119307435	0,696202532	0,121489888
SEQ ID NO: 1 (Assay 2)/MSP SEQ ID NO: 27(Assay 2)	76	0,815789474	0,057168784	0,684210526	0,006049607	0,605263158	0,030550514
SEQ ID NO: 26.2 HM)/MSP SEQ ID NO: 27(Assay 2)	87	0,954022989	0,030109945	0,850574713	0,046226887	0,793103448	0,053973013

【表１２】

閾値３０%～５０%メチル化内で検出された結腸直腸癌腫試料の割合

Panel	N samples	30% meth ylation	30% methylation gain	50% methylation
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/SEQ ID NO: 25 (Assay 3)	73	0,315068493	0,083361176	0,123287671
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/SEQ ID NO: 26 (Assay 6)	78	0,474358974	0,044126416	0,217948718
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/SEQ ID NO: 1 (Assay 2)	78	0,538461538	0,032714412	0,269230769
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/SEQ ID NO: 26(Assay 2 HM)	72	0,486111111	0,040458937	0,263888889
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/MSP SEQ ID NO: 27(Assay 2)	69	0,260869565	0,092330239	0,115942029
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)/SEQ ID NO: 26 (Assay 6)	80	0,475	0,044767442	0,2
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)/SEQ ID NO: 1 (Assay 2)	81	0,580246914	0,074499787	0,259259259
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)/SEQ ID NO: 26(Assay 2 HM)	74	0,5	0,054347826	0,243243243
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)/MSP SEQ ID NO: 27(Assay 2)	72	0,333333333	0,101626016	0,097222222
SEQ ID NO: 26 (Assay 6)/SEQ ID NO: 1 (Assay 2)	85	0,635294118	0,129546991	0,305882353
SEQ ID NO: 26 (Assay 6)/SEQ ID NO: 26(Assay 2 HM)	78	0,551282051	0,105629877	0,269230769
SEQ ID NO: 26 (Assay 6)/ MSP SEQ ID NO: 27.2)	75	0,48	0,049767442	0,186666667
SEQ ID NO: 1 (Assay 2)/ SEQ ID NO: 26(Assay 2 HM)	79	0,620253165	0,114506038	0,303797468
SEQ ID NO: 1 (Assay 2)/MSP SEQ ID NO: 27(Assay 2)	76	0,539473684	0,033726558	0,263157895
SEQ ID NO: 26.2 HM)/MSP SEQ ID NO: 27(Assay 2)	87	0,471264368	0,025612194	0,252873563

【表１３】

閾値0.01%～0.1%メチル化内で検出された全血試料の割合

Panel	N samples	0.01% meth ylation	0.1% methylation
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/SEQ ID NO: 25 (Assay 3)	26	0,076923077	0
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/SEQ ID NO: 26 (Assay 6)	26	0,192307692	0,038461538
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/SEQ ID NO: 1 (Assay 2)	27	0,111111111	0
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/SEQ ID NO: 26(Assay 2 HM)	21	0,285714286	0,095238095
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)/MSP SEQ ID NO: 27(Assay 2)	21	0,095238095	0,047619048
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)/SEQ ID NO: 26 (Assay 6)	26	0,153846154	0,038461538
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)/SEQ ID NO: 1 (Assay 2)	27	0,074074074	0
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)/SEQ ID NO: 26 (Assay 2 HM)	21	0,285714286	0,095238095
SEQ ID NO: 25 (Assay 3)/MSP SEQ ID NO: 27(Assay 2)	21	0,095238095	0,047619048
SEQ ID NO: 26 (Assay 6)/SEQ ID NO: 1 (Assay 2)	27	0,185185185	0,037037037
SEQ ID NO: 26 (Assay 6)/SEQ ID NO: 26(Assay 2 HM)	21	0,333333333	0,095238095
SEQ ID NO: 26 (Assay 6)/MSP SEQ ID NO: 27(Assay 2)	21	0,142857143	0,047619048
SEQ ID NO: 1 (Assay 2)/SEQ ID NO: 26(Assay 2 HM)	22	0,272727273	0,090909091
SEQ ID NO: 1 (Assay 2)/MSP SEQ ID NO: 27(Assay 2)	22	0,136363636	0,045454545
SEQ ID NO: 26(Assay 2 HM)/MSP SEQ ID NO: 27 (Assay 2)	24	0,291666667	0,083333333

【表１４】

図３０～図３７において図示された血液と結腸直腸癌腫試料との差異

Figure	Assay	AUC of ROC	Sensitivity/Specificity	Wilcoxon P-value
30	SEQ ID NO: 165 (Assay 1)	0.76 (0.58, 0.89)	0.62/0.86	0.371
31	SEQ ID NO: 24 (Assay 5)	0.98 (0.93,1)	0.96/0.93	0
32	SEQ ID NO: 25 (Assay 3)	0.89 (0.82, 0.94)	0.78/1	0
33	SEQ ID NO: 26 (Assay 6)	0.99 (0.95, 1)	0.99/0.85	0
34	SEQ ID NO: 1 (Assay 2)	0.99 (0.95/1)	0.98/0.93	0
35	SEQ ID NO: 376 (Assay 2 MSP)	0.57 (0.48, 0.65)	0.14/0.86	0.2399
36	SEQ ID NO: 26 (Assay 2 HM)	0.94 (0.87, 0.97)	0.86/0.88	0
37	SEQ ID NO: 27 (Assay 2 MSP)	0.89 (0.82, 0.94)	0.81/0.87	0

*信頼区間はカッコ内に示される

【表１５－１】

実施例３による試料セット１

試料の種類	性別	年齢	段階	T	N	M	位置
CRC	F	39	III	4	1	0	Ｓ字結腸
CRC	F	65	III	3	2	0	回腸盲腸
CRC	M	58	IV				直腸
CRC	M	63	III	3	1	0	直腸
CRC	M	71	II				上向き
CRC	F	69	I	2	0	0	盲腸
CRC	F	54	III	3	2	0	盲腸
CRC	M	44	IV				
CRC	F	75	IV				横向き
CRC	F	60	II				直腸
CRC	M	76	I				下向き
CRC	M	69	IV				Ｓ字結腸
CRC	M	73	I	1	0	0	直腸

【表１５－２】

CRC	M		II	3	0	0	上向き
CRC	M	62	III	3	1		
CRC	F	49	IV				上向き
CRC	F	58	III	3	1	X	上向き
CRC	M	42	IV	3	0	1	
CRC	M	64	I	2	0	0	S字結腸
CRC	F	64	III				直腸
CRC	F	70	III	3	1	0	回腸終端部
CRC	M	67					
CRC	M	80	III	3	1	0	直腸S状部
CRC	F	72	IV				S字結腸
CRC	M		III				直腸
CRC	M	56	I	2	0	0	S字結腸
CRC	M	72	III	2	1	0	直腸
CRC	M	45	IV	4	2	1	盲腸
CRC	F		II	3	0	0	
CRC	M	74	III	3	1	0	直腸S状部
CRC	F	75	III	4	2	0	盲腸壁
CRC	M		III	3	1	0	
CRC	M		I	2	0	0	上向き
CRC	F	74	I	2	0	0	盲腸
CRC	M	62	I	2	0	0	直腸S状部
CRC	F	60	II	3	0	0	直腸
CRC	F	80	II				上向き
CRC	F	70	III	4	2	0	直腸
CRC	M		III	3	1	0	
CRC	F	75	III	3	1	0	上向き
CRC	F	49	IV	4	X	1	直腸
CRC	F	47	I				肛門
CRC	M	81	IV			1	
CRC	F	89	III	3	1	0	直腸
CRC	M	85	III	3	1	0	盲腸

【表１５－３】

CRC	M	52	III	2	1	0	
CRC	M	75	II				S字結腸
CRC	M						
CRC	F	71					
CRC	M		III				直腸
CRC	M	61		3	x	0	下向き
CRC	F	56	unk				S字結腸
CRC	F	68	IV	3	2	1	S字結腸
CRC	F	65	III	3	2	0	回腸盲腸
CRC	M	88	II	3	0	0	屈曲部
CRC	F	72	III				盲腸
CRC	M	61	IV	3	2	1	直腸
CRC	M		III	3	2		
CRC	M	52	II	3	0	0	横向き
CRC	M	66	IV	2	0	1	直腸
CRC	M	64	III				上向き
CRC	F	65	II	3	0	0	
CRC	M	61	IV	3	2	1	S字結腸
CRC	M	64	III	3	1	0	上向き
CRC	M	76	0	0			S字結腸
CRC	M	64	I	2	0	0	上向き
CRC	M	56	I	2	0	0	横向き
CRC	F	67	II	3	0	0	S字結腸
CRC	M		II	3	0	0	上向き
CRC	M	66	III	4	1	0	
CRC	M		II	3	0	0	
CRC	F		III				
CRC	F	65	I	2	0	X	直腸
CRC	M		II	3	0	0	
CRC	M	40	I				FAP
CRC	M	77	I	2	0	0	直腸S状部
CRC	M	65	III	4	2	0	下向き
CRC	M	68	IV				S字結腸

【表１５－４】

CRC	M	67	II				直腸
CRC	M		unk				直腸
CRC	F	63		3	x	0	
CRC	M	68	unk				下向き
CRC	F	53	III	3	1	0	上向き
CRC	M		II	3	0	0	
CRC	M	68	I	2	0	0	直腸
CRC	M	84	III				直腸
CRC	F	53	I	1	0	0	下向き
CRC	M	72	III	4	1	0	
CRC	F	69	I	1	0	0	S字結腸
CRC	M		II	3	0	0	下向き
CRC	M		II	3	0	0	盲腸
Normal Blood	F	62	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	62	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	44	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	57	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	51	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	66	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	65	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	55	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	70	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	40	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

【表１５－５】

Normal Blood	F	42	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	68	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	67	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	53	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	50	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	50	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	51	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	56	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	58	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	67	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	55	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	62	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	66	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	56	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	56	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	69	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

【表１６－１】

実施例３による試料セット２

試料の種類	性別	年齢	段階	T	N	M	位置
CRC	F	49	IV				上向き
CRC	F	72	IV				S字結腸
CRC	M	69	IV				S字結腸
CRC	F	58	III	3	1	X	上向き
CRC	F	60	II				直腸
CRC	F	74	I	2	0	0	盲腸
CRC	F	70	III	3	1	0	回腸終端部
CRC	F	69	I	2	0	0	盲腸
CRC	F	39	III	4	1	0	S字結腸
CRC	M	56	I	2	0	0	S字結腸
CRC	F		II	3	0	0	
CRC	M	64	I	2	0	0	S字結腸
CRC	M	45	IV	4	2	1	盲腸
CRC	F	54	III	3	2	0	盲腸
CRC	M	42	IV	3	0	1	
CRC	M	73	I	1	0	0	直腸
CRC	M	62	III	3	1		
CRC	M		I	2	0	0	上向き
CRC	F	75	III	3	1	0	上向き
CRC	M	74	III	3	1	0	直腸S状部
CRC	F	68	IV	3	2	1	S字結腸
CRC	F	75	IV				横向き
CRC	M	85	III	3	1	0	盲腸
CRC	M	80	III	3	1	0	直腸S状部
CRC	M	66	III	4	1	0	
CRC	F	70	III	4	2	0	直腸
CRC	F	89	III	3	1	0	直腸

【表１６－２】

CRC	M	67					
CRC	F	67	II	3	0	0	S字結腸
CRC	M	66	IV	2	0	1	直腸
CRC	F	56	unk				S字結腸
CRC	M	72	III	2	1	0	直腸
CRC	F	80	II				上向き
CRC	M	75	II				S字結腸
CRC	F	49	IV	4	X	1	直腸
CRC	M		III				直腸
CRC	F	60	II	3	0	0	直腸
CRC	M	62	I	2	0	0	直腸S状部
CRC	M	88	II	3	0	0	屈曲部
CRC	M	61	IV	3	2	1	S字結腸
CRC	M	61		3	x	0	下向き
CRC	F	64	III				直腸
CRC	M		III				直腸
CRC	M	52	II	3	0	0	横向き
CRC	F	71					
CRC	M	81	IV			1	
CRC	F	65	III	3	2	0	回腸盲腸
CRC	M						
CRC	F	65	II	3	0	0	
CRC	F	72	III				盲腸
CRC	M	61	IV	3	2	1	直腸
CRC	M	52	III	2	1	0	
CRC	M		II	3	0	0	
CRC	F	47	I				肛門
CRC	M		II	3	0	0	上向き
CRC	M	64	III	3	1	0	上向き
CRC	M	64	I	2	0	0	上向き
CRC	M	76	0	0			S字結腸
CRC	M	56	I	2	0	0	横向き
CRC	M	65	III	4	2	0	下向き

【表１６－３】

CRC	M	40	I				FAP
CRC	F	53	I	1	0	0	下向き
CRC	M		II	3	0	0	
CRC	M		III	3	2		
CRC	M		unk				直腸
CRC	M	68	I	2	0	0	直腸
CRC	F	63		3	x	0	
CRC	F		III				
CRC	M	67	II				直腸
CRC	F	65	I	2	0	X	直腸
CRC	M	64	III				上向き
CRC	M	68	IV				S字結腸
CRC	M		II	3	0	0	
CRC	M	72	III	4	1	0	
CRC	M	77	I	2	0	0	直腸S状部
CRC	F	53	III	3	1	0	上向き
CRC	F	69	I	1	0	0	S字結腸
CRC	M	84	III				直腸
CRC	M		II	3	0	0	下向き
CRC	M	68	unk				下向き
CRC	M		II	3	0	0	盲腸
Normal Blood	M	55	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	62	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	57	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	62	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	65	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

【表１６－４】

Normal Blood	F	44	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	68	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	70	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	58	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	62	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	53	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	42	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	51	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	66	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	51	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	40	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	56	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	56	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	50	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	50	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	F	67	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	67	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

【表１６－５】

Normal Blood	M	55	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	66	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Normal Blood	M	56	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

【表１７】

種々の閾値内のメチル化を有する実施例３による試料セット１からの試料の割合

Assays	CRC	CRC	CRC	Blood	Blood	Blood
	>10%**	>20%**	>30%**	2 of 2 +*	1 of 2 +**	>1%
SEQ ID NO: 1 (Assay 2)	75	62	46	1	1	0
%	82,41758	68,13187	50,54945	3,703704	3,703704	0
SEQ ID NO: 6 (Assay 6)/ SEQ ID NO: 1.2	79	69	59	2	11	5
%	86,81319	75,82418	64,83516	7,407407	40,74074	18,51852
SEQ ID NO: 1 (Assay 2)/SEQ ID NO: 4 (Assay 5)/SEQ ID NO: 15174 (Assay 3)	78	62	45	1	1	0
%	85,71429	68,13187	49,45055	3,703704	3,703704	0
SEQ ID NO: 1 (Assay 2)/SEQ ID NO: 5 (Assay 3)	77	66	51	1	1	0
%	84,61538	72,52747	56,04396	3,703704	3,703704	0
SEQ ID NO: 6 (Assay 6)/SEQ ID NO: 1 (Assay 2)/SEQ ID NO: 4 (Assay 5)	79	69	58	2	11	5
%	86,81319	75,82418	63,73626	7,407407	40,74074	18,51852
SEQ ID NO: 1 (Assay 2)/SEQ ID NO: 4 (Assay 5)/SEQ ID NO: 15174 (Assay 3)	78	66	51	1	1	0
%	85,71429	72,52747	56,04396	3,703704	3,703704	0
SEQ ID NO: 1 (Assay 2)/SEQ ID NO: 6 (Assay 6)/SEQ ID NO: 15174 (Assay 3)	79	69	59	2	11	0
%	86,81319	75,82418	64,83516	7,407407	40,74074	0

*両方の反復実験が陽性と判定された
**２つの反復実験の１つが陽性と判定された
もしくは閾値内と測定された

【表１８】

種々の閾値内のメチル化を有する実施例３による試料セット２からの試料の割合

	CRC	CRC	CRC	Blood	Blood	NAT	NAT	NAT
	>10%*	>20%*	>30%*	Positive*	>1%*	<5%*	5-10%*	>10%*
SEQ ID NO: 1(Assay 7)LC	66	54	37	2	1	15	6	1
%	81,48148	66,66667	45,67901	7,692308	3,846154	68,18182	27,27273	4,545455
SEQ ID NO: 1(Assay 7)-LC/ SEQ ID NO: 28 (Assay 2)	69	57	42	3	2			
%	85,18519	70,37037	51,85185	11,53846	7,692308			
SEQ ID NO: 1(Assay 7)-LC/ SEQ ID NO: 24 (Assay 5b)	68	55	39	2	1			
%	83,95062	67,90123	48,14815	7,692308	3,846154			
SEQ ID NO: 1(Assay 7)-Taqman	68	58	46	6	5			
%	83,95062	71,60494	56,79012	23,07692	19,23077			

＊２つの反復実験の１つが陽性と判定された
もしくは閾値内と測定された

【表１９】

実施例３による分析

Genomic SEQ ID NO:	Assay	Primer	Primer	Blocker	Probe	Probe
SEQ ID NO: 24 (Assay 5)	HM	ccaaaacctaaacttacaac (SEQ ID NO: 102)	tctaaataacaaaatacctccatt(SEQ ID NO: 110)	Tacaacaccaccaacaaacccaaaaaacacaa(SEQ ID NO: 104)	GTtAATTGCGGGCGAtCGA(SEQ ID NO: 105)	CGtCGttAGCGGGTGGG(SEQ ID NO: 106)
SEQ ID NO: 28 (Assay 2)	HM	GttTttTttAttAGTTGGAAGAttT (SEQ ID NO: 111)	aAaCTaCAaCAaaCCTTaTC (SEQ ID NO: 112)	CCTTaTCCACACTaAAaCAaaCAaCACACAaaC (SEQ ID NO: 113)	CGtttACGGttCGCGCG (SEQ ID NO: 114)	CGttCGttTGtTTtAGCGCG (SEQ ID NO: 115)
SEQ ID NO: 29 (Assay 2b)	HM	ggtgttgtttatttagagagtt (SEQ ID NO: 116)	CTCCCCTAaCCCCTaTC (SEQ ID NO: 117)	CTaTCCTTCACCACCTTCCCAaCACTaCA (SEQ ID NO: 118)	ttaggggggCGCGgga (SEQ ID NO: 119)	gttagatgCGtCGtagCGttg (SEQ ID NO: 120)

【表２０】

種々の閾値内のメチル化を有する実施例３による試料セット３からの試料の割合

	CRC	CRC	CRC	blood	blood	blood	BC	BC	BC
	>10%	>20%	>30%	>0.1	>1	>10	>10%	>20%	>30%
SEQ ID NO: 1 (Assay 2)	6	5	5	0	0	0	4	2	2
%	50	41,66667	41,66667	0	0	0	28,57143	14,28571	14,28571

【表２１－１】

実施例３による試料セット３

試料の種類	誕生の年	性別	人種	診断
CRC	1938	F	アジア人	M0,N0,T3, 腺癌, 段階ＩＩ、高分化型
CRC	1941	F	アジア人	M0,N1,T3, 腺癌, 中分化型, 段階ＩＩＩ、S字結腸
CRC	1956	F	アジア人	M0,N1,T2, 腺癌, 段階ＩＩＩ、高分化型
CRC	1945	F	アジア人	M0, T2, 腺癌, グレード２,N0
CRC	1961	F	アジア人	M0,N1,T3, 腺癌, 段階ＩＩＩ、高分化型, S字結腸
CRC	1945	F	不明	M0,N0,T2, 腺癌, 段階Ｉ、高分化型, 下向き
CRC	1970	F	アジア人	M0,N0,T3, 腺癌, 中分化型, 段階ＩＩ、上向き
CRC	1941	F	アジア人	M0,N0,T3, 腺癌, 中分化型, 段階ＩＩ、S字結腸
CRC	1952	F	白人	M1,T3, 潰瘍, 低グレード、癌, S字結腸, 間質
CRC	1948	F	アジア人	M0,N1,T3, 腺癌, 段階ＩＩＩ、上向き、グレード１
CRC	1947	F	アジア人	M0,N0,T3, 腺癌, 段階ＩＩ、高分化型, グレード１
CRC	1955	F	アジア人	M0,N0,T3, 腺癌, 段階ＩＩ、高分化型, グレード１、直腸
試料の種類	年齢	性別		
血液	16	F		
血液	33	F		
血液	33	F		
血液	35	F		
血液	23	F		
血液	35	F		
血液	19	F		
血液	36	F		
血液	24	F		
血液	37	F		

【表２１－２】

試料の種類	年齢	性別	診断時閉経段階	BC 段階N　段階値
乳癌	63	F	閉経後	N1
乳癌	59	F	閉経後	N0
乳癌	56	F	閉経後	N0
乳癌	45	F	閉経前	N2
乳癌	85	F	閉経後	N0
乳癌	65	F	閉経後	N0
乳癌	32	F	閉経前	N2
乳癌	47	F	閉経前	N1
乳癌	44	F	閉経前	N0
乳癌	29	F	閉経前	N1
乳癌	37	F	閉経前	N0
乳癌	44	F	閉経前	N0
乳癌	52	F	閉経後	N0
乳癌	54	F	閉経前	N0

【表２２】

実施例４の結果

疾患の種類	全＋試料	全試料番号
他の癌		
膀胱	4	10
乳房	5	29
肝臓	7	9
肺	10	26
前立腺	5	29
胃	2	7
膵臓	1	8
他の疾患		
虫垂炎	1	6
胆嚢炎	3	10
ＩＢＤ	4	17
糖尿病	3	10
食道炎	2	10
胃炎	3	11
慢性心疾患	5	10
膵炎	3	10
腎盂腎炎	5	10
呼吸器感染症	3	10
重度のアレルギー	4	11
憩室症／憩室炎	0	5
関節リウマチ	0	9
慢性腎疾患	0	9
非関節リウマチ	0	10

【表２３】

実施例５による増幅産物のプライマーおよびゲノム等価物

増幅産物の名称	増幅産物の大きさ	図中の増幅産物の名称	ゲノム増幅産物と等価の配列番号	ＰＣＲプライマー１	プライマー１の配列番号	ＰＣＲプライマー２	プライマー２の配列番号
gamma-rc1	493	1	129	gamma-rc1F	130	gamma-rc1R	131
gamma-rc2	428	2	132	gamma-rc2F	133	gamma-rc2R	134
gamma-3-2	557	3	135	gamma-3F_2	136	gamma-3R	137
gamma-4	556	4	138	gamma-4F	139	gamma-4R	140
epsilon-1	529	5	141	epsilon-1F	142	epsilon-1R	143
epsilon-rc2	550	6	144	epsilon-rc2F	145	epsilon-rc2R	146
epsilon-rc3	423	7	147	epsilon-rc3F	148	epsilon-rc3R	149
beta-rc1	282	8	150	beta-rc1F	151	beta-rc1R	152
alpha-1	459	9	153	alpha-1F	154	alpha-1R	155
alpha	260	10	156	alpha-F	157	alpha-R	158

注）名称中「rc」とある増幅産物はEns2鎖から増幅され、その他はEns1鎖から増幅された。

【表２４－１】

実施例６によるオリゴマー

ゲノム標的配列の配列番号	オリゴマーの配列番号	配列	オリゴマーの種類	融解温度
159	204	ggtgggtggttagtgaa	Forward Primer	44,3
	205	ttattataacaataatacctaaaaaaaa	Reverse Primer	46,06
	206	ggtgagtaagcgtttacgtcg	Probe	54,26
	207	cgagcgtcggggagg	Probe	52,37
	208	aaaacacatcaaaaccacaaaatttacaaaaacacaaca	Blocker	59,78
	209	tttagtatgtttttaattagagtgttaa	Forward Primer	49,12

【表２４－２】

	210	cctaacaaacttaactactccc	Reverse Primer	48,61
	211	cgggatttaggcggtcg	Probe	51,86
	212	attttcggaggttttcgattagg	Probe	52,71
	213	ctcccaaaccctcattccaacccca	Blocker	58,58
	214	ccccaaaccctccc	Forward Primer	41,62
	215	tttgtttaggaatttgtagttgt	Reverse Primer	47,21
	216	cgggttaggaagttcgcg	Probe	52,98
	217	gacgtcgcgattgttttttg	Probe	51,64
	218	ccccaccacaaacacctaacctcccc	Blocker	59,6
160	219	ccctctacctccctact	Forward Primer	46,15
	220	ggagagaataggggt	Reverse Primer	42,66
	221	ggtggggcgtcgtcg	Probe	51,26
	222	cgttacggtttttggtgtcg	Probe	51,77
	223	caaactaaacctatcaaaaatcttttacaatcaacaaccc	Blocker	60,64
161	224	ctaaaccaaataaaaaaaaataaaaac	Forward Primer	46,6
	225	gatgggtaggtatagattttag	Reverse Primer	46,36
	226	ggatttttttcgaagcgttttttt	Probe	51,89
	227	taagagcgcgttttttatcgaa	Probe	53,76
	228	aaataaaaacacactaaacacaccaccatacact	Blocker	58,53
162	229	ttttgagtgagtttttaaatttt	Forward Primer	45,08

【表２４－３】

	230	cctcctccctccactaac	Reverse Primer	48,57
	231	tcgtttttttggaatgggcg	Probe	51,75
	232	acgcgaggtacggattttagg	Probe	55,05
	233	taaccacctttctccatccaacatccca	Blocker	58,99
	234	agtggagggaaggatgt	Forward Primer	45,98
	235	aactctacaaacccaaaataaa	Reverse Primer	46,17
	236	gagttcgttttgtagggcgg	Probe	53,18
	237	cgggcggttttggg	Probe	46,11
	238	taaacaaccccactcaaaccaaacaccc	Blocker	57,79
	239	ctatatattataaaaattataatccacc	Forward Primer	46,43
	240	gggttaaggtgttggtagt	Reverse Primer	46,11
	241	cgttagttttcggtaggtaggacg	Probe	56,41
	242	cgcggttgtttggcg	Probe	49,99
	243	ccacccaataacaacaaaacataccaccaattactaa	Blocker	60,46
163	244	tacccttaataaaaaaactcc	Forward Primer	43,53
	245	ttaggttgaggttggaaag	Reverse Primer	46,08
	246	cgaaggggttagttgtcgttga	Probe	54,56
	247	cgttagtacgtagatgtaattggttttcg	Probe	57,45
	248	ctcccacacctacaaaccaacactccacaa	Blocker	61,25

【図面の簡単な説明】

【０３３８】

【図１】セプチン９およびＱ９ＨＣ７４遺伝子転写物のアンサンブルヒトゲノムアノテーションを示す。配列番号２および配列番号３の相対的位置も示される。

【図２】３つのプロットを提供する。左の２つのプロットは実施例２の結腸直腸癌腫および血液試料中の配列番号１の分析（分析２）の感度を示す。右のプロットは結腸直腸癌腫検出のＲＯＣを提供する。

【図３】実施例４の他の癌で測定されたメチル化レベルを示す。

【図４】実施例４の他の非癌性疾患で測定されたメチル化レベルを示す。

【図５】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定さ

れたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、１０％～２０％のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl分析法で）４つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。
【図６】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、１０％～２０％のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl分析法で）４つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。
【図７】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、１０％～２０％のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl分析法で）４つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。
【図８】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、１０％～２０％のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl分析法で）４つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。
【図９】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、１０％～２０％のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl分析法で）４つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。
【図１０】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、１０％～２０％のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl分析法で）４つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する

。
【図１１】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、１０％～２０％のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl分析法で）４つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。
【図１２】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、１０％～２０％のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl分析法で）４つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。
【図１３】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、２０％以上のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl（商標）分析法で）２つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。
【図１４】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、２０％以上のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl（商標）分析法で）２つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。
【図１５】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、２０％以上のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl（商標）分析法で）２つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供

する。
【図１６】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、２０％以上のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl（商標）分析法で）２つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。
【図１７】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、２０％以上のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl（商標）分析法で）２つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。
【図１８】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、２０％以上のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl（商標）分析法で）２つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。
【図１９】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、２０％以上のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl（商標）分析法で）２つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。
【図２０】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、２０％以上のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl（商標）分析法で）２つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供

する。
【図２１】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、３人の健康な被検者から得た血液試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。
【図２２】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、３人の健康な被検者から得た血液試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。
【図２３】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、１０％以下（ただし、０％以上）のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl分析法で）６つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。
【図２４】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、１０％以下（ただし、０％以上）のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl分析法で）６つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。
【図２５】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、１０％以下（ただし、０％以上）のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl分析法で）６つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。
【図２６】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリック

スの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、１０％以下（ただし、０％以上）のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl分析法で）６つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。

【図２７】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、１０％以下（ただし、０％以上）のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl分析法で）６つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。

【図２８】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、１０％以下（ただし、０％以上）のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl分析法で）６つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。

【図２９】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、１０％以下（ただし、０％以上）のメチル化を有すると既に定量された（HeavyMethyl分析法で）６つの試料中の表２３に記載されるゲノム配列の重亜硫酸塩変換増幅産物の配列決定の概観を提供する。

【図３０】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、それぞれ３つのプロットを提供する。左の２つのプロットは実施例２の結腸直腸癌腫および血液試料中の表２３の分析感度を示す。上部プロットは２つの試料タイプの二成分分布を示し、一方、より低いプロットは多クラス分布を提供する。前記プロットのＹ－軸はＸ－軸上に示される定量値以上のメチル化レベルを有すると分析された試料の割合を示す。右の

プロットは結腸直腸癌種検出のＲＯＣを提供する。
【図３１】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、それぞれ３つのプロットを提供する。左の２つのプロットは実施例２の結腸直腸癌腫および血液試料中の表２３の分析感度を示す。上部プロットは２つの試料タイプの二成分分布を示し、一方、より低いプロットは多クラス分布を提供する。前記プロットのＹ－軸はＸ－軸上に示される定量値以上のメチル化レベルを有すると分析された試料の割合を示す。右のプロットは結腸直腸癌種検出のＲＯＣを提供する。
【図３２】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、それぞれ３つのプロットを提供する。左の２つのプロットは実施例２の結腸直腸癌腫および血液試料中の表２３の分析感度を示す。上部プロットは２つの試料タイプの二成分分布を示し、一方、より低いプロットは多クラス分布を提供する。前記プロットのＹ－軸はＸ－軸上に示される定量値以上のメチル化レベルを有すると分析された試料の割合を示す。右のプロットは結腸直腸癌種検出のＲＯＣを提供する。
【図３３】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、それぞれ３つのプロットを提供する。左の２つのプロットは実施例２の結腸直腸癌腫および血液試料中の表２３の分析感度を示す。上部プロットは２つの試料タイプの二成分分布を示し、一方、より低いプロットは多クラス分布を提供する。前記プロットのＹ－軸はＸ－軸上に示される定量値以上のメチル化レベルを有すると分析された試料の割合を示す。右のプロットは結腸直腸癌種検出のＲＯＣを提供する。
【図３４】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、それぞれ３つのプロットを提供する。左の２つのプロットは実施例２の結腸直腸癌腫および血液試料中の表２３の分析感度を示す。上部プロットは２つの試料タイプの二成分分布を示し、一方、より低いプロットは多クラス分布を提供する。前記プロットのＹ－軸はＸ－軸上に示される定量値以上のメチル化レベルを有すると分析された試料の割合を示す。右のプロットは結腸直腸癌種検出のＲＯＣを提供する。
【図３５】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリック

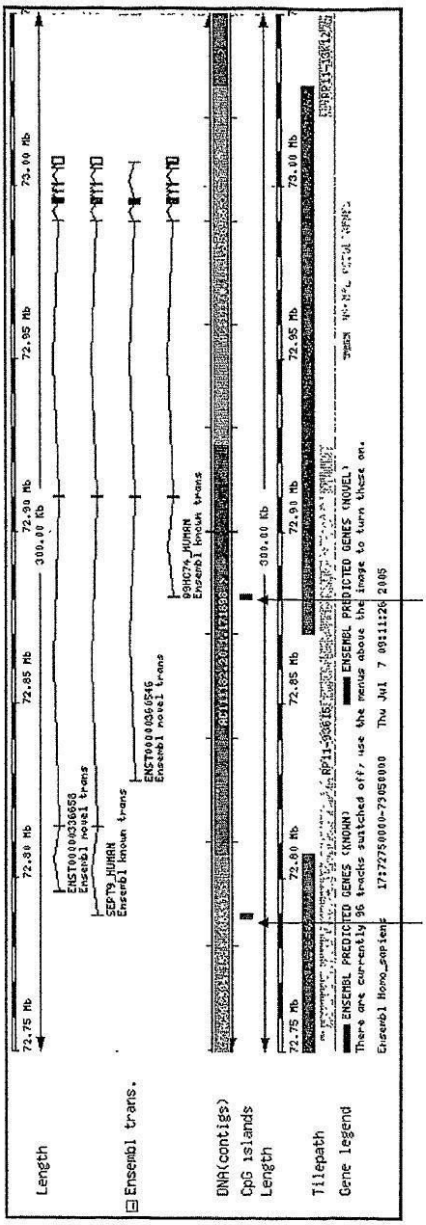
スの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、それぞれ３つのプロットを提供する。左の２つのプロットは実施例２の結腸直腸癌腫および血液試料中の表２３の分析感度を示す。上部プロットは２つの試料タイプの二成分分布を示し、一方、より低いプロットは多クラス分布を提供する。前記プロットのＹ－軸はＸ－軸上に示される定量値以上のメチル化レベルを有すると分析された試料の割合を示す。右のプロットは結腸直腸癌種検出のＲＯＣを提供する。

【図３６】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、それぞれ３つのプロットを提供する。左の２つのプロットは実施例２の結腸直腸癌腫および血液試料中の表２３の分析感度を示す。上部プロットは２つの試料タイプの二成分分布を示し、一方、より低いプロットは多クラス分布を提供する。前記プロットのＹ－軸はＸ－軸上に示される定量値以上のメチル化レベルを有すると分析された試料の割合を示す。右のプロットは結腸直腸癌種検出のＲＯＣを提供する。

【図３７】実施例５の重亜硫酸塩配列決定データのマトリックスを提供する。マトリックスの各コラムは、１つの試料の複製物の配列決定データを示し、各試料の全複製物は１つのブロックで一緒にグループ化されている。マトリックスの各列は、断片内の１つのＣｐＧ部位を示す。増幅産物のＣｐＧ数はマトリックスの左に示される。各ＣｐＧ位置で測定されたメチル化の量は、薄いグレー（０％メチル化）から中程度のグレー（５０％メチル化）から濃いグレー（１００％メチル化）の色で示されている。いくつかの増幅産物、試料またはＣｐＧ位置はうまく配列決定されず、これらは白色で示されている。また、それぞれ３つのプロットを提供する。左の２つのプロットは実施例２の結腸直腸癌腫および血液試料中の表２３の分析感度を示す。上部プロットは２つの試料タイプの二成分分布を示し、一方、より低いプロットは多クラス分布を提供する。前記プロットのＹ－軸はＸ－軸上に示される定量値以上のメチル化レベルを有すると分析された試料の割合を示す。右のプロットは結腸直腸癌種検出のＲＯＣを提供する。

【図１】

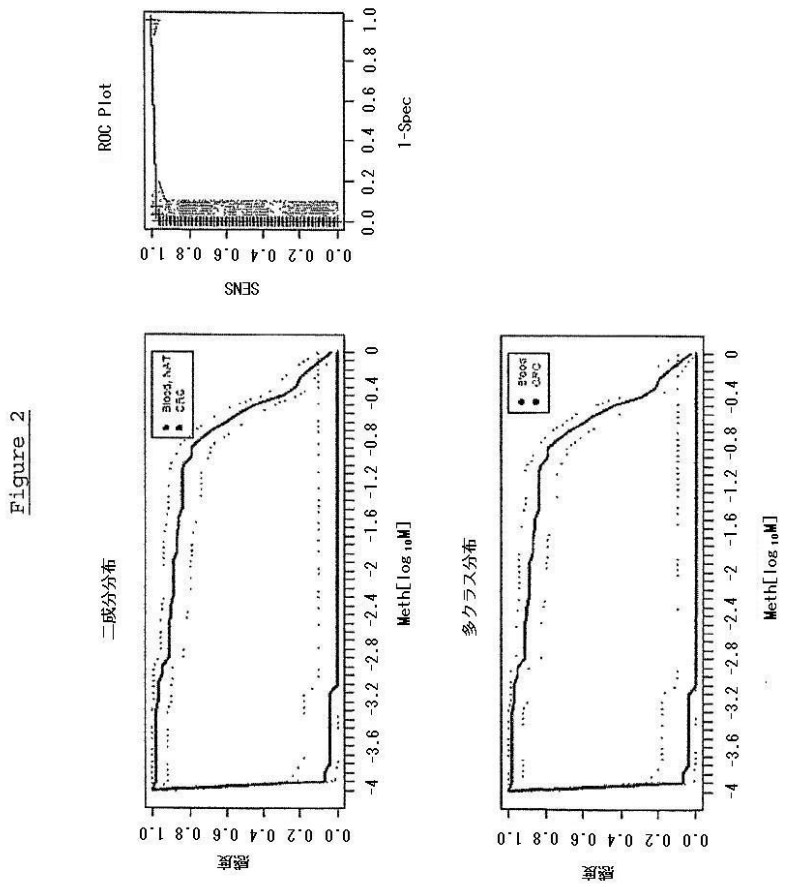
Figure 1



配列番号：2

配列番号：3

【図２】


Figure 2
二成分分布
Blood,NAT
CRC
頻度
Meth[log10M]
多クラス分布
Blood
CRC
頻度
Meth[log10M]
ROC Plot
SENS
1-Spec

【図３】

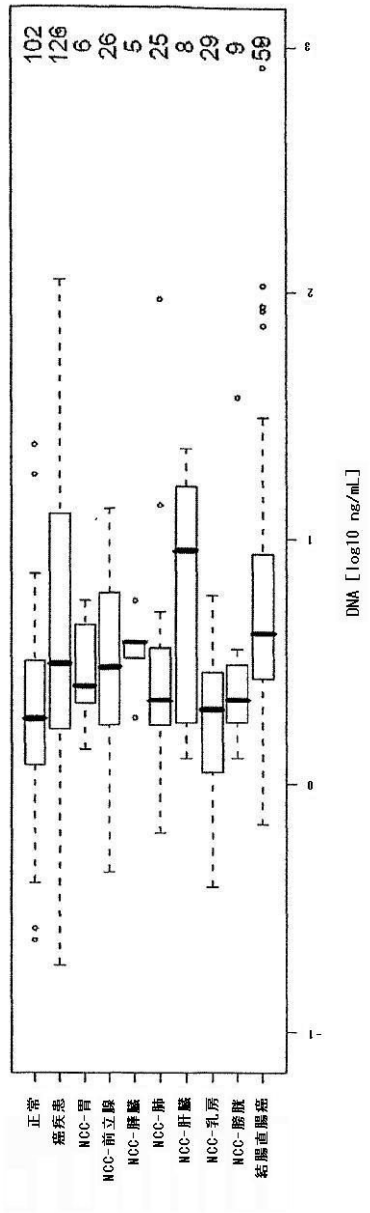
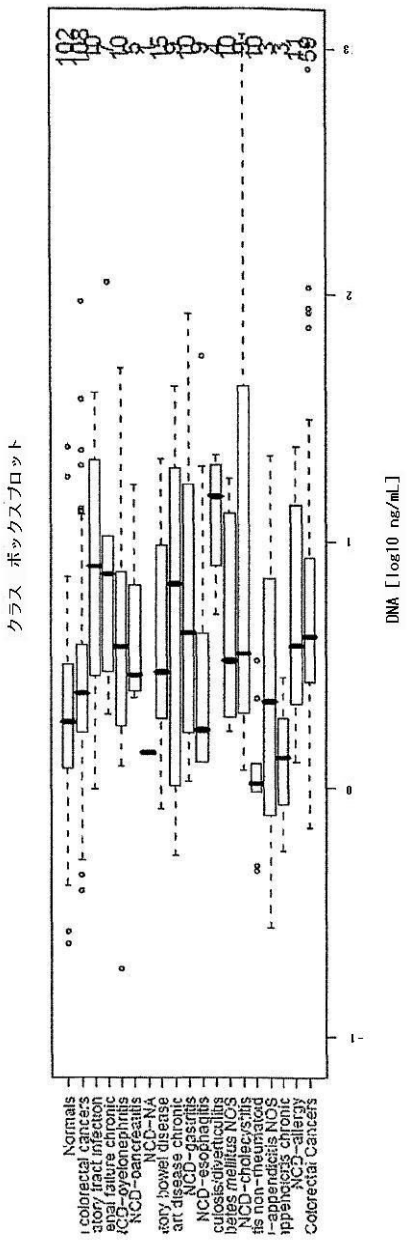

クラス ボックスプロット
DNA [log10 ng/mL]
102
126
6
26
5
25
8
29
9
59
正常
癌疾患
NCC-胃
NCC-前立腺
NCC-膵臓
NCC-肺
NCC-肝臓
NCC-乳房
NCC-膀胱
結腸直腸癌

Figure 3

【図４】

Figure 4


クラス ボックスプロット
DNA [log10 ng/mL]
Normals
colorectal cancers
atory tract infection
enal failure chronic
CD-pyelonephritis
NCD-pancreatitis
NCD-NA
atory bowel disease
art disease chronic
NCD-gastritis
NCD-esophagitis
culosis-pleuritis
bales-meritis NOS
NCD-cholecystitis
tis non-rheumatoid
i-appendicitis NOS
ppendicitis chronic
NCD-allergy
Colorectal Cancers

【図５】

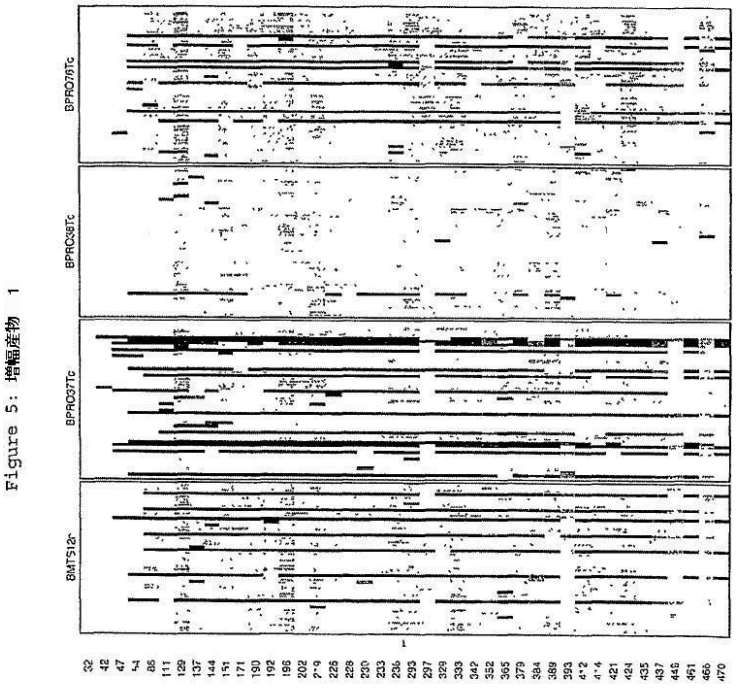


Figure 5: 増幅産物 1

【図６】

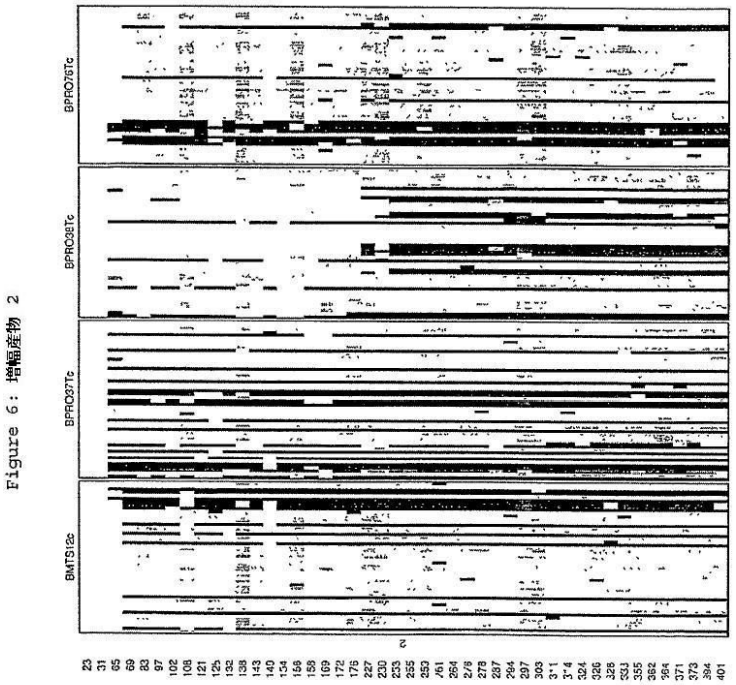


Figure 6: 増幅産物 2

【図７】

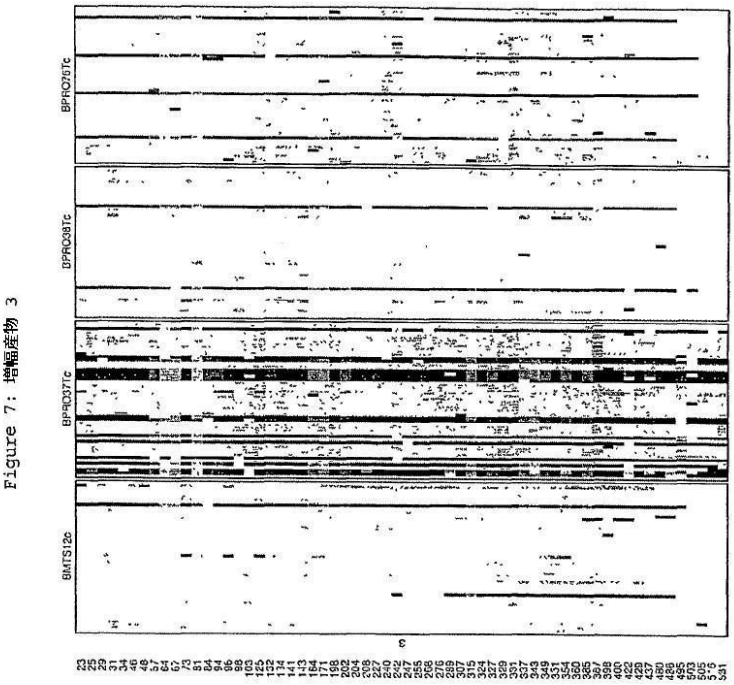


Figure 7: 増幅産物 3

【図８】

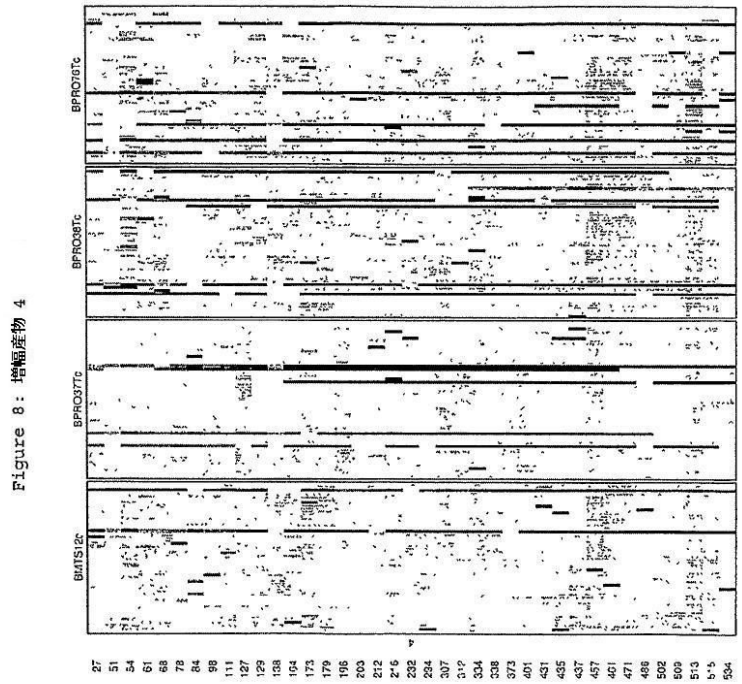


Figure 8: 増幅産物 4

【図９】

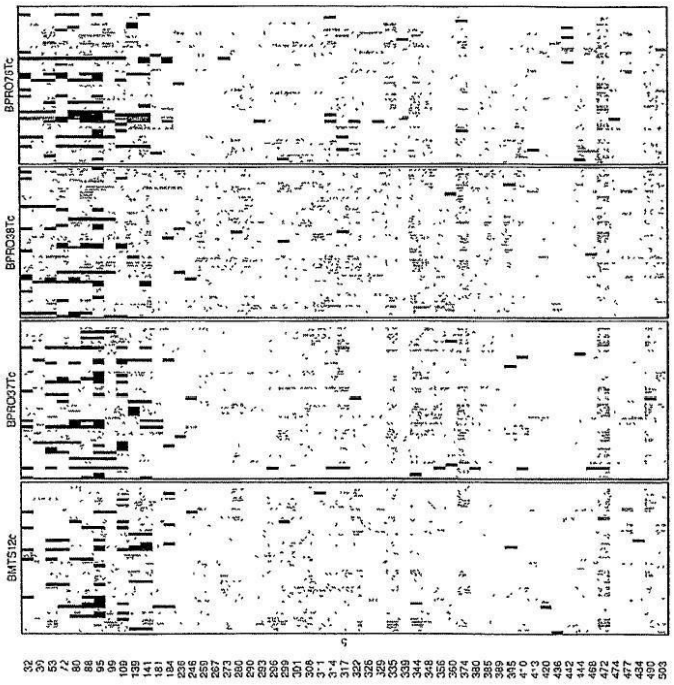


Figure 9: 増幅産物 5

【図１０】

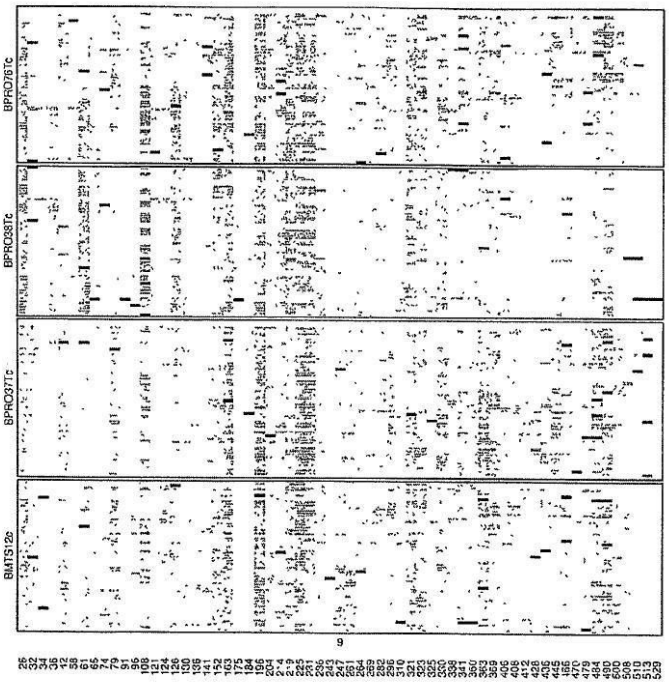


Figure 10: 増幅産物 6

【図１１】

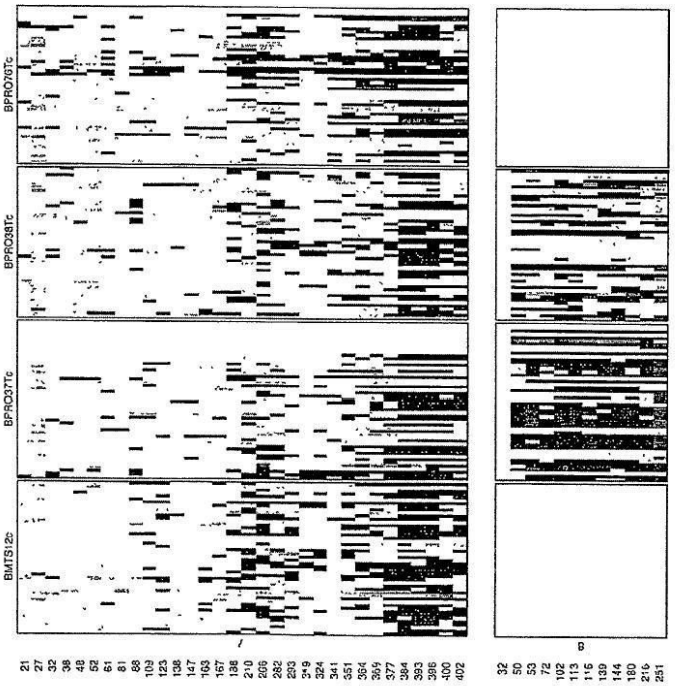


Figure 11: 増幅産物 7及び8

【図１２】

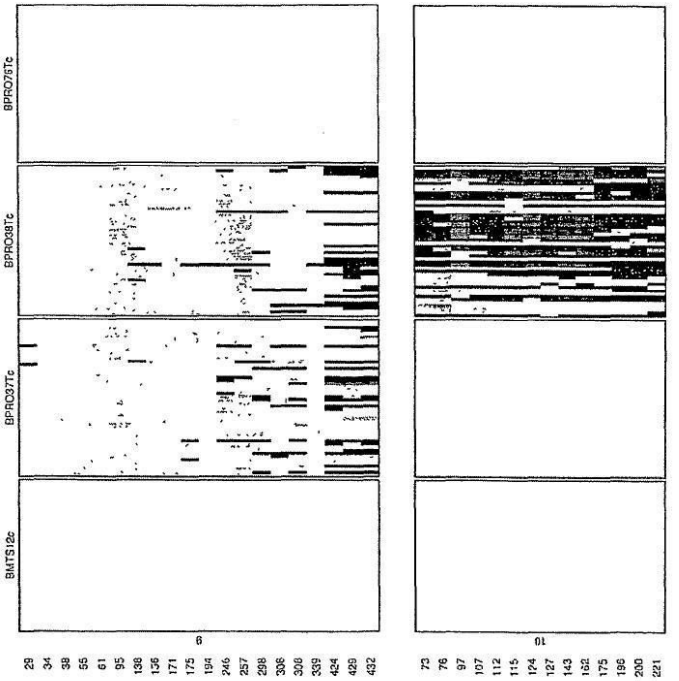


Figure 12: 増幅産物 9及び10

【図１３】

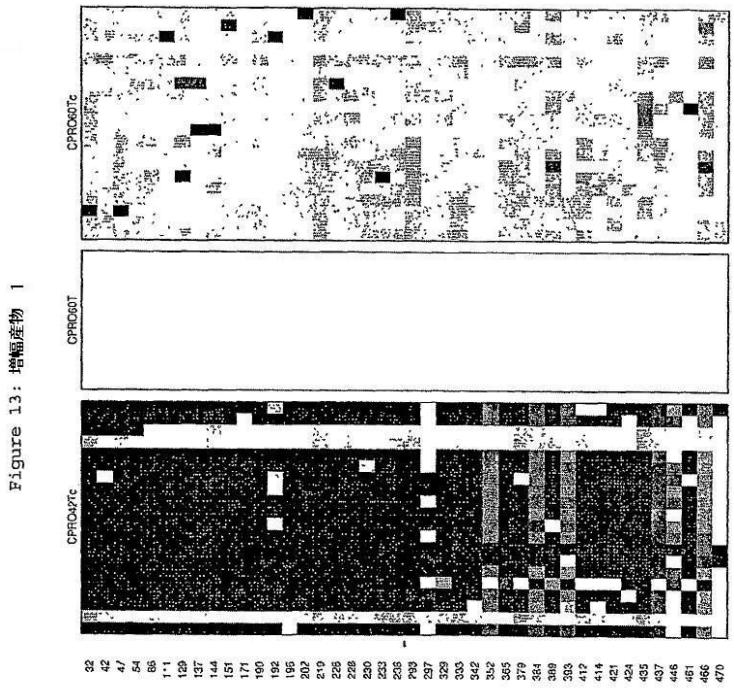


Figure 13: 増幅産物 1

【図１４】

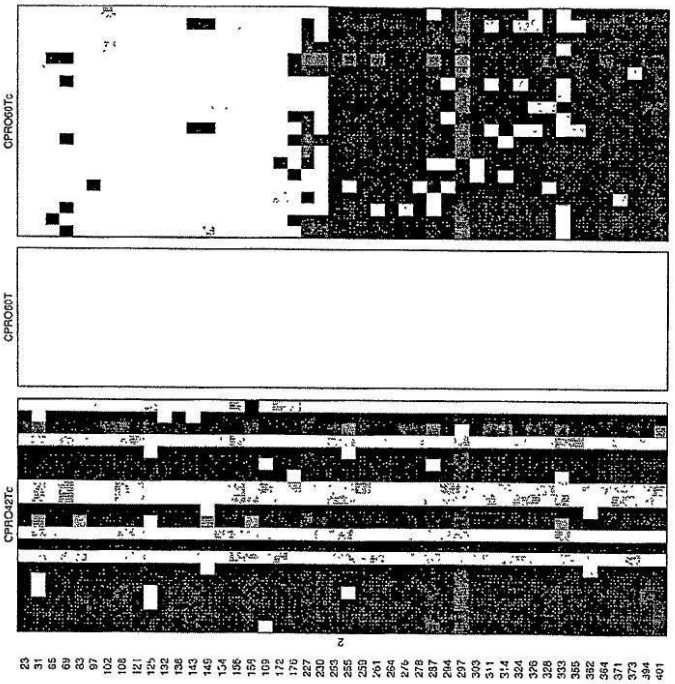


Figure 14: 増幅産物 2

【図１５】

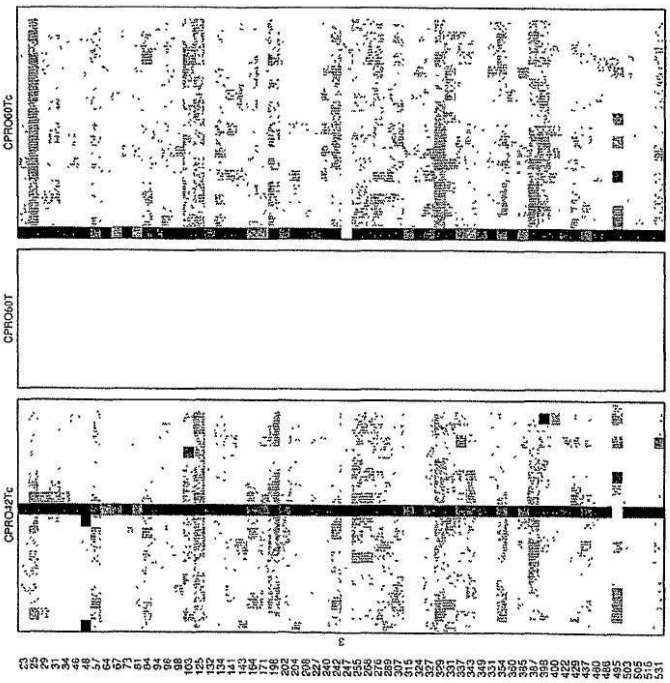


Figure 15: 増幅産物 3

【図１６】

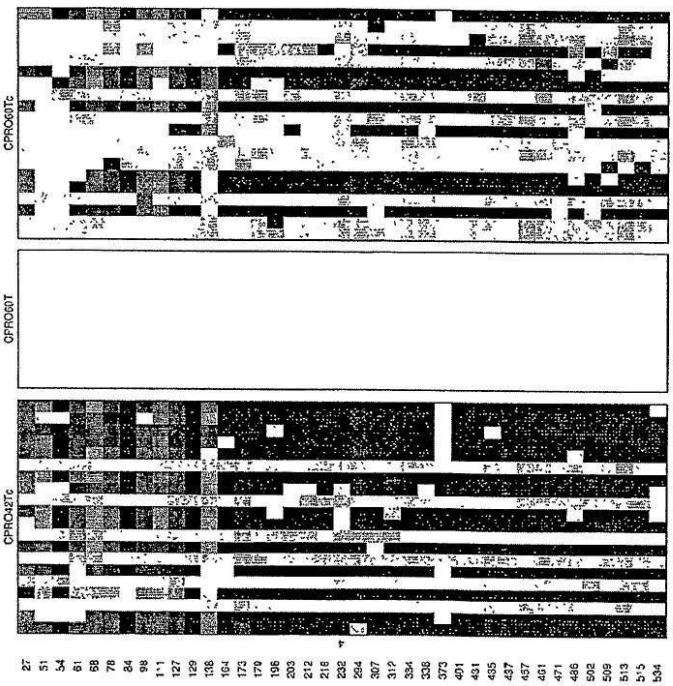


Figure 16: 増幅産物 4

【図１７】

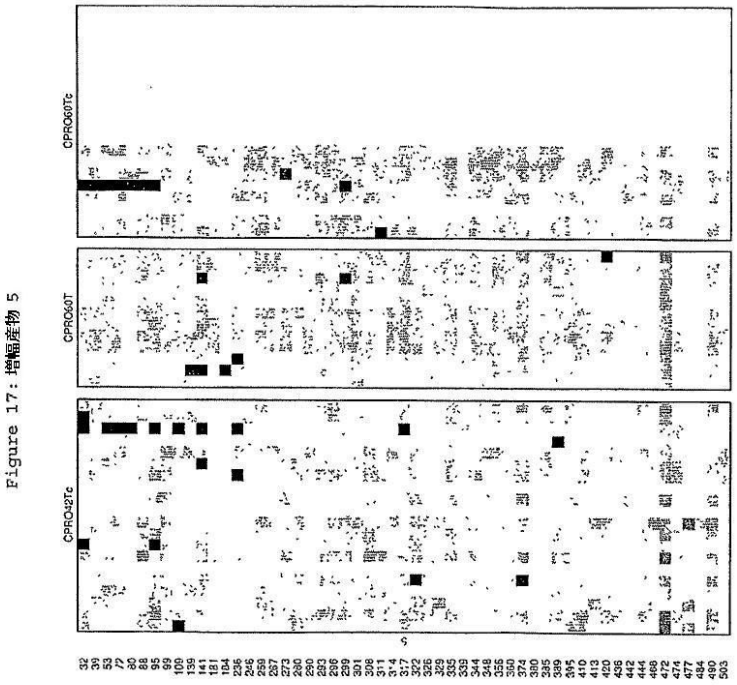


Figure 17: 増幅産物 5

【図１８】

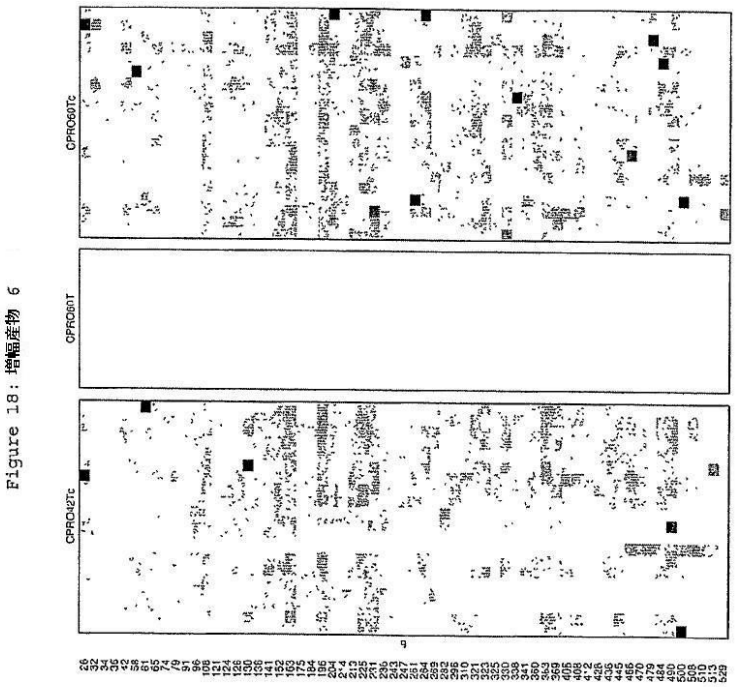


Figure 18: 増幅産物 6

【図１９】

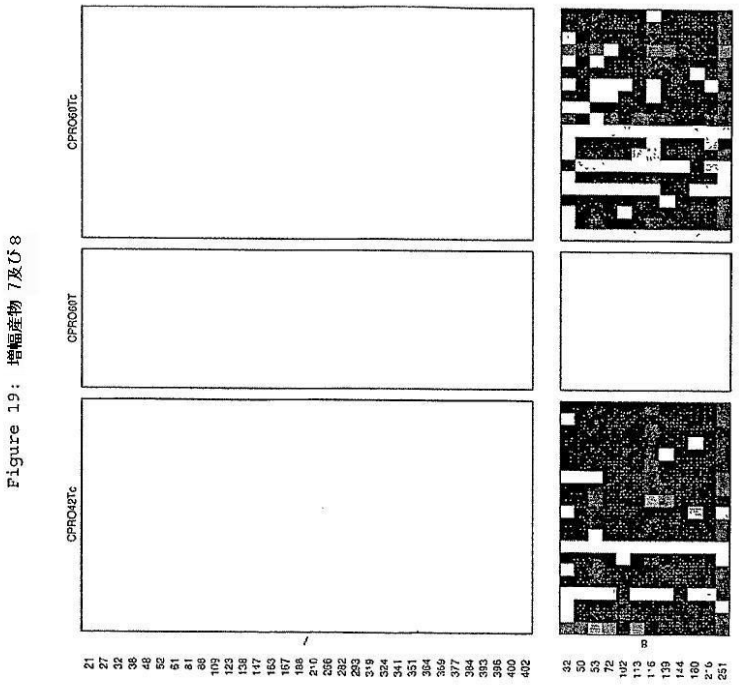


Figure 19: 増幅産物 7及び8

【図２０】

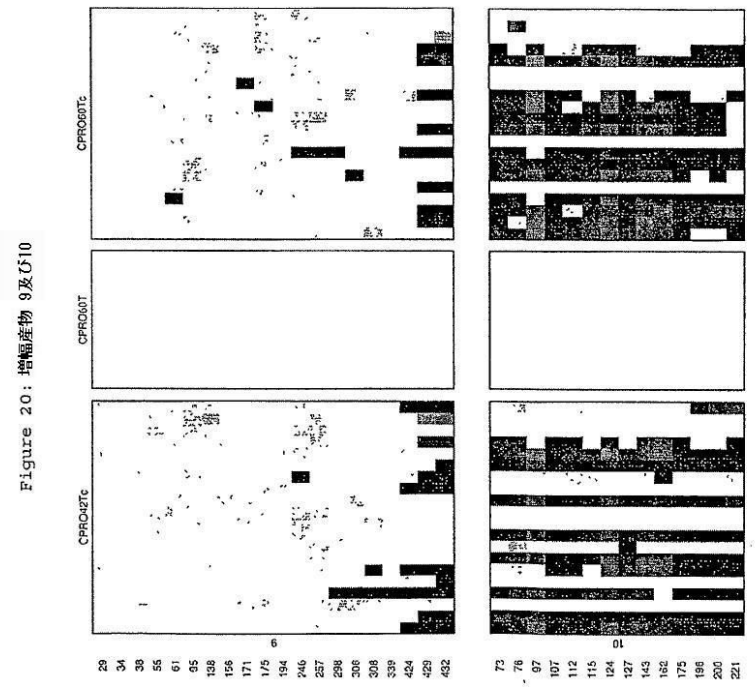


Figure 20: 増幅産物 9及び10

【図２１】

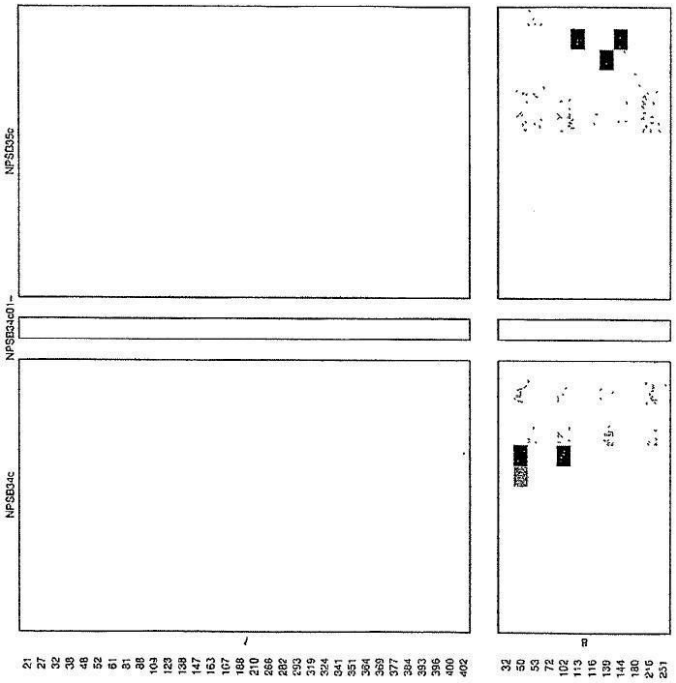


Figure 21: 増幅産物 7及び8

【図２２】

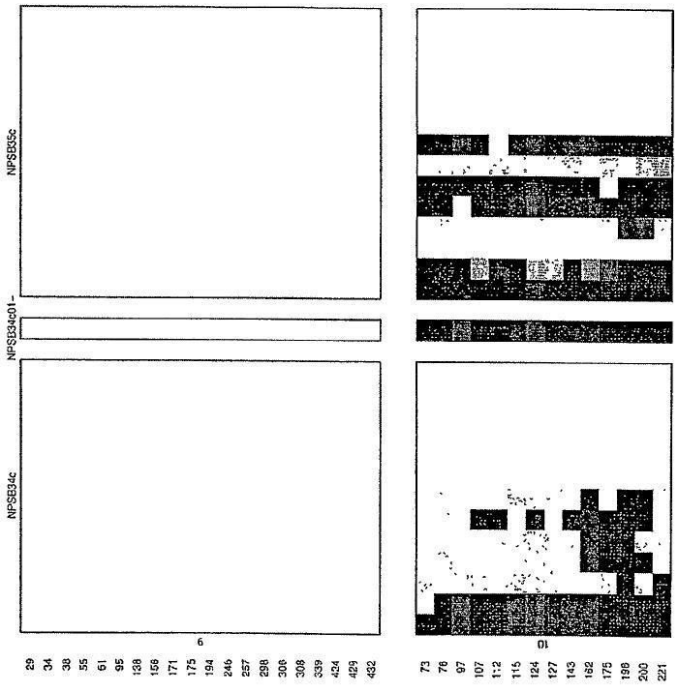
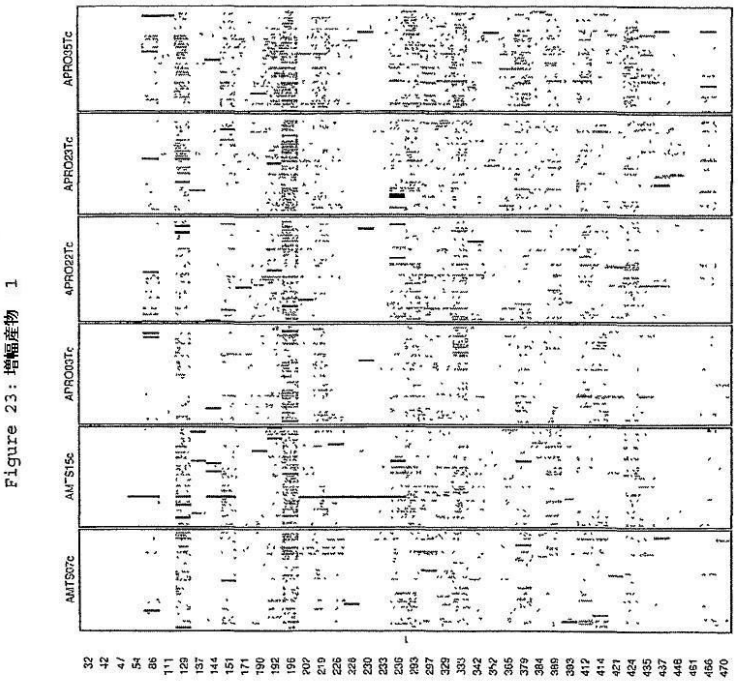
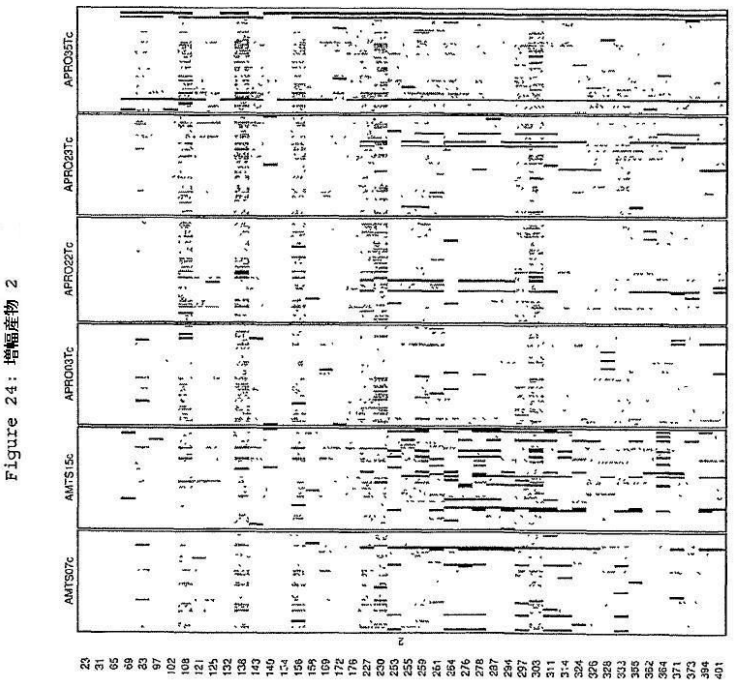


Figure 22: 増幅産物 9及び10

【図２３】


Figure 23: 増幅産物 1
AMTS07c
AMTS15c
APRO03Tc
APRO22Tc
APRO23Tc
APRO35Tc
1
32 42 47 54 86 111 129 137 144 151 171 190 192 196 202 219 226 228 230 233 236 293 297 329 333 342 342 365 379 384 388 393 412 414 421 424 435 437 448 451 466 470

【図２４】


Figure 24: 増幅産物 2
AMTS07c
AMTS15c
APRO03Tc
APRO22Tc
APRO23Tc
APRO35Tc
2
23 31 65 69 83 97 102 108 121 125 132 138 143 140 154 156 159 169 172 176 227 230 253 255 259 261 264 276 278 287 294 297 303 311 314 324 326 328 333 335 352 364 371 373 394 401

【図２５】

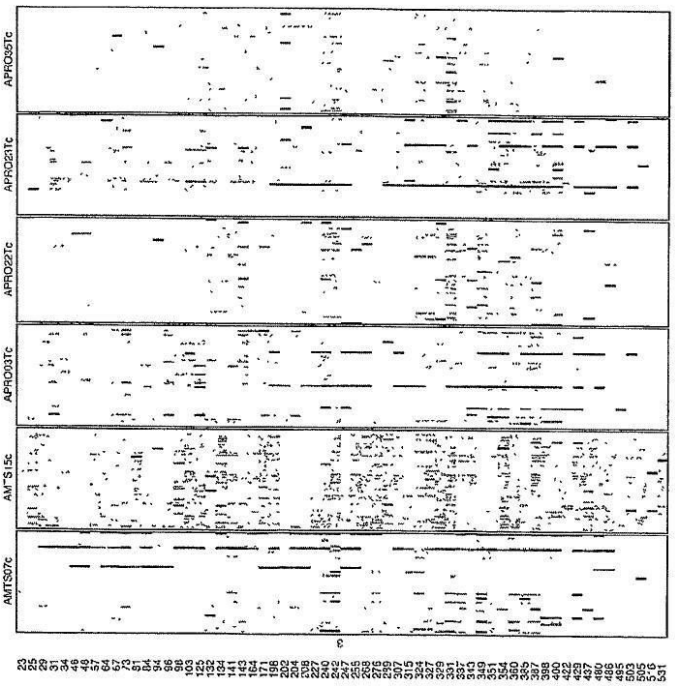


Figure 25: 増幅産物 3

【図２６】

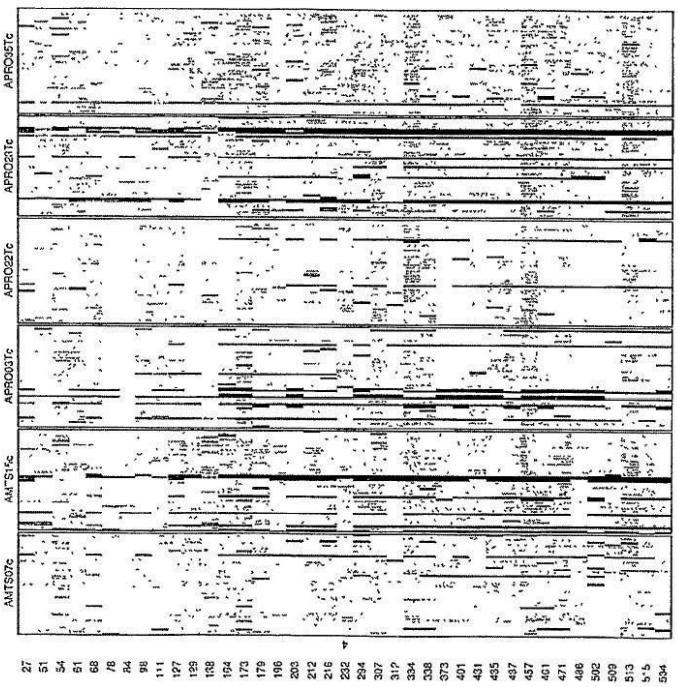


Figure 26: 増幅産物 4

【図２７】

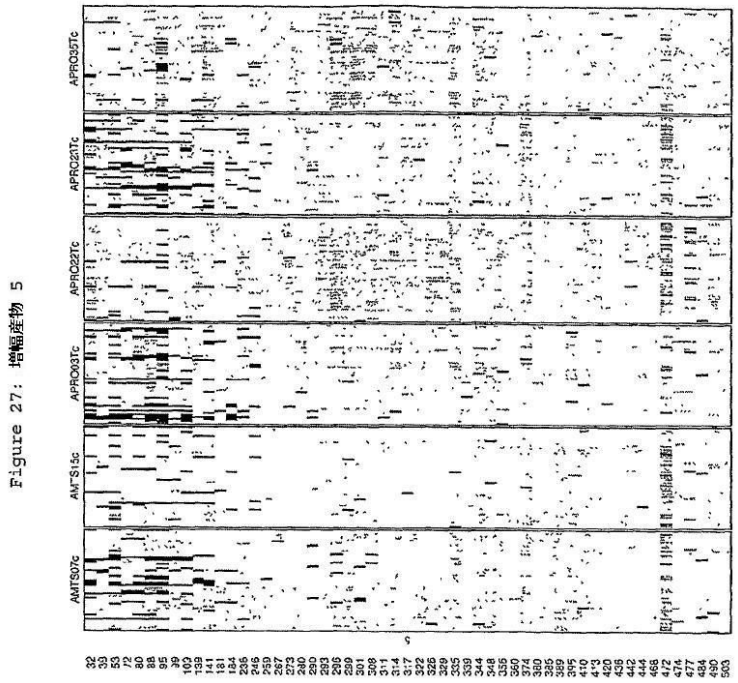


Figure 27: 増幅産物 5

【図２８】

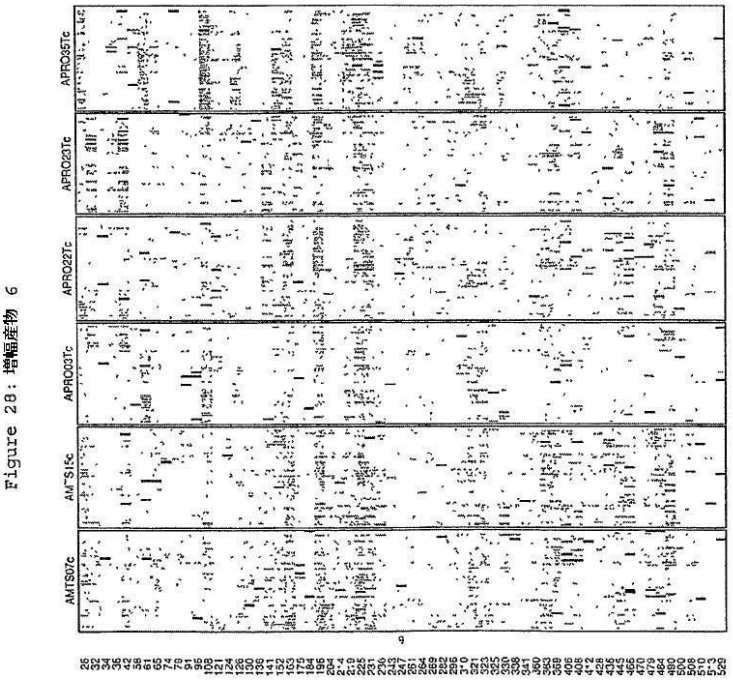
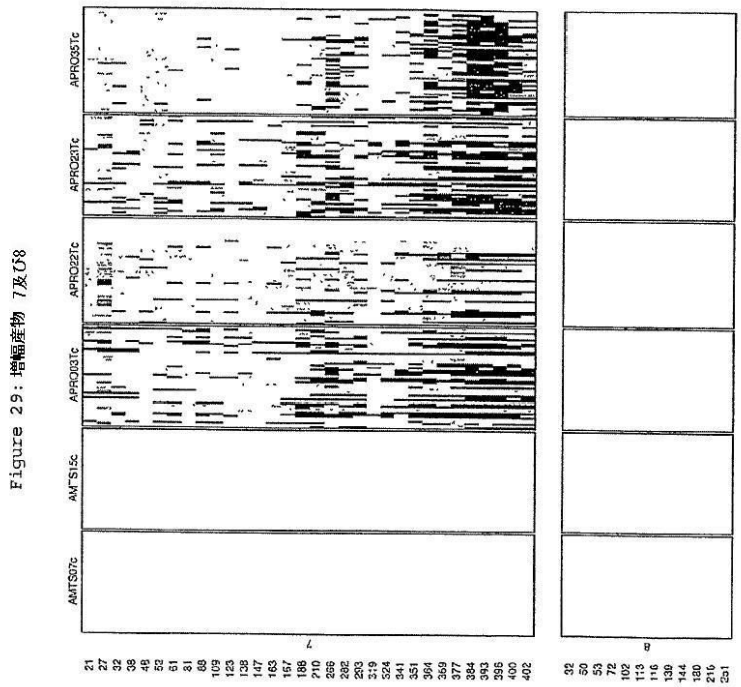
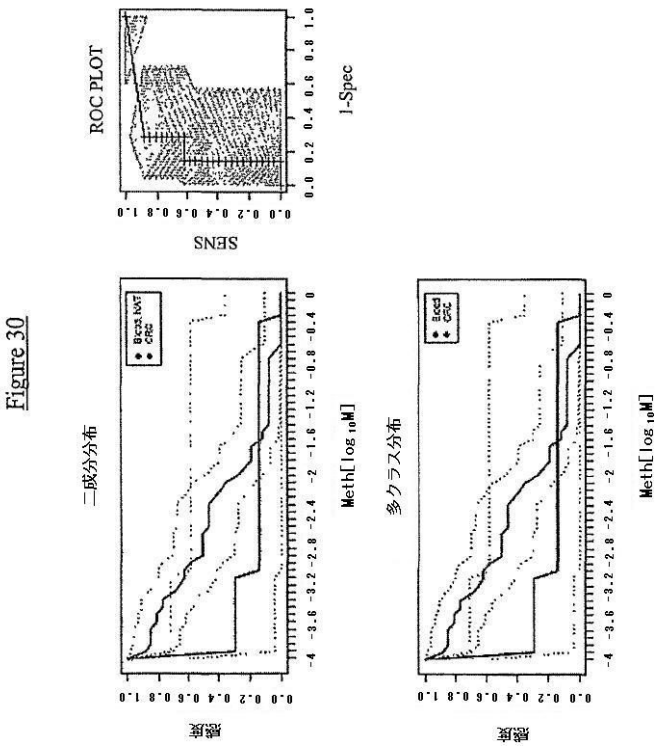


Figure 28: 増幅産物 6

【図２９】

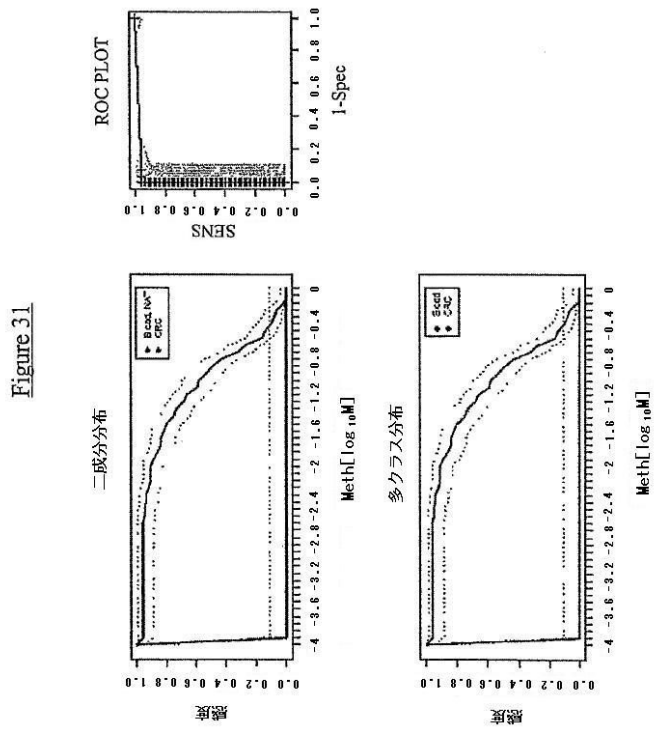

Figure 29: 増幅産物 7及び8
AMTS07c
AMTS15c
APRO03Tc
APRO22Tc
APRO23Tc
APRO35Tc
7
8

【図３０】


Figure 30
ROC PLOT
SENS
1-Spec
二成分分布
多クラス分布
感度
Meth[log10M]

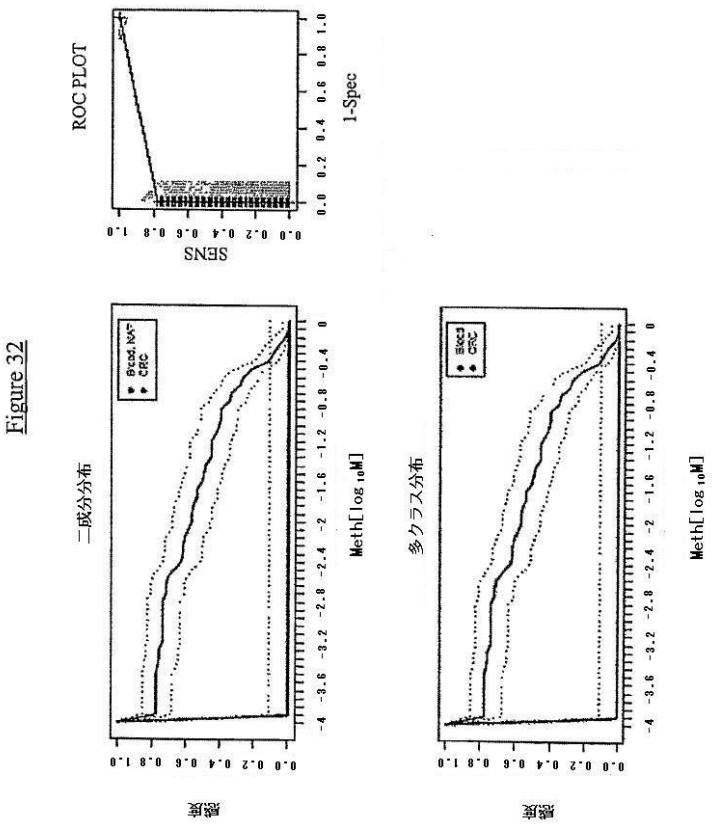
【図３１】

Figure 31



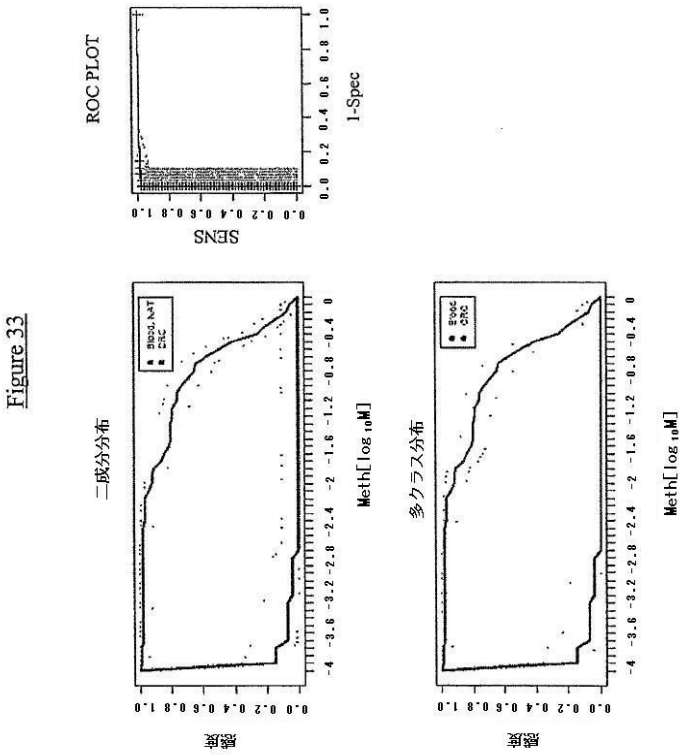
【図３２】

Figure 32



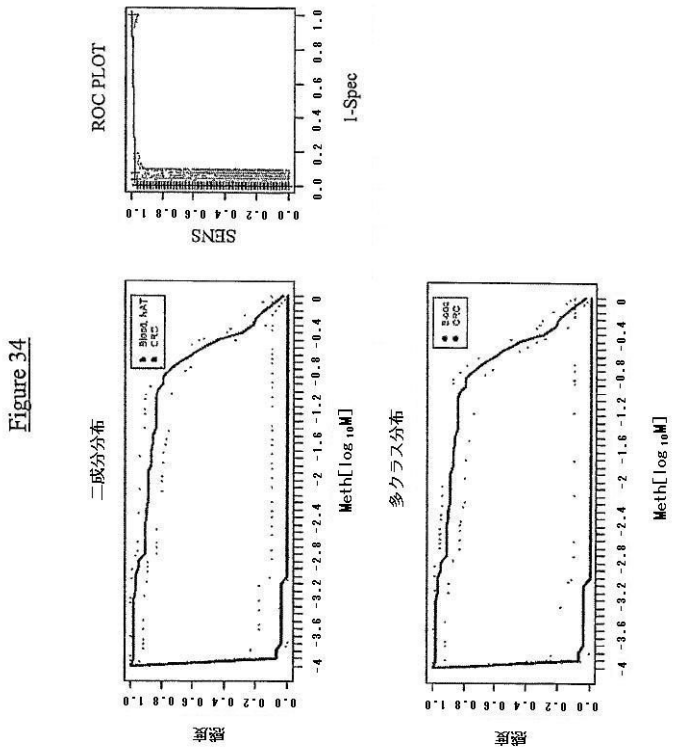
【図３３】

Figure 33



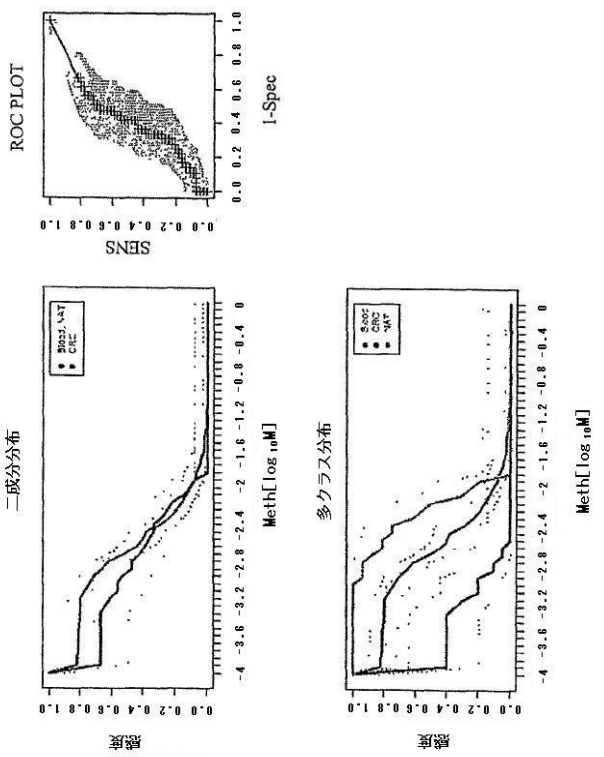
【図３４】

Figure 34



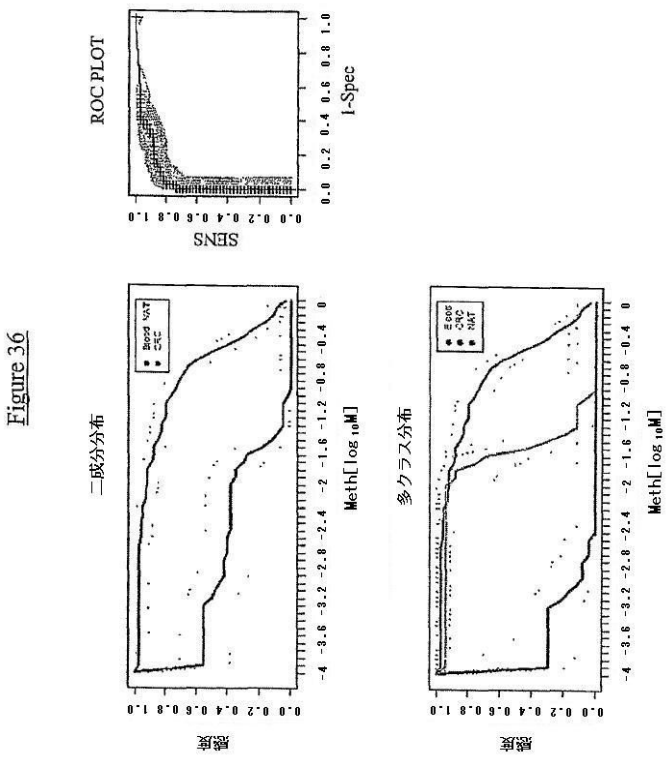
【図３５】

Figure 35



【図３６】

Figure 36



【図３７】

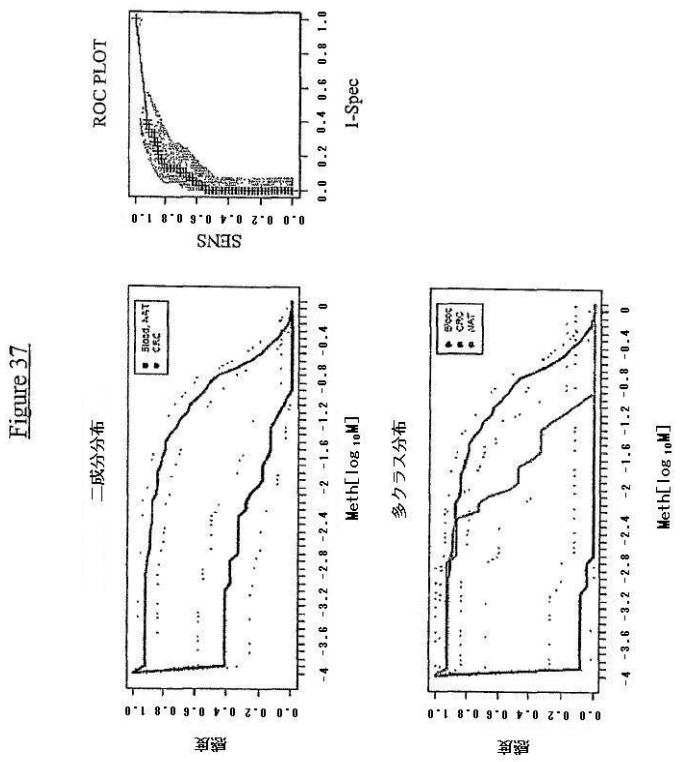


Figure 37

【配列表】

0005341506000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/697,521
(32)優先日 平成17年7月8日(2005.7.8)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/704,860
(32)優先日 平成17年8月1日(2005.8.1)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/709,318
(32)優先日 平成17年8月17日(2005.8.17)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/723,602
(32)優先日 平成17年10月4日(2005.10.4)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/787,402
(32)優先日 平成18年3月30日(2006.3.30)
(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ヒルドマン，トーマス
ドイツ，１０９６７ ベルリン，ハーゼンハイデ ６７
(72)発明者 レシェ，ラルフ
ドイツ，１３１５６ ベルリン，プラタネンシュトラーセ．８９アー
(72)発明者 ロフトン－デイ，キャシー
アメリカ合衆国，ワシントン ９８０３６，ブライアー，２３９０８，３５ス アベニュー ウエスト
(72)発明者 モデル，ファビアン
アメリカ合衆国，ワシントン ９８１２２，シアトル，１７３６ ベルモント アベニュー，エーピーティー．３０５
(72)発明者 シュースター，マティアス
ドイツ，１３１５６ ベルリン，プラタネンシュトラーセ．８９アー
(72)発明者 スレドジィウスキ，アンドリュー
アメリカ合衆国，ワシントン ９８１７７，ショアライン，１７７３６ １５ス アベニュー エヌ．ダブリュー．
(72)発明者 ソン，シャオリン
アメリカ合衆国，ワシントン ９８０７２，ウッジンビル，１５５０１ １３２エヌディー プレース エヌイー
(72)発明者 テツナー，レイモ
ドイツ，１０４３９ ベルリン，クーグラー シュトラーセ．３３

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 米国特許第０６７８３９３３（ＵＳ，Ｂ１）
国際公開第０３／０４２６６１（WO，Ａ１）
特表２００５－５１５７８７（ＪＰ，Ａ）
国際公開第０４／０７４４４１（WO，Ａ１）
The Journal of Pathology，２００３年，Vol.201，p.581-588
Cancer Research，２０００年，Vol.60，p.4729-4734
Nucleic acids research，１９９６年，Vol.24，p.5064-5066
J. Hum. Genet.，２００６年 1月２５日，Vol.51，p.368-374

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１５／００
Ｃ１２Ｑ　１／６８
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）