

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7084034号

(P7084034)

(45)発行日 令和4年6月14日(2022.6.14)

(24)登録日 令和4年6月6日(2022.6.6)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A
C 1 2 Q	1/6844(2018.01)	C 1 2 Q	1/6844	Z
C 1 2 Q	1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z
C 1 2 Q	1/6813(2018.01)	C 1 2 Q	1/6813	Z
C 1 2 Q	1/6886(2018.01)	C 1 2 Q	1/6886	Z

請求項の数 10 (全25頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-559101(P2018-559101)
 (86)(22)出願日 平成29年12月20日(2017.12.20)
 (86)国際出願番号 PCT/JP2017/045715
 (87)国際公開番号 WO2018/123764
 (87)国際公開日 平成30年7月5日(2018.7.5)
 審査請求日 令和2年12月3日(2020.12.3)
 (31)優先権主張番号 特願2016-255108(P2016-255108)
 (32)優先日 平成28年12月28日(2016.12.28)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 日本国(JP)

(73)特許権者 504150450
 国立大学法人神戸大学
 兵庫県神戸市灘区六甲台町1 - 1
 (74)代理人 100124431
 弁理士 田中 順也
 (74)代理人 100174160
 弁理士 水谷 馨也
 (74)代理人 100175651
 弁理士 迫田 恭子
 (72)発明者 西村 範行
 兵庫県神戸市灘区六甲台町1 - 1 国立
 大学法人神戸大学内
 審査官 市島 洋介

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 神経芽腫の微小残存病変を評価するために用いられる試薬、およびそれを用いた生体試料の分析方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

CRMP1、DBH、DDC、GAP43、ISL1、PHOX2BおよびTHからなる遺伝子マーカーを核酸増幅法により増幅しうるプライマーペアを含み、神経芽腫の微小残存病変を評価するために用いられる試薬。

【請求項2】

レファレンス遺伝子としての、HPRT1、HMBS、GUSB、TBPおよびB2Mの少なくともいずれかを核酸増幅法により増幅しうるプライマーペアをさらに含む、請求項1に記載の試薬。

【請求項3】

レファレンス遺伝子としての、HPRT1、HMBS、GUSBおよびTBPの少なくともいずれかを核酸増幅法により増幅しうるプライマーペアをさらに含む、請求項1に記載の試薬。

【請求項4】

HPRT1からなるレファレンス遺伝子を核酸増幅法により増幅しうるプライマーペアをさらに含む、請求項1に記載の試薬。

【請求項5】

骨髄検体に対して用いられる、請求項4に記載の試薬。

【請求項6】

前記遺伝子マーカーとストリンジェントな条件下でハイブリダイズしうるプローブをさら

に含む、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の試薬。

【請求項 7】

レファレンス遺伝子を核酸増幅法により増幅しうるプライマーペアをさらに含む場合、前記レファレンス遺伝子とストリンジентな条件下でハイブリダイズしうるプローブをさらに含む、請求項 6 に記載の試薬。

【請求項 8】

C R M P 1、D B H、D D C、G A P 4 3、I S L 1、P H O X 2 B および T H からなる遺伝子マーカーの生体試料中における発現量を、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の試薬を用いて核酸増幅法により測定する測定工程と、

前記遺伝子マーカーの 1 種以上の発現量が、健常者における定量値を参照して設定されるカットオフ値以上か否かを評価する評価工程とを含み、

前記発現量が神経芽腫の微小残存病変の発生レベルと相関し、

前記評価工程において、前記遺伝子マーカーの 1 種以上の発現量が前記カットオフ値以上である場合に、前記生体試料の神経芽腫の微小残存病変を陽性と判定する、生体試料の分析方法。

10

【請求項 9】

前記測定工程における前記核酸増幅法がデジタル P C R である、請求項 8 に記載の生体試料の分析方法。

【請求項 10】

前記測定工程において、同一の核酸増幅装置を用いて前記遺伝子マーカーを同時に核酸増幅する、請求項 9 に記載の生体試料の分析方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、神経芽腫の微小残存病変を評価するための遺伝子マーカーおよびその使用に関する。より具体的には、本発明は、神経芽腫の微小残存病変を評価するために用いられる試薬、およびそれを用いた生体試料の分析方法に関する。

【背景技術】

【0002】

神経芽腫は、神経堤細胞由来の難治性小児がんであり、小児がんの約 10% を占める。これは、脳腫瘍に次いで高い頻度である。また神経芽腫は、小児がん死亡原因の約 15% を占める。

30

神経芽腫は、5 つの予後因子（病期、病理、年齢、M Y C N 増幅、D N A プロイディー）を用いて、低・中間・高リスク群に分類されるが、50% を超える患者が高リスク群に分類される。そして、高リスク群患者の 50% 超で再発する。

【0003】

したがって、神経芽腫の予後改善、特に高リスク群患者の予後改善には、再発の起源と考えられる微小残存病変（M R D）を正しく評価することが不可欠である。腫瘍細胞にのみを検出される遺伝子が同定されていない神経芽腫では、正常細胞に比して腫瘍細胞で高発現するいくつかの遺伝子をマーカーとすることで、M R D の検出が試みられてきた。

40

【0004】

神経芽腫の M R D の遺伝子マーカーとして、最初に T H が報告され（非特許文献 1）、その後、P H O X 2 B が報告された（非特許文献 2）。さらに、非特許文献 3 では、C H G A、D C X、D D C、P H O X 2 B、および T H の 5 種の遺伝子マーカーが報告されている。非特許文献 4 では、B 4 G A L N T（G D 2 synthase）、C C N D 1、I S L 1、P H O X 2 B の 4 種の遺伝子マーカーが報告されている。非特許文献 5 では、C H R N A 3、D D C、G A P 4 3、P H O X 2 B、および T H の 5 種の遺伝子マーカーが報告されている。

【0005】

一方、非特許文献 6 では、それまでの遺伝子マーカー探索において通常に用いられてきた

50

接着培養したパレンタル神経芽腫細胞ではなく、生体内でMRDを構成するがん幹細胞が濃縮されるように浮遊培養したスフェアー神経芽腫細胞を検証し、CHRNA3、CRMP1、DBH、DCX、DDC、GABRB3、GAP43、ISL1、KIF1A、PHOX2B、およびTHの11種の遺伝子マーカーのうちいずれかが正常範囲を超えて発現している場合にMRD陽性とスコアするMRD検出プロトコールが提唱されている。非特許文献7では、2症例において、再発/再増殖の臨床診断よりも早期に、当該11種の遺伝子マーカーによりMRD陽性と評価することが報告されている。上述の非特許文献6および非特許文献7では、遺伝子マーカーの測定にリアルタイムPCRが用いられている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【文献】International Journal of Cancer (1994) 57: 671-675.

Journal of Clinical Oncology (2008) 26: 5443-5449.

Lancet Oncology (2013) 14: 999-1008.

Journal of Clinical Oncology (2015) 33:755-763.

European Journal of Cancer (2016) 54: 149-158.

Oncology Reports (2013) 29: 1629-1636.

Oncology Letters (2016) 12: 1119-1123.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

このように、神経芽腫のMRDマーカーとしては様々なものが報告されている。最初に神経芽腫のMRDマーカーとして非特許文献1で報告されたTHでは、それ単独ではTH陰性となりMRDを検出できない例が多数報告され、次に、より陰性例の少ないMRDマーカーとして非特許文献2で報告されたPHOX2Bでもそれ単独では陰性例が散見された。これは、神経芽腫が、腫瘍の中でも多様性(ヘテロジェナイティー)が特に著しいという特有の課題を有していることを示している。このような神経芽腫特有の多様性に対応させるため、複数のMRDマーカーを用いたMRDの検出が試みられている。なお、非特許文献3~5でそれぞれ報告された神経芽腫のMRDマーカーでは、それまでとは異なるマーカーが組み合わせられておりどの程度の偽陰性が生じるのか不明であるが、通常の接着培養した神経芽腫細胞株における発現に基づいて選択されたマーカーであることから、特異性の点で改善の余地があると考えられる。

【0008】

非特許文献6~7で報告された神経芽腫のMRDマーカーは、スフェアー神経芽腫細胞中で発現量の多いマーカーから選択されており、特異性が高い点で好ましい。また、神経芽腫特有の多様性に対応するためには、技術常識上、組み合わせるマーカーの数を増やすことでスクリーニング感度を上げる必要がある。スフェアー神経芽腫細胞中で発現量の多い11個もの多数のマーカーが組み合わせられていることは、偽陰性を低減する点でも好ましい。しかしながら、11個もの数のマーカーを分析対象とすることは検査効率が悪く、臨床への適用において非常に高い障壁となる。

【0009】

このように、神経芽腫のMRD検出においては、その特有の著しい多様性ゆえに、偽陰性の抑制と臨床適用性とを両立することが特に困難であった。そこで本発明の目的は、偽陰性を抑制しながらも臨床応用に適した少数の神経芽腫のMRDマーカーの組み合わせを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者は鋭意検討の結果、神経芽腫のMRDの検出能力が特に高い特定の7種の遺伝子マーカーを見出した。本発明は、この知見に基づいて、さらに検討を重ねることにより完成したものである。

10

20

30

40

50

本発明は、神経芽腫の微小残存病変を評価するための試薬と、それを用いた生体試料の分析方法と、を含む。

【0011】

(1)

本発明の試薬は、CRMP1、DBH、DDC、GAP43、ISL1、PHOX2BおよびTHそれぞれの遺伝子マーカを核酸増幅法により増幅しうるプライマーペアを含み、神経芽腫の微小残存病変を評価するために用いられる。

【0012】

上述のCRMP1、DBH、DDC、GAP43、ISL1、PHOX2BおよびTHとしてそれぞれ記載される遺伝子マーカは、それぞれ、後述の配列番号1から配列番号7で表されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと、当該ポリヌクレオチドと少なくともとも70%の相同性を有するヌクレオチド配列からなり且つ当該ポリヌクレオチドと機能的に同等なものを含む。

10

【0013】

本発明における遺伝子マーカはわずか7個の組み合わせでありながら、それぞれの遺伝子マーカが神経芽腫の微小残存病変における検出能力に特に優れるため、偽陰性を抑制するとともに臨床応用も容易となる。さらに、それぞれの遺伝子に対応するプライマーペア全てのアニリング温度も揃い易いため、7種の遺伝子マーカのいずれであっても同様に効率良く増幅させることができる。この点も、本発明における遺伝子マーカセットの臨床応用を容易にする。

20

【0014】

(2)

上記(1)の試薬は、レファレンス遺伝子としての、HPRT1、HMBS、GUSB、TBPおよびB2Mの少なくともいずれかを核酸増幅法により増幅しうるプライマーペアをさらに含んでよい。

【0015】

上述の(2)ならびに後述の(3)および(4)において、HPRT1、HMBS、GUSB、TBPおよびB2Mとしてそれぞれ記載されるレファレンス遺伝子は、後述の配列番号8から配列番号12で表されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドと、当該ポリヌクレオチドと少なくともとも70%の相同性を有するヌクレオチド配列からなり且つ当該ポリヌクレオチドと機能的に同等のものを含む。

30

【0016】

このようなレファレンス遺伝子用のプライマーペアの併用により、神経芽腫の微小残存病変の発生をより正確に評価することができる。

【0017】

(3)

上記(1)の試薬は、レファレンス遺伝子としての、HPRT1、HMBS、GUSBおよびTBPの少なくともいずれかを核酸増幅法により増幅しうるプライマーペアをさらに含んでよい。

【0018】

このような特定のレファレンス遺伝子は低発現量の遺伝子であるため、遺伝子発現量が少ない検体であってもより感度良く神経芽腫の微小残存病変を検出することができる。したがって、このような特定のレファレンス遺伝子用のプライマーペアの併用により、遺伝子マーカの発現量が少なくても神経芽腫の微小残存病変の発生をより良好に評価することができる。

40

【0019】

(4)

上記(1)の試薬は、レファレンス遺伝子としてのHPRT1を核酸増幅法により増幅しうるプライマーペアをさらに含んでよい。

【0020】

50

レファレンス遺伝子H P R T 1は低発現量の遺伝子であるため、遺伝子発現量が少ない検体であってもより感度良く神経芽腫の微小残存病変を検出することができる。それだけでなく、レファレンス遺伝子H P R T 1は特に骨髄検体および末梢血検体の間における発現量の変動(ばらつき)が小さい。このため、骨髄検体であっても末梢血検体であっても、且つ、遺伝子発現量が少ない検体であっても、正しく神経芽腫の微小残存病変を検出することができる。

【0021】

(5)

上記(1)から(4)の試薬は、遺伝子マーカーとストリンジントな条件下でハイブリダイズしうるプローブをさらに含んでよい。

10

【0022】

これによって、プローブをハイブリダイズさせることで遺伝子マーカーを検出することができる。

【0023】

(6)

上記(5)の試薬は、レファレンス遺伝子を核酸増幅法により増幅しうるプライマーペアをさらに含む場合、当該レファレンス遺伝子とストリンジントな条件下でハイブリダイズしうるプローブをさらに含んでよい。

【0024】

これによって、プローブをハイブリダイズさせることで遺伝子マーカーとともにレファレンス遺伝子を検出することができる。

20

【0025】

(7)

本発明の生体試料の分析方法は、CRMP1、DBH、DDC、GAP43、ISL1、PHOX2BおよびTHそれぞれの遺伝子マーカーの生体試料中における発現量を、上記(1)から(6)のいずれかの試薬を用いて核酸増幅法により測定する測定工程を含む。遺伝子マーカーの発現量は、神経芽腫の微小残存病変の発生レベルと相関する。

【0026】

本発明における遺伝子マーカーはわずか7個の組み合わせでありながら、それぞれの遺伝子マーカーが神経芽腫の微小残存病変における検出能力に特に優れるため、偽陰性を抑制するとともに臨床応用も容易となる。さらに、それぞれの遺伝子に対応するプライマーペア全てのアニーリング温度が揃い易いため、7種の遺伝子マーカーのいずれであっても同様に効率良く増幅させることができる。この点も、本発明における遺伝子マーカーセットの臨床応用を容易にする。

30

【0027】

(8)

上記(7)の生体試料の分析方法は、遺伝子マーカーの1種以上の発現量が閾値以上か否かを評価する評価工程を含んでよい。

【0028】

本発明では7種の遺伝子マーカーのいずれであっても同様に効率良く増幅されるため、このように7種の遺伝子マーカーのうち1種以上の発現量が閾値以上であれば、神経芽腫の微小残存病変を陽性と判断することができる。

40

【0029】

(9)

上位(8)の生体試料の分析方法は、評価工程において、遺伝子マーカーの1種以上の発現量が閾値以上である場合に、生体試料の神経芽腫の微小残存病変を陽性と判定してよい。

【0030】

これによって、生体試料の由来元の患者における神経芽腫の微小残存病変を正しく診断することができる。

【0031】

50

(1 0)

上記(7)から(9)のいずれかの生体試料の分析方法は、測定工程における核酸増幅法がデジタルPCRであってよい。

【 0 0 3 2 】

この場合、遺伝子発現量がより少ない検体であっても感度よく神経芽腫の微小残存病変を検出することができる。また、異なる分析主体、分析時期、分析機器、プロトコル(反応時間、反応温度等)等であっても測定結果のばらつきを少なくすることができ、正確に神経芽腫の微小残存病変を検出することができる。

【発明の効果】

【 0 0 3 3 】

本発明によって、偽陰性を抑制しながらも臨床応用に適した好感度の神経芽腫のMRDマーカーの組み合わせが提供されるため、より多くの患者において、神経芽腫の微小残存病変を正確に評価することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 4 】

【図1】実施例6において、本発明における7マーカー(CRMP1、DBH、DDC、GAP43、ISL1、PHOX2BおよびTH)およびその他の4マーカー(DCX、CHRNA3、KIF1A、及びGABRB3)を用いてMRDの評価を行った252検体中の陽性検体数を示す。

【図2】図1の252検体において、当該7マーカー及びその他の4マーカーにおいて単一マーカー陽性となった検体数を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 5 】

[1 . 神経芽腫の微小残存病変を評価するための試薬]

本発明の試薬は神経芽腫の微小残存病変を評価するために用いられるものであり、下記の7種の遺伝子マーカーを核酸増幅法により増幅しうるプライマーペアとして用いられるポリヌクレオチド分子を含む。また、プライマーペアとして用いられるポリヌクレオチド分子に加えて、遺伝子マーカーとストリンジントな条件下でハイブリダイズしうるプローブとして用いられるポリヌクレオチド分子をさらに含んでもよい。

なお、本明細書において、ポリヌクレオチド分子は、DNA、RNA、およびPNA (peptide nucleic acid) を含む意味で用いられる。本発明の好ましい態様によれば、ポリヌクレオチド分子はDNAまたはRNAである。

【 0 0 3 6 】

[1 - 1 . 遺伝子マーカー]

本発明における遺伝子マーカーは、CRMP1として記載される遺伝子、DBHとして記載される遺伝子、DDCとして記載される遺伝子、GAP43として記載される遺伝子、ISL1として記載される遺伝子、PHOX2Bとして記載される遺伝子およびTHとして記載される遺伝子(以下、それぞれ単に、CRMP1、DBH、DDC、GAP43、ISL1、PHOX2BおよびTHと記載する。)の7種を含む。これら遺伝子マーカーそれぞれは、神経芽腫の微小残存病変が存在する場合に発現量が増加する。

【 0 0 3 7 】

これら7種の遺伝子マーカーの組み合わせは、核酸増幅による神経芽腫の微小残存病変の検出感度が高く、神経芽腫の微小残存病変の偽陰性が少ない。このため、神経芽腫の微小残存病変の指標として有用である。したがって、これら7種の遺伝子マーカーの発現量を核酸増幅法で測定することにより、神経芽腫の微小残存病変を感度よく検出することができる。

【 0 0 3 8 】

これら7種の遺伝子マーカーは、それぞれが単一マーカーでも神経芽腫の微小残存病変を検出する性能を有し、わずか7個の組み合わせでありながら、神経芽腫特有の著しい多様性(ヘテロジェナイティー)に対応するスクリーニング感度を有する。この7個という遺

10

20

30

40

50

伝子マーカ数は、レファレンス遺伝子の数を含めても、多くの核酸増幅装置において同時に遺伝子増幅できる数であるため、臨床への適用が容易である。

【 0 0 3 9 】

C R M P 1、D B H、D D C、G A P 4 3、I S L 1、P H O X 2 BおよびT Hの7種の遺伝子マーカの組み合わせは、検出対象検体が末梢血検体であっても骨髄検体であっても有用である。この中でも、P H O X 2 Bは特に骨髄検体で検出感度が高く、C R M P 1は特に末梢血検体で検出感度が高い傾向にある。

【 0 0 4 0 】

本発明における遺伝子マーカそれぞれの配列情報の詳細は、公知のデータベースにおいて取得することができる。たとえば;

- ・ C R M P 1 (collapsin response mediator protein 1)として、アメリカ合衆国国立バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information : NCBI) のRefSeqデータベースにおけるアクセッション番号NM_001014809に相当するもの、
- ・ D B H (dopamine -hydroxylase)として、同アクセッション番号NM_000787に相当するもの、
- ・ D D C (dopa decarboxylase)として、同アクセッション番号NM_000790に相当するもの、
- ・ G A P 4 3 (growth-associated protein 43)として、同アクセッション番号NM_001130064に相当するもの、
- ・ I S L 1 (ISL LIM homeobox 1)として、同アクセッション番号NM_002202に相当するもの、
- ・ P H O X 2 B (paired-like homeobox 2b)として、同アクセッション番号NM_003924に相当するもの、
- ・ T H (tyrosine hydroxylase)として、同アクセッション番号NM_199292に相当するものが挙げられる。

【 0 0 4 1 】

本発明における遺伝子マーカをコードする具体的なヌクレオチド配列としては、以下の配列が挙げられる。すなわち ;

- ・ C R M P 1 は配列番号 1 で表されるものであってよく、
- ・ D B H は配列番号 2 で表されるものであってよく、
- ・ D D C は配列番号 3 で表されるものであってよく、
- ・ G A P 4 3 は配列番号 4 で表されるものであってよく、
- ・ I S L 1 は配列番号 5 で表されるものであってよく、
- ・ P H O X 2 B は配列番号 6 で表されるものであってよく、
- ・ T H は配列番号 7 で表されるものであってよい。

【 0 0 4 2 】

本発明における遺伝子マーカをコードするヌクレオチド配列は、神経芽腫の微小残存病変の指標となる限り、上記の配列と相同性を有するものであってもよい。好ましくは、上述の配列番号 1 から配列番号 7 でそれぞれ表されるヌクレオチド配列と少なくとも 7 0 % の相同性を有し、かつ機能的に同等なポリヌクレオチドからなるとよい。このようなポリヌクレオチドの配列相同性は、より好ましくは 7 5 % 以上であり、さらに好ましくは 8 0 % 以上であり、さらに好ましくは 8 5 % 以上、さらに好ましくは 9 0 % 以上、さらに好ましくは 9 5 % 以上である。

【 0 0 4 3 】

なお、機能的に同等とは、上述の配列番号 1 から配列番号 7 でそれぞれ表されるヌクレオチド配列を有する特定のポリヌクレオチドと同等に、神経芽腫の微小残存病変が存在する場合に発現量が増加するものである。機能同等性は、たとえば、後述するプローブまたはプライマーを用い、ポリヌクレオチドの発現量を測定し、当該発現量と神経芽腫の微小残存病変との相関を公知の統計手法により決定し、上述の特定のポリヌクレオチドのそれと

10

20

30

40

50

比較することにより容易に決定することができる。

【0044】

また、上述のヌクレオチド配列の相同性は、公知の手法によって決定されるものである（以下においても同様）。このような手法の具体例としては、例えば、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873-5877 (1993)〕等が挙げられる。また、このアルゴリズムに基づいて、BLASTNまたはBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されており〔Altschul et al. J. Mol. Biol., 215, 403-410 (1990)〕、本発明においても利用することができる。さらに、他の好ましい手法としては、遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX（ゼネティックス社製）を用いる手法が挙げられる。GENETYXを用いる場合には、BLASTによる解析のほかにLipman-Pearson法によるホモロジー解析を行うことができ、本発明における相同性決定において有利に利用することができる。

10

【0045】

上述の7種の遺伝子マーカーは、神経芽腫の微小残存病変の検出感度が高く、神経芽腫の微小残存病変のレベルが増加する場合に発現量が増加する。つまり、当該発現量と神経芽腫の微小残存病変の発生レベルとが相関する。したがって、後述するポリヌクレオチド分子を用い、これら7種の遺伝子マーカー全ての発現量を測定することで、得られた発現量から神経芽腫の微小残存病変を評価することができる。

【0046】

[1-2. レファレンス遺伝子]

レファレンス遺伝子としては、たとえば、HPRT1として記載される遺伝子、HMB Sとして記載される遺伝子、GUS Bとして記載される遺伝子、TBPとして記載される遺伝子、およびB2Mとして記載される遺伝子（以下、それぞれ単に、HPRT1、HMB S、GUS B、TBP、およびB2Mと記載する。）が挙げられる。これらの中から少なくとも1のレファレンス遺伝子を選択することができる。

20

【0047】

これらの中でも、レファレンス遺伝子は、その発現量が適度に低度であることで遺伝子マーカー発現量が少ない検体であってもより感度よくMRDを検出することができる点で、HPRT1遺伝子、HMB S遺伝子、GUS B遺伝子、およびTBP遺伝子からなる群から選択されることが好ましい。さらにこの中でも、レファレンス遺伝子は、骨髄検体および末梢血検体における発現量の変動（ばらつき）が小さいことで骨髄に由来する生体試料に対しても末梢血に由来する生体試料に対しても有用性が高い点で、HPRT1遺伝子であることが最も好ましい。

30

【0048】

レファレンス遺伝子の配列情報の詳細は、公知のデータベースにおいて取得することができる。たとえば；

- ・HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1)として、アメリカ合衆国国立バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information: NCBI) のRefSeqデータベースにおけるアクセッション番号NM_000194に相当するもの、
- ・HMB S (Hydroxymethylbilane synthase)として、同データベースにおけるアクセッション番号NM_000190に相当するもの、
- ・GUS B (Glucuronidase Beta)として、同データベースにおけるアクセッション番号NM_000181に相当するもの、
- ・TBP (TATA-binding protein)として、同データベースにおけるアクセッション番号NM_003194に相当するもの、
- ・B2M (Beta-2-Microglobulin)として、同データベースにおけるアクセッション番号NM_004048に相当するもの、が挙げられる。

40

【0049】

50

レファレンス遺伝子をコードする具体的なヌクレオチド配列としては、以下の配列が挙げられる。すなわち；

- ・ H P R T 1 は配列番号 8 で表されるものであってよく、
- ・ H M B S は配列番号 9 で表されるものであってよく、
- ・ G U S B は配列番号 10 で表されるものであってよく、
- ・ T B P は配列番号 11 で表されるものであってよく、
- ・ B 2 M は配列番号 12 で表されるものであってよい。

【 0 0 5 0 】

レファレンス遺伝子をコードするヌクレオチド配列は、内在性コントロールとなる限り、上記の配列と相同性を有するものであってもよい。好ましくは、上述のヌクレオチド配列と少なくとも 70% の相同性を有し、かつ上述の遺伝子それぞれと機能的に同等なポリヌクレオチドからなっており、このようなポリヌクレオチドの配列相同性は、より好ましくは 75% 以上であり、さらに好ましくは 80% 以上であり、さらに好ましくは 85% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 95% 以上である。

【 0 0 5 1 】

なお、機能的に同等とは、H P R T 1、H M B S、G U S B、T B P および B 2 M にあっては、上述の配列番号 8 から配列番号 12 で表されるヌクレオチド配列を有する特定のポリヌクレオチドと同等に検体間で測定値のばらつきが少ないものであり；H P R T 1、H M B S、G U S B および T B P にあっては、さらに発現量が適度に低度であり、H P R T 1 にあっては、さらに骨髓検体および末梢血検体の間で測定値のばらつきが少ないものである。機能同等性は、たとえば、後述するプローブまたはプライマーを用い、ポリヌクレオチドの発現量を測定し、当該発現量、および、当該発現量と神経芽腫の微小残存病変との相関を公知の統計手法により決定し、上述の特定のポリヌクレオチドのそれらと比較することにより容易に決定することができる。

【 0 0 5 2 】

[1 - 3 . プライマーペア]

本発明におけるプライマーペアは、上述の遺伝子マーカートをコードするヌクレオチド配列を増幅しうる一対のポリヌクレオチド分子である。本発明の試薬には 7 種の遺伝子マーカート C R M P 1、D B H、D D C、G A P 4 3、I S L 1、P H O X 2 B および T H それぞれに対する合計 7 対のプライマーペアが含まれる。

【 0 0 5 3 】

このようなプライマーペアは、上述の遺伝子マーカートをコードするヌクレオチド配列を増幅できるようにそれぞれ設計されたセンスプライマー及びアンチセンスプライマーを含む。アンチセンスプライマーは、増幅対象のポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド分子であり、センスプライマーは、増幅対象のポリヌクレオチドの相補鎖にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド分子である。具体的なプライマーペアの設計は、増幅対象となる領域のヌクレオチド配列に基づいて当業者が適宜行うことができる。例えば、プライマーペアの一方のプライマーを、増幅対象領域のヌクレオチド配列中における 5' 末端部分の配列を有するものとし、他方のプライマーを、増幅対象領域の相補鎖のヌクレオチド配列中における 5' 末端部分の配列を有するものとするすることができる。

【 0 0 5 4 】

本発明では、上述の 7 種の遺伝子マーカートを選択することにより、7 種の遺伝子マーカートそれぞれに対応するプライマーペア全てのアニーリング温度を良好に揃えることができる。このため、7 種の遺伝子マーカートを同一熱源で同時測定する場合に増幅対象領域の増幅効率を良好に揃えることができる。7 種の遺伝子マーカートのいずれであっても効率良く増幅されることで、遺伝子発現量が少ない検体であっても微小残存病変測定感度を向上させることができる。この点も、本発明における遺伝子マーカートセットの臨床応用を容易にする。

【 0 0 5 5 】

プライマーの長さおよび具体的配列は特に限定されず、当業者が適宜決定することができる。たとえば、7種の遺伝子マーカーのうち複数、好ましくは全部の同時測定のために、アニーリング温度条件が揃うT_m値となるよう設計してよい。

【0056】

プライマーの長さは、たとえば18ヌクレオチド以上30ヌクレオチド以下、好ましくは18ヌクレオチド以上26ヌクレオチド以下であってよい。

【0057】

プライマーの具体的配列としては、たとえば以下が挙げられる。

・CRMP1に対するプライマー

5'-ccaatccctttatgctgacg-3' (sense) (配列番号13)

5'-ggaacgattaagtctctcctatttg-3' (antisense) (配列番号14)

・DBHに対するプライマー

5'-tggggacactgcctattttg-3' (sense) (配列番号15)

5'-ttctggggctcctctgcac-3' (antisense) (配列番号16)

・DDCに対するプライマー

5'-ctggagaagggggaggagt-3' (sense) (配列番号17)

5'-gccgatggatcacttttgg-3' (antisense) (配列番号18)

・GAP43に対するプライマー

5'-gaggatgctgctgccaaag-3' (sense) (配列番号19)

5'-ggcactttccttaggttgg-3' (antisense) (配列番号20)

・ISL1に対するプライマー

5'-aaggacaagaagcgaagcat-3' (sense) (配列番号21)

5'-ttcctgtcatcccctggata-3' (antisense) (配列番号22)

・PHOX2Bに対するプライマー

5'-ctaccccgacatctacactcg-3' (sense) (配列番号23)

5'-ctcctgcttgcgaaacttg-3' (antisense) (配列番号24)

・THに対するプライマー

5'-tcagtgcgccaaggaca-3' (sense) (配列番号25)

5'-gtacgggtcgaacttcacg-3' (antisense) (配列番号26)

【0058】

本発明では、上述の7種の遺伝子マーカーを増幅しうるプライマーペアに加え、上述のレファレンス遺伝子を増幅しうるプライマーペアを含んでよい。

【0059】

レファレンス遺伝子を増幅しうるプライマーの長さおよび具体的配列も特に限定されず、当業者が適宜決定することができる。たとえば、7種の遺伝子マーカーのうち複数、好ましくは全部の同時測定のために、上記の7種の遺伝子マーカーとアニーリング温度条件が揃うT_m値となるよう設計してよい。

【0060】

プライマーの長さは、たとえば18ヌクレオチド以上30ヌクレオチド以下、好ましくは18ヌクレオチド以上26ヌクレオチド以下であってよい。

【0061】

レファレンス遺伝子用のプライマーの具体的配列としてはたとえば以下が挙げられる。

・HPR1に対するプライマー

5'-tgaccttgattttatgcatacc-3' (sense) (配列番号27)

5'-cgagcaagacgttcagtcct-3' (antisense) (配列番号28)

・HMB5に対するプライマー

5'-ctgaaagggccttctgag-3' (sense) (配列番号29)

5'-cagactcctccagtcaggtaca-3' (antisense) (配列番号30)

・GUSBに対するプライマー

5'-cgccctgcctatctgtattc-3' (sense) (配列番号31)

10

20

30

40

50

5'-tccccacagggagtgtag-3' (antisense) (配列番号 3 2)

・ T B P に対するプライマー

5'-gaacatcatggatcagaacaaca-3' (sense) (配列番号 3 3)

5'-atagggattccgggagtcac-3' (antisense) (配列番号 3 4)

・ B 2 M に対するプライマー

5'-ttctggcctggaggctatc-3' (sense) (配列番号 3 5)

5'-tcaggaaatttgactttccattc-3' (antisense) (配列番号 3 6)

【 0 0 6 2 】

プライマーは、増幅対象の検出に適した付加的配列（具体的にはゲノムDNAと相補的でない配列）、例えばリンカー配列をさらに含んでもよい。

また、プライマーは、適当な標識剤、例えば、放射性同位元素（たとえば、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C など）、酵素（たとえば、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素など）、蛍光物質（たとえば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート、Cy3、Cy5など）、発光物質（たとえば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなど）などで標識されていてもよい。

さらに、プライマーは、各々別個に、または各々の機能を損なわなければ混合した状態で、水または適当な緩衝液（たとえば、TEバッファー、Tris-HClバッファーなど）中に適当な濃度（たとえば、 $2\times$ 以上 $20\times$ 以下の濃度で $1\mu\text{M}$ 以上 $50\mu\text{M}$ 以下など）となるように溶解し、約 -20°C で保存することができる。

【 0 0 6 3 】

[1 - 4 . プローブ]

本発明の試薬に含まれてよいプローブは、本発明における遺伝子マーカーを指標として神経芽腫の微小残存病変を検出するための、上述の遺伝子マーカーをコードする配列またはその相補鎖配列を検出するポリヌクレオチド分子である。具体的には、プローブとして、上述の遺伝子マーカーを構成するポリヌクレオチドまたはその相補鎖なポリヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド分子を用いることができる。

【 0 0 6 4 】

本発明の試薬は、レファレンス遺伝子をコードする配列またはその相補鎖配列を検出するポリヌクレオチド分子をさらに含んでもよい。具体的には、プローブとして、上述のレファレンス遺伝子を構成するポリヌクレオチドまたはその相補鎖なポリヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド分子を含んでもよい。

【 0 0 6 5 】

相補的とは、2つのヌクレオチドがハイブリダイゼーション条件下において、対合しうるものであることを意味し、例えば、アデニン（A）とチミン（T）またはウラシル（U）との関係、シトシン（C）とグアニン（G）との関係をいう。

【 0 0 6 6 】

ハイブリダイズするとは、ポリヌクレオチド分子が通常のハイブリダイゼーション条件下（つまり通常のPCRにおけるアニーリング条件下）、好ましくはストリンジентなハイブリダイゼーション条件下で遺伝子マーカーまたはレファレンス遺伝子にハイブリダイズし、遺伝子マーカーまたはレファレンス遺伝子以外のポリヌクレオチド分子にはハイブリダイズしないことを意味する。

【 0 0 6 7 】

ストリンジентな条件とは、例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 6.3.1-6.3.6, 1999に記載される条件、例えば、 $6\times\text{SSC}$ (sodium chloride/sodium citrate) / 45 でのハイブリダイゼーション、次いで $0.2\times\text{SSC}$ / $0.1\% \text{SDS}$ / 50 ~ 65 での一回以上の洗浄等が挙げられるが、当業者であれば、これと同等のストリンジエンシーを与えるハイブリダイゼーションの条件を適宜選択することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 8 】

また、本発明における遺伝子マーカーまたはレファレンス遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチド分子は、遺伝子特異的なハイブリダイズが可能であれば、その遺伝子マーカーまたはそのレファレンス遺伝子に対して完全に相補的である必要はないが、好ましくは、その遺伝子マーカーまたはそのレファレンス遺伝子に相補的なポリヌクレオチド分子の全部または一部の配列を含んで構成されるものとする。

【 0 0 6 9 】

本発明におけるプローブは、市販のオリゴヌクレオチド合成機等を用いて合成オリゴヌクレオチドとして作製してもよいし、あるいは、制限酵素処理等によって取得される二本鎖DNA断片として作製してもよい。

【 0 0 7 0 】

本発明におけるプローブの鎖長は、たとえば18ヌクレオチド以上30ヌクレオチド以下、好ましくは18ヌクレオチド以上26ヌクレオチド以下であってよい。

【 0 0 7 1 】

本発明におけるプローブは、適当な標識剤、例えば、放射性同位元素（たとえば、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C など）、酵素（たとえば、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素など）、蛍光物質（たとえば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート、Cy3、Cy5など）、発光物質（たとえば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなど）などで標識されていてもよい。

あるいは、本発明におけるプローブは、蛍光物質（たとえば、FAM、VICなど）の近傍に該蛍光物質の発する蛍光エネルギーを吸収するクエンチャー（たとえば、MGB、TAMRAなど）がさらに結合されていてもよい。より具体的には、蛍光物質が5'末端に付され、クエンチャーが3'末端に付され、さらに3'末端がリン酸化されて構成されるプローブ（TaqManプローブ）として構成されてもよい。この場合、検出反応の際に蛍光物質とクエンチャーとが分離して蛍光が検出される。

【 0 0 7 2 】

本発明の試薬は、上述のプライマーとして挙げた成分、またはプライマーおよびプローブとして挙げた成分に加え、核酸増幅に必要な他の成分をさらにも含んでもよい。他の成分としては、核酸合成酵素、核酸合成基質、緩衝液、および標識（たとえばプライマーおよび/またはプローブが非標識の態様で含まれている場合）などから選ばれる1または複数の成分が挙げられる。本発明の試薬は、各成分がそれぞれ個装された状態のキットアイテムとして提供されてもよいし、任意の複数成分が混合された状態のキットアイテムとして提供されてもよい。

【 0 0 7 3 】

[2 . 神経芽腫の微小残存病変を評価するための生体試料の分析方法]

本発明における7種の遺伝子マーカーは、上述のとおり神経芽腫の微小残存病変の指標として有用である。したがって、本発明の生体試料の分析方法は、これら7種の遺伝子マーカーの生体試料中における発現量を核酸増幅法により測定する測定工程を含む。遺伝子マーカーの発現量は、神経芽腫の微小残存病変の発生レベルと相関（正の相関）する。

【 0 0 7 4 】

[2 - 1 . 生体試料]

生体試料は、神経芽腫患者に由来する試料であってよい。神経芽腫患者は、神経芽腫の任意の病期にある患者であってよい。具体的な病期としては、初発診断時、寛解導入療法終了後、手術後、幹細胞移植を含む持続療法終了後、放射線治療後、維持療法後の経過観察時、および再発診断時が挙げられる。本発明は特に、被験者が高リスク群患者である場合に有用である。

【 0 0 7 5 】

生体試料は、被験者のRNAを含む試料であれば特に限定されず、使用する検出方法の種類に応じて適宜選択することができる。たとえば、生体試料は、被験者から採取された生

10

20

30

40

50

体組織、具体的には、骨髄液または末梢血などから常法に従って調製した total RNA または mRNA などの核酸試料であってよい。

【0076】

[2-2.測定工程(核酸増幅)]

測定工程においては、核酸試料を鋳型として、上述のプライマーペアを用いて核酸増幅を行い、得られた増幅産物の発現量を測定する。

核酸増幅法としては、当技術分野において公知のいずれの方法を用いてもよい。例えば、核酸増幅法としては、通常のPCR法、リアルタイムPCR法、デジタルPCR法等を用いることができる。好ましくは、核酸増幅法としてデジタルPCR法を用いることができる。神経芽腫の微小残存病変の正確な評価のより好ましい達成は、極めて微量な遺伝子マーカーの発現を検出することによってなされるが、デジタルPCRを用いることは、遺伝子マーカーの発現量が少ない検体であっても感度よく検出することができる点で神経芽腫の微小残存病変の検出に特に適している。それだけでなく、デジタルPCRは、分析主体、分析時期、分析機器、プロトコル(反応時間、反応温度等)等が異なっても測定結果のばらつきが少なく、正確に神経芽腫の微小残存病変を検出することもできる点でも好ましい。したがって、デジタルPCRを用いることは、神経芽腫の微小残存病変の評価において汎用性の高さおよび信頼性の高さ等の点でも好ましい。

10

【0077】

デジタルPCRでは、まず、大きな容量の開始試料が複数のより小さな部分容量の試料(分割試料)に分割される。当該分割試料は、平均で単一コピーの標的を含むように調製される。このように分割試料中に存在するポリヌクレオチド分子が0分子(陰性)または1分子(陽性)となることにより、デジタル性が達成される。分割試料における陽性を計数することにより、開始試料中の標的の開始コピー数を推定することができる。つまり、増幅対象であった遺伝子マーカーの定量を行うことができる。したがって、生体試料中の標的が低い濃度であっても、標的の定量が可能となる。

20

分割試料をデジタル性が達成される適正濃度とするためには開始試料の複数連続希釈法を用いてよく、その容量は任意のPCR装置によって決定されてよい。

【0078】

デジタルPCRとしては、液滴ベースのデジタルドロップレットPCR(ddPCR)を用いることが好ましい。ddPCR法は、具体的には、デジタル希釈工程または液滴生成工程、PCR増幅工程、検出工程、および分析工程を含む。液滴生成工程では、それぞれ核酸増幅に必要な試薬を含む複数の液滴を生成する。PCR増幅工程ではそれらの液滴(または当該液滴が入っているより大きな反応体積試料)を標的の増幅に適切な熱サイクリング条件に付す。検出工程では、PCR産物を含む液滴(または当該液滴が入っているより大きな反応体積試料)と含まない液滴(または当該液滴が入っているより大きな反応体積試料)との特定を行う。分析工程では、標的の濃度、絶対量(遺伝子マーカーの絶対量)または(レファレンス遺伝子に対する遺伝子マーカーの)相対量を導出する。

30

【0079】

さらに本発明においては、上述のプローブを生体試料中の核酸にハイブリダイズさせる工程を含んでもよい。たとえば、増幅産物の検出を標識に基づいて行う場合に、上述の標識されたプローブを用いてよい。一例としてTaqManプローブを用いる場合、遺伝子マーカーにTaqManプローブがハイブリダイズし、プライマーからの伸長反応がそのハイブリダイゼーション領域に到達した際にTaqDNAポリメラーゼの作用によって蛍光標識物質が遊離する。遊離した蛍光標識物質はクエンチャーの消光作用から開放されることで蛍光を発する。

40

【0080】

[2-3.評価工程]

上述のように、本発明では7種の遺伝子マーカーそれぞれに対応するプライマーペア全てのアニーリング温度を良好に揃えることが容易であるため、7種の遺伝子マーカーのいずれであっても効率良く増幅することができる。このため、本発明では、測定された7種の

50

遺伝子マーカーのうち1種以上の遺伝子マーカーの発現量が、神経芽腫の微小残存病変を有しない対照における当該遺伝子マーカーの発現量を参照して予め設定された閾値以上か否かを評価する評価工程を行うことができる。1種以上の遺伝子マーカーの発現量が閾値以上の場合、生体試料について神経芽腫の微小残存病変が陽性と判断することができる。したがって、1種以上の遺伝子マーカーの発現量が閾値以上の場合、生体試料の由来元となる患者について神経芽腫の微小残存病変が陽性と診断することができる。

【0081】

遺伝子マーカーの発現量の閾値は、上述の手法により予め測定された遺伝子マーカーの定量値を参照して公知の統計手法により設定することができる。閾値の具体的な設定手法としては、たとえば、{対照細胞における遺伝子マーカーの発現量の平均値 \pm n \times 標準偏差}として導出する方法またはROC(Receiver Operating Characteristic)分析法などが挙げられる。具体的には、Journal Of Clinical Oncology 2008; 26: 5443-5449において設定された閾値を参考にすることができる。

10

【0082】

本発明によると、偽陰性を抑制しながらも臨床応用に適した高感度の神経芽腫のMRDマーカー7種の組み合わせを利用して神経芽腫の微小残存病変を検出することができる。7種のマーカーはそれぞれの遺伝子に対応するプライマーペア全てのアニーリング温度が揃うようにも選択されているため、遺伝子発現量が少ない検体であっても感度良く神経芽腫の微小残存病変を検出することができる。これまで安定的に検出することができなかった腫瘍量の検体であっても微小残存病変を発見することができるため、神経芽腫の微小残存病変のより詳細な検討が可能となる。たとえば、経時的に微小残存病変をモニタリングすると、微小残存病変の量的および質的検討が可能になる。また、7つの遺伝子マーカーのうちどの遺伝子マーカーが増減したかに着目すると、検体毎の腫瘍細胞の特徴(形質)を検討することができる。

20

これによって、測定した微小残存病変に基づいて高リスク群神経芽腫患者の層別化、および治療プロトコルの最適化を行うことができる。さらに、これまで発見出来なかった段階の再発であっても早期に発見し治療することができるため、特に高リスク群神経芽腫患者の予後改善を図ることができる。

【実施例】

【0083】

以下に実施例を示し本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に制限されるものではない。以下の実施例では、MRD遺伝子マーカーとして、CRMP1(配列番号1)、DBH(配列番号2)、DDC(配列番号3)、GAP43(配列番号4)、ISL1(配列番号5)、PHOX2B(配列番号6)およびTH(配列番号7)を用い、レファレンス遺伝子としてHPRT1(配列番号8)を用いた。

30

【0084】

[実施例1]

神経芽腫患者(診断時)から骨髄検体を採取し、以下のようにして遺伝子マーカーCRMP1、DBH、DDC、GAP43、ISL1、PHOX2BおよびTHの測定を行った。

1)抗凝固剤(EDTAまたはヘパリン)を含む検体2ml~5mlから、モノ・ポリ分離溶液(DSファーマバイオメディカル社製)を用いて有核細胞を遠心分離した。

40

2)得られた有核細胞から、TRIZOL PLUS RNA Purification kit(ライフテクノロジー社製)を用いてtotal RNAを抽出した。

3)抽出したTotal RNAの品質を、RNA 6000ナノキット(アジレントテクノロジー社製)を用いて評価した。

4)品質を評価したtotal RNA 1.0 μ gからQuantiTect Reverse Transcription kit(キアジェン社製)を用いてcDNAを合成し、total 80 μ lとなるようにTE bufferで希釈した。

【0085】

5)QX200 Droplet Digital PCR System(バイオラッド社製)を用いて、7種の遺伝

50

子マーカ-を同時にddPCR (デジタルPCR) 反応に供し、それぞれの遺伝子マーカ-の発現量の解析を行った。

具体的には、各遺伝子マーカ- (CRMP1、DBH、DDC、GAP43、ISL1、PHOX2BおよびTH) およびレファレンス遺伝子 (HPRT1) のプライマーとしては、それぞれ、配列番号13から配列番号26および配列番号27から28に示す配列を有するものを使用し、プローブとしては、Universal Probe Library (ロッシュ社製) #65 (CRMP1マーカ-用)、#3 (DBHマーカ-用)、#49 (DDCマーカ-用)、#26 (GAP43マーカ-用)、#66 (ISL1マーカ-用)、#17 (PHOX2Bマーカ-用)、#42 (THマーカ-用)、#73 (HPRT1マーカ-用)を使用した。

鋳型cDNA 1.0 μl (total RNA 12.5 ng相当)、2 x ddPCR Supermix for Probes (バイオラッド) 10 μl、Sense primer (それぞれfinal 500 nM)、Antisense primer (それぞれfinal 500 nM)、Universal Probe Library (ロッシュ社製) (それぞれfinal 250 nM)を含むtotal 20 μlの反応液を調製した。

Droplet Generator (バイオラッド社製)を用いて反応液のドロップレットを作製し、PCR反応を行い、Droplet Reader (バイオラッド社製)を用いて測定を行った。PCR反応は、95 10分の前反応の後、94 30秒および58 90秒を1サイクルとして40サイクル行い、最後に終了反応として98 10分の条件で、サーマルサイクラーGene Amp PCR System 9700 (アプライドバイオシステム社製)を用いて行った。

【0086】

6) 得られた測定結果から、サンプルの各MRD遺伝子マーカ-のコピー数(Copies per sample)を、MRD遺伝子マーカ-のコピー数(copies per well)とレファレンス遺伝子のコピー数(copies per well)とから以下の式により算出した。

(MRD遺伝子マーカ-のコピー数 / レファレンス遺伝子のコピー数) × 10,000

【0087】

また、健常者10名の検体 (PB:末梢血検体、BM:骨髄検体)におけるそれぞれの7種の遺伝子マーカ-を測定して得られた平均値+3SD (SD:標準偏差)をカットオフ値 (閾値)として下記のように設定し、当該カットオフ値未満である場合、陰性と判断することとした。

【0088】

【表1】

Gene Name	PB_Mean+3SD	BM_Mean+3SD
CRMP1	<54	<107
DBH	<83	<40
DDC	<13	<27
GAP43	<28	<115
ISL1	<12	<45
PHOX2B	<12	<19
TH	<4	<27

【0089】

神経芽腫患者の診断時骨髄検体の分析結果を以下に示す。

【0090】

10

20

30

40

50

【表 2】

	Copies per well	Copies per sample	
HPRT1	4820		
CRMP1	856	1775.9	+
DBH	3.6	7.5	-
DDC	66	136.9	+
GAP43	2360	4896.3	+
ISL1	772	1601.7	+
PHOX2B	1276	2647.3	+
TH	752	1560.2	+

10

【0091】

上記表に示されるように、神経芽腫患者の診断時の骨髄検体では、DBHを除く6遺伝子マーカーのCopies per sample値がカットオフ値以上であった。したがって、この検体のMRDは陽性と評価した。

20

【0092】

[実施例2]

検体として、神経芽腫患者の寛解時の骨髄検体を用いたことを除いて、実施例1と同様に各遺伝子マーカーを測定しMRDの評価を行った。その結果を下記表に示す。

【0093】

【表 3】

	Copies per well	Copies per sample	
HPRT1	6060		
CRMP1	14	23.1	-
DBH	0	0.0	-
DDC	0	0.0	-
GAP43	0	0.0	-
ISL1	2.6	4.3	-
PHOX2B	3	5.0	-
TH	3.2	5.3	-

30

40

【0094】

上記表に示されるように、神経芽腫患者の寛解期の骨髄検体では、7遺伝子マーカーのCopies per sample値全てがカットオフ値未満であった。したがって、この検体のMRDは陰性と評価した。

【0095】

[実施例3]

検体として、神経芽腫患者の診断時の末梢血検体を用いたことを除いて、実施例1と同様に各遺伝子マーカーを測定しMRDの評価を行った。その結果を下記表に示す。

50

【 0 0 9 6 】

【 表 4 】

	Copies per well	Copies per sample	
HPRT1	3120		
CRMP1	20	64.1	+
DBH	0	0.0	-
DDC	1.6	5.1	-
GAP43	104	333.3	+
ISL1	26	83.3	+
PHOX2B	26	83.3	+
TH	1.8	5.8	+

10

【 0 0 9 7 】

上記表に示されるように、神経芽腫患者の診断時の末梢血検体では、CRMP1、GAP43、ISL1、PHOX2BおよびTHマーカーのCopies per sample値がカットオフ値以上であった。したがって、この検体のMRDは陽性と評価した。

20

【 0 0 9 8 】

[実施例 4]

検体として、神経芽腫患者の寛解期の末梢血検体を用いたことを除いて、実施例1を同様に各遺伝子マーカーを測定しMRDの評価を行った。その結果を下記表に示す。

【 0 0 9 9 】

【 表 5 】

	Copies per well	Copies per sample	
HPRT1	4020		
CRMP1	0	0.0	-
DBH	3.2	8.0	-
DDC	2.4	6.0	-
GAP43	2.4	6.0	-
ISL1	0	0.0	-
PHOX2B	1.2	3.0	-
TH	0	0.0	-

30

40

【 0 1 0 0 】

上記表に示されるように、神経芽腫患者の寛解期の末梢血検体では、7遺伝子マーカーのCopies per sample値全てがカットオフ値未満であった。したがって、この検体のMRDは陰性と評価した。

【 0 1 0 1 】

[実施例 5]

高リスク神経芽腫患者の、寛解導入療法1コース終了後および寛解導入療法5コース終了後それぞれの骨髄検体（いずれも同患者由来）について、実施例1と同様に各遺伝子マ-

50

カーを測定しMRDの評価を行った。その結果、寛解導入療法1コース終了後では7マーカー全てのCopies per sample値がカットオフ値以上であったが、寛解導入療法5コース終了後では7マーカー全てのCopies per sample値がカットオフ値未満であった。したがって、この患者は、寛解導入療法5コース終了後にMRDが陰性となったと判断した。

【0102】

また別途、高リスク神経芽腫患者の、初診時の骨髄検体および末梢血検体、ならびに寛解導入療法5コース終了後の骨髄検体および末梢血検体（いずれも同患者由来）それぞれについて、実施例1と同様に各遺伝子マーカーを測定しMRDの評価を行った。その結果、初診時の骨髄検体では6マーカー（具体的には、CRMP1、DDC、GAP43、ISL1、PHOX2B、およびTH）末梢血検体では5マーカー（具体的には、CRMP1、GAP43、ISL1、PHOX2B、およびTH）のCopies per sample値がカットオフ値以上であったが、寛解導入療法5コース終了後の骨髄検体および末梢血検体ではいずれも7マーカー全てのCopies per sample値がカットオフ値未満であった。したがって、この患者は、寛解導入療法5コース終了後にMRDが陰性となったと判断した。

10

【0103】

[実施例6]

上記の本発明における7マーカー（CRMP1、DBH、DDC、GAP43、ISL1、PHOX2BおよびTH）に非特許文献6で報告されたその他の4マーカー（DCX、CHRNA3、KIF1A、およびGABRB3）を加えた11マーカーを用いて、骨髄検体229検体、末梢血検体23検体の合計252検体のMRDの評価を行った。

20

【0104】

この252検体において、レファレンス遺伝子として非特許文献6で報告されたB2Mを選択し、反応装置としてサーマルサイクラーGene Amp PCR System 9700（アプライドバイオシステム社製）を用いてqPCR反応（リアルタイムPCR）を行い、11マーカーの測定を行った。

【0105】

この252検体のqPCR反応に用いたプライマー配列は、以下の通りである。

- ・ B2Mに対するプライマー（配列番号35、36）
- ・ CRMP1に対するプライマー（配列番号13、14）
- ・ DBHに対するプライマー（配列番号15、16）
- ・ DDCに対するプライマー（配列番号17、18）
- ・ GAP48に対するプライマー（配列番号19、20）
- ・ ISL1に対するプライマー（配列番号21、22）
- ・ PHOX2Bに対するプライマー（配列番号23、24）
- ・ THに対するプライマー（配列番号25、26）
- ・ DCXに対するプライマー

30

5'-catccccaacacctcagaag-3' (sense)

5'-ggaggttccgtttgctga-3' (antisense)

- ・ CHRNA3に対するプライマー

5'-tgaaatggaaccctctgac-3' (sense)

5'-ggaaatccccaacagcatt-3' (antisense)

- ・ KIF1Aに対するプライマー

5'-cttggcgacatcactgacat-3' (sense)

5'-gctggacagggctgagag-3' (antisense)

- ・ GABRB3に対するプライマー

5'-gggtgtccttctggatcaatta-3' (sense)

5'-ttgtcagcacagttgtgatcc-3' (antisense)

40

【0106】

また、非特許文献6での報告と同様に、カットオフ値（閾値）を下記のように設定し、当該カットオフ値未満である場合、陰性と判断することとした。

50

【 0 1 0 7 】

【表 6】

Gene name	PB_% dilution	BM_% dilution
CHRNA3	<0.032	<0.413
CRMP1	<0.032	<0.207
DBH	<0.032	<0.032
DCX	<0.160	<5.598
DDC	<0.032	<0.051
GABRB3	<0.032	<1.059
GAP43	<0.032	<0.694
ISL1	<0.160	<0.160
KIF1A	<0.032	<0.351
PHOX2B	<0.032	<0.032
TH	<0.160	<0.160

10

20

【 0 1 0 8 】

252 検体において、本発明における7マーカー（CRMP1、DBH、DDC、GAP43、ISL1、PHOX2BおよびTH）及び他の4マーカー（DCX、CHRNA3、KIF1A、及びGABRB3）が陽性となった検体数を図1に示す。図1においては、たとえば1検体でCRMP1とDCXとの両方が検出された場合には、CRMP1について1陽性及びDCXについて1陽性とカウントした。また、252 検体において、本発明における7マーカー及び他の4マーカーが単独で陽性（単一マーカー陽性）となった検体数を図2に示す。

【 0 1 0 9 】

図1に示すように他の4マーカーは相当数検出されたにもかかわらず、図2に示すように、これら他の4マーカーのみ、単一マーカーとしての検出性能を持たなかった。これら4マーカーは、本発明における7マーカーとともに検出されるものであり、それら自体を測定しなくても偽陰性数に影響せず、スクリーニング感度に実質的に影響を与えなかった。従って、本発明における7マーカーが、偽陰性を抑制したまま臨床適用可能なマーカー数への削減を可能にしたことが示された。

30

【 0 1 1 0 】

[実施例 7]

実施例1と同様にddPCRを用いて各遺伝子マーカーを測定し、神経芽腫患者の骨髄検体又は末梢血検体におけるMRDの評価を行った。その結果を下記表に示す。

【 0 1 1 1 】

40

50

【表 7】

初発治療中患者の骨髄検体 (PHOX2B陽性)

Gene name	Copies per sample	
CRMP1	35.1	—
DBH	8.8	—
DDC	6.1	—
GAP43	30.7	—
ISL1	10.1	—
PHOX2B	19.7	+
TH	0.0	—

10

【 0 1 1 2 】

【表 8】

再発治療中患者の骨髄検体 (CRMP1陽性)

Gene name	Copies per sample	
CRMP1	205.3	+
DBH	4.0	—
DDC	0.0	—
GAP43	0.0	—
ISL1	4.0	—
PHOX2B	0.0	—
TH	0.0	—

20

【 0 1 1 3 】

【表 9】

初発治療中患者の骨髄検体 (DBH陽性)

Gene name	Copies per sample	
CRMP1	31.6	—
DBH	82.9	+
DDC	0.0	—
GAP43	2.6	—
ISL1	2.4	—
PHOX2B	1.2	—
TH	1.4	—

30

40

【 0 1 1 4 】

50

【表 1 0】

再発治療中患者の末梢血検体(DDC陽性)

Gene name	Copies per sample	
CRMP1	29.3	—
DBH	0.0	—
DDC	27.1	+
GAP43	0.0	—
ISL1	0.0	—
PHOX2B	6.8	—
TH	0.0	—

10

【 0 1 1 5】

【表 1 1】

初発治療中患者の末梢血検体(TH陽性)

Gene name	Copies per sample	
CRMP1	0.0	—
DBH	3.1	—
DDC	0.0	—
GAP43	8.8	—
ISL1	0.0	—
PHOX2B	3.1	—
TH	5.7	+

20

【 0 1 1 6】

【表 1 2】

初発治療中患者の末梢血検体(ISL1陽性)

Gene name	Copies per sample	
CRMP1	30.1	—
DBH	4.5	—
DDC	4.5	—
GAP43	8.3	—
ISL1	12.8	+
PHOX2B	0.0	—
TH	0.0	—

30

40

【 0 1 1 7】

50

【表 1 3】

初発治療中患者の骨髄検体(GAP43陽性)

Gene name	Copies per sample	
CRMP1	26.8	—
DBH	5.0	—
DDC	0.0	—
GAP43	130.4	+
ISL1	15.7	—
PHOX2B	0.0	—
TH	0.0	—

10

【0118】

上記表に示されるように、ddPCRを用いた場合も、本発明における7マーカー(CRMP1、DBH、DDC、GAP43、ISL1、PHOX2BおよびTH)すべてが単一マーカーとしてMRD検出能があることが示された。

【0119】

[実施例7]

BE(2)-C神経芽腫細胞株(American Type Culture Collection製)を正常骨髄細胞又は正常末梢血細胞で段階希釈し、実施例1と同様にddPCRを用いて各遺伝子マーカーを測定して検出限界を調べた。同様に、実施例6と同様にqPCRを用いて各遺伝子マーカーを測定して検出限界を調べた。それらの結果を表14に示す。表中、BMは正常骨髄細胞で希釈した試料、PBは正常末梢血細胞で希釈した試料であり、数値は検出限界における希釈倍率を表し、カッコ書きの数値はqPCR(リアルタイムPCR)に対するddPCR(デジタルPCR)の感度を表す。表14に示すように、ddPCRではより一層感度が高いため、より一層少ない検体であっても高感度でMRDを検出することができる。

20

【0120】

【表14】

MRD marker	BE(2)-C			
	BM		PB	
	qPCR	ddPCR(感度)	qPCR	ddPCR(感度)
CRMP1	1/100	1/10000(100倍)	1/1000	1/10000(10倍)
DBH	1/1000	1/10000(10倍)	1/1000	1/10000(10倍)
DDC	1/1000	1/10000(10倍)	1/1000	1/10000(10倍)
GAP43	1/100	1/1000(10倍)	1/1000	1/10000(10倍)
ISL1	1/100	1/10000(100倍)	1/100	1/10000(100倍)
PHOX2B	1/1000	1/10000(10倍)	1/1000	1/10000(10倍)
TH	1/100	1/10000(100倍)	1/100	1/100000(1000倍)

30

40

【0121】

[試験例]

健常者10名から採取した骨髄検体(BM)10検体および末梢血検体(PB)10検体において、レファレンス遺伝子GUSB、HMB5、HPR1、及びTBPを、実施例1と同様にddPCRを用いて増幅させた。これらレファレンス遺伝子マーカーのコピー数を表15に示す。

【0122】

50

【表 1 5】

GUSB		HMBS		HPRT1		TBP	
BM	PB	BM	PB	BM	PB	BM	PB
2120	1680	22420	918	3160	2380	1194	1380
1540	2640	2340	966	3420	3860	486	2980
1420	3300	2500	1478	1540	3520	488	2820
1860	2080	15140	1064	4160	3640	1040	1980
1860	2740	44400	1016	8020	4020	1260	2420
1580	2880	14640	1114	3540	4160	1600	2140
3100	2580	19340	1558	7920	4420	1720	2720
92	2500	7560	2480	2040	3600	268	2460
1580	1900	7800	840	4540	3160	1214	2020
2240	3580	18640	928	5020	5540	1620	3460

10

20

【 0 1 2 3】

表 1 5 に示すように、これらレファレンス遺伝子の中でも、HPRT1のみが、検体間の発現量の変動も骨髄検体と末梢血検体との間の発現量の変動も小さく、安定的に発現していた。なお、実施例 6 において qPCR (リアルタイム PCR) のレファレンス遺伝子として用いた B 2 M が、ddPCR (デジタル PCR) アッセイ系に適用すると発現量過剰で飽和したことにより発現量の定量ができないことも確認した。つまり、HPRT1 は、デジタル PCR に適した低発現であるとともに、骨髄検体であっても末梢血検体であっても、デジタル PCR によって正しく神経芽腫の微小残存病変を検出するのに特に適したレファレンス遺伝子であることが示された。

30

【 0 1 2 4】

本発明の好ましい実施形態は上記の通りであるが、本発明は、上述の実施形態に限定されるものではなく、本発明の趣旨から逸脱することのない様々な変形がなされる。

【配列表フリーテキスト】

【 0 1 2 5】

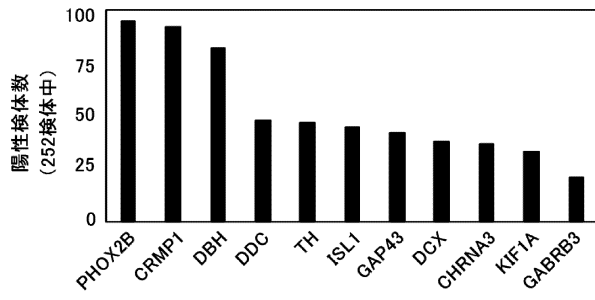
配列番号 1 3 から配列番号 3 6 はプライマーである。

40

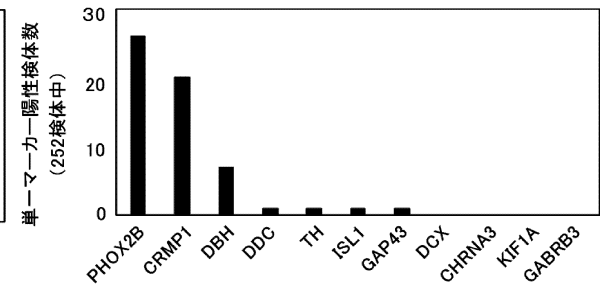
50

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

【配列表】

[0007084034000001.app](#)

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I		
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A
C 1 2 M	1/34 (2006.01)	C 1 2 M	1/34	Z

(56)参考文献

米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 0 2 0 3 6 5 (U S , A 1)

米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 0 2 3 1 4 2 (U S , A 1)

Oncol. Rep. , 2013年 , Vol.29 , p.1629-1636

Oncol. Lett. , 2016年 , Vol.12 , p.1119-1123

ThermoFisher SCIENTIFIC, qPCR vs. Digital PCR vs. Traditional PCR, [online], 2016.6.1, [検索日 2018.3.13], インターネット: URL: <https://web.archive.org/web/20160601181306/https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/qpcr-vs-digital-pcr-vs-traditional-pcr.html>

Clin. Cancer Res. , 2008年 , Vol.14, Issue 21 , pp.7020-7027

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

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

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

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)