

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5537804号
(P5537804)

(45) 発行日 平成26年7月2日(2014.7.2)

(24) 登録日 平成26年5月9日(2014.5.9)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 A

G O 1 N 33/574 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 F

G O 1 N 33/574 A

請求項の数 18 (全 86 頁)

(21) 出願番号 特願2008-505707 (P2008-505707)
 (86) (22) 出願日 平成18年4月18日 (2006.4.18)
 (65) 公表番号 特表2008-536496 (P2008-536496A)
 (43) 公表日 平成20年9月11日 (2008.9.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2006/000652
 (87) 国際公開番号 W02006/111029
 (87) 国際公開日 平成18年10月26日 (2006.10.26)
 審査請求日 平成21年4月10日 (2009.4.10)
 (31) 優先権主張番号 60/672,016
 (32) 優先日 平成17年4月18日 (2005.4.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/721,522
 (32) 優先日 平成17年9月29日 (2005.9.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 507343316
 ミトミクス インコーポレーテッド
 カナダ国 ビー7エイ 7ティー1 オン
 タリオ, サンダー ベイ, マンロー スト
 リート 290, スイート 1000
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (72) 発明者 パー, ライアン
 カナダ国 ビー7ジー 1ジェイ5 オン
 タリオ, サンダー ベイ, ハットン パー
 ク ドライブ 1282

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 日光曝露、前立腺癌および他の癌の検出用の診断ツールとしての、ミトコンドリアの突然変異および再配置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ミトコンドリアDNA(mtDNA)を有する被験体における、ヒトmtDNAゲノムのヌクレオチド10744~14124に渡る前立腺癌と関連する3379塩基対(bp)の欠失を検出する方法であって、前記欠失が、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4L、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット5、tRNAヒスチジン、tRNAセリン2及びtRNAロイシン2をコードする遺伝子を実質的に含み、前記方法が前記被験体由来の生物学的サンプルにおいて前記mtDNA中の前記欠失の存在を検出することを含む、前記方法。

【請求項 2】

前記欠失が、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4L、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット5、tRNAヒスチジン、tRNAセリン2及びtRNAロイシン2をコードする遺伝子を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

mtDNA中の欠失の存在を検出するステップが、欠失特異的PCR分析、放射性PCR分析、定量的PCR、リアルタイムPCR分析及びTaqMan-PCRTMから成る群より選択されるPCR分析を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記PCR分析がRoche Faststart TaqTMの使用を含む定量的PCRである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

10

20

配列番号 1 3 9 に示される核酸配列を有するPCRプライマーをフォワードプライマーとして使用する、請求項 3 又は 4に記載の方法。

【請求項 6】

前記方法を、前立腺癌、前立腺癌に対する素因又は前立腺癌の進行を検出するためのin vitroでのデータ収集において使用する、請求項 1 ~ 5のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

1以上の核酸メンバーと固相基盤を有するアレイであって、少なくとも1つの前記核酸メンバーがヒトmtDNAゲノムのヌクレオチド10744~14124に渡る3379塩基対(bp)の欠失を有するヒトmtDNAの部分に特異的に結合する核酸配列を有し、前記欠失が、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4L、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット5、tRNAヒスチジン、tRNAセリン2及びtRNAロイシン2をコードする遺伝子を実質的に含み、前記部分が、前記欠失が生じた接合部を含み、前記少なくとも1つの核酸メンバーが前記アレイ上に固有の位置を有し、且つ固相基盤と安定的に結合している、前記アレイ。

10

【請求項 8】

前記少なくとも1つの核酸メンバーがプローブである、請求項 7に記載のアレイ。

【請求項 9】

前立腺癌を検出するためのin vitroでのデータ収集におけるバイオマーカーとしての、ヒトmtDNAゲノムのヌクレオチド10744~14124に渡る3379塩基対(bp)の欠失を有するmtDNAの使用であって、前記欠失が、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4L、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット5、tRNAヒスチジン、tRNAセリン2及びtRNAロイシン2をコードする遺伝子を実質的に含む、前記使用。

20

【請求項 10】

前記mtDNAを、前立腺癌若しくは前立腺癌に向かう進行を有する被験体又は前立腺癌を有しない被験体における悪性組織、隣接良性組織、遠位良性組織、前駆病巣、前立腺マッサージ体液、尿、直腸指診後の尿又は血液において検出する、請求項 9に記載の使用。

【請求項 11】

前立腺腫瘍の三次元的なマッピング方法であって、六ヶ所針生検サンプルにおいてヒトmtDNAゲノムのヌクレオチド10744~14124に渡る3379塩基対(bp)の欠失の不在又は存在を検出することを含み、前記欠失が、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4L、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット5、tRNAヒスチジン、tRNAセリン2及びtRNAロイシン2をコードする遺伝子を実質的に含む、前記方法。

30

【請求項 12】

請求項 7 又は 8に記載のアレイと、

使い捨てチップ、該使い捨てチップの固定手段、mtDNAの抽出手段、プライマー、試薬及び使用説明書から成る群より選択される少なくとも1つのメンバーと、を含む、前立腺癌診断用キット。

【請求項 13】

前立腺癌を検出するためのin vitroでのデータ収集における、請求項 1 2に記載のキットの使用。

40

【請求項 14】

配列番号 1 3 9 に示される核酸配列を有するプライマーと前立腺組織検査用説明書とを含む前立腺癌診断用キット。

【請求項 15】

前立腺癌を検出するためのin vitroでのデータ収集における、請求項 1 4に記載のキットの使用。

【請求項 16】

生検サンプルの陽性前立腺癌生検検査を肯定又は否定するためのin vitroでのデータ収集方法であって、前記生検サンプルにおいてヒトmtDNAゲノムのヌクレオチド10744~14124に渡るヒトmtDNAの3379塩基対(bp)のセグメントの不在又は存在のそれぞれを検出するこ

50

とを含み、前記セグメントが、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4L、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット5、tRNAヒスチジン、tRNAセリン2及びtRNAロイシン2をコードする遺伝子を実質的に含む、前記方法。

【請求項 1 7】

ヒトmtDNAゲノムのヌクレオチド10744～14124に渡る3379塩基対(bp)の欠失を含むmtDNAのセグメントを増幅するためのフォワードプライマーとリバースプライマーとを含む前立腺癌診断用キットであって、前記欠失が、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4L、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット5、tRNAヒスチジン、tRNAセリン2及びtRNAロイシン2をコードする遺伝子を実質的に含む、前記キット。

【請求項 1 8】

前立腺癌を検出するためのin vitroでのデータ収集における、請求項 1 7に記載のキットの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はミトコンドリアゲノミックスの分野に関する。特に本発明は、ミトコンドリアゲノムにおける突然変異および再配置、ならびに日光曝露、老化、および疾患の発生または存在の指標としてのその用途、例えば一般的な臨床症状が明らかになる前の潜在的悪性腫瘍に向かう進行、新形成、および前新形成の存在の検出に関する。

【背景技術】

【0002】

生物科学における現在の巨大潮流はヒトゲノム計画であり、そのデータの商用利用である。しかし、このデータが個体レベルまで具体的ではないことから、この情報の利用と実施には特殊な制限がある。信じがたいことに、そのデータはわずか数人の個人由来のものであり、ヒト集団に存在するバリエーションを代表するにはほど遠く、それ故そのデータは一般的応用にのみ有用である。ヒトゲノムの驚異的な複雑性は、個人レベルでの応用を非実用的なものにしてしまう。1つのヒト核ゲノムを完全に配列決定するために、米国エネルギー省および米国国立衛生研究所は1988以来、25億ドルを投資してきた(<http://www.ornl.gov/hgmis/project/budget.html>)。

【0003】

ミトコンドリアゲノム

ミトコンドリアゲノムは、コンパクトながらも極めて重要な核酸の配列である。ミトコンドリアゲノムは、細胞呼吸に必要な酵素サブユニットをコードする。ミトコンドリアDNA、すなわち「mtDNA」は16,569塩基対(bp)の核酸の微小なゲノムであり(Anderson ら, 1981; Andrews ら, 1999)、これは33億bpの巨大な核ゲノムと対照的である。その遺伝性の実体物は、核にある細胞中の対比物のそれと比較して桁外れに小さい(0.0005%)。しかし、個々の細胞は、具体的な細胞性機能に応じて $10^3 \sim 10^4$ 個のミトコンドリアを有する(Singh and Modica-Napolitano 2002)。核とミトコンドリアのゲノム間では、情報伝達または化学的シグナル伝達がルーチンに行われる(Sherratt ら, 1997)。その上、特定の核成分が、ミトコンドリア配列の維持と完全性に関与する(Croteau ら, 1999)。こうした核のエリアが潜在的疾患の兆候である核再配置により非機能的になると、mtDNA配列に突然変異が出現し始める。さらに、特定のミトコンドリアは、ミトコンドリアゲノム中の体細胞変異により促進される欠失による細胞内破壊ゆえに同定されうる。この理論的機構は迫り来る疾患の指標としての役割も果たしうる。1つのミトコンドリアを形成するのに約3,000個の遺伝子が必要であるが、このうち37個のみミトコンドリアゲノムによりコードされ、このことはミトコンドリアの核遺伝子座に対する強い依存を示す(Naviaux, 1997)。

【0004】

ある個体におけるすべてのミトコンドリアDNA (mtDNA)ゲノムは、受精が行われると、卵子内のミトコンドリアのクローン性増殖を前提として、同一である。mtDNAの本質的な役割は細胞の燃料であるアデノシン三リン酸(ATP)の生成であり、これが細胞の代謝を発

10

20

30

40

50

火させる。意義深いことに、ミトコンドリアゲノムは、この生命に必須の機能に必要な酸化および還元反応を行うために、70の核コードタンパク質に依存し、さらにミトコンドリアゲノムにより供給される13種のポリペプチドに依存する(Leonard and Shapira, 1997)。種々の組織や臓器は、様々な度合いで酸化的リン酸化に依存する。酸化的リン酸化(OXPHOS)不全に関連する疾患はmtDNA突然変異と密接に関連しているようである(Byrne, 1992)。mtDNA突然変異の重症度の増大に起因してOXPHOSが減少するにしたがい、臓器特異的エネルギー閾値が超過され、このことは種々の臨床表現型をもたらす。その上、ミトコンドリアゲノムにおける突然変異は、種々の慢性の変性疾患に関与している(Gattermann ら 1995)。老化および特定の種類の病理が、mtDNAを変更または変異させ、細胞のエネルギー生産力を損なわせうことはよく知られている。このことは多くの場合、不全性ミトコンドリアの過剰発現をもたらし、および/または、細胞がより解糖性になることによりATPの欠乏を補完することを引き起こし(Carew and Huang, 2002)、そのため、ミトコンドリアゲノムにおける変化または変異は、間隔を置いて逐次的にモニタリングしたときには、疾患発症および/または疾患進行用のマーカーとして使用することができる。

【0005】

最近になって、Fliss ら (2000)は、肺癌および膀胱癌からの原発性腫瘍から高頻度のmtDNA突然変異を発見したが、それらは本質的に大部分がホモプラズミック(homoplasmic)であり、変異型mtDNAが悪性細胞において支配的であることが示唆された。点突然変異および欠失は、ミトコンドリアの膜およびゲノムへの酸素フリーラジカルダメージの、プログラムされたものではないにせよ不可避の副作用であるようだ(Miquel ら 1992)。この理論がもっともらしいのは、ミトコンドリアゲノムが、保護性のヒストンを欠くのみならず、酸素を生成するミトコンドリア内膜付近に存在するため、酸化的ダメージにより傷つけられやすいからである。その上、mtDNAはコンパクトなゲノムを有し、かつイントロンを欠くため、有害なイベントはコード配列に影響を及ぼし、その結果、生化学的機能不全を引き起こす可能性が高い。この機能不全は細胞の酸化的ストレスをさらに増大させ、それが核のおよびmtDNAの損傷をもたらし、そのことにより細胞が癌化工程に入る可能性を上昇させる(Penta ら, 2001)。これに関連して、研究からは、年齢の増加に伴いmtDNAダメージが増加し(Cortopassi & Wang 1995)、その後呼吸機能の低下があり(Miquel ら 1992)、最終的には細胞死がもたらされることが示されている。

【0006】

診断ツールとしてのMtDNA

MtDNA配列ダイナミクスは重要な診断ツールである。mtDNA中の突然変異は、多くの場合に疾患発症の予備的指標であり、多くの場合に核の突然変異と関連しており、疾患に特に関連するバイオマーカーとして振る舞うが、そうした疾患としては次のものが挙げられるがこれらに限らない。すなわち、喫煙および副流煙への曝露からの組織損傷および癌 (Lee ら, 1998; Wei, 1998); 20歳前後から始まりその後増大するミトコンドリアゲノム突然変異の蓄積に基づく長寿 (von Wurmb, 1998)、突然変異または発癌性物質、変異原性物質、紫外線放射への曝露により引き起こされる転移性疾患 (Birch-Machin, 2000)、変形性関節症; 心血管疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病 (Shoffner ら, 1993; Sherratt ら, 1997; Zhang ら, 1998)、老化に伴う聴力損失(Seidman ら, 1997)、視神経変性および不整脈 (Brown ら, 1997; Wallace ら, 1988)、慢性進行性外眼眼球突出性眼筋麻痺 (chronic progressive external exophthalmoplegia) (Taniike ら, 1992)、アテローム硬化症 (Bogliolo ら, 1999)、甲状腺乳頭状癌および甲状腺腫瘍(Yeh ら, 2000); およびその他の疾患(例えばNaviaux, 1997; Chinnery and Turnbull, 1999;)。

【0007】

ミトコンドリアゲノムの特定の部位における突然変異は、特定の疾患と関連する。例えば、4216、4217および4917における突然変異はレーバー遺伝性視神経萎縮 (LHON)と関連している (Mitochondrial Research Society; Huoponen (2001); MitoMap)。15452における突然変異は、5/5患者において、ユビキノールシトクロームcレダクターゼ(複合体III)不全と関連することが発見された(Valnot ら1999)。しかしながらこれらの部位における

突然変異が前立腺癌と関連することは見出されなかった。

【 0 0 0 8 】

具体的には、こうした変更としては、点突然変異(トランジション、トランスバージョン)、欠失(1～数千の塩基)、逆位、重複(1～数千の塩基)、組換えおよび挿入(1～数千の塩基)が挙げられる。さらに、特定の塩基対の変更、欠失またはその組み合わせは、前立腺癌、皮膚癌および肺癌の早期発症、ならびに老化(例えばPolyakら, 1998)、早期老化、発癌性物質への曝露(Leeら, 1998)などと関連している。

【 0 0 0 9 】

mtDNAはもっぱら卵子を介して子孫に伝えられることから、この遺伝の手段をとおしてミトコンドリア配列を理解することが肝要である。mtDNAの配列は母方の血統で大きく異なり(Wardら, 1991)、それ故に疾患に関連する突然変異は、このような変化との比較において明確に理解されなければならない。例えば、複数の個体の配列において見られ、特定の癌と関連している、ある具体的なTからCへのトランジションは、実際には、ある特定の地理的地域に広がる母方の血統のまたは民族性に関連している天然のバリエーションでありうる。例えば、先住北米インディアンは異常に高頻度の成人発症糖尿病を示す。その上、すべて北米インディアン先住民は、5つの基本的な母方の血統、すなわちA、B、C、D、およびXにより遺伝的特徴付けされている(Schurrら, 1990; Stone and Stoneking, 1993; Smithら, 1999)。血統Aはミトコンドリアゲノム中のbp 663におけるHae III部位を生じる単一の点突然変異により識別されるが、しかしながら、この突然変異と糖尿病の成人発症との間に因果関係はない。さらに、血統クラスター内にも配列バリエーションは存在する。

【 0 0 1 0 】

ある特定の血統に関連している特定のマーカーとは別に、集団間配列バリエーションよりも多くの集団内バリエーションがある(Eastonら, 1996; Wardら, 1991, 1993;)。疾患関連突然変異の最適な同定のためにはこの多様性を理解する必要がある、それ故、疾患に関連しない突然変異と対比して疾患と直接関連する突然変異を同定するためには、縦断的研究(すなわち相当な期間被験体をトラッキングすること)の長所を模倣する母系研究アプローチ(Parsonsら, 1997)を使用する必要がある。その上、特定の物質(例えば副流煙、低レベルのアスベスト、鉛、などいずれも変異原性物質として知られており多くの環境に低レベル存在する)は特定の点突然変異の原因であり得るが、その点突然変異が必ずしも疾患特異的マーカーであるとは限らない。それ故、自然の過程としての、または原因物質への曝露を介した潜在的疾患の正確な予測のためには、実質的なmtDNA配列データベースは明らかに必要条件である。さらに、その全情報内容のために分子全体を配列決定する必要がある。点突然変異(トランジション、トランスバージョン)、欠失(1～数千の塩基)、逆位、重複(1～数千の塩基)、組換えおよび挿入(1～数千の塩基)の一式全体は、ミトコンドリアゲノム全体に渡り、一まとめとして特徴付けする必要がある。このことはミトコンドリアゲノム内の利用可能な全てのありうる情報が捕捉されることを保証する。細胞質のミトコンドリアのゲノム(16,569bp)は個体レベルでは配列決定されたが、その核の対照物と同様に、ミトコンドリアゲノムは、診断ツールとして使用するために集団レベルで配列決定されたわけではない。

【 0 0 1 1 】

最近になって、ミトコンドリアは、アポトーシスおよび腫瘍生物学の他の側面におけるその役割故に、発癌過程において関与していることが示され(Green & Reed, 1998, Pentaら, 2001)、特にmtDNA (mtDNA)の体細胞突然変異が数種のヒト腫瘍において観察された (Habanoら 1998; Polyakら 1998; Tamuraら 1999; Fliss,ら 2000)。こうした後者の知見は、その具体的なmtDNA突然変異がホモプラスミックのようであるとの主張(Habanoら 1998; Polyakら 1998; Fliss,ら 2000)によりさらに興味深いものとなった。さらに研究者達は、紫外線放射(UV)が非黒色腫皮膚癌(NMSC)の発病および病理に重要であること(Weinstock 1998; Rees, 1998)およびUVがヒト皮膚においてmtDNA損傷を誘発すること(Birch-Machin, 2000a)を発見した。

【 0 0 1 2 】

その上、時と共に、ミトコンドリアの配列は完全性を失う。例えば、4977bp欠失の頻度が年齢と共に増加する(Fahnら, 1996)。20歳から始まって、この欠失は少数のミトコンドリアにおいて生じ始める。80歳までには、相当な数の分子が欠失される。この欠失は通常の老化プロセスを特徴付けるものであり、そのためこのプロセスのバイオマーカーとして役立つ。この老化プロセスの定量は、医療または他の介入によりこのプロセスを鈍らせることを可能に示う。

【 0 0 1 3 】

mtDNAは主に集団遺伝学およびより最近では科学捜査におけるツールとして使用されてきたことから、上記のような医療へのミトコンドリアゲノミックスの応用は見過ごされてきた。しかしながら、mtDNAの情報内容が医療診断の分野において重要な用途をなすことがますます明らかになりつつある。その上、mtDNAの実体全体を配列決定することは、大容量、高スループットのロボットDNA配列決定システムの最近の出現より前には骨の折れる仕事であった。さらに、集団遺伝学は制御領域中の2箇所の高度に可変性の領域から有為のデータを集めることができたものの、これらの小さな領域はゲノム全体の極一部分(10%未満)にしか相当せず、このことは、データの識別力の90%が未使用のままであることを意味する。意義深いことに、多くの疾患関連変異は制御領域の外側にある。正確かつ識別力の高い診断のためには、ゲノム全体の特徴は、全ての配列情報を含めて考慮されるべきである。

【 0 0 1 4 】

非黒色腫皮膚癌

ヒト非黒色腫皮膚癌(NMSC)は多くの白人集団において最もありふれた癌である (Weinstock, 1998; Rees, 1998)。こうした腫瘍の大部分は基底細胞癌(BCC)および扁平上皮癌(SCC)である。BCCは局所浸潤性であり、著しい病的状態を引き起こしうが転移は希である。SCCは有意な転移能を示し、免疫抑制患者における多数のNMSCの発生は重大な疾患管理問題を引き起こす(Rees, 1998)。BCCについては臨床的に同定された前悪性病巣は無いものの、一部のSCCは、前駆病巣、すなわち光線角化症(AK)またはボーエン病の領域 (in situ癌腫)(Rees, 1998)から生じると考えられている。

【 0 0 1 5 】

SCCはヘテロ接合性の喪失を示しこれは複数の染色体に影響を及ぼすが、このことは、SCCの発症における複数の腫瘍抑制遺伝子の関与を示唆する。興味深いことに、AKにおいては、SCCと比較して、等しいまたはより大きい度合いの遺伝的喪失がこうした前駆病巣において観察される(Rehmanら 1994; Rehmanら 1996)。このことは、SCCの発症において、腫瘍抑制遺伝子の不活性化の他に、別の機構が関与している可能性があることを示唆するため、提供する本発明において重要である。

【 0 0 1 6 】

腫瘍発生におけるミトコンドリアの役割が最初に仮説として提唱されたのは、腫瘍細胞が機能の損なわれた呼吸系を有した高い解糖活性を有することが発見されたときである(Shay & Werbin, 1987)。ミトコンドリアのアポトーシスにおける役割を解明した最近の知見(Green & Reed, 1998)、それと合わせて結腸癌(Habanoら 1998; Polyakら 1998、Pentaら, 2001に概説)、膀胱、首および肺の原発性腫瘍(Flissら 2000)、ならびに胃癌(Tamuraら 1999)における高い出現率のホモプラスミックmtDNA突然変異は、さらにこの仮説を支持する。さらに、こうしたミトコンドリア突然変異が、高度にミトジェン性であることの示されている活性酸素種(ROS)のレベルに影響を及ぼしうることが提唱されている(Polyakら 1998; Liら 1997)。

【 0 0 1 7 】

本発明者らおよび他の者による以前の研究からは、mtDNA中の突然変異およびそれに伴うミトコンドリア機能不全が、ヒト変性疾患の重要な寄与因子であること (Birch-Machinら 1993; Chinneryら 1999; Birch-Machinら 2000b)が示されている。これは、ミトコンドリア器官内で産生されるROSの量が多いこと、それと相まって保護的なヒストンが欠如

していることおよび細胞核と比較してmtDNAの修復率が低いこと(Pascucciら 1997; Sawyer & van Houten; LeDouxら1999)ゆえに、ミトコンドリアゲノムが突然変異を特に受けやすいためである。実際に、mtDNAの突然変異率は、核DNAのそれよりも約10倍高い(Wallace, 1994)。最近のヒト腫瘍研究において同定されたmtDNA突然変異の大部分は、ROS由来変異原性物質への曝露の可能性を示唆している。このことはNMSCにおけるmtDNA突然変異の調査において重要である。なぜならば、UV誘発ROSが、ヒト皮膚細胞におけるmtDNA欠失の発生に直接関与している証拠が最近発見されたからである(Berneburgら 1999, Lowesら, 2002)。さらに、保護性色素沈着を有しないまたは遺伝性素因のない個体におけるNMSCの主要な決定要因はUVである(Weinstock, 1998)。SCCの推定上の前駆病巣はまた、常に日光曝露される部位において主に見出される。このことが重要なのは、Birch-Machin研究室による研究が、種々の日光曝露された身体部位から得られた皮膚中のミトコンドリアDNA損傷の発生率の明確な違いを示したためである。損傷の大部分は、常に日光曝露される部位に存在する(Krishananら, 2002)。

【0018】

本発明者らのうちの一人は、UV曝露がmtDNA損傷を誘発することを定量的に示した最初の人である(Birch-Machinら 1998)。分子マーカーとしてのMtDNAを使用して、ヒト皮膚における時系列的老化と光による老化の関係が検討された。3-プライマー定量PCR (qPCR)法を使用して、4977 bp-欠失型mtDNAと野生型mtDNAの比の変化を、ヒト皮膚の日光曝露および時系列的年齢について調べた。日光保護された部位(1.1% [1/90])と比較して、日光曝露された部位(27%、[27/100])では、高レベル(すなわち>1%)の4977bp-欠失型mtDNAの発生率の有意な増加が見られた(フィッシャーの直接確率検定、 $P<0.0001$)。したがって、mtDNAの欠失または突然変異は、累積的紫外線放射曝露のマーカーとして有用でありうる。

【0019】

さらに、チミンダイマーに対するモノクローナル抗体を用いたサウス-ウェスタンブロット手法を用いた研究は、精製mtDNAにおけるUV誘発損傷の存在の直接的な証拠をもたらした(Rayら 1998)。

【0020】

発明者らの研究グループによる最近の研究は、UV曝露に続発するmtDNAの全体的な欠失スペクトルを決定するために、長型伸長PCR (LX-PCR)技術を用いてミトコンドリアゲノム全体を増幅した(Rayら 2000)。表皮が下に横たわる真皮と分かれているところにおける、71の分割皮膚サンプルの長型PCR分析が日光曝露に関連して行われた。表皮におけるUV曝露の増加に伴い、欠失の数が有意に増加した(Kruskal-Wallis検定、 $p=0.0015$)。表皮におけるこの知見は、やはり長型PCR技術により検出されるmtDNA欠失の年齢依存性増加と混同されたものではない。同定された欠失の巨大なスペクトルは、UV曝露に伴う、mtDNAの高い突然変異量とその遍在的性質を浮き彫りにする。競合PCRを用いた単一欠失の検出と比較して、この研究は、長型PCRが感度のよい技術であり、そのため、皮膚における全mtDNA損傷の、定量的ではないまでも、より包括的な指標を提供しうることを示す。本発明者らのうちの一人による上記の研究は、mtDNAがUVの重要な標的であることを明確に示しており、またこのことと併せて皮膚疾患におけるミトコンドリアの役割が最近概説された (Birch-Machin, 2000)。

【0021】

UV感受性とヒト皮膚癌との主要な共変成分であるヒト毛髪および皮膚の色素沈着が調査された。こうした調査は、皮膚癌の易罹患性について、メラノコルチン1受容体遺伝子の変異体と個体および集団の日光感受性の関連性に重点を置いた(Smithら 1998; Healyら 1999; Flanaganら 2000; Healyら 2000; Hardingら 2000; Flanaganら, 2002)。しかしながらこうした研究は、特定の種類の皮膚および/または毛髪の色についての、mtDNA配列の集団レベルでのバリエーションを取り上げていない。

【0022】

ヒトの腫瘍におけるmtDNA突然変異の最近の研究において未だにほとんど答の得られて

10

20

30

40

50

いない大きな疑問の一つは、こうした腫瘍との関連でのミトコンドリアゲノムの欠失の発生率である。これが回答されるべき重要な疑問であるのは、一人の患者のヒト皮膚の予備的研究から、複数種の腫瘍(AKおよびSCC)と正常皮膚とで、共通mtDNA欠失の発生率の相違が示された(Pangら 1994)からである。なお、発明者ら自身による予備的データも、mtDNA欠失の数が、正常皮膚と比較して腫瘍において増加していることを示している。最後にBirch-Machinらは、mtDNA欠失、ならびに重複の発生率が、UV曝露の上昇と共に増大することを示した(Berneburgら 1999; Birch-Machinら 1998; Rayら 1998; Rayら 1999; Rayら 2000), Lindseyら, 2001; Birch-Machinら, 2001; Lowesら, 2002, Krishnanら, 2002)。

【0023】

腫瘍進行に関連する疑問とは別に、ヒト腫瘍中のmtDNAの最近の研究において、他の極めて重要な疑問がほとんど未回答のまま残されている(Habanoら 1998; Fiissら 2000)。第1に、技術的制限ゆえに、ヘテロプラズミー(heteroplasmy)の変化するレベルが重要な疾患遷移(transition)をも示しうることから、これらのmtDNA突然変異が真にホモプラズミックなものであるのか否かが明確ではないこと(Habanoら 1998; Polyakら 1998; Fiiss, ら 2000)、第2にある研究(Tamuraら 1999)は別として、mtDNA欠失の発生率とそれらのNMSCのための潜在的バイオマーカーとしての役割は調査されていない。研究者達は、共通欠失に着目し、残りの100程度の欠失を無視している。その上、調査する者は、突然変異の定量ではなくその同定に着目してきた。mtDNA損傷のATP産生およびその結果としての細胞機能に対する閾値効果ゆえに、欠失の発生率を定量的な様式で正確に評価することは重要である。加えて、欠失は特徴付けすることが困難である。

【0024】

典型的に使用される長型PCRは、欠失のラダーを生じ、次いでそれらを特徴付けする必要がある。

【0025】

NMSCの現在の診断は、切除組織の病理学的評価による。したがって、個体をNMSCに罹り易くする、UV誘発DNA損傷の早期マーカーが必要である。また、早期検出を可能にし、診断的に正確である、遺伝学に基づく診断ツールが必要とされている。

【0026】

前立腺癌

前立腺癌は頻繁に診断される固形癌であり、ほとんどの場合、前立腺上皮を起源とする(Huangら 1999)。1997年には、ほぼ1千万人の米国人男性が、前立腺特異的抗原(PSA)(その存在は前立腺癌を示唆する)についてスクリーニングされた(Woodwell, 1999)。実に、このことは、より多くの数の男性が初期直腸指診(DRE)によりスクリーニングされることを示す。同じ年に、3千百万人の男性がDREを受けた(Woodwell, 1999)。その上、合衆国における新たに前立腺癌と診断される年間件数は179,000と推定される(Landisら, 1999)。前立腺癌は、カナダ人男性において2番目に多く診断される癌であり2番目に多い癌死亡率の原因である。1997に前立腺癌は、カナダ人男性の新たに診断される癌の19,800を占めた(28%) (National Cancer Institute of Canada)。四十九歳(49)を超える全ての男性の30%~40%が何らかの癌性の前立腺細胞を有するものの、こうした男性のわずか20%~25%が臨床的に顕在化した形態の前立腺癌を有すると推定されている(SpringNet - CE Connection, internet, www.springnet.com/ce/j803a.htm)。前立腺癌は広範な組織学的挙動を示し、それは内因性の(erogenous)および外因性の因子の両方、すなわち社会経済的状況、食事、地理学的、ホルモン失調、家族歴および遺伝的構成に関係する(Konishiら 1997; Haywardら 1998)。

【0027】

リスクの観点からは「家族性(familial)」と「遺伝性(hereditary)」の前立腺癌は同義語とはみなされない。家族性の癌とは、家族内で発生するが、遺伝で受け継がれるものではない癌を言う。この形態は最大で前立腺癌の25%を占める(Walsh & Partin, 1997)。遺伝性とは、誘発性遺伝子がメンデル性遺伝する前立腺癌のサブタイプを言い、報告される事例の約9%を占める。この疾患についての前立腺癌の陽性の家族歴は、こうした誘発性遺

伝子が前立腺癌の発症と進行に重要な役割を果たすことを示唆する。最近になって、染色体1および染色体X上の易罹患性遺伝子が男性を前立腺癌に罹りやすくすることが同定され、遺伝性の癌の病因学へのさらなる洞察がもたらされた(Berthonら、1998; Xuら 1998)。

【0028】

前立腺癌予後は、主に、診断時の腫瘍の段階と悪性度に依存する。局所前立腺癌のみが放射線療法で治癒されうる。標準的な検知は依然として、直腸指診、PSA検査および前立腺生検組織の組織学的検査に依存している。悪性度を確認するためにはある量についての生検法が使用されるが、これは早期検出法ではない。残念ながら、一部の早期腫瘍は直腸指診中に同定することは不可能である。PSA検査は、特異性が60~70%であり感度が70~80%である(私的交換情報、Dr. Sunil Gulavita, Northwestern Ontario Cancer Centre)。一般的な組織学的悪性度の腫瘍の診断を洗練した新しい技術は、フローサイトメトリーを利用した倍数性-DNA分析である(Shankeyら 1995)が、しかしながらこの技術は、癌発生の後期段階にのみ明確な染色体変化を測定するものであり、早期癌における、染色体逆位(inversion)もしくはDNA構造の微小な変更、または逆の転移(reciprocal trans-location)の検出には感受性が不十分である。予後が診断時における疾患の段階に強く依存することから、本発明は早期検出に重点的に取り組む。

【0029】

前立腺癌における遺伝的異常の理解は不十分である。前立腺癌の研究は次の領域についての知識を得ることに集中してきた。すなわち、1) プロトオンコジーン(Buttayanら 1987); 2) 腫瘍抑制遺伝子(p53, p73, KAI1 および MMAC1/PTEN; Dongら 1995; Cairnsら 1997)、ならびに3) 転移におけるテロメア/テロメラーゼ活性。前立腺細胞中のテロメラーゼのアップレギュレーションとテロメアDNAの増幅は診断用の有効なマーカーとなりうる。その上、テロメアは治療用の部位となりうる(Ozenら 1998)。複数のグループから、染色体1の短腕における「前立腺癌遺伝子」に関する証拠がもたらされた(Berthonら 1998)。この領域内の具体的な遺伝子座を同定するためにはさらなる労力を要する。このマーカーは男性を家族性の前立腺癌に罹りやすくする複数のあり得る遺伝子のうちの1種でしかないと提唱されている。他の研究は、X染色体上のあり得るマーカー遺伝子座を示した(Xuら 1998)。一部の前立腺癌がポリジェニック(polygenic)であるとすれば、mtDNAは重要な診断ツールとなる。なぜならば、そのような場合には全ての関連する核遺伝子同士の相互作用を同定し理解することは困難である可能性があるからである。

【0030】

間違いなく、前立腺癌研究における重要な課題は、腫瘍進行を有効に判別し識別することのできる分子マーカーを同定することである。分子マーカーは、前立腺新生物性(これは迅速に転移性疾患へと進行する)の事例と腫瘍発生をもたらす可能性の低い事例とを識別しうる。分子マーカーまたは突然変異を比較することにより、腫瘍経路が潜伏性であるか攻撃性であるかを判定することができる。これまでの研究は核ゲノム内に隠された秘密に主に焦点を当ててきた。しかしながら、ずっと小さいmtDNAゲノムは細胞核におけるイベントの指標として振る舞うようであり、それゆえヒト前立腺癌の早期検出のための手段を提供する(Zevianiら 1990)。この点に関して重要なこととして、ミトコンドリアは、アポトーシスおよび腫瘍生物学の他の側面におけるその役割ゆえに発癌過程に関与している(Green & Reed 1998)。特に、複数のヒト腫瘍中でmtDNAの体細胞変異が観察されている(Polyakら 1998, Tamuraら 1999, Flissら 2000)。しかしながら以前の研究は、母系におけるmtDNAのクローン性を考慮しなかったことから、例外なく横断的であった。こうした限定的な横断的研究は、ある時点での突然変異を示すに過ぎない。このことは、突然変異と対応する疾患状態との間の正確な関連性を提供するかもしれないし提供しないかもしれない。母系を用いた横断的研究には、経時的にmtDNAにおける突然変異をトラッキングすること、およびそれゆえに縦断的研究の長所を模倣するという利点がある。一般的な集団変異体である突然変異と、それと対比される疾患関連突然変異の両方を同定することができる。

【0031】

老化

老化は、分子レベルおよび細胞レベルの両方での経時的変化の蓄積からなる。しかしながら、老化プロセスの基礎をなす具体的な分子機構は依然として解明されていない。老化過程を説明する試みにおいて、高齢被験者中のミトコンドリアゲノムが同じ血統由来の若い被験者のゲノムと比較された。老化に関連している1つの欠失は、共通欠失、すなわち4977-bp欠失として知られている。これまで老化研究はこの共通欠失および制御領域における多型に限定されている。こうした突然変異の明確な理解のためには、ゲノム全体を分析する必要がある。Wei, 1992年から編集した他の欠失を表1に示す。

【表1】

表1

欠失サイズ (bp)	参考文献
4977	Cortopassi 及び Arnheim, 1990; Ikebe ら, 1990; Linnane ら, 1990; Corral-Debrinski ら, 1991; Yen ら, 1991; Torii ら, 1992; Zhang ら, 1992
7436	Corral-Debrinski ら, 1991; Hattori ら, 1991 Hsieh and Wei, 1992
3610	Katayama ら, 1991
6063	Hsieh 及び Wei, 1992 Yen ら, 1992
5827	Zhang ら, 1992
6335	Zhang ら, 1992
7635	Zhang ら, 1992
7737	Zhang ら, 1992
7856	Zhang ら, 1992
8041	Zhang ら, 1992
8044	Zhang ら, 1992
5756	Zhang ら, 1992

【0032】

ATP産生の通常の副産物である酸素フリーラジカルは、この欠失のありうる原因であり、該欠失の頻度は年齢と共に増加する。既存の刊行物は、mtDNA (mtDNA) 突然変異、暦年齢、および分裂終了組織(筋肉や脳など)における全体的な老化プロセスの間の強い関連性を実証している。しかしながら、老化に関連する突然変異イベントと、老化関連しない突然変異とを識別するためには、母系比較試験が必要である。

【0033】

ここ数年で、mtDNA中の突然変異により、種々の慢性変性疾患が生じることが示された(Gattermanら 1995)。不全性OXPHOSに関連する疾患は、mtDNA突然変異と密接に関連しているようである(Byrne, 1992)。さらに、こうした筋障害が多くの場合ミトコンドリアゲノムの4977-bp共通欠失と関連していることが示された(Liuら 1997)。この大きな欠失はまた、正常に老化している個人の種々の組織において、ヘテロプラズミックなレベルで見出されており、このことは老化のミトコンドリア理論(Mitochondrial Theory of Aging, Harman, 1981)と一致する。このことは欠失頻度の増大(Cortopassi & Wang, 1995)およびその後の呼吸機能の低下(Miquelら 1992)により顕れ、老齢における最終的な細胞死をもたらす。早期の遺伝的診断が患者の予後を改善しうることから、疾患または障害への傾向の早期検出は、医療的介入の最良の機会を提供する。

【0034】

横断的研究を用いた以前の研究は、mtDNA突然変異、欠失および/もしくはその組み合

わせと老化との関連性または因果関係を確立した。しかしながら、正確なデータを得るためには、年齢特異的な欠失および/または突然変異の速度は正確に決定されなければならない。突然変異を、集団レベルにおいて、ある特定の疾患と対比して老化プロセスに帰することは、極めて重要である。この情報はmtDNA損傷がどのように経時的に生じるかを理解するために必須である。その上、分子レベルで老化を予測し最終的には鈍化させるためには、こうした特定の突然変異の帰結、その頻度、および老化の時間的側面における関連性を知っておく必要がある。研究者達は未だにこの速度を決定できていないが、それには母系を介した集団データの評価が必要である。したがって、老化プロセスをトラッキングするバイオマーカーが必要とされている。

【発明の開示】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0035】

したがって、早期癌、老化またはDNA成分を有する他のヒト疾患を示す突然変異についてミトコンドリアゲノムをモニタリングするための、簡便で直接的なシステムが必要とされている。また、ミトコンドリアゲノムにおける欠陥と結びつけられた日光曝露、非黒色腫皮膚癌、前立腺癌、肺癌および老化のための簡便な診断システムが必要とされている。mtDNA中の突然変異のうち、疾患を引き起こすものと、単に集団内や集団間のバリエーションを表すに過ぎないものとを識別する診断システムが必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0036】

20

本発明の態様を特許請求の範囲に列挙する。

【0037】

例えば、本発明の一の態様は、mtDNAを有する生物学的サンプルにおける、癌化傾向、癌の早期検出、癌の発生、癌の存在、癌の進行、癌の不在または日光曝露を検出するための方法であって、(a) mtDNAを含む生物学的サンプルを用意すること、および(b) 前記mtDNA中の欠失を検出することを含む前記方法を提供することである。

【0038】

本発明の別の態様は、複数の核酸メンバーと固相基盤を有するアレイであって、ここで各核酸メンバーが癌化傾向、癌の早期検出、癌の発生、癌の存在、癌の進行、癌の不在、日光曝露または老化と関連する少なくとも1つの欠失と関連するものであり、かつミトコンドリアDNA、ミトコンドリアDNAから転写されるRNA、およびcDNAから選択され、ここで各核酸メンバーは前記アレイ上に固有の位置を有し、かつ前記固相基盤と安定的に結合している前記アレイを提供することに関する。

30

【0039】

本発明の別の態様は、固相支持体、上記アレイ、前記固相支持体の固定手段、ミトコンドリアDNAの抽出手段、ミトコンドリアDNA配列のデータベースへのアクセス手段、プライマー、試薬および使用説明書からなる群より選択されるメンバーを少なくとも1つ含み、癌化傾向、癌の早期検出、癌の発生、癌の存在、癌の進行、癌の不在または日光曝露を診断するためのキットを提供することに関する。

【0040】

40

本発明の別の態様は、非疾患状態と関連する正常な対照配列、集団間変化と関連する配列、集団内変化と関連する配列、あるいは癌化傾向、癌の早期検出、癌の発生、癌の存在、癌の進行、癌の不在、日光曝露または老化と関連する配列から選択されるミトコンドリアDNA配列を有するデータベースを提供することに関する。

【0041】

本発明の別の態様は、mtDNAを有する被験体における、mtDNAゲノムの約ヌクレオチド10744~14124に渡る欠失を検出する方法であって、(a) 前記被験体由来の生物学的サンプルを用意すること、および(b) mtDNA中の前記欠失の存在を検出することを含み、ここで前記欠失は前立腺癌と関連している前記方法を提供することに関する。前記欠失は3000~4000 bpの範囲のものでありうる。前記欠失は約3379 bpでありうる。前記欠失は、NADHデヒ

50

ドロゲナーゼサブユニット4L、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット5、tRNAヒスチジン、tRNA セリン2、およびtRNA ロイシン2をコードする遺伝子を実質的に含む、10744～14124の塩基対の全部または一部の欠失でありうる。

【0042】

本発明の別の態様は、TAG ACT ACG TAC ATA CTA ACC CTA CTC CTA (配列番号139)を含む3.4フォワード核酸プライマーおよびGAG GTA GGA TTG GTG CTG T (配列番号140)を含む3.4リバーズ核酸プライマーを提供することである。

【0043】

本発明の別の態様は、複数の核酸メンバーと固相基盤を有するアレイであって、ここで前記核酸メンバーの1つが約10744～14124におけるmtDNA欠失と関連するものであり、ここで前記核酸メンバーが前記アレイ上に固有の位置を有し、かつ前記固相基盤と安定的に結合している前記アレイを提供することである。

10

【0044】

本発明の別の態様は、使い捨てチップ、請求項31に記載のアレイ、前記使い捨てチップの固定手段、mtDNAの抽出手段、プライマー、試薬および使用説明書からなる群より選択されるメンバーを少なくとも1つ含む皮膚癌診断用のキットを提供することである。

【0045】

本発明の別の態様は、被験体からの生物学的サンプルにおける、前立腺癌に向かう進行または前立腺癌の進行について、個体をモニタリングする方法であって、前記被験体由来の生物学的サンプルを用意すること、前記生物学的サンプルからDNAを抽出すること、mtDNAの欠失の不在または存在を検出すること、前記欠失が通常の集団間もしくは集団内変化と関連しているか否かを判定すること、あるいは前記欠失が前立腺癌化傾向、前立腺癌に向かう進行、前立腺癌または前立腺癌の進行の不在もしくは存在と関連しているか否かを判定すること、ならびに上記ステップを繰り返すことを含む前記方法を提供することである。

20

【0046】

本発明の別の態様は、mtDNAを有する被験体における、前立腺癌に向かう傾向、前立腺癌の早期検出、前立腺癌の発生、前立腺癌の存在、または前立腺癌の進行を検出するための、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4L、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット5、tRNAヒスチジン、tRNA セリン2、およびtRNA ロイシン2の全部または一部を含んでなるmtDNAの約10744～14124の欠失の使用を提供することである。

30

【0047】

本発明の別の態様は、生検サンプルからの前立腺癌生検検査を肯定または否定するための方法であって、生検サンプル由来の正常組織を用意すること、および前記正常組織における約3379 bpのmtDNA欠失の不在または存在を検出することを含む前記方法を提供することである。

【0048】

本発明の別の態様は、前立腺腫瘍の三次元的なマッピング方法であって、六ヶ所針生検サンプルを用意すること、および各六ヶ所サンプル中の約3379 bpのmtDNA欠失の不在または存在を検出することを含む前記方法を提供することである。

40

【0049】

本発明の別の態様は、mtDNAゲノムの約ヌクレオチド10744～14124に渡る欠失を使用することにより前立腺癌を診断するための患者サンプルの収集方法であって、前記被験体由来の生物学的サンプルを用意することを含む前記方法を提供することである。

【0050】

本発明の別の態様は、前立腺癌の診断用のmtDNAゲノムの約ヌクレオチド10744～14124に渡るミトコンドリア欠失を提供することである。

【0051】

本発明の別の態様は、日光曝露または非黒色腫皮膚癌の検出方法を提供することである

50

。

【0052】

本発明の別の態様は、mtDNAを有する被験体におけるmtDNAゲノムのマイナーアーク(minor arc)中の約ヌクレオチド547～4443に渡る欠失の検出方法であって、前記被験体由来の生物学的サンプルを用意すること、および前記mtDNAにおける欠失の存在を検出することを含み、ここで前記欠失が皮膚癌および/または日光曝露と関連している前記方法を提供することである。本発明の別の態様は、mtDNAを有する被験体における、累積的UV曝露の決定方法であって、前記被験体由来の生物学的サンプルを用意すること、および前記mtDNA中の欠失の存在を検出することを含む前記方法を提供することである。臨床UV光線療法レジメンの長期安全性をモニタリングするためにも同じ様な方法を使用することができる。前記欠失は3500～4000 bpの範囲でありうる。前記欠失は、約3895 bpであってもよく、およそD-ループ中のmtTF1結合部位からtRNAメチオニンに渡るmtDNAの領域を含みうる。前記欠失は、12s rRNA遺伝子、16s rRNA遺伝子、ND1遺伝子ならびにHおよびL鎖の転写用のプロモーターを実質的に含む、mtDNAゲノムのマイナーアーク中の547～4443の塩基対の全部または一部の欠失でありうる。

10

【0053】

本発明の別の態様は、CTT TTG GCG GTA TGC ACT TT (配列番号145)を含む核酸プライマーL404およびGAT TAT GGA TGC GGT TGC TT (配列番号146)を含む核酸プライマーH4676を提供することである。

【0054】

20

本発明の別の態様は、核酸プローブの一種である、TGC TAA CCC CAT ACC CCG AAA ATG TTG G Tamra (配列番号153)を含む、3895-プローブを提供することである。

【0055】

本発明の別の態様は、複数の核酸メンバーと固相基盤を有するアレイであって、ここで前記核酸メンバーの1つが約547～4443におけるmtDNA欠失と関連するものであり、ここで前記核酸メンバーが前記アレイ上に固有の位置を有し、かつ前記固相基盤と安定的に結合している前記アレイを提供することである。

【0056】

本発明の別の態様は、使い捨てチップ、上記アレイ、前記使い捨てチップの固定手段、およびmtDNAの抽出手段を含んでなる皮膚癌診断用のキットを提供することである。

30

【0057】

本発明の別の態様は、被験体由来の生物学的サンプルにおける日光曝露および非黒色腫皮膚癌について個体をモニタリングする方法であって、前記被験体由来の生物学的サンプルを用意すること、前記生物学的サンプルからDNAを抽出すること、mtDNAの欠失の不在または存在を検出すること、前記欠失が通常の集団間または集団内変化と関連しているか否か、あるいは前記欠失が日光曝露と関連しているか否かを判定すること、ならびに上記ステップを繰り返すことを含む前記方法を提供することである。

【0058】

本発明の別の態様は、日光曝露または非黒色腫皮膚癌を診断するための、mtDNAを有する被験体におけるmtDNAゲノムのマイナーアーク中の約547～4443の欠失の使用を提供することである。

40

【0059】

本発明の別の態様は、mtDNAゲノムのマイナーアーク中の約ヌクレオチド547～4443に渡る欠失を使用することによる皮膚癌診断用の患者サンプルの収集方法であって、前記被験体由来の生物学的サンプルを用意することを含む前記方法を提供することである。

【0060】

本発明の別の態様は、日光曝露または皮膚癌の診断用のmtDNAゲノムのマイナーアークの約ヌクレオチド547～4443に渡るミトコンドリア欠失を提供することである。

【0061】

本発明の別の態様は、日光曝露またはNMSCに関連する3895bp mtDNA欠失の存在を確認す

50

るための配列番号147の欠失接合部配列の使用を提供することである。

【0062】

本発明の別の態様は、DNAサンプル中の再配置の高感度検出方法であって、再配置を含むまたは含むことが疑われるDNAサンプルを用意すること、前記再配置により生じる、新たに形成される接合部にまたがるプライマーまたはプローブを用意すること、前記接合部を増幅またはプロービングすることにより、前記再配置を検出することを含み、ここで前記再配置はサンプル中のDNA配列において新たに形成される接合部を生じるものである前記方法を提供することである。前記再配置はmtDNA中に存在しうる。前記再配置は欠失でありうる。

【0063】

10

表の簡単な説明

表1は老化に関連する突然変異をまとめたものである。

【0064】

表1aは、対照、遠位良性、隣接良性および悪性組織における7種のタンパク質コード領域のmtDNAにおける突然変異の主成分分析である。

【0065】

表1bは、対照、遠位良性、隣接良性および悪性組織における7種のタンパク質コード領域のmtDNAにおける突然変異のニューラルネットワーク分析である。

【0066】

表1cは、前立腺癌を有する31患者由来の遠位良性、隣接良性および悪性前立腺組織からのミトコンドリアのND1、ND2、COXIおよびCYTB領域に見出される、同義的および非同義的な突然変異のまとめである。

20

【0067】

表1dは、悪性腺由来の遠位良性組織と症状性だが悪性ではない被験者由来の前立腺組織とのミトコンドリアDNA中の突然変異のカイ二乗分析である。

【0068】

表2は、表皮腫瘍と隣接正常組織における欠失の平均数のまとめである。

【0069】

表3はDHPLCの標準方法の概略である。

【0070】

30

表4は、前立腺針生検材料からのミトコンドリア突然変異(D-ループを含め)、ならびに、前立腺癌を有する患者由来の悪性、隣接および遠位良性前立腺からの完全なゲノム突然変異のまとめである。

【0071】

表5は、血液からの正常組織およびホルマリン固定組織についての完全ミトコンドリアゲノム増幅のために用いたプライマーのリストである。

【0072】

表6は実施例12に使用する増幅プライマーのリストである。

【0073】

表7は実施例12のqPCR成分である。

40

【0074】

表8は実施例12のためのサイクリングパラメーターを示す。

【0075】

表9は実施例14に用いたプローブの一覧である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0076】

本発明の方法はmtDNAと関連している疾患を診断するために使用することができる。本発明の方法は、例えばあらゆる既知の手段を用いる、ミトコンドリアゲノムの増幅、ミトコンドリアゲノムの一部、好ましくは個体のミトコンドリアゲノム全体を配列決定することによる、生物学的サンプルからの個体のミトコンドリアゲノムの分析を提供する。変性

50

性高速液体クロマトグラフィー (DHPLC)もまた、多くのサンプルを迅速にスクリーニングするために使用することができる。DHPLCは突然変異のホットスポットに焦点を合わせることができる。DHPLCは、突然変異の検出という観点においては自動配列決定よりも高感度であり、通常の配列決定の20～25%という値と比較して2%ヘテロプラズミーさえも検出することができる。さらに低いレベルのヘテロプラズミー (<2%) の検出方法も開発することができる。

【 0 0 7 7 】

本明細書において用いる「光線性角化症」とは扁平上皮細胞癌の提唱された前駆表皮障害を言う。

【 0 0 7 8 】

本明細書において用いる「老化」とは、分子レベルおよび細胞レベルの両方での、経時的な変化の蓄積を言う。

【 0 0 7 9 】

本明細書において用いる「対立遺伝子」とは、染色体上のある具体的な場所を占める、あるDNA配列の複数の代替形態のうちの1つを意味する。

【 0 0 8 0 】

本明細書において用いる「人工ニューラルネットワーク(ANN)」とは、複数の相互に接続された要素が、情報を同時に処理し、過去のパターンから状況に合わせ学習するパーチャルデバイスを意味する。

【 0 0 8 1 】

本明細書において用いる「付着」または「スポッティング」とは、核酸を固相基盤上に沈着させて核酸アレイを形成させ、そのとき前記核酸が共有結合、水素結合またはイオン性相互作用を介して固相基盤に不可逆的に結合されるようにする工程を言う。

【 0 0 8 2 】

本明細書において用いる「異型(atypical)」または「異常」とは、正常ではないが、見かけ上は悪性でもない細胞の外観を意味する。

【 0 0 8 3 】

本明細書において用いる「基底細胞癌」とは、皮膚細胞のある種類の癌を意味する。

【 0 0 8 4 】

本明細書において用いる「良性」とは健康に対する危険性がないこと、再発性でも進行性でもないこと、悪性ではないことを意味する。

【 0 0 8 5 】

本明細書において用いる「良性前立腺疾患」とは、過形成、炎症、萎縮、前立腺症、化生、および前立腺上皮内腫瘍を含みうるがこれに限定されない。

【 0 0 8 6 】

本明細書において用いる「ボーエン病」とはin situ表皮癌を意味する。

【 0 0 8 7 】

本明細書において用いる「サイクル閾値」(C_T)は、標的増幅がバックグラウンドよりも高くなる点であり、これは蛍光シグナルのようなシグナルにより示される。

【 0 0 8 8 】

本明細書において用いる「診断用」または「診断性の」とは、突然変異または突然変異の組み合わせの存在または不在を疾患の診断または管理に使用することを意味する。突然変異の検出は、疾患状態診断における一つのステップでありうる。

【 0 0 8 9 】

本明細書において用いる「疾患」には、障害または他の異常な身体状態も含まれる。

【 0 0 9 0 】

本明細書において用いる「疾患関連ミトコンドリアゲノム」とは、特定の疾患を示唆するまたはそれと関連する突然変異を有するゲノムを意味する。

【 0 0 9 1 】

本明細書において用いる「データベース」とは、研究者がヌクレオチド配列の構造を迅

10

20

30

40

50

速に決定することができるようにする、検索可能情報が格納され提供される容量を有する電子格納システム(標準産業ソフトウェアを用いたコンピューターに基づくシステム)を意味する。このデータベースにはまた、生物学的サンプルを提供する個人を説明する情報が格納される。この説明的情報には、健康状態や他の関連指標が含まれ、それらは生物学的サンプルと関連づけられうる。

【0092】

本明細書において用いる「欠失」とは、核酸の連続配列からのDNA領域の除去であって、欠失が生じた後にギャップが末端の再結合により修復されたものを意味する。欠失は大きさが1～数千の塩基またはそれ以上の範囲でありうる。

【0093】

本明細書において用いる「重複(duplications)」とは、DNAの特定の配列がコピーされ、元のコピーの後もしくは前に、またはゲノム中の別の箇所に1回以上挿入されることを意味する。

【0094】

本明細書において用いる「ヘテロプラスミー」とは、1つの器官または細胞内のミトコンドリア配列中の突然変異の比率により定義される。ヘテロプラスミックな突然変異とは、ミトコンドリアゲノムの複数コピーのうちの一部ではあるが全てではないものにおいて生じる突然変異である。

【0095】

本明細書において用いる「ホモプラスミー」とは全てのミトコンドリア配列が同一であることを意味する。

【0096】

本明細書において用いる「超変異」とは、正常な細胞過程または標準的な進化の原理では説明することのできない、加速された突然変異速度を意味する。

【0097】

本明細書において用いる「逆位(inversions)」とは、ある長さのDNAが切り取られ逆方向に再挿入されたときのことを言う。

【0098】

本明細書において用いる「母性遺伝」とは、ミトコンドリアが卵子の細胞質を介して遺伝することを意味する。

【0099】

本明細書において用いる「母系」は、ミトコンドリアDNAのクローン性配列が母から継続的に代々伝えられることを言う。

【0100】

本明細書において用いる「ミトコンドリア」は、細胞プロセスのためにATPを産生する真核細胞の細胞小器官を意味する。

【0101】

本明細書において用いる「突然変異」とは、野生型配列からのDNAもしくはRNA配列におけるあらゆる改変または変更を包含し、これには、点突然変異、トランジション、挿入、トランスバージョン、転座、欠失、逆位、重複、組換えまたはその組み合わせが含まれるがこれに限らない。配列の改変または変更には、一塩基の変更から、DNAもしくはRNA断片全体の付加または除去までありうる。

【0102】

本明細書において用いる「突然変異量」とは、関連する遺伝子もしくはゲノム全体の機能不全を最終的にもたらしうるまたは非コード領域に蓄積されうる、mtDNA中の突然変異の増大を言う。

【0103】

本明細書において用いる「新形成」は、結果的に悪性状態へ形質転換しうる病的過程を意味する。

【0104】

10

20

30

40

50

本明細書において用いる「非関連組織」とは、対象の疾患と無関係の身体の一部からの組織を意味する。

【0105】

本明細書において用いるポリヌクレオチドの「非同義的」突然変異とは、異なるコードされるアミノ酸をもたらす突然変異のことである。

【0106】

本明細書において用いる「正常組織」とは、組織学により判定される可視的な兆候のない組織を意味する。

【0107】

本明細書において定義される「核酸アレイ」とは、複数の固有の核酸が、固相支持体の1つの表面に、20の異なる核酸/cm²を超える密度で結合しているアレイを言い、ここで各核酸は固相支持体の表面上に同一ではないあらかじめ選択された領域において結合されている。一の実施形態において、固相支持体の表面に結合している核酸はDNAである。好ましい実施形態において、固相支持体の表面に結合している核酸はcDNAである。別の好ましい実施形態において、固相支持体の表面に結合している核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により合成されるcDNAである。好ましくは、本発明の核酸アレイは、長さが少なくとも150ヌクレオチドの核酸を含む。好ましくは、核酸アレイは、長さが6,000ヌクレオチド未満の核酸を含む。より好ましくは、核酸アレイは、長さが500ヌクレオチド未満の核酸を含む。一の実施形態において、アレイは固相支持体の1つの表面に結合した、少なくとも500の異なる核酸を含む。別の実施形態において、アレイは、固相支持体の1つの表面に結合した少なくとも10の異なる核酸を有する。さらに別の実施形態において、アレイは、固相支持体の1つの表面に結合した、少なくとも10,000の異なる核酸を含む。本明細書において用いる「核酸」という用語は、「ポリヌクレオチド」という用語と相互交換可能である。

【0108】

本明細書において用いる、「核酸標的」または「標的核酸」とは、1種以上の化学結合を介して、通常は相補的塩基対形成を介して、通常は水素結合を介して、相補的な配列の核酸メンバーに結合することのできる核酸と定義される。本明細書において用いる、核酸標的には、天然塩基(すなわちA、G、C、もしくはT)または修飾塩基(7-デアザグアノシン、イノシンなど)が含まれうる。さらに、核酸プローブ中の塩基は、ハイブリダイゼーションを妨害しない限り、リン酸ジエステル結合以外の連結法により結合されうる。そのため、核酸標的は、構成塩基がホスホジエステル結合ではなくむしろペプチド結合により結合しているペプチド核酸でありうる。好ましくは、核酸標的は、ヒトの組織または体液抽出物から誘導されうる。より好ましくは核酸標的は、ヒトの組織または体液抽出物から合成される、一本鎖または二本鎖DNA、RNA、またはDNA-RNAハイブリッド核酸である。

【0109】

本明細書において用いる「細胞核」とは、染色体DNAを全て含有する、真核細胞において最も目立つ細胞小器官を意味する。

【0110】

本明細書において用いる、NPV(陰性的中率)とは、陰性の検査結果の患者のうち、検査されている疾患または症状を有しない患者の割合を意味する。この値は陰性の検査結果の信頼性を評価するものである。その計算式は $NPV = (\text{真の陰性}) / (\text{真および偽陰性})$ である。

【0111】

本明細書において用いる「時折日光曝露される皮膚」とは、個体中の時折またはときたま曝露される皮膚を意味する。例えば、個体によっては、肩、背中および胸が含まれうる。

【0112】

本明細書において用いる、PPV(陽性的中率)とは、陽性の検査結果の患者のうち、検査されている疾患または症状を有する患者の割合を意味する。この値は陽性検査結果の信頼

10

20

30

40

50

性を評価するものである。その計算式は $PPV = (\text{真の陽性}) / (\text{真} + \text{偽陽性})$ である。

【0113】

本明細書において用いる「PSA検査」とは前立腺特異的抗原検査を意味し、ここで該抗原は前立腺の癌の指標となりうる血液中に存在する抗原である。

【0114】

本明細書において用いる「点突然変異」は、DNA中の単一のヌクレオチドの変化を意味する。

【0115】

本明細書において用いる「多型」は、mtDNAゲノムまたは対立遺伝子の集団における配列バリエーションを意味する。

10

【0116】

本明細書において用いる「前駆病巣」とは、潜在的疾患関連を示す、DNA突然変異またはその組み合わせを意味する。

【0117】

本明細書において用いる「疾患への傾向を有する」または「疾患傾向」とは、疾患または障害と関連している突然変異の存在または不在に起因して、平均的な個体よりも、当該疾患または障害の発症リスクが高いあるいはその疾患または障害の早期発症のリスクが高いことを意味する。

【0118】

本明細書において用いる「前新形成」とは、ある細胞が新生物となりうる閾値上にあることを示す細胞レベルまたはDNAレベルの兆候を意味する。

20

【0119】

本明細書において用いる「あらかじめ選択された領域」、「所定の領域」、または「固有の位置」とは、核酸の沈着用を使用される、使用された、または使用を意図する基盤上の局所を言い、本明細書における他の表現としては「選択領域」または単に「領域」などとも言う。あらかじめ選択された領域は任意の適当な形、例えば、円形、長方形、楕円形、くさび形、などでありうる。一部の実施形態において、あらかじめ選択された領域は、約1 cm²未満、より好ましくは1 mm²未満、さらにより好ましくは0.5 mm²未満であってもよく、また、一部の実施形態では約0.125~0.5 mm²でありうる。

【0120】

本明細書において用いる、mtDNA中の突然変異の「存在」にはヘテロプラズミックな突然変異も含まれ、そのため、突然変異DNAが存在するサンプル中にいくらかの正常なmtDNAがさらに存在しうることも考慮される。

30

【0121】

本明細書において用いる「希に日光曝露される皮膚」とは、個体における希にしか曝露されないまたはほとんど日光に曝露されることがない皮膚を意味する。例えば、個体によっては、これには臀部またはかかとが含まれうる。この部分はまた、「日光保護された」皮膚とも呼ばれうる。

【0122】

本明細書において用いる「リアルタイムPCRサイクル閾値C_T」とは、蛍光が閾値線を超える点(サイクル)である。

40

【0123】

本明細書において用いる「体細胞変異」は受精後のDNA配列の変化を意味する。

【0124】

本明細書において用いる「固相基盤」または「固相支持体」とは、硬い表面または半ば硬い表面を有する材料を言う。本明細書において、「基盤」と「支持体」は、「固相基盤」および「固相支持体」という用語と相互交換可能に使用される。固相支持体は、生物学的、非生物学的、有機性、無機性、またはこれらの任意の組み合わせであってもよく、粒子、より糸状、沈殿物、ゲル、シート、管類、球体、コンテナ、毛細管、パッド、切片、膜、プレート、スライドなどとして存在しうる。多くの場合、基盤はシリコンまたはガラ

50

ス表面、(ポリ)テトラフルオロエチレン、(ポリ)ピニリデンジフルオリド、ポリスチレン、ポリカーボネート、荷電膜、例えばナイロン66もしくはニトロセルロース、またはその組み合わせである。好ましい実施形態において、固相支持体はガラスである。好ましくは、基盤の少なくとも1つの表面は、実質的に平坦である。好ましくは、固相支持体の表面は、カルボキシル、アミノ、ヒドロキシル、チオールなどを含むがこれに限らない反応基を有する。一の実施形態において、表面は光学的に透明である。

【0125】

本明細書において用いる「日光曝露される皮膚」は、「日常的に」または「時折」日光曝露される皮膚を意味する。

【0126】

本明細書において用いる「日光保護される皮膚」とは、稀にしか日光に曝露されない皮膚を意味する。

【0127】

本明細書において用いる「扁平上皮細胞癌」は、皮膚細胞のある種類の癌を意味する。

【0128】

本明細書において用いる「安定的に結合した」とは、核酸が、共有結合、水素結合またはイオン性相互作用を介して固相基盤に不可逆的に結合してアレイを形成し、このことにより、前記核酸が、アレイを分析する条件下(すなわち、ハイブリダイゼーションおよびスキャニング)で、アレイに安定的に結合している他のすべての核酸または固相基盤上の他のすべてのあらかじめ選択された領域に対して固有のあらかじめ選択された位置を保持することを言う。

【0129】

「統計的に有意」な数のミトコンドリアDNA配列は、観察スコア対期待スコアを使用するまたは決定する標準カイ二乗統計的アルゴリズムによりまたはその使用により決定する。

【0130】

本明細書において用いる「わずかな突然変異」とは、検出の閾値にある低レベルの突然変異を意味する。

【0131】

本明細書において用いる「症候性の良性」とは、患者が、前立腺悪性腫瘍と関連する1以上の症状(これにはPSA上昇、直腸指診(DRE)スコア異常、排尿困難、尿中の血液および/または膿、腰背部、骨盤および大腿上部の疼痛、または射精時疼痛が含まれるがこれに限らない)を示すものの、有資格の病理学者による生検組織の検査により良性と診断されたものを意味する。

【0132】

本明細書において用いる、「同義的」突然変異とは、コードされるアミノ酸に対して影響を及ぼさない、ポリヌクレオチド中の突然変異である。

【0133】

本明細書において用いる「トランジション」とは、類似窒素含有塩基の置換、ピリミジンからピリミジンへの、プリンからプリンへの置換を意味する。これは、あるピリミジンが他方のピリミジンにより置換される、またはあるプリンが他方のプリンにより置換される突然変異である。

【0134】

本明細書において用いる「トランスバージョン」とは、非類似窒素含有塩基の置換、プリンからピリミジン、ピリミジンからプリンへの置換を意味する。これは、あるプリンがピリミジンにより置換または置き換えられる、あるいはその逆の突然変異である。

【0135】

本明細書において用いる「日常的に日光曝露された皮膚」とは、個体における、日常的にまたは頻繁に曝露される皮膚を意味する。例えば、個体によっては、頭皮、顔、首および耳が含まれる。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 6 】

MtDNAと特定の疾患の診断

本発明の一の実施形態においては、mtDNA配列の比較をとおして、老化、日光曝露をモニタリングする、および前立腺癌や非黒色腫皮膚癌のような特定の疾患を診断する方法を提供する。核DNAではなくmtDNAを用いて、前立腺癌のような疾患を診断することにはいくつかの利点がある。第1に、複雑ではないゲノムのmtDNAは、個人レベルおよび集団レベルで容易に理解することができ、そのため正常ゲノムおよび疾患関連ゲノムの大規模mtDNAデータベースから、個人診断が極めて正確なものとなる。したがって疾患に関連して、バリエーションが理解できる。第2に、mtDNAは、突然変異率が核DNAよりも10倍高い (Wallace 1992)。予備的疾患を示唆する核の再配置は、迅速にミトコンドリアに伝達され、そこで体細胞変異として現れる。第3に、mtDNAは母性遺伝パターンを有し、すべてのミトコンドリアは同じmtDNA配列から出発するという意味において本質的にクローン性であり、そのためこのクローン状態からの変化は容易に検知される。その上、mtDNAには組換えの有力な証拠がないことから、配列中のあらゆる変更は体細胞性のイベントである。1つのミトコンドリアあたりに多数のミトコンドリアゲノムがある(2~10コピー)こと、および1つの細胞当たり多数のミトコンドリアがあること(500~2,000)の結果として、突然変異を有する1つのミトコンドリアはある意味において「劣性」である。その上、ミトコンドリアゲノムは、非常に高いレベルの、損傷ゲノムを有するミトコンドリア(最大90%)に耐えることができる。このことは、残っている野生型mtDNAによる相補を介して起こる (Chomynら 1992)。しかしながら、変異したゲノムは、通常より小さいことから、野生型ゲノムに対して複製的には有利であり (Hayashiら 1991)、そのため変異したmtDNAのクローン性増殖が生じ (Brierleyら 1998)、このことは核遺伝子と異なり、mtDNA突然変異を保有する細胞に対する選択が少ないまたはないことを示唆する。この突然変異率上昇に起因して、mtDNA中に出現する突然変異および/または欠失は、細胞の一生にわたり維持され、種々の変異原性物質に対する曝露の記録として役立ちうる。mtDNAの完全性は、核の修復機構により維持され、こうした遺伝子座における欠陥は、複数のミトコンドリア欠失を伴う常染色体優性疾患をもたらすことが提唱されている (Zevianiら 1990)。結果的に、mtDNAは、種々の癌または他の疾患に関連する初期核イベントの早期警告前哨として機能しうる。最後に、ミトコンドリアゲノムは、個人レベルで、配列決定および突然変異についてモニタリングすることができる。

【 0 1 3 7 】

本発明の方法および産物は、ヘテロプラズミックのみならずホモプラズミックな突然変異をも検出する。実際に、ヘテロプラズミック突然変異は、疾患、障害または老化の早期発症の検出の鍵となりうる。その上、具体的な突然変異部位が特定の疾患状態、障害または老化過程を示す可能性もあるが、合計の突然変異量もまた、疾患、障害または老化の発症、存在および進行を判定する上で重要である。

【 0 1 3 8 】

本発明は、良性または正常組織または体液を検査して、日光曝露、疾患、障害または老化の発症および/または存在の影響を決定することを可能にする。例えば、本発明は良性組織または体液を、前新形成、新形成、悪性腫瘍に向かう進行および悪性腫瘍の存在について検査することを可能にする。

【 0 1 3 9 】

本発明の方法により検出されるミトコンドリア突然変異を、ミトコンドリアDNA中の集団間および集団内バリエーションと比較するが、これには被験者からの非関連組織由来のミトコンドリアDNAとの、または母方の親類からのミトコンドリアDNAとの比較が含まれる。ミトコンドリアゲノム全体を分析する必要はない。例えば、ミトコンドリアゲノム全体を配列決定する必要はなく、その選択部分だけ配列決定すればよい。したがって、ミトコンドリアDNAのサンプルは診断を提供しうる。

【 0 1 4 0 】

日光曝露の検出

10

20

30

40

50

本発明の一の実施形態においては、ミトコンドリアDNA突然変異および再配置(例えば日光曝露の結果としての欠失)の早期検出用システムを提供する。特定の変異、例えば共通欠失、実施例13および14で同定された3895 bp欠失、それに関連する突然変異、およびmtDNA中の未だ特徴付けされていない欠失の発生率は、日光曝露の信頼できるバイオマーカーとして機能しうる。

【0141】

皮膚癌の診断

本発明の好ましい実施形態において、非黒色腫皮膚癌(NMSC)および黒色腫皮膚癌、ならびに固形癌発生を示唆するそれらの前駆病巣におけるmtDNA変化の早期診断用システムを提供する。特定の変異、例えば共通欠失、実施例13および14で同定された3895 bp欠失、それに関連する突然変異、およびmtDNA中の未だ特徴付けされていない欠失の発生率は日光曝露およびそれに関連する皮膚癌の信頼できるバイオマーカーとして機能しうる。特に非黒色腫皮膚癌は慢性的な生涯にわたる日光曝露と関連している。黒色腫皮膚癌は急性の熱傷症状に、より関連しているようである。ヒトNMSCおよびその前駆病巣におけるmtDNAゲノム全体の突然変異フィンガープリントを決定する。このことからmtDNA変化は、ヒト皮膚癌およびその前駆病巣の早期バイオマーカーとして確立される。次に変性HPLCを使用して、対象の配列について低レベルのヘテロプラズミーを評価することができる。このアプローチはまた、他のヒト腫瘍における早期変化の発達にも洞察をもたらしうる。

【0142】

前立腺癌の診断

本発明の別の実施形態において、前立腺癌診断用のシステムを提供する。mtDNA不全の年齢に関連した蓄積は、個体において、前立腺癌のような中年および高齢の男性に広まっている特定の臨床障害が出現しやすくなる傾向を生じうる。好ましい実施形態において、ルーチンな前立腺癌スクリーニングは、前立腺マッサージ体液からのミトコンドリアゲノム配列決定を介して行われる。癌細胞に形質転換した上皮細胞の存在は、前立腺マッサージ体液由来のmtDNAの増幅を介して判定することができ、これは直腸指診やPSAなどといった現行の診断技術をしのぐものである。最近になってFlissら(2000)は、膀胱癌の患者の尿サンプル中から突然変異mtDNAを同定した。前立腺マッサージ体液における同じ様な検出事項は、前立腺癌用の非侵襲的な早期検出法を提供する。一まとめにした前立腺癌とは対照的に、種々の種類の前立腺癌を診断することができ、また患者における、攻撃的で、急成長する細胞を識別することもできる。例えば、出願人らの教示において同定された3.4 kb欠失は、前立腺癌の指標として使用することができる。

【0143】

前立腺癌進行の早期検出およびモニタリング

本発明のシステムおよび方法は、癌、特に前立腺癌を、早期段階に、および何らかの組織学的異常が見られる前に、検出するために使用することができる。例えば、本発明のシステムと方法は、前立腺組織における前新形成を検出するために使用することができる。このシステムは前立腺癌の発生と進行を検出するために使用することができる。ヒト前立腺組織または前立腺に關係する体液(例えば前立腺マッサージ体液または尿)由来のミトコンドリアDNA中の、わずかな突然変異および超変異を含む突然変異(Chenら 2002; Chenら 2003)を、新形成の存在のために検査することができ、そして癌転換の追跡、悪性腫瘍の診断または継続する良性状態の確認のために間隔をおいて再検査することができる。

【0144】

こうした突然変異は、非関連組織(例えば血液、尿、毛髪および口腔ぬぐい液が挙げられるがこれに限らない)から抽出されたミトコンドリアと比較して判別することができる。この直接比較により、疾患と関連しない多型、母方のバックグラウンドまたは正常ハプロタイプバリエーションが除外される。上記突然変異はまた、集団間および集団内変異に関連するミトコンドリア配列と比較することができる。対象の臓器または体組織の体液または組織からの1以上の突然変異は、疾患発生の可能性を示唆する。次にその個人を、疾患進行を示唆する、他の部位における突然変異の増加、および/または突然変異ミトコン

ドリアゲノムの数の増加について間隔を置いて逐次的にモニタリングする。前立腺からの良性組織は、必ず非関連性であると見なすことはできない。それどころか、下記実施例9に見られるとおり、一見すると良性な組織であっても、その組織は前新形成、新形成、悪性腫瘍への進行または悪性腫瘍と関連するミトコンドリア突然変異を含有しうる。その上、具体的な突然変異よりも、突然変異量が、疾患および疾患の進行の決定に有益でありうる。本発明のシステムと方法は、ホモプラスミックのみならずヘテロプラスミックな突然変異をも検出する。

【0145】

前立腺の初期直腸指診(DRE)中に採取された前立腺マッサージ体液(PMF)を介して、前立腺のミトコンドリアゲノム中の突然変異をモニタリングする。PMF中の細胞を濃縮し、スライド上に塗り、PSAイムノペルオキシダーゼを用いて染色することにより、前立腺上皮細胞を同定する。こうした前立腺細胞を、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法により選択的に回収する。こうした細胞からのミトコンドリアDNAを分析して、非関連組織からのミトコンドリアDNA、および/または集団間および集団内変異の配列と比較する。例えば、DNA分析は、mtDNAの配列決定を含みうる。全DNAをこうした細胞から抽出し、ホルマリン処理された生検材料用に設計されたミトコンドリア特異的プライマー(表5)を用いて、重なり合う増幅産物を伴うmtDNAゲノム全体を増幅する。次にこうしたPCR産物を当業者に周知の方法(DNA再配列決定アレイを含む)により配列決定する。配列決定した結果を、ヘテロプラスミーおよび突然変異についてスクリーニングし、悪性および良性前立腺組織に関連する既知のmtDNA突然変異のデータベースと比較する。こうした比較に基づき、限定するものではないが、良性(突然変異なし); 前新形成もしくは新形成(低レベルの突然変異); または悪性(高レベルの突然変異)に関して、前立腺の状態についての名称を割り当てる。良性、前新形成および新形成の状況においては、前立腺の進行を、記載された通常のPMFスクリーニングによりモニタリングすることができる。

【0146】

あるいはまた、良性、異型、異常と診断された生検材料を、生検材料のレーザーキャプチャーマイクロダイセクションにより、または組織をスライドから削り取り、またはすえられた組織切片を使用してもよく、次いでDNA抽出、増幅、配列分析およびデータベース比較により同じように検査することができる。

【0147】

配列決定とデータベースへの比較に対する代替方法として、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの特異的なセットの構築を介するマイクロアレイ技術を用いて、表4に列記した突然変異の任意の数のまたは組み合わせに基づき、突然変異量または突然変異の具体的なパターンを同定することができる。

【0148】

mtDNA突然変異を、前新形成、新形成および前立腺癌と関連するミトコンドリアゲノム中の突然変異のデータベースに対して間隔を置いて逐次的に比較すること(合計突然変異量の計算を含め)により、疾患進行をモニタリングすることができる。前立腺生検組織は、通常の組織学的/病理学的、または他の臨床方法により臨床的には良性、正常、異型または異常とされる細胞について、前新形成、新形成および/または悪性腫瘍進行に関して検査することができる。

【0149】

同様に、DNAを、疾患、例えば前立腺癌と関連することが知られている特異的欠失に関して分析することができる。このことは、PCRに基づく技術を用いて、かかる欠失をスクリーニングすることにより実行できる。

【0150】

老化に伴う突然変異の評価

本発明のシステムと方法は、突然変異、例えば4977-bpの「共通欠失」(Liuら 1997)およびミトコンドリアゲノムの他の突然変異の発生率の増加に基づき老化を評価するために使用することができる。この情報は、健康調査データと併せて、同じ突然変異/欠失を生

10

20

30

40

50

じる別々の原因の間の極めて重要な統計的識別を可能にする。幸いにもmtDNAは、卵子を介して排他的に遺伝し、天然では本質的にクローン性である (Van De Graaff & Fox, 1995)。このことは、複数の世代に渡る母系内の突然変異 / 欠失の注意深く管理された研究により、信頼できる年齢に相関する欠失頻度の決定を可能にする。この情報は、老化過程を鈍らせる処置方法を開発するために使用することができる。

【 0 1 5 1 】

サンプルの収集

生物学的サンプルは、どのような既知の手段により収集してもよく、それはmtDNA配列データベースの構築を目的としたものであっても、個体に対して診断検査を行うためのものであってもよい。データベース作製のためのサンプルとしては、腫瘍バンク、同じ母方の血統からの罹患および非罹患個体に関する母方の血統の調査、ならびに高頻度で特定の疾患 (例えば限定するものではないが、皮膚および前立腺癌) を有する群または集団からの母方の血統調査、健康状態および老化の評価が挙げられるがこれに限らない。例えば、FTA (登録商標) Gene Cards (登録商標) を用いて生物学的サンプルを収集しアーカイブに保管することができる。適当なサンプルとしては、中皮、上皮または内皮に由来するあらゆる組織または体液が挙げられる。かかる組織および体液としては、血液、唾、口腔細胞、唾液、前立腺マッサージ体液、汗、骨、毛髪、リンパ組織、子宮頸部スミア、胸部吸引物、糞便物、射精物、月経出血、尿および生検組織が挙げられるがこれに限らない。好ましくは、約100 μ lの血液、100 μ g ~ 25 mgの固形組織をサンプリングする。皮膚癌の疑いがある場合には、(正常、NMSCおよび前駆病巣からの) 皮膚細胞または組織を、皮膚生検またはルーチンな吸引式水疱形成法により採取する。疾患が疑われるときには、一次診療医、癌専門医、または他の医師が、患者から、正常組織と疾患の疑いのある組織の両方を摘出してもよい。日光曝露を分析するためには、組織を真皮もしくは表皮、またはその両方の組み合わせから採取してもよい。

【 0 1 5 2 】

前立腺または皮膚などの腫瘍のサンプルのためには、パラフィン包埋された微小切開組織の複製しておいた切片 (5ミクロン) を、ヘマトキシリンおよびエオシン (HE) で1つのスライドを染色する前に脱パラフィン処理し、このとき複製物をメチルグリーン (MG) で染色するが、これは当技術分野での標準法である。HE染色は、病理専門家により、正常、前駆、および腫瘍進行に当てはまるグレードに等級付けされる。複製されたMGスライドは、製造社 (Arcturus社) の推奨にしたがい、等級付け細胞のレーザーキャプチャーに使用する。

【 0 1 5 3 】

mtDNAの抽出

DNA抽出は、当技術分野で既知のどのような方法を用いて行ってもよく、その後、ミトコンドリアゲノム全体またはそのある領域を増幅することもでき、これにはミトコンドリアゲノムの配列決定も含まれるが、これはCurrent Protocols in Molecular Biologyに記載のとおりに行うことができる。

【 0 1 5 4 】

mtDNAの分析

mtDNA中の突然変異の存在を検出するステップは、当業者に既知のどのような技術から選択して行ってもよい。例えば、mtDNA分析は、mtDNAを配列決定すること、PCRによりmtDNAを増幅すること、サザン、ノーザン、ウェスタン、サウス-ウェスタンプロットハイブリダイゼーション、変性HPLC、ハイブリダイゼーション、マイクロアレイ、バイオチップもしくは遺伝子チップ、分子マーカー分析、バイオセンサー、融解温度プロファイリングまたはこれらの任意の組み合わせを含みうる。その上、帰納的規則抽出やニューラルネットワーク形成のような統計的手法を用いることもできる。

【 0 1 5 5 】

MtDNAの配列決定

PCR

本発明のポリヌクレオチド配列は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により増幅することが

10

20

30

40

50

できる。PCR法は当業者に周知である。PCRには、増幅すべき核酸、増幅すべき配列に隣接する2種の一本鎖オリゴヌクレオチドプライマー、DNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオシド三リン酸、バッファーおよび塩の存在が必要である。PCRの方法は当技術分野で周知である。PCRはMullis and Faloona, 1987, Methods Enzymol., 155: 335(参照により本明細書に組み入れる)に記載のように行われる。

【0156】

一般に、PCRはテンプレートDNA (少なくとも1 fg; より実用的には、1~1000 ng) および少なくとも25 pmolのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行う。典型的な反応混合物は、2 µlのDNA、25 pmolのオリゴヌクレオチドプライマー、2.5 µlの10×PCRバッファー1 (Perkin-Elmer, Foster City, CA)、0.4 µlの1.25 µM dNTP、0.15 µl (または2.5単位)のTaq DNAポリメラーゼ(Perkin Elmer, Foster City, CA)および脱イオン水を合計容積が25 µlとなるように含んでなる。ミネラルオイルを重層し、プログラム制御できるサーマルサイクラーを用いてPCRを行う。

10

【0157】

PCRサイクルの各ステップの時間および温度、ならびにサイクル数は、実際のストリンジェンシー要件に応じて調整する。アニーリング温度およびタイミングは、プライマーがテンプレートにアニーリングすると期待される効率および許容されるべきミスマッチの程度の両方により決定される。プライマーアニーリング条件のストリンジェンシーを最適化する能力は、十分に当業者の知識の範囲内にある。40 ~ 72 のアニーリング温度を用いる。一般に、テンプレート分子の最初の変性は通常、4分に渡る92 ~ 99 において起こり、その後、変性(94~99 にて15秒~1分/kb)、アニーリング(温度は上記のように決定、1~2分)、および伸長(72 にて1分)からなるサイクル20~40が行われる。最終伸長ステップは一般に、72 にて4分行われ、その後4 での時間不確定なステップ(0~24時間)が続いてもよい。

20

【0158】

DNA配列決定

ミトコンドリアゲノムを配列決定するためにはどのような既知の手段を使用してもよい。好ましくは、配列決定前にmtDNAをPCRにより増幅する。PCR産物は直接配列決定してもよく、またはベクターにクローニングして次いでそれを細菌宿主に導入することもできる。DNA配列決定法の例は、Brumley, R. L. Jr. and Smith, L.M., 1991, Rapid DNA sequencing by horizontal ultrathin gel electrophoresis, *Nucleic Acids Res.* 19:4121-4126 およびLuckey, J.A., ら, 1993, High speed DNA sequencing by capillary gel electrophoresis, *Methods Enzymol.* 218: 154-172に見出される。mtDNAのPCRと配列決定の併用は、Hopgood, R., ら, 1992, Strategies for automated sequencing of human mtDNA directly from PCR products, *Biotechniques* 13:82-92およびTanaka, M. ら, 1996, Automated sequencing of mtDNA, *Methods Enzymol.* 264: 407-421に記載されている。

30

【0159】

欠失分析および検出

好ましい手法は、Expand Long Template PCRシステム(Boehringer Mannheim社)を用いた、長型伸長PCR (LX-PCR)法である。Birch-Machin 研究室において開発され有効性の確認されたLX-PCR法(Rayら 2000)を用いると、単一の欠失の発生とは対照的に、mtDNA欠失のスペクトル全体を迅速にスクリーニングする機会がもたらされる。

40

【0160】

半定量的PCR法 (Corral-Debrinskiら 1991)は、全mtDNA中のmtDNA⁴⁹⁷⁷欠失の割合を推定するために使用することができる。

【0161】

さらに、アイソトープを用いて標識を行うサザンブロットおよびプロービング技術または当技術分野で標準的な他の任意の技術を、欠失検出のために使用することもできる。

【0162】

定量的PCRを用いて、新しく形成される配列接合部の両側にかかるプライマーを使用す

50

ることにより、あらゆる特定の欠失標的の量を定量することができる。欠失型mtDNA分子の量を、野生型mtDNAの量と比較して、欠失型mtDNA分子の割合を決定することができる。

【0163】

PCR産物の配列決定

PCR産物を配列決定するためにはどのような公知の方法を用いてもよい。好ましくは、DNA配列全体を、ジデオキシ配列決定法により特徴付けするが、これにはABI Big Dye Terminator™ 技術と一連の72の重なり合うプライマー(それぞれが重鎖および軽鎖用)を使用する。配列決定は、1つ、複数、または組み合わせとしてのABIプラットフォーム(310、3100、または3700など)上で行われる。配列決定反応は、製造者の推奨に従い行う。

【0164】

変性高速液体クロマトグラフィー (DHPLC)を用いたミトコンドリアゲノムの突然変異分析

ミトコンドリアゲノムの配列決定および突然変異ホットスポットの同定の前に、DHPLCを使用して、多数のサンプル中の突然変異について迅速にスクリーニングを行うことができる。この技術は、低レベルのヘテロプラズミーの同定においてより高い感度を提供する。この技術は、ホモプラズミックな変化を検出することはできないが、従来の配列決定を補完する。最近になって腫瘍中に同定されたホモプラズミック突然変異は別として、報告されたmtDNA突然変異の大部分はヘテロプラズミックである(Chinneryら 1999)。こうしたヘテロプラズミックmtDNA変化は、mtDNAのPCR増幅後のヘテロ二本鎖の形成をもたらす。ヘテロプラズミックmtDNA突然変異の迅速なスクリーニングは、比較的新しい技術である変性高速液体クロマトグラフィー (DHPLC) (Oefner & Underhill, 1998)を用いて決定する。この技術は最近、全mtDNAゲノムを、<5%のレベルに至るまでのヘテロプラズミック点突然変異について迅速にスクリーニングし同定するために使用された(Van den Boschら 2000)。

【0165】

DHPLCは、完全自動化スクリーニング手段を提供するWAVE™ DNA Fragment Analysis System (Transgenomic, Omaha, USA)を用いて行うことができる。同じ技術を使用してmtDNAヘテロプラズミック突然変異をスクリーニングすることができる。好ましくは、mtDNAゲノム全体を、van den Boschら (2000)に記載されたように、2種の異なるPCR条件を用いて13の重なり合う断片としてPCRにより増幅する。1~2 kb PCR産物を90~600bpの断片に消化し、その最適融解温度にて解離させる。突然変異は、2つのピークとして表され、パーセンテージの低い突然変異(<2% ヘテロプラズミーなど)は、ピーク中の「肩」として表される。

【0166】

DNA配列決定はまた、マイクロアレイを用いて行うことができ、これは当技術分野で知られているとおりである (Cheeら 1996)。

【0167】

データ分析

配列決定後、正常および疾患関連mtDNA配列を、データベース中での比較のためにアーカイブに保管する。再配列決定デバイス、マイクロアレイ技術、統合されたマイクロ流体増幅および分析システム、高速で高スループットの突然変異検出、および他の方法のいずれもが、本発明の方法と共に使用可能である。

【0168】

個別のミトコンドリアゲノムの配列決定から得られたデータを、集団レベルのデータと比較する。このデータは、上記のようにサンプルを取得しmtDNAを配列決定することにより取得する。好ましくは、前記データベースは母系研究からの情報を有する。集団レベルデータは、データベースに保存される。あらゆる適当なデータベースが使用可能である。

【0169】

好ましくは、臨床および生物学的データの多次元的評価研究データベースが使用されるが、これはこの事業に関わる研究室により蓄積される情報の、収集、加工および配布に必要なバイオインフォマティックスのインフラストラクチャーを提供するものである。この

データベースは、ネットワークを連結する集中型電子システムであり、ダイナミックで強力な供給源をもたらす。

【0170】

データベースには、あらゆる既知の手段によりアクセスすることができ、好ましくは安全なインターネット経路によりアクセスされる。好ましくは、データベースは、電子商取引アルゴリズムを用いて開発され、サーバー上で構築され、最適動作および拡張性機能を介して多数の同時利用者をサポートするアプリケーションサーバを用いて配備される。別の「ウェブ」サーバが、ウェブサイト構築物の基盤を提供することもできるが、これは、ウェブサーバが、ユーザーに到達する前に全ての内容、アプリケーションおよびトランザクションが通らなければならない中心点として機能しうるからである。

10

【0171】

当技術分野で知られているデータマイニングアルゴリズムは、データからパターン、クラスターおよびモデルを発見するために使用される(SAS 2000)。さらに、突然変異の発生および突然変異率、疾患検出のための突然変異パターン、情報検索、および他の複合配列解析ソフトウェアのために知的アルゴリズムおよび方法が開発される。

【0172】

核酸メンバーおよびプローブ

本発明は、標的核酸配列に特異的に結合する核酸メンバーおよびプローブを提供する。この標的核酸配列は、前立腺癌、非黒色腫皮膚癌などの疾患を示唆する、検出されるべき核酸または核酸の領域である。本発明のマイクロアレイを用いて分析される標的核酸配列は、好ましくはヒト組織または体液サンプルに由来する。本発明は、RNAまたはRNAに対応する核酸(すなわちcDNA)またはDNAを含む標的核酸配列を提供する。核酸メンバーは、固相支持体と安定的に結合し、本発明のアレイを構成する。前記核酸メンバーは、一本鎖または二本鎖であってもよく、cDNAから増幅されたPCR断片でありうる。

20

【0173】

本発明はまた、プローブを含むポリヌクレオチド配列を提供する。本明細書において用いる「プローブ」という用語は、プローブ中の少なくとも1つの配列と標的領域中の配列との相補性に起因して、標的核酸中の配列と二本鎖構造を形成するオリゴヌクレオチドを言う。プローブは、当技術分野で既知のどのような方法により標識してもよい。本発明のプローブは一本鎖または二本鎖でありうる。

30

【0174】

診断デバイス

本発明には、特定の疾患を診断するまたは特定の突然変異を同定するために使用される、診断デバイス、例えばバイオチップ、遺伝子チップまたはマイクロアレイが含まれる。すべての配列決定されたミトコンドリアゲノムを評価して、塩基対配置のコンセンサス構造を創出し、それに対して、特定の疾患または障害に関連する塩基対欠失および突然変異の部分に関する禁制指標を割り当てる。次に、バイオチップ、遺伝子チップまたはマイクロアレイを創出するために診断用配置を使用する。

【0175】

特定の疾患、疾患状態または障害に関連する配列を同定した後に、mtDNAとオリゴヌクレオチドアレイとのハイブリダイゼーションを利用して特定の突然変異を同定することができる。あらゆる既知のハイブリダイゼーション法を使用することができる。好ましくは、野生型または突然変異した領域にマッチするオリゴヌクレオチドプローブおよび対照プローブを有するアレイが使用される。市販のアレイ、例えばマイクロアレイまたは遺伝子チップなどが適当である。こうしたアレイは、スライドまたはマイクロチップ上に、数千のいプローブのマッチするおよび対照の対を有し、ゲノム全体を素早く配列決定することができる。マイクロアレイのゲノムおよびDNA配列分析における使用を記載した総説文献は、www.gene-chips.comより入手可能である。

40

【0176】

マイクロアレイ

50

ポリヌクレオチドアレイは、1以上の標的核酸配列を含むサンプル中における、多数のポリヌクレオチドをアッセイすることのできる、高スループット技術を提供する。本発明のアレイは、遺伝子発現解析、疾患の診断および疾患の予後診断(例えば、治療に対する患者の応答のモニタリング、薬剤スクリーニングなど)に有用である。

【0177】

疾患、老化または他の健康関連突然変異を示すmtDNAのポリヌクレオチド配列のどのような組み合わせも、マイクロアレイの構築に有用である。

【0178】

マイクロアレイを用いて分析することの予定される標的核酸サンプルは、先に記載したように、適量のmtDNAを含有するあらゆるヒト組織または体液(好ましくは好ましくはは前立腺マッサージ体液、固形癌、良性組織、血液、または尿)に由来しうる。標的核酸サンプルは、相補性核酸メンバー/標的複合体のハイブリダイゼーションパターンを生じるのに適当なハイブリダイゼーション条件下でポリヌクレオチドメンバーと接触させる。

【0179】

マイクロアレイの構築

前記マイクロアレイは、固相支持体の1つの表面に結合した固有のポリヌクレオチドを複数種有し、このとき各ポリヌクレオチドは固相支持体の表面の同一ではないあらかじめ選択された領域に結合されている。アレイ上の結合した各サンプルは、正体が既知の、通常は配列が既知のポリヌクレオチド組成を有するが、このことは下記にてより詳細に説明する。あらゆる想定可能な基盤が本発明に利用可能である。

【0180】

前記アレイは、任意の既知の手段を用いて構築する。核酸メンバーは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)および逆転写(RT)などの確立された技術を用いて作製されうる。こうした方法は当技術分野で現在知られている方法と類似している(例えばPCR Strategies, Michael A. Innis (編者),ら(1995)およびPCR: Introduction to Biotechniques Series, C. R. Newton, A. Graham (1997)を参照されたい)。増幅ポリヌクレオチドは、当技術分野で既知の方法により精製される(例えばカラム精製)。ポリヌクレオチドは、プライマーも所望のポリヌクレオチドの合成中に生じた不完全産物も実質的に含まない程度に単離されたときに、純粋されたとみなされる。好ましくは、精製ポリヌクレオチドはまた、分子の結合活性を妨害するまたはマスキングする可能性のある混入物質を実質的に含まない。

【0181】

本発明のアレイにおいて、ポリヌクレオチド組成物は固相支持体の表面と安定的に結合しており、このとき前記支持体は柔軟なまたは硬い固相支持体でありうる。

【0182】

核酸メンバーを結合することのできるあらゆる固相支持体が、本発明に使用可能である。適当な固相支持体材料の例としては、ケイ酸塩、例えばガラスやシリカゲル、セルロースおよびニトロセルロース紙、ナイロン、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ラテックス、ゴム、およびTEFLONTMのような炭化フッ素樹脂が挙げられるがこれに限らない。

【0183】

固相支持体材料は、広範な種類の形状として使用可能であり、そのような形状には限定するものではないが、スライドやビーズが含まれる。スライドは、いくつかの機能的な利点を提供するため、固相支持体の好ましい形態である。その平坦な表面のおかげで、ガラススライドを使用すると、プローブおよびハイブリダイゼーション試薬は最小限ですむ。スライドはまた、試薬を目標に向かって点着することを可能にし、一定温度に保つのが容易であり、洗浄が容易であり、固相支持体上に固有されたRNAおよび/またはDNAの直接視覚化を容易にする。固相支持体上に固定されたRNAおよび/またはDNAの除去もまた、スライドの使用により容易となる。

【0184】

固相支持体として選択された具体的材料は、記載された機能を提供する限り、本発明にとって本質的ではない。通常、本発明を作製し使用する者は、コストと入手可能性の経済

10

20

30

40

50

的側面、最終産物の期待される応用要件、および全体的な製造プロセスの要求に基づき最良の市販材料を選択する。

【0185】

本発明の核酸メンバーを基盤に結合させる(スポッティングと呼ばれる工程)には種々の方法が使用される。一例として、例えば米国特許第5,807,522号に記載の技術を用いてポリヌクレオチドを結合させる(ポリマー結合方法の教示に関して参照により本明細書に組み入れる)。あるいはまた、スポッティングは、接触プリンティング技術を用いて行う。

【0186】

各組成物中に存在するポリヌクレオチドの量は、アレイを用いるアッセイ中に、標的ポリヌクレオチド配列の適切なハイブリダイゼーションおよび検出をもたらすのに十分なものである。一般に、アレイの固相支持体と安定的に結合している各核酸メンバーの量は、少なくとも約0.1 ng、好ましくは少なくとも約0.5 ngおよびより好ましくは少なくとも約1 ngであり、このときその量は最大1000 ng以上であってもよいが、通常は約20 ngを超えない。前記核酸メンバーを固相支持体上に、全体として円形の外形であるスポットとして「スポッティング」するとき、「スポット」の直径は一般に、約10~5,000 μm、通常は約20~2,000 μmおよびより一般的には約50~1000 μmである。

【0187】

対照ポリヌクレオチドをアレイ上にスポッティングして、標的発現対照ポリヌクレオチドまたはミスマッチ対照ヌクレオチドとして用いて、プローブが標的化された標的以外のサンプル中のポリヌクレオチドへの非特異的結合または交差ハイブリダイゼーションをモニタリングすることができる。したがって、ミスマッチプローブはあるハイブリダイゼーションが特異的であるか否かを示す。例えば、標的が存在するならば、完全にマッチするプローブは、ミスマッチしたプローブよりも一貫して明るいはずである。さらに、全ての中心的ミスマッチが存在するならば、ミスマッチプローブは突然変異を検出するために使用される。

【0188】

標的調製

マイクロアレイ用の標的は、ヒト体液または組織サンプルから誘導される。ハイブリダイゼーション前に標的核酸サンプルを増幅することが望ましい場合がある。当業者であれば、どのような増幅方法を使用するにせよ、定量的結果を所望であれば、増幅されるポリヌクレオチドの相対的頻度を維持または制御する方法を用いることに注意する必要があると理解するであろう。「定量的」増幅の方法は、当業者によく知られている。例えば、定量的PCRは、同じプライマーを用いて既知量の対照配列を同時に共増幅することに関する。このことは、PCR反応をキャリブレーションするために用いることのできる内部標準を提供する。次いで高密度アレイに、増幅ポリヌクレオチドの定量的ための内部標準に特異的なプローブを追加することができる。定量PCRのための詳細なプロトコルは、PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innisら, Academic Press, Inc. N.Y., (1990)に提供されている。他の適当な方法としては、限定するものではないが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(Innis,ら, PCR Protocols. A guide to Methods and Application. Academic Press, Inc. San Diego, (1990))、リガーゼ連鎖反応(LCR)(Wu and Wallace, Genomics, 4: 560 (1989), Landegren,ら, Science, 241: 1077 (1988)およびBarringer,ら, Gene, 89: 117 (1990)を参照)、転写増幅(Kwoh,ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 1173 (1989))、および自己持続型配列複製(Guatelli,ら, Proc. Nat. Acad. Sci. US A, 87: 1874 (1990))が挙げられる。

【0189】

本発明は、標識化標的または標識化プローブを提供する。分子に結合または取り込まれた、あらゆる分析的に検出可能なマーカ―を本発明に使用することができる。あらゆる分析的に検出可能なマーカ―とは、分析的に検出され定量されるあらゆる分子、部分または原子を言う。本発明に使用するのに適当な検出可能標識には、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段により検出可能なあらゆる組成物が

含まれる。本発明に有用な標識としては、標識ストレプトアビジンコンジュゲートを用いた染色のためのビオチン、磁性ビーズ(例えばDynabeadsTM)、蛍光色素(例えばフルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質など)、放射性標識(例えば³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³²P)、酵素(例えばセイヨウウサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよびELISAに一般的に使用される他の酵素)、ならびに比色分析標識、例えばコロイド状の金または着色ガラスもしくはプラスチック(例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど)ビーズが挙げられる。かかる標識の使用を教示する特許としては、米国特許第3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149および4,366,241号が挙げられる。

【0190】

かかる標識の検出手段は当業者に周知である。したがって、例えば、放射標識は、感光性フィルムまたはシンチレーションカウンタを用いて検出することができ、蛍光マーカは放射光検出用の光検出器を用いて検出することができる。酵素標識は典型的には、酵素を基質とともに用意し、酵素の基質に対する活性により生じる反応産物を検出することにより検出し、比色分析標識は着色標識を単純に可視化することにより検出する。

【0191】

標識は、当業者に周知の任意の数の手段により組込むことができる。しかしながら、好ましい実施形態においては、標識は、サンプルポリヌクレオチドの調製における増幅ステップ中に同時に組み込まれる。したがって例えば、標識プライマーまたは標識ヌクレオチドを用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は標識された増幅産物をもたらす。好ましい実施形態においては、標識ヌクレオチド(例えばフルオレセイン-標識UTPおよび/またはCTP)を用いた上記のような転写増幅は、転写されるポリヌクレオチド中に標識を組み入れる。あるいはまた、標識を、元のポリヌクレオチドサンプル(例えば、mRNA、polyA mRNA、cDNAなど)に、または増幅が完了したあとの増幅産物に、直接付加することもできる。標識をポリヌクレオチドに結合させる方法は、当業者に周知であり、例えばニックトランスレーション法または、ポリヌクレオチドをキナーゼ処理しその後ポリヌクレオチドリンカーを付加すること(ライゲーション)によりサンプルポリヌクレオチドに標識(例えばフルオロホア)を連結させる末端標識化(例えば標識RNAを使用)が挙げられる。

【0192】

好ましい実施形態において、標的には、マイクロアレイから生じるシグナルを正規化するためのマイクロアレイ上の対照プローブにハイブリダイズする対照分子が1以上含まれる。標識された正規化用標的には、上記のようにマイクロアレイ上にスポッティングされる、対照オリゴヌクレオチドに完全に相補的なポリヌクレオチド配列である。ハイブリダイゼーション後の正規化対照から得られるシグナルは、ハイブリダイゼーション条件、標識強度、「読み取り」効率、およびアレイ間で完全ハイブリダイゼーションのシグナルを変動させる他の要因による変化に対する対照を提供する。

【0193】

ハイブリダイゼーション条件

ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションは、変性させたプローブまたは標的核酸メンバーと標的ポリヌクレオチドを、前記プローブまたは標的核酸メンバーとその相補的標的が相補性塩基対形成により安定なハイブリッド二本鎖を形成することのできる条件下に置くことを要する。次に、ハイブリッド二本鎖を形成しないポリヌクレオチドを洗い流し、ハイブリダイゼーションしたポリヌクレオチドを、典型的には付加された検出可能標識を介して、検出できるようにする。ポリヌクレオチドは、温度を上げることにより、または前記ポリヌクレオチドを含有するバッファの塩濃度を減少させることにより変性すると一般的に理解されている。低ストリンジェンシー条件下(例えば低温および/または高塩濃度)では、例えばアニリングする配列が完全に相補的ではない場合でも、ハイブリッド二本鎖(例えばDNA:DNA、RNA:RNA、RNA:DNA、cDNA:RNAおよびDNA:DNA)が形成される。したがって、ハイブリダイゼーションの特異性は、低ストリンジェンシー条件では低下する。逆に、高ストリンジェンシー(例えば高温または低塩)では、ハイブリダイゼーションが

10

20

30

40

50

成功するには、ミスマッチが少なければならない。ハイブリダイゼーション条件の最適化方法は、当業者に周知である(例えばLaboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 24: Hybridization With Polynucleotide Probes, P. Tijssen, 編 Elsevier, N.Y., (1993)を参照されたい)。

【0194】

ハイブリダイゼーションの後に、ハイブリダイズしなかった標識または非標識ポリヌクレオチドを支持体表面から、好適には洗浄により、除去し、そのことにより基盤表面上にハイブリダイズした標的ポリヌクレオチドのパターンを生成させる。種々の洗浄溶液が当業者に知られており使用可能である。ハイブリダイゼーションした標識オリゴヌクレオチドおよび/またはポリヌクレオチドの得られたハイブリダイゼーションパターンは、種々の方法により視覚化または検出することができ、このとき検出の具体的な様式は、試験するポリヌクレオチドの具体的な標識に応じて選択され、ここで代表的検出手段としては、シンチレーションカウンティング、オートラジオグラフィー、蛍光測定、熱量測定、光放射測定などが挙げられる。

10

【0195】

画像収集およびデータ分析

上記のような、ハイブリダイゼーションおよび任意の洗浄工程および/またはその後の処理の後に、得られるハイブリダイゼーションパターンを検出する。ハイブリダイゼーションパターンを検出または視覚化する際には、標識の強度またはシグナル値を検出するのみならず定量するが、これは、ハイブリダイゼーションの各スポットからのシグナルを測定し、かつそれを既知数の末端標識化標的ポリヌクレオチドにより放射されるシグナルに対応する単位値と比較することにより、ハイブリダイゼーションパターンにおけるアレイ上の特定のスポットとハイブリダイゼーションする各末端標識化標的のコピー数のカウントまたは絶対値を得る、という意味である。

20

【0196】

アレイへのハイブリダイゼーションから得られたデータの分析方法は当技術分野で周知である。例えば、ハイブリダイゼーションの検出が蛍光標識に関するときは、データ分析には、次の各ステップ、すなわち、得られたデータから基盤位置の関数として蛍光強度を決定すること、外れ値(すなわち既定の統計分布から逸脱するデータ)を除外すること、および残りのデータに対する試験ポリヌクレオチドの相対的結合親和性を計算すること、が含まれる。得られたデータは、画像として表示され、このとき各領域の強度は、結合したオリゴヌクレオチドおよび/またはポリヌクレオチドと試験ポリヌクレオチドとの結合親和性に従い変化する。

30

【0197】

検出または視覚化の後に、ハイブリダイゼーションパターンを使用して、ハイブリダイゼーションパターンを作製するためにアレイに接触させた標識化標的ポリヌクレオチドサンプルの遺伝的プロファイル、ならびに標識化標的ポリヌクレオチドサンプルの由来する生理学的供給源に関する定量的情報を決定する。遺伝的プロファイルとは、サンプル中に存在するポリヌクレオチドの種類に関する情報、例えば前記ポリヌクレオチドが相補的である遺伝子の種類、ならびにサンプル中の各特定ポリヌクレオチドのコピー数に関する情報を意味する。

40

【0198】

診断または予後検査

本発明は疾患検出用の診断検査を提供する。本発明はまた、患者の治療に対する応答をモニタリングする予後検査を提供する。本発明の方法によると、疾患の存在または患者の治療に対する応答は、患者からの体液または組織サンプルを用意して検知する。この体液または組織サンプルから、核酸を含むサンプルを調製する。前記サンプルから抽出された核酸を、固相基盤と複数の核酸メンバーを有するアレイとハイブリダイゼーションさせるが、このとき、各メンバーは、疾患の存在または疾患もしくは障害への傾向を示すものである。この診断検査によると、前記核酸を含むサンプルがアレイ上の核酸メンバーの1以

50

上とハイブリダイゼーションすることは、疾患の存在、または疾患もしくは障害への傾向を示すか、あるいは予後検査の場合には患者の治療に対する応答を示す。

【0199】

キット

本発明の方法を実施するための説明書および試薬を含むキットを提供する。例えば、このキットは、組織特異的サンプルおよび組織関連体液中の、ミトコンドリア欠失、突然変異、ヘテロプラズミー、ホモプラズミーを検出するための試薬と説明書を含みうる。このキットはまた、プライマー伸長産物を作製するための、ミトコンドリアゲノムにハイブリダイズするプライマーを1以上含みうる。キットにはまた、固相支持体、例えば使い捨てチップ、前記固相支持体の固定手段、mtDNAの抽出手段、およびmtDNA配列のデータベースへのアクセス手段が含まれうる。

10

【0200】

例えば、前立腺癌に関連するmtDNA欠失を検出するためのキットには、フォワードおよびリバースの3.4 プライマー、試薬、および説明書が含まれうる。

【0201】

同様に、日光曝露またはNMSCに関連するmtDNA欠失を検出するためのキットには、L404 プライマー、H4676 プライマー、3895プローブ、試薬および説明書が含まれうる。

【0202】

本発明の他の用途、例えば上に記載したおよび以下の実施例に記載する用途は、当業者に容易に明らかとなろう。

20

【実施例】

【0203】

以下の実施例において本発明をより具体的に説明するが、当業者に多数の改変および変法が明らかとなることから、これらの実施例は例証のみを目的としたものである。

【0204】

実施例1：前立腺腫瘍

前立腺体液の採取または前立腺腫瘍除去のための手術の後に、形質転換している細胞または癌性の細胞を同定するために、生検材料のスライドを調製する。レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM)顕微鏡検査を使用して、組織切片から正常、良性または悪性の細胞を単離する。周囲の異種細胞の中から、対象の疾患細胞(前癌性細胞または癌細胞の侵襲グループなど)を採取することができる。

30

【0205】

これらの各細胞からの全DNA抽出物を、Arcturus Engineering Inc.社により概説されたプロトコルの変法にしたがい精製した。DNAは、50 μ l容積の、10mM Tris pH 8.0、0.1mM EDTA pH 8.0、および0.1% Tween 20中の1 mg/mlプロテイナーゼK (PK)を42 にて一晩用いて、細胞から抽出した。一晩42 でのインキュベーション後にチューブをインキュベーションオープンから取り出した。これらのサンプルを、5 分、6400 rpm(2000 \times g)にてマイクロ遠心分離した。CapSureTM をチューブから除き廃棄した。チューブを95 にて10分インキュベートし(PKが不活化される)、次いで室温に冷却する。サンプルの5~50 μ lをPCR増幅に使用した。

40

【0206】

精製後に、個々のサンプルをLX-PCRにより増幅するが、これには超可変領域1 (HV1)、超可変領域2 (HV2)および12S領域全体のための適当なプライマーを用いる。次にこれらのPCR産物を、当技術分野で周知の高スループット法を用いて配列決定する。

【0207】

あるいはまた、表5に記載のプライマーを用いて全長ミトコンドリアゲノムを増幅することもできる。あらゆるグリーソンのグレードの悪性腫瘍細胞、隣接良性腺由来の細胞、および「遠位」良性腺由来の細胞に由来するDNAの特異的キャプチャーおよび増幅を行うことができる。増幅することができ増幅される他の前立腺組織としては、前立腺上皮内腫瘍(PIN)、良性前立腺肥大(BPH)、種々の過形成、ストロマ、および原因不明の変化を有す

50

る細胞が挙げられる。この研究は、前立腺癌と診断されたため前立腺切除術を受けることを選択した31人の個体由来の前立腺組織を用いて行った。各個体から、3種の組織、すなわち、悪性、隣接良性および遠位良性組織をキャプチャーした。各患者からの血液を、陽性の、非疾患性組織対照として使用した。こうしたサンプルを増幅し配列決定したところ、表4に示す新規突然変異が得られた。表4の突然変異はまた、置換を記載した配列番号102、欠失を記載した配列番号103～109、および挿入を記載した配列番号110～138に提供されている。多型および突然変異の位置は改訂されたケンブリッジ参照配列(Revised Cambridge Reference Sequence)(2001)との比較により決定したが、歴史的ナンバリングは維持され、すなわち位置3106における欠失はギャップとして示され、レアな多型 750Aは保持されている。次にこのデータのサブセット(7タンパク質コード領域)を、主成分分析(当技術分野で標準的)に供したが、その結果は表1aに示すとおりである：

【表 1 a】

表 1a

血液	遠位良性	隣接良性	悪性	不明
100.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
16.13%	35.48%	9.68%	29.03%	16.13%
12.9%	12.90%	45.16%	3.22%	25.81%
3.22%	0.00%	0.00%	96.78%	0.00%

【 0 2 0 8 】

この結果は悪性形質転換の明確なパターンを示している。正常組織（血液）および悪性組織は高いクラスタリング頻度を示している(1.00および0.967)。興味深いことに、隣接および遠位良性(このどちらも組織学的および病理学的な観点からは正常に見える)は、50%を超えるサンプルが遠位良性および隣接良性切片(intercept)の外側に外れる形質転換のレベルを示す。さらに、サンプルデータを、当技術分野で標準的なニューラルネットワークにより分析したところ、表1bに示す以下の結果が得られた：

【表 1 b】

表 1b

血液	遠位良性	隣接良性	悪性
100.00%	0.00%	0.00%	0.00%
6.45%	0.00%	0.00%	93.55%
19.35%	0.00%	0.00%	77.14%
3.22%	0.00%	0.00%	96.78%

10

20

30

40

50

【 0 2 0 9 】

この表は、腫瘍が存在する場合、全ての前立腺組織は、その組織の解剖学的な外観が「正常」であったとしても、分子レベルでは悪性と認められることを示す。

【表 1 c】

表 1c: 突然変異領域- ND1, ND2, COX1 および CYTB

	遠位良性	隣接良性	悪性
1.	105DB - 6037	105AB - 4655	105ML - 4655, 4917, 7407
2.	208DB	208AB - 4917, 5174, 5985, 6776	208ML - 4722, 6553, 7028
3.	349DB	349AB	349ML - 6548
4.	377DB - 4735, 5984, 6912	377AB	377ML - 4917, 6686, 7028, 7407, 15452, 15607
5.	378DB	378AB - 6776, 15043	378ML - 4703
6.	380DB - 3469, 3507, 15218,	380AB - 4917, 4951, 5440, 6059	380ML - 15218
7.	382DB - 6307, 7028, 7407, 15452, 15527, 15607	382AB - 4716, 5312, 5371, 15162, 15323, 15324	382ML - 6147, 6691, 7178, 15523
8.	384DB - 4733, 7028	384AB - 6219, 15452, 15607	384ML - 4733, 7028
9.	386DB - 15677	386AB - 15244, 15301, 15452, 15607, 15670	386ML
10.	416DB - 4561, 15326, 15525	416AB	416ML - 4864

10

20

30

40

50

	遠位良性	隣接良性	悪性
11.	417DB	417AB	417ML - 4917
12.	418DB	418AB - 7159	418ML - 7028, 7407
13.	426DB	426AB	426ML - 4892, 5102, 5213
14.	449DB - 4646, 4917, 5999, 6047, 7407	449AB	449ML
15.	450DB - 15323	450AB - 4917, 5300, 15323	450ML - 3398, 5147, 6009, 15323
16.	451DB	451AB - 4217	451ML
17.	452DB - 4018, 6557, 15286	452AB - 3308, 3480, 3594, 3666, 3693, 5036, 5046, 5393, 5984, 6548, 6827, 6989, 7055, 7146, 7256, 7389, 15115	452ML - 3480, 4591, 5268, 7159, 7407
18.	455DB - 7160	455AB	455ML
19.	456DB - 3589, 4216, 5312, 5424, 6041, 7013, 7407,	456AB - 4216, 4787, 4917, 7407, 15343, 15452, 15607	456ML - 4787, 6579, 7059, 15302

10

20

30

40

	遠位良性	隣接良性	悪性
	15384, 15452		
20.	457DB	457AB	457ML
21.	458DB - 5198, 7407	458AB	458ML
22.	460DB - 5147	460AB	460ML
23.	461DB - 7028, 7184	461AB - 3394, 7184, 14899	461ML - 7184
24.	463DB - 14903	463AB - 14903	463ML - 14903
25.	464DB	464AB	464ML - 6314, 6643, 6667, 7028, 7066, 7407, 15265
26.	466DB - 3507, 7028	466AB - 3908, 3969, 3992, 4017, 4185, 4239, 7028	466ML - 6382, 6776, 15527
27.	467DB	467AB - 4917, 5147	467ML
28.	498DB - 14903, 14918, 15355	498AB - 14918	498ML
29.	501DB - 4580, 4826, 6224, 7007	501AB - 4580, 6776	501ML - 3966, 4569, 4580, 4917, 15379
30.	504DB - 3507	504AB	504ML

10

20

30

40

	遠位良性	隣接良性	悪性
31.	505DB - 15307, 15526	505AB - 4216, 4917, 5456, 6776, 6953, 7028, 7407, 15452	505ML

【 0 2 1 0 】

クラスター分析

前立腺癌と診断された31人の個体から同定された突然変異を、Hierarchical Clusterin
g Explorer (HCE) (www.cs.umd.edu/hcil/multi-cluster; Seoら, 2002; Seoら 2003; Zh
aoら 2003; Seo and Shneiderman; Seoら; 2004a; Seoら 2004b; Seoら 2005a; Seoら 2
004c; Seoら 2005b)を用いて解析した。さらに、臨床的には前立腺癌の症状があるもの
、病理学的結果はその前立腺組織が悪性ではないことを示した12人の男性の前立腺針生検
組織からのミトコンドリアゲノムも解析した。図2および3は、同定された非同義的ミトコ
ンドリア突然変異のクラスター解析を示す。図2はクラスター解析の最初の半分であり、
図3はクラスター解析の残り半分である。Y軸に、前立腺癌を有する31人の個体(105, 208,
349, 377, 378, 380, 382, 384, 386, 416, 417, 418, 426, 449, 450, 451, 452, 455,
456, 457, 458, 460, 461, 463, 464, 466, 467, 498, 501, 504, 505)および臨床症状
を示すものの病理検査からは悪性なしと判定された12人の個体 (2, 35, 51, 209, 270, 2
78, 375, 480, 503, 536, 560, 858)の患者番号を示す。Y軸には、組織の供給源も示した
(すなわち遠位良性(db)、隣接良性(ab)、悪性(ml)および(b)血液)。12人の個体の、症状
はあるものの悪性ではない組織由来の良性腺組織は「gl」と表示した。X軸は突然変異の
部位を示す。

【 0 2 1 1 】

図4は、図3のコピーであり、陰影を付けた領域に、臨床前立腺癌と関連する一連の非同
義的突然変異を示す。突然変異は特定の遺伝子に生じる：位置4216および4217における突
然変異は、いずれもND1遺伝子(NADHデヒドロゲナーゼサブユニット1)中に生じる。位置49
17における突然変異はND2遺伝子(NADHデヒドロゲナーゼサブユニット2)中に生じる。位置
7407における突然変異は、COXI遺伝子(シトクロムcオキシダーゼサブユニット1)中に生じ
る。最後に、位置15452における突然変異はCytB遺伝子(シトクロム b)中に生じる。突然
変異4216および4217は同じアミノ酸における非同義的突然変異を引き起こし、4917と同様
に、レーパー遺伝性視神経萎縮(LHON)に関連する二次的突然変異である (Mitochondrial
Research Society; Huoponen, 2001; MitoMap)。前立腺癌との関連性を除き、7407につい
ての関連性は証明されていないままである。15452における突然変異は、ユビキノールシ
トクロムcレダクターゼ(複合体III)不全を有する5/5患者中に見出された(Valnotら 1999)
ものである。

【 0 2 1 2 】

前立腺癌のため前立腺切除術を受けた31人の男性のコホートにおいて、これらの突然変
異の1つ以上が、被験者の20人(64.5%)に見られた。上記のように、これらの各個人につ
いて、あらゆる周囲の組織病理を除いた3種の関連組織、すなわち悪性組織、悪性組織に
隣接する良性組織および、「遠位」良性組織、からの前立腺切片組織から、全ミトコンド
リアゲノム配列を得た。組織は、資格のある臨床病理学者が、レーザーキャプチャーマイ
クロダイセクション(LCM)を用いて切除した。配列を、患者の血液から抽出され配列決定
されたミトコンドリアDNA (mtDNA)と比較した。配列決定の結果は、ミトコンドリア突然
変異が、多くの場合ヘテロプラズミックな状態で、全三種の組織に出現することを示した
。Alonsoら (2005)による分析に反して、患者の血液からのmtDNA配列と比較して、悪性組
織、隣接良性および遠位良性組織からのミトコンドリアDNAには突然変異が見られた。ヘ
テロプラズミー(同じ個体中に突然変異型および正常型ミトコンドリアゲノムが存在する
状態のこと)は、少し前に突然変異が生じたことの証拠と考えられている(Huoponen, 2001

10

20

30

40

50

)。ほとんどの突然変異は、同じ個体からの3種の組織において共有されていない。それどころか、各種類の組織についての相対的突然変異量はおおよそ同じであり、このことは、腫瘍が存在する場合、前立腺組織の種類に関わりなく、mtDNA突然変異は前立腺内において活発であることを示す。その上、外観が組織学的には良性の組織も、多くの場合、ミトコンドリアゲノム中に突然変異を有することが見出された。これらの突然変異は、細胞核、またはNUMTS (核/ミトコンドリア配列)に組み込まれているミトコンドリア配列 (Lopez, 1994)と関連していない。Rho⁰ 細胞株を用いた、ヒトNUMTSの長大なクローニングおよび配列決定研究、ならびにNCBIデータベースにアーカイブ保管されている既知NUMTSに対する比較を行ったところ、公共データベースにアーカイブ保管された既知ミトコンドリア偽遺伝子についての突然変異は検出されず、このことは、データが、偽遺伝子データ点を有しないことを保証した。

10

【0213】

臨床的に前立腺癌の症状のある12人の男性においては、病理学的検査結果によると前立腺組織が悪性ではないことが示されたときには、良性腺組織をLCMにより回収し、前立腺針生検組織からのミトコンドリアゲノムを増幅して配列決定した。結果は、4人の患者ではmtDNA突然変異が完全に不在であること、4人の患者では非コード制御領域にのみ突然変異があること、または4人の患者では制御領域と遺伝子コード領域の両方に突然変異があることを示す。しかしながら、突然変異の位置は悪性コホートとは著しく異なっていた ($P > 0.01$)。さらにこうした個体においてはコード領域突然変異は1つのみ観察され、こうした突然変異のうち1つは上記の領域内にあるものであった (すなわちND1、ND2、COX1およびCytB) (患者375、位置15081におけるCytB)。

20

【0214】

4つのタンパク質コード領域を含む、同義的および非同義的突然変異の両方を悪性疾患マーカーとして使用したところ、前立腺癌グループの30/31 (97%)が特定された。表1cに、前立腺癌を有する31人の個体からの組織サンプル中のND1、ND2、COX1、およびCytBにおいて見出され同義的および非同義的突然変異を記載する。ND1、ND2、COX1、およびCytBにおける突然変異は明らかに前立腺癌と関連している。本発明は、表1cおよび図2~4に記載の突然変異を同定したが、本発明にはND1、ND2、COX1およびCytB中のあらゆる突然変異が含まれる。同じ分析において、12人の良性で症状のある患者のうちの1人は悪性グループに含まれたが、しかし、この患者は、早期癌進行を示しうるCytB中の突然変異を有した。このグループの残りは、血液、または正常対照とクラスタリングされた。

30

【0215】

悪性被験体由来の遠位良性と、12人の症状はあるが悪性ではない患者の良性腺とを比較した統計分析を行った。悪性患者は31人であり、症状はあるが悪性ではない被験者は12人であったことから、悪性患者からの12人の6グループのランダムサンプルを、12人の症状はあるが悪性ではない被験者に対して比較した。各6グループについてのカイ二乗分析を行った。結果を表1dに示す。各事例において、相違は0.01レベルで有意であり、これは、悪性被験者における遠位良性組織からのミトコンドリア配列と、症状はあるが悪性ではない被験者からのミトコンドリア配列との相違が99%の確率で偶然ではないことを意味する。分析は、上記4つのコード領域中に見出された突然変異の数に基づいた。

40

【表 1 d】

表 1d カイ二乗検定

1) 第1セットの DB - 426, 456, 450, 449, 380, 501, 386, 456, 466, 378, 457, 504	
2) 第2セットの DB - 377, 105, 451, 417, 501, 456, 426, 498, 382, 461, 384, 464	
3) 第3セットの DB - 467, 208, 466, 505, 452, 458, 105, 498, 380, 463, 208, 377	
4) 第4セットの DB - 416, 504, 457, 466, 382, 452, 460, 450, 498, 386, 418, 501	10
5) 第5セットの DB - 456, 452, 461, 505, 464, 460, 378, 455, 417, 505, 449, 349	
6) 第6セットの DB - 463, 426, 498, 349, 455, 466, 452, 380, 386, 461, 450, 460	
組織 ND1 ND2 COI CYTB Xi-二乗	
症状あり 0 0 0 1	
第1セット 10 8 12 7 35.14	
第2セット 3 6 14 9 30.11	
第3セット 4 2 7 8 19.12	20
第4セット 3 4 7 11 23.09	
第5セット 4 5 10 8 25.12	
第6セット 4 1 5 9 17.11	

症状のある患者- 12; 遠位良性- 各 12 の 6 ランダムセット

【 0 2 1 6 】

実施例 2 : 日光曝露された皮膚由来のmtDNAの非コード領域における重複

DNAは、Qiagen社からのDNeasy™キットを用いて、実施例 1 に記載のように組織サンプルから抽出した。「背中合わせ」プライマー手法を用いて、日光曝露に関連した非コード領域(NCR)中のタンデム重複の発生率を調べた。32の年齢マッチングされた、日光曝露された(n=24)および日光保護された身体部位(n=10)からの分割ヒト皮膚サンプルを調べた。

【 0 2 1 7 】

Brockingtonら 1993およびLeeら 1994からの次の重複プライマーを使用した:

C	L336	AAC ACA TCT CTG CCA AAC CC	20 mer	配列番号1
D	H335	TAA GTG CTG TGG CCA GAA GC	20 mer	配列番号2
E	L467	CCC ATA CTA CTA ATC TCA TC	20 mer	配列番号3
F	H466	AGT GGG AGG GGA AAA TAA TG	20 mer	配列番号4

【 0 2 1 8 】

プライマーの対であるC/DおよびE/Fは、非コード領域中の 2 つの別のセットの直接反復の部位において「背中合わせ」である。その結果、これらのプライマーは、これらの箇所において重複が存在する場合にのみ産物を生じる。生じる産物は、260 bpおよび / またはさほど一般的ではない200bp変種である。改変PCR条件は、100ng 合計細胞性DNA、200 μM dNTP、2.5 U HotStarTaqポリメラーゼおよびPCRバッファー (Qiagen, Uk)、25 pmoleのプライマー: 94 にて4分を 1 サイクル、94 × 1分、55 × 1分、72 × 1分を36サイクルならびに72 × 7分を 1 サイクル、というものである。

【 0 2 1 9 】

日光曝露の増大に伴い、重複の発生率の増大が観察され、このとき、日光曝露されたおよび日光保護された皮膚からのサンプルの、それぞれ10/24と0/10から重複が同定された(フィッシャーの直接確率検定、p=0.01 5) (Birch-Machin and Krishnan 2001)。最も頻

10

20

30

40

50

繁な重複のサイズは、200および260塩基対であった。興味深いことに、これらの同じサンプルはまた、高レベル(>1%)の4977bp共通mtDNA欠失を有し、このことは実施例6に記載の確立された定量的3-プライマーPCRアッセイにより決定された。

【0220】

実施例3：ヒトNMSCおよびその前駆病巣中のmtDNAの突然変異フィンガープリント

DNAは、Qiagen社からのDNeasy™を用いて、実施例1に記載のようにヒト皮膚組織サンプルから抽出した。特異的プライマーを用いて、PCRによりmtDNAを増幅し、次いでDNAサンプル調製(Qiagen)の後に、突然変異を自動配列決定(PE Applied Biosystems)によりBig Dye™ Terminator Cycle配列決定を用いて同定した。この方法論はHealyら 2000; Hardin 10
gら 2000に記載されている。16,569bpヒトミトコンドリアゲノム全体を、偽遺伝子や他の核遺伝子座を増幅しないことの知られている、確立されたPCRプライマー対を用いて配列決定した。あらゆる推定上のDNA変化は、改訂された「ケンブリッジ」ヒトmtDNA参照(Andrewsら 1999)との比較により確認した。腫瘍mtDNAから得られた配列を、最初に既知の多型(Andrewsら 1999; MITOMAP)について比較し、次いで正常病変部近傍皮膚からのmtDNA配列と比較して、本物の体細胞変異を同定した。

【0221】

DHPLCは、完全自動化スクリーニング手法を提供するWAVE™ DNA Fragment Analysis System (Transgenomic, Omaha, USA)を用いて行った。同じ技術を用いて皮膚腫瘍mtDNA中のヘテロプラズミック突然変異をスクリーニングした。

【0222】

実施例2に記載の背中合わせプライマー方法論を用いて、非コード領域(NCR)中の超可変セグメント中のDNA長さの突然変異(すなわちタンデムな重複)のパターンを迅速にスクリーニングする。

【0223】

実施例4：ヒトNMSCおよびその前駆病変中のミトコンドリアゲノム全体の欠失スペクトル

扁平上皮細胞癌(SCCS)、基底細胞癌(BCCS)およびボーエン病や光線性角化症(As)のような推定上の前駆病巣におけるMtDNA損傷を、種々の日光曝露された身体部位から採取された隣接病変部近傍の皮膚と比較した。長型伸長PCR技術(LX-PCR)(Rayら 1998)を用いてミトコンドリアゲノム全体を増幅することにより、mtDNAの欠失スペクトル全体を決定した。無数の具体的な欠失がミトコンドリアゲノム中に生じることが観察された。全ての欠失が非黒色腫皮膚癌と相関するわけではないが、しかし、正確な診断方法のためには、この疾患と実際に関連する欠失を知っておく必要がある。

【0224】

DNAは、製造者の指示に従い、市販のキット(Qiagen社)を用いて抽出する。ミトコンドリアゲノム全体は、Expand™ Long Template PCR System™ (Boehringer Mannheim, Switzerland)を用いて、2つの別の反応において増幅する。使用するPCRプライマーはKleinleら(1997)が記載したものであり、ケンブリッジ配列(Andrewsら 1999)の次の領域をカバーする：DIA(ヌクレオチド(nt) 336~363)、DIB(nt 282~255)、OLA(nt 5756~5781)、およびOLB(nt 5745~5781)。これらの巨大産物は核偽遺伝子の増幅を除外する。プライマーの配列は次のとおりである：

DIAF: (336-363) 5' AACACATCTCTGCCAAACCCCAAAAACA 3' 配列番号5

OLBR: (5745-5721) 5' CCGGCGGCGGGAGAAGTAGATTGAA 3' 配列番号6

OLAF: (5756-5781) 5' GGGAGAAGCCCCGGCAGGTTTGAAGC 3' 配列番号7

DIBR: (282-255) 5' ATGATGTCTGTGTGGAAAGTGGCTGTGC 3' 配列番号8

【0225】

増幅は、16 pmolの各プライマー、500 μmol dNTP、22.5mM MgCl₂と界面活性剤を有する10×PCRバッファー(キット)、0.75 μlの酵素(3.5×10³ units/ml)および50~200ngの全DNAを含有する50 μl反応中で行った。1つの反応はゲノムの11,095bpセグメントを生成し、別の反応は5,409bp長さのセグメントを生じる(例えばKleinleら, 1997)。PCR増幅条件は、93℃にて1分30秒の変性段階、それに次ぐ10サイクルの93℃にて30秒、60℃にて30秒お

10

20

30

40

50

よび68 にて12分、それに続くさらに20サイクルの同じプロファイルに各サイクルに5秒の追加の伸長時間を追加したものから構成される。93 にて30秒、60 にて30秒および68 にて26分の伸長時間という最終サイクルがある。再現性を保証するために、既知量のDNAを1%アガロースゲル上で分離し、少なくともそれと同じ量のDNAを有するサンプルのみを分析対象に加えた。

【0226】

表2に示すように、腫瘍サンプルにおけるUV曝露の増加に伴い、より大きな平均数の欠失が見られた。

【表2】

表2 種々のUV曝露身体部位から得られた正常皮膚と腫瘍皮膚との間のmtDNAのLX-PCRにて観察された欠失の平均数の比較

UV 曝露	隣接正常表皮における欠失の平均数	表皮腫瘍における欠失の平均数
継続的 (n=5)	1.0	3.6
断続的 (n=2)	0	1.5
日光保護 (n=2)	0	0

【0227】

実施例5：老化とMtDNA

時間的な母系比較(すなわちひ孫から曾祖母まで)を用いて、所定の組織から抽出されたmtDNAの配列全体を、迅速にそして正確に配列決定し、そのことにより、その具体的分子のヌクレオチド塩基対の並びおよび時間と共に生じた可能性のある変化を、断定的に記載する。こうした特徴付けを、健康状態、および老化指標について、ならびにより大きな集団中の特定の母系の間で比較する。この組み合わせた情報は、同じ突然変異/欠失をもたらす別の原因同士の極めて重要な統計的識別を可能にし、また、バイオマーカーとして使用されるmtDNA配列が、その有効性を確立するための特異性と感度の必要な指標を有することを証明する。さらに、塩基対欠失および突然変異の比率を、4代の母系世代に渡る種々の組織における整合性について比較する。最近の方法論的発展は、血液サンプルにおける老化に関係する塩基対欠失の検出を可能にし(Bassamら 1991)、mtDNAを検査するために骨格筋のかわりに血液サンプルを使用する可能性を高めた(von Wurmbら1998)。mtDNA欠失および/または突然変異を代表するものとして、筋組織の代わりに白血球を用いる有効性を確立した後に、次のステップでは白血球中のmtDNAのみを測定する。次いでMtDNA欠失/突然変異を先に記載したように決定する。

【0228】

骨格筋または白血球を患者から採取する。DNAを実施例1に記載のようにして抽出する。次のプライマーを使用した：

12ST1: (1257-1279) 5' TATACCGCCATCTTCAGCAAAC 3' 配列番号9

12ST2: (1433-1411) 5' TACTGCTAAATCCACCTTCGAC 3' 配列番号10

D1F: 5' CCTTACACTATTCCTCATCACC 3' 配列番号11

D1R: 5' TGTGGTCTTTGGAGTAGAAACC 3' 配列番号12

【0229】

増幅は、2.0 μmolの各プライマー、250 μmol dNTP、10×PCRバッファー(Thermopol 反応バッファー)、ウシ血清アルブミン、0.5単位のDeep ventポリメラーゼおよび50~200ngの全DNAを含む50 μl反応にて行った。PCR増幅条件は、95 にて5分の変性段階(ホットスタート)、それに続く30サイクルの94 にて30秒、60 にて60秒および72 にて30秒、ならびに72 にて10分の最終伸長からなる。ゲル電気泳動は2%アガロースゲルを用いて、125ボルトにて60分行い、臭化エチジウムを用いて染色し、UV光の元で可視化した。再現性を保証するために、既知量のDNAを2%アガロースゲル上で分離し、それと同じ量のDNAを有するサンプルのみを分析に加えた。

【0230】

実施例 6 : 3-プライマーPCRによる4977bp共通mtDNA欠失の定量的検出

適当な場合には、共通欠失の発生率は、1~5%より大きいレベルを検出する3-プライマーPCR法、または1%未満から 10^{-4} %未満のレベルを検出する希釈PCR法により定量的な様式で決定する(実施例7を参照されたい)。実施例1に記載のようにサンプルを取得し、DNAを抽出する。DNAサンプル中の欠失型および野生型(wt)mtDNAの両方を同時に検出しその比率を定量するためには、3-プライマーPCR法を用いる(Birch-Machinら1998に記載)。プライマーAおよびCは、それぞれ重鎖位置13720~13705および9028~9008に対応する(Andersonら, 1981);プライマーBは軽鎖位置8273~8289に対応する。プライマーCは、共通欠失内のmtDNA領域にマッピングされ、これに対してプライマーAおよびBは欠失領域に隣接する。したがってプライマーBとCはwt-mtDNAのみを増幅し、プライマーAとBは欠失型mtDNAのみを増幅する(欠失が不在の場合の2つのプライマーの間の距離は約5.5kbであり、以下に記載のここでのPCR条件下で増幅されるには長すぎる)。

【0231】

3種のプライマーを用いることにより、2つのバンドの同時検出が可能となったが、そのうちの大きいバンド(755bp)はwt-mtDNAに対応し、小さいバンド(470bp)は「共通欠失」を保有する欠失型mtDNAに対応する。PCR反応混合物(合計容積25 μ l)は、100ng合計細胞性DNA、200 μ M dNTP、10mM Tris-HCl (pH 8.8)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.1% Triton X-100、2.5U Taq DNAポリメラーゼ(BioTaq, BiolineUK Limited, London)、25 pmoleのプライマーAおよびB、6.25 pmoleのプライマーCおよび3 μ Ciの[γ -³²P]-dATPを含んでなるものであった。PCR条件は、25サイクルの、94℃にて1分、55℃にて1分、72℃にて2分、および最終伸長として72℃にて15分というものであった。次にこれらのPCR産物を、6%非変性ポリアクリルアミドゲルを通して電気泳動し、放射性PCR断片を、ImageQuant™ソフトウェア(Molecular Dynamics, Chesham UK社)を用いた蛍光イメージ分析により定量した。

【0232】

実施例 7 : 低レベル(<1%)の共通mtDNA欠失を定量的に検出するための連続希釈PCR法

半定量的PCR法(Corral-Debrinskiら 1991)を用いて、組織/細胞サンプルから抽出された全mtDNA中の共通欠失の割合を推算する。実施例1に記載のように、生物学的サンプルを用意しDNAを抽出する。DNAサンプルは、最初に、制限酵素Bam HI (1 μ l酵素および1 μ lの市販バッファー)を37℃にて90分用いて線状化する。連続希釈は2倍にするステップとして行い(全mtDNAについては最初の10倍希釈が行われた)、その後、各希釈物(1 μ l)についてPCRを次のプライマーを用いて行った：

全mtDNA用のプライマー

L3108 (nt3108-3127)

H3717 (nt3717-3701)

共通欠失用のプライマー

L8282 (nt8282~8305)

H13851(nt13851~13832)

【0233】

反応条件は次のとおりである：94℃にて2分を1サイクル、94℃にて45秒、51℃にて30秒(全mtDNA)、56℃にて30秒(共通欠失)、72℃にて1分を34サイクル、および72℃にて8分の最終サイクル1つ。すべてのPCR反応は次の混合物(50 μ l)中で行う：サンプルDNA 1 μ l、0.6 μ M フォワードプライマー、0.6 μ M リバースプライマー、0.2mM dNTP、5 μ l GeneAmp(登録商標)10 \times PCRバッファー(Perkin Elmer社)、0.2 μ l Amplitaq(登録商標)DNAポリメラーゼ(Perkin Elmer社)、35.75 μ lオートクレーブ滅菌済み再蒸留水。

【0234】

電気泳動の後に、PCR産物をUVトランスイルミネーター(TMW-20, Flowgen Ltd., Lichfield, UK)上で可視化し、画像収集装置(Alpha Imager 2000, Alpha Innotech Corporation社製、Flowgen Ltd., Lichfield, UKにより供給)を用いてゲルのデジタル画像を得る。付随する画像解析ソフトウェア(Alpha Ease バージョン3.3, Alpha Innotech Corp.)は希釈系列の各PCR産物について積分光学密度(IOD)の計算を可能にする。全mtDNAおよび欠失

型mtDNAの両方について、IOD値がゼロであるバンドを得て、対応する希釈値を用いてサンプル中の共通欠失のパーセンテージを計算する。したがって：

$$\text{共通欠失\%} = \frac{\text{全mtDNA希釈係数}^{(\text{IOD Zero})} \times 100}{\text{共通欠失希釈係数}^{(\text{IOD Zero})}}$$

【 0 2 3 5 】

実施例 8：変性高速液体クロマトグラフィー (DHPLC)

実施例 1 に記載のようにして、サンプルを取得しDNAを抽出する。2 種類の異なるPCR条件を用いた13の重なり合う断片のPCRはvan den Boschら(2000)に記載のとおりであった。PCRには次の3つのmtDNA特異的プライマー対を用いた：

オリゴ配列

Mt3118F CCCTGTACGAAAGGACAAGAG 配列番号13
 Mt3334R TGAGGAGTAGGAGGTTGG 配列番号14
 Mt8207F CCCATCGTCCTAGAATTAATTCC 配列番号15
 Mt8400R ATGGTGGGCCATACGGTAG 配列番号16
 Mt14427F CCCATGCCTCAGGATACTCCTC 配列番号17
 Mt14997R GCGTGAAGGTAGCGGATG 配列番号18

【 0 2 3 6 】

1 ~ 2 kb PCR産物を90 ~ 600bpの断片に消化し、その最適融解温度にて解離させる。突然変異は2つのピークとして表され、<2%ヘテロプラズミーのようなパーセンテージの低い突然変異はピーク中の「肩」として表される。

【 0 2 3 7 】

DHPLCは、2 種類の溶離液からなる移動相を用いて行う(pH 7.0)。バッファーAは酢酸トリエチルアンモニウム(TEAA)を含有し、これはDNA上の負電荷を有するリン酸基およびカラムの表面の両方と相互作用する。バッファーBは25%の変性剤アセトニトリルを有するTEAAを含む。断片は、一定の流速で線形のアセトニトリル勾配を用いて溶出させた。アセトニトリルの濃度を増加させると断片が変性する。下の表3は、製造者の説明書に従いWAVEMAKER ソフトウェア(Transgenomics)を用いて作製した、PCR反応のDHPLCの標準的方法の例である。

【表 3】

表 3: DHPLC 用の標準法

ステップ	時間	A(バッファー)%	B(バッファー)%	Ml/分 (流速)
ローディング	0.0	52	48	0.90
開始勾配	0.1	47	53	
停止勾配	4.1	39	61	
開始クリーン	4.2	0	100	
停止クリーン	4.7	0	100	
平衡化開始	4.8	52	48	
平衡化停止	6.8	52	48	

【 0 2 3 8 】

種々のヘテロ二本鎖を上手く分離する温度を以下に詳述するが、これは表2中の該当する箇所に単純に代入することができる：

断片 融解温度() バッファーB%の勾配

Mt3118F 59 51 ~ 59

Mt8207F 58 50 ~ 58

Mt14427F 56 60 ~ 68

【 0 2 3 9 】

実施例 9

49の前立腺針生検患者(46人は悪性腫瘍と診断された)からのmtDNA D-ループ配列の広範囲な調査から、患者血液のミトコンドリアDNAと比較して、良性前立腺肥大(BPH)、入手可能なグリーソンのグレードおよびストロマを含む全ての前立腺組織においてmtDNA突然変異が存在することが実証された。さらに、31人の前立腺切除術を受けた患者からのミトコンドリアゲノムの拡張研究は、マッチングさせた悪性腺、隣接良性腺(悪性腺のそば)、お

よび遠位良性腺(あらゆる悪性病理を除去した、悪性病理を含まない組織中に位置する)における、あいまいな超変異量(Chenら 2002; Chenら 2003)を実証するが、これは表4に示すとおりである。表4の突然変異はまた、置換を記載した配列番号102、欠失を記載した配列番号103~109、および挿入を記載した配列番号110~138において提供される。多型および突然変異位置は、改訂されたケンブリッジ参照配列(Revised Cambridge Reference Sequence)(2001)との比較により決定したが、しかしながら歴史的ナンバリングを維持し、そのため位置3106における欠失はギャップとして表され、レアな多型750Aは保持された。塩基のナンバリングは、合計16569の塩基位置を有する改訂されたケンブリッジ参照配列(Revised Cambridge Reference Sequence)に基づく。図1に、ミトコンドリアゲノムの位置についての突然変異の数を表すヒストグラムを示す。図1に見られるとおり、突然変異はmtDNAゲノム全体に渡り、および、全ての疾患前立腺に存在する。しかしながら、特定の「ホットスポット」も明確であり、例えばD-ループ領域および16s領域において認められた。これらのデータセットは、資格のある病理学者がルーチンな組織学的方法および等付け標準を用いて割り当てた悪性または良性組織との指定が、早期疾患進行を同定するものではないことを示す。このことは、細胞の形態学的特性が変更される前から、細胞レベルで悪性形質転換が始まっていることを強く示唆する。重要なこととして、突然変異パターンは、個別の患者からのマッチングさせた前立腺組織について、または別の患者との比較においてまったく一貫せず、このことは悪性細胞のクローン性増殖が生じうるあり得る組織部位を示している可能性がある。その上、同じ個体からのグリーンソンスコアが同じである別の針生検材料は、ほとんど必ず別のmtDNA突然変異パターンを示す。このことは、特定の突然変異部位ではなく合計突然変異量が、この疾患および疾患の進行をより表していることを示す。

【0240】

このデータは、前立腺癌を有することの知られている個体、および進行した段階にあることの知られている前立腺切除術グループの個体から収集されたため、組織学的に良性の組織は、新形成および悪性腫瘍に向かうありうる進行と関連する何らかの細胞内形質転換を経て高い可能性が高い。mtDNA突然変異を有する良性組織は、「バイオセンサー」の役割を果たし、これは、疾患進行の速度を示す、突然変異増大についてモニタリングすることができる。この速度はまた腫瘍侵襲性を示しうる。その上、ある具体的な療法の有効性もまた、この突然変異パターンの変化に基づきモニタリングすることができる。

【0241】

この技術は、良性針生検の確認検査として使用することができる。現在は、患者の前立腺に針生検が行われ、その組織が見かけ上組織学的に良性である場合、彼は帰宅を許され、通常は6カ月後に追跡針生検を行うことが予定される。上記方法を用いて、既に採取された針生検組織を検査すると、その組織が分子レベルにおいても良性であることが確認されるか、さもなければ針生検法により場所的に見逃された悪性腫瘍が実際には前立腺中に存在する、またはその組織が分子レベルでは前新生物または新生物であるとの証拠が発見される。このことは、潜在的には、多くの人間が複数の手術を受けずに済むようにするかまたは早期予防性治療を可能にする。

【表 4】

表 4

塩基突然変異:ホモプラズミックからホモプラズミックへ、ホモプラズミックからヘテロプラズミックへ、およびヘテロプラズミックからホモプラズミックへの観察された突然変異

* 最初のヌクレオチドは正常ヌクレオチドを表し、「-」により分けられた突然変異ヌクレオチドがそれに続く。

*血液が存在しない場合には、それを「X」として表す。

** BP 3106 における欠失をギャップとして表し、レアな多型 750A を保持した歴史的ナンバリング

BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ-ホモ	ホモ-ヘテロ	ヘテロ-ホモ	BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ-ホモ	ホモ-ヘテロ	ヘテロ-ホモ
10	10	T-C	T-T/C		200	200	A-G	A-A/G	
31	31		C-C/T		204	204	T-C	T-T/C	
								C-C/T	
41	41	C-T	C-C/T		205	205		A-A/G	
55	55	C-T			207	207		A-A/G	
57	57	A-T					G-A	G-G/A	
61	61		C-C/T		208	208		T-T/C	
64	64	C-T			214	214		A-A/G	
72	72	C-T	C-C/T		217	217	C-T		
		T-C	T-T/C		222	222	C-T		
73	73	A-G	A-A/G		225	225	A-G	A-A/G	
81.1	81.1	INS T			226	226	C-T	C-C/T	
93	93		G-G/A		228	228	A-G	A-A/G	
94	94		A-A/G					G-G/A	
104	104		C-C/T		229	229	G-T		
113	113		C-C/T		234	234		A-A/G	
119	119		C-C/T		235	235	A-G		
128	128	C-T						G-G/A	
146	146	C-T	C-C/T		239	239	T-C		
		T-C	T-T/C		247	247		G-G/A	
150	150	C-T	C-C/T		248	248	DEL A		
		T-C	T-T/C		262	262		C-C/T	
152	152	C-T	C-C/T		263	263		G-G/T	
		T-C	T-T/C				A-G	A-A/G	
153	153	A-G	A-A/G		264	264	T-C		
		G-A	G-G/A		277	277		C-C/T	
170	170		C-C/T		280	280		C-C/T	
182	182	C-T	C-C/T		295	295	T-C	T-T/C	
185	185	G-A	G-G/A		297	297	G-A	G-G/A	
			A-A/G		303.1	303.1	INS C		
			G-G/T		303.2	303.2	INS C		
188	188	A-G			305	305		C-C/T	
		G-A	G-G/A		309	309		T-T/C	
189	189	A-G	A-A/G					C-C/T	
		G-A	G-G/A		309	309	DEL C		
192	192	T-C			309.1	309.1	INS C		
194	194	T-C	T-T/C		309.2	309.2	INS C		
		C-T			309.3	309.3	INS C		

BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロー－ホモ	BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロー－ホモ
195	195	C-T	C-C/T		310	310	DEL C	T-T/C	T/C-T
			T-T/C				DEL T	C-C/T	
196	196	T-C			311	311		C-C/T	
198	198		C-C/T		311.1	311.1	INS C		
199	199		T-T/C		312	312		C-C/T	
			C-C/T		313	313		C-C/T	
200	200	G-A	G-G/A						

【 0 2 4 3 】

BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ-ホモ	ホモ-ヘテロ	ヘテロ-ホモ	BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ-ホモ	ホモ-ヘテロ	ヘテロ-ホモ
315.1	315.1	INS C			1719	1719		A-A/G	A/G-A
315.2	315.2	INS C			1761	1761			A/T-A
323	323		G-G/A		1766	1766			C/T-T
325	325	C-T	C-C/T		1811	1811	G-A	G-G/A	
329	329	G-T			1842	1842			A/G-A
394	394		C-C/T		1883	1883			A/G-G
416.1	416.1	INS G/A			1888	1888	G-A	G-G/A	A/G-G
419	419		A-A/G						A/G-A
456	456	C-T			2005	2005			C/T-C
			T-T/C		2056	2056			A/G-G
462	462	T-C			2068.1	2068.1	INS A		
465	465		T-T/C		2075	2075			T/G-T
468	468		C-C/T		2257	2257			C/T-C
477	477	C-T			2258	2258			A/G-A
481	481	C-T	C-C/T		2259	2259	T-C		
482	482	C-T			2261	2261		C-C/T	
489	489	C-T	C-C/T		2280	2280			C/T-C
497	497	T-C	T-T/C		2351	2351			C/T-T
499	499	A-G			2352	2352			C/T-T
501	501		C-C/T		2357	2357			C/T-C
505	505		C-C/T		2359	2359			C/T-C
506	506			C/T-C	2389	2389			C/T-C
508	508	G-A			2596	2596		G-G/A	
513	513	A-G			2627	2627		G-G/A	
513	513	DEL A			2657	2657	C-T		
514.1	514.1	INS C			2683	2683		C-C/T	
515	515		A-A/G		2689	2689		C-C/T	
515	515	DEL A			2706	2706	A-G	A-A/G	
515.1	515.1	INS A			2761	2761	C-T		
517	517		T-T/A		2857	2857		C-C/T	
523	523		A-A/G		2885	2885		C-C/T	
523	523	DEL A			2927	2927	C-T		
523.1	523.1	INS C			2948	2948	C-T		
523.2	523.2	INS A			2952	2952			C/T-T
523.3	523.3	INS C			3010	3010	A-G	A-A/G	
523.4	523.4	INS A							
533	533	A-G	A-A/G		3013	3013		G-G/A	
536	536		C-C/T		3036	3036			A/G-G
567.1	567.1	INS C			3040	3040			A/G-G
568.1	568.1	INS C			3046	3046			C/T-C
568.2	568.2	INS C							
709	709		A-A/G		3308	3307		T-T/C	
			G-G/A		3338	3337			C/T-T
785	785		C-C/G		3349	3348			A/G-A
857	857	G-C			3394	3393	C-T		
909	909		G-G/A		3398	3397	T-C		

BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロ－ホモ	BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロ－ホモ
1189	1189		C-C/T		3469.1	3468.1	INS T		
1247	1247		G-G/A		3480	3479	G-A		
1431	1431		G-G/A		3499	3498			A/G-A
1693	1693	C-T			3507	3506	C-A		
1709	1709			A/G-G	3589	3588		C-C/T	
1719	1719			A/G-G	3594	3593		C-C/T	

【 0 2 4 5 】

BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ-ホモ	ホモ-ヘテロ	ヘテロ-ホモ	BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ-ホモ	ホモ-ヘテロ	ヘテロ-ホモ
3657	3656	C-T			5663	5662		C-C/T	
3666	3665	G-A			5677	5676	C-T		
3688	3687		G-G/A		5882	5881		C-C/T	
3693	3692		G-G/A		5897	5896		C-C/T	
3744. 1	3743. 1	INS T			5984	5983	A-G	A-A/G	
3908	3907	C-T			5985	5984		A-A/G	
3966	3965		C-C/T		5999	5998	C-T		
3969	3968	C-T			6009	6008		C-C/T	
3992	3991	C-T			6028	6027			A/G-G
4017	4016	C-T			6037	6036		G-G/A	
4185	4184	C-T			6041	6040		C-C/T	
4216	4215	T-C	T-T/C		6047	6046	G-A		
4217	4216		A-A/G		6059	6058		C-C/T	
4239	4238	C-T			6147	6146	C-T		
4418	4417		C-C/T		6219	6218		C-C/T	
4561	4560	C-T			6221	6220		C-C/T	
4569	4568		G-G/A		6224	6223		C-C/T	
4580	4579		A-A/G		6307	6306		A-A/G	
4591	4590		T-T/C		6314	6313		C-C/T	
4646	4645	C-T			6382	6381	G-A		
4655	4654		A-A/G		6548	6547		C-C/T	
4703	4702		C-C/T		6553	6552		C-C/T	
4716	4715		C-C/T		6557	6556		C-C/T	
4722	4721		A-A/G		6579	6578	G-A		
4733	4732		C-C/T		6643	6642		T-T/C	
4735	4734		C-C/T		6667	6666		C-C/T	
4787	4786	G-A	G-G/A		6686	6685	T-C		
4826	4825		C-C/T		6691	6690	G-A		
4864	4863		C-C/T		6776	6775	C-T	C-C/T	
4892	4891		C-C/T				T-C	T-T/C	
4917	4916	A-G	A-A/G		6827	6826		T-T/C	
			G-G/A		6912	6911		G-G/A	
4951	4950		C-C/T		6917. 1	6916. 1	INS T		
5036	5035		A-A/G		6953	6952	G-A		
5046	5045		G-G/A		6989	6988		A-A/G	
5102	5101		A-A/G		7007	7006	C-T		
5147	5146	G-A	G-G/A		7013	7012		G-G/A	
			A-A/G		7028	7027	C-T	C-C/T	
5174	5173		C-C/T					T-T/C	
5198	5197		G-G/A		7055	7054		A-A/G	
5213	5212		C-C/T		7059	7058		G-G/A	
5300	5299		C-C/T		7146	7145		A-A/G	
5312	5311		C-C/T		7159	7158		T-T/C	
5371	5370		C-C/T		7184	7183	G-A	G-G/A	
5424	5423		C-C/T		7256	7255		C-C/T	
5440	5439		C-C/T		7309	7308		T-T/C	
5456	5455		C-C/T		7389	7388		T-T/C	

10

20

30

40

BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロ－ホモ	BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロ－ホモ
5593	5592		T-T/C		7406.1	7405.1	INS C		
5633	5632		T-T/C		7407	7406	T-C	T-T/C	
5650	5649		G-G/A		7412	7411			(C/T)/ (C/T)
5655	5654		T-C/T		7476	7475		T-T/C	
5656	5655	A-G	A-A/G		7521	7520		G-G/A	

【 0 2 4 7 】

BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ 消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロ－ホモ	BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置 ギャップ 消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロ－ホモ
7756	7755		C-C/T		10295	10294		G-G/A	
7763	7762		G-G/A		10345	10344		T-T/C	
7768	7767	G-A	A-A/G		10355	10354		C-C/T	
7815	7814		C-C/T		10439	10438		C-C/T	
7867	7866		C-C/T		10455	10454		G-G/A	
7897	7896	G-A			10463	10462	T-C	T-T/C	
8027	8026	G-A							
8065	8064			G/A-G	10550	10549		G-G/A	
8117	8116		C-C/T		10679	10678	G-A		
8133	8132		C-C/T		10685	10684		A-A/G	
8248	8247		A-A/G		10688	10687		G-G/A	
8270	8269	C-T	C-C/T		10754	10753	A-C		
8426.1	8425.1	INS G			10810	10809	T-C	T-T/C	
8468	8467		C-C/T		10819	10818		G-G/A	
8616	8615		A-A/G		10873	10872		C-C/T	
8655	8654		C-C/T				T-C	T-T/C	
8697	8696	G-A	G-G/A		10882	10881	C-T		
8701	8700		A-A/G		10885	10884	C-T		
8718	8717	A-G			10944	10943		C-C/T	
8818	8817		T-T/C		10956	10955		X-C/T	
8893	8892	A-T			10972	10971	G-A	G-G/A	
8903	8902		C-C/T		10975	10974		C-C/T	
9055	9054	A-G			10978	10977		A-A/G	
9093	9092		G-G/A		9667	9666	G-A		
9132	9131	A-G			9696	9695		C-C/T	
9163	9162	A-G	A-A/G		9698	9697	C-T	C-C/T	
9313	9312		A-A/G		9716	9715	C-T		
			A-A/C		9767	9766	C-T		
9327	9326		A-A/G		9778	9777		G-G/A	
9352	9351		C-C/T		9899	9898	C-T		
9405	9404		T-T/C		10143	10142	A-G		
9413	9412		T-T/C		10295	10294		G-G/A	
9419	9418		C-C/T		10345	10344		T-T/C	
9445	9444		G-G/A		10355	10354		C-C/T	
9477	9476	G-A	G-G/A		10439	10438		C-C/T	
9502	9501	G-A			10455	10454		G-G/A	
9540	9539		C-C/T		10463	10462	T-C	T-T/C	
9548	9547	A-G							
9554	9553		G-G/A		10550	10549		G-G/A	
9559	9558		C-C/T		10679	10678	G-A		
9564	9563		G-G/A		10685	10684		A-A/G	
9574	9573		C-C/T		10688	10687		G-G/A	
9591	9590		G-G/C		10754	10753	A-C		
9628	9627		G-G/A		10810	10809	T-C	T-T/C	
9667	9666	G-A			10819	10818		G-G/A	
9696	9695		C-C/T		10873	10872		C-C/T	
9698	9697	C-T	C-C/T				T-C	T-T/C	

BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ 消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロ－ホモ	BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置 ギャップ 消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロ－ホモ
9716	9715	C-T			10882	10881	C-T		
9767	9766	C-T			10885	10884	C-T		
9778	9777		G-G/A		10944	10943		C-C/T	
9899	9898	C-T			10956	10955		X-C/T	
10143	10142	A-G			10972	10971	G-A	G-G/A	

【 0 2 4 9 】

BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロ－ホモ	BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロ－ホモ
10975	10974		C-C/T		13398	13397		A-A/G	
10978	10977		A-A/G		13431	13430		C-C/T	
11001	11000		A-A/G		13436	13435		C-C/T	
11013	11012		X-C/T		13468	13467		C-C/T	
11024	11023		T-T/C		13476	13475		A-A/G	
			C-C/T		13484	13483		T-T/C	
11069	11068		A-A/G		13487	13486		C-C/T	
11084	11083		A-A/G		13506	13505		C-C/T	
11113	11112	T-C	T-T/C		13530	13529		C-C/T	
11177	11176		C-C/T		13536	13535		C-C/T	
11180	11179		G-G/T		13563	13562		A-A/G	
11195	11194		G-G/A		13573	13572		C-C/T	
11217	11216		C-C/T		13579	13578	G-A		
11251	11250	A-G	A-A/G		13609	13608		C-C/T	
		G-A	G-G/A					T-T/C	
11299	11298	C-T	C-C/T		13617	13616	C-T	C-C/T	
11332	11331		T-T/C				T-C	T-T/C	
11337	11336		G-A/G		13634	13633		G-G/A	
11351	11350		G-A/G		13650	13649		C-C/T	
11356	11355		T-T/C		13621	13620			T/C-C
11377	11376		A-A/G		13631	13630		C-C/T	
11420	11419		G-G/A		13637	13636		G-G/A	
11647	11646	C-T			13638	13637		A-A/G	
11719	11718	G-A	G-G/A		13651	13650		A-A/G	
11812	11811	A-G	A-A/G		13655	13654		T-T/C	
11852	11851		G-G/A		13674	13673	C-T		
					13674	13673	DEL C		
11857	11856		C-C/T		13680	13679		T-T/C	
11864	11863	C-T	C-C/T		13687	13686		C-C/T	
11881	11880		C-C/T		13707	13706		G-G/A	
11907	11906		T-T/C		13708	13707		A-A/G	
11914	11913		G-G/A					G-G/A	
12012	12011		C-C/T		13711	13710		G-G/A	
12013	12012			A/G-A	13712	13711		C-C/T	
12308	12307		G-G/A		13725	13724		C-C/T	
12372	12371		G-G/A		13731	13730		A-A/G	
			A-A/G		13734	13733		C-C/T	
12492	12491		T-T/A		13743	13742		T-T/C	
12624	12623	C-T			13748	13747		A-A/G	
12633	12632	A-C	A-A/C		13759	13758		G-G/A	
12654	12653		G-G/A					A-A/G	
12810	12809		G-G/A		13766	13765		C-C/T	
12959	12958		C-C/T		13788	13787		C-C/T	
13079	13078			A/G-A	13789	13788		T-T/C	
13089	13088	T-A			13805	13804		C-C/T	
13105	13104		A-A/G		13841	13840		T-T/C	
13111	13110	T-C			13880	13879		C-C/A	

10

20

30

40

BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロ－ホモ	BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロ－ホモ
13212	13211		C-C/T		13888	13887	X-T	X-C/T	
13281	13280		T-T/C		13911	13910		G-G/A	
13294	13293		A-A/G		13933	13932		A-A/G	
13359	13358		G-G/A		14025	14024		C-C/T	
13368	13367	G-A	G-G/A		14044	14043		C-C/T	
		A-G	A-A/G		14135	14134		T-T/A	

【 0 2 5 1 】

BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ-ホモ	ホモ-ヘテロ	ヘテロ-ホモ	BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ-ホモ	ホモ-ヘテロ	ヘテロ-ホモ
14139	14138		G-G/A		15889	15888		T-T/C	
14167	14166		T-T/C		15904	15903	T-C	T-T/C	
14178	14177		T-T/C					C-A/C	
14182	14181	T-C	T-T/C		15907	15906		G-G/A	
14203	14202		A-A/G		15927	15926	A-G		
14220	14219	X-G	X-G/A		15928	15927	A-G	A-A/G	
14233	14232	A-G	A-A/G				G-A	G-G/A	
14281	14280	T-C	T-T/C		15998	15997			A/T-A
			C-C/T		15999. 1	15998. 1	INS T		
14899	14898		G-G/A		16048	16047		G-G/A	
14903	14902	G-A	X-A/G		16051	16050		A-A/G	
14918	14917		G-G/A					G-G/A	
15043	15042		G-G/A		16063	16062		C-C/T	
15115	15114		T-T/C		16067	16066		C-C/T	
15162	15161		C-C/T		16069	16068		C-C/T	
15218	15217	G-A	G-G/A		16093	16092	X-C	T-T/C	
15244	15243		G-G/A				C-T	C-C/T	
15265	15264		C-C/T		16095	16094	C-T	C-C/T	
15286	15285		C-C/T		16111	16110		T-T/C	
15301	15300		A-A/G		16126	16125	T-C	T-T/C	
15302	15301		C-C/T					C-C/T	
15307	15306		C-C/T		16129	16128	G-A	G-G/A	
15323	15322	A-G	A-A/G		16134	16133		C-C/T	
			G-G/A		16148	16147		C-C/T	
15324	15323		C-C/T		16153	16152		A-A/G	
15343	15342	X-C	X-C/T		16163	16162		G-G/A	
15355	15354	X-A	X-A/G		16172	16171		C-C/T	
15379	15378		C-C/T		16184	16183	C-T	C-C/T	
15384	15383	X-C	X-C/T				T-C		
15429	15428		A-A/G		16186	16185		T-T/C	
15452	15451	C-A	C-C/A		16189	16188	T-C	T-T/C	
		A-C	A-A/C				C-T	C-C/T	
15523	15522		C-C/T		16190	16189	T-C		
15525	15524		G-G/A		16192	16191		C-C/T	
15526	15525		C-C/T				T-C	T-T/C	
15527	15526		C-C/T		16209	16208		C-C/T	
15557	15556		G-G/A					T-T/C	
15587	15586		C-C/T		16223	16222		T-T/C	
15607	15606	A-G	A-A/G				C-T		
		G-A	G-G/A		16224	16223	C-T	C-C/T	
15670	15669		C-C/T					T-T/C	
15693	15692	C-T	C-C/T		16225	16224	C-T		
15698	15697		C-C/T		16235	16234		A-A/G	
15704	15703		C-C/A		16239	16238	C-T	C-C/T	
15708	15707		G-G/T				X-C		
15762	15761		G-G/A		16247	16246		G-G/A	
15812	15811		A-A/G		16256	16255		T-T/C	

BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロ－ホモ	BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロ－ホモ
15826.1	15825.1	INS G						C-C/T	
15834	15833		T-T/C		16270	16269	C-T	C-C/T	
15865	15864		A-A/G		16292	16291		C-C/T	
15884	15883	C-G	G-C/G		16294	16293	C-T	C-C/T	

【 0 2 5 3 】

BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロ－ホモ	BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロ－ホモ
			A-A/G		16296	16295	C-T	C-C/T	
16270	16269	T-C	T-T/C		16544	16543		T-T/C	
			C-C/T						
16278	16277	T-C							
16280	16279		A-A/G	A/G-A					
16290	16289		C-C/T						
			T-T/C						
16291	16290		C-C/T						
16292	16291		T-T/C						
16293	16292		A-A/G						
16294	16293		T-T/C						
		C-T	C-C/T						
16295	16294		C-C/T						
16296	16295	C-T	C-C/T						
			T-T/C						
16298	16297	C-T	C-C/T						
16303	16302		G-G/T						
16304	16303		T-T/C						
		C-T	C-C/T						
16311	16310	C-T	C-C/T						
		T-C	T-T/C						
16319	16318	G-A	G-G/A						
			T-T/C						
			A-A/G						
16320	16319		T-T/C						
16325	16324		C-C/T						
16344	16343	C-G							
16356	16355		C-C/T						
16342	16341	C-T	C-C/T						
16352	16351		T-T/C						
16353	16352		C-C/T						
16354	16353		T-T/C						
16355	16354		T-T/C						
16359.1	16358.1	INS G							
16360	16359		C-C/T						
16362	16361		C-C/T						
			T-T/C						
16370	16369		G-G/A						
16389	16388		G-G/A						
16390	16389	X-G	X-G/A						
16398	16397	A-G		G/A-G					
16399	16398	G-A		G/A-A					
16429	16428		X-T/C						
16465	16464	C-T	C-C/T						
		T-C	T-T/C						
16475	16474		T-T/C						
16514	16513		C-C/T						

BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロ－ホモ	BP 歴史的ナンバリング**	3106 における位置ギャップ消去 BP	ホモ－ホモ	ホモ－ヘテロ	ヘテロ－ホモ
16519	16518	T-C	T-T/C						
		C-T	C-C/T						
16526	16525	A-G							
			G-G/A						
16527	16526		C-C/T						
16537	16536	T-C	T-T/C						

【 0 2 5 5 】

【表 5】

表 5

D-ループプライマー(ホルマリン固定組織および針生検のための血液について使用)			
配列番号	プライマー	長さ(#塩基)	5'-3'
19	15971f	20	TTAACTCCACCATTAGCACC
20	15f	20	CACCCTATTAACCACTCACG
21	16211f	22	CAGCAATCAACCCTCAACTATC
22	16410r	19	AGGATGGTGGTCAAGGGAC
23	389r	20	CCTAACACCAGCCTAACCAG
24	420r	18	GTGCATACCGCCAAAAGA
25	711r	21	AACGGGGATGCTTGCATGTGT
ホルマリン固定組織プライマー(31の前立腺切除術について使用)			
配列番号	プライマー	長さ(#塩基)	5'-3'
26	649f	21	TAGGTTTGGTCCTAGCCTTC
27	1051f	26	ACAATAGCTAAGACCCAACTGGGAT
28	1247r	22	CAAGAGGTGGTGAGGTGATCG
29	8959r	22	CGATAATAACTAGTATGGGGAT
30	8814f	22	CCAATATCTATAAACCTAGCC
31	9247f	19	GCCCATGACCCCTAACAGG
32	9868r	21	CGGATGAAGCAGATAGTGAGG
33	9711f	22	CTGGGTCTCTATTTTACCCTCC
34	10663f	18	TCTTTGCCGCCTGCGAAG
35	10766r	22	TTAGCATTGGAGTAGGTTAGG
36	11813r	26	GTAGAGTTTGAAGTCCTTGAGAGAGG
37	11629f	23	AATCAGCCACATAGCCCTCGTAG
38	12709r	28	GGAAGATGAGTAGATATTTGAAGAAGT
39	12528f	22	GAACTGACACTGAGCCACAACC
40	13516r	23	GGTCTTTGGAGTAGAAACCTGTG
41	13239f	23	CGTAGCCTTCTCCACTCAAGTC
42	15351r	23	TCGTGCAAGAATAGGAGGTGGAG
43	15144f	25	TCCCGTGAGGCCAAATATCATTCTG
44	6145r	24	CAGTTGCCAAAGCCTCCGATTATG
45	5867f	25	CAATGCTTCACTCAGCCATTTTACC
46	13957r	22	CTAGATAGGGGATTGTGCGGTG
47	13838f	23	CCCTAGACCTCAACTACCTAACC
48	15026r	21	GGCAGATAAAGAATATTGAGG
49	14937f	22	CATCAATCGCCACATCACTCG
50	1938f	24	AGAGCACACCCGTCTATGTAGCAA
51	2084r	26	TACAAGGGGATTTAGAGGTTCTGTG
52	2973f	24	TAGGGTTTACGACCTCGATGTTGG
53	3101r	24	TAGAAACCGACCTGGATTACTCCG
54	3728f	23	CATATGAAGTCACCCTAGCCATC
55	3893r	23	GTTGCGTTGGTCTCTGCTAGTGT
56	4888f	27	CAATCATATACCAATCTCTCCCTCAC
57	5035r	25	CATCCTATGTGGGTAATTGAGGAGT
58	5981f	23	TGGAGTCCTAGGCACAGCTCTAA
59	6154r	24	GGAAGTAGTCAGTTGCCAAAGCCT
60	6911f	24	TGCAGTGCTCTGAGCCCTAGGATT
61	7082r	26	GAAGCCTCTATGATGGCAAATACAG
62	7829f	25	CGCATCCTTTACATAACAGACGAGG
63	8029r	24	GGCTTCAATCGGGAGTACTACTCG

血液プライマー(前立腺切除術)			
配列番号	プライマー	長さ(#塩基)	5'-3'
64	16485f	24	GAAGTGTATCCGACATCTGGTTCC
65	919r	22	TTGGGTTAATCGTGTGACCGCG
66	1644r	26	CTCCTAAGTGTAAGTTGGGTGCTTTG
67	615f	24	ATGTTTAGACGGGCTCACATCACC
68	1488f	24	CGTCACCTCCTCAAGTATACTTC
69	2612r	28	GGAACAAGTGATTATGCTACCTTTGCAC
70	2417f	23	CACTGTCAACCCAACACAGGCAT
71	3641r	23	GCTAGGCTAGAGGTGGCTAGAAT
72	3230f	23	GTTAAGATGGCAGAGCCCGGTAA
73	4417r	26	TTTAGCTGACCTTACTTTAGGATGGG
74	4337f	24	ATGAGAATCGAACCCATCCCTGAG
75	5551r	24	GGCTTTGAAGGCTCTTGGTCTGTA
76	6418f	23	AACCCCTGCCATAACCCAATAC
77	7554r	33	CTTTGACAAAGTTATGAAATGGTTTTCTAATA
78	7400f	22	CCCACCCTACCACACATTTCGAA
79	8441r	26	GTTGGGTGATGAGGAATAGTGAAGG
80	8346f	26	CAACACCTCTTTACAGTGAATGCCC
81	9413r	24	GCCTTGGTATGTGCTTTCTCGTGT
82	10285r	21	GGTAGGGGTAAAAGGAGGGCA
83	9273f	21	TCAGCCCTCCTAATGACCTCC
84	10198f	19	CCCGCGTCCCTTTCTCCAT
85	11408r	25	GGAGTCATAAGTGGAGTCCGTAAAG
86	11210f	24	TTCTACACCCTAGTAGGCTCCCTT
87	12231r	26	GTTAGCAGTTCTTGTGAGCTTTCTCG
88	12096f	22	TCCTATCCCTCAACCCCGACAT
89	13098r	26	CAACTATAGTGCTTGAGTGGAGTAGG
90	12881f	26	CATCCTCGCCTTAGCATGATTATCC
91	13851r	24	GTTGAGGTCTAGGGCTGTTAGAAG
92	14738f	24	AGAACACCAATGACCCCAATACGC
93	15731r	28	CTAGGAGTCAATAAAGTGATTGGCTTAG
94	15347f	23	CACGAAACGGGATCAAACAACCC
95	16000r	24	CTTAGCTTTGGGTGCTAATGGTGG
96	5544f	21	CACGCTACTCCTACCTATCTC
97	6482r	20	GACTGCTGTGATTAGGACGG
98	13354f	23	TTTATGTGCTCCGGGTCCATCAT
99	14458r	22	GATGGCTATTGAGGAGTATCCT
100	14399f	21	ACACTCACCAAGACCTCAACC
101	15593r	23	ATCGGAGAATTGTGTAGGCGAAT

【 0 2 5 7 】

実施例10：前立腺組織のmtDNAにおける3.4 kb欠失

約3.4キロベース(kb)の欠失は、新鮮な凍結前立腺組織の完全ミトコンドリアゲノム増幅を介して同定された。線形回帰法を用いることにより、この欠失の大きさは、3000塩基対(bp)～3500 bpと推定された。2つのありうる候補欠失、すなわち9574～12972における3397 bp欠失、および10744～14124における3379 bp欠失が、Mitomap (Brandon, M. C., Lott, M. T., Nguyen, K. C., Spolim, S., Navathe, S. B., Baldi, P. & Wallace, D. C. MITOMAP: a human mitochondrial genome database--2004 update. Nucleic Acid Research 33 (Database Issue):D611-613, 2005; www.mitomap.org)を用いることにより同定

10

20

30

40

50

された。2つの欠失のうちのいずれかが正しいとすれば、そのどちらが正しいのかを決定するために、欠失接合部にまたがるフォワードプライマーを各2つの候補について作製し、それによりプライマーが欠失に隣接する反復領域よりも遠くまで伸長することを保証した。図5は、プライマーの設計と配列を示す概略図である。10744～14124における3379 bp欠失(3.4 kb欠失と呼ぶ)に対応する増幅産物(amplicon)についての陽性の増幅結果が得られた。

【0258】

この欠失は、次の遺伝子の全部または一部を除去する：(i) NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4L、(ii) NADHデヒドロゲナーゼサブユニット4、(iii) NADHデヒドロゲナーゼサブユニット5、(iv) tRNAヒスチジン、(v) tRNAセリン2、および(vi) tRNAロイシン2。

10

【0259】

この3.4kb欠失は、33の新鮮な凍結前立腺サンプルの91%に存在することが決定された。特異的欠失プライマーを用いて、ホルマリン固定組織を検査し、n値を増加させた。

【0260】

以前に、本調査者らはLCMによりマイクロダイセクション切除された32の組織サンプルからの、および組織学的に正常な前立腺の12の針生検材料からのミトコンドリアゲノム全体を配列決定した。これらの各サンプルからのアーカイブ保管された組織切片を次の研究に用いた。1～2の連続切片を各サンプルから切除した。DNAは、各サンプルからマイクロダイセクションとしてではなく全体として抽出した。したがって各サンプルは腺の前立腺組織ならびにストロマの前立腺組織の混合物からなるものであった。この抽出は、Qiagen社のQIAamp DNAミニキット(カタログ番号51304)を用いて行った。抽出後に、サンプルをNano-Drop分光光度計を用いて定量し、その後濃度を2ng/ulへと正規化した。各サンプルは、20ng 投入DNAおよびiQTM SYBR Green Supermixキット(Bio-Rad Laboratories Inc.)を用いて増幅した。反応は、Opticon(登録商標) 2 (MJ Research)を用いて行った。

20

【0261】

図6に示すように、悪性前立腺サンプルと症状はあるものの良性の前立腺サンプルとの間では、サイクル閾値におよび、延長により、欠失の量に、明らかな差異が観察された。悪性サンプルは、良性サンプルよりも常に早いサイクル閾値を示した。

【0262】

実施例11：3.4kb 欠失盲検検査 - サイクル閾値の比較

30

実施例10に記載の調査の後に、追加の21サンプルを選択したが、そのうちの10は良性でありそのうちの11は悪性であった。病理学的状態は、資格のある病理学者が行う針生検により決定された。サンプルを盲検化して、本調査者らがこの検査を行うときにサンプルの病理学的状態を知らないようにした。本調査者らは、サイクル閾値を調べることにより、症例の81%において正しい病理学的状態を予測することができた。4つの正しくなかった予測のうち、2つは良性と判定された悪性サンプルであり、2つは悪性と判定された良性サンプルであった。後者の症例において臨床医が2人の個体の追跡臨床情報を要求し、それを用いてこの2人の個体がこの調査に使用された針生検結果の後に前立腺癌と診断されたかを調べた。元は良性サンプルをもたらすがこの研究により悪性腫瘍を有すると予測された個体の1人は、その後悪性サンプルをもたらした。その結果として、偽陽性のうちの1つは真の陽性となった。したがって、病理学的状態は、この調査に置いて検査された86%の症例において正しく予測された。この調査の最終的な陽性的中率(PPV、ここでPPV = 真の陽性/(真の陽性 + 偽陽性))は91%であり、そして陰性的中率(NPV、ここでNPV = 真の陰性/(真の陰性 + 偽陰性))は80%であった。

40

【0263】

実施例12：3.4kb欠失研究 - 方法(n=76)

アーカイブ保管サンプル

この研究では76の前立腺組織を3.4 kb欠失について検査した。すべての組織サンプルをホルマリン固定し、25が悪性、12が正常、および39が良性前立腺疾患を有すると組織学的には示された。後者の群については半分以上が過形成を有した。すべての標本は、調査され

50

る者の組織アーカイブから得られた針生検材料であった。

【 0 2 6 4 】

前立腺標本

各スライドについて、テープリフトを、Arcturus Bioscience Inc.社からのPrep-Strip s (カタログ番号LCM0207)を用いて行った。このことにより、DNA抽出前にスライドからあらゆる粒状物質または非付着性組織を除去することができた。組織がスライド上にある状態で、スライドをPBS (リン酸緩衝生理食塩水溶液)で洗浄して、可能な限り固定剤を除去した。スライド上の1~2針生検切片を、個別に包装された滅菌された外科用カミソリ刃を用いて擦り取り、滅菌マイクロ遠心分離チューブに入れた。次に、製造者の説明書に従ってQIAamp(登録商標) DNA Mini Kit (Qiagen社、カタログ番号51304)を用いて、DNAを単離し精製した。品質保証チェックポイントとしての陰性抽出対照を、スライド抽出物と並行して処理した。DNAの合計濃度と各サンプルについての純度比を分光光度法(Nano-Drop ND-1000)により測定し、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR)のために2ng/ μ lの希釈物を調製した。

【 0 2 6 5 】

プライマー(オリゴヌクレオチド)

精製オリゴヌクレオチドプライマーは、Invitrogen社(California, USA)により化学的に合成された。プライマーの配列および増幅されるPCR産物の期待される大きさを表6に列記した。さらに、mtDNA欠失のためのPCR分析には、陽性対照(突然変異mtDNAを有することの知られている供給源からのDNA)も追加された。TNFを除き、各プライマーセットをミトコンドリア非含有rho 0 細胞株に対して確認し、偽遺伝子の共増幅の不在を確認した。

【表6】

表6 増幅プライマー

プライマー対	増幅される位置 5'- 3'	増幅産物の長さ (塩基対)
3.4 欠失 リアルタイム	10729~14379 (10744~14124 において 3379bp 少ない)	273
12s mtDNA	708~945	238
TNF	3756~3886	131
3.4 フォワード (10729-10743 - 14125-14139) 5'TAGACTACGTACATACTAACCCTACTCCTA-3' 配列番号 139 3.4 リバース (14361-14379) 5'-GAGGTAGGATTGGTGCTGT-3' 配列番号 140 12s フォワード (708-728) 5'-CGTTCCAGTGAGTTCACCCTC-3" 配列番号 141 12s リバース (923-945) 5'-CACTCTTTACGCCGGCTTCTATT-3' 配列番号 142 TNF フォワード (3756-3775) 5' -CCTGCCCAATCCCTTTATT-3' 配列番号 143 TNF リバース (3866-3886) 5'-GGTTTCGAAGTGGTGGTCTTG-3'配列番号 144		

TNF プライマーについては、プライマーレファレンス Eppendorf(登録商標) HotMaster™ Application No. 1

HotMaster-An innovative Hot Start/Cold Stop technology for better PCR* results

George Halley and Vincent Prezioso, PhD

George Halley, Eppendorf - 5 Prime, Inc., Boulder, CO, USA

Vincent Prezioso, Brinkmann Instruments, BioSystems Application Lab, Westbury, NY

http://www.brinkmanncanada.com/applications/PCR_appl_hotmaster.asp

10

20

30

40

50

【 0 2 6 6 】

リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応

各サンプルに対して、3つの別のPCRを行った。各反応は、25 μ l 合計容積であり、テンプレートDNA、1対のプライマー(12sまたは3.4欠失またはTNF用プライマー)、iQTM SYBR Green Supermixキット(カタログ番号170-8882, Bio-Rad Laboratories Inc.社)および蒸留脱イオン水(ddH₂O)を含むものであった。TNF(腫瘍壊死因子)用は単一コピーの核遺伝子プライマーを含み、12s用は全ミトコンドリアゲノムプライマーを含むものであった。テンプレートDNA、プライマー、および反応バッファの容積と濃度を以下に記載する。

【表7】

表7 qPCR 成分

試薬	反応あたりの濃度	反応あたりの容積
反応バッファー	1X	12.5 μ l
プライマー (フォワードおよびリバース)	250nM	各 100 umole ストックの 0.0625 μ l
ddH ₂ O	N/A	2.375. μ l
テンプレート DNA	20ng	10.0 μ l
合計		25 μ l

【 0 2 6 7 】

各増幅産物についてのサイクリングパラメーターを表8に示す。

【表8】

表8 サイクリングパラメーター

ステップ	温度 (°C)	持続時間
1	95	3 分
2	95	30 秒
3	66 (3.4 欠失プライマー)または 61.5 (12s プライマー)または 61.5 (TNF プライマー)	30 秒
4	72	30 秒
5	プレート読み取り	
6	72	10 分
7	融解曲線 50°C ~ 110°C、1°C 毎に読み取り	3 秒
ステップ 2~5 を 44 回反復して合計 45 サイクルを行う		

【 0 2 6 8 】

分析

熱サイクリング、リアルタイム検出および反応の分析は、Intuitive Opticon Monitor^T_M ソフトウェア (MJ Research Inc.)を備えたDNA Engine Opticon(登録商標) 2 Continuous Fluorescence Detection Systemを用いて行った。DNA定量のためには、標準曲線法を利用した。本発明者らは、1セットの連続希釈 (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1)を、3種の精製PCR生成テンプレート(すなわち1つの産物は3.4欠失について、1つの産物は12sプライマーについて、および1つの産物はTNFについて)に対して行った。ここから、3種の異なる標準曲線が作製され、それらは、全mtDNA (12s 増幅産物 - 合計ミトコンドリアゲノムプライマー)、3.4欠失または全核DNA (TNF - 単一コピー核遺伝子プライマー)のコピー数を示した。次にサンプルC_Tを標準のそれと比較することにより、サンプルのC_T値をDNAコピー数に変換することができる。3.4欠失は、それが37サイクル以内に検出されなかったときには、存在しないまたは低レベルであると見なされた。

【 0 2 6 9 】

悪性腫瘍の判定は、正規化サンプル中に存在する3.4kb欠失の量に基づき、これはサイクル閾値の位置により示される。この位置は、絶対的(25サイクルより多くしかし35サイクルより少ないなど)であってもよく、またはより多くの場合には、存在する全ミトコンドリアDNA(12s増幅産物により示される)と3.4kb欠失との比であってもよい。これは合計ミトコンドリアDNAの百分率として表すことができる。細胞の数(TNF増幅産物により表される)を組み入れて、良性および悪性組織の間の差異を精緻化することもできる。

【0270】

こうしたサンプルの分析を自動化するために、バイオインフォマティックスのツールを用いた。こうした分析に考慮される3つの変動物は、腫瘍壊死因子(TNF)のサイクル閾値 C_T 、その特定のプライマー部位を有するミトコンドリアの全種、および対象の欠失を有するミトコンドリアである。

10

【0271】

クラスター分析

データが類似しておりその範囲が小さいことから、クラスタリングは正規化せず、対数関数も使用しなかった。

【0272】

図7は、データの実際の動きと傾向を示す。X軸は患者番号であり、Y軸はリアルタイムPCRから得られたサイクル閾値である。

【0273】

サイクル閾値が高ければ高いほど、存在する変動物の量は少ないことに注目することは重要である。

20

【0274】

図7に示される主要な一般的傾向は、欠失、全、およびTNFという変動物の間の差異/比率に基づくものである。欠失は、良性/正常サンプルでは低い~不在であり(右側)、異常良性および悪性サンプルでは増加する(左側)。異常良性および悪性サンプルは、欠失とTNFのサイクル閾値比に基づき、互いに識別されるようになる。

【0275】

管理学習

管理学習は、システムが既知サンプルについて結果を予測しようとするに基づく。データの半分を用いて教育を行い、残り半分を用いてアルゴリズムを試した。管理学習は、自身の予測を標的の回答と比較して、自身の間違いから「学習」する。しかし、予測された結果がデータの実際の結果よりも高いまたは低い場合には、エラーをシステムに戻して伝え、重みを適切に調節する。

30

データセット: 5%~35% - 良性

35%~65% - 過形成

65%~95% - 悪性

ANNアルゴリズム(下に図式的に示す):

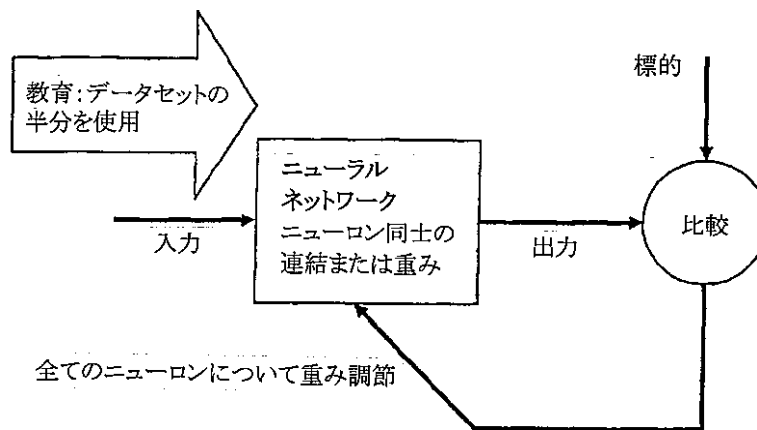
データセットの半分をANNの教育に使用

残り半分の正確性を比較するために使用

正確性 = 期待データセットを得られたデータセットと比較 86.6%

40

人工ニューラルネットワークアルゴリズム



10

【 0 2 7 6 】

人工ニューラルネットワーク (ANN) を用いた欠失データの管理学習

3 つの分類:

良性

過形成

悪性

20

リアルタイムPCR サイクル閾値 C_T に基づいて各分類のための 3 つの変動物を用いる:

腫瘍壊死因子 (TNF) - 核コピー対照

全ミトコンドリア-ミトコンドリアコピー対照

欠失 - 欠失状態のミトコンドリア

結果:

データセットの半分を用いて ANN を教育し、残り半分を用いて正確性を比較する。

3 つの分類の正確性 = 86.6%

陽性的中率 (PPV);

良性から悪性 = 88.2%

陰性的中率 (NPV)

良性から悪性 = 76.5%

30

【 0 2 7 7 】

実施例 13: ヒト皮膚における日光曝露のマーカーとしての 3895 bp ミトコンドリア DNA 欠失の使用

Harbottle ら, 2004 および Durham ら, 2003 により報告された、3895bp 欠失と日光曝露とのあり得る関連性の最初の発見を受けて、その後、さらなる研究からそのような関連性が存在することを確認した。その上、今回のさらなる研究は、完全に定量的な様式で欠失および配列再配置の新規検出方法を発明することにより、日光曝露または皮膚癌検出のための診断検査のためのこの欠失の使用を実施可能にした。この方法は、プライマーまたはプローブと、再配置に関連する欠失もしくは挿入により生じた新たに形成された配列とのアニーリングを提供し、そのことにより検出手段としてのリアルタイム定量 PCR (qPCR) の使用を可能にする。qPCR プラットフォームの使用は、単純な存在と不在のシナリオの代わりに、欠失の定量的検出を実施可能にする。日光曝露のレベルまたは悪性腫瘍の特性を測定するのが、以前に報告された単純な存在または不在の半定量ではなく、欠失の相対量であることから、この定量は検査の基礎である。その上、qPCR プラットフォームは、検出感度が従来の PCR および臭化エチジウム検出よりも大幅に高いことから、見かけ上は疾患にかかっていないまたは曝露されていない組織の使用を可能にする。

40

【 0 2 7 8 】

バックグラウンド:

非黒色腫皮膚癌 (NMSC) の発生率は、欧州が起源の集団において増大している (Severi an

50

d English, 2004)。例えば、米国では毎年100万の新規症例が診断されており(Wesson and Silverberg, 2003)、また英国では65,000が診断されている(数はCancer Research. UKの提供)。NMSCは皮膚癌のほぼ90%を占め、基底細胞および扁平上皮細胞癌(それぞれBCCおよびSCC)からなる。BCCは、NMSCの最も一般的な形態であり、表皮の基底ケラチノサイトから主に発生するが、毛包および脂腺の細胞からも発生する。これらは局所的には浸潤性であるが転移性であることは希である。SCCもまたケラチノサイトから誘導されるが、しかしながらBCCとは対照的に、SCCは転移しうる。BCCに比べて、SCCは、年齢とともに最も大きな増加を示し、高齢者に集中している(Severi and English, 2004)。NMSCの相対的密度は、外出時に「日常的に」日光曝露される身体部位(Armstrong (2004)によって定義された頭皮、顔、首および耳など)において最も高い。しかしながらSCCは、「時折」日光曝露される身体部位、例えばArmstrong (2004)により定義された肩、背中および胸部などにおいてずっと低い密度である点において、BCCとは感知できる程度に異なる。したがって、NMSCの主要な決定因子は、DNA損傷を誘発する日光の紫外線放射(UVR)成分である。重要なこととして、NMSCの発生に影響を及ぼすのは、日光曝露のパターン(より継続的対断続的)とその累積量の両方である(Armstrong and Krickler, 2001)。ヒト皮膚における累積UVR曝露の信頼できるマーカーを決定するために、本発明者らおよび他の者達は、UV-誘発DNA損傷のバイオマーカーとして、核DNAではなく、ミトコンドリアDNA (mtDNA)を用いるとの新規な着想を検討した(Pangら, 1994; Berneburgら, 1997; Birch-Machinら, 1998; Birch-Machin, 2000;)。p53のような核DNA遺伝子の突然変異スクリーニングと比較して、日光曝露された皮膚におけるmtDNA損傷を調べることに特定の利点がある。第1に、ミトコンドリアにおける酸化損傷の塩基除去修復の証拠はあるものの、mtDNA中のDNA光分解産物(例えばシクロブタンピリミジンダイマー)の修復のための核除去修復の証拠はない(LeDouxら, 1993; Croteau and Bohr, 1997; Pascucciら, 1997; Sawyer and Van Houten, 1999)。第2に、各細胞は最大で数千コピーものmtDNAゲノムを保有することができ、したがってミトコンドリアは、残りの野生型による相補を介して非常に高レベル(最大90%)の損傷mtDNAに耐えることができる(Chomynら, 1992; Sciaccoら, 1994)。一緒になると、こうした要因は、細胞機能が損なわれることなくmtDNA中の光損傷の蓄積をもたらす。

【0279】

ヒト皮膚における累積日光曝露のバイオマーカーとしてのmtDNA損傷の使用は、比較的新しい研究分野であり、以前の研究は、日光保護されたおよび日光曝露された皮膚を識別するために単純にmtDNA損傷を比較していた(Pangら, 1994; Berneburgら, 1997; Birch-Machinら, 1998)。この以前の手法が制限されたものであるのは、NMSCが、外出時に「時折」日光曝露される身体部位と対照的に、「日常的」に日光曝露される身体部位において主に形成される(Armstrong, 2004)ためである。この制限に対処する試みとして、本実施例は、ほとんど報告されていない3895 bp mtDNA欠失(以前に疾患筋肉において記載されたのみ(Moraesら, 1992))の発生の頻度が、「日常的に」対「時折」日光曝露される身体部位の間で有意に異なることを実証する。さらに、本実施例は、UVA + UVB光源の反復的な致死量未満の照射量を用いて3895 bp欠失をin vitroにて誘発させることにより、3895 bp欠失と日光のUVR成分との病因論の間の関連性を実証する。

【0280】

方法および材料

日光中の紫外線放射(UVR)は、白人個体における非黒色腫皮膚癌(NMSC)の主要な原因因子として広く認識されている。本発明者らおよび他の者達による以前の研究では、ヒト皮膚における累積日光曝露のバイオマーカーとしてのミトコンドリアDNA (mtDNA)損傷の使用が検討された。こうした研究は、日光保護されたおよび日光曝露された皮膚の間でmtDNA損傷を比較した。NMSCは、外出時に「時折」日光曝露される身体部位と対照的に、「日常的」に日光曝露される身体部位において主に形成されること、およびこのためこれらはその累積UV曝露が異なることから、この手法は制限されたものである。この制限に対処する試みとして、本実施例は、104の年齢マッチングさせた、日常的に、時折、および希に日光曝露される身体部位から採取されたヒト皮膚サンプル中のほとんど報告されていない

3895 bp mtDNA欠失の発生の頻度を調べた。UV曝露の増大と共に欠失頻度は有意に増大し($p < 0.0001$)、興味深いことに、「時折」日光曝露される身体部位と比較して、「日常的に」日光曝露される身体部位においては、著しく高い欠失頻度が、真皮($p = 0.0018$)および表皮($p < 0.0001$)の両方において見られた。4977 bp共通欠失の以前の研究に使用された同一のNMSCサンプルにおける3895 bp欠失の調査からは、比較的高い3895欠失の発生頻度が示された(それぞれ8/10 対 4/10)が、ただしこの差異は統計的に有意なものではなかった。その上、本実施例は、UVA + UVB光源の反復的な致死量未満の照射量を用いて3895 bp欠失をin vitroにて誘発させることにより、3895 bp欠失と日光のUVR成分との病因論の間の関連性を助成する。ヒト皮膚における3895 bp欠失の頻度は累積UV曝露の可能性のあるバイオマーカーを提供し、また、NMSC発生の早期検出ツールを提供すると共に、臨床UV光線療法レジメンの長期安全性をモニタリングする方法を提供する。

10

【0281】

患者サンプル

外出時に「日常的に」日光曝露される身体部位(頭皮、顔、首および耳など)からの臨床的に正常な病変部近傍の皮膚(表皮 $n = 21$ 、真皮 $n = 21$ 、平均年齢 \pm SEM = 69.4 ± 2.6)ならびに「時折」日光曝露される身体部位(肩、背中および胸部)(表皮 $n = 21$ 、真皮 $n = 21$ 、平均年齢 \pm SEM = 63.1 ± 3.6)を、Royal Victoria Infirmary, Newcastle, UKの皮膚癌切除診療所にかかっている42人のNMSC患者からインフォームドコンセントのもとで採取した。日常的におよび時折日光曝露された群の間には特に有意な年齢差はなかった ($p = 0.158$: 両側t検定(Welch 相関))。さらに、42人の患者のうち、女性: 男性のパーセンテージはほぼ同じであり(すなわち、それぞれ52%: 48%)、またBCCとSCCのパーセンテージもほぼ同じであり、患者の57%がBCCを有した。希に日光曝露される身体部位からの正常皮膚サンプル(臀部やかかとなど)は、以前に得られた死体解剖サンプル(表皮 $n = 10$ 、真皮 $n = 10$ 、平均年齢 = 73歳)から採取された。0.25% ディスパーゼを4 にて一晚使用して表皮と真皮を分離し(Durham ら, 2003)、DNAをQiagen社のDNeasy組織抽出キットを用いて抽出した。表皮腫瘍、BCC ($n = 5$)、SCC ($n = 5$)は、癌切除のために通院している患者から採取された。この調査に使用された患者はいずれもmtDNA不全を有しなかった。

20

【0282】

HaCaT細胞のUV照射

自然発生的に不死化されたケラチノサイト細胞株(HaCaT) (Boukamp ら, 1988)を、10% ウシ胎仔血清、1 mL 当たり5 IUのペニシリン、および1 mL 当たり5gのストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地中で増殖させた。細胞を、直径9 cmの組織培養処理されたペトリ皿中で70%~90%コンフルエント状態まで増殖させ、PBSで洗浄し、その後、致死量未満の照射量(1 cm² 当たり0.5 J、これは1 SEDに相当する)のUVRを、Helarium(登録商標) 40 Wランプ(Wolff B1.01、290~400 nm、ピーク発光325 nmにて)を用いて、隔日的に照射した。適当な時点で、付着細胞から、Qiagen社のDNeasy組織抽出キットを用いて全細胞性DNAを抽出した。

30

【0283】

PCR分析

PCRは、200 ng ゲノムDNA、600 nMの各プライマー、250 μ M dNTP、反応当たり0.6 U のAmplitaq Gold DNAポリメラーゼ(Applied Biosystems)、GeneAmpバッファ(100 mM Tris-HCl、pH 8.3、500 mM KCl、15 mM MgClおよび0.01% (wt/vol)ゼラチンを含む)を含む25 μ l反応にて行った。使用したPCRプライマーは、L404 (5' CTT TTG GCG GTA TGC ACT T T 3') (404-423nt) (配列番号145)およびH4676 (5' GAT TAT GGA TGC GGT TGC TT 3') (4676-4657nt) (配列番号146)であった。プライマーL404およびH4676は、3895 bp欠失の外側にアニーリングするように設計した。DNA増幅において、短い(30秒)ポリメラーゼ伸長時間は、野生型PCR産物の増幅をもたらさず、欠失型mtDNA種を表す小さい375 bp産物の増幅のみが可能であった。PCR条件は、94 にて10分、35サイクルの94 にて30秒、56 にて30秒、72 にて30秒、および最終伸長として72 にて7分というものであった。増幅産物は1%アガロースゲル中で臭化エチジウム(1 ml 当たり0.25 μ g)を用いて染色して可視化

40

50

した。

【 0 2 8 4 】

DNA配列分析

375 bp PCR産物をゲルから切り出し、QIAquickゲル抽出キット(Qiagen社, Germany)を用いて精製し、pCR(登録商標)4-TOPO(登録商標)ベクター中にTOPO(登録商標)TA Cloningキット(Invitrogen社, UK)を用いてクローニングした。この375 bp PCR産物の正体を確認するために、自動化DNA配列決定 (MWG Biotech, Ebersberg, Germany)を用いてDNAを配列決定した。

【 0 2 8 5 】

放射性PCR分析

UVRにより生じた低レベルの欠失を検出するために、PCRを上記のように行ったが、ここでは3 μ Ciの[$-^{32}$ P]-dCTP (Amersham, Buckinghamshire, UK)を添加した。次にPCR産物を6%非変性ポリアクリルアミドゲルに通して電気泳動し、約24時間に渡り、ホスホリメーグスクリーンに曝露した。放射性PCR断片を、PhosphorimagerによりImageQuant ソフトウェア (Molecular Dynamics, UK)を用いてスキャンし視覚化した。

【 0 2 8 6 】

統計分析

統計分析は、StatCalc (Epi-info. CDC, Alberta, Georgia)を使用し、²、ピアソンの²、フィッシャーの直接確率検定および両側t検定を用いて行った。

【 0 2 8 7 】

結果と考察

3895 bp欠失の正体の確認

以前の研究からのNMSCおよび日光曝露された皮膚からのmtDNA欠失スペクトル(Durhamら, 2003)を、再度分析した。多くのサンプルが大きさ約4 kbの欠失を有することが見出された。MITOMAP (Mitomap, 2004) データベースの検索により、この欠失は、ヌクレオチド547~4443に渡るマイナーアーク中に報告された、3895 bp種であると同定された。この欠失は以前に、キーンズ・セイアー症候群および慢性進行性外眼筋麻痺症と関連する(Moralesら, 1995)とされた。この欠失の正体を確認するために、欠失特異的PCRアッセイを方法の章で説明したように設計した。このPCRからの375 bp産物を配列決定して、それが、3895 bp欠失に特徴的な欠失接合部配列、すなわち5' CTAACC^{536 bp/4430 bp}ccataccgccga^{548 bp/4442}AATGTT 3' (配列番号147)を有することを確認した。特徴として、この配列は、野生型 mtDNA中で3895 bp欠失に隣接する2つの12 bp反復のうちの1つのみを有した(小文字)。

【 0 2 8 8 】

日常的に日光曝露される身体部位対時折曝露される身体部位における3895 bp欠失の頻度の比較

3895 bp欠失は、そもそも、日光曝露された部位から採取されたNMSCサンプルにおいて観察されたことから、本発明者らは、この欠失の頻度が累積日光曝露の増大のマーカーであるか否かという疑問に取り組んだ。欠失特異的PCRアッセイ(材料および方法を参照)を用いて、日常的に、時折および希に日光曝露された身体部位から採取された104の年齢マッチングさせた、分割ヒト皮膚サンプルにおける発生頻度を分析した。表皮($p < 0.0001$ 、²=31.36、2df; ピアソン²検定)および真皮($p < 0.0001$ 、²=28.68、2df)の両方において、増加するUV曝露と共に欠失頻度は有意に増加した。図8は、日光曝露の増加と共に観察される、3895bp欠失の発生頻度の増加を示す。図8aに示す代表的な臭化エチジウム染色されたアガロースゲルは、外出時に日常的に日光曝露される身体部位における3895 bp欠失の頻度(上のパネル)が、時折日光曝露された身体部位のそれ(下のパネル)と比較して、より大きいことを示す(Dは真皮でありEは表皮である)。陽性対照は、配列決定により確認された3895 bp欠失を有するサンプルを表す。両方のパネル中のレーン1は分子量マーカー(Hyperladder IV- 範囲1000 ~ 100 bp、Bioline社、London UK)を表す。同じ量のテンプレートDNAを各PCR反応に添加した。図8bは、種々の日光曝露された身体部位から採取さ

10

20

30

40

50

れた104の分割皮膚サンプル中の3895 bp欠失の頻度を示すヒストグラムである。

【0289】

重要なこととして、「時折」曝露された身体部位と比較して、「日常的に」日光曝露された身体部位における欠失頻度は、真皮($p=0.0018$ 、 $\chi^2=9.72$ 、オッズ比8.5; χ^2 検定)および表皮($p<0.0001$ 、 $\chi^2=17.53$ 、オッズ比40)の両方において、有意に大きかった(図8b)。この欠失は、「希に」日光曝露される身体部位では検出されなかった(図8b)。病変部近傍の皮膚を採取した対象の、平均年齢、性別比、および腫瘍型は、日常的に日光曝露されたおよび時折曝露された群の間に非常に似ていた(材料および方法を参照のこと)ことから、前記知見がこれらの要因により混乱する可能性は低い。さらに、3895 bp欠失を保有する(すなわち平均 = 66.95 ± 2.84)および保有しない(平均 = 65.81 ± 3.47)サンプルの間の平均年齢値に統計的な差異はなかった($p=0.80$ 、 t 検定(Weilch相関))。

10

【0290】

NMSC中の3895bp mtDNA欠失

以前に行われた4977 bp 共通欠失の研究(Durhamら, 2003)において使用されたのと同じNMSCサンプル中の3895 bp欠失の調査からは、3895欠失の発生頻度が比較的大きい(それぞれ8/10対4/10)ことが示されたが、この違いは統計的に有意なものではなかった。こうした腫瘍は日常的に日光曝露される身体部位から摘出されたことから、この3895 bp欠失が共通欠失よりも累積日光曝露の高感度なマーカーでありうると推測することは興味深い。

【0291】

20

歴史的には、3895 bp欠失を有するミトコンドリアゲノムのマイナーアーク領域は、共通欠失を有するメジャーアークほど多くの欠失を保有しないと推測されてきた(Weiら, 1996; Mitomap, 2004)。その結果、以前の研究の大半は、傾向として、メジャーアーク領域における欠失のスペクトルに焦点を合わせてきた。3895 bp欠失が一般的文献において報告されることが少ないのは、この「研究のバイアス」ゆえかもしれない。あるいはまた、3895 bp欠失は、正常組織において現在検出不能なレベルで自然発生し、ついでそれがUVへの曝露を介して皮膚に富化される可能性がある。

【0292】

血液における3895 bp mtDNA欠失の不在

3895 bp欠失は、以前に疾患筋肉において報告された(Moraesら, 1992)のみである。皮膚についての本研究は別として、他の組織におけるその発生頻度は未知である。本発明者らは、血液におけるこの欠失の頻度を、皮膚サンプルのそれと類似する年齢群の患者から採血された16の血液サンプルに対して欠失特異的PCRを行うことにより調べた。これらの血液サンプルのいずれも、欠失の保有を示さなかった(データ未掲載)。

30

【0293】

反復UV照射による培養HaCaT細胞における3895 bp欠失の生成

日光曝露の累積量と3895 bp欠失の発生頻度の相関関係を評価するためには、in vitroでの日光の影響を調べる必要があった。日光は、UVAとUVBの両方を含むことから、helariumランプ(Diffey, 2002)を用いて、反復的な致死量未満のUVR照射レジメンの広範な系列を用意し、ヒト表皮由来(HaCaT)細胞株における3895 bp欠失を生成させることを試みた。最適UVR反復照射方法は、かなりの程度の細胞死を伴わずにこの欠失を生じるものであった。放射性PCRに基づくアッセイを用いて、本発明者らは、17の隔日的な 1 cm^2 当たり0.5 J(すなわち、1 SED)の量のUVRの照射後に、付着細胞において3895 bp欠失が誘発される最初の兆候が観察されることを実証した。

40

【0294】

図9は、helariumランプ(UVA/UVB)による、 1 cm^2 当たり0.5 JのUVRの17回の照射後に、HaCaT細胞において3895 bp欠失が誘発されることを示す。HaCaT細胞に、 1 cm^2 当たり0.5 J(すなわち1 SED)のUVA/UVBを隔日的に照射し合計19の照射を行った。全細胞性DNAを付着細胞から抽出し、100 ngをPCRに供して3895 bp欠失を増幅した。3895 bp欠失のUV誘導性の増加の最初の兆候は、UVRの17の反復照射の後に観察された。陽性対照は、3895 bp欠失

50

を有する腫瘍サンプルからのDNAであり、これに対して陰性対照はDNAを含有しないものである。その上、致死量未満のUVR照射を用いたことから、2回のその後のUV照射の後にも欠失のレベルは細胞株において維持され、これは、3895 bpをヒト皮膚における日光曝露の推定上の累積バイオマーカーとして使用できるとすれば重要な性質である。このことは、UVA誘発型共通欠失が照射の停止から16ヵ月後に存在しうることをin vivoで実証した、ごく最近のBernebergら(2004)の知見(原稿修正中に刊行された)に鑑みると興味深い。

【0295】

上記観察はいくつかの理由ゆえに重要である。第1に、本研究はUVAとUVBの両方を放射するUVR源を使用したため、UVAのみを用いて共通欠失を生成させた以前の研究(Berneburgら, 1999; Kochら, 2001)と比べて、より太陽を模倣したUVR源を表す。第2に、UVRの反復照射により4977 bp共通欠失以外の欠失が生成されたのは今回が初めてである。その上、線維芽細胞を利用したBerneburg研究とは対照的に、本実験は、ケラチノサイト由来細胞株を用いて行われたものであり、NMSCを生じるのはこの細胞種である。

【0296】

機能的有意性

3895 bp欠失において欠失される領域は、D-ループ中のmtTF1結合部位からtRNAメチオンンまでである。欠失された遺伝子としては、12s rRNA、16s rRNA、ND1ならびにHおよびL鎖の両方の転写のためのプロモーターが挙げられる。ミトコンドリアの呼吸機能不全が観察される前に、野生型：欠失型mtDNAのある特定の閾値が達成される必要がある(Sciaccoら, 1994)。タンパク質をコードするmtDNA遺伝子(3895 bp欠失により除去されたものなど)についての、ミトコンドリア呼吸鎖機能不全の閾値は、約65%以上である(Hayashiら, 1991; Chomynら, 1992)。例えば、以前の研究は、<25%の4977 bp mtDNA共通欠失を有するヒト皮膚サンプルがミトコンドリア機能の欠損を示さないことを、シトクロムオキシダーゼおよびコハク酸デヒドロゲナーゼ活性の二重組織化学的染色により決定した(Durhamら, 2002)。3895 bp欠失については組織化学的染色が存在しないことから、この欠失は、サザン分析を用いて患者サンプルにおいて定量した。適当な対照の存在下で、この分析は3895 bp欠失の存在を検出することができなかったことから、この欠失のレベルは2%~5%未満であることが示唆された(結果は未掲載)。したがって共通欠失を用いた以前の研究に基づくと、患者サンプル中の3895 bp欠失のレベルが、真皮または表皮全体に渡る何らかの機能的効果を引き起こす可能性は低い、ただし小さい限局的な効果は除外できない。

【0297】

推定上の機構

共通欠失の生成機構は、スリップした鎖の誤対合を介したゲノム内組換えイベントが関わっており、共通欠失に隣接する13 bp反復DNA配列において生じると以前に提唱された(Schonら, 1989; Shoffnerら, 1989; Mitaら, 1990; Degoulら, 1001)。3895 bp欠失には12 bp反復が隣接することから、その欠失の生成は類似の機構により生じる可能性がある。共通欠失の生成機構は、前記13 bp反復がDNA屈曲され易く、そのため一本鎖DNAの小領域または「泡」が開くことができるようにする、と提唱されている(Schonら, 1989)。本実施例の結果は、3895 bp欠失の生成においてUVRが寄与因子である可能性を示唆する。この欠失の機構は、組換えイベントを促進しうる一本鎖DNAの「泡」を開くことを介して、12 bp反復中の構造的に不安定な部位に、直接または間接的に影響を及ぼすことにより生じうる。

【0298】

結論

まとめると、本実施例は、ほとんど報告されていない3895 bp-mtDNAの出現頻度が、外出時に「日常的に」日光曝露される身体部位と「時折」日光曝露される身体部位とで、有意に異なることを示した。4977 bp 共通欠失の以前の研究に使用されたのと同じNMSCサンプルにおける3895 bp欠失の調査は、比較すると、3895 bp欠失の発生頻度がより大きいことを示した。その上、3895 bp欠失の病因と日光のUVR成分との間の関連性が、反復的な

致死量未満の照射量のUVA+UVB光源を用いてin vitroにて3895 bp欠失を誘発させたことにより証明された。ヒト皮膚における3895 bp欠失の頻度は、ヒト皮膚における累積UV曝露の潜在的バイオマーカーを提供し、次いでそれがNMSC発症の早期検出ツールを提供し、また、臨床UV光線療法レジメンの長期安全性のモニタリング方法を提供しうる。

【0299】

実施例14：NMSCにおける3895ミトコンドリアDNA欠失のリアルタイムPCR分析およびヒト皮膚における日光曝露のための定量的マーカーとしてのその使用

材料および方法

ヒト皮膚サンプル

腫瘍およびマッチングさせた病変部近傍の皮膚サンプルは、Out-Patients Clinic, Royal Victoria Infirmary, Newcastle, UKにて、NMSC、すなわち基底細胞癌 (BCC) (n=5, 年齢範囲55~89歳、平均78歳)または扁平上皮細胞癌(SCC) (n=5, 年齢範囲70~87歳、平均78歳)の切除を受けている患者からインフォームド Consentのもとで抽出された。日光曝露研究のためには、臨床的に正常な病変部近傍の皮膚は、外出時に「日常的に」日光曝露される身体部位(頭皮、顔、首および耳など)(表皮n=30、真皮n=30、平均年齢 \pm SEM = 70.45 ± 2.161)、ならびに「時折」日光曝露される身体部位(肩、背中および胸部)(表皮n=22、真皮n=22、平均年齢 \pm SEM = 63.77 ± 3.501)から採取した。日常的および時折日光曝露された群の間に有意の年齢差はなかった($p=0.1134$):両側t検定(Welch相関)。すべての病変部近傍の皮膚サンプルについて、0.25% ディスパーゼを4 にて一晩使用して表皮と真皮を分割し(Durhamら, 2003)、次いでDNAをQiagen社のDNeasy組織抽出キットを用いて抽出した。この研究に用いた患者はいずれもmtDNA不全を有しなかった。

【0300】

PCR分析

PCRは、200 ng ゲノムDNA、600 nMの各プライマー、250 μ M dNTP、0.6 u/反応Amplitaq Gold DNAポリメラーゼ(Applied Biosystems社)、GeneAmpバッファー(100 mM Tris-HCl、pH 8.3、500 mM KCl、15mM MgClおよび0.01%(w/v)ゼラチンを含む)を含んでなる25 μ l 反応にて行った。PCRプライマーL404およびH4676(表9および図10)は、3895 bp欠失の外側にアニーリングするように設計した。DNA増幅において、短い(30秒)ポリメラーゼ伸長時間からは野生型PCR産物は増幅されず、より短くかつ欠失型のmtDNA断片のみの増幅が可能であった。PCR条件は、94 にて10分、35サイクルの94 にて30秒、56 にて30秒、72 にて30秒、および最終伸長として72 にて7分というものであった。増幅産物は、臭化エチジウム (0.25 μ g/ml)を用いて染色した1%アガロースゲル中で視覚化された。

【0301】

この方法を2回改良したが、最初の改良はDeep Vent (New England Biolabs)を使用し、その後Roche Faststart Taqを用いた感度のさらなる改良を行った。このことは、高齢患者の日光曝露サンプルにおける欠失を測定していた状態から、若年患者における欠失を測定することができる状態への前進をもたらした。

【0302】

リアルタイムPCR分析

3895 bp欠失の定量的ための、信頼できるTaqMan-PCRアッセイを開発した。この定量的TaqMan-PCR法は、二重標識されたプローブを介するPCR蓄積として、標的投入量のリアルタイム測定を提供する。プローブはフォワードプライマーとリバースプライマーとの間にアニーリングし、PCR伸長段階中にTaqポリメラーゼの5'-3' エキソヌクレアーゼ活性により切断される。したがってプローブに結合している5'末端レポーター色素FAM(6-カルボキシフルオレセイン)またはVICと3'末端消去剤色素TAMRA (6-カルボキシ-N,N,N',N'-テトラメチルローダミン)が分離され、レポーター色素の蛍光発光をもたらす。このプローブは、3'末端側がリン酸基でブロックされていることから、それ自体ではプライマーとして機能することができない。この方法は、ゲノムのシトクロムb領域に相当する内部標準プローブ(IS-プローブ、表1および図10)(Kochら, 2001)を使用して、mtDNAの総コピー数(すなわち欠失型および野生型)を推定する。3895 bp欠失のレベルは、欠失のブレイクポイントに

またがるプローブ(3895-プローブ、表9および図10)により測定され、これはその欠失が存在するときのみ増幅されることを保証する。欠失レベルの定量は、内部標準と3895 bp欠失との比率の比較により測定される。

【0303】

増幅反応は、96ウェルマイクロプレート上で、三重反復して25ulとして行った。全mtDNAおよび欠失型mtDNA反応を、別々のチューブ内で増幅させたが、その各々は、100ngのDNA、1×TaqMan Universal Mastermix (ABI)、300nMの各内部標準プライマー(ISF とISR、表9および図10)および100nMのIS-プローブ、または300nMの各3895 bp欠失プライマー(3895Fと3895R、表9)および100nMの3895-プローブ(図10)を含むものであった。PCRおよび蛍光分析は、ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, UK)を用いて行った。増幅条件は次のとおりであった： 50℃にて2分、95℃にて10分、その後の40サイクルに渡る95℃にて15秒および60℃にて1分。 R_n 値は、TaqMan反応バッファーに含まれる色素である受動的レファレンスに対して正規化された標的レポーターシグナルである。 R_n は、 R_n^+ (テンプレートを含め、全ての成分を含む反応の R_n)と R_n^- (テンプレート無し対照の R_n)の差と定義される。統計的に有意な R_n の増大が検出される最初のサイクルのことを、閾値サイクル(C_t)と呼ぶ。蛍光強度が、閾値を定義するためのバックグラウンド R_n 値の標準偏差の10倍を超える場合、蛍光シグナルを有意と見なす。

【0304】

本リアルタイムPCR法は新規であり、以前に刊行されたことのないものである。この方法は、半定量的な標準PCRと比較して、感度が高く、定量を可能にする。この種類のブレイクポイント特異的検出は前立腺検出に使用したのと同じ技術であり、新規である。本発明者らは、この方法が前立腺癌および日光曝露に特異的なミトコンドリア再配置の検出に有用であることを示したが、この方法は他の再配置の検出にも使用可能である。

【0305】

図10は、PCRプライマーおよびTaqManプローブの局在性を示す、3895 bp欠失を有するmtDNAゲノムの配置図である。プライマーISF/ISRおよびISプローブは、野生型および欠失型mtDNAの両方にアニーリングする。3895 bp欠失の検出は、プライマー3895F/3895Rおよび3895プローブを用いて行った。特異的3895プローブは、欠失接合部にまたがって結合することから、欠失型mtDNAにのみアニーリングする。さらに、3895 bp欠失の発生は、所定のPCR条件下で増幅産物が生成しうるので、欠失特異的プライマー(すなわち3895F:3895RおよびL404:H4676)同士が接近するようにする。

【0306】

TOPO TAクローニング

制御領域および3895欠失の両方のクローニングは、TOPO TA Cloningキット(Invitrogen, UK)を製造者の説明書に従い使用して行った。TOPO TAクローニングは、PCR産物の3'末端に単一のデオキシアデノシン(A)を付加するという、Taqポリメラーゼのテンプレート非依存性末端トランスフェラーゼ活性を利用する。キットに付随する線状化されたベクターは、単一のオーバーハングする3'デオキシチミジン(T)残基を有し、PCR産物とベクターの効率的なライゲーションを可能にする。ベクターpCR4-TOPO中の正しい大きさの挿入物の存在は、EcoRI制限断片分析により確認された。

【0307】

結果

3895bp欠失用の定量的リアルタイムPCRアッセイの開発

3895bp mtDNA欠失を保有するミトコンドリアゲノムを確実に検出しそのコピーのパーセンテージを定量することができることを確定させた後に、内部標準プローブ(IS-プローブ)または3895欠失プローブ(3895-プローブ)のいずれかを広い範囲のテンプレート濃度に対して使用する2つのPCR反応の線形性を検討した。いずれの事例においても、テンプレートDNAは、適当なPCR産物をクローニングベクター中にクローニングすることにより作製した(方法を参照のこと)。各テンプレートの濃度を蛍光分析により測定し(GRI, UK)、次いで各プローブについて50ng~50pgのテンプレートDNAを用いて、リアルタイムPCR増幅を行

った(図11)。CT値とテンプレート濃度との関係は、3895bp欠失($r=0.9952$)および内部標準($r=0.9941$)の両方について線形であった。その上、各テンプレートの増幅の勾配も同じであった。このことから、各テンプレートが同じ程度の効率で増幅されることが確認された。したがって、結果として、CT値は、テンプレートDNAの測定指標として使用可能であり、また3895bp欠失型mtDNAの野生型mtDNAに対する相対量を定量するために使用可能である。欠失型：野生型mtDNAの比を正確に予測するこうした標準曲線の能力は、ある範囲のクローニングされた欠失型：野生型テンプレート混合物を使用することにより確認した(結果未掲載)。

【0308】

図11はテンプレートコピー数に対するリアルタイムPCRの感度を示す。減少する濃度のテンプレートDNA(希釈範囲1/10～1/10000の1 μ g/ μ lテンプレート)の3895bp欠失(A)もしくは野生型内部標準(B)についての、閾値サイクル(すなわちCT、縦軸)を示す。いずれの増幅においても、テンプレート濃度と閾値サイクル数(CT)の間には直線関係がある。各数値は、3つの独立した観測の平均 \pm SDを表す。

【0309】

腫瘍における3895bp欠失の定量

NMSCならびに組織学的に正常な病変部近傍の真皮と表皮の両方における3895bp欠失のレベルを、リアルタイムtaqman PCRおよび以前に確立された標準PCRアッセイの両方により測定した(図12)。リアルタイムPCRにより定量された3895bp欠失のレベルは、標準的な非定量的PCR分析により推定されたレベルと概ね一致することが見出された。

【0310】

図12は、BCCおよびSCCの両方からの、腫瘍(T)および組織学的に正常な病変部近傍の真皮(D)および表皮(E)における、3895bp欠失の発生を示す臭化エチジウム染色されたアガロースゲルを示すことにより、腫瘍における3895bp欠失のリアルタイムPCR定量および標準的PCR増幅を示す。各レーンの下には、3895bp欠失のレベルを、各サンプルにおける百分率として示す(リアルタイムtaqman PCRにより定量)。「ND」と標されたサンプルは、リアルタイムPCRのCTが >36 (このレベルはテンプレート無し対照について観測されたレベルである)であったことから、ゼロと判定されたものである。すべてのパネルにおけるレーン1は分子量マーカー(Hyperladder IV - 範囲1000～100bp, Bioline Ltd, London UK)である。各PCR反応には同じ量のテンプレートDNAを添加した。

【0311】

BCCにおける3895bp欠失の発生の単純なパターンは、SCCについて観察されたそれと概ね類似していた。BCCとSCCの両方において、この欠失は5人の患者中の3人に存在した(ただし同じ患者ではない)。病変部近傍の皮膚においては、この欠失の存在は、表皮(5人のBCC中の2人、および5人のSCC中の1人)に比べて、真皮(5人のBCC中の4人、5人のSCC中の3人)においてより頻繁に存在した。一方で、サンプルの絶対数は小さいものの、欠失の単純な発生パターンではなく、実際の欠失のレベルを考慮すると、BCCとSCCの結果の間には差異がある。例えば、欠失が腫瘍および病変部近傍の真皮の両方に存在するサンプルについては、欠失のレベルは、SCC患者については真皮において最大であり、これに対してBCC患者については逆のことが真である傾向があった。その上、顔の2つの別の領域から採取されたBCCサンプルが、大幅に異なるレベルの欠失を示す(すなわち7.14%対0.02%)との観察は興味深いものであり、これは累積日光曝露の度合いの違いを反映するものである可能性がある。種々の日光曝露された身体部位から得られた組織学的に正常な病変部近傍のサンプルの比較的大きなサブセットにおける欠失の、発生パターンではなく、発生レベルを測定することにより、この側面をさらに調べることにした。

【0312】

種々の日光曝露された身体部位から得られた組織学的に正常な病変部近傍の皮膚サンプルのより大きなサブセットにおける3895bp欠失の定量

累積日光曝露の部位以外の要因による混乱を回避するために、腫瘍サンプルではなく組織学的に正常な病変部近傍の皮膚を選択した。定量的リアルタイムtaqman PCRを用いて、

10

20

30

40

50

外出時に日常的に曝露される (n=60) および時折曝露される (n=44) と定義される、種々の日光曝露された部位から得られた、104の年齢マッチングさせた分割ヒト皮膚サンプルにおける3895bp欠失のレベルを調べた。図13は、3つの対についての、日常的におよび時折日光曝露されるサンプルのリアルタイムPCRにより検出された、3895bp増幅産物および対応するレベルの3895bp欠失の、臭化エチジウム染色されたアガロースゲルの典型例を示す。図13は、日常的に日光曝露されたおよび時折日光曝露されるものにおける3895bp欠失のリアルタイムPCR定量および標準的PCR増幅を示しており、代表的臭化エチジウムアガロースゲルがその3895bp欠失の対応するレベルの典型例を示すが、これは3つの対の日常的に日光曝露されたおよび3つの対の時折日光曝露されるサンプルのリアルタイムPCRにより検出されたものである。欠失のレベルをパーセンテージとして表す。両方のパネルにおけるレーン1は分子量マーカーである (Hyperladder IV-範囲1000~100bp, Bioline Ltd, London UK)。各PCR反応に、同じ量のテンプレートDNAを添加した。両方のパネルにおける陽性対照は、リアルタイムPCR用のテンプレートを作製するためにクローニングし配列決定したPCR産物の由来する腫瘍DNAである。リアルタイムPCRにより検出された3895bp欠失のレベルと標準PCRにより検出されたそれとの比較からも、やはりこの2つの技術の良好な相関が示された。

【0313】

したがって、すべてのサンプルを定量的リアルタイムPCRアッセイを用いて分析することとした。この分析からの結果は、増加する日光曝露と共に3895 bp欠失の発生率が増加することを明確に示した。図14は、日常的に日光曝露されたおよび時折日光曝露される皮膚における3895bp欠失の定量を示す散布図である。3895bp欠失のレベルを、日常的に日光曝露されるおよび時折日光曝露される真皮および表皮におけるパーセンテージとして表すが、これはリアルタイムtaqman PCRにより測定されたものである。欠失の平均レベルを、各サンプルセットについて水平の線として示す。

【0314】

具体的には、定量リアルタイムPCR分析は、時折日光曝露されるサンプルと比較したときに、日常的に日光曝露されたサンプルにおいて欠失のレベルが有意に高いことを示した (真皮については $p=0.0009$ 、表皮については $p=0.008$; 両側t検定)。興味深いことに、真皮サンプルは表皮よりも高い頻度で欠失を保有した ($p=0.0143$ 時折日光曝露される、 $p=0.0007$ 日常的に日光曝露される)。病変部近傍の皮膚を採取した対象の平均年齢、性別および腫瘍型は、日常的に日光曝露されたおよび時折曝露された群 (方法を参照されたい) において非常に似ていたことから、これらの知見がこうした要因により混乱する可能性は低い。

【表9】

表9

名称	色素	位置	配列
ISF		16042-16066	5'-GAT TTG GGT ACC ACC CAA GTA TTG-3' 配列番号 148
ISR		16125-16102	5'-AAT ATT CAT GGT GGC TGG CAG TA=3' 配列番号 149
IS-プローブ	Vic	16069-16101	5'-CAC CCA TCA ACA ACC GCT ATG TAT TTC GTA CA-3'Tamra 配列番号 150
3895F		491-508	5'-CAA CCC TCG CCC ATC CTA-3'配列番号 151
3895R		4516-4489	5'-CCT GCA AAG ATG GTA GAG TAG ATG AC-3'配列番号 152
3895-プローブ	Fam	527//4450	5'-TGC TAA CCC CAT ACC CCG AAA ATG TTG G-3'Tamra 配列番号 153
L404		404-423	5' CTT TTG GCG GTA TGC ACT TT 3') 配列番号 145
H4676		4676-4657	5' GAT TAT GGA TGC GGT TGC TT 3') 配列番号 146

【0315】

実施例15：生検検査の確認

未使用の針コア生検サンプルを前立腺サンプルアーカイブから収集した：62良性、49悪性、30の腫瘍に隣接するがしかし悪性細胞を含まない生検材料。全体として、合計141のサンプル、ならびに7の追加サンプル(うち6つが標準曲線作成用であり、1つが陰性対照(試薬/反応汚染))を分析した。この完全アッセイを3回反復し、3人の別の個人がそれぞれ1回を行った。

【0316】

人工ニューラルネットワーク(ANN)に対して、盲検的に、腫瘍に隣接するまたは腫瘍の近位の良性サンプルを問い合わせた(クエリー)。さらに、腫瘍に対して遠位であると決定された複数のサンプル(前立腺切除術後にこの位置にマッピングされたもの)も追加した。結果は、隣接する悪性組織と一致して、腫瘍の近位の「正常」組織において3.4kb欠失の頻度が増大しているというものであった。しかしながら、遠位良性のサンプルは、その良性の形跡を保持した(図15)。この検査は、腫瘍の近くの位置から得られた正常組織に基づき悪性腫瘍を確認することができるものであり、3.4kb欠失の研究に基づく。ミトコンドリアDNAにおける分子変化(すなわち欠失)は、組織における検出可能な形態学的変化に先行して生じることが示された。したがって、病理学者による視覚的観察の元では見かけ上は正常または良性であるサンプルの組織領域であっても、悪性腫瘍に至る経路にある突然変異を蓄積し始めている可能性がある。本方法の機能は、病理学者による組織学的診断および前立腺生検の既存の臨床診療に対する大きな補完である。前立腺癌をスクリーニングするためのPSA検査の使用は、多数の生検手法を必要とし、推定70%は悪性細胞を示さない。こうした生検材料は良性と診断され、2つのカテゴリーに分類することができる：真の良性、すなわち前立腺には腫瘍は存在しない；および偽良性、この場合前立腺に腫瘍は存在するが針生検法は悪性腫瘍をサンプリングすることができなかった。良性組織の分子検査により、真の良性カテゴリーに属する個体が実際に良性であることを再度保証し、そのことにより彼らが少ない追跡生検処置または追跡生検処置なしでさほど綿密ではない追跡で済むようにするか、さもなければ、症状を引き起こしているものの生検法ではまだ検出することのできない悪性腫瘍の早期検出を提供し、診断用の追加の生検の必要性をなくし、臨床医に患者への早期のおよび高確率でより効果的な治療を開始する機会を提供する。この検査は、高い数の偽陰性診断に苦しめられている現在の生検分析に対して再保証と確認の両方を提供する。

【0317】

実施例16：前立腺腫瘍マッピング

腫瘍挙動マーカー発見のために行われた研究のさらなる潜在的結果は、六ヶ所針生検標本に基づく、前立腺内の腫瘍の位置の3次元モデルを提供する能力である。隣接良性組織中の悪性腫瘍の存在を反映する3.4kb欠失の機能は、このマッピング手法に極めて重要である。このマップは、泌尿器科医および癌専門医に対して、前立腺腫瘍のバーチャルモデルを提供し、治療判断を助けうる。

【0318】

参考文献

- Alonso, A. C Alves, M.P. Suarez-Mier, C Albarran, L Pereira, L Fernandez de Simo n, P. Martin, O Garcia, L Gusmao, M Sancho, A Amorim 2005. J Clin Pathology 58: 83-86.
- Anderson S,ら, Nature 290:457-464, 1981
- Andrews RM,ら, Nature Genetics 23(2):147, 1999
- Armstrong, B.K. & Kricker, A. (2001). The epidemiology of UV induced skin cancer . J Photochem Photobiol B, 63, 8-18.
- Armstrong, B.K. (2004). How sun exposure causes skin cancer: an epidemiological perspective. In Prevention of Skin Cancer, Hill, D., Elwood, J.M. & English, D.J . (eds), Vol. 3. pp. 89-116. Cancer Prevention - Cancer Causes. Kluwer Academic Publishers.

- Barringer S, Gene, 89:117 1990
- Bassam BJ, Caetano-Anolles PM, Gresshoff PM., Anal. Biochem. 196: 80-83, 1991
- Berneburg, M., Gattermann, N., Stege, H., Grewe, M., Vogelsang, K., Ruzicka, T. & Krutmann, J. (1997). Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system. Photochem Photobiol, 66, 271-5.
- Berneburg, M., Grether-Beck, S., Kurten, V., Ruzicka, T., Briviba, K., Sies, H. & Krutmann, J. (1999). Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. J Biol Chem, 274, 15345-9.
- Berneburg, M., Plettenberg, H., Medve-Konig, K., Pfahlberg, A., Gers-Barlag, H., Gefeller, O. & Krutmann, J. (2004). Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion in vivo in normal human skin. J Invest Dermatol, 122, 1277-83.
- Berthon P, Valeri A, Cohen-Akenin A, Drelon E, Paiss T, Wohr G, Latil AS, Am. J. Hum. Genet., 62: 1416-1424, 1998
- Birch-Machin MA and Krishnan K. Mitochondrion, 1, p45 (2001).
- Birch-Machin MA, S, Methods in Toxicology, Volume 2, 51-69, 1993
- Birch-Machin MA, Lindsey J. Lusher M and Krishnan K. Mitochondrion, 1 Suppl. 1, S30 (2001).
- Birch-Machin MA, Online Conference Report (Sunburnt DNA), International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, New Scientist, 2000(a)
- Birch-Machin MA, Taylor RW, Cochran B, Ackrell BAC, Turnbull DM. Ann Neurol 48: 330-335, 2000(b)
- Birch-Machin, M.A. (2000). Mitochondria and skin disease. Clin Exp Dermatol, 25, 141-6.
- Birch-Machin, M.A., Tindall, M., Turner, R., Haldane, F. & Rees, J.L. (1998). Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo- rather than chronological aging. J Invest Dermatol, 110, 149-52.
- Bogliolo, M, S, Mutagenesis, 14: 77-82, 1999
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. & Fusenig, N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. J Cell Biol, 106, 761-71.
- Brierley EJ, Johnson MA, Lightowlers RN, James O, Turnbull DM., Ann Neurol 43(2):217-223, 1998
- Brockington, S, Nature Genet 4:67-71, 1993
- Brown, M.D., S, Am J. Humn Genet, 60: 381-387, 1997
- Brumley, R. L. Jr. and Smith, L.M., 1991, Rapid DNA sequencing by horizontal ultrathin gel electrophoresis, Nucleic Acids Res. 19:4121-4126 Nucleic Acids Res. 19: 4121-4126
- Buttayan R, Sawczuk IS, Benson MC, Siegal JD, Olsson CA., Prostate 11:327-337, 1987
- Byrne E., Curr Opin Rheumatol 4(6):784-793, 1992
- Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, Herman JG, Jen JS, Cancer Res 57:4997-5000, 1997
- Carew J.S. and Huang P. Molecular Cancer <http://www.molecular-cancer.com> (2002)
- Chee, M. S Science 274; 610-614, 1996
- Chen J.Z. S Cancer Research (62): 6470-6474 (2002).
- Chen J.Z. S Carcinogenesis (Vol 24) No. 9 1481-1487 (2003)
- Chinnery PF and Turnbull DM., Lancet 354 (supplement 1): 17-21, 1999
- Chinnery PF and Turnbull DM., Lancet 354 (supplement 1): 17-21, 2000

- Chinnery PF, Howel N, Turnbull DM. *J. Med. Genet.*; 36: 425-436, 1999
- Chollat-Traquet, C, Tobacco or health: a WHO programme., *Eur J Cancer*, 28(2-3): 311-315, 1992
- Chomyn, A., Martinuzzi, A., Yoneda, M., Daga, A., Hurko, O., Johns, D., Lai, S.T., Nonaka, I., Angelini, C. & Attardi, G. (1992). MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 4221-5.
- Cohen D, Barton G, The cost to society of smoking cessation., *Thorax*. 53(2): S38-42, 1998 10
- Corral-Debrinski S, *Mutat Res*, 275: 169-180, 1991
- Cortopassi G, Wang E., *Biochim Biophys Acta* 1271(1):171-176, 1995
- Cortopassi G. A. and Arnheim, H. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans, *Nucleic Acids Res.* 18, 6927-6933 1990
- Croteau DL, Stierum RH, Bohr VA, *Mutat Res* 434(3):137-148, 1999
- Croteau, D.L. & Bohr, V.A. (1997). Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J Biol Chem*, 272, 25409-12.
- Current Protocols in Molecular Biology
- Davis RM, Boyd GM, Schoenborn CA, "Common courtesy" and the elimination of passive smoking. Results of the 1987 National Health Interview Survey. *JAMA* 263(16): 2208-10, 1990 20
- Degoul, F., Nelson, I., Amselem, S., Romero, N., Obermaier-Kusser, B., Ponsot, G., Marsac, C. & Lestienne, P. (1991). Different mechanisms inferred from sequences of human mitochondrial DNA deletions in ocular myopathies. *Nucleic Acids Res*, 19, 493-6.
- Diffey, B.L. (2002). Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*, 28, 4-13.
- Dong JT, Isaacs WB, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, Barrett JC., *Science* 268:884-886, 1995
- Driezen P, Brown KS., Searchable database of questionnaire items from population surveys of tobacco use in Canada: A summary report to the Ontario Tobacco Research Unit (Toronto, Ontario) 1999 30
- Durham, S.E., Krishnan, K.J., Betts, J. & Birch-Machin, M.A. (2003). Mitochondrial DNA damage in non-melanoma skin cancer. *Br J Cancer*, 88, 90-5.
- Easton RD, Merriwether AD, Crews DE, and Ferrell RE., *Am. J. Hum. Genet.* 59:202-212, 1996
- Fahn H, Wang L, Hseith R, Chang S, Kao S, Huang M, and Wei Y. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 154:1141-1145, 1996
- Fahn HJ, Wang LS, Kao SH, Chang SC, Huang MH, Wei YH., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 19(6): 901-9, 1998 40
- Finegold D., *Mitochondrial Disease- Primary Care Physician's Guide*. Psy-Ed. Corp D/B/A Exceptional Parents Guide: 12, 1997
- Flanagan N, Birch-Machin MA, Rees JL., *Hum Mol Genet* 9 (17):2531-2537, 2000
- Flanagan N, Ray AJ, Todd C, Birch-Machin MA and Rees JL. *J Invest. Dermatol* (2001) 117 (5) 1314-1317
- Fliss MS, *Science* 287: 2017-2019, 2000
- Gattermann, N, Berneburg, M, Heinisch, J, Aul, C, Schneider, W., *Leukemia* 9(10): 1704-10, 1995
- Green R, Reed JC., *Science* 281 (5381):1309-1312, 1998
- Guatelli, S, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 1874 1990 50

- Gulavita, Sunil Dr. Northwestern Ontario Cancer Centre - Personal Communication
- Habano S, Nakamura, Sugai T., *Oncogene* 17 (15):1931-1937, 1998
- Harbottle S, *The Journal of Investigative Dermatology*:1518 -1521, 2004.
- Harding RM, S, *Am. J. Hum. Genet.* 66, 1351-1361, 2000
- Harman, D., *Proc Natl Acad Sci USA* 78(11): 7124-8, 1981
- Hattori S, Age-dependant increase in deleted mitochondrial DNA in the human heart: possible contributory factor to presbycardia, *AM. Heart J.*, 121, 1735-1742, 1991
- Hayashi, J., Ohta, S., Kikuchi, A., Takemitsu, M., Goto, Y. & Nonaka, I. (1991). Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci*, 88, 10614-10618. 10
- Hayward SW, Grossfeld GD, Tlsty TD, Cunha GR., *Int J Oncol* 13:35-47, 1998
- Healy E, Birch-Machin MA, Rees JL. Chapter 11. The Human Melanocortin 1 Receptor Gene. In the *Melanocortin Receptors*(Cone RD (ed)). Humana Press Inc. New Jersey, USA, 1999
- Healy E, Birch-Machin MA, Rees JL., *Lancet* 355, 1072-1073, 2000
- Hearst N, Hulley SB. Using secondary data, In *Designing clinical research: an epidemiological approach*. Ed. Hulley, S. and Cummings, S., Baltimore: Williams & Wilkins, pages 53-62, 1988 20
- Hopgood, R., S, 1992, Strategies for automated sequencing of human mtDNA directly from PCR products, *Biotechniques* 13:82-92
- Hsieh, RH and Wei, YH, Age-dependent multiple deletions in human muscle mitochondrial DNA, in preparation 1992
- [Http://www.ornl.gov/hgmis/project/budget.html](http://www.ornl.gov/hgmis/project/budget.html))
- Huang GM, Ng WL, Farkas J, He L, Liang HA, Gordon D, Hood R., *Genomics* 59(2):178-86,1999
- Huoponen, Kirsi, Leber hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic findings, *Neurogenetics* (2001) 3: 119-125.
- Ikebe S, Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170, 1044-1048, 1990 30
- Innis S PCR Protocols, A Guide to Methods and Application, Academic Press Inc. San Diego 1990
- Kaiserman MJ, *Chronic Dis Can* 18(1): 13-9, 1997
- Kalra J, Chaudhary AK, Prasad K., *Int. J. Exp. Pathol.* 72(1): 1-7, 1991
- Katayama S, Deleted mitochondrial DNA in the skeletal muscle of aged individuals, *Biochem. Int.*, 25, 47-56 1991
- Kleinle S, S, *Human Genet.* 290: 457-465, 1997
- Koch, H., Wittern, K.P. & Bergemann, J. (2001). In human keratinocytes the Common Deletion reflects donor variabilities rather than chronologic aging and can be induced by ultraviolet A irradiation. *J Invest Dermatol*, 117, 892-7. 40
- Konishi N, Cho M, Yamamoto K, Hiasa Y. *Pathol. Int.* 47:735-747,1997
- Krishnan K and Birch-Machin MA. *British Journal of Dermatology* (2002), 146,723
- Kwoh S *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 1173 1989
- Landegren S *Science*, 241: 1077 1988
- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. *Cancer J. Clin.* 49:8-31
- LeDoux SP, S *Mutat Res* 434(3):149-159, 1999
- LeDoux, S.P., Patton, N.J., Avery, L.J. & Wilson, G.L. (1993). Repair of N-methylpurines in the mitochondrial DNA of xeroderma pigmentosum complementation group D cells. *Carcinogenesis*, 14, 913-7. 50

- Lee HC, 5 FEBS Letters 354:79-83,1994
- Lee HC, 5 Arch. Biochem. Biophys. 362(2): 309-16, 1999
- Lee HC, Lu CY, Fahn HJ, Wei YHu. Federation of European Biochemical Societies, 441:292-296,1998
- Leonard & Shapira 1997
- Li Y, 5 In: Oxygen Radicals and the Disease Process, Amsterdam, The Netherlands : Harwood Academic Publishers, 237-277, 1997
- Lindsey J, Lusher M, Krishnan KJ and Birch-Machin MA., British Journal of Dermatology (2001), 144,655
- Linnane 5 , 1990 10
- Liu CS, Kao SH, Wei YH. Environ. Mol. Mutagen 30(1): 47-55, 1997
- Lopez, J.V. 5 (1994) Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the cat. J. Mol. Evol. 39, 174-190.
- Lowes S, Krishnan K, Lindsey J, Lusher M and Brich-Machin MA. British Journal of Dermatology (2002, 146,736
- Luckey, J.A., 5 , 1993, High speed DNA sequencing by capillary gel electrophoresis, Methods Enzymol. 218: 154-172
- McCormack, Douglas. Website: <http://cormactech.com/dna>, 2001
- Meibner C, von Wurmb N, Oehmichen M., Int. J. Legal Med. 110: 288-291, 1997
- Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G., Science 286: 77 20
4-779,1999
- Miquel J, de Juan E, Sevilla I. EXS 62:47-57,1992
- Mita, S., Rizzuto, R., Moraes, C.T., Shanske, S., Arnaudo, E., Fabrizi, G.M., Koga, Y., DiMauro, S. & Schon, E.A. (1990). Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA. Nucleic Acids Res, 18, 561-7.
- Mitochondrial Research Society <http://www.mitoresearch.org/diseases.html>.
- Mitomap. (2004). <http://www.mitomap.org>
- MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>, 2005.
- MITOMAP: A human mt genome database (www.gen.emory.edu/mitomap.html) 30
- Moraes, C.T., Ricci, E., Petruzzella, V., Shanske, S., DiMauro, S., Schon, E.A. & Bonilla, E. (1992). Molecular analysis of the muscle pathology associated with mitochondrial DNA deletions. Nat Genet, 1, 359-67.
- Moraes, C.T., Sciacco, M., Ricci, E., Tengan, C.H., Hao, H., Bonilla, E., Schon, E.A. & DiMauro, S. (1995). Phenotype-genotype correlations in skeletal muscle of patients with mtDNA deletions. Muscle Nerve, 3, S150-3.
- Mullis and Faloona Methods Enzymol 155, 335 1987
- Nachman MW, Brown WM, Stoneking M, Aquardo CF., Genetics 142:53-963,1996
- National Cancer Institute of Canada, Canadian cancer statistics 2000., National Cancer Institute of Canada., Toronto, Ont. 2000 40
- Naviaux, RK., Mitochondrial Disease- Primary Care Physican ' s Guide. Psy-Ed. Corp D/B/A Exceptional Parents Guide: 3-10, 1997
- Newton, CR and Graham, A., Introduction toBiotechniques Series 1997
- Oefner PJ, Underhill PA., Current protocols in human genetics 19, 7.10.1-12, 1998
- Ozen M, 5 , Prostate 36:264-271,1998
- Pang, C.Y., Lee, H.C., Yang, J.H. & Wei, Y.H. (1994). Human skin mitochondrial DNA deletions associated with light exposure. Arch Biochem Biophys, 312, 534-8.
- Parsons TJ, 5 , Nature Genet. 15 (4):363-368, 1997
- Pascucci, B., Versteegh, A., van Hoffen, A., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H. 50

- & Dogliotti, E. (1997). DNA repair of UV photoproducts and mutagenesis in human mitochondrial DNA. *J Mol Biol*, 273, 417-27.
- Penta JS, Johnson FM, Wachsmann JT, Copeland WC., *Mut. Res.* 488, 119-133, 2001
- Polyak Y, ␣, *Nature Genet.* 20 (3):291-293, 1998
- Ray AJ, Pickersgill L, Turner R, Nikaido O, Rees JL, Birch-Machin MA., *J. Invest . Dermatol* 115(4):674-679, 2000
- Ray AJ, Rees JL, Birch-Machin MA., *Brit.J.Dermatol.*140:788, 1999
- Ray AJ, Rees JL, Birch-Machin MA., *J. Invest.Dermatol.* 110:692, 1998
- Rees JL, Skin cancer. In: *The Genetic Basis of Human Cancer*, eds Vogelstein B, Kinzler K. New York: McGraw-Hill, pp527-536, 1998 10
- Rehman I, Quinn AJ, Healy E, Rees JL. *Lancet* 344: 788-789, 1994
- Rehman I, Takata M, Wu YY, Rees JL. *Oncogene* 12: 2483-2490, 1996
- SAS Enterprise Mining Users Guide, SAS Inc., 2000
- Sawyer, D.E. & Van Houten, B. (1999). Repair of DNA damage in mitochondria. *Muta t Res*, 434, 161-76.
- Schon, E.A., Rizzuto, R., Moraes, C.T., Nakase, H., Zeviani, M. & DiMauro, S. (1 989). A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondri al DNA. *Science*, 244, 346-9.
- Schurr TG, Ballinger SW, Gan Y, Hodge JA, Merriwether DA, Lawrence DN, Knowler W C, Weiss KM, and Wallace DC., *Am. J. Hum. Genet.* 46:613-623, 1990 20
- Sciaccio, M., Bonilla, E., Schon, E.A., DiMauro, S. & Moraes, C.T. (1994). Distri bution of wild-type and common deletion forms of mtDNA in normal and respiration -deficient muscle fibers from patients with mitochondrial myopathy. *Hum Mol Gene t*, 3, 13-9.
- Seidman, M.D. ␣, *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg.*, 123: 1039-1045, 1997
- Seo, Jinwook ␣, Interactively optimizing signal-to-noise ratios in expression pr ofiling: project-specific algorithm selection and detection p-value weighting in Affymetrix microarrays, *Bioinformatics*, Vol. 20, pp. 2534-2544, 2004a.
- Seo, Jinwook, ␣, Interactive Color Mosaic and Dendrogram Displays for Signal/Noi se Optimization in Microarray Data Analysis, *IEEE International Conference on Mu ltimedia and Expo* 2003. 30
- Seo, Jinwook, Shneiderman, Ben, A Rank-by-Feature Framework for Interactive Expl oration of Multidimensional Data, will appear in the journal, *Information Visual ization*, 2005a. (pdf)
- Seo, Jinwook, Shneiderman, Ben, A Rank-by-Feature Framework for Unsupervised Mul tidimensional Data Exploration Using Low Dimensional Projections, *Proc. IEEE Inf oVis* 2004b, pp. 65-72.
- Seo, Jinwook, Shneiderman, Ben, Interactive Exploration of Multidimensional Micr oarray Data: Scatterplot Ordering, Gene Ontology Browser, and Profile Search, *HC IL-2003-25, CS-TR-4486, UMIACS-TR-2003-55.* 40
- Seo, Jinwook, Shneiderman, Ben, Interactively Exploring Hierarchical Clustering Results, *IEEE Computer*, Volume 35, Number 7, pp. 80-86, July 2002. [initial draf t (pdf)]
- Seo, Jinwook, Shneiderman, Ben, Knowledge Integration Framework for Information Visualization, will be published in *LNCS* by Springer-Verlag, Berlin Heidelberg N ew York, 2005b. (pdf)
- Seo, Jinwook, Shneiderman, Ben, Understanding Clusters in Multidimensional Space s: Mading Meaning by Combining Insights from Coordinated Views of Domain Knowled ge, Technical Report, *HCIL-2004-03*, 2004c.
- Severi, G. & English, D.J. (2004). Descriptive epidemiology of skin cancer. In P 50

- revention of Skin Cancer, Hill, D., Elwood, J.M. & English, D.J. (eds), Vol. 3. pp. 73-88. Cancer Prevention - Cancer Causes. Kluwer Academic Publishers.
- Shankey TV, Jin JK, Dougherty S, Flanigan RC, Graham S, Pyle JM., Cytometry 21:30-39, 1995
- Shay JW, Werbin H., Mutat. Res:186: 149, 1987
- Sherrat EJ, Thomas AW, Alcolado JC., Clin. Sci. 92:225-235, 1997
- Shoffner JM, Brown MD, Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Mirra SS, Beal MF, Yang C, Gearing M, Salvo R, Watts RL, Juncos JL, Hansen LA, Crain BJ, Fayad M, Reckford CL, and Wallace DC., Genomics 17: 171-184, 1993
- Shoffner, J.M., Lott, M.T., Voljavec, A.S., Soueidan, S.A., Costigan, D.A. & Wallace, D.C. (1989). Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy. Proc Natl Acad Sci U S A, 86, 7952-6.
- Singh K.K. and Modica-Napolitano J.S. Expert reviews in molecular medicine. <http://www.ermm.cbcu.ac.uk> (2002)
- Smith DG, Malhi RS, Eshleman J, Lorenz JG and Kaestle FA., Am. J. Hum. Genet. 110:271-284, 1999
- Smith R, Birch-Machin MA, Rees JL. J. Invest. Dermatol. 111: 101 -104, 1998
- SpringNet - CE Connection: Screening, Diagnosis: Improving Primary Care Outcomes. Website: <http://www.springnet.com/ce/j803a.htm>
- Stone AC and Stoneking M. Amer. J., Phys. Anthro. 92(4):463-471, 1993
- Tamura S, Eur.J.Cancer [A] 35 (2):316-319, 1999
- Tanaka, M., 1996, Automated sequencing of mtDNA, Methods Enzymol. 264: 407-421
- Taniike, M., BioChem BioPhys Res Comun, 186: 47-53, 1992
- Taylor RW, Birch-Machin MA, Bartlett K, Turnbull DM., J Biol Chem, 269, 3523-3528 1994
- Tijssen, P. (ed) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 24: Hybridization with Polynucleotide Probes, Elsevier, N.Y., 1993
- Tori, Ageing-associated deletions of human diaphragmatic mitochondrial DNA, AM J. Respir. Cell Mol. Biol. in press 1992
- Valnot, Isabelle, A mitochondrial cytochrome b mutation but no mutations of nuclearly encoded subunits in ubiquinol cytochrome c reductase (complex III) deficiency, Human Genetics (1999) 104: 460-466.
- Van De Graff, KM, Fox, SI. Concepts of Human Anatomy and Physiology., Dubuque: W M. C. Brown Publishers, 1995
- Van den Bosch BJC, Nucleic Acids Res. 28: 89, 2000
- von Wurmb, N, Oehmichen, M, Meissner, C., Mutat Res. 422:247-254, 1998
- Wald and Wallace, D.C., Mitochondrial Diseases in man and Mouse. Science, 5(283): 1482-1497, 1999
- Wald, NJ, Hackshaw, AK, Cigarette Smoking: an epidemiological overview. Br Med Bull. 52(1): 3-11, 1996
- Wallace DC. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 8739-8746, 1994
- Wallace DC., Annu Rev Biochem, 61: 1175-1212, 1992
- Wallace, Mitochondrial DNA Mutation Associated with Leber's Hereditary Optic Neuropathy, Science, 1427-1429
- Walsh PC, Partin AW. Cancer 80:1871-1874, 1997
- Ward 1993
- Ward RH, Frazier BL, Dew-Jager K, Paabo S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8720-8724, 1991

Wei YH. Proceedings of the Nat. Sci. Council of the Republic of China April 22(2):5567, 1998

Wei, Y.H., Pang, C.Y., You, B.J. & Lee, H.C. (1996). Tandem duplications and large-scale deletions of mitochondrial DNA are early molecular events of human aging process. Ann N Y Acad Sci, 786, 82-101.

Weinstock MA: In: JJ Stern RS, MacKie RM and Weinstock MA, Grob (eds) Epidemiology, Blackwell (UK). pp121-128, 1998

Wesson, K.M. & Silverberg, N.B. (2003). Sun protection education in the United States: what we know and what needs to be taught. Cutis, 71, 71-4, 77.

Woodwell DA. National Ambulatory Medical Care Survey: 1997 Summary. Advance data from vital and health statistics; no. 305. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics. 1999

Wu & Wallace Genomics, 4:560, 1989

Xu J, 5, Nature Genet 20: 175-179, 1998

Yamaguchi KT, 5, Free Radical Res. Commun. 16(3):167-74, 1992

Yeh, J.J., 5, Oncogene Journal, 19: 2060-2066, 2000

Yen 5, Age-dependent 6 kb deletion in human liver mitochondrial DNA, Biochem. Int. 26, 457-468 1992

Yen 5, Ageing-associated 5kb deletion in human liver mitochondrial DNA, Biochem., Biophys., Res. Commun., 178, 124-131 1991

Zeviani M, 5, Am. J. Hum. Genet. 47:904-914, 1990

Zhang 5, Multiple mitochondrial DNA deletions in an elderly human individual, FEBS Lett, 297, 34-38 1992

Zhang, C., 5, BioChem. BioPhys. Res. Commun., 195: 1104-1110, 1993

Zhao, Po 5, In vivo filtering of in vitro MyoD target data: An approach for identification of biologically relevant novel downstream targets of transcription factors, Comptes Rendus Biologies, Vol. 326, Issues 10-11, October-November 2003, pp 1049-1065.

【 0 3 1 9 】

本発明の範囲から逸脱することなく種々の変更および改変を行うことが可能である。本明細書の開示は例示的なものであって限定的なものではないことを意図する。本明細書の記載は当業者に多くの変法および代替法を提案する。こうした代替法および変法はいずれも、特許請求の範囲に包含されることを意図する。当業者であれば、記載された特定の実施形態と等価な別の実施形態を認識することができ、それらもまた特許請求の範囲に包含されることを意図する。

【図面の簡単な説明】

【 0 3 2 0 】

【図 1】前立腺癌を有する患者由来のミトコンドリアDNA中のヌクレオチド位置における突然変異の数を示すヒストグラムである。

【図 2】Hierarchal Clustering Explorer(HCE)を用いて得られた非同義的クラスターの最初の半分を示す。

【図 3】Hierarchal Clustering Explorer(HCE)を用いて得られた非同義的クラスターの残り半分を示す。

【図 4】重要なクラスターに陰影をつけた図 3 の写しである。

【図 5】3.4 kb欠失の検出のために有用なプライマーの設計と配列を示す概略図である。

【図 6】3.4 kb研究における悪性の参加者と症状のある良性の参加者との間のサイクル閾値の比較を示すグラフである。

【図 7】実施例12に関連したサイクル閾値を示すグラフである。

【図 8】図 8 a は、時折日光曝露された皮膚と比較して日常的に日光曝露された皮膚における3895 bp欠失の頻度が大きいことを示す、代表的臭化エチジウム染色アガロースゲル

10

20

30

40

50

である。図8bは、種々の日光曝露身体部位から得られた104の分割皮膚サンプルにおける3895 bp欠失の頻度のヒストグラムである。

【図 9】17の反復的なUVRの照射後に観察される3895 bp欠失のUV誘導性の増大を示すゲルである。

【図 10】3895 bp欠失を検出するために実施例14に用いた、mtDNA上のPCRプライマーおよびTaqManプローブの位置の略図である。

【図 11】3895 bp欠失(A)および野生型内部標準(B)についての、テンプレート濃度と閾値サイクル数(CT)との間の直線関係を示す2つのグラフである。

【図 12】BCCおよびSCCにそれぞれ由来する、腫瘍(T)ならびに組織学的に正常な病変部近傍の真皮(D)および表皮(E)における3895 bp欠失の発生を示す臭化エチジウム染色アガロースゲルの写真である。

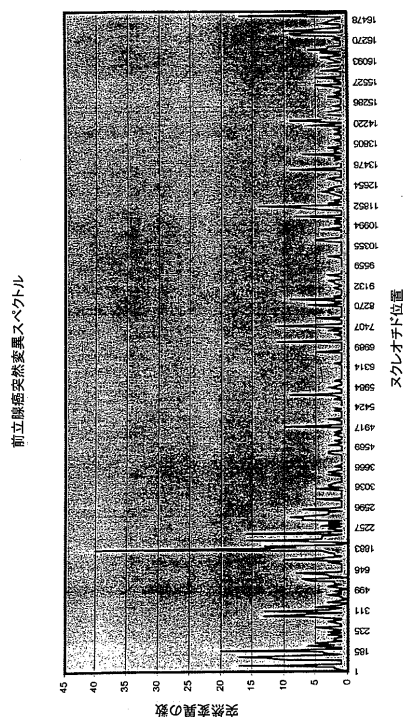
10

【図 13】3対の日光曝露および3対の日光間欠的なサンプルのリアルタイムPCRにより検出された3895欠失のそれらの対応するレベルの典型例を示す代表的な臭化エチジウムアガロースゲルの写真である。

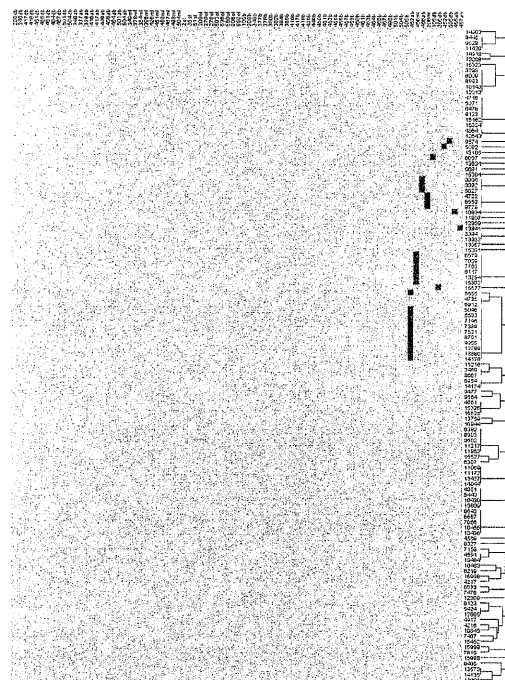
【図 14】リアルタイムPCRにより測定された、日光曝露および日光間欠的な真皮および表皮における3895 bp欠失のレベルをパーセンテージとして表したものを示す散布図である。

【図 15】前立腺腫瘍の診断における、生検結果とmtDNA分析との関係を示す図である。

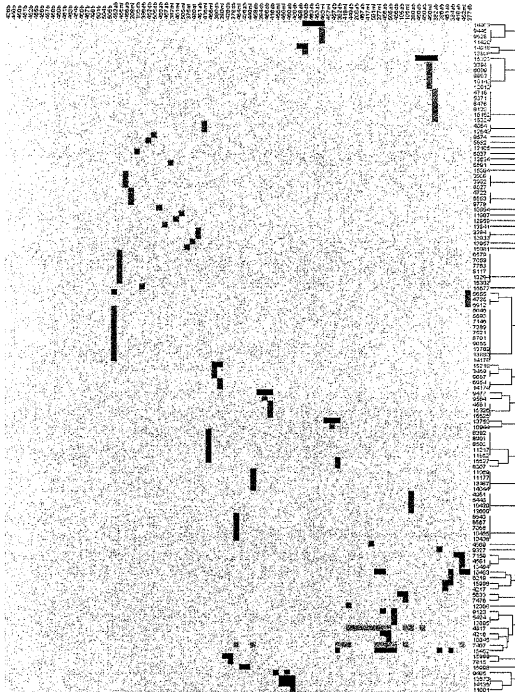
【図 1】



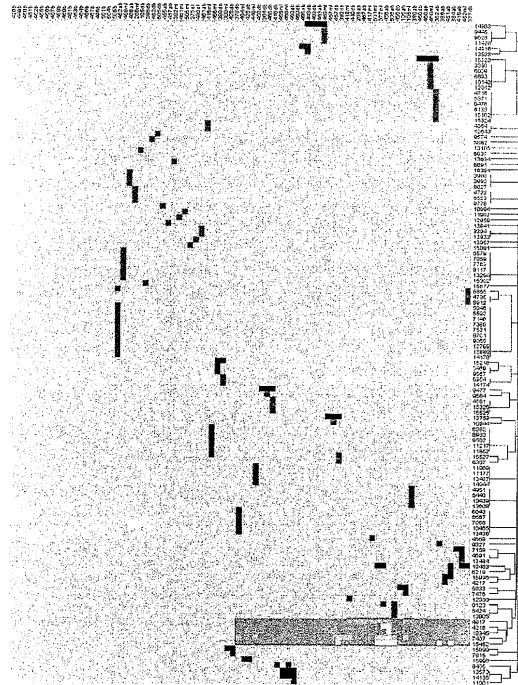
【図 2】



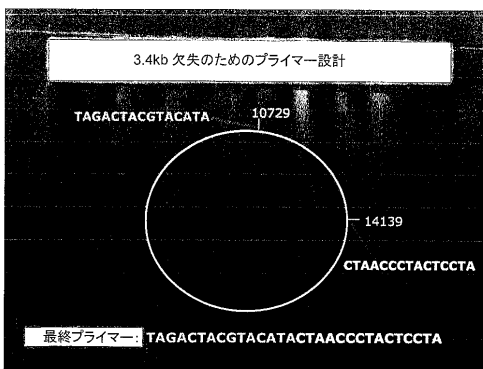
【図 3】



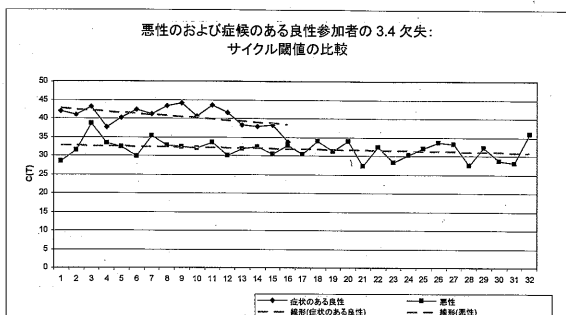
【図 4】



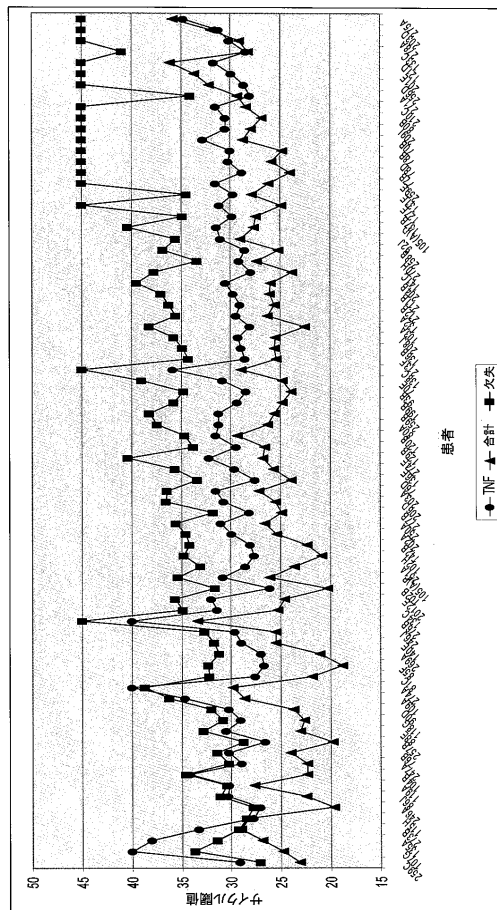
【図 5】



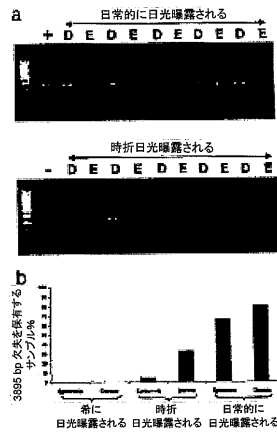
【図 6】



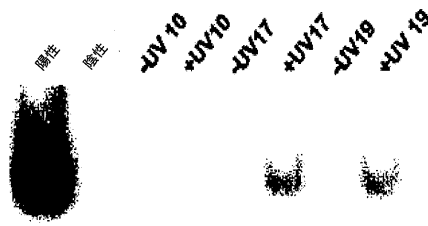
【図 7】



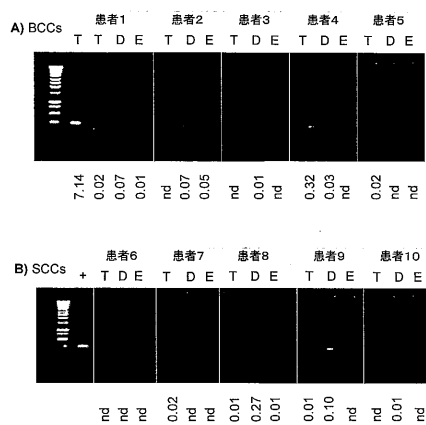
【図 8】



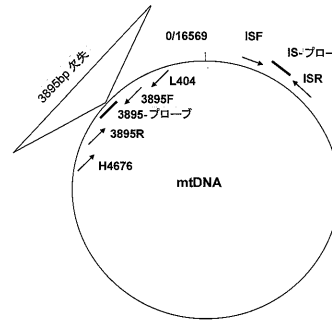
【図 9】



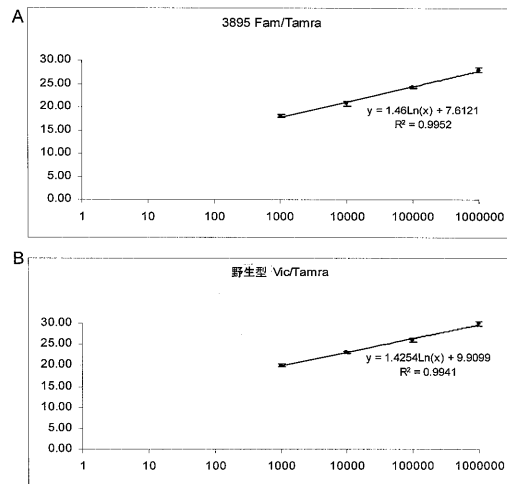
【図 12】



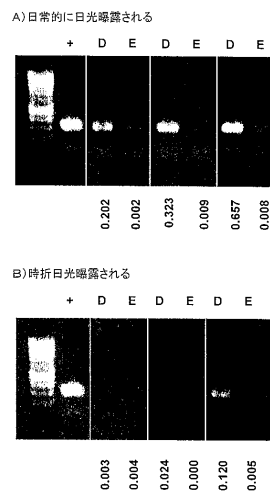
【図 10】



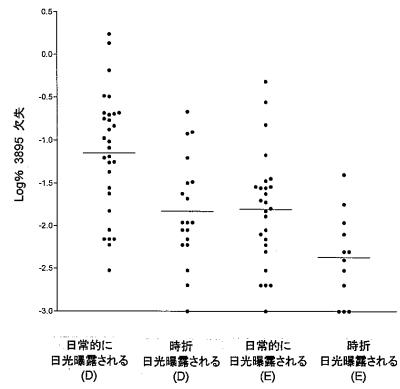
【図 11】



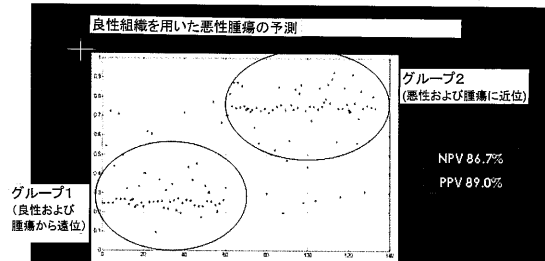
【図 13】



【図 14】



【図 15】



【配列表】

0005537804000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/789,872

(32)優先日 平成18年4月7日(2006.4.7)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 セイアー, ロバート

カナダ国 ピー7ケイ 1エイチ5 オンタリオ, サンダー ベイ, ファルコンクリート ドライブ 2197

(72)発明者 ダクボ, ガブリエル

カナダ国 ピー7ジェイ 1エイチ7 オンタリオ, サンダー ベイ, ブラナン レーン 1016

(72)発明者 マキ, ジェニファー

カナダ国 ピー7ピー 5エス8 オンタリオ, サンダー ベイ, ペパリー ストリート 537

(72)発明者 ロビンソン, ケリー

カナダ国 ピー7エイ 4エックス1 オンタリオ, サンダー ベイ, コート ストリート ノース 400

(72)発明者 マグラ, アンドレア

カナダ国 ピー7ジー 1シー6 オンタリオ, サンダー ベイ, ハットン パーク ドライブ 1291

(72)発明者 レグリー, ブライアン

カナダ国 ピー7エイ 5エス9 オンタリオ, サンダー ベイ, デューク ストリート 145

(72)発明者 ハーボトル, アンドリュウ

イギリス国 エヌイー1 3ディーダブリュー ニューカッスル アボン タイン, バンドン キーズ, ラブ レーン 19

(72)発明者 パーチ - マシャン, マーク

イギリス国 エヌイー3 4アールダブリュー ニューカッスル アボン タイン, ゴスフォース, キングスミア, エンブルホーブ ドライブ 5

審査官 吉森 晃

(56)参考文献 国際公開第2002/101086(WO, A1)

米国特許出願公開第2005/0026167(US, A1)

Nature Genetics, 1998年, Vol.20, pp.291-293

PNAS, 1994年, Vol.91, pp.6206-6210

Mutation Research, 2006年, Vol.595, pp.42-51

PNAS, 2005年 1月, Vol.102, No.3, pp.719-724

Oncogene, 2001年, Vol.20, pp.5195-5198

Exp. Gerontol., 2001年, Vol.37, p.169-174

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/00 - 3/00

CAplus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq