

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5777340号  
(P5777340)

(45) 発行日 平成27年9月9日 (2015.9.9)

(24) 登録日 平成27年7月17日 (2015.7.17)

(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

請求項の数 20 (全 48 頁)

(21) 出願番号	特願2010-520284 (P2010-520284)	(73) 特許権者	506137468
(86) (22) 出願日	平成20年8月6日 (2008.8.6)		オリオン ゲノミクス エルエルシー
(65) 公表番号	特表2010-535507 (P2010-535507A)		アメリカ合衆国 ミズーリ州 セントルイス
(43) 公表日	平成22年11月25日 (2010.11.25)		ス フォレスト パーク アベニュー 4
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/072356		0 4 1
(87) 国際公開番号	W02009/021054	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成21年2月12日 (2009.2.12)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成23年8月4日 (2011.8.4)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	60/954, 290		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成19年8月6日 (2007.8.6)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 裕孝
(31) 優先権主張番号	60/988, 715	(74) 代理人	100119507
(32) 優先日	平成19年11月16日 (2007.11.16)		弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100142929
前置審査			弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I G F 2 遺伝子の対立遺伝子特異的な発現を判定するための一塩基多型ならびに新規および公知の多型の組み合わせ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インスリン様増殖因子-2 (IGF2) 遺伝子のインプリンティングの消失を検出するために、IGF2遺伝子における一塩基多型 (SNP) についてヘテロ接合体であるヒト個体におけるRNAの対立遺伝子特異的な発現を定量化する方法であって、

SEQ ID NO: 4の26位のSNPの各多型選択肢を含むRNAの量を、個体由来の試料において定量化する段階; ならびに

該SNPの各多型選択肢を含んだRNAの相対量を、IGF2遺伝子のインプリンティングの消失と関連付ける段階であって、該SNPの2種の対立遺伝子の発現がインプリンティングの消失の指標となる、段階を含む方法。

【請求項 2】

IGF2遺伝子のインプリンティングの消失の検出が、がん又はがん素因を有していることの指標となる、あるいはIGF2遺伝子のインプリンティングの消失の低下または欠如が、抗がん処置が有効であることの指標となる、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

試料が血液、大便または組織試料である、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

RNAをcDNAに逆転写し、対立遺伝子特異的なcDNAの量を用いて、RNAの量を判定する、請求項1記載の方法。

## 【請求項 5】

個体がSNPについてホモ接合性またはヘテロ接合性であるかどうかを判定する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

## 【請求項 6】

ヒト個体におけるSNP遺伝子型を判定する方法であって、

個体由来のゲノムDNAを含有する試料において、一塩基多型(SNP)の多型位置のヌクレオチドを判定する段階を含み、該ヌクレオチドがSEQ ID NO:4の26位のヌクレオチドであり、

判定結果がIGF2遺伝子のインプリンティングの消失を検出するために利用される、方法。

10

## 【請求項 7】

SNPの一方の対立遺伝子(またはその相補体)と、SNPの他方の対立遺伝子(またはその相補体)とを、ハイブリダイゼーション反応において識別し、15～100ヌクレオチドである、ヒトインスリン様増殖因子2(IGF2)遺伝子のインプリンティングの消失を検出するためのプローブまたはプライマーであって、該SNPが、SEQ ID NO: 4の26位にある、プローブまたはプライマー。

## 【請求項 8】

プローブまたはプライマーの最後から2番目のまたは最後の3'ヌクレオチドが、SNPの多型ヌクレオチドとハイブリダイズする、請求項7記載のプローブまたはプライマー。

## 【請求項 9】

インスリン様増殖因子2 (IGF2) cDNAとハイブリダイズし、かつ、プライマーの3'ヌクレオチドが、SEQ ID NO: 4の26位のSNPの多型ヌクレオチドのすぐ上流のヌクレオチドに相補的であり、プライマーの少なくとも15個の連続した3'ヌクレオチドが前記cDNAに相補的である、ヒトインスリン様増殖因子2(IGF2)遺伝子のインプリンティングの消失を検出するための15～100ヌクレオチドのプライマー。

20

## 【請求項 10】

SEQ ID NO: 4のSNP配列またはその相補体を含み、SNPの多型位置のヌクレオチドが、SEQ ID NO:4の26位のAである、ヒトインスリン様増殖因子2(IGF2)遺伝子のインプリンティングの消失を検出するためのプライマーまたはプローブ。

## 【請求項 11】

請求項7または9記載のプライマーまたはプローブを含む、ヒトにおけるインスリン様増殖因子2 RNAの対立遺伝子特異的な発現を検出するためのキット。

30

## 【請求項 12】

SNPの第一の対立遺伝子と、SNPの第二の対立遺伝子(またはその相補体)とを、ハイブリダイゼーション反応において識別する、15～100ヌクレオチドの第一の単離プローブまたはプライマーを含む、請求項11記載のキット。

## 【請求項 13】

SNPの第一の対立遺伝子(またはその相補体)とSNPの第二の対立遺伝子(またはその相補体)とを識別する、15～100ヌクレオチドの第二の単離プローブまたはプライマーをさらに含むキットであって、第一のプローブまたはプライマーが第一の対立遺伝子における多型ヌクレオチドに相補的であり、第二のプローブまたはプライマーが第二の対立遺伝子の多型ヌクレオチドに相補的である、請求項12記載のキット。

40

## 【請求項 14】

多型部位を包含するIGF2遺伝子座の領域を増幅するため的一种または複数種のプライマーをさらに含むキットであって、該一种または複数種のプライマーが前記プローブまたはプライマーとは異なっている、請求項11記載のキット。

## 【請求項 15】

DNAポリメラーゼをさらに含む、請求項11記載のキット。

## 【請求項 16】

ポリメラーゼが熱安定性DNAポリメラーゼである、請求項11記載のキット。

50

## 【請求項 17】

逆転写酵素をさらに含む、請求項11記載のキット。

## 【請求項 18】

第一および/または第二のプロープまたはプライマーが検出可能に標識される、請求項12または13記載のキット。

## 【請求項 19】

請求項7または9記載のプライマーまたはプロープを含む、ヒトにおけるインスリン様増殖因子2 RNAの対立遺伝子特異的な発現を検出するための反応混合物。

## 【請求項 20】

以下を含む、請求項19記載の反応混合物：

SNPの第一の対立遺伝子(またはその相補体)と、SNPの第二の対立遺伝子(またはその相補体)とを、ハイブリダイゼーション反応において識別する、15~100ヌクレオチドの第一の単離プロープまたはプライマー；

熱安定性DNAポリメラーゼ；および

ヒトゲノムDNA、またはヒトRNAの逆転写由来のDNA。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連特許出願の相互参照

本出願は、2007年8月6日付で出願された米国仮特許出願第60/954,290号および2007年11月16日付で出願された米国仮特許出願第60/988,715号の優先権の恩典を主張するものであり、これらの各々が参照により組み入れられる。

## 【背景技術】

## 【0002】

発明の背景

インスリン様増殖因子2の遺伝子、すなわちIGF2は、ヒト染色体11p15.5上のインプリンティング遺伝子のクラスターに位置している。ゲノムインプリンティングは、一方の遺伝子コピーが通常発現され、他方のコピーが親由来の後成的マークを通じて沈黙化される重要な遺伝子調節機構である。IGF2は、通常、ヒト組織では母性的にインプリントされており、それゆえ、父性的に受け継がれた遺伝子コピーからのみ発現される(DeChiara TM, et al. Cell 64, 849-859 (1991)(非特許文献1); Rainier S, et al., Nature 362, 747-749 (1993)(非特許文献2); Ogawa, et al, Nature 362, 749-751 (1993)(非特許文献3))。IGF2のインプリンティングの消失(インプリンティングの消失またはLOIといわれる)は、いくつかのがん種(Falls, et al. 1999, AJP 154, 635-647(非特許文献4)に概説されている20種を超える腫瘍種)に強く結び付けられている。さらに、山のような証拠から、IGF2のLOIを示す個体は、結腸直腸がんを発症するリスクが高い可能性のあることも示唆される(Kinochi et al., 1996, Cancer Letters 107, 105-108 (1996)(非特許文献5); Nishihara S. 2000, Int. Jour. Oncol. 17, 317-322(非特許文献6); Cui H 1998, Nature Medicine 4-11, 1276-1280(非特許文献7); Nakagawa H 2001, PNAS 98-2, 591-596(非特許文献8))。IGF2のLOIは、末梢血および正常結腸粘膜を含むがん患者の正常組織において(Kinochi et al., 1996, Cancer Letters 107, 105-108 (1996)(非特許文献5); Ogawa, et al, Nature Genetics 5, 408-412 (1993)(非特許文献9); Cui H, Science 299, 1753 (2003)(非特許文献10))、ならびにがんがないと考えられる人の正常組織において(Cui H, et al. Nature Medicine 4-11, 1276-1280 (1998)(非特許文献7); Cui H, Science 299, 1753 (2003)(非特許文献10); Woodson K et al., JNCI 96, 407-410 (2004)(非特許文献11); Cruz-Correa Met al., Gastroenterology 126, 964-970 (2004)(非特許文献12))検出することができる。

## 【0003】

一般集団の末梢血に関するいくつかの研究から、7~10%の人が結腸粘膜組織においてIGF2のインプリンティングの消失を示すことが報告されている。三つの後ろ向き研究から、

10

20

30

40

50

末梢血または結腸粘膜のどちらかでIGF2のLOIを示す結腸直腸がん患者の確率は、LOIを示すがんなしの年齢適合対照群の確率よりも著しく(2~21倍)高いことが報告されている。これらの研究から、IGF2のLOIは、他の点では健常な個体を結腸直腸がんにかかりやすくさせる可能性のあることが示唆される。それゆえ、IGF2のLOIの検出に基づくリスク検査には将来の臨床の有益性があり得る(Cui H, et al. Nature Medicine 4-11, 1276-1280 (1998)(非特許文献7); Cui H, Science 14, 1753-1755 (2003)(非特許文献13); Woodson K 2004, JNCI 96, 407-410(非特許文献11); Cruz-Correa M, Gastroenterology 126, 964-970 (2004)(非特許文献12))。これらの研究から、IGF2のLOI (IGF2バイオマーカーともいわれる)を有する人は、IGF2バイオマーカーのない個体よりも結腸直腸がんを発症する可能性が最大で20倍まで高い可能性のあることが明らかである。

10

#### 【 0 0 0 4 】

IGF2のLOIの検出は、IGF2遺伝子の両コピー由来の転写産物がそれぞれ定量化される定量的な対立遺伝子特異的遺伝子発現アッセイ法に基づく。次いでその量を互いに比較して、対立遺伝子の発現比率を判定し、これを次に閾値と比較する。豊富ではない方の対立遺伝子の濃度が豊富な方の対立遺伝子の濃度と「比較的似ている」なら、IGF2のインプリントは失われていると判定される。豊富ではない方の対立遺伝子の濃度が豊富な方の対立遺伝子の濃度と「比較的似ていない」なら、IGF2のインプリントは存在していると判定される。試料におけるIGF2のインプリンティング状態を測定する一つの方法は、IGF2遺伝子の転写領域における一つまたは複数の多型部位の遺伝子型をまず判定することである。遺伝子の転写領域におけるヘテロ接合性のマーカーは、IGF2遺伝子の個々の対立遺伝子を試料中において互いに識別できる簡便な分子的手段を提供する。二コピーのIGF2遺伝子の各々からのRNA転写を定量的な対立遺伝子特異的アッセイ法で独立的に測定することができる。一方の対立遺伝子の発現量と他方の対立遺伝子の発現量との比較をゆえに行うことができ、IGF2遺伝子のインプリンティング状態を判定することができる(図2参照)。

20

#### 【 0 0 0 5 】

IGF2は、各々が選択的スプライスによる転写産物の発現を、組織特異的に推進する四つのプロモーターを有する(図1A)。第7、8、および9エクソンは全ての転写産物に存在するが、第1~6エクソンはプロモーター特異的に発現されることが報告されている。第9エクソンはタンパク質コード配列の短いストレッチと、その後により長い3' UTRを含む。それゆえ、第7、8、および9エクソンにおける多型マーカーは、四つのIGF2プロモーターのいずれかより推進されるIGF2転写の対立遺伝子特異的な発現の検出を可能にすることにより、IGF2インプリンティング状態の判定において有用である。

30

#### 【 0 0 0 6 】

IGF2インプリンティング状態を測定する四種の対立遺伝子特異的な発現アッセイ法が当業者に公知である。Woodsonらは、二種のSNPに基づくアッセイの組み合わせ(rs680 - 表1A中のSEQ ID NO: 64に類似; およびrs2230949 - 表1A中のSEQ ID NO: 56に類似)を用いてIGF2のインプリンティング状態を測定した(Woodson K 2004, JNCI 96, 407-410(非特許文献11))。両SNPはIGF2の第9エクソンの中にあるが、Woodsonらによって最小の連鎖不均衡にあると報告されている。それゆえ、そのようなマーカーの組み合わせを用いて個体のLOIを測定しようとする試みは、個体がその二種のSNPの少なくとも一種についてヘテロ接合性であるという可能性を高め、それにより、個体のLOI状態を判定できる可能性を高める。同著者らは、第一のSNP、第二のSNP、または両方のSNPが、評価した患者106人中48人(または45%)において情報価値のある(すなわち、ヘテロ接合性であり、それゆえ、IGF2のLOIの測定を可能にする)ことを実証した。Cuiらは、一つがSNP (rs680 - 表1A中のSEQ ID NO: 64に類似)を標的とし、もう一つがIGF2の第9エクソン内の単純な配列リピートの制限断片長多型を測定する、二通りのアッセイ法の組み合わせを用いてIGF2のインプリンティングを測定した。同著者らは、SNP、リピート、または両方のマーカーが、評価した患者421人中191人(または45%)において情報価値のあることを実証した(Cui H, et al. Nature Medicine 4-11, 1276-1280 (1998)(非特許文献7))。

40

#### 【 0 0 0 7 】

50

過去の研究では、これらの多型を使用しても患者集団における組み合わせたヘテロ接合性の頻度が低く、それゆえ、これらの集団における多数の個体が、彼らのIGF2のインプリンティング状態を判定され得ない「情報価値なし」であったことを示している。本出願では、IGF2の第9エクソン中で新たに発見されたSNP、およびヒト集団のさらに高い割合において功を奏するLOIの測定を可能にするSNPの有用な組み合わせの発見について記述する。一般集団でこれらの多型を用いてLOIを測定する能力には、さまざまな分子診断的および治療的検査の基礎を成す著しい医学的有益性が有るであろう。

#### 【0008】

LOIの検出のための所与のSNPの情報の有益性は、集団内でのSNPのヘテロ接合性の頻度に基づく。さらに、異なるSNPの組み合わせの至適な情報有益性は、異なるマーカー間の連鎖に依る。例えば、二種のSNPが共通のハプロタイプブロック内であれば、二種のSNPの併用は二種のSNP単独でのどちらかの使用と比べて情報の有益性の増加はわずかとなる。しかしながら、二種のSNPが同一のハプロタイプブロック内になれば(すなわち、最小の連鎖不均衡であれば)、二種のSNPの併用は二種のSNP単独でのどちらかの使用と比べて情報の有益性の効果的増加を与える。

#### 【0009】

HapMap IIヒト遺伝的変異データセットが最近公表されたことで、ゲノム規模でのDNA配列データのハプロタイプ解析が可能になる。HapMap IIの研究では、ナイジェリアのイバダン出身ヨルダ族の母親・父親・成人した子供の三人組30組；ユタ州に住む北および西ヨーロッパ系のそのような三人組30組；北京に住む親族でない漢族の中国人個体および東京に住む親族でない日本人個体45人を含む、地理的に多様な4集団由来の遺伝子型を特定された270人の人においてSNPを特定した。IGF2の遺伝子座を含むおよそ70 Kbの領域内でのそれらSNPのハプロタイプ解析は、この現在のかつ広範囲のデータセットにより予測されるハプロタイプブロックの概観を提供する。図3には、一定の比率に縮小したIGF2遺伝子座の図式下にHaploviewによる連鎖予測の視覚化を描いた。三つのハプロタイプブロックが特定されている(IGF2の遺伝子座と釣り合いをとって位置付けた黒色の水平棒として表されている)。データから、IGF2第1エクソンの上流およそ14~19 Kbに及ぶハプロタイプブロック、第3エクソンの上流およそ1 Kb~第4エクソンの下流およそ5 Kbに及ぶハプロタイプブロック、および第9エクソンの開始部の上流およそ2 Kb~第9エクソンの末端部の下流およそ14 Kbに及ぶハプロタイプブロック、つまり第8および9エクソンを包含するハプロタイプブロックが予測される。一般に、これらのハプロタイプブロック間の領域は、最小の連鎖不均衡を示し、(多重対SNP比較を表す白色の菱形によって示した)歴史上起こった組み換えの強力な証拠を提供する。これらのデータを図1Bにまとめた。ハプロタイプブロックを黒色の水平棒によって表し、予測される最小の連鎖不均衡の領域を灰色の水平棒によって表した。

#### 【0010】

Gauntらは、IGF2第1エクソンのすぐ上流から第9エクソン3' UTRの末端部の前およそ1 Kbに及ぶ12種のSNPを用いて欧州人男性2,734人の白人同齡集団で体格指数(BMI)について関連研究を行った(Gaunt et al. Human Mol Genet. vol. 10, no. 14: 1491-1501(非特許文献14))。この研究には、一方の対立遺伝子が同齡集団において高いBMIと正の関連を示すと報告された、単一のSNP(rs680 - 表1A中のSEQ ID NO: 64に類似)の、その他11種のSNPの各々に対する一対の形での連鎖解析が含まれた。同著者らは、その研究からの3種のSNPを含んだ、第9エクソンの3' UTR内のハプロタイプブロックを報告している(実施例3、図1C中の黒色の水平棒、および図4中の灰色棒を参照のこと)。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0011】

【非特許文献1】DeChiara TM, et al. Cell 64, 849-859 (1991)

【非特許文献2】Rainier S, et al., Nature 362, 747-749 (1993)

【非特許文献3】Ogawa, et al, Nature 362, 749-751 (1993)

10

20

30

40

50

- 【非特許文献4】 Falls, et al. 1999, AJP 154, 635-647  
【非特許文献5】 Kinochi et al., 1996, Cancer Letters 107, 105-108 (1996)  
【非特許文献6】 Nishihara S. 2000, Int. Jour. Oncol. 17, 317-322  
【非特許文献7】 Cui H 1998, Nature Medicine 4-11, 1276-1280  
【非特許文献8】 Nakagawa H 2001, PNAS 98-2, 591-596  
【非特許文献9】 Ogawa, et al, Nature Genetics 5, 408-412 (1993)  
【非特許文献10】 Cui H, Science 299, 1753 (2003)  
【非特許文献11】 Woodson K et al., JNCI 96, 407-410 (2004)  
【非特許文献12】 Cruz-Correa Met al., Gastroenterology 126, 964-970 (2004)  
【非特許文献13】 Cui H, Science 14, 1753-1755 (2003)  
【非特許文献14】 Gaunt et al. Human Mol Genet. vol. 10, no. 14: 1491-1501

10

#### 【発明の概要】

#### 【0012】

#### 発明の簡単な概要

本発明は、ヒト個体におけるSNP遺伝子型を判定する方法を提供する。いくつかの態様において、この方法は、個体由来のゲノムDNAを含有する試料において、SNPがSEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、および47からなる群より選択される、一塩基多型(SNP)の多型ヌクレオチドの位置のヌクレオチドを判定する段階を含む。いくつかの態様において、SNPの多型位置の(およびそれゆえポリヌクレオチドの対応する位置の)ヌクレオチドは、表2Aまたは2Bに示される下線が引かれたヌクレオチドである。

20

#### 【0013】

本発明は同様に、インスリン増殖因子-2 (IGF2) 遺伝子における一塩基多型(SNP)についてヘテロ接合体である、ヒト個体におけるRNAの対立遺伝子特異的な発現を定量化する方法を提供する。いくつかの態様において、この方法は、SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、および47からなる群より選択されるSNPの一つのまたは各々の多型選択肢(polymorphic option)を含む、ヒト個体由来の試料におけるRNAの量を定量化する段階を含む。

30

#### 【0014】

いくつかの態様において、試料は血液または組織試料である。いくつかの態様において、試料は大便試料である。いくつかの態様において、この方法は、SNPの各々の多型選択肢を含んだRNAの相対量を、IGF2遺伝子のインプリンティングの消失と関連付ける段階をさらに含む。いくつかの態様において、関連付ける段階は、RNAの相対量を、がんの予後もしくは診断またはがんを処置するための薬物の効力の予測と関連付ける段階を含む。いくつかの態様において、RNAをcDNAに逆転写し、対立遺伝子特異的なcDNAの量を用いて、RNAの量を判定する。

#### 【0015】

いくつかの態様において、この方法は、個体が一種または複数種のSNPについてホモ接合性またはヘテロ接合性であるかどうかを判定する段階をさらに含む。

40

#### 【0016】

本発明は同様に、SNPの一方の対立遺伝子(またはその相補体)と、SNPの他方の対立遺伝子(またはその相補体)とを、ハイブリダイゼーション反応において識別する、8~100ヌクレオチドの単離されたポリヌクレオチドであって、該SNPがSEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、および47からなる群より選択される、ポリヌクレオチドを提供する。

#### 【0017】

いくつかの態様において、ポリヌクレオチドの最後から2番目のまたは最後の3'ヌクレ

50

オチドは、SNPの多型ヌクレオチドとハイブリダイズする。

【0018】

本発明は同様に、インスリン様増殖因子2 (IGF2) cDNAにおけるプライマーとして機能する、8~100ヌクレオチドの単離されたポリヌクレオチドであって、cDNAとハイブリダイズし、かつ、ポリヌクレオチドの3'ヌクレオチドが、SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、および47からなる群より選択されるSNPの多型ヌクレオチドのすぐ上流のヌクレオチドに相補的であるような、該ポリヌクレオチドを提供する。

【0019】

いくつかの態様において、ポリヌクレオチドの少なくとも10個の連続した3'ヌクレオチドがcDNAに相補的である。

【0020】

本発明は同様に、SNPの多型位置のヌクレオチドが表2Aまたは2Bに示される下線が引かれたヌクレオチドである、SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、および47からなる群より選択される、SNP配列、またはその相補体を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0021】

本発明は同様に、  
ポリヌクレオチドがインスリン様増殖因子2 (IGF2) cDNAにおけるプライマーとして機能し、このポリヌクレオチドはcDNAとハイブリダイズし、かつポリヌクレオチドの3'ヌクレオチドはSNPの多型ヌクレオチドのすぐ上流のヌクレオチドに相補的であるような、8~100ヌクレオチドの；または

ポリヌクレオチドがインスリン様増殖因子2 (IGF2) cDNAにおけるプライマーとして機能し、このポリヌクレオチドはcDNAとハイブリダイズし、かつポリヌクレオチドの3'ヌクレオチドは、SNPがSEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、および47からなる群より選択されるSNPの多型ヌクレオチドのすぐ上流のヌクレオチドに相補的であるような、8~100ヌクレオチドの  
単離されたポリヌクレオチドを含むキットを提供する。

【0022】

いくつかの態様において、キットは、ポリヌクレオチドがSNPの第一の対立遺伝子と、SNPの第二の対立遺伝子(またはその相補体)とを、ハイブリダイゼーション反応において識別する、8~100ヌクレオチドの第一の単離ポリヌクレオチドを含む。

【0023】

いくつかの態様において、キットは、ポリヌクレオチドがSNPの第一の対立遺伝子(またはその相補体)と、SNPの第二の対立遺伝子(またはその相補体)とを識別し、かつ第一のポリヌクレオチドが第一の対立遺伝子における多型ヌクレオチドに相補的であり、第二のポリヌクレオチドが第二の対立遺伝子の多型ヌクレオチドに相補的である、8~100ヌクレオチドの第二の単離ポリヌクレオチドをさらに含む。

【0024】

いくつかの態様において、キットは、多型部位を包含するIGF2遺伝子座の領域を増幅するための一種または複数種のプライマーであって、単離ポリヌクレオチドとは異なる該一種または複数種のプライマーをさらに含む。

【0025】

いくつかの態様において、キットは、DNAポリメラーゼをさらに含む。いくつかの態様において、ポリメラーゼは熱安定性DNAポリメラーゼである。いくつかの態様において、キットは、逆転写酵素をさらに含む。いくつかの態様において、第一および/または第二

10

20

30

40

50

のポリヌクレオチドは検出可能に標識される。

【0026】

本発明は同様に、

ポリヌクレオチドがインスリン様増殖因子2 (IGF2) cDNAにおけるプライマーとして機能し、このポリヌクレオチドはcDNAとハイブリダイズし、かつポリヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドは、ポリメラーゼによるポリヌクレオチドの伸長によってSNPの多型ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドが取り込まれるようにSNPの多型ヌクレオチドのすぐ上流のヌクレオチドに相補的であるような、8~100ヌクレオチドの；または

ポリヌクレオチドがインスリン様増殖因子2 (IGF2) cDNAにおけるプライマーとして機能し、このポリヌクレオチドはcDNAとハイブリダイズし、かつポリヌクレオチドの3'ヌクレオチドは、ポリメラーゼによるポリヌクレオチドの伸長によって、SNPがSEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、および47からなる群より選択されるSNPの多型ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドが取り込まれるようにSNPの多型ヌクレオチドのすぐ上流のヌクレオチドに相補的であるような、8~100ヌクレオチドの

単離されたポリヌクレオチドを含む反応混合物を提供する。

【0027】

いくつかの態様において、反応混合物は以下を含む：

SNPの第一の対立遺伝子(またはその相補体)とSNPの第二の対立遺伝子(またはその相補体)とをハイブリダイゼーション反応において識別する、8~100ヌクレオチドの第一の単離ポリヌクレオチド；熱安定性DNAポリメラーゼ；およびヒトゲノムDNAまたはヒトRNAの逆転写由来のcDNA。

【0028】

いくつかの態様において、第一の単離ポリヌクレオチドはDNAとハイブリダイズする。

いくつかの態様において、ポリメラーゼは熱安定性DNAポリメラーゼである。

【0029】

いくつかの態様において、反応混合物は、SNPの第一の対立遺伝子(またはその相補体)とSNPの第二の対立遺伝子(またはその相補体)とを識別する、8~100ヌクレオチドの第二の単離ポリヌクレオチドをさらに含み、第一のポリヌクレオチドは第一の対立遺伝子における多型ヌクレオチドに相補的であり、第二のポリヌクレオチドは第二の対立遺伝子の多型ヌクレオチドに相補的である。

【0030】

いくつかの態様において、反応混合物は、多型部位を包含するIGF2遺伝子座の領域を増幅するための一種または複数種のプライマーであって、単離ポリヌクレオチドとは異なる該一種または複数種のプライマーをさらに含む。

【0031】

本発明は、インスリン増殖因子-2 (IGF2)遺伝子における少なくとも二種の一塩基多型(SNP)についてヘテロ接合体である、ヒト個体におけるRNAの対立遺伝子特異的な発現を定量化する方法を提供する。いくつかの態様において、この方法は以下の段階を含む：

表1A、1B、1C、2Aもしくは2Bの「連鎖ブロック」1から各々選択される少なくとも二種のSNPそれぞれの一つもしくは複数の多型選択肢を含むヒト個体由来の試料におけるRNAの量を定量化する段階；または

表1A、1B、1C、2Aもしくは2Bの「連鎖ブロック」2から各々選択される少なくとも二種のSNPそれぞれの一つもしくは各々の多型選択肢を含むヒト個体由来の試料におけるRNAの量を定量化する段階；または

表1A、1B、1C、2Aもしくは2Bの「連鎖ブロック」3から各々選択される少なくとも二種のSNPそれぞれの一つもしくは各々の多型選択肢を含むヒト個体由来の試料におけるRNAの量を定量化する段階。

【0032】



いくつかの態様において、試料は血液または組織試料である。いくつかの態様において、試料は大便試料である。いくつかの態様において、この方法は、SNPの各多型選択肢を含んだRNAの相対量を、IGF2遺伝子のインプリンティングの消失および/またはがんの素因と関連付ける段階をさらに含む。

【0033】

いくつかの態様において、RNAをcDNAに逆転写し、対立遺伝子特異的なcDNAの量を用いて、RNAの量を判定する。

【0034】

定義

「熱安定性ポリメラーゼ」とは、PCRの用途に有用なポリメラーゼをいう。熱安定性ポリメラーゼは一般に、75℃まで繰り返し(例えば、毎回1分間を少なくとも20回)加熱され、それなのにその元の活性の少なくとも80%を保持することができる。そのようなポリメラーゼの例としては、Taqポリメラーゼが挙げられるが、これに限定されることはない。

【0035】

「一塩基多型」または「SNP」とは、対立遺伝子間で異なる一ヌクレオチドの部位をいう。

【0036】

「対立遺伝子」とは、異なる遺伝子形態の対または組のうちの一つの成員をいう。二倍体生物においては、個体は二コピーの各常染色体遺伝子を持つ。一塩基多型の場合、多型ヌクレオチドの位置での遺伝子型が一方の遺伝子コピー上で、もう一方の遺伝子コピーとは異なっていれば、個体は多型ヌクレオチドの異なる対立遺伝子を二つ持つ(すなわち個体は多型ヌクレオチドについてヘテロ接合性である)。個体が両方の遺伝子コピー上の多型ヌクレオチドの位置で同じ遺伝子型を持つ(すなわち個体が多型ヌクレオチドについてホモ接合性である)なら、個体は多型ヌクレオチドの同じ対立遺伝子のコピーを二つ持つ。所与の個体は遺伝子内のある多型ヌクレオチドについてホモ接合性(多型ヌクレオチドの同じ対立遺伝子のコピーが二つ)であり、同じ遺伝子内の異なる多型ヌクレオチドについてヘテロ接合性(多型ヌクレオチドの異なる対立遺伝子が二つ)であることができる。

【0037】

「ハイブリダイゼーション」とは、相補的塩基対合に起因する二本の一本鎖核酸による二重鎖構造の形成をいう。ハイブリダイゼーションは厳密に相補的な核酸鎖の間で、またはミスマッチの領域が小さい核酸鎖の間で起こりうる。

【0038】

「標的配列」または「標的領域」とは、分析される核酸の領域をいい、関心対象の多型部位を含む。

【0039】

本明細書において用いられる場合、「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、核酸領域、核酸セグメント、プライマー、プローブ、単位複製配列およびオリゴマー断片をいう。これらの用語は長さによって限定されるものではなく、ポリデオキシリボヌクレオチド(2-デオキシ-D-リボースを含む)、ポリリボヌクレオチド(D-リボースを含む)、およびプリン塩基もしくはピリミジン塩基、または修飾プリン塩基もしくは修飾ピリミジン塩基のその他任意のN-グリコシドの直鎖重合体に対する総称である。これらの用語は二本鎖および一本鎖DNA、ならびに二本鎖および一本鎖RNAを含む。

【0040】

核酸、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、例えば、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチルエステル、アセトアミデート、カルバメート、チオエーテル、架橋ホスホロアミデート、架橋メチレンホスホネート、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオエート、架橋ホスホロチオエートまたはスルホン結合、およびこのような結合の組み合わせを含むが、これらに限定されない、ホスホジエステル結合または修飾結合を含むことができる。

## 【0041】

核酸、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、生物学的に存在する5種の塩基(アデニン、グアニン、チミン、シトシンおよびウラシル)および/または生物学的に存在する5種の塩基以外の塩基を含むことができる。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、N<sup>6</sup>-メチル-アデニン、N<sup>6</sup>-tert-ブチル-ベンジル-アデニン、イミダゾール、置換イミダゾール、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、-D-ガラクトシルキューオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、-Dマンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン、シュードウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)<sub>w</sub>、2,6-ジアミノプリン、および5-プロピニルピリミジンを含むが、これらに限定されない、一つまたは複数の修飾された、非標準的な、または誘導体化された塩基部分を含むことができる。修飾された、非標準的な、または誘導体化された塩基部分の他の例は、米国特許第6,001,611号；同第5,955,589号；同第5,844,106号；同第5,789,562号；同第5,750,343号；同第5,728,525号；および同第5,679,785号において見出すことができる。

## 【0042】

さらに、核酸、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、アラビノース、2-フルオロアラビノース、キシロース、およびヘキソースを含むが、これらに限定されない、一つまたは複数の修飾された糖部分を含むこともできる。

## 【0043】

「ハプロタイプブロック」とは、遺伝でともに受け継がれる傾向にある一個または複数個(例えば、1~10個)の多型部位を含んだ染色体の領域をいう。換言すれば、ブロック内の多型部位での多型の組み合わせは、ある集団において、異なるハプロタイプブロックで生じる多型部位の組み合わせよりも高頻度に同時分離する。ハプロタイプブロック内の多型部位は、お互いに連鎖不均衡の傾向がある。多くの場合、ハプロタイプブロックを特徴付ける多型部位は、共通の多型部位である。ハプロタイプブロックのなかには、個体集団において隣接する多型部位と同時分離しない多型部位を含むものもある。

## 【0044】

「連鎖不均衡」とは、特定の多型の、異なる染色体位置にある別の多型との、偶然と予想されるよりも高い頻度での選択的な分離をいう。連鎖不均衡とは、表現型形質が、偶然と予想されるよりも高い頻度で、特定の多型または別の表現型形質との選択的な分離を示す状況も指しうる。

## [請求項1001]

インスリン増殖因子-2 (IGF2) 遺伝子における一塩基多型(SNP)についてヘテロ接合体であるヒト個体におけるRNAの対立遺伝子特異的な発現を定量化する方法であって、

SEQ ID NO: 10、1、2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、および47からなる群より選択されるSNPの各々の多型選択肢(polymorphic option)を含むRNAの量を、個体由来の試料において定量化する段階；ならびに

SNPの各々の多型選択肢を含んだRNAの相対量を、IGF2遺伝子のインプリンティングの消失と関連付ける段階を含む方法。

[請求項1002]

関連付ける段階が、RNAの相対量を、がんの予後もしくは診断またはがんを処置するための薬物の効力の予測と関連付ける段階を含む、請求項1001記載の方法。

[請求項1003]

試料が血液、大便または組織試料である、請求項1001記載の方法。

[請求項1004]

RNAをcDNAに逆転写し、対立遺伝子特異的なcDNAの量を用いて、RNAの量を判定する、請求項1001記載の方法。

[請求項1005]

個体がSNPについてホモ接合性またはヘテロ接合性であるかどうかを判定する段階をさらに含む、請求項1001記載の方法。

10

[請求項1006]

ヒト個体におけるSNP遺伝子型を判定する方法であって、

個体由来のゲノムDNAを含有する試料において、一塩基多型(SNP)の多型位置のヌクレオチドを判定する段階を含み、SNPがSEQ ID NO: 10、2、3、4、5、6、7、8、9、1、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、および47からなる群より選択され、かつヌクレオチドが表2Aまたは2Bに示される下線が引かれたヌクレオチドである

20

方法。[請求項1007]

SNPの一方の対立遺伝子(またはその相補体)と、SNPの他方の対立遺伝子(またはその相補体)とを、ハイブリダイゼーション反応において識別する、8~100ヌクレオチドの単離されたポリヌクレオチドであって、該SNPが、SEQ ID NO: 10、2、3、4、5、6、7、8、9、1、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、および47からなる群より選択される、ポリヌクレオチド。

[請求項1008]

ポリヌクレオチドの最後から2番目のまたは最後の3'ヌクレオチドが、SNPの多型ヌクレオチドとハイブリダイズする、請求項1007記載のポリヌクレオチド。

30

[請求項1009]

インスリン様増殖因子2 (IGF2) cDNAにおけるプライマーとして機能する、8~100ヌクレオチドの単離されたポリヌクレオチドであって、cDNAとハイブリダイズし、かつ、ポリヌクレオチドの3'ヌクレオチドが、SEQ ID NO: 10、2、3、4、5、6、7、8、9、1、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、および47からなる群より選択されるSNPの多型ヌクレオチドのすぐ上流のヌクレオチドに相補的であるような、ポリヌクレオチド。

[請求項1010]

ポリヌクレオチドの少なくとも10個の連続した3'ヌクレオチドがcDNAに相補的である、請求項1009記載のポリヌクレオチド。

40

[請求項1011]

SEQ ID NO: 10、2、3、4、5、6、7、8、9、1、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、および47からなる群より選択されるSNP配列またはその相補体を含む、単離されたポリヌクレオチドであって、SNPの多型位置のヌクレオチドが、表2Aまたは2Bに示される下線が引かれたヌクレオチドである、単離されたポリヌクレオチド。

[請求項1012]

請求項1007または1009記載の単離されたポリヌクレオチドを含むキット。

50

[請求項1013]

SNPの第一の対立遺伝子と、SNPの第二の対立遺伝子(またはその相補体)とを、ハイブリダイゼーション反応において識別する、8~100ヌクレオチドの第一の単離ポリヌクレオチドを含む、請求項1012記載のキット。

[請求項1014]

SNPの第一の対立遺伝子(またはその相補体)とSNPの第二の対立遺伝子(またはその相補体)とを識別する、8~100ヌクレオチドの第二の単離ポリヌクレオチドをさらに含むキットであって、第一のポリヌクレオチドが第一の対立遺伝子における多型ヌクレオチドに相補的であり、第二のポリヌクレオチドが第二の対立遺伝子の多型ヌクレオチドに相補的である、請求項1013記載のキット。

10

[請求項1015]

多型部位を包含するIGF2遺伝子座の領域を増幅するための一種または複数種のプライマーをさらに含むキットであって、該一種または複数種のプライマーが単離ポリヌクレオチドとは異なっている、請求項1012記載のキット。

[請求項1016]

DNAポリメラーゼをさらに含む、請求項1012記載のキット。

[請求項1017]

ポリメラーゼが熱安定性DNAポリメラーゼである、請求項1012記載のキット。

[請求項1018]

逆転写酵素をさらに含む、請求項1012記載のキット。

20

[請求項1019]

第一および/または第二のポリヌクレオチドが検出可能に標識される、請求項1012記載のキット。

[請求項1020]

請求項1007または1009記載の単離ポリヌクレオチドを含む反応混合物。

[請求項1021]

以下を含む、請求項1020記載の反応混合物:

SNPの第一の対立遺伝子(またはその相補体)と、SNPの第二の対立遺伝子(またはその相補体)とを、ハイブリダイゼーション反応において識別する、8~100ヌクレオチドの第一の単離ポリヌクレオチド;

30

熱安定性DNAポリメラーゼ; および

ヒトゲノムDNA、またはヒトRNAの逆転写由来のDNA。

[請求項1022]

以下を含む反応混合物:

ポリヌクレオチドがSNPの第一の対立遺伝子(またはその相補体)と、SNPの第二の対立遺伝子(またはその相補体)とを、ハイブリダイゼーション反応において識別する、8~100ヌクレオチドの第一の単離ポリヌクレオチド;

熱安定性DNAポリメラーゼ; および

ヒトゲノムDNA、またはヒトRNAの逆転写由来のDNA。

40

[請求項1023]

第一の単離ポリヌクレオチドがDNAとハイブリダイズする、請求項1021記載の反応混合物。

[請求項1024]

ポリメラーゼが熱安定性DNAポリメラーゼである、請求項1020記載の反応混合物。

[請求項1025]

ポリヌクレオチドがSNPの第一の対立遺伝子(またはその相補体)とSNPの第二の対立遺伝子(またはその相補体)とを識別する、8~100ヌクレオチドの第二の単離ポリヌクレオチドをさらに含む反応混合物であって、第一のポリヌクレオチドが第一の対立遺伝子における多型ヌクレオチドに相補的であり、第二のポリヌクレオチドが第二の対立遺伝子の多型ヌクレオチドに相補的である、請求項1020記載の反応混合物。

50

[請求項1026]

多型部位を包含するIGF2遺伝子座の領域を増幅するための一種または複数種のプライマーをさらに含む反応混合物であって、該一種または複数種のプライマーが単離ポリヌクレオチドとは異なっている、請求項1020記載の反応混合物。

[請求項1027]

インスリン増殖因子-2 (IGF2) 遺伝子における少なくとも二種の一塩基多型(SNP)についてヘテロ接合体であるヒト個体におけるRNAの対立遺伝子特異的な発現を定量化する方法であって、

表1A、1B、1C、2A、2Bもしくは2Cの「ブロック」1から各々独立して選択される少なくとも二種のSNPそれぞれの一つもしくは各々の多型選択肢を含むRNAの量を個体由来の試料において定量化する段階；または

表1A、1B、1C、2A、2Bもしくは2Cの「ブロック」2から各々独立して選択される少なくとも二種のSNPそれぞれの一つもしくは各々の多型選択肢を含むRNAの量を個体由来の試料において定量化する段階；または

表1A、1B、1C、2A、2Bもしくは2Cの「ブロック」3から各々独立して選択される少なくとも二種のSNPそれぞれの一つもしくは各々の多型選択肢を含むRNAの量を個体由来の試料において定量化する段階

を含む方法。

[請求項1028]

試料が血液、大便または組織試料である、請求項1027記載の方法。

[請求項1029]

SNPの各多型選択肢を含んだRNAの相対量を、IGF2遺伝子のインプリンティングの消失またはがんの素因と関連付ける段階をさらに含む、請求項1027記載の方法。

[請求項1030]

RNAをcDNAに逆転写し、対立遺伝子特異的なcDNAの量を用いて、RNAの量を判定する、請求項1027記載の方法。

【図面の簡単な説明】【 0 0 4 5 】

【図1A】 IGF2遺伝子の構造を図示している。遺伝子略図の上の尺度棒は、1 Kbの増分で描かれており、染色体11 (NCBI build 36)上のIGF2の位置を表現している。この尺度棒は図4にも含まれている。図1A中の矢印はIGF2の四つのプロモーターを表す。遺伝子略図の下には第1～9エクソンが示されている。黒の影付きの第1～6エクソンは、IGF2の大部分の転写産物においてタンパク質をコードしていない。白色の第7および8エクソンはタンパク質をコードしており、第9エクソンの小さな白色領域も同様である。第9エクソンの黒の影付きの領域は3' UTRである。

【図1B】 背景の項において記述したように、HapMap II遺伝子型特定データのハプロタイプ解析に基づいてハプロタイプブロック(黒色の水平棒)内に、および低い連鎖不均衡にあると予測される領域(灰色の水平棒)内に含まれると予測されるIGF2の領域を図示している。

【図1C】 背景の項および実施例3に記述したように、過去の研究(Gaunt et al. Human Mol Genet. 10(14): 1491-1501 (2001))に基づいてハプロタイプブロック(黒色の水平棒)内に、およびIGF2の二つの特徴未定域(灰色の水平棒)内に含まれると予測されるIGF2の領域を図示している。

【図2】 生体試料においてIGF2のLOIを判定するための基本戦略を図示している。個体由来する生体試料(例えば、末梢血、末梢血単核細胞、大便など)からゲノムDNAおよびトータルRNAまたはポリアデニル化RNAを単離する。ゲノムDNA試料を一種または複数種の多型マーカーの遺伝子型の特定(DNA SNPアッセイ法)に用いる。この段階では、特定のSNPまたはSNPの組み合わせについて個体がヘテロ接合体であるかどうかを判定する。ヘテロ接合体であると判定された、いずれかのSNPまたはSNPの組み合わせを、適合するRNA試料でのIGF2遺伝子の対立遺伝子特異的な発現の分析(RNA SNPアッセイ法)に利用することがで

10

20

30

40

50

きる。示した例では、対立遺伝子を識別するDNA遺伝子型特定アッセイ法により、個体は仮定のSNP 1、3、4および6についてホモ接合性、かつ仮定のSNP 2および5についてヘテロ接合性であると判定されている。標準的な逆転写酵素、ならびに少なくともSNP 2および5を含むPCR産物が増幅されるようなPCR法を用いてIGF2転写産物の関連領域からcDNAを増幅する。ニコピーのIGF2遺伝子の各々に由来する発現を、定量的な、かつ遺伝子の二種の対立遺伝子を十分に識別できる、対立遺伝子特異的な遺伝子発現アッセイ法で、生成されたcDNAを用いて独立的に測定する。一方の対立遺伝子の発現量の、他方の対立遺伝子の発現量に対する比較により、IGF2遺伝子のインプリンティング状態が判定される。SNP 2および5を識別するアッセイは同時に行われてもよく、各アッセイで得た対立遺伝子特異的な発現比率を比べて精度を高めることができる。

10

【図3】背景の項に記述したように、HapMap II SNP遺伝子型データのハプロタイプ解析を図示している。IGF2の遺伝子略図(図1Aに記述した)を示し、Haploviewにより生成した連鎖データを下に表している。垂直線は、IGF2遺伝子略図に対して予測されるハプロタイプブロックの位置(水平黒色の棒)を示す。表示したSNPペアワイズ比較の連鎖データに基づいて菱形に影を付けてある。黒色の菱形は、連鎖不均衡の強力な証拠( $D' = 1$ およびLODスコア  $> 2$ )があるSNP対を表す。白色の菱形は、最小の連鎖不均衡を示す、歴史上起こった組み換えの強力な証拠( $D' < 1$ およびLODスコア  $< 2$ )があるSNP対を表す。灰色の菱形は、連鎖不均衡の判定に対して情報価値のないデータを与えたSNP対を表す。図の左下端には、予測されるハプロタイプブロックの境界を定義するSNPに対するdbSNP識別子を示してある。HapMap IIデータの解析は、第9エクソンを包含するハプロタイプブロックを支持している。

20

【図4】本出願において記述する研究により作成された、白人、アフリカ系アメリカ人、中国人、日本人およびメキシコ人の個体の組み合わせ同年齢集団に対するSNP遺伝子型データのハプロタイプ解析を図示している。IGF2の遺伝子略図を示してある。垂直線は、解析したSNPの相対位置を示し、下方のHaploviewによる連鎖解析の視覚化にまで伸びている。Gauntらが判定したように、水平灰色の棒はハプロタイプブロックを表し、水平白色の棒は第9エクソンの特徴未定域を表す(背景の項および実施例3を参照のこと)。菱形の陰影付けは図3に記述した通りである。解析したSNPに対するSEQ ID NO: 数、および各々が属する既報の連鎖ブロック(Gauntブロック)を左下端に示してある。

【図5】SEQ ID NO: 64に対応するSNP遺伝子型を特定するための制限酵素に基づくアッセイ法の使用を図示している。多型ヌクレオチドは二種の制限酵素の認識配列内に位置している。Apa Iは「G」対立遺伝子が存在する場合に配列を認識かつ切断し、Ava IIは「A」対立遺伝子が存在する場合に配列を認識かつ切断する。3人の個体に由来する3つの独立したゲノムDNA試料(試料A、BおよびC)からSEQ ID NO: 64を含むPCR単位複製配列を増幅した。単位複製配列をApa IもしくはAva IIまたは両酵素の組み合わせ(二重)により消化した。Apa Iのみによる消化では、G対立遺伝子について個体がホモ接合性であることを示唆し(試料B)、Ava IIのみによる消化では、A対立遺伝子について個体がホモ接合性であることを示唆し(試料C)、両酵素による消化では、このSNPについて個体がヘテロ接合性であることを示唆する(試料A)。

30

【図6】IGF2のLOIを検出するための制限酵素に基づく方法の使用を図示している。SEQ ID NO: 64についてヘテロ接合性である個体3人からトータルRNAを抽出した。SEQ ID NO: 64を含む領域を各試料からRT-PCR増幅した。各レーンの上方に示したように、cDNA単位複製配列をApa IもしくはAva IIまたは両酵素の組み合わせで消化した。消化された産物をAgilent Bioanalyzerにて分離し、切断されたおよび切断されなかった断片の濃度を測定した。Apa Iにより切断された断片の量は、「G」対立遺伝子を含むcDNAの割合を表す。Ava IIにより切断された断片の量は、「A」対立遺伝子を含むcDNAの割合を表す。それゆえ、Apa I切断断片のAva II切断断片に対する比率は、元のRNA試料における二種の対立遺伝子の発現の相対比率を示す。計算されたG:Aの比率を、各試料に対応する各三つ組のレーン下方に示す。試料2は「A」対立遺伝子を排他的に発現している。試料1および3は、両方の対立遺伝子を発現しており(すなわちIGF2のLOIを示しており)、G:Aの比率、それぞれ、

40

50

0.5および0.3を有する。

【図7】一塩基プライマー伸長戦略を用いたSNPの対立遺伝子特異的な検出のための方法を図示している。SEQ ID NO:64により表されるSNPおよびその周囲のDNA配列を一例(「PCR単位複製配列」 - SEQ ID NO: 114)として示す。SEQ ID NO:64のヌクレオチド位置を、矢印で表示した「SeqID 64」により示している。一塩基プライマー伸長に用いられるポリヌクレオチドの配列は、括弧で表示した「プライマー」(SEQ ID NO: 113)により示される。関心対象の配列を含むPCR DNA単位複製配列(また、あるいはRT-PCR cDNA単位複製配列)を、アッセイする試料から増幅する。精製したPCR (また、あるいはRT-PCR)産物に、遺伝子型を特定する多型ヌクレオチドの3'側1塩基の位置で鋳型ヌクレオチドに相補的な3'末端のヌクレオチドによりアニールするプライマーを加える。熱安定性DNAポリメラーゼおよび示差的に蛍光標識されたddNTPを用いて、一ヌクレオチドのプライマー伸長を行う。この例では、dR110標識ddGTPまたはdR6G標識ddATPのどちらかがプライマーの3'末端に付加される(それぞれ、SEQ ID NO: 115および116を生ずる)。次いでこれらの標識されたポリヌクレオチドを分離し、取り込まれた可能性のある各ヌクレオチドを表すピーク面積を計算する。ピーク面積を比較して、そのSNP位置での個体の遺伝子型(また、あるいは対立遺伝子特異的な遺伝子発現の比率)を判定する。

【図8】SEQ ID NO:64について3人の個体の遺伝子型を特定するための図7に記述した一塩基プライマー伸長アッセイ法の使用を図示している。図6に示した制限酵素に基づくアッセイ法によりIGF2のLOIについてアッセイされた個体3人の遺伝子型を特定した。図には、ABI Genetic AnalyzerおよびGene Mapperソフトウェアによる分離およびピーク検出後に各試料について得られたクロマトグラムが示されている。予想通り、SEQ ID NO:64の両対立遺伝子に相当するピークは比較的均等な割合で得られており、3人の個体がSEQ ID NO:64についてヘテロ接合性であることが確認され、制限酵素に基づく方法により得られた結果と一塩基プライマー伸長に基づく方法により得られた結果との一致が実証された。

【図9】IGF2のLOIを検出するための方法に基づく一塩基プライマー伸長の適用を図示している。SEQ ID NO:64を含む領域を、図8で遺伝子型を特定した個体3人の各人に由来するトータルRNA試料からRT-PCR増幅した。得られたcDNA産物を精製し、図7に図示されているように解析した。図には、ABI Genetic AnalyzerおよびGene Mapperソフトウェアによる分離およびピーク検出後に各試料について得られたクロマトグラムが示されている。各試料について、可能性のある二種の対立遺伝子の各々に相当するピーク面積を計算し、互いに比較した。計算されたG:Aの比率を各クロマトグラムの右側に示してある。図6に示した結果と一致して、試料1および3はIGF2のLOIを示すと判定され、試料2はIGF2の正常なインプリンティングを示すと判定された。

【図10】9種の独立的SNPに向けて開発された一塩基プライマー伸長アッセイ法の定量的な直線性を図示している。アッセイした各SNPに対するSEQ ID数をグラフの右側に示してある。各アッセイについて、SNPの一方の対立遺伝子について一方がホモ接合性およびSNPの他方の対立遺伝子について他方がホモ接合性の二人の個体に由来するゲノムDNA試料からPCR産物を別々に増幅した。PCR産物を精製し定量化した。9種のSNPの各々について、2種のPCR産物(一方の対立遺伝子についてホモ接合性のDNA試料から増幅された一方のものおよび他方の対立遺伝子についてホモ接合性のDNA試料から増幅された他方のもの)を、対立遺伝子1の対立遺伝子2に対する以下の比率; 1:10、1:8、1:6、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、6:1、8:1および10:1で混合した。9種のSNPの各々について、一塩基プライマー伸長アッセイ法を各希釈点に対し三つ組で実施した。可能性のある二種の対立遺伝子の各々に相当するピーク面積を計算し(y軸)、各対立遺伝子対の公知の入力した比率(x軸)と比較する。値はlog<sub>10</sub>の尺度でプロットされている。アッセイの平均R<sup>2</sup>は0.996±0.002であり、平均の傾きは0.830±0.024であり、各アッセイによって、試料で示される各対立遺伝子対の相対的な定量比を感度良く正確に測定できることを実証している。

【発明を実施するための形態】

【0046】

詳細な説明

## I. 導入

本発明は、IGF2のLOIを検出する方法を提供し、IGF2遺伝子中の新規の一塩基多型(SNP)を含む。これらのSNPの、単独でのもしくは相互との組み合わせでの、または既知のSNPとの組み合わせでの検出は、例えば、IGF2のインプリンティングの消失を検出するのに有益な新しい方法を提供する。この新たなSNPは、単独でまたは組み合わせで、ヒト個体の二種のIGF2遺伝子コピーの各々の発現を独立的にモニタリングするために用いることができる。例えば、生体試料におけるIGF2のインプリンティング状態を判定するために用いることができる。例えば、個体が特定のIGF2 SNPについてヘテロ接合性であれば、プローブまたは他の試薬を利用して、各IGF2対立遺伝子由来のRNAを別々に検出および定量化することができる。一方の対立遺伝子が主に発現されていれば、IGF2のインプリンティングが起きている可能性が高い。しかしながら、両方の対立遺伝子が類似のレベルで発現されていれば、IGF2のインプリンティングの消失が起きている可能性が高い。

### 【0047】

さらに、現在では、ずっと多くのヒト遺伝的および人種的背景でのインプリンティングの消失をモニタリングすることも可能である。一例として、本発明は、アフリカ系アメリカ人、白人、中国人、日本人およびメキシコ人の集団によく見られるいくつかのSNPを提供し、それによって、これまでよりもそれらの集団におけるがんのリスクを判定するためのさらに有用な方法を可能にする。

### 【0048】

新規のIGF2 SNPの発見に加えて、本発明は、以前に予測されたものに比べて個体におけるLOIを検出する能力の驚くべき改善をもたらすIGF2 SNPの組み合わせも提供する。例えば、IGF2遺伝子座での遺伝子組み換え頻度の以前の研究では、組み換えの低いブロックの存在について記述しており、同一ブロック内の二つまたはそれ以上のSNPを用いることに利点はないものと示唆している。例えば、HapMap II (NCBI build 36); Gaunt et al., 前記を参照されたい。これらのブロックは図1Bおよび1Cに描かれている。しかしながら、本明細書において提示されるデータに示されるように(例えば、図4を参照されたい)、実際には、これらの「ブロック」内ではかなりの組み換えが行われており、それゆえ、これらの「ブロック」内の二種またはそれ以上のSNPの検出は、先行技術において予測されていたよりも個体におけるLOIを検出する能力の実質的な改善をもたらす。

### 【0049】

したがって、本発明は、LOI判定の精度を改善するうえで、および(ある人が少なくとも一種のSNPについてヘテロ接合性である場合に)アッセイ法が有効な可能性のある人の集団を拡げるうえで驚くほど有効であるSNPの組み合わせ(本明細書において最初に記述のまたは既知の)を提供する。

### 【0050】

## II. IGF2 SNP

以下の配列識別子は、SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、および112からなる群より選択されるIGF2遺伝子座内のSNP配列を表す。

### 【0051】

一つの態様において、本発明は、SNP配列がSEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、および47からなる群より選択される、一方または他方の多型配列を有する少なくとも一つのSNPを含む単離核酸を提供する。

### 【0052】



本発明は、SNPがSEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、および47からなる群より選択されるSNPの二種の対立遺伝子を識別するポリヌクレオチドを提供する。

【0053】

例えば、本発明は、特定のSNPの第一の対立遺伝子にハイブリダイズするが、SNPの第二の対立遺伝子に有意にハイブリダイズしないポリヌクレオチドを提供する。「有意にハイブリダイズしない」とは、試料中における等量の両対立遺伝子の存在下で、ポリヌクレオチドが第一の対立遺伝子の存在を検出できるが、アッセイの解釈を妨げるような程度には第二の対立遺伝子の存在を検出しないことを意味する。いくつかの態様において、試料中における等量の両対立遺伝子の存在下で、ポリヌクレオチドは、等量の第二の対立遺伝子を有する試料に対してポリヌクレオチドが発するシグナルよりも少なくとも、例えば、約100倍、1,000倍、10,000倍、100,000倍またはそれ以上である、第一の対立遺伝子を有する試料に対するシグナルを与える。「シグナル」とは、相補配列へのポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションを示す任意の出力をいう。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドの配列の少なくとも70%、80%、90%、95%が、SEQ ID NO: 1~112より選択されるSNPに相補的であり、例えば、それらは少なくとも8、10、15、20、30、40、50個の相補的ヌクレオチドを有する。

【0054】

あるいは、ポリヌクレオチドは、鋳型特異的なプライマー伸長反応においてプライマーとして作用することによりSNPの二種の対立遺伝子を識別することもできる。これらの態様において、ポリヌクレオチドは、多型ヌクレオチドを一般的に包含しないが、その代わりに多型ヌクレオチドの位置でポリヌクレオチドの3'伸長が起こるようにゲノムDNAにハイブリダイズする。したがって、いくつかの態様において、ポリヌクレオチドの3'末端は多型ヌクレオチドから10、5、3、2または1ヌクレオチド上流の範囲内のヌクレオチドに相補的である。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドはIGF2 cDNAに対するポリヌクレオチド長の少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%にわたって相補的である。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドはその3'末端に、IGF2 cDNAに対して少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%相補的である少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50個またはそれ以上の連続ヌクレオチドを含む。任意で、ポリヌクレオチドの5'末端は、配列タグまたはIGF2 cDNAに相補的ではない他の配列を含んでもよい。当技術分野において周知であるように、種々のプライマー伸長法を利用して、SNPを検出することができる。

【0055】

いくつかの態様において、二種の対立遺伝子を識別するポリヌクレオチドは、長さが少なくとも4、6、8、10、12、15、20、30、50個またはそれ以上のヌクレオチドである。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、長さがわずか1000、500、200、100、80、50、40、30、または25個のヌクレオチドしかない。例えば、ポリヌクレオチドは、例えば、8~25、8~30、8~50、8~100、10~25、10~50、10~100ヌクレオチドなどでありうる。二種の対立遺伝子を識別するポリヌクレオチドは、典型的には、SNPの多型ヌクレオチドの一つに対応する(すなわち、それと整列する)およびそれに相補的であるヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドの最後のまたは最後から2番目の3'ヌクレオチドは、SNPの多型位置のヌクレオチドに相補的である。そのような態様は、ポリヌクレオチドをプライマーまたはプローブとして、例えばポリメラーゼ連鎖反応を伴うものなどの増幅に基づくアッセイ法において、利用するSNP検出法にとりわけ有用でありうる。

【0056】

本発明のポリヌクレオチドを検出可能な程度に標識することができる。本発明で用いるのに適した検出可能な標識は、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な手段によって検出可能な任意の組成物を含む。本発明において有用な

10

20

30

40

50

標識は、標識ストレプトアビジン結合体で染色するためのビオチン、磁性ビーズ(例えば、Dynabeads(商標))、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、例えば、Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA参照)、放射性標識(例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、もしくは $^{32}\text{P}$ )、酵素(例えば、西洋ワ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でよく使われるその他のもの)、およびコロイド金のような比色標識(例えば、直径サイズ40~80 nmの範囲で、高効率の散乱緑色光の金粒子)または着色ガラスもしくは着色プラスチック(例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど)ビーズを含む。そのような標識の使用について教示している特許としては、米国特許第3,817,837号; 同第3,850,752号; 同第3,939,350号; 同第3,996,345号; 同第4,277,437号; 同第4,275,149号; および同第4,366,241号が挙げられる。

10

#### 【0057】

ハイブリダイゼーション反応条件は、SNPを検出するために用いられるアッセイ法に応じて変わりうる。オリゴヌクレオチドが、厳密に相補的な標的配列としかハイブリダイズしない、ストリンジェントの、配列特異的なハイブリダイゼーション条件は、当技術分野において周知である。ストリンジェントの条件は、配列依存的であり、異なる環境では異なるであろう。一般的に、ストリンジェントの条件は規定のイオン強度およびpHでの特異的配列に対する熱融点( $T_m$ )よりも約5℃低くなるように選択される。 $T_m$ は、塩基対の50%が解離した(規定のイオン強度およびpH下の)温度である。ハイブリダイズする条件のストリンジェンシーを緩めることで、配列のミスマッチが許容されるようになる。許容されるミスマッチの程度は、ハイブリダイゼーション条件の適当な調整によって制御することができる。

20

#### 【0058】

サザン型のハイブリダイゼーションの場合、例示的な条件は以下である: 50%ホルムアミド、5×SSC、および1% SDS、42℃でインキュベートを行い、または5×SSC、1% SDS、65℃でインキュベートで行い、0.2×SSC、および0.1% SDS中55℃、60℃、または65℃で洗浄。そのような洗浄は5、15、30、60、120分またはそれ以上の間、行うことができる。PCR用途(プライマーおよび/またはプローブのハイブリダイゼーションおよび/または伸長を伴う)の場合、アニーリングおよび伸長条件を含むハイブリダイゼーション条件は、例えば、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds., 1990)に記述されているように周知である。

30

#### 【0059】

本発明は、遺伝子組み換え工学の分野における日常の技術に依る。本発明で役に立つ一般的な方法を開示している基礎的なテキストには、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); およびCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994))が含まれる。

#### 【0060】

##### III. インプリンティングの消失およびがん素因を測定する方法

LOIの検出は、個体から得た生体試料中の二種のIGF2遺伝子コピーの各々に由来する発現量の比較に基づく。すなわち、個体がIGF2遺伝子の異なる二種の対立遺伝子を持っているなら、対立遺伝子特異的な検出を用いて、各遺伝子コピーの発現を定量化することができる。インプリンティングが機能しているなら、一方の遺伝子コピー(典型的には母方のコピー)は遺伝子のゲノムコピーの存在にもかかわらず発現されないであろう。しかし、LOIが起きているなら、発現は、IGF2遺伝子の母方および父方の両方のコピーから起こるであろう。LOIが起きている場合に、発現レベルは必ずしもぴったり等しいとは限らないので、いくつかの態様において、定量化した豊富ではない方の対立遺伝子の割合が、定量化した豊富な方の対立遺伝子の割合の33.3%を超えるか、またはそれに等しい場合に、試料はIGF2のLOIを示すと判定される。

40

#### 【0061】

特定のSNPについて個体がヘテロ接合性であるかどうかを知ることは、一般的に望まし

50

い。したがっていくつかの態様においては、試料からDNA（すなわち、ゲノムDNA）もRNAもともに得る。ゲノムDNAをアッセイして、特定のSNPについて個体がヘテロ接合性であるかどうかを判定する。個体がヘテロ接合性であるなら、二種のSNP対立遺伝子のどちらかを有するRNAを検出し、次いでその発現を比較することによりインプリンティングの消失を測定することが可能である。これを図2に示す。しかしながら、ある状況では、特定のSNPについて個体がヘテロ接合体であるかどうかを知ることなく、RNAだけを検出するのが有益なこともある。この状況では、二種の対立遺伝子の発現を観察することでLOIが示唆されるが、一方の対立遺伝子の発現を検出するのでは情報価値がない。というのも、陰性の結果が特定のSNPのインプリンティングまたはホモ接合性に起因するのかは、分からないためである。しかしながら、検出される異なるSNPの数を増やすことにより、どのSNPについても個体がホモ接合性であるという可能性が極めて低くなるようなアッセイ法をデザインすることが可能である。

10

#### 【0062】

いくつかの態様において、二種以上のSNPを個体についてアッセイする。「アッセイする」または「についてアッセイする」とは、SNPの可能性のある各対立遺伝子を別々に定量化することをいう。一般に、試料においてSNPの任意の組み合わせをアッセイすることができる。いくつかの態様において、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、75、100種またはそれ以上の異なるSNPをアッセイして、IGF2のLOIが起きているかを判定する。二種以上のSNPを包含する単位複製配列をデザインし、それによって、複数のSNPの効率的な検出を可能にすることが最適である。

20

#### 【0063】

実施例3において詳細に説明するように、本発明の一つの新規の特徴は、アッセイの精度も、可能性のあるヘテロ接合性の候補の数もともに改善する、概して互いに近接した二種のSNPの検出である。この後者の発見は、ある種のゲノム領域が連鎖ブロックとして分離することを示唆した以前の報告を考えれば、ことさらに驚きである。実施例3に記述の発見を考えれば、本発明のもう一つの新規の特徴は、各SNPが表1A、1B、1C、2Aおよび2Bに記載の同じ「ブロック」から選択される二種またはそれ以上のSNPの多型選択肢の相対量の検出である。したがって、例えば、ブロック1において二種またはそれ以上のSNPをアッセイする。あるいは、ブロック2において二種またはそれ以上のSNPをアッセイする。あるいは、ブロック3において二種またはそれ以上のSNPをアッセイする。これらの選択肢は、他のブロックからのSNPをさらに追加することを除外するものではない。単純に一例として、このことは、ブロック1からの二種のSNPおよびブロック2からの一種のSNPをアッセイできることを意味する。

30

#### 【0064】

表4～8に示されるように、各種の人種群は、SNPに対するヘテロ接合性の発生率の違いを見せる。したがって、いくつかの態様において、SNPを特定の人種群内で用いるために選択し、特定の人種群においてヘテロ接合性であるSNPをアッセイする可能性の改善を可能にする。したがって、いくつかの態様において、中国系の人では表4中の一または複数種のSNPをアッセイし、日系の人では表5中の一または複数種のSNPをアッセイし、アフリカ系の人では表6中の一または複数種のSNPをアッセイし、白人では表7中の一または複数種のSNPをアッセイし、およびメキシコ系の人では表8中の一または複数種のSNPをアッセイする。

40

#### 【0065】

あるいは、一組のSNPを選択して、人種にかかわらずヘテロ接合性のSNPについてアッセイする最も高い可能性を可能にすることもできる。したがって、いくつかの態様において、表4～8から選択されるSNPのパネルを用いる。

#### 【0066】

さらなる態様において、表4～8に記載のある種の人種群の者を、その同じ人種群に対して表1A～Cおよび表2A～Bに記載の同じ連鎖ブロックを有する一または複数種のSNPで検査する。

50

## 【 0 0 6 7 】

## IV. SNP検出の方法

SNPの存在について核酸を評価するための検出技術は、分子遺伝学の分野において周知の手順を伴う。さらに、方法の多くは核酸の増幅を伴う。実施のための十分な指針が当技術分野において提供されている。例示的な参考文献としては、PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (ed. H. A. Erlich, Freeman Press, NY, N.Y., 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (eds. Innis, et al., Academic Press, San Diego, Calif., 1990); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, 1994-1999, 2004年4月までの追補改訂版を含む; Sambrook & Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd Ed, 2001)などの手引き書が挙げられる。

10

## 【 0 0 6 8 】

これらの方法では典型的にはPCR段階を利用するが、他の増幅または非増幅に基づくプロトコルを用いることもできる。適当な増幅法には、リガーゼ連鎖反応(例えば、Wu & Wallace, Genomics 4:560-569, 1988を参照のこと); 鎖置換アッセイ(例えば、Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:392-396, 1992; 米国特許第5,455,166号を参照のこと); ならびに米国特許第5,437,990号; 同第5,409,818号; および同第5,399,491号に記述されている方法を含め、いくつかの転写に基づく増幅系; 転写増幅系(TAS) (Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177, 1989); ならびに自家持続配列複製(3SR) (Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878, 1990; WO 92/08800)が含まれる。あるいは、Q レプリカーゼ増幅(Kramer & Lizardi, Nature 339:401-402, 1989; Lomeli et al., Clin. Chem. 35:1826-1831, 1989)などの、検出可能なレベルまでプローブを増幅する方法を用いることもできる。公知の増幅法の総説は、例えば、Abramson およびMyersによってCurrent Opinion in Biotechnology 4:41-47, 1993に提供されている。

20

## 【 0 0 6 9 】

典型的には、個体におけるSNPの検出は、オリゴヌクレオチドプライマーおよび/またはプローブを用いて行われる。オリゴヌクレオチドは任意の適当な方法、通常は化学合成によって調製することができる。オリゴヌクレオチドは市販の試薬および機器を用いて合成することができる。あるいは、商業的供給源を通じてそれらを購入することもできる。オリゴヌクレオチドを合成する方法は、当技術分野において周知である(例えばNarang et al., Meth. Enzymol. 68:90-99, 1979; Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109-151, 1979; Beaucage et al., Tetrahedron Lett. 22:1859-1862, 1981; 米国特許第4,458,066号の固体支持体法を参照のこと)。さらに、上記の合成方法の改変を用いて、合成されたオリゴヌクレオチドに対する酵素作用に望ましい影響を与えることもできる。例えば、修飾されたホスホジエステル結合(例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホアミデートもしくはボラノホスフェート)または亜リン酸誘導体以外の結合のオリゴヌクレオチドへの組み込みを用いて、選択部位での切断を阻止することができる。さらに、2'-アミノ修飾糖の使用は、新しい核酸鎖の合成のための鋳型でもある核酸へのハイブリダイズ時のオリゴヌクレオチドの消化よりも置換に有利に働く傾向がある。

30

40

## 【 0 0 7 0 】

個体から得た試料における本発明のSNPの対立遺伝子の量および/または存在は、当技術分野において周知である多くの検出法を用いて判定することができる。いくつかのSNPアッセイの形成では、いくつかの一般的なプロトコル: 対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーション、プライマー伸長、対立遺伝子特異的なライゲーション、配列決定、または電気泳動的な分離技術、例えば、一本鎖高次構造多型分析(SSCP) およびヘテロ二重鎖分析のうちの一つを必要とする。例示的なアッセイ法としては、5'ヌクレアーゼアッセイ法、鋳型を標的とした色素終結因子の取り込み、分子指標対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドアッセイ法、一塩基伸長アッセイ法、および実時間のピロリン酸エステル配列によるSNPスコアリングが挙げられる。増幅された配列の分析はマイク

50

ロチップ、蛍光偏光アッセイ法およびマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)質量分析などの、さまざまな技術を用いて行うことができる。同様に使用できる二つの方法は、Flapヌクレアーゼを用いた侵襲的切断に基づくアッセイ法、およびパドロックプローブを利用した方法論である。

【0071】

特定のSNP対立遺伝子の有無の判定は、分析される個体由来の生体試料から得られる核酸試料を分析することによって一般に行われる。SNP対立遺伝子の量および/または存在は、試料由来のRNAを用いて直接測定されてもよいが、多くの場合、試料中のRNAを逆転写し、任意で増幅し、次いで得られたcDNAにおいてSNP対立遺伝子を検出する。

【0072】

SNPの対立遺伝子の量および/または存在を測定するのによく使われる核酸試料の分析方法を簡単に記述する。しかしながら、当技術分野において公知の任意の方法を本発明のなかで用いて、一塩基多型の量および/または存在を測定することができる。

【0073】

#### 対立遺伝子特異的なハイブリダイゼーション

対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション(ASO)ともよくいわれるこの技術(例えば、Stoneking et al., Am. J. Hum. Genet. 48:70-382, 1991; Saiki et al., Nature 324, 163-166, 1986; EP 235,726; およびWO 89/11548)は、変種的一方に特異的であるオリゴヌクレオチドプローブを、核酸試料の増幅から得られた増幅産物とハイブリダイズすることによって、一塩基だけ異なる二種のDNA分子を識別することに依る。いくつかの態様において、この方法では短い、例えば、長さが15~20塩基のオリゴヌクレオチドを利用する。プローブは、もう一方の変種と比べて一方の変種と示差的にハイブリダイズするようにデザインされる。そのようなプローブをデザインするための原理および指針は、当技術分野において、例えば、本明細書に引用の参考文献において入手可能である。ハイブリダイゼーション条件は、対立遺伝子間にハイブリダイゼーション強度の有意な相違が存在し、好ましくは本質的に二成分の応答が存在し、それによってプローブが対立遺伝子的一方とだけハイブリダイズするように十分にストリンジェントとすべきである。プローブのなかには、多型部位がプローブの中央の位置と(例えば、オリゴヌクレオチドの中央の4塩基内で、例えば、15塩基のオリゴヌクレオチドでは7個目の位置で; 16塩基のオリゴヌクレオチドでは8個目か9個目のどちらかの位置で)整列するように、標的DNAまたはcDNAのセグメントとハイブリダイズするようデザインされるものもある(例えば、本発明のポリヌクレオチドは本明細書に記載の二種のSNP対立遺伝子を識別する)が、このデザインは必要とされない。

【0074】

対立遺伝子の量および/または存在は、試料とハイブリダイズしている対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドの量を測定することによって判定される。典型的には、オリゴヌクレオチドは蛍光標識などの標識で標識される。例えば、対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドを、潜在的なSNP配列に相当する固定化されたオリゴヌクレオチドにアプライする。ストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件の後、各SNPオリゴヌクレオチドについて蛍光強度を測定する。

【0075】

一つの態様において、多型部位に存在するヌクレオチドは、多型部位を包含する領域において多型対立遺伝子的一方に厳密に相補的なオリゴヌクレオチドプローブを用いた配列特異的なハイブリダイゼーション条件下でのハイブリダイゼーションによって特定される。プローブハイブリダイズ配列および配列特異的なハイブリダイゼーション条件は、多型部位での単一のミスマッチがハイブリダイゼーション二重鎖を十分に不安定化し、その結果、該二重鎖が効果的に形成されないように選択される。かくして、配列特異的なハイブリダイゼーション条件の下では、安定な二重鎖は、プローブと、厳密に相補的な対立遺伝子配列との間だけで形成される。したがって、多型部位を包含する領域において対立遺伝子配列に厳密に相補的である、長さが約10~約35ヌクレオチドの、例えば、長さが約15~

10

20

30

40

50

約35ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドは、本発明の範囲内(例えば、SEQ ID NO: 1~112のうちの一つ)である。

【0076】

代替的な態様において、多型部位のヌクレオチドの量および/または存在は、多型部位を包含する領域においてSNP対立遺伝子の一方に実質的に相補的な、および多型部位で対立遺伝子に厳密に相補的なオリゴヌクレオチドを用いた十分にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でのハイブリダイゼーションによって特定される。非多型部位で生じるミスマッチは両方の対立遺伝子配列とのミスマッチであるので、標的の対立遺伝子配列と形成された二重鎖中のおよび対応する非標的の対立遺伝子配列と形成された二重鎖中のミスマッチ数の相違は、標的の対立遺伝子配列に厳密に相補的なオリゴヌクレオチドを用いた場合と同じである。この態様においては、非標的配列との安定な二重鎖の形成を防ぐのに十分なストリンジェンシーは維持しながらも、ハイブリダイゼーション条件を十分に緩めて、標的配列との安定な二重鎖の形成を可能にする。そのような十分にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の下で、安定な二重鎖はプローブと標的の対立遺伝子との間でのみ生じる。したがって、多型部位を包含する領域において対立遺伝子配列に実質的に相補的である、および多型部位で対立遺伝子配列に厳密に相補的である、長さが約10~約35ヌクレオチドの、好ましくは、長さが約15~約35ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドは、本発明の範囲内である。

【0077】

厳密によりもむしろ、実質的に、相補的なオリゴヌクレオチドの使用は、ハイブリダイゼーション条件の最適化が制限されているアッセイの形式において望ましいことがある。例えば、典型的な多標的固定化プローブアッセイの形式においては、各標的に対するプローブを単一の固体支持体に固定化する。ハイブリダイゼーションは、標的DNAまたはcDNAを含有する溶液と固体支持体を接触させることによって同時に行われる。全てのハイブリダイゼーションが同一の条件下で行われるので、ハイブリダイゼーション条件を各プローブについて別々に最適化することはできない。アッセイの形式によってハイブリダイゼーション条件の調整が不可能とされる場合には、プローブへのミスマッチの組み込みを用いて、二重鎖の安定性を調整することができる。導入された特定のミスマッチが二重鎖の安定性に及ぼす影響は周知であり、二重鎖の安定性を、上記のように、日常的に推定することも実験的に判定することもできる。プローブの正確なサイズおよび配列に依る、適当なハイブリダイゼーション条件は、本明細書において提供のおよび当技術分野において周知の指針を用いて実験的に選択することができる。配列の一塩基対の相違を検出するためのオリゴヌクレオチドプローブの使用は、例えば、Conner et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:278-282、ならびに米国特許第5,468,613号および同第5,604,099号に記述されており、これらの各々が参照により本明細書に組み入れられる。

【0078】

完全マッチのハイブリダイゼーション二重鎖と一塩基ミスマッチのハイブリダイゼーション二重鎖との間の安定性の比例的变化は、ハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの長さに依る。いっそう短いプローブ配列と形成される二重鎖は、ミスマッチの存在によっていっそう比例的に不安定化される。実際には、長さが約15~約35ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドが、配列特異的な検出には好ましい。さらに、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドの末端は、熱エネルギーによって間断のない無作為の解離および再アニーリングを起こしているので、両末端のミスマッチは、内部に生じたミスマッチほど、ハイブリダイゼーション二重鎖を不安定化しない。標的配列における一塩基対変化の識別のため、多型部位がプローブの内部領域に生じるように、標的配列とハイブリダイズするプローブ配列を選択することが好ましい。

【0079】

特定のSNPとハイブリダイズするプローブ配列を選択するための上記の基準は、プローブのハイブリダイズ領域、すなわち、標的配列とのハイブリダイゼーションに関わるプローブのその部分に当てはまる。プローブのハイブリダイゼーション特性をあまり変化させ

ないで、プローブを固定化するために使われるポリ-T尾部などの、さらなる核酸配列にプローブを結合させることができる。本発明の方法で用いる場合、標的配列に相補的ではない、すなわち、ハイブリダイゼーションに関わらないさらなる核酸配列に結合するプローブは、未結合のプローブと本質的に同等であることを当業者は認識するであろう。

#### 【0080】

プローブと試料中の標的核酸配列との間で形成されるハイブリッドを検出するのに適したアッセイ形式は、当技術分野において公知であり、固定化した標的(ドットプロット)の形式および固定化したプローブ(逆ドットプロットまたはラインプロット)のアッセイ形式を含む。ドットプロットおよび逆ドットプロットのアッセイ形式は、米国特許第5,310,893号; 同第5,451,512号; 同第5,468,613号; および同第5,604,099号に記述されており、これらの各々が参照により本明細書に組み入れられる。

10

#### 【0081】

ドットプロットの形式においては、増幅された標的DNAまたはcDNAをナイロン膜などの、固体支持体に固定化する。膜-標的複合体を適当なハイブリダイゼーション条件の下で標識プローブとともにインキュベートし、ハイブリダイズしなかったプローブを適当にストリンジェントな条件下での洗浄によって除去し、結合したプローブの存在について膜をモニタリングする。

#### 【0082】

逆ドットプロット(またはラインプロット)の形式においては、プローブをナイロン膜またはマイクロタイタープレートなどの、固体支持体に固定化する。標的DNAまたはcDNAを、典型的には増幅の間に標識プライマーの取り込みによって標識する。プライマーの一方または両方を標識することができる。膜-プローブ複合体を適当なハイブリダイゼーション条件の下で、標識され増幅された標的DNAまたはcDNAとともにインキュベートし、ハイブリダイズしなかった標的DNAまたはcDNAを、適当にストリンジェントな条件下での洗浄によって除去し、結合した標的DNAまたはcDNAの存在について膜をモニタリングする。

20

#### 【0083】

多型変種の一方に特異的である対立遺伝子特異的なプローブは、他方の多型変種に対する対立遺伝子特異的なプローブと併せて用いられることが多い。いくつかの態様において、プローブを固体支持体に固定化し、個体における標的配列を両方のプローブによって同時に分析する。核酸アレイの例はWO 95/11995によって記述されている。特徴付けられている多型の分析に同じアレイまたは異なるアレイを用いることができる。WO 95/11995でも、既に特徴付けられている多型の変種型の検出のために最適化されたサブアレイについて記述している。

30

#### 【0084】

##### 対立遺伝子特異的なプライマー

対立遺伝子の量および/または存在は同様に、対立遺伝子特異的な増幅法またはプライマー伸長法を用いて一般に検出される。これらの反応では、典型的には、プライマーの3'末端のミスマッチを介して多型を特異的に標的化するようにデザインされたプライマーの使用を伴う。ポリメラーゼに誤りを修正する活性がない場合には、ミスマッチの存在がプライマーを伸長するポリメラーゼの能力に影響を与える。例えば、対立遺伝子特異的な増幅または伸長に基づく方法を用いて対立遺伝子配列を検出するために、SNPの多型ヌクレオチドに相補的なプライマーは、3'末端のヌクレオチドが多型位置でハイブリダイズするようにデザインされる。特定の対立遺伝子の存在は、伸長を開始するプライマーの能力によって判定することができる。3'末端が不適合であれば、伸長が妨げられる。プライマーが3'末端の多型ヌクレオチドに適合すれば、プライマーは効率的に伸長されるであろう。

40

#### 【0085】

典型的には、プライマーは増幅反応において第二のプライマーと併せて用いられる。第二のプライマーは多型位置と無関係の部位でハイブリダイズする。増幅はこれらの二つのプライマーから進行し、特定の対立遺伝子型が存在することを示す検出可能な産物をもたらす。対立遺伝子特異的な増幅または伸長に基づく方法は、例えば、WO 93/22456; 米国

50

特許第5,137,806号；同第5,595,890号；同第5,639,611号；および米国特許第4,851,331号に記述されている。

【0086】

対立遺伝子特異的な増幅に基づく方法を用いる場合、対立遺伝子の特定および/または定量化には増幅された標的配列の存在または非存在の検出が必要になる。増幅された標的配列の検出のための方法は、当技術分野において周知である。例えば、記述したゲル電気泳動法およびプローブハイブリダイゼーションアッセイ法は、核酸の存在を検出するために使われることが多い。

【0087】

プローブを使用しない代替的な方法では、増幅された核酸は、反応混合液中での二本鎖DNAの総量の増大をモニタリングすることによって検出され、これは、例えば、米国特許第5,994,056号；ならびに欧州特許出願公開第487,218号および同第512,334号に記述されている。二本鎖の標的DNAまたはcDNAの検出は、さまざまなDNA結合色素、例えば、SYBR Greenが二本鎖DNAへの結合時に示す蛍光の増大に依る。

【0088】

当業者には理解されるように、対立遺伝子特異的な増幅法は、特定の標的対立遺伝子に対する複数の対立遺伝子特異的なプライマーを利用する反応において実施することができる。そのような複数の用途のためのプライマーは、一般には識別可能な標識を用いて標識されるか、または対立遺伝子から生じる増幅産物がサイズによって識別可能であるように選択される。したがって、例えば、単一試料中の両方の対立遺伝子は、さまざまな方法により単一増幅を用いて特定および/または定量化することができる。

【0089】

対立遺伝子特異的なプローブの場合と同様に、対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドプライマーは、ハイブリダイズする領域において多型対立遺伝子の一方に厳密に相補的であってもよく、またはオリゴヌクレオチドの3'末端以外の位置でいくつかのミスマッチを有していてもよいが、そのミスマッチは両方の対立遺伝子配列内の非多型部位に存在している。

【0090】

5'-ヌクレアーゼアッセイ法

対立遺伝子の量および/または存在は米国特許第5,210,015号；同第5,487,972号；および同第5,804,375号；ならびにHolland et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280に記述されているように、「TaqMan(登録商標)」または「5'-ヌクレアーゼアッセイ法」を用いて判定することもできる。TaqMan(登録商標)アッセイでは、増幅された領域内でハイブリダイズする標識した検出プローブが増幅反応中に加えられる。プローブは、DNA合成用のプライマーとしてプローブが作用することを阻止するように修飾される。増幅は、5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを用いて行われる。増幅の各合成段階中、伸長されているプライマーより下流の標的核酸とハイブリダイズする任意のプローブは、DNAポリメラーゼの5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性によって分解される。したがって、新しい標的鎖の合成はプローブの分解も引き起こし、分解産物の蓄積は標的配列合成の尺度となる。

【0091】

ハイブリダイゼーションプローブは、SNP対立遺伝子を識別する対立遺伝子特異的なプローブであってもよい。あるいは、本方法は、対立遺伝子特異的なプライマーおよび増幅産物に結合する標識プローブを用いて行われてもよい。

【0092】

分解産物を検出するのに適した任意の方法を5'ヌクレアーゼアッセイ法において用いることができる。多くの場合には、検出プローブを二種の蛍光色素で標識し、その一方が他方の色素の蛍光を消光することができる。色素をプローブに付着させるが、好ましくは、プローブが非ハイブリダイズ状態にある場合に消光が起こるように、およびDNAポリメラーゼの5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性によるプローブの切断が二種の色素間で起

10

20

30

40

50



こるように、一方を5'末端に付着させ、他方を内部部位に付着させる。増幅は、同時に起こる消光の解除と、最初には消光されていた色素からの観察可能な蛍光の増大とともに、色素間でのプローブの切断を引き起こす。分解産物の蓄積は、反応による蛍光の増大を測定することによってモニタリングされる。参照によりともに本明細書に組み入れられる米国特許第5,491,063号および同第5,571,673号では、増幅と同時に起こるプローブの分解を検出するための代替的な方法について記述している。

#### 【0093】

##### DNA配列決定および一塩基または他のプライマー伸長

対立遺伝子の量および/または存在は直接的な配列決定によって判定することもできる。方法としては、例えば、ダイデオキシ配列決定に基づく方法、ならびにMaxamおよびGilbert配列のような他の方法が挙げられる(例えば、Sambrook and Russell, 前記を参照のこと)。

#### 【0094】

その他の検出方法には、オリゴヌクレオチド長の産物のPyrosequencing(商標)が含まれる。そのような方法では、PCRなどの増幅技術を利用することが多い。例えば、パイロ配列決定法では、配列決定用のプライマーを、一本鎖の、PCR増幅された、DNAまたはcDNA鋳型とハイブリダイズし、酵素のDNAポリメラーゼ、ATPスルフィラーゼ、ルシフェラーゼおよびアピラーゼ、ならびに基質のアデノシン5'ホスホ硫酸(APS)およびルシフェリンとともにインキュベートする。初めの四種のデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)を反応に加える。DNAポリメラーゼは、鋳型鎖中の塩基に相補的であれば、DNA鎖へのデオキシヌクレオチド三リン酸の組み込みを触媒する。各組み込み事象には、組み込まれたヌクレオチドの量と当モルの量でのピロリン酸塩(Pi)の遊離が付随する。ATPスルフィラーゼは、アデノシン5'ホスホ硫酸の存在下でPiをATPへ定量的に変換する。このATPは、ATPの量に比例する量で可視光を発生するオキシルシフェリンへのルシフェリンの、ルシフェラーゼを介した変換を推進する。ルシフェラーゼ触媒反応において生じた光は、電荷結合素子(CCD)カメラによって検出され、pyrogram(商標)におけるピークとして見られる。各光シグナルは、組み込まれたヌクレオチドの数に比例する。ヌクレオチド分解酵素であるアピラーゼは、組み込まれていないdNTPおよび過剰なATPを持続的に分解する。分解が完了した時点で、さらに別のdNTPを加える。

#### 【0095】

SNPを特徴付けるための別の類似の方法では、完全なPCRの使用を要しないが、典型的には、調べられるヌクレオチドに相補的である一つの、検出可能に(例えば蛍光的に)標識されたジデオキシリボ核酸分子(ddNTP)によるプライマーの伸長だけを用いる。多型部位のヌクレオチドは、一塩基だけ伸長された、かつ蛍光的に標識されているプライマーの検出によって特定することができる(例えば、Kobayashi et al, Mol. Cell. Probes, 9:175-182, 1995)。もちろん、伸長産物を必要に応じて、他種の標識に基づきまたは質量分析により検出することもできる。

#### 【0096】

類似の方法では、PCR増幅された標的DNAまたはRT-PCR増幅された標的cDNAを、一ヌクレオチドのプライマー伸長反応の鋳型として用いることができ、それによって多型ヌクレオチドに相補的な一つの蛍光標識ddNTPが単一のプライマーの3'末端に組み込まれる。各特異的ddNTPを、異なる蛍光色素で標識することができる(例えば、ddATPをdR6Gで標識し、ddCTPをdTAMRA(商標)で標識し、ddGTPをdR110で標識し、およびddTTPまたはddUTPをdROX(商標)で標識することができる)。それゆえ、初めには標識されていないプライマーの一ヌクレオチド伸長により、プライマーは、非標識プライマーの3'末端に付加された塩基を特定する特異的な蛍光色素でタグ付けされる。伸長されたプライマーを分離し分析して、標的DNAまたは標的cDNA鋳型中の各対立遺伝子の相対量に当たる、各特異的な色素タグの付いたプライマーの存在および相対量を判定することができる。

#### 【0097】

##### 制限断片長多型分析

他の態様において、SNPの対立遺伝子の量および/または存在は、関心対象の多型ヌクレオチドが制限酵素の認識配列内にある場合、増幅された標的DNAまたはcDNAの示差的消化によって判定することができる。ある場合には、SNPの一方の対立遺伝子(第一の対立遺伝子)は制限酵素の認識配列を保持しており、他方の対立遺伝子(第二の対立遺伝子)は保持していない。この場合には、制限酵素は、第一の対立遺伝子を含む標的DNAまたはcDNAを切断するが、第二の対立遺伝子を含む標的DNAまたはcDNAは切断しないであろう。別の場合には、SNPの一方の対立遺伝子(第一の対立遺伝子)は制限酵素(第一の制限酵素)の認識配列を保持しており、他方の対立遺伝子(第二の対立遺伝子)は異なる制限酵素(第二の制限酵素)の認識配列を保持している。この場合には、第一の制限酵素は、第一の対立遺伝子を含む標的DNAまたはcDNAを切断するが、第二の対立遺伝子を含む標的DNAまたはcDNAは切断しないであろう。第二の制限酵素は、第二の対立遺伝子を含む標的DNAまたはcDNAを切断するが、第一の対立遺伝子を含む標的DNAまたはcDNAは切断しないであろう。対立遺伝子の量および/または存在は、固定化された制限断片へのサザンブロットハイブリダイゼーションおよびバンド強度の定量化、ゲル電気泳動による制限断片の分離および可視化、(Agilent BioAnalyzerを用いて行われるような)キャピラリー電気泳動による制限断片の分離および定量化、または切断された鋳型DNAもしくはcDNA vs 切断されなかった鋳型DNAもしくはcDNAの示差的な定量的PCR増幅を含むが、これらに限定されない、さまざまな方法によって判定することができる。

【0098】

#### 変性勾配ゲル電気泳動

ポリメラーゼ連鎖反応を用いて作製された増幅産物は、変性勾配ゲル電気泳動の使用によって分析することができる。異なる配列依存的融解特性および溶液中でのDNAの電気泳動的な移動に基づいて、異なる対立遺伝子を特定することができる(例えば、Erlich, ed., PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification, W. H. Freeman and Co, New York, 1992, Chapter 7を参照のこと)。

【0099】

#### 一本鎖高次構造多型分析

標的配列の対立遺伝子は、例えば、Orita et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 86, 2766-2770 (1989)に記述されているように、一本鎖PCR産物の電気泳動的な移動の変化によって塩基の差異を特定する、一本鎖高次構造多型分析を用いて差別化することができる。増幅されたPCRまたはRT-PCR産物を上記のように作製し、加熱するか、それ以外の方法で変性させて、一本鎖増幅産物を形成させることができる。一本鎖核酸は再び折り畳まれるか、または塩基配列に部分的に依存した二次構造を形成することができる。一本鎖増幅産物の異なる電気泳動移動度を、標的の対立遺伝子間の塩基配列差異に関連付けることができる。

【0100】

SNP検出法では、標識されたオリゴヌクレオチドを利用することが多い。オリゴヌクレオチドは、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、または化学的手段によって検出可能な標識を組み込むことによって標識することができる。有用な標識には、蛍光色素、放射性標識、例えば、 $^{32}\text{P}$ 、電子密度の高い試薬、例えばペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼなどの酵素、ビオチン、または抗血清もしくはモノクローナル抗体が得られるハプテンおよびタンパク質が含まれる。標識化技術は、当技術分野において周知である(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, 前記; Sambrook & Russell, 前記を参照のこと)。

【0101】

#### V. RNAを定量化するための方法

特定のSNPに対応するRNAの存在および量を、RNAを定量化するための任意の方法にしたがって容易に判定することができる。固体支持体へのRNAの結合およびRNAのプロベイングを伴う種々の方法(例えば、ノザンブロット、ドットブロットなど)を用いることができる。

## 【 0 1 0 2 】

いくつかの態様において、標的RNAを初めに(例えば、逆転写酵素を用いて)逆転写し、次いで、得られたcDNAをRNA量の代わりに、当技術分野において公知の任意の方法(プロットハイブリダイゼーション、RT-PCRなど)により定量化する。種々の逆転写の方法が公知であり、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); およびCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994))に記述されており、特異的または非特異的なプライマーのどちらかを用いた逆転写を伴いうる。

## 【 0 1 0 3 】

いくつかの態様において、RT-PCRまたは他の定量的な増幅技術を用いて、標的RNAを定10  
量化する。反応によるcDNAの増幅は周知である(米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号; PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS (Innis et al., eds, 1990))。

## 【 0 1 0 4 】

本発明の方法により増幅された配列を、溶液中でまたは固体支持体への結合の後に、特異的なDNA配列の検出に通常適用される任意の方法、例えばPCR、オリゴマー制限(Saiki, et al., Bio/Technology 3:1008-1012 (1985))、対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチド(ASO)プローブ分析(Conner, et al., PNAS USA 80:278 (1983))、オリゴヌクレオチドドライ20  
ゲーションアッセイ(OLA) (Landegren, et al., Science 241:1077, (1988))などによって、さらに評価、検出、配列決定することなどができる。DNA分析のための分子技術が概説されている(Landegren, et al., Science 242:229-237 (1988))。

## 【 0 1 0 5 】

定量的増幅の方法は、例えば、米国特許第6,180,349号; 同第6,033,854号; および同第5,972,602号に、ならびに、例えば、Gibson et al., Genome Research 6:995-1001 (1996); DeGraves, et al., Biotechniques 34(1): 106-10, 112-5 (2003); Deiman B, et al., Mol Biotechnol. 20(2): 163-79 (2002)に開示されている。増幅は「実時間」でモニタリングすることができる。

## 【 0 1 0 6 】

一般に、定量的増幅は、増幅(例えばPCR)反応のサイクルにおける鋳型のコピー数に当たるシグナル(例えば、プローブの蛍光)のモニタリングに基づく。PCRの初期サイクルに30  
おいては、形成された単位複製配列の量はアッセイ由来の測定可能なシグナル出力を支持するものではないので、非常に低いシグナルが観察される。初期サイクルの後、形成された単位複製配列の量が増加するにつれて、シグナル強度は測定可能なレベルまで増大し、PCRが非対数増殖期に入る後期サイクルでプラトーに達する。シグナル強度 vs サイクル数のプロットを通じて、測定可能なシグナルがPCR反応から得られる特定のサイクルを推定し、これを用いて、PCRの開始前の標的の量を逆算することができる。この方法によって判定される特定のサイクル数は、典型的には、サイクル閾値(Ct)といわれる。例示的な方法は、例えば、加水分解に関連してHeid et al. Genome Methods 6:986-94 (1996)に記述されている。

## 【 0 1 0 7 】

増幅産物の検出のための一つの方法は、5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ「加水分解」PCRアッセイ法(TaqMan(商標)アッセイ法ともいわれる)(米国特許第5,210,015号および同第5,487,972号; Holland et al., PNAS USA 88: 7276-7280 (1991); Lee et al., Nucl40  
eic Acids Res. 21: 3761-3766 (1993))である。このアッセイ法では増幅反応中の、二重標識された蛍光発生プローブ(「TaqMan(商標)」プローブ)のハイブリダイゼーションおよび切断によって特異的なPCR産物の蓄積を検出する。この蛍光発生プローブは、蛍光レポーター色素と消光剤色素の両方を用いて標識されたオリゴヌクレオチドからなる。PCR中、このプローブは、増幅されているセグメントとハイブリダイズする場合に、かつその場合にのみ、DNAポリメラーゼの5'-エキソヌクレアーゼ活性によって切断される。プローブの切断によって、レポーター色素の蛍光強度の増大が生じる。50

## 【0108】

エネルギー転移の使用に依存した増幅産物を検出する別の方法は、Tyagi and Kramer, Nature Biotech. 14:303-309 (1996)によって記述されている「ビーコンプローブ」法であり、これは米国特許第5,119,801号および同第5,312,728号の主題でもある。この方法では、ヘアピン構造を形成できるオリゴヌクレオチド・ハイブリダイゼーションプローブを利用する。ハイブリダイゼーションプローブの一方の末端(5'または3'末端のどちらか)には供与体フルオロフォアがあり、他方の末端には、受容体成分がある。TyagiおよびKramerによる方法の場合には、この受容体成分は消光剤であり、すなわち、受容体は供与体によって放出されたエネルギーを吸収するが、蛍光自体は吸収しない。かくして、ビーコンが開放構造にある場合、供与体フルオロフォアの蛍光は検出可能であるのに対し、ビーコンがヘアピン(閉鎖)構造にある場合、供与体フルオロフォアの蛍光は消光される。PCRに利用された場合、PCR産物の鎖の一つとハイブリダイズする分子ビーコンプローブは「開放構造」にあって、蛍光が検出されるのに対し、未ハイブリダイズのままのものは、蛍光を発しないであろう(Tyagi and Kramer, Nature Biotechnol. 14: 303-306 (1996))。結果として、蛍光の量は、PCR産物の量が増加するにつれて増加するので、したがってPCRの進行の尺度として用いることができる。その他の定量的増幅の方法も利用可能であることを当業者は認識するであろう。

10

## 【0109】

核酸の定量的増幅を実施するためのその他種々の技術も公知である。例えば、方法論のなかには、オリゴヌクレオチドが標的核酸とハイブリダイズする場合に蛍光の変化が生じるように構造化されている一つまたは複数のプローブオリゴヌクレオチドを利用するものもある。例えば、一つのそのような方法には、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)を活用する二重フルオロフォア法、例えば、二種のオリゴ・プローブが単位複製配列にアニールするLightCycler(商標)ハイブリダイゼーションプローブがある。このオリゴヌクレオチドは、頭尾方向でハイブリダイズし、効率的なエネルギー転移に適合した距離でフルオロフォアが離れているようにデザインされている。核酸に結合するまたは伸長産物に組み込まれる場合にシグナルを放射するよう構造化されている標識オリゴヌクレオチドのその他の例としては、Scorpions(商標)プローブ(例えば、Whitcombe et al., Nature Biotechnology 17:804-807, 1999および米国特許第6,326,145号)、Sunrise(商標)(またはAmplifluor(商標))プローブ(例えば、Nazarenko et al., Nuc. Acids Res. 25:2516-2521, 1997および米国特許第6,117,635号)、ならびに消光剤なしでもシグナルの低下をもたらす、かつ標的とハイブリダイズする場合に増大したシグナルを放射する二次構造を形成するプローブ(例えば、Luxプローブ(商標))が挙げられる。

20

30

## 【0110】

他の態様において、二本鎖DNAに挿入される場合にシグナルを生み出す挿入剤を用いることができる。例示的な薬剤としては、SYBR GREEN(商標)およびSYBR GOLD(商標)が挙げられる。これらの薬剤は鋳型特異的ではないので、シグナルは鋳型特異的な増幅に基づいて作り出されるものと考えられる。これは、温度に応じてシグナルをモニタリングすることにより確認することができる。なぜなら、鋳型配列の融解点は一般的に、例えば、プライマー-二量体などよりもはるかに高いからである。

40

## 【0111】

## VI. キット

本発明は同様に、本方法を実践するのに有用な構成成分を含むキットを提供する。いくつかの態様において、キットは、適切な支持膜に任意で固定化されてもよい、本発明のSNPに対する一方または両方の対立遺伝子特異的な検出ポリヌクレオチド(例えば、プライマーまたはプローブ)を含むことができる。いくつかの態様において、キットは、8~100ヌクレオチドの第一の単離ポリヌクレオチドであって、SNPの第一の対立遺伝子(またはその相補体)とSNPの第二の対立遺伝子(またはその相補体)とをハイブリダイゼーション反応において識別するポリヌクレオチド、および任意で、8~100ヌクレオチドの第二の単離ポリヌクレオチドであって、SNPの第一の対立遺伝子(またはその相補体)とSNPの第二の対立遺

50

伝子(またはその相補体)とを識別し、かつ第一のポリヌクレオチドが第一の対立遺伝子における多型ヌクレオチドに相補的であり、第二のポリヌクレオチドが第二の対立遺伝子の多型ヌクレオチドに相補的である、ポリヌクレオチドを含む。任意で、キットは、SEQ ID NO: 1~112より選択される2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100種またはそれ以上のSNPに対する一方または両方の対立遺伝子特異的なポリヌクレオチドを含んでもよい。そのようなキットは、多型部位を包含するIGF2遺伝子座の領域を増幅するための増幅プライマーを含むこともできる。あるいは、有用なキットは、多型対立遺伝子の特異的増幅のための対立遺伝子特異的なプライマーを含んだプライマーのセットを含むこともできる。そのようなキットは、増幅産物の検出のためのプローブを含むこともできる。あるいは、有用なキットは、上記のプライマー伸長法で用いるために関心対象のSNP位置の5'側の、しかしそのSNP位置は含まない配列(またはその相補体)に相補的なプライマーのセットを含むこともできる。

10

#### 【0112】

キットのその他の任意の構成成分には、患者の遺伝子型を決定するのに、および/または存在する特定の対立遺伝子の相対量を定量化するのに使われるさらなる試薬が含まれる。例えば、キットは、ポリメラーゼ、標識されたまたは標識されていない基質ヌクレオチド三リン酸、核酸を標識するおよび/または検出するための手段、増幅またはハイブリダイゼーション反応に適した緩衝液、ならびに本発明の方法を実施するための使用説明書を含むことができる。

#### 【0113】

20

### VII. 反応混合物

本発明は同様に、本方法を実践するための構成成分を含む反応混合物を提供する。いくつかの態様において、キットは、適切な支持膜に任意で固定化されてもよい、本発明のSNP(またはその相補体)に対する一方または両方の対立遺伝子特異的な検出ポリヌクレオチド(例えば、プライマーまたはプローブ)を含むことができる。いくつかの態様において、反応混合物は、8~100ヌクレオチドの第一の単離ポリヌクレオチドであって、SNPの第一の対立遺伝子(またはその相補体)とSNPの第二の対立遺伝子(またはその相補体)とをハイブリダイゼーション反応において識別するポリヌクレオチド、および任意で、8~100ヌクレオチドの第二の単離ポリヌクレオチドであって、SNPの第一の対立遺伝子(またはその相補体)とSNPの第二の対立遺伝子(またはその相補体)とを識別し、かつ第一のポリヌクレオチドが第一の対立遺伝子における多型ヌクレオチドに相補的であり、第二のポリヌクレオチドが第二の対立遺伝子の多型ヌクレオチドに相補的である、ポリヌクレオチドを含む。任意で、反応混合物は、SEQ ID NO: 1~112より選択される2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100種またはそれ以上のSNPに対する一方または両方の対立遺伝子特異的なポリヌクレオチドを含んでもよい。そのような反応混合物は、多型部位を包含するIGF2遺伝子座の領域を増幅するための増幅プライマーを含むこともできる。あるいは、反応混合物は、多型対立遺伝子の特異的増幅のための対立遺伝子特異的なプライマーを含んだプライマーのセットを含むこともできる。そのような反応混合物は、増幅産物の検出のためのプローブを含むこともできる。任意で、反応混合物は、SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、および112より選択される2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100種またはそれ以上のSNPに対するSNP位置の5'側の、しかしそのSNP位置は含まない配列に相補的なプライマーのセットを含んでもよい。

30

40

#### 【0114】

反応混合物のその他の任意の構成成分には、患者の遺伝子型を決定するのに、および/または存在する特定の対立遺伝子の相対量を定量化するのに使われるさらなる試薬が含ま

50

れる。例えば、反応混合物は、ポリメラーゼ、標識されたまたは標識されていない基質ヌクレオシド三リン酸、核酸を標識するおよび/または検出するための手段、増幅またはハイブリダイゼーション反応に適した緩衝液を含むことができる。

#### 【0115】

#### VIII. がん検出

IGF2 L0Iは、例えば、がんの素因および種々の薬物によるがん処置の効力の予測と関連付けられる。例えば、WO2004/003003; Kaneda et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 (52): 20926-20931 (2007)を参照されたい。したがって、本明細書において記述のIGF2におけるL0Iの検出は、がんのリスクの診断、予後、分類、予測、がんの再発の検出、およびいくつかのがん種の処置の選択において用いることができる。原発がん、転移がんおよび再発がんなどの、任意の進行度のがんを検出することができる。多数のがん種に関する情報は、例えば、米国がん協会(cancer.orgのワールドワイドウェブにて入手可能)より、または、例えば、Harrison's Principles of Internal Medicine, Kaspar, et al., eds., 16th Edition, 2005, McGraw-Hill, Incより見出すことができる。検出できる例示的ながんとしては、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、絨毛がん、結腸直腸新生物(結腸直腸腺腫または結腸直腸がん)、食道がん、胃腺がん、神経膠腫、肝細胞がん、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、肺がん、髄芽腫、前立腺がん、中皮腫、卵巣がん、腎細胞がん、精巢生殖細胞、および子宮がんが挙げられる。

#### 【0116】

本発明は、哺乳類(例えば、ヒト)ががんを有するかどうか、哺乳類から採取された生体試料ががん細胞を含むかどうかを判定する、哺乳類ががんを発現するリスクもしくは可能性を推定する、がんの種類および病期を分類する、抗がん処置の効力をモニタリングする、またはがんを有する哺乳類において適切な抗がん処置を選択するための方法を提供する。

#### 【0117】

いくつかの態様において、生体試料は、がん細胞を含むものと疑われる組織由来の組織試料を含む。例えば、がんを有するものと疑われる個体において、乳房組織、リンパ組織、肺組織、脳組織、または血液を評価することができる。あるいは、肺、腎臓、肝臓、卵巣、頭頸部、甲状腺、膀胱、頸部、結腸、子宮内膜、食道、前立腺、または皮膚の組織を評価することもできる。組織または細胞は、例えば、外科手術、生検、静脈切開術、綿球採取、乳頭分泌、大便などによるような、当技術分野において公知の任意の方法により得ることができる。他の態様において、がん細胞を含むことが分かっている組織試料、例えば、腫瘍由来の組織試料を、本発明の診断バイオマーカーの一種または複数種でのメチル化の存在または量について分析し、がんに関する情報、例えば、ある種の処置の効力、個体の生存予測などについて判定する。いくつかの態様において、本方法をさらなる診断法、例えば、他のがんバイオマーカーの検出などと併せて用いる。

#### 【0118】

本発明の方法は、がんを有することが分かっているもしくは疑われる個体を評価するために、または日常の臨床検査として、すなわち、がんを有することが必ずしも疑われない個体において用いることができる。さらなる診断アッセイを実施して、個体におけるがんの状態を確認することもできる。

#### 【0119】

さらに、本発明の方法は、処置過程の効力を評価するために用いることもできる。例えば、がんを有する哺乳類において経時的にL0Iをモニタリングすることによって、抗がん処置の効力を評価することができる。例えば、処置の前に、または処置の初期に哺乳類から採取された試料でのレベルと比べて、処置後の哺乳類から採取された生体試料でのIGF2におけるL0Iの低下または欠如は、有効な処置であることを示す。さらに、がん処置に適した薬物の選択の前にIGF2のL0Iについて患者をスクリーニングすることもできる。例えば、L0Iが検出されたら、患者はIGF1R阻害剤にふさわしい候補である可能性が高い。例えば、Kaneda et al., 前記を参照されたい。

## 【 0 1 2 0 】

いくつかの態様において、本方法は、個体から判定されたメチル化状態に基づき、診断、予後、リスク評価または分類を記録する段階を含む。例えば、コンピュータによる電磁的記録を含め、いかなる種類の記録も企図される。

## 【 0 1 2 1 】

## 実施例

以下の実施例は、本発明を限定するためではなく例示するために提供される。

## 【 0 1 2 2 】

## 実施例1. IGF2遺伝子の第9エクソン内の新規のSNPの発見

IGF2遺伝子の第9エクソン内のSNPのコレクションがこれまでに報告されている。表1A、1Bおよび1Cはゲノムコーディネート(NCBI build 36)、単一ヌクレオチド配列変種、NCBI dbSNP参照識別子および以前に特定されたSNP周囲のヌクレオチド配列(dbSNP build 129)を記載している。これまでに特徴付けられていないSNPを特定するため、本発明者らは、IGF2第9エクソンの大部分をタイル状に埋め尽くす15種のPCR単位複製配列をデザインした。各々を用いてInternational HapMap Projectコレクションの一部である試料462個を含む、個体589人分のパネルに由来するゲノムDNAをPCRにより増幅した。このパネルには白人の個体225人分(親族でない健常な白人の個体を含むCoriell Human Variation Panel由来の98人分および血液試料を商業的に入手した個体127人分)、アフリカ系アメリカ人(Coriell Human Variation Panel)の個体96人分、メキシコ系の個体(各人にはメキシコで生まれた3人または4人の祖父母がいる、親族でない個体を含むロサンゼルス・メキシコ系アメリカ人社会のCoriell Human Variationパネル) 96人分、日本人の個体(日本・東京の個体を含むInternational Hapmap Projectコレクション) 88人、ならびに中国人の個体(中国・北京の中国人漢族の個体を含むInternational Hapmap Projectコレクション) 84人分が含まれた。全ての単位複製配列について両方向で複数回の直接的な配列決定を試みた。配列をアセンブルかつ整列し、遺伝子型を記録し、自動化ポリフレッド・ポリスキャン配列決定解析パイプラインによりパネル中の各人についてSNPを特定した。高いヘテロ接合性頻度のSNPに対する遺伝子型の指定は、CONSED内の配列クロマトグラムの手動検査により手作業で確認した。配列決定データに基づいた遺伝子型の指定に関するさらなる信頼の指標として、実施例4に記述するように、表1A中のSEQ ID NO: 64に対応するSNPについて独立した制限酵素に基づく遺伝子型特定アッセイ法をデザインした。遺伝子型の指定を、配列決定データに基づくものと比較した。白人パネル由来の個体70人分の遺伝子型を両方の方法によって特定した。これらの独立した二通りの方法(配列決定および制限酵素消化に基づくアッセイ法)に基づく遺伝子型の指定の一致は、100%であった。

## 【 0 1 2 3 】

表2Aおよび2Bは単一ヌクレオチド配列変種および本出願に記述の本研究において発見された新規SNPの周囲のヌクレオチド配列のゲノムコーディネート(NCBI build 36)を記載している。配列決定された全個体のパネルでの、ならびにアフリカ系アメリカ人、白人、中国人、日本人およびメキシコ人の個体での選択のSNP(新規のSNPも以前に特定されたSNPもともに含む)について認めたヘテロ接合性の頻度を表3に記載する。新規のSNPの特定は、本出願において記述される新規のSNPがIGF2のLOIの検出向上に有用でありうることを意味する。例えば、アフリカ系アメリカ人のパネルの個体間で認めたSEQ ID 10のヘテロ接合性の頻度は、17.33%である。

## 【 0 1 2 4 】

本研究では、異なる人種群の間での新規のSNPと以前に特定されたSNPの両方の示差的なヘテロ接合性の頻度について実証する。中国人、日本人、アフリカ系アメリカ人、白人、およびメキシコ人の同齡集団内の個体の少なくとも2%においてヘテロ接合性と遺伝子型を特定されたSNPを、それぞれ、表4~8に記載している。その結果、IGF2のLOIをモニタリングするのに最適なSNPまたはSNPの組み合わせは、人種群で異なる可能性がある。

## 【 0 1 2 5 】

実施例2. IGF2遺伝子のLOIの検出向上のための新規のSNPのいずれか一つの使用

上記のように、IGF2遺伝子のLOIの検出は、所与の個体由来の生体試料から単離された二コピーのIGF2遺伝子の各々に由来する発現量の独立的な比較に基づく。IGF2遺伝子は、通常、母性的にインプリントされ(すなわち、個体の母親から受け継がれたコピーは、通常、転写的に抑制され)、その一方で、父性的に受け継がれた遺伝子コピーは、通常、発現される。IGF2の母方のインプリントが緩められるとLOIが起こり、父性的におよび母性的に受け継がれた遺伝子コピーの両方の発現レベルが類似になる。試料におけるIGF2のインプリンティング状態を測定する一つの方法は、生体試料からゲノムDNAを最初に単離し、次いでIGF2遺伝子の転写領域における一つまたは複数の多型部位の遺伝子型を判定することである。第二に、IGF2の対立遺伝子特異的な発現を次いで、同じ生体試料から抽出されたRNAにおいて一種または複数種のヘテロ接合性ヌクレオチドを利用することにより測定する。二コピーのIGF2遺伝子の各々に由来する発現を、定量的であり、かつ試料中の一種または複数種のヘテロ接合性のSNPの二種の対立遺伝子を十分に識別できるアッセイ法で独立に測定することができる。第三に、一方の対立遺伝子由来の発現量の、他方の対立遺伝子の発現量に対する比率をコンピュータで計算し、閾値と比較し、それによって試料におけるIGF2遺伝子のインプリンティング状態を判定する。

#### 【0126】

IGF2のLOIをモニタリングするための本出願において報告の新規のSNPのいずれかの一種または複数種の有用性の一例として、特定の意図した手法の一つをここで記述する。SNPの検出および定量化のための複数の手法が存在しており、これらのいずれも、特定のSNPに対する生体試料由来ゲノムDNAの遺伝子型の特定と、生体試料の発現mRNAにおいて存在する各配列変種の相対レベルの定量化の両方に利用できることは、当業者には明らかである。基本戦略を図2に概説する。これには、個体に由来する生体試料(例えば、末梢血、末梢血単核細胞、結腸粘膜試料、大便試料など)からゲノムDNAとトータルRNAまたはポリアダニル化RNAの両方を単離することが伴われる。次いで、ゲノムDNA試料を、一種または複数種のSNPの対立遺伝子を検出するアッセイ法で遺伝子型特定する。この段階では、もしあるなら、どのSNPを、適合するRNA試料でのIGF2遺伝子の対立遺伝子特異的な発現の分析に利用できるかを判定する。アッセイにより評価した全てのSNPについて個体がホモ接合性であるなら、個体は、それらのSNPについて情報価値がなく、IGF2のLOIについて測定することができない。一種または複数種のSNPについて個体がヘテロ接合性である(情報価値がある)なら、標準的な逆転写酵素/PCR (RT-PCR)法を用いてIGF2転写産物の関連領域からcDNAを増幅する。二コピーのIGF2遺伝子の各々に由来する発現を、定量的であり、かつ二種の対立遺伝子を十分に識別できるアッセイ法で、生成されたcDNAを用いて独立に測定する。一方の対立遺伝子の発現量の、他方の対立遺伝子の発現量に対する比率のコンピュータ計算、およびこの比率と閾値との比較により、IGF2遺伝子のインプリンティング状態を判定する。所与の試料に複数のヘテロ接合性のSNPが存在していれば、各々のSNPを識別するアッセイ法を同時に用いることができる。これによって試料内での対立遺伝子特異的な発現の重複測定が可能になり、これらの測定結果の比較を用いて、LOIの判定精度を判定することができる。閾値の範囲を用いることができるが、典型的には、定量化した豊富ではない方の対立遺伝子の割合が、定量化した豊富な方の対立遺伝子の割合の33.3%を超えるか、またはそれに等しい場合に、試料はIGF2のLOIを示すと一般的に判定される。

#### 【0127】

所与のSNPについて個体の遺伝子型を特定するための一つの方法は、IGF2遺伝子の配列に相補的であり、かつ、鋳型の多型ヌクレオチドの一塩基3'側のIGF2鋳型ヌクレオチドに相補的である3'末端のヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドプライマーをデザインすることにより達成される(例えば図7参照)。アッセイ法は表1A、1B、1C、2Aおよび2Bに記載のSNPのいずれかの一種または複数種の遺伝子型を特定するようにデザインすることができる。オリゴヌクレオチドプライマーを、異なる蛍光成分でそれぞれタグ付けされた全ddNTP (ddATP、ddCTP、ddGTP、ddTTP (またはddUTP))を含む混合物中でゲノムDNA試料からPCR増幅されたDNA産物と混ぜ合わせ、ハイブリダイズする。例えば、G/A多型の遺伝子型を特定したい(およびG/AヌクレオチドがゲノムDNA試料の鋳型鎖にある)なら、相補的な



鋳型とハイブリダイズし、3'末端のヌクレオチドが鋳型のG/A位置の一塩基3'側の相補的な鋳型ヌクレオチドとハイブリダイズしているようにオリゴヌクレオチドプライマーをデザインする。一ヌクレオチドのプライマー伸長は、ddCTPの取り込み(G対立遺伝子を表す)によりまたはddTTPの取り込み(A対立遺伝子を表す)により伸長するオリゴヌクレオチドがその3'末端で示差的に蛍光標識されるような、示差的に蛍光標識されたddNTPの存在下においてDNAポリメラーゼにより触媒される。次いで、伸長されたオリゴヌクレオチドをキャピラリー電気泳動によって分離し、第5の蛍光色素で標識されたサイズ標準物質の存在下において分析する。特異的な一ヌクレオチドのプライマー伸長産物に相当するピークを検出し定量化して、所与のDNA試料に対する遺伝子型を判定する。異なる多型部位のすぐ3'側で終結するようにデザインされた異なる長さのオリゴヌクレオチドと多重化することにより、一回の反応で複数のSNP遺伝子型を特定することができる。異なる遺伝子型は、i) 異なる長さの伸長されたヌクレオチドの分離およびii) 一ヌクレオチドの伸長の間に組み込まれた、特異的な蛍光でタグ付けされているddNTPに基づいて得られる。

#### 【0128】

IGF2のインプリンティング状態を判定するための一つの方法では、特定のSNPの異なる対立遺伝子を識別するようにデザインされた類似の一塩基プライマー伸長法を伴う。表1および2に記載したSNPのいずれかの一種または複数種を利用するようにアッセイ法をデザインすることができる。所与のSNPがゲノムDNA試料においてヘテロ接合性であると判定されれば、ランダムヘキサマーもしくはデカマープライマー、mRNAのポリA尾部に相補的なオリゴdTプライマーまたはIGF2転写産物の特定領域に相補的なプライマーを用いて逆転写酵素(RT)により適合するRNA試料から第一鎖cDNAを増幅する。SNP部位に隣接する配列に相補的なオリゴヌクレオチドプライマーを引き続き用いて、多型部位を含むcDNA産物をPCR増幅する。あるいは、ネスト化PCR法を用いて、cDNA産物を作製することもできる。あるいは、直鎖のインビトロでの転写によるcDNAからのaRNAの作製、続けてランダムヘキサマー(hexamer)もしくはデカマープライマーまたはIGF2転写産物特異的なプライマーによる2回目の逆転写反応およびその後のPCR増幅を含む手法を用いて、cDNA産物を作製することもできる。次いでこれらのRT-PCR産物を、上記と同じ一塩基プライマー伸長アッセイ法により多型部位の特異的な配列変種についてアッセイする。特異的な一ヌクレオチドのプライマー伸長産物に相当するピークを検出し定量化する。一方の対立遺伝子の他方の対立遺伝子に対する定量化された量の比率を判定する。豊富ではない方の対立遺伝子に相当するPCR産物の定量化された割合が、豊富な方の対立遺伝子に相当するPCR産物の定量化された割合の33.3%を超えるか、またはそれに等しいなら、LOIが検出される。上記のように、複数のヘテロ接合性のSNPを用いて、異なる多型部位のすぐ3'側で終結するようにデザインされた異なる長さのオリゴヌクレオチドと、または伸長されるプライマーに異なる標識ddNTPを組み込むオリゴヌクレオチドと多重化することにより、共通の反応でLOIを測定することができる。

#### 【0129】

実施例3. 連鎖解析から多数のSNP間で最小の連鎖不均衡が示唆される

本出願ではIGF2の第9エクソンにおける多数の新規SNPの発見について記述する。これらのデータから、個体589人分の高分解能ハプロタイプ解析が可能になった(発見用パネルの記述については実施例1を参照のこと)。遺伝子型のデータをHaploview (Broad Institute of MIT and Harvard University)により解析して、全解析域でのハプロタイプブロックの存在、または非存在を判定した。

#### 【0130】

図4は、個体パネルの全体においてIGF2第9エクソン領域にわたり分布しているSNPのハプロタイプ解析を示す。解析に含めたSNPは、遺伝子型を特定した個体内で少なくとも1%のヘテロ接合性の頻度を示した。

#### 【0131】

全個体(図4)で、第9エクソンの全体に分布している8種のSNP (SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 32

10

20

30

40

50

、SEQ ID NO: 102)を解析した。8種のSNPのサブセットにはSEQ ID 10を含めたが、これは、本研究に含まれる全ての新規SNPのうち、所与の同齡集団内で最も高いヘテロ接合性の頻度(アフリカ系アメリカ人の同齡集団におけるヘテロ接合性の頻度17.33%)を有していた。本研究では、既報のハプロタイプブロック内の(すなわち、図4に示したように「Gaunt ブロック2」内の) SNP間での最小の連鎖不均衡を実証した。例えば、歴史上起こった組み換えの強力な証拠を高頻度SNPのSEQ ID NO: 10とSEQ ID NO: 16との間で検出した(Haploviewの出力では白色の菱形で示した)。最小の連鎖不均衡は、既報のハプロタイプブロック内のSNPと第9エクソンの上流および下流領域(特徴未定域のブロック1およびブロック3)内のSNPとの間でも認められた。この一例はブロック3中のSEQ ID 102と最小の連鎖不均衡を記録した、ブロック2中の高頻度SNPのSEQ ID 10である。これらのSNP対のさらなる例としては、SEQ ID NO: 4とSEQ ID NO: 64; SEQ ID NO: 4とSEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 64とSEQ ID NO: 32; およびSEQ ID NO: 10とSEQ ID NO: 102が挙げられる。驚くべきことに、またこの領域のGauntのおよびHAPMAP連鎖解析の所見に反して、本発明者らは、強力な連鎖不均衡の証拠を見出せなかった。これらの所見から、この相対的に小さなゲノム配列領域内での予想外の組み換え頻度が示唆される。これらの所見は、この遺伝子座の場合、その先行技術の「連鎖ブロック」であると考えられていたものとともに配置している二つ以上の多型マーカーを検出するアッセイ法の使用により、試料のインプリンティング状態を判定するための検査の情報有益性が高まるという結論を支持するものである。定量化するマーカーのパネルは、既報のSNPと、本出願に記述の新規SNPとのSNPの組み合わせに基づくことができ、またこれらの所見は、本発明者らの研究の前に分かっていたことに反して、そのようなマーカーの組み合わせでは、検査できる集団の割合を劇的に高めることにより、IGF2のLOIをモニタリングする能力を向上させられることを実証するものである。

#### 【0132】

実施例4. IGF2のLOI状態を判定するためにSNPを用いることの実証

SEQ ID NO: 64に対応するSNP (rs680)は、二種の制限酵素Apa IおよびAva IIの標的認識配列の中にある。これらの二種の酵素は対立遺伝子特異的な形で切断を行う。Apa Iは「G」対立遺伝子が存在する場合に配列を認識かつ切断し、Ava IIは「A」対立遺伝子が存在する場合に配列を認識かつ切断する。選択した個体パネル内の遺伝子型を独立的に評価するため、各個体に由来するゲノムDNA試料からSEQ ID NO: 64の位置を含むPCR単位複製配列を増幅した。単位複製配列をApa IもしくはAva IIまたは両酵素の組み合わせを用いて消化した。Apa Iのみによる消化では、G対立遺伝子について個体がホモ接合性であることを示唆し、Ava IIのみによる消化では、A対立遺伝子について個体がホモ接合性であることを示唆し、両酵素による消化では、このSNPについて個体がヘテロ接合性であることを示唆する。SEQ ID NO: 64の各可能性のある遺伝子型に関するデータ出力の一例を図5に示す。上記のように、個体70人中70人で、消化に基づくアッセイ法によって判定した遺伝子型の呼出し(genotype call)は、DNA配列決定に基づく遺伝子型の呼出しにぴったり(100%)一致した。

#### 【0133】

検査している個体がSEQ ID NO: 64についてヘテロ接合性であれば、同じ基本的アッセイ戦略を利用してIGF2のLOIを検出することができる。一例を図6に示す。SEQ ID NO: 64についてヘテロ接合性の個体3人からトータルRNAを抽出した。2人の個体はIGF2についてLOIであることが以前に示され、3人目はIGF2の正常なインプリンティングを見せることが以前に示されていた。SEQ ID NO: 64を含む領域を各試料からRT-PCR増幅した。逆転写酵素を欠いた反応を並行して実施し、ゲノムDNAからの増幅がないことを確認した。次いでRT-PCR単位複製配列を上記のように、Apa IもしくはAva IIまたは両酵素の組み合わせを用いて消化した。消化された産物をAgilent Bioanalyzerにて分離し、切断されたおよび切断されなかった断片の濃度を測定した。Apa Iにより切断された断片の量は、「G」対立遺伝子から増幅されたcDNAの割合を表す。Ava IIにより切断された断片の量は、「A」対立遺伝子から増幅されたcDNAの割合を表す。それゆえ、Apa I切断断片のAva II切断断片に対する比率は、元のRNA試料における二種の対立遺伝子の発現の相対比率を示す。図6に示

されるように、試料2は「A」対立遺伝子を排他的に発現している。試料1および3は、両方の対立遺伝子を発現しており(すなわちIGF2のL0Iを示しており)、G:Aの比率、それぞれ、0.5および0.3を有する。上記のように、過去の研究では、IGF2のL0Iの定義として、豊富な方の対立遺伝子に対する豊富ではない方の対立遺伝子由来の発現の閾値33.3%を用いていた。

#### 【 0 1 3 4 】

IGF2のL0Iを検出するのに有用でありうる他のSNPは、制限酵素認識配列の中に入っていない。それゆえ、制限酵素消化を要しない対立遺伝子特異的な遺伝子発現アッセイ法を開発することにより、所与の個体におけるL0Iをモニタリングする能力は改善される。実証として、本発明者らは、SEQ ID NO: 64についてプライマー伸長に基づくアッセイ法を開発した。図7は、SEQ ID NO: 64の遺伝子型を特定するためのプライマー伸長アッセイ法の使用を図示している。遺伝子型を特定する個体から得られたゲノムDNAを用いて、関心対象のSNPを含む領域をPCR増幅する。精製したPCR産物に、遺伝子型を特定する多型ヌクレオチドの3'側1塩基の位置で鋳型ヌクレオチドに相補的な3'末端のヌクレオチドによりアニールするプライマーを加える。熱安定性DNAポリメラーゼおよび示差的に蛍光標識されたddNTPを用いて、一ヌクレオチドのプライマー伸長を行う。図7に図示した例では、dR110標識ddGTPまたはdR6G標識ddATPのどちらかがプライマーの3'末端に付加される。次いでこれらの標識されたポリヌクレオチドを分離し、取り込まれた可能性のある各ヌクレオチドを表すピーク面積を計算する(すなわちABI 3730 Gene AnalyzerをGene Mapperソフトウェアとともに用いる)。ピーク面積を比較して、そのSNP位置での個体の遺伝子型を判定する。

#### 【 0 1 3 5 】

制限酵素に基づくアッセイ法(図6)によりIGF2のL0Iについてアッセイした個体3人を、プライマー伸長アッセイ法(図8)によりSEQ ID NO: 64について遺伝子型特定した。SNPの両対立遺伝子に相当するピークを検出したところ、予想通り、個体3人がSEQ ID NO: 64についてヘテロ接合性であることが確認された。

#### 【 0 1 3 6 】

同じ個体3人でのIGF2の対立遺伝子特異的な発現を測定するため、各個体に由来するトータルRNA試料からSEQ ID NO: 64を含む領域をRT-PCR増幅した。逆転写酵素を欠いた反応を並行して実施し、ゲノムDNAからの増幅がないことを確認した。得られたcDNA産物を精製し、図7に図示するように解析した。可能性のある二種の対立遺伝子の各々に相当するピーク面積を計算した。色素強度の相違を補正するため、各対立遺伝子の所定の比率1:1(すなわち二種の対立遺伝子の各々についてホモ接合性である個体に由来するDNA単位複製配列の比率1:1)を用いて計算されたピーク面積の比較に基づきこれらの値を規準化した。得られたクロマトグラムおよび計算された対立遺伝子の比率を図9に示す。図6に示した結果に一致して、試料1および3はIGF2のL0Iを示すと判定され、試料2はIGF2の正常なインプリンティングを示すと判定された。IGF2の転写領域内の任意のSNPを利用する同種の一塩基プライマー伸長アッセイ法を用いて、IGF2の対立遺伝子特異的な発現をモニタリングすることができよう。

#### 【 0 1 3 7 】

IGF2の対立遺伝子特異的な発現を測定するためのさらなるSNPの使用を実証するため、さらに8種のSNP (SEQ ID NO: 1、10、21、56、83、85、102および111)に基づき一塩基プライマー伸長アッセイ法をデザインした。SEQ ID NO: 1、10および21に対応するSNPは新規のSNPである。9種のSNP (SEQ ID NO: 64を含む)の各々について、SNPの一方の対立遺伝子について一方がホモ接合性およびSNPの他方の対立遺伝子について他方がホモ接合性の二人の個体に由来するゲノムDNA試料からPCR産物を別々に増幅した。PCR産物を精製し定量化した。9種のSNPの各々について、2種のPCR産物(一方の対立遺伝子についてホモ接合性のDNA試料から増幅された一方のものおよび他方の対立遺伝子についてホモ接合性のDNA試料から増幅された他方のもの)を、対立遺伝子1の対立遺伝子2に対する以下の比率; 1:10、1:8、1:6、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、6:1、8:1および10:1で混合した。9

種のSNPの各々について、一塩基プライマー伸長アッセイ法を各希釈点に対し三つ組で実施した。可能性のある二種の対立遺伝子の各々に相当するピーク面積を計算した。色素強度の相違を補正するため、各対立遺伝子の所定の比率1:1を用いて計算されたピーク面積の比較に基づきこれらの値を規準化した。各アッセイの分析定量的な直線性を図10に示す。アッセイの平均 $R^2$ は $0.996 \pm 0.002$ であり、平均の傾きは $0.830 \pm 0.024$ である。

【 0 1 3 8 】

本明細書において記述する実施例および態様が例示的な目的のものでしかない、かつそれらに照らして種々の修正または変更が当業者に示唆されるはずであり、本出願の趣旨および範囲ならびに添付の特許請求の範囲のなかに含まれるものと理解されよう。本明細書において引用される全ての刊行物、特許および特許出願は、全ての目的についてその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

10

【 0 1 3 9 】

(表 1 A) IGF2第8および9エクソンにおける公知の多型



40

Seq. ID	ゲノム位置 *	dbSNP	対立遺伝子	ブロック	配列
76	2108682	rs11042767	[C/T]	3	ACAATTCTTGGGGGTCCCAGGAGA[C/T]GGGCAAAGATGATCCCTAGGTGTGC
77	2108628	rs7129583	[C/T]	3	AGTCCTCGGGGGCCGTGCACTGATG[C/T]GGGGAGTGTGGGAAGTCTGGCGGTT
78	2108395	rs28462050	[T/G]	3	GCATTTTTCCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTACCCCTCCTTAGCT
79	2108344	rs28472590	[-/GG]	3	TGCCCCCTGTACATGGGGGGGG[-/GG]TTTAATTGTGTTTCTGAGCGCATAA
80	2108288	rs58312807	[C/T]	3	GAGTCCTCGGGGGCCGTGCACCTGATG[C/T]GGGGAGTGTGGGAAAGTCTGGCGGTT
81	2107971	rs60649995	[G/A]	3	AGGCTGGCCGGAGGGGAAGGGCTA[G/A]CAGGTGTGTAACACAGAGGGTTCCAT
82	2107909	rs58562468	[A/G]	3	CAGGGTGCCGCCCTTCGGCACACTTG[A/G]GGAAACCTCCCTCCTCCCTCGGTGA
83	2107900	rs1065687	[C/G]	3	CGCCTTCGCACACACTTGAGGAACCT[C/G]CCCTCTCCCTCGGTGACATCTTGCC
84	2109167	rs3208122	[A/C]	2	TAAGCAACTACGATATCTGTATGGAT[A/C]AGGCCAAAGTCCCGCTAAAGATTCTC
85	2109117	rs3168310	[C/G]	2	CCAAATGTTTCATGGTCTGAGCCCC[C/G]CTCCTGTTCCTCATCTCCACTGCCCC
86	2108911	rs58527086	[-/T]	3	CATCGTGGCTCACGCTCGGGGGCCG[-/T]GGGGACAGGCGCCAAGGAGGCCAGC
87	2108682	rs57156844	[C/T]	3	ACAATTCTTGGGGGTCCCCAGGAGA[C/T]GGGCAAAGATGATCCCTAGGTGTGC
88	2108628	rs3802971	[C/T]	3	AGTCCTCGGGGGCCGTGCACTGATG[C/T]GGGGAGTGTGGGAAGTCTGGCGGTT
89	2108395	rs3180700	[T/G]	3	GCATTTTTCCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTACCCCTCCTTAGCT
90	2108344	rs57423851	[-/GG]	3	TGCCCCCTGTACATGGGGGGGG[-/GG]TTTAATTGTGTTTCTGAGCGCATAA
91	2108288	rs35818489	[C/T]	3	GAGTCCTCGGGGGCCGTGCACTGATG[C/T]GGGGAGTGTGGGAAAGTCTGGCGGTT
92	2107971	rs11825733	[G/A]	3	AGGCTGGCCGGAGGGGAAGGGCTA[G/A]CAGGTGTGTAACACAGAGGGTTCCAT
93	2107909	rs11541377	[A/G]	3	CAGGGTGGCCGCCCTTCGCACACTTG[A/G]GGAACCTCCCTCCTCCCTCGGTGA
94	2107900	rs11541375	[C/G]	3	CGCCTTCGCACACACTTGAGGAACCT[C/G]CCCTCTCCCTCGGTGACATCTTGCC
95	2107862	rs11541373	[C/T]	3	GGTGACATCTTGCCCGCCCTCAGCA[C/T]CCTGCCTTGCTCCAGGAGGTCCGA
96	2107847	rs11541372	[A/C]	3	CCCTCAGCACCCCTGCCTTGCTCTCC[A/C]GGAGGTCCGAAGCTCTGTGGGACCT
97	2107755	rs11541374	[G/T]	3	CAGGGGGTCTGAGCCACAGAGCAG[G/T]AGAGCTGCCAGGTCTGCCCATCGAC
98	2107602	rs3189464	[A/C]	3	CCTCGCCCCCACTTGTGCCCCCAGCT[A/C]AGCCCCCTTGCA CGCAGCCCCACTA
99	2107472	rs61745040	[C/T]	3	CAGTCGAGAGGGTCCCTCGGCAAG[C/T]GCCCTGTGAGTGGGCCATTCCGGAAC
100	2107471	rs11564732	[G/A/T]	3	AGTCGCAGAGGCTCCCTCGGCAAGC[G/A/T]CCCTGTGAGTGGGCCATTCCGGAACA

50

【 0 1 4 1 】

(表 1 C) IGF2第9エクソンにおける公知の多型

Seq. ID	ゲノム位置*	dbSNP	対立遺伝子	ブロック	配列
101	2107452	rs11541376	[C/T]	3	GCAAGCGCCCTGTGAGTGGGCCATT[C/T]GGAACAATTGGACAGAGCCCAAGA
102	2107273	rs7873	[A/G]	3	GTGTTCCCGGGGACACTTGGCCGACC[A/G]GCCCCCTTGGCTCCCCAGGTTTGCAG
103	2107263	rs61745039	[G/A/T]	3	GGGCACTTGCCGACCAAGCCCTTGC[G/A/T]TCCCCAGGTTTGCAGCTCTCCCTG
104	2107147	rs3177805	[C/T]	3	TTGTCTCTCCCGGTGTCCTTGC[A/T]TTCAGTGGGGGCCCCCTCTTGGGT
105	2107135	rs1065715	[C/G]	3	CGTGCCCCAATGTCTTCAAGTGGGG[G/C]CCCCCTCTTGGGTCCCCCTCTCTGC
106	2107134	rs11541371	[C/G]	3	TGTCCCCAATGTCTTCAAGTGGGG[G/C]CCCCCTCTTGGGTCCCCCTCTCTGCC
107	2107128	rs1049926	[C/T]	3	CCAATGTCTTCAAGTGGGGCCCCCT[C/T]TTGGGTCCCCCTCTCTGCCATCACC
108	2107113	rs3177946	[C/T]	3	GGGGCCCCCTCTTGGGTCCCCCTCT[C/T]TGCCATCACCTGAAGACCCCCACGC
109	2107049	rs1050035	[A/C]	3	GTCACTGTGCTGCCCTGCCCTCGGTCC[A/C]CTTGGGGCCCGTGTGACTCAAC
110	2107027	rs11541370	[A/G]	3	AATATTAGCGTTAAAGGAGCTGAGTT[A/G]AGTCAAAACACGGGGCCGCAAGGTGGA
111	2107020	rs2585	[G/A/C/T]	3	TGCGGCCCGTGTGTTGACTCAACTCA[G/A/C/T]CTCCTTTAAAGGCTAATATTCCGGC
112	2106955	rs1050141	[C/A]	3	GGGTTTGTCTTTAACCTTGTAACG[C/A]TGCAATCCCAATAAAGCATTAAAA

10

20

30

40

50

(表 2 A) IGF2第9エクソンにおける新規の多型

Seq. ID	ゲノム位置*	対立遺伝子	ブロック	配列
1	2110869	[G/A]	1	GCGTTCAGGGAGGCCAAACGTCAACC[G/A]TCCCTGATTGCTCTACCCACCCAA
2	2110827	[G/A]	1	CCCACCCAAAGACCCCGCCACGGGG[G/A]CGCCCCCCCAGAGATGGCCAGCAAT
3	2110825	[G/A]	1	CACCCAAAGACCCCGCCACGGGGG[G/A]CCCCCCCAGAGATGGCCAGCAATCG
4	2110781	[G/A]	1	GCAATCGGAAGTGAGCAAAACTGCC[G/A]CAAGTCTGCAGCCCGGCCACCAT
5	2110657	[G/A]	1	TGGGGCTTCTCTGTACCCAGTCCCG[G/A]TGCCCCGCTCCCCGAAACAGGCTA
6	2110465	[C/T]	1	TTAAACTAACCCCTTCCCCCCCC[C/T]CACAAACAACCCCTCTTAAAACTAATT
7	2110430	[G/A/T]	1	CCTCTTAAACTAAATTGGCTTTTA[G/A/T]AAACACCCACAAAGCTCAGAAAT
8	2110287	[C/G]	1	AAGGAATTGGCACTCCCCACCCC[C/G/TCTTCTCTCTCTCCCTTGGACTTG
9	2110197	[C/T]	2	GAGAAAAGAAGGACCCAGAAATCA[C/T]AGTGGGACGTGGCTGTACCCGCTC
10	2110187	[C/T]	2	GGACCCAGAAATCACAGGTGGCA[C/T]GTCGCTGTACCCGCCATCTCCCTTC
11	2110129	[G/A]	2	AATTTTCAGGGTAAACTGGCCATCC[G/A]AAATAGCAACAACCCAGACTGGCT
12	2110109	[C/T]	2	CATCCGAAAATAGCAACAACCCAGA[C/T]TGCTCTCTCACTCCCTTTCCATCA
13	2110063	[A/C]	2	CATCACTAAAATCACAGAGCAGT[C/A/C]GAGGGACCCAGTAAGACCAAGGAG
14	2110060	[G/C]	2	CACTAAAAATCACAGAGCAGTCAAG[G/C]GGACCCAGTAAGACCAAGGAGGGG
15	2110058	[G/T/A]	2	CTAAAAATCACAGAGCAGTCAAGG[G/T/A]ACCCAGTAAGACCAAGGAGGGAG
16	2109220	[A/C]	2	GGCACACACACGCACACCCCCACA[A/C]AATTGGATGAAACAATAAGCATAT
17	2109153	[G/A]	2	TCGTATGGATCAGGCCAAAGTCCC[G/A]CTAAGATTCTCCAATGTTTTCATGG
18	2109095	[C/T]	3	CCCGTCTCTGTCCCATCTCCACTG[C/T]CCCTCGGCCCTGTCTGTGCCCTGCC
19	2109074	[C/G]	3	ACTGCCCTCGGCCCTGTCTGTGCC[C/G]TGCTCTCAAGAGGAGGGGCTCAGA
20	2108843	[T/C]	3	CATTCCGATACACCTTACTTACTGT[C/G]GTGTGGCCAGCCAGAGTGAGGAA
21	2108835	[C/T]	3	ATACACCTTACTTACTGTGTGTGG[C/T]CCAGCCAGAGTGAGGAAGGAGTTG
22	2108806	[A/C/T]	3	GCCAGAGTGAGGAAGGAGTTTGGCC[A/C/T]CATTGGAGATGGCGGTAGCTGAGCA
23	2108738	[G/A/T]	3	AGCTGACTCCCTGGTGTGCTCCTG[G/A/T]AAGGAAGAATCTTGGGACCCCCCA
24	2108440	[C/T/G]	3	CAAATTTCATGTCAATTGATCTATT[C/T/G]CCCCCTCTTGTCTTGGGCAATT
25	2108424	[T/G]	3	TGATCTATTCCCTCTTGTGTCTTGTGTCT[T/G]GGGCAATTTTCTTTTTTTTT
26	2108417	[T/G]	3	TTCCCCCTCTTGTGTCTTGGGCA[T/G]TTTCTTTTTTTTTTTTTTTTGT
27	2108326	[G/A]	3	AATTAAACCCCCCCCCATGTAACA[G/A]GGGGGCAGTGACAAAAGCAAGAACG
28	2107988	[C/T/A]	3	GGCTCTGGCTGGCTGAGGCTGGC[C/T/A]GGAGGGGAAGGGGCTAGCAGGTGTG
29	2107918	[G/C/A]	3	GGCTGGGCGAGGTGGCCCTTCC[G/C/A]CACACTTGAGGAACCTCCCTCTC

【 0 1 4 3 】



(表 2 B) IGF2第9エクソンにおける新規の多型

Seq. ID	ゲノム 位置*	対立遺伝子	ブロック	配列
30	2107819	[T/G]	3	AGGTCCGAAGCTCTGTGGACCTCT[T/G]GGGGGCAAGGTGGGGTGAGCCGGG
31	2107776	[G/A]	3	AGCCGGGAGTAGGAGGTCAAGC[G/A]GGTCTGAGCCACAGAGCAGGAGAG
32	2107668	[G/A]	3	ATGCCATAGCAGCACACCGCGGC[G/A]CCTAGGGCTGCGGCAGGACTCGGC
33	2107664	[A/T]	3	CATAGCAGCACACCGCGCGCCT[A/T]GGGTGCGGCAGGACTCGGCCTCT
34	2107625	[C/T]	3	GACTCGGCCTCTGGGAGGTTACCT[C/T]GCCCCACCTTGTCGCCCCAGCTCAG
35	2107595	[C/G]	3	CCACTTGTGCCCCCAGCTCAGCCCC[C/G]CTGCACGACGCCCGACTAGCAGTCT
36	2107523	[C/T]	3	CCTGGTGACGGGCTGGCATGACCC[C/T]GGGGTCTGTCATGCCAGTCCGCCT
37	2107478	[G/A]	3	CCGCCTCAGTCGCAGAGGGTCCCTC[G/A]GCAAGCGCCCTGTGAGTGGGCCATT
38	2107472	[C/T]	3	CAGTCGCAGAGGTCCCTCGGCAAG[C/T]GCCCTGTGAGTGGGCCATTGGGAAC
39	2107469	[C/T]	3	TCGCAGAGGTTCCCTCGGCAAGCGC[C/T]CTGTGAGTGGGCCATTTCGGAACATT
40	2107379	[C/T]	3	ACCCACATTGGCCTGAGATCCAAA[C/T]GCTTCGAGGCACCCCAAATTACCTG
41	2107353	[C/G]	3	GCTTCGAGGCACCCCAAATTACCTG[C/G]CCATTGTCAGGACACCCACCCACC
42	2107278	[C/T]	3	AGTGGGTGTTCCCGGGGCACTTGC[C/T]GACCAAGCCCTTGGTCCCCAGGTT
43	2107263	[G/A]	3	GGGCACTTGCCGACCAAGCCCTTGC[G/A]TCCCCAGGTTTGCAGCTCTCCCCCTG
44	2107151	[A/G]	3	ATCTTGCTCTCCCTCCCGTGTCCCA[A/G]TGCTTTCAGTGGGGGCCCTCTT
45	2107054	[G/A]	3	GAATGTCACCTGTGCCTGCCGCTC[G/A]GTCCACCTTGGGGCCCGTGTGTGAC
46	2107037	[G/A]	3	GCCGCCCTCGGTCCACCTTGGGGGCC[G/A]TGTTTGACTCAACTCAACTCCTTTA
47	2106956	[G/A/C]	3	TGGGTTTGTCTTTAACCTTGTAAC[G/A/C]CTTGCAATCCCAATAAGCATTA

\* NCBI Build 36, Chr:11に対するコ-ディネ-ート

【 0 1 4 4 】

(表 3) ヒト集団において認められた転写IGF2 SNPのヘテロ接合性

10

20

30

40

SEQ ID NO:	ゲノム位置	ブロック	全 ObsHET	AA ObsHET	CAU ObsHET	CHI ObsHET	JAP ObsHET	MEX ObsHET
1	2110869	1	1.08% (6 / 553)	3.3% (3 / 91)	1% (2 / 201)	0% (0 / 84)	0% (0 / 90)	1.15% (1 / 87)
4	2110781	1	0.95% (4 / 421)	2.9% (2 / 69)	0% (0 / 155)	0% (0 / 61)	2.86% (2 / 70)	0% (0 / 66)
56	2110764	1	1.45% (1 / 69)	6.25% (1 / 16)	0% (0 / 35)	0% (0 / 8)	0% (0 / 2)	0% (0 / 8)
6	2110465	1	3.38% (7 / 207)	11.48% (7 / 61)	0% (0 / 51)	0% (0 / 21)	0% (0 / 29)	0% (0 / 45)
7	2110430	1	1.23% (1 / 81)	16.67% (1 / 6)	0% (0 / 54)	0% (0 / 8)	0% (0 / 7)	0% (0 / 6)
64	2110210	2	54.46% (110 / 202)	13.89% (5 / 36)	63.08% (41 / 65)	70.83% (17 / 24)	64.1% (25 / 39)	57.89% (22 / 38)
10	2110187	2	2.82% (15 / 531)	17.33% (13 / 75)	1% (2 / 201)	0% (0 / 80)	0% (0 / 89)	0% (0 / 86)
16	2109220	2	1.57% (9 / 572)	9.88% (8 / 81)	0% (0 / 214)	0% (0 / 90)	0% (0 / 91)	1.04% (1 / 96)
83	2109215	2	3.28% (19 / 579)	0% (0 / 94)	8.13% (17 / 209)	0% (0 / 90)	0% (0 / 91)	2.11% (2 / 95)
85	2109117	2	38.59% (137 / 355)	27.27% (18 / 66)	40.16% (49 / 122)	40.74% (22 / 54)	53.85% (35 / 65)	27.08% (13 / 48)
20	2108843	3	0.35% (2 / 566)	2.3% (2 / 87)	0% (0 / 202)	0% (0 / 90)	0% (0 / 91)	0% (0 / 96)
21	2108835	3	4.07% (20 / 492)	1.43% (1 / 70)	9.94% (18 / 181)	0% (0 / 79)	0% (0 / 81)	1.23% (1 / 81)
87	2108682	3	1.89% (5 / 265)	14.29% (4 / 28)	1.01% (1 / 99)	0% (0 / 41)	0% (0 / 52)	0% (0 / 45)
88	2108628	3	7.57% (14 / 185)	3.13% (1 / 32)	4.88% (2 / 41)	12.2% (5 / 41)	20% (5 / 25)	2.17% (1 / 46)
25	2108424	3	0.35% (1 / 288)	2.17% (1 / 46)	0% (0 / 89)	0% (0 / 67)	0% (0 / 57)	0% (0 / 29)
26	2108417	3	3.38% (9 / 266)	7.32% (3 / 41)	6.74% (6 / 89)	0% (0 / 44)	0% (0 / 56)	0% (0 / 36)
92	2107971	3	2.8% (15 / 536)	16.3% (15 / 92)	0% (0 / 185)	0% (0 / 79)	0% (0 / 87)	0% (0 / 93)
32	2107668	3	2.35% (12 / 511)	0% (0 / 94)	0.7% (1 / 142)	10.23% (9 / 88)	2.2% (2 / 91)	0% (0 / 96)
100	2107471	3	4.66% (26 / 558)	1.05% (1 / 95)	1.97% (4 / 203)	1.16% (1 / 86)	5.75% (5 / 87)	17.24% (15 / 87)
102	2107273	3	6.41% (32 / 499)	14.81% (8 / 54)	9.34% (17 / 182)	0% (0 / 86)	0% (0 / 85)	7.61% (7 / 92)
111	2107020	3	50.19% (135 / 269)	23.08% (3 / 13)	49.58% (59 / 119)	50% (24 / 48)	53.85% (21 / 39)	56% (28 / 50)
47	2106956	3	0.33% (1 / 304)	0% (0 / 70)	0% (0 / 115)	0% (0 / 43)	0% (0 / 42)	2.94% (1 / 34)

\* NCBI Build 36, Chr:11に対するコ-ディネ-ート

10

20

30

40

50

## 【 0 1 4 5 】

(表 4) 中国人において情報価値のある SNP

<i>SEQ</i>			
<i>ID NO:</i>	ゲノム位置	ブロック	<i>Obs Het</i>
64	2110210	2	70.83% (17 / 24)
85	2109117	2	40.74% (22 / 54)
88	2108628	3	12.2% (5 / 41)
32	2107668	3	10.23% (9 / 88)
111	2107020	3	50% (24 / 48)

## 【 0 1 4 6 】

(表 5) 日本人において情報価値のある SNP

10

<i>SEQ ID</i>			
<i>NO:</i>	ゲノム位置	ブロック	<i>Obs Het</i>
4	2110781	1	2.86% (2 / 70)
64	2110210	2	64.1% (25 / 39)
85	2109117	2	53.85% (35 / 65)
88	2108628	3	20% (5 / 25)
32	2107668	3	2.2% (2 / 91)
100	2107471	3	5.75% (5 / 87)
111	2107020	3	53.85% (21 / 39)

## 【 0 1 4 7 】

(表 6) アフリカ系アメリカ人において情報価値のある SNP

20

<i>SEQ</i>			
<i>ID NO:</i>	ゲノム位置	ブロック	<i>Obs Het</i>
1	2110869	1	3.3% (3 / 91)
4	2110781	1	2.9% (2 / 69)
56	2110764	1	6.25% (1 / 16)
6	2110465	1	11.48% (7 / 61)
7	2110430	1	16.67% (1 / 6)
64	2110210	2	13.89% (5 / 36)
10	2110187	2	17.33% (13 / 75)
16	2109220	2	9.88% (8 / 81)
85	2109117	2	27.27% (18 / 66)
20	2108843	3	2.3% (2 / 87)
87	2108682	3	14.29% (4 / 28)
88	2108628	3	3.13% (1 / 32)
25	2108424	3	2.17% (1 / 46)
26	2108417	3	7.32% (3 / 41)
92	2107971	3	16.3% (15 / 92)
102	2107273	3	14.81% (8 / 54)
111	2107020	3	23.08% (3 / 13)

30

## 【 0 1 4 8 】

(表 7) 白人において情報価値のある SNP

<i>SEQ</i>			
<i>ID NO:</i>	ゲノム位置	ブロック	<i>Obs Het</i>
64	2110210	2	63.08% (41 / 65)
83	2109215	2	8.13% (17 / 209)
85	2109117	2	40.16% (49 / 122)
21	2108835	3	9.94% (18 / 181)
88	2108628	3	4.88% (2 / 41)
26	2108417	3	6.74% (6 / 89)
100	2107471	3	1.97% (4 / 203)
102	2107273	3	9.34% (17 / 182)
111	2107020	3	49.58% (59 / 119)

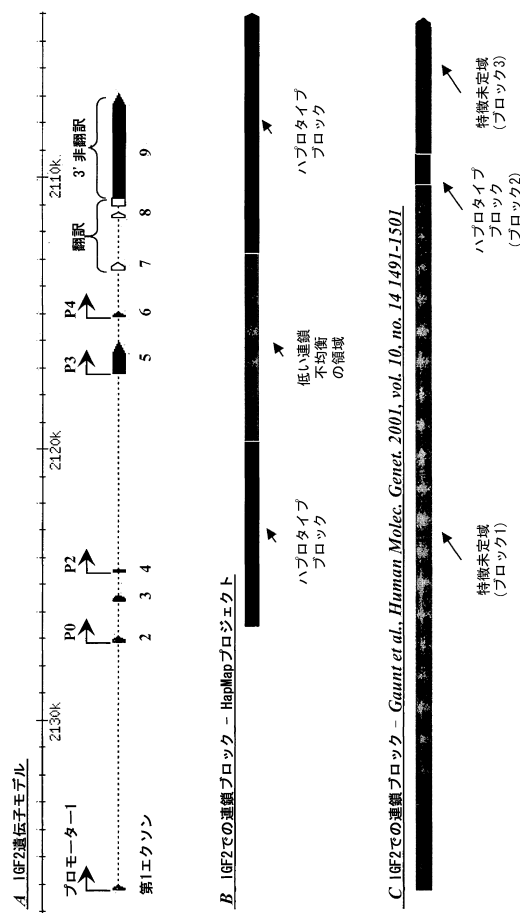
40

## 【 0 1 4 9 】

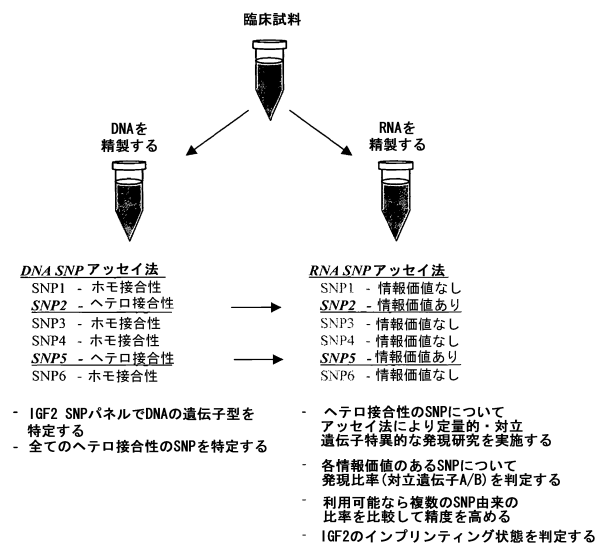
(表 8) メキシコ人において情報価値のある SNP

SEQ ID	ゲノム位置	ブロック	Obs Het
64	2110210	2	57.89% (22 / 38)
83	2109215	2	2.11% (2 / 95)
85	2109117	2	27.08% (13 / 48)
88	2108628	3	2.17% (1 / 46)
100	2107471	3	17.24% (15 / 87)
102	2107273	3	7.61% (7 / 92)
111	2107020	3	56% (28 / 50)
47	2106956	3	2.94% (1 / 34)

【図 1】

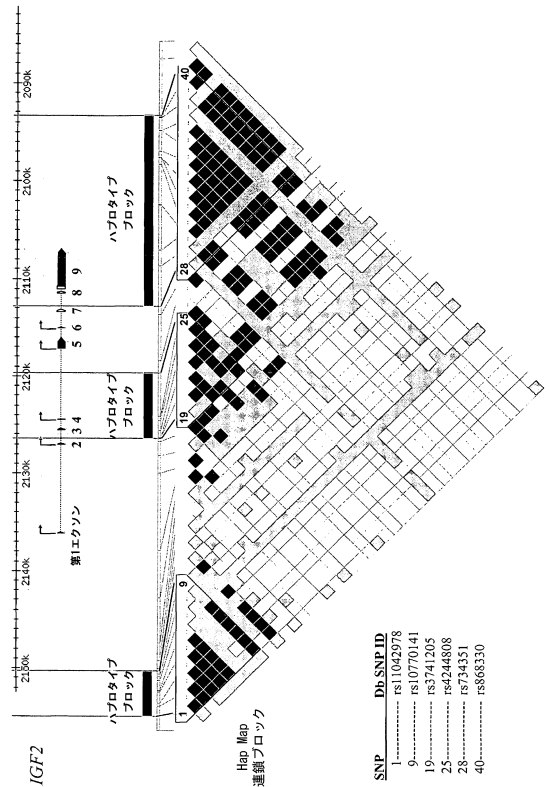


【図 2】



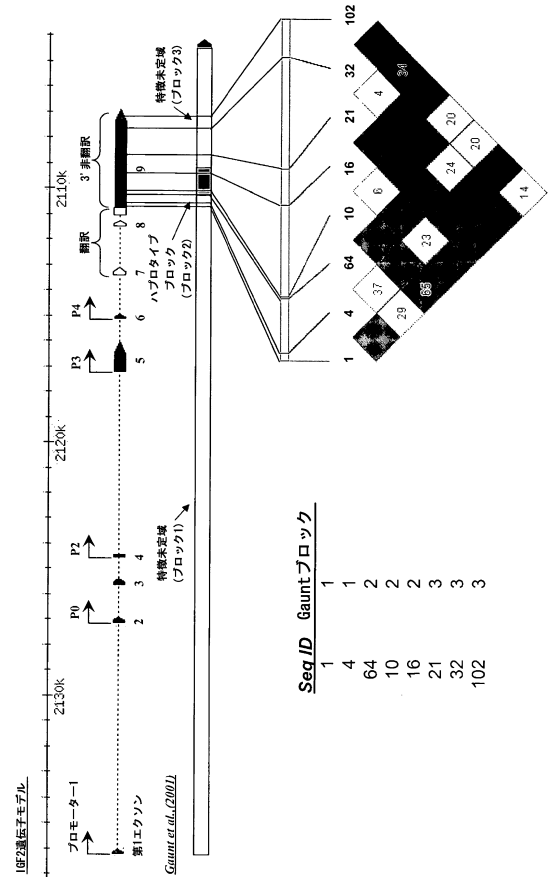
【図 3】

HapMap 11からの16F2での連鎖不均衡



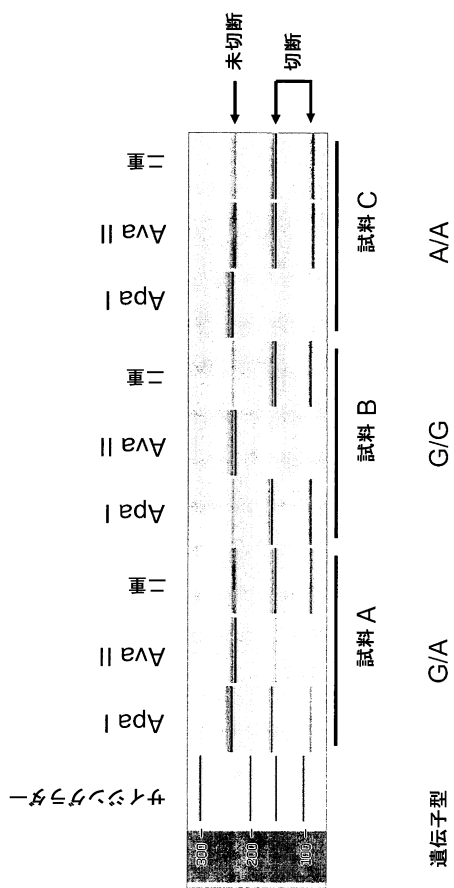
【図 4】

全体におけるSNPの連鎖不均衡



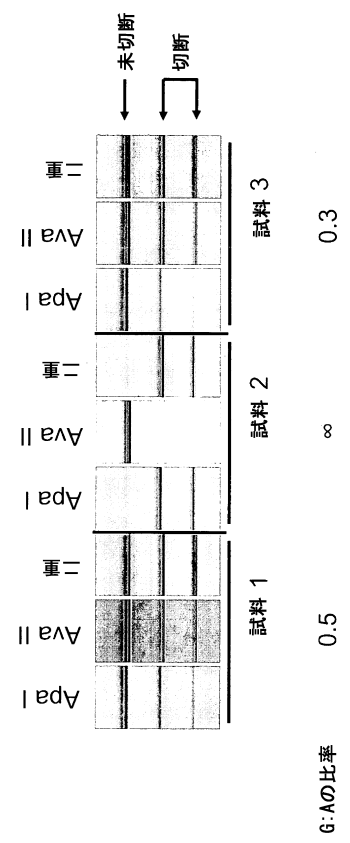
【図 5】

SEQ ID 64の遺伝子型を特定するための制限酵素に基づくアッセイ法の例



【図 6】

16F2のLOIを検出するための制限酵素に基づくアッセイ法の例





【配列表】

0005777340000001.app

## フロントページの続き

- (74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 オードウェイ ジャレド  
アメリカ合衆国 ミズーリ州 セントルイス キャッスルマン アベニュー 4 2 6 6
- (72)発明者 レイキ ネイサン  
アメリカ合衆国 ミズーリ州 チェスターフィールド ウィルソン リッジ レーン 2 0 4 0
- (72)発明者 マローニー レベッカ  
アメリカ合衆国 バージニア州 センタービル ラベンダー ミスト レーン 1 3 5 8 1
- (72)発明者 ロルフィン テレサ  
アメリカ合衆国 ミズーリ州 ウェブスター グローブス イースト グレンデール ロード 1  
1 2

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 J. Natl. Cancer Inst., (2004), 96, [5], p.407-410  
Nat. Med., (1998), 4, [11], p.1276-1280

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
C 1 2 Q 1 / 6 8  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
P u b M e d