

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年8月3日(03.08.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/145754 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)

UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡 7 4 4 Fukuoka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/002178

(22) 国際出願日: 2023年1月25日(25.01.2023)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2022-009850 2022年1月26日(26.01.2022) JP

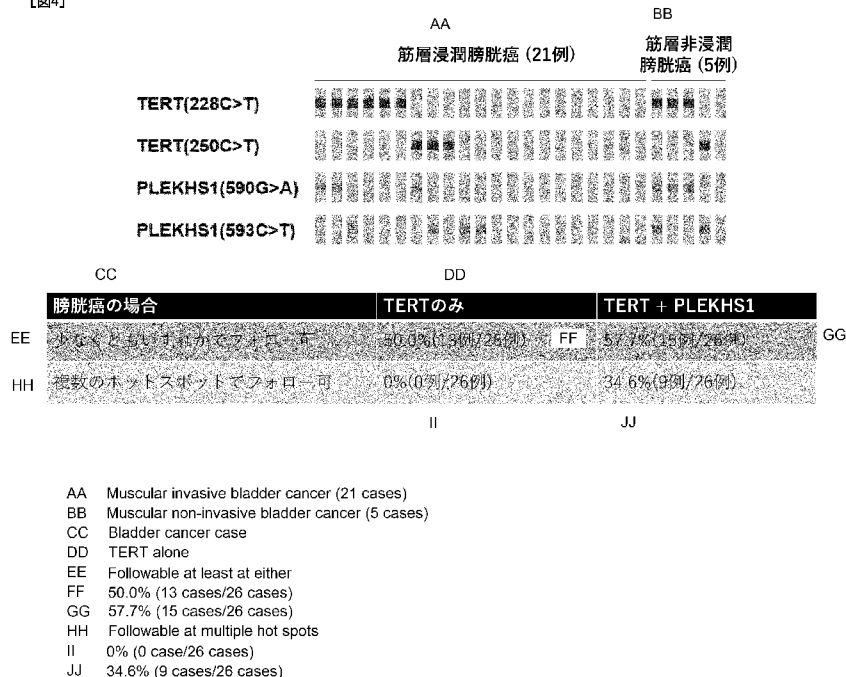
(71) 出願人: デンカ株式会社 (DENKA COMPANY LIMITED) [JP/JP]; 〒1038338 東京都中央区日本橋室町二丁目1番1号 Tokyo (JP). 国立大学法人九州大学 (KYUSHU

(72) 発明者: 塚原 茂大 (TSUKAHARA, Shigehiro); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡 7 4 4 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 松元 崇 (MATSUMOTO, Takashi); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡 7 4 4 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 塩田 真己 (SHIOTA, Masaki); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡 7 4 4 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 江藤 正俊 (ETO, Masatoshi); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡 7 4 4 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 康 東天 (KANG, Dongchon); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡 7 4 4 国立大学法人九

(54) Title: PRIMERS AND PROBE FOR DETECTING PRESENCE OF BLADDER CANCER

(54) 発明の名称: 膀胱癌の存在を検出するためのプライマー及びプローブ

【図4】



(57) Abstract: The present invention provides a primer set for detecting the presence of bladder cancer in a specimen, said primer set containing a pair of primers that are oligonucleotides targeting a PLEKHS1 promoter mutation and having a length of 16-21 bases inclusive, and one or more pairs of primers targeting a TERT promoter mutation.

(57) 要約: 本発明は、検体における膀胱癌の存在を検出するためのプライマーセットであって、PLEKHS1プロモーターの変異を標的とする、16塩基長以上で且つ21塩基長以下のオリゴヌクレオチドである1対のプライマーと、TERTプロモーターの変異を標的とする、1又は複数の対のプライマーと、を含む、プライマーセット、を提供する。

[続葉有]

州大学内 Fukuoka (JP). 兒玉 啓輔(KODAMA, Keisuke); 〒1038338 東京都中央区日本橋室町二丁目1番1号 デンカ株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(INABA, Yoshiyuki et al.); 〒1066123 東京都港区六本木6-10-1 六本木ヒルズ森タワー23階 TMI 総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

膀胱癌の存在を検出するためのプライマー及びプローブ

技術分野

[0001] 本発明は広く、膀胱癌の存在を検出するためのプライマー及びプローブ等に関する。

[0002] 腫瘍由来の遺伝子変異を血中循環DNA (c e l l - f r e e DNA : c f DNA) で検出するリキッドバイオプシーは低侵襲な検査であり、術後の経過観察や治療効果判定において有効であることが近年報告されている。

[0003] c f DNAの分析手法として、次世代シーケンサー (N G S) とデジタルP C Rの利用が挙げられる。デジタルP C RはN G Sよりも低いコストで分析できるという利点がある。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1: Clinical significance of hotspot mutation analysis of urinary cell-free DNA in urothelial bladder cancer(Frontiers in oncology, 2020)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 膀胱癌等の多くの癌では、T E R T (t e l o m e r a s e r e v e r s e t r a n s c r i p t a s e) のプロモーター領域に点変異が起きており、そのような点変異を検出するためのプライマーが知られている。

[0006] 膀胱癌では、T E R TのみならずP L E K H S 1 (p l e c k s t r i n h o m o l o g y d o m a i n - c o n t a i n i n g S 1) のプロモーター領域の遺伝子変異がホットスポット、つまり複数の患者に共通で見られる変異である可能性があるが、c f DNAを検体としたとき、定量P C Rでの検出は難しい。また、従来のプライマーやプローブではc f DNAを

十分な精度で検出できないという問題もあった。

課題を解決するための手段

[0007] 膀胱癌の存在を検出するために、TERTプロモーターの変異に加え、PLEKHS1プロモーターの変異を標的とするプライマー等を、通常とは異なる思想で設計した結果、従来のTERTプロモーター変異を対象とした検出では40%程度であった検出カバー率が増大した。

[0008] すなわち、本願は以下の発明を包含する。

(1)

検体における膀胱癌の存在を検出するためのプライマーセットであって、PLEKHS1プロモーターの変異を標的とする、16塩基長以上で且つ21塩基長以下のオリゴヌクレオチドである1対のプライマーと、TERTプロモーターの変異を標的とする、1又は複数の対のプライマーと、を含む、プライマーセット。

(2)

PLEKHS1プロモーターの変異が、10番染色体の115, 511, 590位におけるGからAへの置換、10番染色体の115, 511, 593位におけるCからTへの置換又はその両方である、(1)に記載のプライマーセット。

(3)

PLEKHS1プロモーターの変異を標的とするプライマーが配列番号1及び／又は2に記載の塩基配列を有する、(1)又は(2)に記載のプライマーセット。

(4)

TERTプロモーターの変異を標的とするプライマーが、5番染色体の1, 295, 228位におけるCからTへの置換、5番染色体の1, 295, 250位におけるCからTへの置換又はその両方である、(1)～(3)のいずれかに記載のプライマーセット。

(5)

検体における膀胱癌の存在を検出するためのプローブであって、PLEKHS1プロモーターの変異を標的とする、プローブ。

(6)

プローブが配列番号4又は5に記載の塩基配列を有する、(5)に記載のプローブ。

(7)

(1)～(4)のいずれかに記載のプライマーセットを含む、キット。

(8)

(5)又は(6)に記載のプローブを更に含む、(7)に記載のキット。

(9)

検体における膀胱癌の存在を検出するための方法であって、(1)～(4)のいずれかに記載のプライマーセット、あるいは(5)又は(6)に記載のプローブを用いてPLEKHS1プロモーターの変異を検出する工程を含む、方法。

(10)

検出工程で使用される核酸増幅法がデジタルPCRである、(9)に記載の方法。

(11)

検体が液性検体である、(9)又は(10)に記載の方法。

(12)

検体が血中循環DNA(cfDNA)を含む、(9)～(11)のいずれかに記載の方法。

発明の効果

[0009] PLEKHS1プロモーターの変異として、10番染色体の115, 511, 590位におけるGからAへの置換や10番染色体の115, 511, 593位におけるCからTへの置換がある。本発明者らは、プローブの設計にあたり、これらの変異に相当する位置がプローブの中心付近となるように

し、最も T m 値が高くなるようにした。具体的には、プローブは通常 20 量体で設計され、短くても 18 量体であり、長くても 25 量体であるところ、本願発明では T m 値が最大限高値となるよう 25 量体とした。

[0010] プライマーも通常とは異なる思想で設計した。一般的に、プライマーの長さは 20～25 量体程度となるよう設計される。プライマーの長さを 20 量体未満とすると標的以外の塩基配列に対する非特異的に結合してしまう配列が増える可能性があるが、PLEKHS1 プロモーターの変異を検出するフォワードプライマーは 16 量体のものを設計した。これは、野生型・変異体用のプローブより T m 値を下げる必要があることを考慮したものである。PLEKHS1 プロモーター領域のホットスポットを含む領域が A T リッチな配列となっているがプライマー設計領域は A T リッチとはいえない配列であることから T m 値が高くなってしまい、通常よりも配列を短くする必要がある。さらに G C を避けようとする、例えば、プライマーの 3' 末端に A または T を設計すると、鋳型 DNA に対する特異性が落ちる可能性がある。しかしながら、検証実験をすることで、一般的な設計よりも T m 値が低く、短い長さで設計することを達成した。

[0011] なお、フォワードプライマーの T m 値より変異体プローブの T m 値の方が低い。その結果、アニーリングの順番は野生型プローブ (53.92)、フォワードプライマー (52.61)、変異体プローブ (52.28)、リバースプライマー (50.66) となる。

[0012] 更に、cfDNA の断片は 200 bp 未満とされていることから、増幅するアンプリコンのサイズが 200 bp 未満になるように工夫して設計した。

[0013] TERT プロモーターの変異を標的とする従来のプライマーに加え、上記のとおり通常とは異なる思想のもと設計した PLEKHS1 プロモーターの変異を標的とするプライマー等を用いることにより、膀胱癌の検出において従来カバーできなかった患者についてもカバーすることができるようになる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は、バリデーション用のプラスミド（野生型（W T）、変異型（M u t））の検出精度（上）と、変異率（下）を示す。変異率はプラスミド（W T／M u t）を999：1に混合して算出した（n＝3）。

[図2]図2は、変異型陽性である患者について陽性・陰性ドロップレットを定量した結果を示す。各図のC h 1はM u tのドロップレット、C h 2はW Tのドロップレットを示し、左下枠はW T及びM u t陰性ドロップレット、右下枠はW T陽性ドロップレット、左上枠はM u t陽性ドロップレット、右上枠はW T及びM u t陽性ドロップレットを示す。

[図3]図3は、変異型陽性である患者の初回治療（経尿道的膀胱腫瘍切除術）以降についてのM A F：M u t a t i o n A l l e l e F r e q u e n c yの経時的な変化を示す。図中の矢印は、再発している段階、つまり「c t D N A：c i r c u l a t i n g t u m o r D N Aがあり他変異で陽性と判定できる」にもかかわらず、M A Fが0.00%と検出されてしまっている変異（又はそれを含む試料）の特定の段階を示す。左図は患者番号03（P t 03）の結果を、右図は患者番号21（P t 21）の結果を示す。参考として膀胱癌で変異を示すことがある遺伝子D C C（左図）又はF G F R 3（右図）の経時的な変化も併せて示す。

[図4]図4は、本発明のプライマー／プローブによる膀胱癌患者のカバー率を図示したものである。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明の実施の形態（以下、「本実施形態」という。）について説明するが、本発明の範囲は以下の実施形態に限定して解釈されない。

[0016] （プライマーセット）

第一の態様において、検体における膀胱癌の存在を検出するためのプライマーセットであって、

PLEKHS1プロモーターの変異を標的とする、16塩基長以上で且つ21塩基長以下のオリゴヌクレオチドである1対のプライマーと、

TERTプロモーターの変異を標的とする、1又は複数の対のプライマー

と、

を含む、プライマーセットが提供される。

[0017] 検体は、膀胱癌の存在を示唆する P L E K H S 1 プロモーターの変異と T E R T プロモーターの変異を検出できるものであれば特に限定されないが、本発明のプライマーセット等はリキッドバイオプシーにおいて好適に使用されるため、検体は c f D N A を含む液性検体、例えば血液やその他の体液であることが好ましい。より具体的には、検体は血液、血清、血漿、尿、便、唾液、喀痰、組織液、髄液、ぬぐい液等の体液等又はその希釈物等、特に血漿であることが好ましい。

[0018] 検体は、膀胱癌を有すると疑われる被験者から採取される。膀胱癌は筋層非浸潤性又は筋層浸潤性のいずれでもよい。採取回数は 1 回でもよいし、膀胱癌治療後の予後観察等の目的のために複数回であってもよい。

[0019] リキッドバイオプシーで得られる c f D N A 中に含まれる膀胱癌由来の D N A (c t D N A) の割合は非常に少ないため、検体の種類によって、核酸増幅前に検体から c t D N A を抽出する工程や、夾雑物等を除去する工程を実施してもよい。血液を例に説明すると、血漿分離交換法等の公知の手段を行うにより c t D N A の回収率を増大させることができる。

[0020] 一実施形態において、P L E K H S 1 プロモーターの変異は、10 番染色体の 115, 511, 590 位における G から A への置換（以下、「590 G>A」ともいう。）、10 番染色体の 115, 511, 593 位における C から T への置換（以下、「593 C>T」ともいう。）又はその両方であってもよい。

[0021] プライマーは 16 塩基長以上で且つ 21 塩基長以下のオリゴヌクレオチドである。中でも、T_m 値が低いものが好ましい。具体的には、リバープライマーの T_m 値をプローブより 1～3℃ 高く設定することで、鋳型 D N A に対して先にプローブがアニールし、その後、リバープライマーがアニールするようになる。

[0022] 更に、プライマーは増幅するアンプリコンのサイズが 200 b p 未満にな

るように設計され得る。

- [0023] 上記のような設計思想に基づくプライマーであって、590G>Aと593C>Tの両方の変異を検出するプローブを含む配列を増幅するプライマーの例として、塩基長が16塩基である配列番号1に記載のフォワードプライマー (gacctcttggcttcca)、塩基長が21塩基である配列番号2に記載のリバースプライマー (ctgcaaaattttccatttcca) が挙げられる。プライマーセットは、配列番号1及び2に記載の配列から成るものを使用することが好ましい。これらのプライマーを、PLEKHS1プロモーター領域を増幅する公知のプライマーセットと組み合わせてもよい。
- [0024] 一実施形態において、TERTプロモーターの変異は、5番染色体の1, 295, 228位におけるCからTへの置換（以下、「228C>T」ともいう。）、5番染色体の1, 295, 250位におけるCからTへの置換（以下、「250C>T」ともいう。）又はその両方であってもよい。228C>Tは膀胱癌において、そして250C>Tは筋層非浸潤性膀胱癌において検出率が高いことが知られている。
- [0025] 228C>Tと250C>Tの両方の変異を検出するプローブを含む配列を増幅するプライマーは、それぞれの変異を起点として、その上流もしくは下流に113bp内、つまり、前者の変異を標的とするプライマー及びプローブについては1, 295, 115位から1, 295, 341位の領域内、後者の変異を標的とするプライマー及びプローブについては1, 295, 237位から1, 295, 363位の領域内で設計され得る。GenBankに開示されているTERTプロモーター領域のコーディング鎖の5'上流にある配列（配列番号6）(ref|NC_000005.9|:1295115-1295374 Homo sapiens chromosome 5, GRCh37.p13 Primary Assembly)を参照して設計方法の例について説明すると、当該配列をセンス鎖側の配列に変換し、また、228C>Tと250C>Tの両方の変異を反映させると配列番号7に示す配列となる。228C>Tを検出するプライマー、プローブについては、配列番号7における、1, 295, 115位から1, 295, 341位に対応する1

， 2 9 5， 3 4 1 位～1， 2 9 5， 1 1 5 位の 2 2 7 b p の配列（配列番号 8）から適宜所望とするプライマー、プローブを設計することができる。2 5 0 C>T を検出するプライマー、プローブについても同様であり、1， 2 9 5， 3 6 3 から1， 2 9 5， 2 3 7 位の 1 2 7 b p の配列（配列番号 9）から設計され得る。そのようなプライマーの例として、B i o R a d 社製のプライマー（T E R T C 2 2 8 T _ 1 1 3 : d H s a E X D 7 2 4 0 5 9 4 2， T E R T C 2 5 0 T _ 1 1 3 : d H s a E X D 4 6 6 7 5 7 1 5）（アンプリコンサイズ：1 1 3 b p）（J Mol Diagn. 2019 Mar;21(2)274-285も参照のこと。）が挙げられる。このようなプライマーを、T E R T プロモーター領域を増幅する公知のプライマーセットと組み合わせてもよい。

[0026] 配列番号 6～9 の配列を以下に示す。

配列番号 6：

```
GCCGGGGCCAGGGCTTCCCACGTGCGCAGCAGGACGCAGCGCTGCCTGAAACTCGCGCCGCGAGGAGAG
GGCGGGGCGCGGAAAGGAAGGGGAGGGGCTGGGAGGGCCCGAGGGGGCTGGGCCGGGGACCCGGGAG
GGGTGCGGACGGGGCGGGGTCCGCGCGGAGGAGGCGGAGCTGGAAGGTGAAGGGGCAGGACGGGTGCCC
GGGTCCCCAGTCCCTCCGCCACGTGGGAAGCGCGGTCCCTGGG
```

配列番号：7

```
CCCAGGACCGCGCTTCCCACGTGGCGGAGGGACTGGGGACCCGGGCACCCGTCCTGCCCCCTTCACCTTC
CAGCTCCGCCTCCTCCGCGCGGACCCCGCCCCGTCCCGACCCCTCCCGGGTCCCCGGCCAGCCCCCTC
CGGGCCCTCCCAGCCCCCTCCCTTCTTTCCGCGGCCCCGCCCTCTCCTCGCGGCGCGAGTTTCAGGCA
GCGCTGCGTCCTGCTGCGCACGTGGGAAGCCCTGGCCCCGGC
```

配列番号 8：

```
GGCGGAGGGACTGGGGACCCGGGCACCCGTCCTGCCCCCTTCACCTTCAGCTCCGCCTCCTCCGCGCGG
ACCCCGCCCCGTCCCGACCCCTCCCGGGTCCCCGGGCCAGCCCCCTCCGGGCCCTCCCAGCCCCCTCCC
TTCCTTTCCGCGGCCCCGCCCTCTCCTCGCGGCGCGAGTTTCAGGCAGCGCTGCGTCCTGCTGCGCACG
TGGGAAGCCCTGGCCCCGGC
```

配列番号 9：

```
CCCAGGACCGCGCTTCCCACGTGGCGGAGGGACTGGGGACCCGGGCACCCGTCCTGCCCCCTTCACCTTC
```

CAGCTCCGCCTCCTCCGCGCGGACCCCGCCCCGTCCCGACCCCTC CCGGGTCCCCGGC

[0027] プライマー等の塩基配列を構成するヌクレオチドは、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドのいずれでもよい。これらのオリゴヌクレオチドは、既知の方法で合成することができ、例えば、塩基配列に従って、固相ホスホルアミダイト法及びトリエステル法等の任意の核酸合成法により合成され得る。

[0028] 上記プライマーを用いる核酸増幅反応により、膀胱癌に関連するホットスポット領域を含む配列を増幅することが可能になる。

[0029] 核酸増幅法としてはPCR法があり、通常のPCRに加え、デジタルPCR、マルチプレックスPCR、LAMP (Loop-mediated isothermal Amplification) 法、ICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids) 法、RCA (Rolling Circle Amplification) 法、LCR (Ligase Chain Reaction) 法、SDA (Strand Displacement Amplification) 法等を挙げることができる。

[0030] cfDNA中の変異を対象とする場合、核酸増幅方法はデジタルPCRであることが好ましい。デジタルPCRを使用することで、癌遺伝子について変異型と正常型の割合 (MAF: Mutation Allele Frequency) を決定することができる。デジタルPCRはドロップレットデジタルPCRであってもよい。

[0031] (プローブ)

第二の態様において、検体における膀胱癌の存在を検出するためのプローブであって、PLEKHS1プロモーターの変異を標的とする、プローブ、が提供される。

[0032] プローブを構成する配列はPLEKHS1プロモーターの変異を検出できるものであれば限定されず、例えば590G>Aの変異又は593C>Tの

変異を検出できるプローブが好ましい。

[0033] 一実施形態において、5 9 0 G > A の変異を検出するプローブは配列番号 4 に記載の配列 (tgcaattgttttaattgcaaaaaagc) を有する。プローブは配列番号 4 に記載の配列から成るものが好ましい。

[0034] 一実施形態において、5 9 3 C > T の変異を検出するプローブは配列番号 5 に記載の配列を有する。プローブは配列番号 5 に記載の配列 (tgcaattattcaattgcaaaaaagc) から成るものが好ましい。

[0035] プローブはその一部が修飾されていてもよく、その例として、末端がアミノ化されたものや、一部の塩基がリンカーとなる塩基で修飾されたもの等が挙げられる。また、塩基配列の一部へ別の塩基を挿入したり、その塩基配列の一部の塩基を欠失させたり、又は別の塩基に置換したり、あるいは塩基以外の物質に置換してもよい。

[0036] 更に、プローブは標識物質等で修飾されていてもよく、例えば蛍光色素とそのクエンチャーを有してもよい。そのような標識物質は市販のものを使用することができる。クエンチャーは蛍光色素からの蛍光をクエンチできるものであれば特に制限されない。プローブを構成するヌクレオチド残基自体に修飾が施されていてもよく、例えば、人工的に修飾されたヌクレオチド残基に置換されていてもよい。

[0037] (キット)

第二の態様において、検体における膀胱癌の存在を検出するためのプライマーセットを含むキットが提供される。プライマーセットは上述したものを使用することができる。

[0038] キットは P L E K H S 1 プロモーターの変異を標的とするプローブを更に含んでもよい。5 9 0 G > A 及び 5 9 3 C > T の変異を検出するプローブとして、それぞれ配列番号 4 及び 5 に記載の塩基配列を有するものが挙げられる。

[0039] キットは更に、T E R T プロモーターの変異を標的とする、1 又は複数の対のプライマーとプローブを含んでもよい。T E R T プロモーターの変異と

しては228C>Tと250C>Tがある。228C>Tを標的とするプライマー及びプローブについては1, 295, 115位から1, 295, 341位の領域内、250C>Tを標的とするプライマー及びプローブについては1, 295, 237位から1, 295, 363位の領域内で設計され得る。

[0040] デジタルPCRで核酸を増幅する場合、上記プライマーセット、プローブ、検体、及びDNAポリメラーゼを含む反応溶液が調製される。反応溶液は、ウェルやドロップレットに分配された後、増幅反応にかけられる。

[0041] 核酸増幅反応で得られる増幅産物の検出には、増幅産物を特異的に認識することができる標識物質を利用してもよい。そのような標識物質としては蛍光色素、ビオチン、ジゴキシゲニン等が挙げられる。標識体として蛍光を用いた場合には、その蛍光を蛍光顕微鏡、蛍光プレートリーダー等を用いて検出することができる。

[0042] 標識物質として、増幅産物にインターカレートする物質を使用することもできる。インターカレーターは、二本鎖DNAにインターカレートして蛍光を発する物質であれば特に限定されない。

[0043] あるいは、ポリアクリルアミド又はアガロースゲルを用いた電気泳動法など、既知の方法で検出を行ってもよい。例えば、電気泳動では、分子量が既知のマーカーの移動度に対する増幅産物の移動度から、増幅産物の存在を同定することができる。

[0044] (検出方法)

第三の態様において、検体における膀胱癌の存在を検出するための方法であって、上記プライマーセット、あるいは上記キットを用いてPLEKHS1プロモーターの変異を検出する工程を含む、方法、が提供される。

[0045] プライマーセットにはTERTプロモーターの変異を標的とするプライマーを含め、検出工程においてTERTプロモーターの変異も併せて検出することが好ましい。検出工程の前後に他の工程を含んでもよく、例えば、検体は、膀胱癌を有すると疑われる被験者から採取され得る。検出工程は複数回

行ってもよく、例えば同一の被験者に由来する検体を定期的に採取して、それらを採取の都度検出工程にかけることもできる。

[0046] PLEKHS1 プロモーターの変異が検出された場合、検体において膀胱癌が存在することが決定される。これにより、医師等による膀胱癌の診断やその後の治療方法の決定を補助することができる。膀胱癌と診断された被験者に対しては、経尿道的膀胱腫瘍切除術、根治的膀胱摘出術等の手術（外科治療）、術前化学療法、術後化学療法、再発化学療法等の化学療法（抗癌剤治療）、放射線治療を行うことができる。

[0047] 例えば、経尿道的膀胱腫瘍切除術の結果から筋層浸潤かどうかの診断が可能になる。筋層非浸潤であれば経尿道的膀胱腫瘍切除術のみで治療は終了し、その後経過観察となる。

[0048] 経尿道的膀胱腫瘍切除術の手術結果より筋層浸潤と診断されると術前化学療法に進み、治療完遂後に再発転移を認められた場合、再発化学療法が導入される。

[0049] 術前化学療法を行うことで予後が改善され得るが、腫瘍の組織型や患者の希望次第で行わない場合もある。術後化学療法は術中の所見から残存病変が疑われる際に追加される場合が多い。年齢や全身状態によって根治的膀胱摘出術が難しいと考えられる場合、代わりに放射線照射が行われる場合もある。

[0050] 以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0051] 1. 1. プライマー／プローブの設計

1) プローブの認識部位の決定

PLEKHS1 115, 511, 590及び115, 511, 593周辺の塩基配列をNCBI等で取得し、変異を含む箇所に検出用プローブの認識部位を設定した。プローブの認識位置・塩基長は、GC含有率とTm値を考慮して決定した。

[0052] 2) プライマー設計

プローブを含む配列を増幅するようなプライマーペアを複数設計し、gDNA、cfDNAにおける非特異的なアンプリコン形成の有無、プライマーダイマー評価をPCRの電気泳動で、プライマーペアごとのPCR効率を定量PCRで確認した。cfDNAを対象とするため、アンプリコンは80～150量体の範囲内とし、プライマーの配列・塩基数はプローブから算出されるT_m値を考慮した。PCR効率、プライマーダイマー、非特異的なバンドを考慮し最も効率的なプライマーペアを決定し、ターゲットとしている領域が正しく増幅されていることをサンガーシーケンシングによって確認した。

[0053] 3) プローブ配列の決定

それぞれのプライマーのT_m値とプローブのT_m値を比較し、センス鎖側に結合させるかアンチセンス鎖側に結合させるかプローブの塩基配列を決定した。

[0054] 上記の手順で決定した配列を以下の表に示す。

[表1]

プライマー名	配列	T _m 値
Fw1	gacctcttggttcca (配列番号1)	52.61
Re3	ctgcaaaattttccatttcca (配列番号2)	50.66
プローブ名	配列	T _m 値
WT	tgcaattgttcaattgcaaaaaagc (配列番号3)	53.92
Mut 590G>A	tgcaattgtttaattgcaaaaaagc (配列番号4)	52.28
Mut 593C>T	tgcaattattcaattgcaaaaaagc (配列番号5)	52.28

[0055] 2. 検体の調製

膀胱癌（筋層非浸潤・筋層浸潤を問わない）患者における腫瘍組織・血液検体を対象検体として採取した（26検体）。なお、膀胱癌は治療既往のない初発のものを対象とした。筋層浸潤性膀胱癌と診断された患者においては

治療後も血液検体を3ヶ月毎に採取した。

[0056] 血液検体のサンプリングは、通常採血（EDTA採血管）にて末梢白血球、血漿を回収することで行った。腫瘍組織は手術にて摘出された腫瘍組織を冷凍保存した。いずれのサンプルも抽出・解析まで -80°C で冷凍保存とした。

[0057] 得られたサンプルについて、腫瘍組織由来のDNAをtDNA（tumor DNA）、体細胞（末梢白血球）由来のDNAをgDNA（genome DNA）、血漿中の血中循環DNAをcfDNAとしてそれぞれ解析を行なった。

[0058] 3. 実験方法

3. 1. 実験のフロー

以下の順序で設計したプライマーの妥当性をチェックした。

- (i) PCRによる断片の増幅。
- (ii) DNA精製。
- (iii) 電気泳動による目的断片の確認とプライマーダイマーの確認。
- (iv) 断片のサンガーシーケンシングによる配列確認。

[0059] 続いて、以下の順序でバリデーション用プラスミドを作製した。

- (i) 患者の腫瘍サンプルからゲノムDNAの抽出。
- (ii) 野生型PLEKHS1の115, 511, 590~115, 511, 593領域を含むDNA断片のPCRによる増幅。
- (iii) ベクターへPLEKHS1断片の挿入。
- (iv) ベクターを大腸菌に導入し、10~20程度のコロニーを分離し大量培養。
- (v) ベクターをmini prepで回収し、それぞれのベクターがWTかMutantかサンガーシーケンシングで確認。
- (vi) WTのみ回収された場合、野生型PLEKHS1導入プラスミドを鋳型にしたMutagenesisキットによる590G>A及び593C>T変異の導入。

(v i i) 変異型 P L E K H S 1 導入プラスミドの取得。

[0060] 以下の順序によりバリデーション用プラスミドを用いてプライマー／プローブの検出精度を確認した。

(i) 野生型 P L E K H S 1 導入プラスミドと変異型 P L E K H S 1 導入プラスミドそれぞれに対し、野生型プライマー／プローブセット、並びに変異型プライマー／プローブセットを用いた d P C R による検出精度の確認。

なお、野生型 P L E K H S 1 及び変異型 P L E K H S 1 を検出するためのフォワードプライマーとして、配列番号 1 に記載の配列 (gacctcttggttcca) から成るものを、そして、リバープライマーとして配列番号 2 に記載の配列 (ctgcaaaattttccatttcca) から成るものを使用した。野生型 P L E K H S 1 を検出するためのプローブとして、配列番号 3 に記載の配列 (tgcaattgttcaattgcaaaaaagc) から成るものを使用した。5 9 0 G > A の変異型のプローブとしては配列番号 4 に記載の配列 (tgcaattgtttaattgcaaaaaagc) から成るものを、そして、5 9 3 C > T の変異を検出するプローブは配列番号 5 に記載の配列 (tgcaattattcaattgcaaaaaagc) から成るものを使用した。(i i) 野生型：変異型 = 9 9 9 : 1 の割合での 0. 1 % 変異プラスミドの作製。

(i i i) 0. 1 % 変異プラスミドの検出精度の確認。

[0061] 患者サンプルを用いて、d P C R により T E R T 及び P L E K H S 1 変異を検出した。

(i) 検証済み野生型 P L E K H S 1 プライマー／プローブ及び変異型 P L E K H S 1 プライマー／プローブを用いた、t D N A および g D N A (各 2 6 検体) をサンプルとした変異検出確認。

(i i) 同様に T E R T のプライマー／プローブを用いた、t D N A および g D N A (各 2 6 検体) をサンプルとした変異検出確認。なお、T E R T のプライマー／プローブは市販品 (B i o R a d 社製のプライマー／プローブのセット (T E R T C 2 2 8 T _ 1 1 3 : d H s a E X D 7 2 4 0 5 9 4 2, T E R T C 2 5 0 T _ 1 1 3 : d H s a E X D 4 6 6 7 5 7 1 5))

(アンプリコンサイズ：113bp))を使用した。それらの配列は不明であるが、アンプリコンサイズが2種とも113bpとなっており、また、一般的には変異箇所を中心にプライマーを設計し、変異箇所にプローブが当たるようにプローブを設計することから、C228もしくはC250を起点にして、上流もしくは下流の113bpの範囲内にプライマーとプローブがあると考えられる。上記変異箇所から上流もしくは下流に50～200bpの範囲内で設計を行ってもよい。

(iii) tDNAにおいて変異型陽性かつgDNAで変異型陰性であることが確認できた症例において、cfDNAをサンプルとした変異検出・MAFの算出。腫瘍において低頻度である場合、血中での検出が困難であることが予想されたため、tDNAにおいて変異率が10%以上のものを変異型陽性とした。

[0062] デジタルPCRに用いた材料と方法を以下に記載する。

材料：

サンプルDNA (−20℃)

2x ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) (4℃)

20x プライマー／プローブ：

制限酵素： HaeIII

[0063] 方法：

1. <50ng／ウェル(7μLまで)のDNA溶液を調整(10–50コピーの場合は15ng追加可)
2. 室温で溶解し、ボルテックスし、遠心し、遮光しておく。
3. Mixを調製(制限酵素は原液10U／μL)

[表2]

成分	量 (μL)	終濃度
2 x d d P C R S u p e r m i x f o r P r o b e s	1 0	1 x
2 0 x 変異型プライマー／プローブ	1	1 x
2 0 x 野生型プライマー／プローブ	1	1 x
制限酵素	0. 5	2 – 5 U / r e a c t i o n
DNAサンプル+水	1 – 7	< 5 0 n g
合計	2 0	—

4. V o r t e x ・遠心し室温で3分放置

5. D G 8 (登録商標) カートリッジのサンプルウェルに $20\mu\text{L}$ の m i x を、オイルウェルに $70\mu\text{L}$ の D r o p l e t G e n e r a t i o n O i l を添加。

6. D r o p l e t G e n e r a t o r に入れて溶液中のドロップレットを作成する

7. D r o p l e t $40\mu\text{L}$ を P C R 9 6 w e l l に入れてシーリング (アルミホイル)

[表3]

サイクリングステップ	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	時間	サイクル数
酵素活性化	9 5	1 0 m i n	1
変性	9 4	3 0 s e c	4 0
アニーリング／伸長	5 5	1 m i n	4 0
酵素不活性化	9 8	1 0 m i n	1

8. D r o p l e t R e a d e r で解析

[0064] 4. 結果

バリデーション用のプラスミド (W T、M u t) を作成し検出精度を確認

した。結果を図1に示す。PLEKHS1 590G>Aの検出に関してはWTとMutの検出精度はそれぞれ99.98%、100.00%だった。PLEKHS1 593C>Tの検出に関してはWTとMutの検出精度はそれぞれ99.99%、100.00%だった。また、WTでMutを1000倍希釈したDNA溶液を検出したところ有意に0.1%の変異を検出できた(590G>A: $p=0.0031$ 、593C>T: $p<0.001$)。

[0065] 変異型陽性患者サンプル(tDNA、cfDNA)を対象にdPCRを試行したところWT、Mutとも検出シグナルは良好であり、いずれのサンプルでも陽性ドロップレットと陰性ドロップレットを明確に分離できた(図2)。

[0066] 図3に示すとおり、変異型陽性である患者のcfDNAのMAFを経時的に解析したところ、画像による転移診断より前にMAFの増加を検出できた。また、同じ検体をPLEKHS1以外にTERTプロモーターでも解析したところ変異によって異なる変動を見ることがあった。例えば、図3中の矢印は、再発している段階、つまり「ctDNAがあり他変異で陽性と判定できる」にもかかわらず、MAFが0.00%と検出されてしまっている変異(又はそれを含む試料)の特定の段階を示しており、この結果から、膀胱癌の術後を経過観察においては複数の変異の経過を観察する必要があることが分かる。

[0067] 図4に示すとおり、26検体の腫瘍DNAをdPCRで検出したところ、TERTプロモーターとPLEKHS1プロモーターはそれぞれ50.0%(13/26)、42.3%(11/26)の患者が陽性であった。なお、PLEKHS1プロモーターの変異が重複している患者は1とカウントした。TERTプロモーターのみでは50.0%の対象患者を観察できるのに対し、PLEKHS1プロモーターの追加によって57.7%(15/26)に改善した。また、TERTプロモーターのみでは同一患者において複数の変異を観察できなかった、つまり0.0%(0/26)であったのに対し、

PLEKHS1プロモーターの追加によって34.6% (9/26) の患者を複数の変異で観察できるようになった。

[0068] 5. 考察

従来の方法で検出できるTERTプロモーターと同様に、今回検出したPLEKHS1プロモーターの変異も複数の患者で陽性であり、ホットスポットとして有用であった。これをcfDNAのMAFとして検出することにより患者の病勢を評価できることが可能であると考えられる。PLEKHS1プロモーターの変異検出精度はWT、Mutとも高精度でありcfDNAのMAF解析のような低頻度の解析においても利用可能である。

[0069] WTで軽微なミスアニーリングが起こる原因としては、変異によってGC%が変動しプローブのT_m値が変わることが原因であると考えられる。患者サンプルを用いた検討でもtDNAとcfDNAは類似したシグナル検出能でありcfDNAを対象とした解析にも有用であると判断できた。

[0070] TERTプロモーターだけでなくPLEKHS1プロモーターにおいてもdPCRでの変異解析ができる利点として、第一に同一アッセイで解析可能な患者が増えることが挙げられる。膀胱癌の腫瘍変異は多岐に富むため患者ごとに異なる変異を経時的に解析する方法が主流であり、この方法に比してホットスポットを検出することは解析コストの改善において有利である。第二に複数のMAFを解析することによって患者の病勢評価をより正確に行うことが可能となる。全身転移が診断されているにも関わらずMAFが検出できない事象を複数回認めたが、これは単一の変異で経過観察を行なった場合に偽陰性と判断される危険性を示唆するものである。複数のMAFを観察することで偽陰性と評価される可能性を減少させることができると考えられる。

[0071] 複数検出による臨床的な意義としては、安価にモニタリングができるため病勢の早期評価に有用だが、NGSと異なり単一の変異をみるdPCRにおいては偽陰性による誤った病勢評価の影響を受けやすく、いずれの変異検出においても単一変異での評価は誤評価の危険性を伴うため、複数での検出評

価が望ましい。

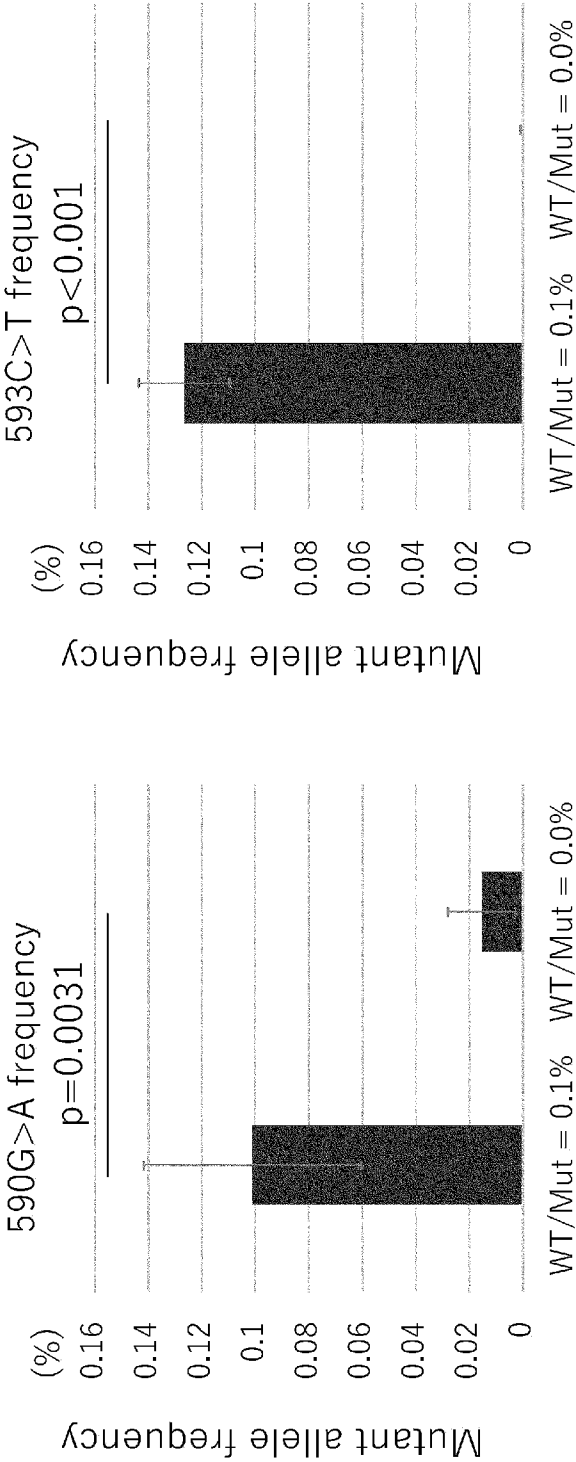
請求の範囲

- [請求項1] 検体における膀胱癌の存在を検出するためのプライマーセットであって、
- PLEKHS1 プロモーターの変異を標的とする、16塩基長以上で且つ21塩基長以下のオリゴヌクレオチドである1対のプライマーと、
- TERT プロモーターの変異を標的とする、1又は複数の対のプライマーと、
- を含む、プライマーセット。
- [請求項2] PLEKHS1 プロモーターの変異が、10番染色体の115, 511, 590位におけるGからAへの置換、10番染色体の115, 511, 593位におけるCからTへの置換又はその両方である、請求項1に記載のプライマーセット。
- [請求項3] PLEKHS1 プロモーターの変異を標的とするプライマーが配列番号1及び／又は2に記載の塩基配列を有する、請求項1又は2に記載のプライマーセット。
- [請求項4] TERT プロモーターの変異を標的とするプライマーが、5番染色体の1, 295, 228位におけるCからTへの置換、5番染色体の1, 295, 250位におけるCからTへの置換又はその両方である、請求項1～3のいずれか一項に記載のプライマーセット。
- [請求項5] 検体における膀胱癌の存在を検出するためのプローブであって、PLEKHS1 プロモーターの変異を標的とする、プローブ。
- [請求項6] プローブが配列番号4又は5に記載の塩基配列を有する、請求項5に記載のプローブ。
- [請求項7] 請求項1～4のいずれか一項に記載のプライマーセットを含む、キット。
- [請求項8] 請求項5又は6に記載のプローブを更に含む、請求項7に記載のキット。

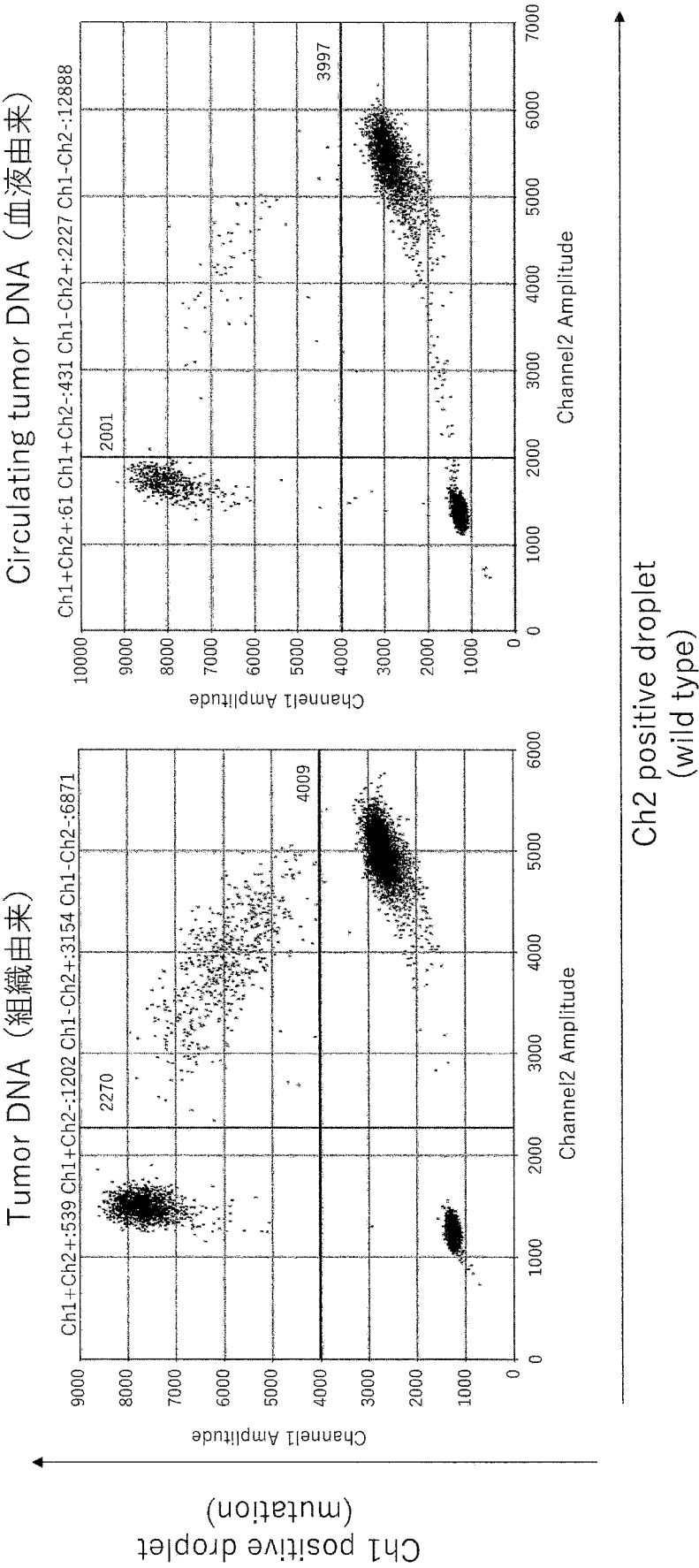
- [請求項9] 検体における膀胱癌の存在を検出するための方法であって、請求項1～4のいずれか一項に記載のプライマーセット、あるいは請求項5又は6に記載のプローブを用いてPLEKHS1プロモーターの変異を検出する工程を含む、方法。
- [請求項10] 検出工程で使用される核酸増幅法がデジタルPCRである、請求項9に記載の方法。
- [請求項11] 検体が液性検体である、請求項9又は10に記載の方法。
- [請求項12] 検体が血中循環DNA（cfDNA）を含む、請求項9～11のいずれか一項に記載の方法。

[図1]

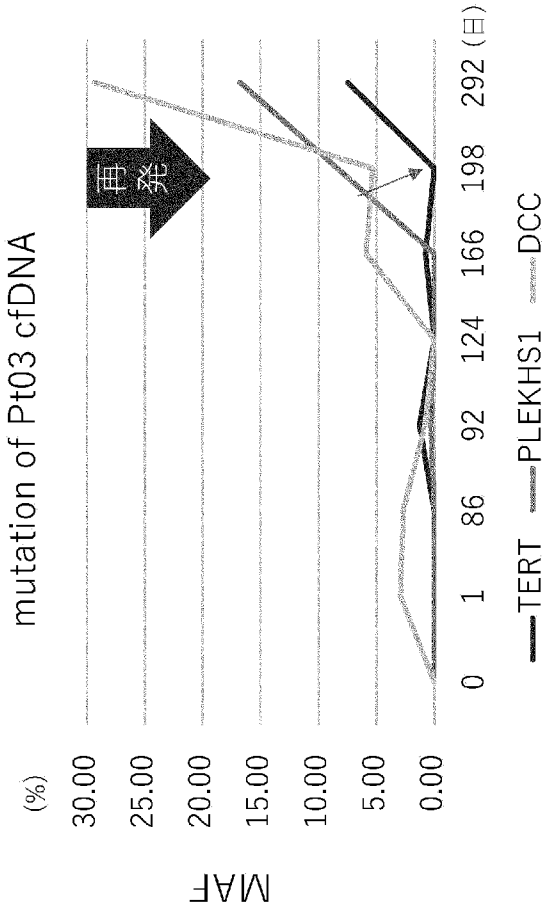
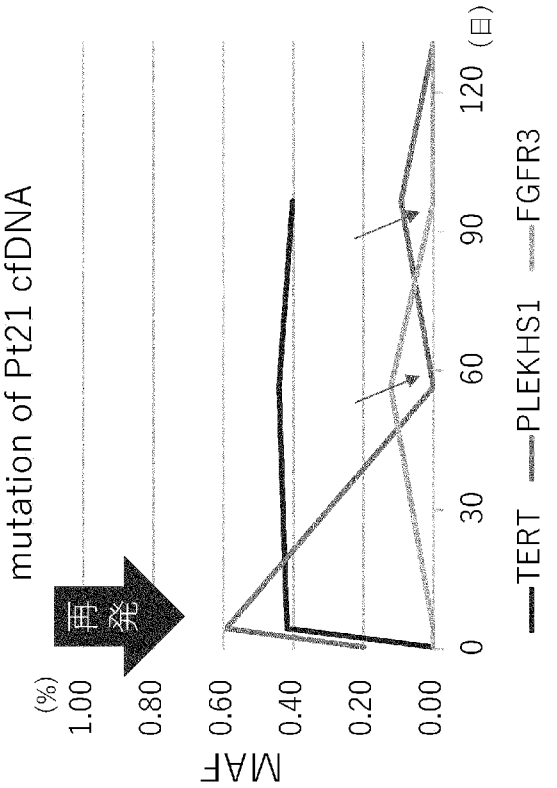
PLEKHS1変異型		PLEKHS1 590G>A		PLEKHS1 593C>T	
プラスミド	野生型	変異型	変異型	野生型	変異型
検出精度	99.98 %	100.00 %	100.00 %	99.99 %	100.00 %



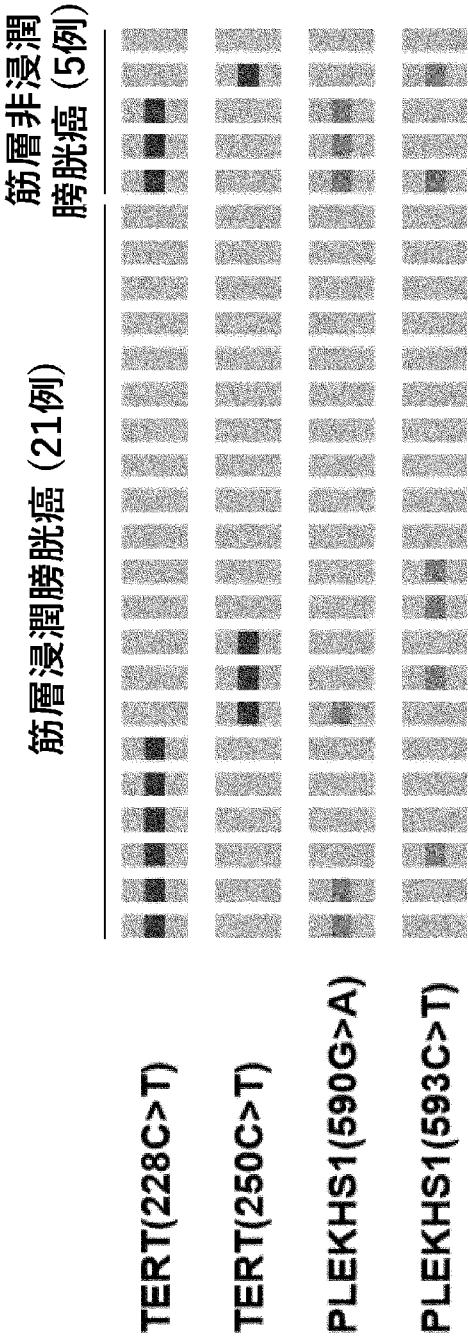
[図 2]



[図3]



[図4]



膀胱癌の場合	TERTのみ	TERT + PLEKHS1
少なくともいずれかでフォロー可	50.0%(13例/26例)	57.7%(15例/26例)
複数のホットスポットでフォロー可	0%(0例/26例)	34.6%(9例/26例)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/002178

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*C12N 15/09*(2006.01)i; *C12Q 1/686*(2018.01)i; *C12Q 1/6886*(2018.01)i

FI: C12N15/09 Z ZNA; C12Q1/686 Z; C12Q1/6886 Z

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09; C12Q1/686; C12Q1/6886

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023

Registered utility model specifications of Japan 1996-2023

Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WU, S. et al. Whole-genome sequencing identifies ADGRG6 enhancer mutations and FRS2 duplications as angiogenesis-related drivers in bladder cancer. Nature Communications. 2019, vol. 10, no. 720, DOI: 10.1038/s41467-019-08576-5 summary, first paragraph of section "Recurrent noncoding mutations and their affected genes."	1-12
P, A	BAXTER, L. et al. Properties of non-coding mutation hotspots as urinary biomarkers for bladder cancer detection. Scientific reports. 19 January 2023, vol. 13, no. 1060, DOI: 10.1038/s41598-023-27675-4 entire text	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 April 2023

Date of mailing of the international search report

25 April 2023

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)

3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915

Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/002178

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

“The form of Annex C/ST.25 text file” above shall read as “the form of ST.26.”.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/09(2006.01)i; C12Q 1/686(2018.01)i; C12Q 1/6886(2018.01)i FI: C12N15/09 Z ZNA; C12Q1/686 Z; C12Q1/6886 Z														
B. 調査を行った分野														
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/09; C12Q1/686; C12Q1/6886														
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2023年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2023年	日本国実用新案登録公報	1996-2023年	日本国登録実用新案公報	1994-2023年				
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2023年													
日本国実用新案登録公報	1996-2023年													
日本国登録実用新案公報	1994-2023年													
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）														
C. 関連すると認められる文献														
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号												
X	WU, S. et al., Whole-genome sequencing identifies ADGRG6 enhancer mutations and FRS2 duplications as angiogenesis-related drivers in bladder cancer, Nature Communications, 2019, Vol.10, No.720, DOI: 10.1038/s41467-019-08576-5 要旨、"Recurrent noncoding mutations and their affected genes."の項の第一段落	1-12												
P, A	BAXTER, L. et al., Properties of non-coding mutation hotspots as urinary biomarkers for bladder cancer detection, Scientific reports, 2023.01.19, Vol.13, No.1060, DOI: 10.1038/s41598-023-27675-4 全文	1-12												
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</td> <td>"&" 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	"&" 同一パテントファミリー文献	"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	
* 引用文献のカテゴリー	"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの													
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの													
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの													
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	"&" 同一パテントファミリー文献													
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献														
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献														
国際調査を完了した日 12. 04. 2023	国際調査報告の発送日 25. 04. 2023													
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 井関 めぐみ 4B 5574 電話番号 03-3581-1101 内線 3448													

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。