

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6777757号
(P6777757)

(45) 発行日 令和2年10月28日 (2020. 10. 28)

(24) 登録日 令和2年10月12日 (2020. 10. 12)

(51) Int. Cl.

F I

G O 1 N 33/574 (2006. 01)

G O 1 N 33/574 A

G O 1 N 33/53 (2006. 01)

G O 1 N 33/574 Z

C 1 2 Q 1/6886 (2018. 01)

G O 1 N 33/53 D

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/6886 Z

A 6 1 K 45/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 15 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-549812 (P2018-549812)
 (86) (22) 出願日 平成29年3月22日 (2017. 3. 22)
 (65) 公表番号 特表2019-510974 (P2019-510974A)
 (43) 公表日 平成31年4月18日 (2019. 4. 18)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/056851
 (87) 国際公開番号 W02017/162755
 (87) 国際公開日 平成29年9月28日 (2017. 9. 28)
 審査請求日 令和2年3月12日 (2020. 3. 12)
 (31) 優先権主張番号 1604806.8
 (32) 優先日 平成28年3月22日 (2016. 3. 22)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 英国 (GB)

(73) 特許権者 517151969
 ベルジアン ポリション エスピーアール
 エル
 ベルギー ビーイー-5032 イスネス
 ルエ プホカス レジュネ 22
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹
 (72) 発明者 ジャコブ ビンセント ミカレフ
 ベルギー ビーイー-5032 イスネス
 ルエ プホカス レジュネ 22 シー
 /オー ベルジアン ポリション エスピ
 アールエル

早期審査対象出願

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌検出のためのヌクレオソーム転写因子複合体の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における癌の検出又は診断のための、生物学的液体中のバイオマーカーとしての組織特異的転写因子-ヌクレオソーム付加物又は転写補助因子-ヌクレオソーム付加物のインビトロにおける使用。

【請求項 2】

前記組織特異的転写因子-ヌクレオソーム付加物もしくは転写補助因子-ヌクレオソーム付加物が、前記対象における前記癌の発生部位を同定するために使用される、請求項1記載の使用。

【請求項 3】

対象において癌を検出し及び/又は癌の発生部位を決定するための方法であって：

(i) 該対象から得られた生物学的液体試料を、ヌクレオソームもしくはその成分、又はヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子もしくは補助因子へ結合する、第一の結合性物質と接触させる工程；

(ii) 該ヌクレオソーム又は試料を、該第一の結合性物質が該ヌクレオソームもしくはその成分へ結合する場合には、ヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子もしくは補助因子に結合する第二の結合性物質と、あるいは該第一の結合性物質がヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子もしくは補助因子に結合する場合には、ヌクレオソームもしくはその成分に結合する第二の結合性物質と、接触させる工程；並びに

(iii) 該第二の結合性物質の、該試料中の該付加された組織特異的転写因子もしくは補

助因子、ヌクレオソームもしくはその成分への結合を検出又は定量する工程：を含み；

ここで、ヌクレオソームに付加された該組織特異的転写因子もしくは補助因子の存在又はレベルが、該癌の発生部位の指標として使用される、前記方法。

【請求項 4】

(i)前記対象から得られた生物学的液体試料を、ヌクレオソームもしくはその成分へ結合する第一の結合性物質と接触させる工程；

(ii)該ヌクレオソーム又は試料を、ヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子もしくは補助因子に結合する第二の結合性物質と接触させる工程；並びに

(iii)該第二の結合性物質の、該試料中の該付加された組織特異的転写因子もしくは補助因子への結合を検出又は定量する工程：を含む、請求項3記載の方法。

10

【請求項 5】

(i)前記対象から得られた生物学的液体試料を、組織特異的転写因子もしくは補助因子に結合する第一の結合性物質と接触させる工程；

(ii)該ヌクレオソーム又は試料を、ヌクレオソームもしくはその成分に結合する第二の結合性物質と接触させる工程；並びに

(iii)該第二の結合性物質の、該試料中のヌクレオソームもしくはその成分への結合を検出又は定量する工程：を含む、請求項3記載の方法。

【請求項 6】

前記癌が、原発性癌である、請求項1又は2記載の使用、又は請求項3～5のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 7】

前記対象が、原発不明癌の転移性癌を伴う対象である、請求項1又は2記載の使用、又は請求項3～6のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

前記対象が、以前に癌と診断されている、請求項1又は2記載の使用、又は請求項3～7のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

前記対象が、バイオマーカーとして循環腫瘍DNA(ctDNA)を使用して、以前に癌と診断されている、請求項8記載の使用又は方法。

【請求項 10】

30

前記結合性物質が、抗体、抗体断片又はアプタマーである、請求項3～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

ヌクレオソーム又はその成分に結合する前記結合性物質が、特定のヒストン、ヒストン修飾物、ヒストン変種もしくはアイソフォームへ、又はDNAもしくはその成分へ結合するように方向付けられている、請求項3～10のいずれか一項記載の方法。

【請求項 12】

医学治療に関する適合性について動物又はヒト対象を評価するための方法であって：

(i)請求項3～11のいずれか一項記載の方法に規定されたように、該対象の生物学的液体中のヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子を検出又は測定する工程；並びに

40

(ii)該対象にとって好適な治療を決定するために、検出されたヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子の種類を使用する工程：を含む、前記方法。

【請求項 13】

動物又はヒト対象の治療をモニタリングするための方法であって：

(i)請求項3～11のいずれか一項記載の方法に規定されたように、該対象の生物学的液体中のヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子を検出又は測定する工程；

(ii)1回以上、該対象の生物学的液体中のヌクレオソームに付加された該組織特異的転写因子又は補助因子の検出又は測定を繰り返す工程；並びに

50

(iii) 該対象の状態の何らかの変化に関するパラメータとして、検出されたヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子のレベルの何らかの変化を使用する工程：を含む、前記方法。

【請求項14】

前記組織特異的転写因子が、GATA 3、CDX2、TTF-1、PAX8、WT1、NKX3.1、P63又はP40から選択される、請求項1又は2記載の使用、又は請求項3～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項15】

前記生物学的液体が、血液、血清又は血漿から選択される、請求項1又は2記載の使用、又は請求項3～14のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、侵襲性が最小の血液検査により、癌を検出するための方法、特に原発部位が不明の転移性癌疾患を伴う対象における原発性癌を同定するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

広範な免疫検定血液検査は、広範な臨床上の必要性に対処するために、一般に臨床使用されている。いくつかの具体例は、ウイルス性疾患、心筋梗塞、甲状腺疾患、不妊、婦人科的状態、炎症反応、免疫状態、アレルギー、薬物状態(医薬性、アンドロゲン性、運動能力向上性、及び快楽性)並びに更に多くを検出又は調査するための使用を含む。多くの診断器具会社により提供される自動化された免疫検定システムは、数百の免疫検定試験のメニューを有する。免疫検定試験の多くの利点は；わずか1滴の血液を必要とする患者への侵襲性が最小の様式と；大規模検査施設内で又は医師の診療所内で又は家庭内の使用様式で且つ全て低コストで実行することができる試験を可能にする極度の柔軟性を伴う；堅牢性及び信頼性と組合せられたそれらの極度の分析感度及び特異性を含む。それにもかかわらず、ただ一種の免疫検定血液検査が、癌検出に一般に臨床使用されている：前立腺癌のための前立腺特異抗原(PSA)試験。他の古典的タンパク質癌バイオマーカー、例えばCA125、CA19.9、CEA(癌胎児性抗原)及びAFP(アルファ-フェトプロテイン)などは、癌治療を

20

30

【0003】

循環している腫瘍細胞検出を基にした非免疫検定の血液ベースの癌検出法が開発されているが、しかし一般に臨床使用されていない。同様に、循環腫瘍DNA(ctDNA)、RNA又は他の循環核酸に関する方法が開発されているが、これらも広範には臨床使用されていない。多種多様な循環核酸の方法が存在する。その一部は、ctDNA配列突然変異に関連した癌の検出、又は癌に関連した他のDNA配列作用を基にしている。他の例は、癌に関連したメチル化されたDNA配列又は癌に関連したマイクロRNA配列の検出を基にした方法を含む。DNA異常は、全ての癌疾患の特徴である。癌細胞のDNAは、非限定的に、点突然変異、メチル化状態、転座、遺伝子コピー数、マイクロサテライト異常及びDNA鎖完全性を含む多くの様式で、健常な細胞のDNAとは異なる。これらの突然変異はいずれも、ctDNA試験に適用できる。

40

【0004】

癌が疾患の初期ステージで検出される場合、これは現在は、恐らく糞便試験、侵襲的内視鏡法、侵襲的生検法、潜在的に危険性のあるX線走査法、MRI走査法、子宮頸部塗抹試験又は症状によるものである。これらの方法は全て、侵襲性、不快感、患者のリスク、患者のコンプライアンス及び/又は高いコストの欠点を有する。一旦検出されたならば、現時点では癌は通常、生検時に摘出された腫瘍組織の免疫組織化学(IHC)試験により確認され且つ診断される。癌の初期での検出は、患者の転帰の改善、並びに経費のかかる後期ス

50

テージでの入院及び治療を避ける上での医療提供者に関する経済的恩恵に繋がる。残念ながら、現時点で癌は、原発性腫瘍の部位を超えて拡散される場合、疾患発症の後期ステージに達するまで、検出されないことが多く、且つ治療の選択肢は、より限定され、より高価となり、且つ効果が低く、患者の転帰不良に繋がる。より多く且つより良い癌血液検査の明らかに満たされていない医学的必要性が存在する。

【0005】

癌と診断された患者は、原発性癌が発生した臓器を超えて既に拡散している、後期ステージ又は転移性癌を示すことがある。多くの症例において、原発性癌が最初に発生した部位は、明確ではなく、且つこれらの症例は、原発不明癌(CUP)又は潜伏腫瘍(occult tumour)として知られている。これらの症例における原発性腫瘍部位の同定は、臨床との関連性が大きく、その理由は、癌は、例えばそれらが体の他の部位に拡散されていたとしても、それらの当初の発生部位に従い治療されるからである。これは特に、原発部位の癌腫が標的化されるべきであることを前提とした標的化療法に関してあてはまる。例えば、原発性肺癌が肝臓へ拡散した場合、これは肝臓転移又は続発を伴う肺癌である。この癌細胞は、癌性肺細胞であるので、これは肝臓癌ではない。

10

【0006】

対象が転移性癌を示す多くの症例において、原発性癌の部位は明確である。しかしCUPにおいては、原発性癌は決定することができない。これには、例えば、続発性癌は非常に迅速に成長するのに対し、原発性癌は依然小さく走査では可視できないので、あるいは原発性癌は、恐らく免疫攻撃又は原発性癌の剥落(例えば、結腸直腸癌は、腸壁から剥離し、且つ糞便と共に体外へ押し出される)のために消失したのでなど、数多くの理由を含む。

20

【0007】

現在、転移性疾患を呈している患者の原発性腫瘍は、患者の検査、患者の症状、走査及び生検時に摘出された腫瘍組織の免疫組織化学(IHC)試験により通常位置づけられる。原発性腫瘍部位は、組織特異的転写因子のIHCにより同定又は確認することができる。

【0008】

循環腫瘍DNA分析、又は他のバイオマーカー法は、癌の部位を同定することなく、対象における原発性癌の存在を明らかにすることができる。これは、対象が癌を有することは分かっているか又は有することが疑われるが、しかしその癌部位に関する知識がないCUP(転移が存在しない必要がある場合を除いて)と類似の状況に繋がる。例えば、ctDNA配列技術を用いて診断された癌は、癌の部位を示すことなく、癌の存在を示す、対象の血液中の遺伝子突然変異に関連した癌を同定することができる。類似の状況は、検出された腫瘍の部位を明らかにしない、循環腫瘍細胞技術又は他の癌検出法による癌の検出について起こり得る。

30

【0009】

ヒトの体は、数百種の細胞型を含んでいる。これらの細胞型は全て、同じゲノムを含んでいるが、広範に異なる表現型及び体内での異なる機能を有する。この表現型の多様性は、異なる細胞型におけるゲノムの差次的発現によるものである。差次的遺伝子発現の制御は、完全には理解されていないが、その基本的機構は、ユークロマチン又はヘテロロマチンとしてのクロマチンパッキングの制御、ヌクレオソームポジショニング及びヌクレアーゼ到達可能部位の制御、DNAのメチル化、並びにその周りにDNAが巻き付いたヌクレオソームのヒストン構造の変化、並びに転写因子及び転写補助因子の発現の変化、並びにそれらが結合する遺伝子との相互作用を含む、遺伝子と関連する多数の相互接続されたエピジェネティックシグナルによる遺伝子調節を含んでいる。

40

【0010】

ヌクレオソームは、クロマチン構造の基本単位であり、8種の高度に保存されたコアヒストンのタンパク質複合体(ヒストンH2A、H2B、H3及びH4の各々の対を含む)からなる。この複合体の周りには、DNAのおよそ146塩基対が巻き付いている。別のヒストンであるH1又はH5は、リンカーとして作用し、且つクロマチン凝縮に関与している。このDNAは、「ピ

50

ーズ-オン-ストリング」に似ていると言われることの多い構造で連続したヌクレオソームの周りに巻き付いており、且つこれは、オープン(open)又はユークロマチンの基本構造を形成している。凝縮された又はヘテロクロマチンにおいて、このストリングは、閉じた複雑な構造へ、コイル形成及びスーパーコイル形成される(Herranz及びEstellerの文献、2007)。

【 0 0 1 1 】

成人における正常細胞の代謝回転には、毎日数千億個の細胞の細胞分裂による創出、及び主にアポトーシスによる同等数の細胞死が関与している。アポトーシスの過程において、クロマチンは、モノヌクレオソーム及びオリゴヌクレオソームを含む断片へ破壊され、これらは細胞から放出される。通常の条件下で、これらは除去され、且つ健常対象において認められる循環ヌクレオソームのレベルは、低いことが報告されている。多くの癌、自己免疫疾患、炎症状態、脳卒中及び心筋梗塞を含む様々な状態の対象においては、上昇したレベルが認められる(Holdenrieder及びStieberの文献、2009)。

【 0 0 1 2 】

モノヌクレオソーム及びオリゴヌクレオソームは、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)により検出することができ、且ついくつかの方法が報告されている(Salgameらの文献、1997; Holdenriederらの文献、2001; van Nieuwenhuijzeらの文献、2003)。これらのアッセイは典型的には、捕獲抗体として抗-ヒストン抗体(例えば、抗-H2B、抗-H3又は抗-H1、H2A、H2B、H3及びH4)を、並びに検出抗体として抗-DNA又は抗-H2A-H2B-DNA複合抗体を利用する。リアルタイムPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)により測定された循環無細胞系ヌクレオソームレベルと循環DNAレベルのELISA結果の間の相関係数は、血清中 $r = 0.531$ 、及び血漿中 $r = 0.350$ であることが報告されている(Holdenriederらの文献、2005)。

【 0 0 1 3 】

ヌクレオソームELISA法は、細胞培養物において、主にアポトーシスを検出する方法として、使用され(Salgameらの文献、1997; Holdenriederらの文献、2001; van Nieuwenhuijzeらの文献、2003)、且つ血清及び血漿中の循環無細胞系ヌクレオソームの測定のためにも使用される(Holdenriederらの文献、2001)。死滅しつつある細胞により循環中に放出された無細胞系血清及び血漿ヌクレオソームレベルは、可能性のあるバイオマーカーとしてのそれらの使用を評価するために、数多くの異なる癌の研究においてELISA法により測定されている(Holdenriederらの文献、2001)。平均循環ヌクレオソームレベルは、ほとんどの試験された癌において、高いことが報告されている。最高の循環ヌクレオソームレベルは、肺癌対象において観察された。しかし悪性腫瘍を伴う患者は、かなり変動する血清ヌクレオソーム濃度を有することが報告され、並びに進行した腫瘍疾患を伴う患者の一部は、健常対象について測定された範囲内の低い循環ヌクレオソームレベルを有することがわかった(Holdenriederらの文献、2001)。このこと及び様々な非癌が上昇したヌクレオソームレベルを引き起こすという理由で、循環ヌクレオソームレベルは、臨床上、癌のバイオマーカーとしては使用されない(Holdenrieder及びStieberの文献、2009)。

【 0 0 1 4 】

ヌクレオソームの構造は、ヒストンタンパク質の転写後修飾(PTM)により、及び変種ヒストンタンパク質の封入により、変動することができる。ヒストンタンパク質のPTMは典型的には、8個のコアヒストンのテールで起こり、一般的な修飾は、リジン残基のアセチル化、メチル化又はユビキチン化に加え、アルギニン残基のメチル化及びセリン残基のリン酸化を含む。ヒストン修飾は、遺伝子発現のエピジェネティック調節に関与していることは知られている(Herranz及びEstellerの文献、2007)。ヌクレオソームの構造はまた、異なる遺伝子もしくはスプライシング産物であり、且つ異なるアミノ酸配列を有する代替ヒストンアイソフォーム又は変種の封入によっても、変動することができる。ヒストン変種は、個別の型に更に細分されている数多くのファミリーへ分類することができる。多数のヒストン変種のヌクレオチド配列が公知であり、且つ例えば、米国立ヒトゲノム研究所(NHGRI)ヒストンデータベース(Marino-Ramirez, L.らの文献、2011、及び<http://genome.nih.gov/histones/complete.shtml>)、GenBank(NIH遺伝子配列)データベース、EMBL

10

20

30

40

50

ヌクレオチド配列データベース、並びに日本DNAデータバンク (DDBJ) などにおいて公的に入手可能である。

【 0 0 1 5 】

正常細胞及び罹患細胞中に存在するヒストン変種及びヒストン修飾のパターンは、多くの研究(ほとんどは免疫組織化学的)において差異が示されている(Herranz及びEstellerの文献、2007)。臨床使用のための免疫組織化学的方法の一つの欠点は、組織試料の収集は、手術又は生検が関与し侵襲的であることである。

【 0 0 1 6 】

ヌクレオソーム構造及び位置により媒介されたエピジェネティックシグナル伝達に加え、細胞における遺伝子発現の制御も、ヌクレオソーム会合したDNAの構造への修飾により、例えばDNAのメチル化により、媒介される(Herranz及びEstellerの文献、2007)。DNAは、シトシンヌクレオチドの5位でメチル化され、5-メチルシトシンを形成し得ることは、先般から当該技術分野において公知である。全般的DNA低メチル化は、癌細胞の特徴である(Estellerの文献、2007、及びHervouetらの文献、2010)。全般的DNAメチル化は、免疫組織化学技術を用いて細胞において試験することができる。

【 0 0 1 7 】

長年、クロマチンは、核酸及びヒストンタンパク質に加え、その構成要素DNA及び/又はヒストンに結合された多数の非-ヒストンタンパク質を含むことがわかっている(Yoshida及びShimuraの文献、1972)。これらのクロマチン会合したタンパク質は、多種多様な型であり、且つ転写因子、転写増強因子、転写抑制因子、ヒストン修飾酵素、DNA損傷修復タンパク質及びその他多くのものを含む、様々な機能を有する。クロマチン結合したタンパク質の研究は、改変クロマチン免疫沈降(ChIP)法により大部分が実行されている。これらの方法は、当該技術分野において周知であるが、複雑で、煩雑であり且つ高価である。

【 0 0 1 8 】

典型的ChIP法において、細胞のクロマチンは架橋され、その結果全てのタンパク質成分及び核酸成分は、互いに共有結合される。次にクロマチンは剪断され、モノヌクレオソーム及びオリゴヌクレオソームの調製品を形成する。関心対象のタンパク質に対する抗体が、剪断されたクロマチンに添加され、タンパク質を含むそれらのクロマチン断片を免疫沈降させる。この抗体は、関心対象のタンパク質を含有するクロマチン複合体の単離を促進するために、通常固相(例えばプラスチックビーズ)に付着される。次に架橋は逆行され、このタンパク質は、プロテイナーゼによる消化により取り除かれる。クロマチン複合体に会合したDNAは、単離され且つ分析され、PCRと後続のゲル電気泳動、DNAシーケンシング(ChIP-Seq)又はDNAマイクロアレイ(ChIP-オン-チップ)を含む様々な技術のいずれかを使用し、DNA配列、特定のタンパク質結合に関連した遺伝子又は遺伝子座を決定する。これらのChIP法は、クロマチン結合したヒストンタンパク質に会合されたDNA配列を明らかにする。非-ヒストンタンパク質のヒストン及びヌクレオソームとの会合の研究を促進するために、ChIP法の改変法、例えば、ヒストン会合アッセイ(Ricke及びBielinskyの文献、2005)が開発されている。

【 0 0 1 9 】

同じく、ヌクレオソーム-タンパク質又はクロマトソーム-タンパク質の付加物の形状の非-ヒストンタンパク質を含むクロマチン断片も、ヌクレオソーム-タンパク質付加物として循環中で検出される。無細胞系ヌクレオソーム-タンパク質付加物を検出するアッセイの例は、WO2013/084002に説明されている。

【 0 0 2 0 】

他のエピジェネティック調節機構に加え、差次的遺伝子発現が、転写因子の発現及び活性の変動により調節される。転写因子は、その発現が調節される一つ又は複数の遺伝子に会合された特異的遺伝子配列に結合する、DNA結合ドメイン(DBD)を含む物質である。例えば、アンドロゲン受容体(AR)は、染色体においてアンドロゲン反応エレメント(ARE)と称される特異的DNA配列に結合し、且つAREを含むか又はこれにより調節されるアンドロゲン依存性遺伝子の発現をアップレギュレーション又はダウンレギュレーションする転写因子

である。転写因子がそれらの標的遺伝子配列に結合する場合、これらは遺伝子発現を促進又は抑制することができる。一部の転写因子は、全て又はほとんどの組織において発現される。他の転写因子は、異なる組織において差次的に発現されることができ、従ってより組織特異的である。

【0021】

組織特異的転写因子は、特定の原発性癌細胞の細胞において生じるが、他の細胞においては生じないことが、IHCにより示されている。例えば転写因子CDX2は、消化器癌細胞、特に結腸直腸癌細胞において生じ、且つ生検又は手術時に摘出された組織中にIHCにより示されたその存在は、原発性消化器癌を同定するために使用することができる。

【0022】

同様に、組織特異的転写補助因子は、例えば前立腺組織及び心臓組織に特異的なアンドロゲン受容体(AR)に対する補助因子であることが報告されているFHL2を含むことが説明されている(Mullerらの文献; 2000)。

【0023】

本発明者らはここで、生物学的試料中の転写因子-ヌクレオソーム及び転写補助因子-ヌクレオソームの付加物を直接概算するための簡単な免疫検定法を報告する。組織特異的転写因子及び/又は補助因子の選択により、この方法は、転移性疾患を伴う対象における癌を検出するか又は原発性腫瘍の部位を決定もしくは確認するための、非侵襲的又は最小の侵襲性の血液検査として使用することができる。本発明者らは、かかるヌクレオソーム付加物は、血清試料中に検出することができること、及び疾患におけるバイオマーカーとして使用することも示している。

【発明の概要】

【0024】

(発明の概要)

本発明の第一の態様に従い、対象における癌の検出又は診断のための生物学的液体中のバイオマーカーとしての組織特異的転写因子-ヌクレオソーム付加物又は転写補助因子-ヌクレオソーム付加物の使用が提供される。

【0025】

本発明の第二の態様に従い、以前に癌と診断された対象における癌の発生部位の同定又は診断のための生物学的液体中のバイオマーカーとしての組織特異的転写因子-ヌクレオソーム付加物又は転写補助因子-ヌクレオソーム付加物の使用が提供される。

【0026】

本発明の更なる態様に従い、対象において癌を検出し及び/又は癌の発生部位を決定するための方法であって：

(i) 該対象から生物学的液体試料を得る工程；

(ii) 該試料を、ヌクレオソーム又はその成分へ結合する第一の結合性物質と接触させる工程；

(iii) 該ヌクレオソーム又は試料を、ヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子に結合する第二の結合性物質と接触させる工程；並びに

(iv) 該第二の結合性物質の、該試料中の該付加された組織特異的転写因子又は補助因子への結合を検出又は定量する工程：を含み；

ここで、ヌクレオソームに付加された該組織特異的転写因子又は補助因子の存在又はレベルは、該癌の存在及び/又は発生部位の指標として使用される、方法が提供される。

【0027】

本発明の更なる態様に従い、対象において癌を検出し及び/又は癌の発生部位を決定するための方法であって：

(i) 該対象から生物学的液体試料を得る工程；

(ii) 該試料を、組織特異的転写因子又は補助因子に結合する第一の結合性物質と接触させる工程；

(iii) 該ヌクレオソーム又は試料を、ヌクレオソーム又はその成分に結合する第二の結

10

20

30

40

50

合性物質と接触させる工程；並びに

(iv)該第二の結合性物質の、該試料中のヌクレオソーム又はその成分への結合を検出又は定量する工程：を含み；

ここで、ヌクレオソームに付加された該組織特異的転写因子又は補助因子の存在又はレベルは、該癌の存在及び／又は発生部位の指標として使用される、方法が提供される。

【0028】

本発明の更なる態様に従い、動物又はヒト対象の医学治療に関する適合性を評価するための方法であって：

(i)本明細書記載の方法において規定されたように、該対象の生物学的液体中のヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子を検出又は測定する工程；並びに

(ii)該対象にとって好適な治療を決定するために、検出されたヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子の種類を使用する工程：を含む、方法が提供される。

【0029】

本発明の更なる態様に従い、動物又はヒト対象の治療をモニタリングするための方法であって：

(i)本明細書記載の方法において規定されたように、該対象の生物学的液体中のヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子を検出又は測定する工程；

(ii)1回以上、該対象の生物学的液体中のヌクレオソームに付加された該組織特異的転写因子又は補助因子の検出又は測定を繰り返す工程；並びに

(iii)該対象の状態の何らかの変化に関するパラメータとして、検出されたヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子のレベルの何らかの変化を使用する工程：を含む、方法が提供される。

【0030】

本発明の更なる態様に従い、治療を必要とする個体において癌を治療する方法であって：

(a)本明細書記載の方法に従い、個体において癌を検出し及び／又は癌の発生部位を診断する工程；それに続けて

(b)該癌及び／又は発生部位へ適するよう該個体へ抗-癌療法、手術又は医薬品を投与する工程：を含む、方法が提供される。

【0031】

本発明の更なる態様に従い、対象における癌の検出のための生物学的液体中のバイオマーカーとして、2種以上の転写因子もしくは補助因子の組織特異的組合せを含むクロマチン断片の使用が提供される。

【0032】

本発明の更なる態様に従い、対象において癌を検出するか又は癌の発生部位を決定するための方法であって：

(i)該対象から生物学的液体試料を得る工程；

(ii)該試料を、第一の転写因子又は補助因子に結合する第一の結合性物質と接触させる工程；

(iii)該試料を、第二の転写因子又は補助因子に結合する第二の結合性物質と接触させる工程；並びに

(iv)該試料中の該第一又は第二の結合性物質の結合を検出又は定量する工程：を含み、

ここで、クロマチン断片中の第一及び第二の転写因子もしくは補助因子の両方の組合せの存在、並びに／又はその断片のレベルは、該癌の存在及び／又は発生部位の指標として使用される、方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0033】

(図面の簡単な説明)

【図1】図1：健常対象、乳癌と診断された対象3名、膀胱癌と診断された対象2名から採

10

20

30

40

50

取した試料、及び陰性対照試料に関する循環無細胞系ヌクレオソーム結合したGATA 3付加物のELISA結果。

【図2】図2：健常対象、甲状腺癌と診断された対象3名、肺癌と診断された対象2名から採取した試料、及び陰性対照試料に関する循環無細胞系ヌクレオソーム結合したTTF-1付加物のELISA結果。

【図3】図3：健常対象3名、甲状腺癌と診断された対象1名、肺癌と診断された対象4名、直腸癌と診断された対象3名、結腸癌と診断された対象3名、乳癌と診断された対象3名から採取した試料、及び陰性対照試料に関する循環無細胞系ヌクレオソーム結合したTTF-1付加物ELISA結果。

【図4】図4：健常対象3名、甲状腺癌と診断された対象1名、肺癌と診断された対象4名、直腸癌と診断された対象3名、結腸癌と診断された対象3名、乳癌と診断された対象3名から採取した試料、及び陰性対照試料に関する循環無細胞系ヌクレオソーム結合したCDX2付加物のELISA結果。

【発明を実施するための形態】

【0034】

(発明の詳細な説明)

本発明の第一の態様に従い、対象における癌の検出又は診断のための、生物学的液体中のバイオマーカーとしての、組織特異的転写因子又は転写補助因子のヌクレオソーム付加物の使用が提供される。

【0035】

一実施態様において、該組織特異的転写因子ヌクレオソーム付加物又は転写補助因子ヌクレオソーム付加物は、対象における癌の発生部位を同定するために使用される。

【0036】

一実施態様において、対象は、それ以前には癌と診断されていない(すなわち、一見したところ健常である)。例えば癌は、スクリーニング試験において見かけ上の健常者において検出される。一実施態様において、対象は、癌に関連した症状を伴うことが同定され、すなわち、癌は疾患の症状を伴うヒトにおいて検出されている。これらの症状は、癌を示唆するか、あるいは特定の組織又は臓器の機能不全を示唆することができる。かかる症状は、疼痛、異常な出血、異常なしこりもしくは腫脹、長引く咳、息切れ及び/又は説明できない体重減少を含み得る。

【0037】

本発明はまた、例えば、ctDNA試験、循環腫瘍細胞試験を用いて、又は症候性に、癌の位置はわからないが、原発性癌と既に診断された患者における有用性も有する。従って、本発明の第二の態様に従い、以前に癌と診断された対象における癌の発生部位の同定又は診断のための、生物学的液体中のバイオマーカーとしての組織特異的転写因子又は補助因子ヌクレオソーム付加物の使用が提供される。

【0038】

本発明者らは、組織特異的転写因子又は補助因子は、無細胞系ヌクレオソームにおいて検出することができ、結果的に、発生部位はわからないが、以前に癌と診断された患者などの患者における癌の検出及び/又は癌の起源の同定に使用することができることがわかった。癌の発生部位の同定は、適切な療法を選択するため、従って患者の予後及び治療を改善するために重要である。

【0039】

一実施態様において、癌は、原発性癌であり、すなわち癌が体内で始まる/生じる場所である。別の実施態様において、癌は、続発性癌であり、すなわち、一度癌細胞が、体の別の部分へ拡散した転移である。

【0040】

一実施態様において、対象は、転移性原発不明癌(CUP)を有する対象である。この実施態様において、対象は、転移を同定することにより、癌と診断されたが、好適な治療を提供するために原発性癌を位置づけることは依然重要である。

【0041】

一実施態様において、対象は、例えばctDNA、RNA、miRNAを使用する循環核酸法又は癌それ自身を検出する他の循環血核酸ベースの方法を使用し、以前に癌と診断された。更なる実施態様において、対象は、バイオマーカーとして循環腫瘍DNA(ctDNA)を使用し、以前に癌と診断された。一実施態様において、対象は、循環腫瘍細胞を検出することにより、以前に癌と診断された。これらの実施態様において、癌は、検出されるが、対象における癌の当初の位置に関する情報は不十分であるか又は情報が無い。

【0042】

本発明の更なる態様に従い、転移性疾患を伴う対象における原発性癌の部位、位置又は臓器の所在の同定又は診断のための、生物学的液体中のバイオマーカーとしての組織特異的転写因子-ヌクレオソーム付加物の使用が提供される。本発明者らは、各々、甲状腺又は肺の癌組織(TTF-1)、消化管癌組織(CDX2)及び乳癌組織(GATA 3)において発現される、TTF-1、CDX2又はGATA 3を含有するかかる3種の付加物は、癌を伴う対象の循環中に存在すること、並びにそれらの存在又はレベルを使用し、患者が、各々、原発性の甲状腺癌、結腸直腸癌又は乳癌を有することを示すことができること、並びにこれらの組織特異的転写因子-ヌクレオソーム付加物は、他の癌を伴う対象又は健常対象の循環中には、通常存在しない(又は低レベルで存在する)ことを示した。

【0043】

文献において、TTF-1は、ほとんどの肺癌組織試料並びにほとんどの甲状腺癌組織試料において発現されることが報告されている。結腸直腸癌組織は、時には、組織TTF-1発現が上昇される。従ってTTF-1に関する組織アッセイは、甲状腺又は肺が原発性起源であるとしてCUP腫瘍を同定するために、使用することができるが、結腸直腸癌を含むいくつかの他の癌が、誤って肺癌又は甲状腺癌として同定され得る「偽陽性」の結果をもたらす可能性がある。本発明者らは、循環ヌクレオソームに結合したTTF-1付加物のレベルは、甲状腺腫瘍の対象の血液中で上昇し、且つ肺癌の対象において上昇が少ないことを認めた。驚くべきことに、本発明者らはまた、循環ヌクレオソームに結合したTTF-1付加物のレベルは、結腸直腸癌(結腸癌又は直腸癌)と診断された全ての対象の血液中で上昇したことも認めた。このことは、体液中の無細胞系ヌクレオソーム-転写因子付加物のレベルの組織特異性は、全ての症例においてではなく、生検時に摘出された癌組織における転写因子発現レベルの特異性と同じであることを指摘している。

【0044】

同様の組織特異的転写因子発現が、多くの他の癌で生じることが知られており(Kandalaft及びGownの文献、2015)、且つ好適な組織特異的転写因子-ヌクレオソーム付加物に関する類似のヌクレオソーム付加物アッセイを使用し、かかる転写因子が既に同定されている広範な癌に関して、原発部位が不明の癌を同定することができることは、当業者には明らかであろう。これは、例えば、GATA 3、CDX2、TTF-1、PAX8、WT1、NKX3.1、P63(TP63)もしくはP40及び/又は任意のかかる組織特異的転写因子発現が同定され得る任意の癌を含むが、これらに限定されるものではない。本発明の方法は、対象が、検出されないかもしくははわかっていない癌を有するか、又はCUPの症例又は癌がその発生部位の情報を伴わずに検出されている症例を含む、癌を有することはわかっているが、原発性腫瘍の発生部位は不明であるような、任意の状況において、臨床的有用性を有する。後者の状況は、例えば、ctDNA、RNAを基にした癌検出法、又は癌それ自身を検出する他の循環血核酸ベースの方法が使用される場合、あるいは原発起源が不明の循環腫瘍細胞が検出される場合に起こり得る。多種多様な循環核酸法が存在する。一部は、癌に関連したctDNA配列突然変異の検出、又は癌に関連した他のDNA配列作用の検出を基にしている。他のものは、癌に関連したマイクロRNA配列、癌に関連したメチル化DNA配列及び他のものの検出を基にしている。DNA異常は、全ての癌疾患の特徴である。癌細胞のDNAは、非限定的に、点突然変異、メチル化状態、転座、遺伝子コピー数、マイクロサテライト異常及びDNA鎖完全性を含む多くの様式で、正常な細胞のDNAとは異なる。しかし、遺伝子突然変異は、全ての癌の特徴であり、それらの存在は、原発性腫瘍の性質に関する情報は提供しない。具体例として；

10

20

30

40

50

P53遺伝子突然変異は、癌において一般的であり、且つctDNA中のそれらの存在は、癌検出のためのバイオマーカーとして使用することができる。しかし、P53突然変異は、多種多様な癌において存在するので、それらの存在は、原発性癌の性質に関しては情報不足であろう。当業者には、本発明は、任意のバイオマーカーを使用する別の方法によるか、又はその検出法とは関係なく、症候性の理由により、癌それ自身が検出された、癌発生の部位を決定する上で有用であることは明らかであろう。従って、本発明は、以前に癌と診断されたが、まだその疾患の起源、位置又は配置がわかっていない患者における、有用な二次試験である。

【0045】

「転写因子」の言及は、DNAに結合し、且つ転写を促進する(すなわちアクチベーター)か又は抑制する(すなわちリプレッサー)ことにより、遺伝子発現を調節するタンパク質を指す。転写因子は、それらが調節する遺伝子に隣接するDNAの特異的配列に結合する1以上のDNA-結合ドメイン(DBD)を含む。

【0046】

本明細書において説明される用語「組織特異的転写因子」とは、特定の組織又は癌において常に又は通常発現されるが、他の組織又は癌においては稀に発現されるか又は決して発現されない転写因子を指す。かかる組織特異的転写因子は、1、2、3、4又は5種のための組織又は癌型など、限定された数の組織又は癌型においてのみ発現され得る。循環中の無細胞系ヌクレオソーム-転写因子付加物の存在又はレベルは、転写因子を発現している細胞の細胞死を指摘し、且つその組織特異性は、腫瘍発生の原発部位として起源の組織を指摘するためのバイオマーカーとして使用することができる。

【0047】

本明細書において説明される用語「補助因子」又は「転写因子補助因子」とは、転写因子の作用を修飾するタンパク質を指す。多くの転写因子は、結合を修飾し且つ時には前開始複合体及びRNAポリメラーゼの動員に関与するこれらの協調する補助因子の存在下でのみ、それらの標的DNA配列へ結合する。本明細書において使用されるように転写因子に関する実施態様の言及は、補助因子へ同等に適用されてよい。

【0048】

更に、それら自身の発現に関して組織特異性ではないことがある転写因子が、組織特異性であるコンビナトリアル転写因子制御により、組織特異的遺伝子発現を調節する場合に、転写因子及び/又は転写補助因子の組織特異的組合せが説明される。従って、その個別の発現は組織特異性でない2種以上の転写因子又は補助因子の結合は、組織特異的遺伝子の発現を、実際に調節し、ここでこの遺伝子の発現には、両方の又は複数の転写因子又は補助因子の存在が必要である。従って「組織特異的」転写因子及び補助因子の言及は、組織特異性を実現するために協力して働く転写因子及び/又は補助因子の組合せを含み、すなわち一実施態様において、本明細書に説明された態様は、組織特異性である転写因子及び/又は補助因子の組合せを検出することを含む。

【0049】

用語「バイオマーカー」は、プロセス、事象、又は状態の特徴的な生物学的指標又は生物学的に誘導された指標を意味する。バイオマーカーは、癌の差次的診断方法、例えば、予後の評価及び療法の結果のモニタリング、特定の治療的処置に対し最も反応する可能性がある患者の同定、薬物のスクリーニング及び開発において、使用することができる。バイオマーカー及びそれらの使用は、新規薬物治療の同定にとって、及び薬物治療の新規標的の発見にとって価値がある。

【0050】

本発明の更なる態様に従い、癌部位の情報がない対象において検出された原発性癌の部位を同定又は診断するための、血液中のバイオマーカーとしての組織特異的転写因子-ヌクレオソーム又は補助因子-ヌクレオソーム付加物の使用が提供される。一実施態様において、癌の存在は、症候性の理由で(すなわち、患者の症状を基に)、対象において疑われ、且つ本発明を使用し、癌の存在及び/又は部位、位置又は臓器の所在を確認する。

【0051】

本発明は、体液中のヌクレオソームに結合される組織特異的転写因子又は補助因子の検出を目的としている。これは、対象から体液試料を採取し、且つ一方の抗体はヌクレオソームへの結合が指示され、且つ他方は、ヌクレオソームに結合又は付加された組織特異的転写因子又は補助因子への結合が指示された二重抗体ELISA試験を実行することにより実施することができる。しかし、ヌクレオソームへの結合が指示された抗体は、全ヌクレオソーム複合体に対し向けられる必要はなく、ヌクレオソームの構成部分に向けられてよい。本発明のこの実施態様において、ヌクレオソームへの結合に利用される抗体は、例えば、特定のヒストン、ヒストン修飾物、ヒストン変種もしくはアイソフォームへ、又はDNA又は特定のヌクレオチド、例えば5-メチルシトシンなどを含む、ヌクレオソームの任意の構成部分へ結合するように指示されてよい。同様に、組織特異的転写因子への結合に利用される抗体は、転写因子の任意の構成部分又はドメインへ結合するように指示されてよい。転写因子が複数のタンパク質からなるタンパク質複合体である場合、これらのいずれかは同様にその抗体により標的化されてよい。

10

【0052】

本発明の更なる態様に従い、対象において癌を検出し及び／又は癌の発生部位を決定するための方法であって：

(i) 該対象から生物学的液体試料を得る工程；

(ii) 該試料を、ヌクレオソーム又はその成分へ、あるいはヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子に結合する第一の結合性物質と接触させる工程；

20

(iii) 該ヌクレオソーム又は試料を、第一の結合性物質が該ヌクレオソームもしくはその成分へ結合する場合には、ヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子に結合する第二の結合性物質と、あるいは第一の結合性物質がヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子に結合する場合には、ヌクレオソーム又はその成分に結合する第二の結合性物質と、接触させる工程；並びに

(iv) 該第二の結合性物質の、該試料中の該付加された組織特異的転写因子又は補助因子、ヌクレオソーム又はその成分への結合を検出又は定量する工程：を含み、

ここで、ヌクレオソームに付加された該組織特異的転写因子又は補助因子の存在又はレベルは、該癌の存在及び／又は発生部位の指標として使用される、方法が提供される。

【0053】

30

本発明の更なる態様に従い、対象において癌を検出し及び／又は癌の発生部位を決定するための方法であって：

(i) 該対象から生物学的液体試料を得る工程；

(ii) 該試料を、ヌクレオソーム又はその成分へ結合する第一の結合性物質と接触させる工程；

(iii) 該ヌクレオソーム又は試料を、ヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子に結合する第二の結合性物質と接触させる工程；並びに

(iv) 該第二の結合性物質の、該試料中の該付加された組織特異的転写因子又は補助因子への結合を検出又は定量する工程：を含み、

ここで、ヌクレオソームに付加された該組織特異的転写因子又は補助因子の存在又はレベルは、該癌の存在及び／又は発生部位の指標として使用される、方法が提供される。

40

【0054】

当業者には、検出結合性物質は、付加された組織特異的転写因子又は補助因子への、もしくはヌクレオソーム又はヌクレオソームの構成部分へのいずれかに結合することが指示されるように選択されてよいことは明らかであろう。

【0055】

従って、本発明の更なる態様に従い、対象において癌を検出し及び／又は癌の発生部位を決定するための方法であって：

(i) 該対象から生物学的液体試料を得る工程；

(ii) 該試料を、ヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子に結合す

50

る第一の結合性物質と接触させる工程；

(iii)該ヌクレオソーム又は試料を、ヌクレオソーム又はその成分に結合する第二の結合性物質と接触させる工程；並びに

(iv)該第二の結合性物質の、該試料中のヌクレオソーム又はその成分への結合を検出又は定量する工程：を含み、

ここで、ヌクレオソームに付加された該組織特異的転写因子又は補助因子の存在又はレベルは、該癌の存在及び／又は発生部位の指標として使用される、方法が提供される。

【0056】

本発明の方法はまた、以前に癌と診断された対象においても使用することができる。

【0057】

先に注記したように、組織特異性は、1又は複数の他の転写因子又は補助因子との共同的結合により、転写因子にもたらされてよく、且つこれらの複数の補助因子は、ゲノム内の部位で近くに同時に配置されてよい(例えば、Zhang及びGlassの文献、2013；並びに、Yuらの文献、2006参照)。このことは、細胞死時のクロマチン消化は、複数の転写因子を含むクロマチン断片に繋がることを意味する。かかるクロマチン断片は、ヌクレオソームの存在下又は非存在下で、複数の転写因子を含んでよい。複数の転写因子を含むクロマチン断片は、本発明の更なる態様において使用することができる。

【0058】

転写因子と補助因子の同時配置は、ゲノム内のそれらの各DNA結合部位の同時配置に起因して生じることが多いが、それらの結合部位が更に離れている転写因子と補助因子の同時配置もまた、より遠位の部位が一緒に遺伝子調節をもたらすようなDNA中のループ化に起因して生じ得る。当業者には、クロマチン断片はまた、かかるループから生じる転写因子及び補助因子の組織特異的組合せを含み得ることは明らかであろう。

【0059】

本明細書において使用される用語「クロマチン断片」は、タンパク質とその起源が細胞の染色体にある核酸の複合体を指す。クロマチンの断片は、マルチ-タンパク質-核酸複合体中のヌクレオソーム及び／又は会合したDNA及び／又は任意の膨大な様々な非-ヒストンクロマチン会合タンパク質のいずれかを含んでよい。非-ヒストンクロマチン会合タンパク質の一部の例は、転写因子、補助因子、コ-アクチベーター、コ-リプレッサー、RNAポリメラーゼ部分、伸長因子、クロマチンリモデリング因子、メディエーター、STAT部分、上流結合因子(UBF)などを含む。

【0060】

本発明の更なる態様に従い、対象における癌の検出のための、生物学的液体中のバイオマーカーとしての2種以上の転写因子又は補助因子の組織特異的組合せを含有する又は含むクロマチン断片の使用が提供される。当業者には、一緒に組織特異性を付与する2種の転写因子又は補助因子は、例えば、各々、2種の転写因子又は補助因子の一方へ結合することが指示された2種の抗体を使用する、単独のELISA型アッセイにおいて、検出又は測定することができることは明らかであろう。あるいは、一緒に組織特異性を付与する2種の転写因子又は補助因子は、例えば、2種の個別の転写因子もしくは転写補助因子-ヌクレオソーム付加物アッセイ、又は本明細書記載の2種の個別の転写因子もしくは転写補助因子-DNA付加物アッセイを使用する、個別のELISA型アッセイにおいて、検出又は測定することができる。当業者には、一緒に組織特異性を付与する複数の転写因子又は補助因子は、例えば、3、4又はそれよりも多い個別の転写因子もしくは転写補助因子-ヌクレオソーム付加物アッセイ、又は本明細書記載の個別の転写因子もしくは転写補助因子-DNA付加物アッセイを使用する、個別のELISA型アッセイにおいて、検出又は測定することも明らかであろう。

【0061】

組織特異性を付与する(組織特異的)転写因子又は補助因子を含むクロマチン断片は、それら自身組織特異性であることは、理解されるであろう。同様に、組織特異性を付与する2種以上の転写因子又は補助因子の組織特異的組合せを含むクロマチン断片は、それら自

10

20

30

40

50

身組織特異性である。従って本明細書において説明される用語「組織特異的クロマチン断片」は、組織特異的転写因子又は補助因子を含むか、あるいは2種以上の転写因子又は補助因子の組織特異的組合せを含むクロマチン断片を指す。

【0062】

前述の組織特異的組合せは、対象における癌の発生部位を同定するために使用することができる。従って本発明の更なる態様に従い、対象における癌の発生部位の同定又は診断のための、生物学的液体中のバイオマーカーとしての2種以上の転写因子又は補助因子の組織特異的組合せを含有するか又は含むクロマチン断片の使用が提供される。

【0063】

本発明の更なる態様に従い、対象において癌を検出するか又は癌の発生部位を決定するための方法であって：

(i) 該対象から生物学的液体試料を得る工程；

(ii) 該試料を、第一の転写因子又は補助因子に結合する第一の結合性物質と接触させる工程；

(iii) 該試料を、第二の転写因子又は補助因子に結合する第二の結合性物質と接触させる工程；並びに

(iv) 該試料中の該第一又は第二の結合性物質の結合を検出又は定量する工程：を含み、

ここで、該第一及び第二の転写因子もしくは補助因子の両方を含むクロマチン断片の存在又はレベルは、該癌の存在及び/又は発生部位の指標として使用される、方法が提供される。

【0064】

工程(iv)は、いずれかに由来するシグナルは両方の抗体が結合した場合のみ生じるので、両方に結合した抗体を測定することを必要としないことは、理解されるであろう。好ましい実施態様において、第一の転写因子又は補助因子への結合が指示された第一の結合性物質は、固体表面上に固定され、且つ第二の転写因子又は補助因子への結合が指示された第二の結合性物質は、検出標識により標識される。これらの結合性物質は、試料中のクロマチン断片へ露出され、且つ固相に結合された標識された抗体が、検出される。本発明のこの態様に従い実行される免疫検定は、第一及び第二の両方の結合性物質が、第一及び第二の転写因子又は補助因子に結合した場合にのみ、シグナルを生じ、これは両方の転写因子又は補助因子が生物学的試料中のクロマチン断片内に同時配置された場合にのみ起こることは理解されるであろう。

【0065】

一実施態様において、この組合せは、クロマチン断片において検出される。更なる実施態様において、クロマチン断片は、DNA及び2種以上の転写因子を含む。別の実施態様において、クロマチン断片は、2種以上の転写因子及び1種以上のヌクレオソームを含む。

【0066】

2種以上の転写因子又は補助因子の、単独の遺伝子又は遺伝子プロモーター座への同時結合は、単独の組織に対し、又は限定された数の組織に対し、特異的であり得る。転写因子及び/又は補助因子のかかる組織特異的同時結合が生じる場合、その結合モチーフは通常、近接近し、且つ200未満の塩基対により隔てられている。

【0067】

かかる協調する因子は、それら自身広範に発現される多くのシグナル-依存性転写因子の作用へ、組織特異性を付与することができる。例としては、非限定的に、核ホルモン受容体、STAT転写因子、NF- κ Bファミリーメンバー、CREBなどを含む細胞表面受容体を介して、細胞外シグナルにより活性化される、多様な転写因子ファミリーの一員が挙げられる。従って、広範に発現された細胞表面受容体は、各々組織特異的様式で、様々な組織において様々な異なる遺伝子を調節することができる。報告された例は、転写因子FoxA1と協調する前立腺特異的遺伝子の転写、転写因子Hnf4 と協調する腎臓特異的遺伝子の転写、及び転写因子AP-2 と協調する精巣上体特異的遺伝子の転写の、アンドロゲン受容体調節を含む(Pihlajamaaの文献、2014)。類似例は、引用により本明細書中に組み込まれている

、Levyらの文献、2007；Zhaoらの文献、2010；並びに、Zhang及びGlassの文献、2013において、他の核ホルモン受容体について報告されている。

【 0 0 6 8 】

本発明における使用に適している転写因子及び補助因子の多数の組織特異的組合せが、知られており、且つ例えば、Johns Hopkins大学のWilmer Eye InstituteのBioinformatics Laboratoryにより開発された「組織特異的遺伝子発現及び調節(TiGER)」データベースを含む、公に利用可能なデータベースにおいて認めることができる。各々様々な組織(末梢神経系(PNS)及び乳腺(乳房)を含む)に対し組織特異的を持つ3つの例となる転写因子又は補助因子の対を、以下に示す：

【表 1】

膀胱	ARNT:SREBP1	MAX:SREBP1	SREBP1:MYC/MAX
血液	ELF1:PEA3	ETF:NRF1	PEA3:PU.1
骨	EF-C:MIF1	EF-C:RFX1	GATA-3:MIF1
骨髓	ETF:NRF1	MAX:SREBP1	NRF1:STAT3
脳	AP2alpha:ETF	C/EBP:PBX1	ETF:LBP1
頸部	CREB:NRF1	ELK1:NRF1	ETF:NRF1
結腸	AFP1:HNF1	CDP:FOXO4	CDP:HNF1
眼	CHX10:CRX	CHX10:GATA6	CRX:PITX2
心臓	AP1:MEF2	AP1:RSRFC4	FOXJ2:POU3F2
腎臓	CRX:HNF1	GCNF:HNF1	COUP-TF/HNF4:HNF1
喉頭	AP1:NFE2	AP1:TCF11/MAFG	BACH1:NFE2
肝臓	CDP:HNF1	C/EBPgamma:HNF1	E4BP4:HNF1
肺	ETF:MYC/MAX	ETF:LBP1	ETF:TBP
リンパ節	c-Ets-1:c-Ets-2	ELK1:PU.1	ICSBP:c-Ets-2
乳房	E2F:SRF	ETF:TAX/CREB	ETF:ZID
筋肉	AP-4:MEF2	MEF2:MYOD	MEF2:RSRFC4
卵巣	AP2alpha:VDR	CREB:MAZ	DBP:VDR
膵臓	ATF:HEB	ATF:NF-muE1	ATF:NRL
PNS	CREB:RSRFC4	HNF1:SRF	MYOD:OCT1
胎盤	ATF1:CHX10	ATF1:LHX3	ATF:CHX10
前立腺	AFP1:LHX3	CART1:LHX3	C/EBPγ:LHX3
皮膚	AREB6:ALX4	AREB6:ARP-1	AREB6:E47
腸	CART1:LHX3	HNF1:LHX3	HNF1:NKX6-2
軟組織	C/EBPγ:FOXO4	FOXO1:SF1	FOXO4:TBP
脾臓	E12:c-Ets-1	GCM:NFKB1	LBP1:MYOD
胃	AP2γ:ETF	AREB6:NFE2	ER:HIF1
睾丸	AP2:NRF1	EGR1:NRF1	EGR3:NRF1
胸腺	ATF:TAX/CREB	c-Ets-1:c-Ets-2	ETF:NRF1
舌	ATF:CREB	ATF:CREBP1	CREBP1:CREB
子宮	E4BP4:POU1F1	E4BP4:POU3F2	NKX6-2:POU3F2

【 0 0 6 9 】

本発明の更なる態様に従い、2種以上の組織特異的転写因子又は補助因子に関するアッセイを含む、提供された転写因子／補助因子パネルバイオマーカーが存在する。本発明のこの態様は、個々の転写因子／補助因子が、限定された組織特異性を有し、且つそれらの組合せられた組織特異性が、その個々の成分アッセイのそれよりもより大きい場合に、有用であることができる。本発明のこの態様において、転写因子は、生物学的に連結されなくてよく、且つ単独のクロマチン断片上に生じなくてよいが、それにもかかわらず、一緒に組織特異性を付与することができる。かかる転写因子／補助因子の組合せは、個別のELISA型アッセイにおいて、例えば、本明細書記載の、2、3、4又はそれよりも多い個別の転写因子もしくは転写補助因子-ヌクレオソーム付加物アッセイ又は個別の転写因子又は転写補助因子-DNA付加物アッセイのパネルを使用し、検出又は測定されてよい。

【 0 0 7 0 】

本発明の更なる態様に従い、生物学的液体中の2種以上の転写因子／補助因子の組合せられた存在又はレベルに関するパネルは、癌の存在及び／又はその発生部位を示すために使用される。本発明のこの態様において、転写因子／補助因子は、DNA結合部位のそれら

10

20

30

40

50

の部位に関して接近して配置される必要はなく、単独のクロマチン断片内に含まれる必要はない。かかる2種以上の転写因子／補助因子の組合せは、それらがクロマチン断片の構成部分であるかどうかに係わらず、各々直接アッセイされてよい。本発明のこの態様において、非限定的に、単独抗体(又は他の結合性物質)免疫検定法、二重抗体(又は他の結合性物質)免疫検定法、質量分析法、ChIP法又は任意の他の好適な分析法を含む、各転写因子／補助因子を検出する任意の方法が、利用されてよい。生物学的液体中の2種以上の転写因子／補助因子の組合せられた存在又はレベルは、癌の存在及び／又はその発生部位を指摘するのに十分である。

【0071】

当業者には、生物学的液体中の組織特異的無細胞系転写因子及び／又は補助因子、及びそれらの組合せは、ヌクレオソーム又はDNAに結合しているかどうかにかかわらず、細胞又はクロマチンを起源とする、組織特異的バイオマーカーとしてみなすことができることは明らかであろう。本発明の更なる態様に従い、生物学的液体中の、組織特異的無細胞系転写因子又は補助因子バイオマーカー、もしくはかかるバイオマーカーのパネルが提供される。本発明のこの態様において、非限定的に、単独抗体(又は他の結合性物質)免疫検定法、二重抗体(又は他の結合性物質)免疫検定法、質量分析法、ChIP法又は任意の他の好適な分析法を含む、無細胞系転写因子又は補助因子を検出する任意の方法が、利用される。生物学的液体中の、転写因子／補助因子の存在もしくはレベル又はそれらのパネルは、癌の存在もしくはレベル及び／又はその発生部位を示すために使用される。

【0072】

当業者には、多種多様な免疫化学的分析方法及び他の分析方法を使用し、本発明と共同で、転写因子-及び／又は補助因子-ヌクレオソーム付加物を含む組織特異的クロマチン断片を測定することができることは明らかであろう。例えば、非限定的に、クロマチン免疫沈降ベースの方法(ChIP)又はクロマチン物質の分析のための他の方法を含む、様々な分子生物学的方法もまた、本発明と一緒に使用に適している。非免疫化学的方法は、任意のクロマトグラフィー又は質量分析法及び組織特異的転写因子-ヌクレオソーム付加物の解離に關与する任意の方法、並びに免疫化学、クロマトグラフィー、質量分析又は他の手段による解離した組織特異的転写因子の測定を含む。タンパク質複合体又は付加物及びタンパク質-核酸複合体又は付加物を解離する方法は、当該技術分野において周知であり、例えば、非限定的に、該付加物の酸性又は塩基性pH媒体又は高塩濃度への曝露によるか、あるいは機械的又は音波的方法によるか、あるいは生物学的消化又は他の酵素ベースの方法によるものを含む。従って、本発明の更なる態様に従い、対象における癌の存在を検出するか又は癌の発生部位を決定するための方法であって：

(i) 該対象から生物学的液体試料を得る工程；

(ii) 該試料中のそれに付加されたヌクレオソーム又はクロマチン断片から、組織特異的転写因子又は補助因子を解離する工程；

(iii) 該解離された組織特異的転写因子又は補助因子を検出又は定量する工程：を含み、

ここで、該組織特異的転写因子又は補助因子の存在又はレベルは、該癌の発生部位の指標として使用される、方法が提供される。

【0073】

本発明の更なる態様において、組織特異的転写因子又は補助因子は、DNAへ結合され、且つDNA-組織特異的転写因子又は補助因子付加物は、体液中で測定され、且つ本明細書において説明されたようにバイオマーカーとして使用される。一実施態様において、DNA-組織特異的転写因子又は補助因子付加物は、組織特異的転写因子又は補助因子への結合が指示されたバインダーを、DNA又は任意のDNA構成部分への結合が指示された別のバインダーと組合せて用いる、本明細書に説明された方法に従い、体液中で検出される。

【0074】

それらの標的ヌクレオソームDNAへ直接結合する転写因子は、当該技術分野において、先駆(pioneering)転写因子と称される。しかし多くの転写因子は、結合を修飾する協調性

10

20

30

40

50

補助因子の存在下でのみ、それらの標的DNA配列に結合し、且つ更なる組織特異性を付与することもできる。例えば；FoxA1は、前立腺組織中のアンドロゲン反応要素(ARE)に結合するアンドロゲン受容体(AR)にとって及び乳癌におけるエストロゲン反応要素(ERE)に結合するエストロゲン受容体(AR)にとって必要とされる補助因子である。従って、本発明の一実施態様において、無細胞系ヌクレオソーム結合した(転写因子の)補助因子が測定され、且つ癌の発生部位を同定するために使用される。転写因子はまた、補助因子に結合されたヌクレオソームであっても、なくともよい。無細胞系ヌクレオソーム結合した補助因子は、転写因子の存在下又は非存在下で測定されてよい。

【0075】

一実施態様において、組織特異的補助因子は、FoxA1である。補助因子がFoxA1である場合、癌の発生部位は、乳房及び前立腺から選択されてよい。

【0076】

好ましい実施態様において、組織特異的転写因子は、以下から選択される：GATA 3、CDX2、TTF-1、PAX8、WT1、NKX3.1、P63(TP63)又はP40。表1は、癌組織におけるこれらの転写因子に関連した腫瘍を列挙している。

【0077】

表1：組織特異的転写因子及び癌組織におけるそれらの関連腫瘍の例

【表2】

転写因子	関連腫瘍
GATA 3	乳癌、唾液腺癌、移行上皮癌、皮膚付属器腫瘍
CDX2	結腸直腸癌、膵臓癌、胃癌
TTF-1	肺腺癌、甲状腺癌、神経内分泌癌
PAX8	婦人科癌、甲状腺癌、腎細胞癌
WT1	卵巣癌、中皮腫
NKX3.1	前立腺癌
P63 (TP63)	扁平上皮癌、移行上皮癌、胸腺腫、唾液腺癌、絨毛性腫瘍
P40	扁平上皮癌、移行上皮癌、胸腺腫、唾液腺癌、絨毛性腫瘍

【0078】

表1の例は、網羅的ではない。本発明の方法により体液中で検出されたヌクレオソーム転写因子付加物レベルの組織特異性は、時には、癌組織における転写因子発現レベルのそれとは異なることがある。

【0079】

一実施態様において、該組織特異的転写因子は、GATA 3であり、且つ癌の発生部位は、乳癌、唾液腺癌、移行上皮癌及び皮膚付属器腫瘍から選択される。

【0080】

一実施態様において、該組織特異的転写因子は、CDX2であり、且つ癌の発生部位は、結腸直腸癌及び胃癌から選択される。

【0081】

一実施態様において、該組織特異的転写因子は、TTF-1であり、且つ癌の発生部位は、肺腺癌、結腸直腸癌、甲状腺癌及び神経内分泌癌から選択される。

【0082】

一実施態様において、該組織特異的転写因子は、PAX8であり、且つ癌の発生部位は、婦人科癌、甲状腺癌及び腎細胞癌から選択される。

【0083】

－実施態様において、該組織特異的転写因子は、WT1であり、且つ癌の発生部位は、卵巣癌及び中皮腫から選択される。

【0084】

－実施態様において、該組織特異的転写因子は、NKX3.1であり、且つ癌の発生部位は、前立腺癌である。

【0085】

－実施態様において、該組織特異的転写因子は、P63(TP63)であり、癌の発生部位は、扁平上皮癌、移行上皮癌、胸腺腫、唾液腺癌及び絨毛性腫瘍から選択される。

【0086】

－実施態様において、該組織特異的転写因子は、P40であり、癌の発生部位は、扁平上皮癌、移行上皮癌、胸腺腫、唾液腺癌及び絨毛性腫瘍から選択される。

10

【0087】

本方法は、ヌクレオソームそれ自身に向けられた抗体をヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子に結合するよう指示された抗体と組合せて使用するか、又はヌクレオソームの成分に向けられた抗体を、再度ヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子に結合するよう指示された抗体と組合せて使用し、実行することができる。同様に、本方法は、DNAもしくは任意のDNA成分に、又は特定のヌクレオチドもしくは修飾されたヌクレオチド、例えば5-メチルシトシンに結合するよう指示された抗体を用いて、実行することができる。

【0088】

20

－実施態様において、ヌクレオソーム又はそれらの成分に結合する結合性物質は、特定のヒストン、ヒストン修飾物、ヒストン変種又はアイソフォーム、又は特定のヌクレオチドに結合するよう指示されている。更なる実施態様において、ヌクレオソーム又はそれらの成分に結合する結合性物質は、DNAもしくは5-メチルシトシンなどの修飾されたヌクレオチドを含むヌクレオチドへ結合するよう指示され、且つDNA結合した転写因子を検出する。

【0089】

用語「結合性物質」とは、バイオマーカー(すなわち、ヌクレオソーム又はヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子)に特異的に結合することが可能である、天然の又は化学的に合成された化合物などの、リガンド又はバインダーを指す。本発明のリガンド又はバインダーは、バイオマーカーに特異的に結合することが可能である、ペプチド、抗体もしくはそれらの断片、又はプラスチック抗体などの合成リガンド、又はアプタマーもしくはオリゴヌクレオチドを含んでよい。この抗体は、標的に特異的に結合することが可能である、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体又はそれらの断片であることができる。本発明のリガンド又はバインダーは、ルミネセンス、蛍光、酵素又は放射性マーカーなどの検出可能なマーカーにより標識されてよく；あるいは又は加えて、本発明のリガンドは、親和性タグ、例えばビオチン、アビジン、ストレプトアビジンもしくはHis(例えばhexa-His)タグにより標識されてよい。－実施態様において、結合性物質は、抗体、抗体断片又はアプタマーから選択される。更なる実施態様において、使用される結合性物質は、抗体である。用語「抗体」、「結合性物質」又は「バインダー」は、本明細書において互換的に使用される。

30

40

【0090】

－実施態様において、試料は、生物学的液体(これは本明細書において用語「体液」と互換的に使用される)である。この液体試料は、非限定的に、脳脊髄液(CSF)、全血、血液の血清、血漿、月経血、子宮内膜の液体、尿、唾液、又は他の体液(糞便、涙液、滑液、痰)、例えば濃縮された呼気のような呼気、又はそれらからの抽出物もしくは精製物、又はそれらの希釈物を含む、対象から採取された任意の生物学的液体試料であってよい。生物学的試料はまた、生存対象由来の標本、又は剖検時に採取された標本を含む。試料は、例えば、適切に希釈されるか又は濃縮されるかなど調製されることができ、且つ通常の様式で貯蔵される。更なる実施態様において、生物学的液体試料は、血液又は血清又は血漿

50

から選択される。当業者には、体液中のヌクレオソーム付加物の検出は、生検を必要としない、侵襲性が最小の方法であるという利点を有することは明らかであろう。

【0091】

一実施態様において、対象は、哺乳動物の対象である。更なる実施態様において、対象は、ヒト又は動物(マウスなど)の対象から選択される。

【0092】

一実施態様において、ヌクレオソームは、無細胞系モノヌクレオソーム又はオリゴヌクレオソームである。

【0093】

本発明の使用及び方法は、インビトロ、エキスピボ及び/又はインピボにおいて実行されてよいことは理解されるであろう。

【0094】

本発明の更なる態様に従い、動物又はヒト対象における原発性腫瘍の性質を決定又は診断するための方法であって：

(i)対象の生物学的液体中のクロマチン断片中の又はヌクレオソームに付加された1種以上の組織特異的転写因子又は補助因子を検出又は測定する工程；並びに

(ii)クロマチン断片中の又はヌクレオソームに付加された1種以上の組織特異的転写因子又は補助因子の検出を使用し、該対象における原発性腫瘍の性質を同定する工程：を含む、方法が提供される。

【0095】

本発明の一実施態様において、試料中のクロマチン断片中の又はヌクレオソームに付加された1種以上の組織特異的転写因子の存在又はレベルを使用し、そのような治療を必要とする対象のための最適治療レジメンが決定される。当業者により、組織特異的クロマチン断片又は転写因子-ヌクレオソーム付加物を使用し、癌の部位、位置及び/又は臓器配置を同定することができ、これは、すなわち癌の起源/配置を基に、最適治療を決定するために使用することができることは理解されるであろう。

【0096】

本発明の更なる態様に従い、動物又はヒト対象の医学治療に関する適合性を評価するための方法であって：

(i)該対象の生物学的液体中のクロマチン断片中の又はヌクレオソームに付加された1種以上の組織特異的転写因子又は補助因子を検出又は測定する工程；並びに

(ii)該対象にとって好適な治療を決定するために検出されたクロマチン断片中の又はヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子の種類を使用する工程：を含む、方法が提供される。

【0097】

本発明の更なる態様に従い、動物又はヒト対象の治療をモニタリングするための方法であって：

(i)該対象の生物学的液体中のクロマチン断片中の又はヌクレオソームに付加された1種以上の組織特異的転写因子又は補助因子を検出又は測定する工程；

(ii)1回以上、該対象の生物学的液体中のクロマチン断片中の又はヌクレオソームに付加された1種以上の組織特異的転写因子又は補助因子の検出又は測定を繰り返す工程；並びに

(iii)該対象の状態の何らかの変化に関するパラメータとして、検出されたクロマチン断片中の又はヌクレオソームに付加された1種以上の組織特異的転写因子又は補助因子のレベルの何らかの変化を使用する工程：を含む、方法が提供される。

【0098】

被験試料中の組織特異的クロマチン断片又は転写因子-もしくは補助因子-ヌクレオソーム付加物のレベルの、同じ被験対象から先に採取されたより早期の被験試料中のレベルに対する変化は、障害又は疑われる障害に対する該療法の、有益な作用の、例えば安定化又は改善を示すことができる。更に、一旦治療が完了したならば、本発明の方法は、疾患の

10

20

30

40

50

再発をモニタリングするために、定期的に反復されてよい。

【0099】

一実施態様において、組織特異的クロマチン断片又は転写因子ヌクレオソーム付加物は、測定値のパネルの一つとして検出又は測定される。例えば、組織特異的転写因子ヌクレオソーム付加物は、同じ組織に特異的である他のバイオマーカーにより、例えばKandalaf t及びGownの文献、2015に説明された組織特異的マーカーと組合せて、検出することができる。

【0100】

本発明の更なる実施態様において、癌疾患の型を検出又は診断し、それに薬物又は他の治療の選択肢が標的化されるべき最適な癌型を評価するための方法であって、試験のパネルの一部としてヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子の存在又はレベルについて、癌と診断された対象から採取された試料を試験する工程を含む方法が提供される。

10

【0101】

従ってかかる試験のパネルは、例えば、様々な組織特異的転写因子を含むヌクレオソーム付加物の2以上の又は複数の測定値からなる。

【0102】

本明細書に説明された組織特異的クロマチン断片及び転写因子ヌクレオソーム付加物は、疾患の所在の指標であるので、これらの付加物は、インビトロアッセイ及び/又はインビボアッセイにおける新規治療的化合物の同定に有用である。従って、本発明のヌクレオソーム付加物は、ヌクレオソーム付加物のレベルを変更する化合物のスクリーニングする方法において利用することができ、結果的に特異的癌型を標的化することが可能である。

20

【0103】

従って対象において特異的癌型を標的化することが可能である物質を同定する方法であって、被験物質を、対象動物へ投与する工程、並びにこの対象からの被験試料中に存在する組織特異的クロマチン断片又は転写因子ヌクレオソーム付加物のレベルを検出及び/又は定量する工程を含む方法が提供される。

【0104】

癌型の効率の差次的診断及びモニタリング法は、正確な診断を確立し、最も適した治療の迅速な同定を可能にし(従って、有害な薬物の副作用への不必要な曝露を減らす)、且つ再発率を低下することにより、改善された予後をもたらす可能性のある、非常に強力な「患者解法」を提供する。

30

【0105】

同定及び/又は定量は、患者由来の生物学的試料中の又は生物学的試料の精製物もしくは抽出物もしくはそれらの希釈物中の、特異的タンパク質の存在及び/又は量を同定するのに適した任意の方法により実行することができることは理解されるであろう。本発明の方法において、定量は、1又は複数の試料中のバイオマーカーの濃度を測定することにより実行することができる。本発明の方法において試験され得る生物学的試料は、本明細書において先に規定されたものを含む。試料は、例えば、適切に希釈されるか又は濃縮されるなど調製されることができ、且つ通常の様式で貯蔵される。

【0106】

40

バイオマーカーの同定及び/又は定量は、バイオマーカー又はそれらの断片、例えばC-末端切断を伴う断片、又はN-末端切断を伴う断片の検出により実行することができる。断片は、好適には、長さが4個よりも大きいアミノ酸、例えば、長さが5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個のアミノ酸である。

【0107】

前記バイオマーカーは、例えば、SELDI又はMALDI-TOFにより、直接的に検出されてよい。あるいは、バイオマーカーは、抗体もしくはそれらのバイオマーカー結合断片、又は他のペプチドなどの1種又は複数のリガンドとの相互作用、あるいは例えばバイオマーカーに特異的に結合することが可能であるアプタマー又はオリゴヌクレオチドなどのリガンドとの相互作用を介して、直接的に又は間接的に検出されてよい。リガンド又はバインダー

50

は、ルミネセント、蛍光又は放射性標識などの、検出可能な標識、及び／又は親和性タグを有してよい。

【0108】

例えば、検出及び／又は定量は、SELDI(-TOF)、MALDI(-TOF)、1-Dゲル-ベース分析、2-Dゲル-ベース分析、質量分析(MS)、逆相(RP)LC、サイズ透過(ゲル濾過)、イオン交換、アフィニティ、HPLC、UPLC及び他のLC又はLC MS-ベースの技術からなる群から選択される1種以上の方法により、実行することができる。適切なLC MS技術は、ICAT(登録商標)(Applied Biosystems社、CA、米国)、又はiTRAQ(登録商標)(Applied Biosystems社、CA、米国)を含む。液体クロマトグラフィー(例えば、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)又は低速液体クロマトグラフィー(LPLC))、薄層クロマトグラフィー、NMR(核磁気共鳴)分光法も、使用することができる。

10

【0109】

本発明に従う癌の差次的診断又はモニタリングの方法は、バイオマーカーの存在又はレベルを検出するために、SELDI TOF又はMALDI TOFにより試料を分析することを含んでよい。これらの方法は同じく、予後、療法の結果のモニタリング、特定の治療的処置に対し最も反応する可能性がある患者の同定、薬物スクリーニング及び創薬、並びに薬物治療に関する新規標的の同定に適している。

【0110】

被検体バイオマーカーの同定及び／又は定量は、バイオマーカーに特異的に結合することが可能である抗体、又はそれらの断片が関与する、免疫学的方法を用いて実行されてよい。好適な免疫学的方法は、被検体バイオマーカーの検出が被検体バイオマーカー上の異なるエピトープを認識する2種の抗体を用いて実行される、サンドイッチELISAなどの、サンドイッチ免疫検定；放射免疫測定(RIA)、直接的、間接的又は競合酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、酵素免疫検定(EIA)、蛍光免疫検定(FIA)、ウェスタンブロット、免疫沈降及び任意の粒子-ベースの免疫検定(例えば、金、銀、もしくはラテックス粒子、磁気粒子、又はQ-dotを使用する)を含む。免疫学的方法は、例えば、マイクロタイタープレート又はストリップフォーマットにおいて実行されてよい。

20

【0111】

本発明の免疫検定は、酵素検出法(例えばELISA)を利用するイムノメトリックアッセイ、蛍光標識イムノメトリックアッセイ、時間分解蛍光標識イムノメトリックアッセイ、化学発光イムノメトリックアッセイ、免疫比濁法、粒子標識イムノメトリックアッセイ及び免疫放射線検定法、並びに放射性、酵素、蛍光、時間分解蛍光及び粒子の標識を含む、様々な標識型による、標識抗原及び標識抗体競合型免疫検定法を含む競合型免疫検定法を含む。一部の免疫検定は、任意の標識部分を使用せず、直接の抗体結合を検出する方法を利用する。該免疫検定法は全て、当該技術分野において周知であり、例えば、Salgameらの文献、1997、及びvan Nieuwenhuijzeらの文献、2003を参照されたい。

30

【0112】

本発明の更なる態様に従い、組織特異的転写因子に特異的なリガンド又はバインダー、及びヌクレオソームもしくはそれらの構成部分に特異的な別のリガンド又はバインダーを、本明細書に説明した方法に従うキットの使用説明書と一緒に備える、ヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子の検出のためのキットが提供される。

40

【0113】

本発明の更なる態様に従い、第一の転写因子又は補助因子に特異的なリガンド又はバインダー、及び第二の転写因子又は補助因子に特異的な別のリガンド又はバインダーを、本明細書に説明した方法に従うキットの使用説明書と一緒に備える、組織特異的クロマチン断片の検出のためのキットが提供される。

【0114】

本発明の更なる態様に従い、治療を必要とする個体において癌を治療する方法であって：

(a)本明細書記載の方法に従い、個体において癌を検出又は診断する工程；それに続け

50

て

(b)該癌へ適するよう該個体へ抗-癌療法、手術又は医薬品を投与する工程：を含む、方法が提供される。

【0115】

本発明の更なる態様に従い、治療を必要とする個体において癌を治療する方法であって：

(a)本明細書記載の方法に従い、個体において癌の発生部位を診断する工程；それに続けて

(b)該発生部位へ適するよう該個体へ抗-癌療法、手術又は医薬品を投与する工程：を含む、方法が提供される。

10

【0116】

本発明者らは、本明細書記載のアッセイのための検出抗体として、抗-ヒストン抗体を、捕獲抗体として好適な特異的な抗-組織特異的転写因子抗体と組合せて、使用した。本発明者らは、特異的な組織特異的転写因子を含むヌクレオソーム付加物は、癌対象から採取された血液試料中で測定することができ、且つ非侵襲的又は最小の侵襲性のバイオマーカーとしての使用のために識別されることを示すために、本アッセイを使用した。

【0117】

当業者には、本発明の使用又は方法は、ヌクレオソームに付着又は結合され得る任意の組織特異的転写因子又は補助因子を検出又は測定するために使用することができることは明らかであろう。

20

【0118】

本発明者らは、本発明の方法は、組織特異的クロマチン断片及び組織特異的転写因子-ヌクレオソーム付加物の検出及び測定の好結果を伴う方法であること、並びにこの方法は、対象における癌の非侵襲的検出及び/又は別の癌検出法(例えば、ctDNA配列法による)により検出された又はCUPにおける原発性腫瘍の同定に関して、優れた方法であることを結論付けている。

【0119】

本発明はここで、以下の非限定的実施例を参照し、更に詳細に説明されるであろう。

【実施例】

【0120】

30

(実施例1)

血清試料を、健常対象1名、乳癌対象2名、及び尿路上皮膀胱癌(GATA 3癌組織発現試験において陽性結果を生じることがわかっている移行上皮癌)の対象2名から採取した。GATA 3に関する唯一のELISAキットを使用する市販の96ウェルリサーチを購入し、これはマイクロタイターウェルにコーティングされたGATA 3転写因子のための固相抗体を含んだ。GATA 3は、乳癌から採取された生検材料試料の全て又はほとんどにおいて発現される組織特異的転写因子であり、これはまた、移行上皮癌及び皮膚付属器腫瘍においても陽性であるが、他の癌由来の試料のほとんどにおいては陽性ではない。固相GATA 3抗体を、ビオチン化抗-ヌクレオソーム抗体と一緒に、以下のように、無細胞系ヌクレオソーム結合したGATA 3のための二重抗体ELISAにおいて使用した：血清試料(50 µl)及びアッセイ緩衝液(50 µl)を、抗-GATA 3抗体でコーティングされたウェルに添加し、且つ室温(およそ20 °C)で2.5時間、振盪しながらインキュベーションした。その後試料を除去し、且つビオチン化抗-ヌクレオソーム抗体(100 µl)を添加し、1.5時間インキュベーションした。ビオチン化抗体溶液を除去し、ウェルを、洗浄緩衝液(200 µl)により3回洗浄した。ストレプトアビジン-HRPコンジュゲート溶液を、ウェルに添加し、30分間インキュベーションした。ウェルを更に3回洗浄し、HRP基質溶液(2,2'-アジノビス[3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸]-ジアンモニウム塩溶液の100 µl)を添加し、20分間インキュベーションした。停止溶液(50 µl)を添加し、ウェルの光学濃度(OD)を405nmで決定した。

40

【0121】

健常対象から採取した試料又は陰性対照よりも、乳癌対象3名中の2名から採取した試料

50

について、より高いELISAシグナル、及び循環無細胞系ヌクレオソーム-GATA 3付加物のより高いレベルが認められた。移行上皮癌対象2名のうちの1名もまた、健常対象を上回る上昇したODレベルを有した。これらの結果は、図1に示し、且つ血清ヌクレオソーム-GATA 3付加物アッセイを使用し、乳癌である場合に癌を検出し、及び/又は発生の原発部位が不明の癌を同定することができること、並びにヌクレオソーム-GATA 3付加物をこの目的のためのバイオマーカーとして使用することができることを例示している。

【0122】

(実施例2)

血清又は試料を、甲状腺癌対象2名、肺癌対象3名、及び健常対象1名から採取した。TTF-1に関する唯一のELISAキットを使用する市販の96ウェルリサーチを購入し、これはマイクロタイターウェルにコーティングされたTTF-1(甲状腺転写因子1)のための固相抗体を含んだ。TTF-1は、甲状腺癌及び肺癌から採取された生検材料試料の全て又はほとんどにおいて発現される組織特異的転写因子であるが、他の癌由来の試料のほとんどにおいては発現されない。固相TTF-1抗体を、実施例1に説明したように、ビオチン化抗-ヌクレオソーム抗体と一緒に、無細胞系ヌクレオソーム結合したTTF-1のための二重抗体ELISAにおいて使用した。

【0123】

健常対象から採取した試料又は陰性対照よりも、甲状腺癌患者対象から採取した試料について、より高いELISAシグナル、及び循環無細胞系ヌクレオソーム-TTF-1付加物のより高いレベルが認められた。肺癌患者の血液中の循環無細胞系ヌクレオソーム-TTF-1付加物のレベルは、わずかに上昇した。これらの結果は、図2に示している。

【0124】

後続の実験において、健常対象3名からの血清試料に加え、甲状腺、肺、膵臓、直腸、結腸及び乳房の癌と診断された対象からの試料を、循環無細胞系ヌクレオソーム-TTF-1付加物レベルについてアッセイし、このアッセイの組織特異性を解明した。アッセイした甲状腺癌患者1名に関する結果は、強力な陽性であった。肺癌患者4名全員、膵臓癌患者3名全員、及び乳癌患者3名中2名のレベルは、低かった。驚くべきことに；レベルは、結腸直腸癌患者6名全員において上昇し、これは循環無細胞系ヌクレオソーム-TTF-1付加物レベルを使用し、結腸直腸原発性癌として原発不明癌を同定することができることを指摘している。これは、血液中の循環無細胞系ヌクレオソーム-転写因子付加物レベルの組織特異性は、生検時に摘出された癌組織における転写因子発現レベルの特異性と必ずしも同じではないことを指摘している。これらの結果は、図3に示している。

【0125】

当業者には、ヌクレオソーム-TTF-1付加物アッセイを使用し、甲状腺癌又は結腸直腸癌である場合に、癌を検出するか、又は発生の原発部位が不明の癌を同定することができること、並びにヌクレオソーム-TTF-1付加物をこの目的のためのバイオマーカーとして使用することができることは明らかであろう。

【0126】

(実施例3)

血清を、健常対象3名、甲状腺癌と診断された対象1名、肺癌対象3名、膵臓癌対象3名、結腸直腸癌対象6名(結腸癌3名及び直腸癌3名)並びに乳癌対象3名から採取した。CDX2に関する唯一のELISAキットを使用する市販の96ウェルリサーチを購入し、これはマイクロタイターウェルにコーティングされたCDX2(Caudal型ホメオボックス転写因子-2)のための固相抗体を含んだ。CDX2は、結腸直腸癌から採取された生検材料試料の全て又はほとんどにおいて発現される組織特異的転写因子であるが、他の癌由来の試料のほとんどにおいては発現されない。固相CDX2抗体を、実施例1に説明したように、ビオチン化抗-ヌクレオソーム抗体と一緒に、無細胞系ヌクレオソーム結合したCDX2のための二重抗体ELISAにおいて使用した。

【0127】

健常対象からもしくは他の癌の対象から採取した試料又は陰性対照よりも、結腸直腸癌

10

20

30

40

50

患者から採取した試料について、より高いELISAシグナル、及び循環無細胞系ヌクレオソーム-CDX2付加物のより高いレベルが認められた。健常対象1名及び乳癌対象1名もまた、偽陽性の結果であり得る上昇したレベルを有した。これらの結果は、図4に示し、且つ循環無細胞系ヌクレオソーム-CDX2付加物レベルを使用し、結腸直腸癌である場合に癌を検出するか、又は発生の原発部位が不明の癌を同定することができること、並びにヌクレオソーム-CDX2付加物をこの目的のためのバイオマーカーとして使用することができることを指摘している。

【 0 1 2 8 】

本発明者らは、3種のプロトタイプ無細胞系ヌクレオソーム-組織特異的転写因子付加物アッセイを開発し、これら3種全ては、対象が既に癌と診断された場合に、原発部位が不明の癌を同定するための臨床的有用性を示した。これは、一般的効果であること、並びに類似のヌクレオソーム-組織特異的転写因子アッセイを、癌と診断されるか又は検出されているが、原発性癌の発生部位は不明である場合に、広範な原発性癌疾患の同定のために開発することができることは明らかであろう。類似の組織特異的転写因子発現が、多くの他の癌について手術又は生検により摘出された癌組織試料において生じることはわかっている (Kandalafi及びGownの文献、2015)。当業者には、好適な組織特異的クロマチン断片又は組織特異的ヌクレオソーム-転写因子もしくは補助因子付加物に関する実施例1-3に説明したアッセイに似た、類似の血液又は他の体液をベースにした無細胞系ヌクレオソーム付加物アッセイは、かかる転写因子が既に同定されている広範な癌に関して、並びに / 又はかかる組織特異的転写因子、組織特異的転写補助因子、又は転写因子及び / もしくは補助因子発現の組織特異的組合せが同定され得る任意の癌に関して、癌を検出するか、又は原発部位が不明の癌を同定するために使用することができることは明らかであろう。

【 0 1 2 9 】

本明細書に説明された実施態様は、本発明の全ての態様に適用されてよいことは理解されるであろう。更に本明細書に引用された特許及び特許出願を含むがこれらに限定されるものではない全ての刊行物は、十分に説明されたように引用により本明細書中に組み込まれている。

本件出願は、以下の構成の発明を提供する。

(構成 1)

対象における癌の検出又は診断のための、生物学的液体中のバイオマーカーとしての組織特異的転写因子-ヌクレオソーム付加物又は転写補助因子-ヌクレオソーム付加物の使用。

(構成 2)

前記組織特異的転写因子-ヌクレオソーム付加物又は転写補助因子-ヌクレオソーム付加物が、対象における癌の発生部位を同定するために使用される、構成1記載の使用。

(構成 3)

以前に癌と診断された対象における癌の発生部位の同定又は診断のための、生物学的液体中のバイオマーカーとしての組織特異的転写因子-ヌクレオソーム付加物又は転写補助因子-ヌクレオソーム付加物の使用。

(構成 4)

前記癌が、原発性癌である、構成1～3のいずれか一項記載の使用。

(構成 5)

前記対象が、転移性原発不明癌を伴う対象である、構成1～4のいずれか一項記載の使用。

(構成 6)

前記対象が、バイオマーカーとして循環腫瘍DNA(ctDNA)を使用し、以前に癌と診断された、構成3～5のいずれか一項記載の使用。

(構成 7)

対象において癌を検出し及び / 又は癌の発生部位を決定するための方法であって：

(i) 該対象から生物学的液体試料を得る工程；

10

20

30

40

50

(ii) 該試料を、ヌクレオソーム又はその成分へ結合する第一の結合性物質と接触させる工程；

(iii) 該ヌクレオソーム又は試料を、ヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子に結合する第二の結合性物質と接触させる工程；並びに

(iv) 該第二の結合性物質の、該試料中の該付加された組織特異的転写因子又は補助因子への結合を検出又は定量する工程：を含み；

ここで、ヌクレオソームに付加された該組織特異的転写因子又は補助因子の存在又はレベルが、該癌の存在及び／又は発生部位の指標として使用される、前記方法。

(構成8)

対象において癌を検出し及び／又は癌の発生部位を決定するための方法であって：

(i) 該対象から生物学的液体試料を得る工程；

(ii) 該試料を、組織特異的転写因子又は補助因子に結合する第一の結合性物質と接触させる工程；

(iii) 該ヌクレオソーム又は試料を、ヌクレオソーム又はその成分に結合する第二の結合性物質と接触させる工程；並びに

(iv) 該第二の結合性物質の、該試料中のヌクレオソーム又はその成分への結合を検出又は定量する工程：を含み；

ここで、ヌクレオソームに付加された該組織特異的転写因子又は補助因子の存在又はレベルが、該癌の存在及び／又は発生部位の指標として使用される、前記方法。

(構成9)

前記癌が、原発性癌である、構成7又は8記載の方法。

(構成10)

前記対象が、転移性原発不明癌を伴う対象である、構成7～9のいずれか一項記載の方法

。

(構成11)

前記対象が、以前に癌と診断されている、構成7～10のいずれか一項記載の方法。

(構成12)

前記結合性物質が、抗体、抗体断片又はアプタマーである、構成7～11のいずれか一項記載の方法。

(構成13)

ヌクレオソーム又はその成分に結合する前記結合性物質が、特定のヒストン、ヒストン修飾物、ヒストン変種もしくはアイソフォームへ、又はDNAもしくはその成分へ結合するように方向付けられている、構成7～12のいずれか一項記載の方法。

(構成14)

医学治療に関する適合性について動物又はヒト対象を評価するための方法であって：

(i) 構成7～13のいずれか一項記載の方法に規定されたように、該対象の生物学的液体中のヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子を検出又は測定する工程；並びに

(ii) 該対象にとって好適な治療を決定するために、検出されたヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子の種類を使用する工程：を含む、前記方法。

(構成15)

動物又はヒト対象の治療をモニタリングするための方法であって：

(i) 構成7～13のいずれか一項記載の方法に規定されたように、該対象の生物学的液体中のヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子を検出又は測定する工程；

(ii) 1回以上、該対象の生物学的液体中のヌクレオソームに付加された該組織特異的転写因子又は補助因子の検出又は測定を繰り返す工程；並びに

(iii) 該対象の状態の何らかの変化に関するパラメータとして、検出されたヌクレオソームに付加された組織特異的転写因子又は補助因子のレベルの何らかの変化を使用する工程：を含む、前記方法。

10

20

30

40

50

(構成 1 6)

ヌクレオソームに付加された前記組織特異的転写因子が、測定値のパネルの一つとして検出又は測定される、構成7～15のいずれか一項記載の方法。

(構成 1 7)

前記組織特異的転写因子が、GATA 3、CDX2、TTF-1、PAX8、WT1、NKX3.1、P63又はP40から選択される、構成1～6のいずれか一項記載の使用又は構成7～16のいずれか一項記載の方法。

(構成 1 8)

前記生物学的液体が、血液、血清又は血漿から選択される、構成1～6のいずれか一項記載の使用又は構成7～17のいずれか一項記載の方法。

10

(構成 1 9)

治療を必要とする個体において癌を治療する方法であって：

(a) 構成7～18のいずれか一項記載の方法に従い、個体において癌を検出し及び／又は癌の発生部位を診断する工程；それに続けて

(b) 該癌及び／又は発生部位へ適するよう該個体へ抗-癌療法、手術又は医薬品を投与する工程：を含む、前記方法。

(構成 2 0)

対象における癌の検出のための生物学的液体中のバイオマーカーとして、2種以上の転写因子又は補助因子の組織特異的組合せを含んでいるクロマチン断片の使用。

(構成 2 1)

前記組織特異的組合せが、対象における癌の発生部位の同定のために使用される、構成20記載の使用。

20

(構成 2 2)

前記対象が、癌を有することが以前に診断されている、構成20又は21記載の使用。

(構成 2 3)

前記癌が、原発性癌である、構成20～22のいずれか一項記載の使用。

(構成 2 4)

前記対象が、転移性原発不明癌を伴う対象である、構成20～23のいずれか一項記載の使用。

(構成 2 5)

前記対象が、バイオマーカーとして循環腫瘍DNA(ctDNA)を使用し、以前に癌と診断された、構成22～24のいずれか一項記載の使用。

30

(構成 2 6)

対象において癌を検出するか又は癌の発生部位を決定するための方法であって：

(i) 該対象から生物学的液体試料を得る工程；

(ii) 該試料を、第一の転写因子又は補助因子に結合する第一の結合性物質と接触させる工程；

(iii) 該試料を、第二の転写因子又は補助因子に結合する第二の結合性物質と接触させる工程；並びに

(iv) 該試料中の該第一又は第二の結合性物質の結合を検出又は定量する工程：を含み、

ここで、クロマチン断片中の第一及び第二の転写因子もしくは補助因子の両方の組合せの存在、並びに／又はその断片のレベルが、該癌の存在及び／又は発生部位の指標として使用される、前記方法。

40

【 0 1 3 0 】

(参考文献)

【化 1】

Esteller, Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps
Nature Reviews Genetics, 8: 286-298, 2007

Herranz and Esteller, DNA methylation and histone modifications in subjects with
cancer: potential prognostic and therapeutic targets. Methods Mol Biol. 361: 25-62,
2007

10

Hervouet et al, Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 Interactions Promotes
Tumorigenesis from Human and Mice Glial Cells
PLoS ONE 5(6): e11333. doi:10.1371/journal.pone.0011333, 2010

Holdenrieder et al, Nucleosomes in serum of subjects with benign and malignant
diseases. Int. J. Cancer (Pred. Oncol.), 95: 114–120, 2001

Holdenrieder et al, Cell-Free DNA in Serum and Plasma: Comparison of
ELISA and Quantitative PCR. Clinical Chemistry, 51(8): 1544-1546, 2005

20

Holdenrieder and Stieber, Clinical use of circulating nucleosomes. Critical Reviews in
Clinical Laboratory Sciences; 46(1): 1–24, 2009

Kandalaft and Gown, Practical Applications in Immunohistochemistry; Carcinomas of
Unknown Primary Site. Arch Pathol. Lab. Med. doi: 10.5858/arpa.2015-0173-CP,
2015

30

Levy et al, Multiple Transcription Factor Elements Collaborate with Estrogen
Receptor α to Activate an Inducible Estrogen Response Element in the NKG2E
Gene. Endocrinology, 148(7): 3449-345, 2007

Mariño-Ramírez et al, The Histone Database: an integrated resource for histones
and histone fold-containing proteins. Database, doi: 10.1093/database/bar048, 2011

Muller et al, FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. The
EMBO Journal 19(3): 359–369, 2000

40

Pihlajamaa et al, Tissue-specific pioneer factors associate with androgen receptor
cistromes and transcription programs. The EMBO Journal 33(4): 312-326, 2014

Ricke and Bielinsky, Easy detection of chromatin binding proteins by the histone association. *Assay Biol Proced Online*, 7(1): 60-69, 2005

Salgame et al, An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic Acids Research*, 25(3): 680-681, 1997

van Nieuwenhuijze et al, Time between onset of apoptosis and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative implications for systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.*, 62: 10–14, 2003

10

Yoshida and Shimura, Isolation of nonhistone chromosomal protein from calf thymus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 263(3): 690-695, 1972

Yu et al, Computational analysis of tissue-specific combinatorial gene regulation: predicting interaction between transcription factors in human tissues. *Nucleic Acids Research* 34(17): 4925–4936, 2006

20

Zhang and Glass, Towards an understanding of cell-specific functions of signal-dependent transcription factors. *Journal of Molecular Endocrinology*, 51: T37–T50, 2013

Zhao et al, Estrogen Signaling via Estrogen Receptor β . *Journal of Biological Chemistry*, 285(51): 39575–39579, 2010

30

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 45/00

(72)発明者 ジョルジ レイス フィルホ
ベルギー ビーイー 5 0 3 2 イスネス ルエ プホカス レジュネ 2 2 シー / オー ベル
ジアン ポリション エスピーアールエル

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特表 2 0 1 5 - 5 0 0 4 7 8 (J P , A)
特開 2 0 0 4 - 1 5 9 6 4 0 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 0 / 0 0 1 9 3 3 (W O , A 1)
BALLARE CECILIA ET AL , Nucleosome-Driven Transcription Factor Binding and Gene Regulation , MOLECULAR CELL , 2 0 1 2 年 1 1 月 2 1 日 , Vol.49 No.1 , Page.67-79
MATTHEW W. SNYDER ET AL , Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin , CELL , 2 0 1 6 年 1 月 1 4 日 , Vol.164 No.1-2 , Page.57-68
CHRISTIN WITTWER ET AL , Circulating nucleosomes and immunogenic cell death markers HMG B1, sRAGE and DNase in patients with advanced pancreatic cancer undergoing chemotherapy , INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER , 2 0 1 3 年 8 月 9 日 , Vol.133 No.11 , Page.2619-2630
MOTOKI TAKAKU ET AL , GATA3-dependent cellular reprogramming requires activation-domain dependent recruitment of a chromatin remodeler , GENOME BIOLOGY , 2 0 1 6 年 2 月 2 7 日 , Vol.17 No.1 , Page.36
横山 敦 , 組織特異的な転写制御をつかさどるヒストン修飾因子複合体 , 生化学 , 2 0 1 5 年 , 第87巻 第5号 , Page.621-624
Andrea Campos-Carrillo , Circulating tumor DNA as an early cancer detection tool , Pharmacology & Therapeutics , 2 0 2 0 年 , Vol.207 , Page.107458
Arpit Bhargava , Epigenetic Biomarkers for Risk Assessment of Particulate Matter Associated Lung Cancer , Current Drug Targets , 2 0 1 8 年 , Vol.19 , Page.1127-1147
Rajbir K Athwal , CENP-A nucleosomes localize to transcription factor hotspots and subtelomeric sites in human cancer cells , Epigenetics & Chromatin , 2 0 1 5 年 , Vol.8 , Page .2

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G 0 1 N 3 3 / 5 7 4
A 6 1 K 4 5 / 0 0
A 6 1 P 3 5 / 0 0
C 1 2 Q 1 / 6 8 8 6
G 0 1 N 3 3 / 5 3
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)