

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-546504

(P2022-546504A)

(43)公表日 令和4年11月4日(2022.11.4)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68	Z N A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/6886(2018.01)	C 1 2 Q 1/6886	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全155頁)

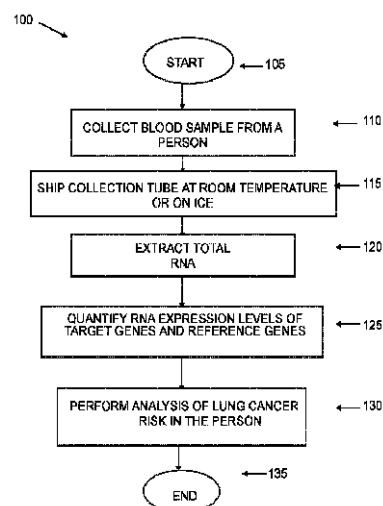
(21)出願番号 特願2022-513690(P2022-513690) (86)(22)出願日 令和2年8月27日(2020.8.27) (85)翻訳文提出日 令和4年4月28日(2022.4.28) (86)国際出願番号 PCT/US2020/048270 (87)国際公開番号 WO2021/041726 (87)国際公開日 令和3年3月4日(2021.3.4) (31)優先権主張番号 62/892,426 (32)優先日 令和1年8月27日(2019.8.27) (33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US) (81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,最終頁に続く	(71)出願人 518065773 エグザクト サイエンス コーポレーション アメリカ合衆国, 5 3 7 1 9 ウィスコンシン州, マディソン, エンデヴァーレーン 5 5 0 5 (71)出願人 513195570 マヨ ファウンデーション フォア メディカル エデュケーション アンド リサーチ Mayo Foundation for Medical Education and Research アメリカ合衆国, 5 5 9 0 5 ミネソタ州, ロチェスター, ファースト ストリ最終頁に続く
--	--

(54)【発明の名称】 肺新生物形成を有する疑いのある対象におけるメチル化されたDNA、RNA、及びタンパク質の特性決定

(57)【要約】

本明細書で提供されるのは、新生物形成の検出に関連する技術であり、特に、肺癌などの新生物の検出のための方法、組成物、及び関連する使用に関連する技術であるが、これらに限定されない。

FIG. 6



10

20

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象からサンプリングされた血液中の 1 つまたは複数の遺伝子発現産物の量を測定する方法であって、

a) 対象からサンプリングされた血液から、

i) S100A9、SELL、PADI4、APOBE3CA、S100A12、MMP9、FPR1、TYMP、及び SAT1 から選択されるマーカー遺伝子の発現の産物である、少なくとも 1 つの遺伝子発現マーカー、ならびに

ii) 少なくとも 1 つの参照マーカー

を抽出することと、

b) a) で抽出された前記少なくとも 1 つの遺伝子発現マーカーの量及び少なくとも 1 つの参照マーカーの量を測定することと、

c) 前記少なくとも 1 つの参照マーカーの前記量に対するパーセンテージとしての、前記少なくとも 1 つの遺伝子発現マーカーの前記量の値を算出することであって、前記値は、前記対象からサンプリングされた前記血液中の前記少なくとも 1 つの遺伝子発現マーカーの量を示す前記算出することと

を含む前記方法。

【請求項 2】

前記抽出することは、全血、白血球を含む血液製剤、及び血漿を含む血液製剤から選択されるサンプルからマーカーを抽出することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記少なくとも 1 つの遺伝子発現マーカーは、タンパク質または RNA を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記対象からサンプリングされた前記血液から抽出される RNA は、循環セルフリー RNA を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記対象からサンプリングされた前記血液から抽出される RNA は、免疫細胞によって発現された RNA を含む、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記対象からサンプリングされた前記血液から抽出される RNA は、mRNA を含む、請求項 3 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記少なくとも 1 つの遺伝子発現マーカーは、2、3、4、5、6、7、8、または 9 つの遺伝子発現マーカーからなる、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記少なくとも 1 つの参照マーカーは、PLGLB2、GABARAP、NACA、EIF1、UBB、UBC、CD81、TMBIM6、MYL12B、HSP90B1、CLDN18、RAMP2、MFAP4、FABP4、MARCO、RGL1、ZBTB16、C10orf116、GRK5、AGER、SCGB1A1、HBB、TCF21、GMFG、HYAL1、TEK、GNG11、ADH1A、TGFB3、INPP1、ADH1B、STK4、ACTB、HNRNPA1、CASC3、及び SKP1 から選択される遺伝子から発現される RNA またはタンパク質を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 つの参照マーカーは RNA を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記少なくとも 1 つの参照マーカーは、U1 snRNA 及び U6 snRNA から選択される RNA を含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記少なくとも1つの遺伝子発現マーカーの量を測定することは、逆転写、ポリメラーゼ連鎖反応、核酸シーケンシング、質量分析、質量ベースの分離、及び標的捕捉、定量的パイロシーケンシング、フラップエンドヌクレアーゼアッセイ、PCRフラップアッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）検出、ならびにタンパク質免疫沈降のうちの1つまたは複数を使用することを含む、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

前記測定は、マルチプレックス増幅を含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

請求項1～12のいずれか1項に記載の方法であって、

d) 前記対象からサンプリングされた血液から、少なくとも1つのメチル化マーカーDNA及び少なくとも1つの参照マーカーDNAを抽出することと、

e) 少なくとも1つのメチル化マーカーDNAの量を測定することであって、前記少なくとも1つのメチル化マーカーDNAは、EMX1、GRIND2、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329のうちの少なくとも1つに関連するヌクレオチド配列を含む前記測定することと、

f) 少なくとも1つの参照マーカーDNAの量を測定することと、

g) 前記参照マーカーDNAの前記量に対するパーセンテージとしての、前記少なくとも1つのメチル化マーカーDNAの前記量の値を算出することであって、前記値は、対象からサンプリングされた前記血液中の前記少なくとも1つのメチル化マーカーDNAの量を示す前記算出することと

をさらに含む前記方法。

【請求項14】

前記少なくとも1つのメチル化マーカーDNAは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個のメチル化マーカーDNAからなる、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記対象からサンプリングされた前記血液から抽出されるDNAは、循環セルフリーDNAを含む、請求項13または請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記少なくとも1つの参照マーカーDNAは、B3GALT6 DNA及びβ-アクチンDNAから選択される、請求項13～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

前記少なくとも1つのメチル化マーカーDNAは、BARX1、FLJ45983、HOPX、ZNF781、FAM59B、HOXA9、SOBP、及びIFFO1のうちの少なくとも1つに関連するヌクレオチド配列を含む、請求項13～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

前記少なくとも1つの遺伝子発現マーカーは、FPR1、PADI4、及びSELLか

10

20

30

40

50

ら選択されるマーカー遺伝子の発現の産物を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記メチル化マーカー DNA は、DNA のメチル化ステータスに特異的な様式で前記 DNA を選択的に修飾する試薬で処理される、請求項 13 ～ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

前記試薬は、バイサルファイト試薬、メチル化感受性制限酵素、またはメチル化依存性制限酵素を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記バイサルファイト試薬は、重亜硫酸アンモニウムを含む、請求項 20 に記載の方法

10

【請求項 22】

前記少なくとも 1 つのメチル化マーカー DNA の量を測定することは、ポリメラーゼ連鎖反応、核酸シーケンシング、質量分析、メチル化特異的ヌクレアーゼ、質量ベースの分離、及び標的捕捉のうちの 1 つまたは複数を使用することを含む、請求項 13 ～ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

前記測定は、マルチプレックス増幅を含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記少なくとも 1 つのメチル化マーカー DNA の量を測定することは、メチル化特異的 PCR、定量的メチル化特異的 PCR、メチル化特異的 DNA 制限酵素分析、定量的バイサルファイトパイロシーケンシング、フラップエンドヌクレアーゼアッセイ、PCR フラップアッセイ、及びバイサルファイトゲノムシーケンシング PCR からなる群から選択される 1 つまたは複数の方法を使用することを含む、請求項 13 ～ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 25】

対象からサンプリングされた血液の特性決定を行う方法であって、

i) 対象からサンプリングされた血液を処理して抽出 DNA 及び抽出 RNA を生成することと、

ii) 前記抽出 RNA 中の 2 つ以上のマーカー RNA の量を測定することであって、前記マーカー RNA は、S100A9、SELL、PADI4、APOB3CA、S100A12、MMP9、FPR1、TYMP、及び SAT1 RNA から選択される前記測定することと、

30

iii) 前記抽出 RNA 中の少なくとも 1 つの参照 RNA の量を測定することであって、前記参照 RNA は、CASC3A、SKP1、及び STK4 から選択される前記測定することと、

iv) 前記少なくとも 1 つの参照 RNA の前記量に対するパーセンテージとしての、前記 2 つ以上のマーカー RNA の各々の前記量の値を算出することであって、各マーカー RNA の前記値は、前記対象からサンプリングされた前記血液中の前記マーカー RNA の前記量を示す前記算出することと、

40

v) 前記抽出 DNA をバイサルファイト試薬で処理して、バイサルファイト処理済み DNA を生成することと、

vi) 前記バイサルファイト処理済み DNA 中の 2 つ以上のメチル化マーカー DNA の量を測定することであって、前記メチル化マーカー DNA は、EMX1、GRIND2、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6_2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR_9、DOCK2、MAX__chr

50

19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRT A2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX. chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIX、S1PR4、SKI、SUGL2、TBX15、及びZNF329遺伝子から選択される前記測定することと、

vii) 前記バイサルファイト処理済みDNA中の少なくとも1つの参照DNAの量を測定することであって、前記少なくとも1つの参照DNAは、B3GALT6 DNA及びβ-アクチンDNAから選択される前記測定することと、

viii) 前記バイサルファイト処理済みDNA中で測定された参照DNAの前記量に対するパーセンテージとしての、前記2つ以上のメチル化マーカーDNAの各々の前記量の値を算出することであって、各メチル化マーカーDNAの前記値は、前記対象からサンプリングされた前記血液中の前記メチル化マーカーDNAの前記量を示す前記算出することと

を含む前記方法。

【請求項26】

単一の採血デバイスで採取された血液からDNA及びRNAが単離される、請求項13～25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項27】

前記対象は、肺新生物を有するか、または有する疑いがある、請求項1～26のいずれか1項に記載の方法。

【請求項28】

前記対象からサンプリングされた前記血液中の前記少なくとも1つの遺伝子発現マーカーの量は、前記対象の肺癌リスクを示す、請求項1～27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】

前記対象からサンプリングされた前記血液中の前記少なくとも1つのメチル化マーカーDNAの量は、前記対象の肺癌リスクを示す、請求項13～28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】

a) 対象からサンプリングされた血液中の少なくとも1つの遺伝子発現マーカーの量を測定するための試薬セットであって、前記少なくとも1つの遺伝子発現マーカーは、S100A9、SELL、PADI4、APOBE3CA、S100A12、MMP9、FPR1、TYMP、及びSAT1から選択されるマーカー遺伝子の発現から生成される前記試薬セット、

b) 前記対象からサンプリングされた血液中の少なくとも1つの参照マーカーの量を測定するための試薬セット

を備えるキット。

【請求項31】

前記少なくとも1つの遺伝子発現マーカー及び前記少なくとも1つの参照マーカーを血液から抽出するための試薬セットをさらに備える、請求項30に記載のキット。

【請求項32】

前記少なくとも1つの遺伝子発現マーカーは、RNA及びタンパク質のうちの1つまたは複数を含み、前記少なくとも1つの参照マーカーは、RNA、DNA、及びタンパク質のうちの1つまたは複数を含む、請求項30または31に記載のキット。

【請求項33】

請求項30～32のいずれか1項に記載のキットであって、

i) 少なくとも1つの第1のオリゴヌクレオチドであって、前記少なくとも1つの第1のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、S100A9、SELL、PADI4、APOBE3CA、S100A12、MMP9、FPR1、TYMP、及びSAT1から選

10

20

30

40

50

択される遺伝子発現マーカーに関連するヌクレオチド配列を含む核酸鎖に特異的にハイブリダイズする前記少なくとも1つの第1のオリゴヌクレオチド、

i i) 少なくとも1つの第2のオリゴヌクレオチドであって、前記少なくとも1つの第2のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、参照マーカーに特異的にハイブリダイズし、前記参照マーカーは参照核酸である前記少なくとも1つの第2のオリゴヌクレオチドを備える前記キット。

【請求項34】

遺伝子発現マーカーに関連するヌクレオチド配列を含む前記核酸鎖は、RNA、cDNA、または増幅DNAから選択される、請求項33に記載のキット。

【請求項35】

前記参照核酸はRNAまたはDNAを含む、請求項33または34に記載のキット。

【請求項36】

前記参照マーカーは、PLGLB2、GABARAP、NACA、EIF1、UBB、UBC、CD81、TMBIM6、MYL12B、HSP90B1、CLDN18、RAMP2、MFAP4、FABP4、MARCO、RGL1、ZBTB16、C10orf116、GRK5、AGER、SCGB1A1、HBB、TCF21、GMFG、HYAL1、TEK、GNG11、ADH1A、TGFB3、INPP1、ADH1B、STK4、ACTB、HNRNPA1、CASC3、及びSKP1から選択される遺伝子から発現されるRNAまたはタンパク質を含む、請求項30～35のいずれか1項に記載のキット。

【請求項37】

請求項33～36のいずれか1項に記載のキットであって、

c) 前記対象からサンプリングされた血液中の少なくとも1つのメチル化マーカーDNAの量を測定するための試薬セットであって、前記少なくとも1つのメチル化マーカーDNAは、EMX1、GRIND2、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329のうちの少なくとも1つに関連するヌクレオチド配列を含む前記試薬セット

をさらに備える前記キット。

【請求項38】

少なくとも1つのメチル化マーカーDNAの量を測定するための前記試薬セットは、

i i i) 少なくとも1つの第3のオリゴヌクレオチドであって、前記少なくとも1つの第3のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、EMX1、GRIND2、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、AR

HGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX、chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329のメチル化メーカー遺伝子に関連するヌクレオチド配列を含む核酸鎖に特異的にハイブリダイズする前記少なくとも1つの第3のオリゴヌクレオチドを含む、請求項37に記載のキット。

【請求項39】

請求項38に記載のキットであって、少なくとも1つの第4のオリゴヌクレオチドをさらに備え、前記少なくとも1つの第4のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、参照マーカーDNA、好ましくは、B3GALT6 DNA及びβ-アクチンDNAから選択される参照マーカーDNAに特異的にハイブリダイズする前記キット。

10

【請求項40】

メチル化メーカー遺伝子に関連するヌクレオチド配列を含む前記核酸鎖及び前記参照マーカーDNAのうちの少なくとも1つは、バイサルファイト処理済みDNAを含む、請求項38または39に記載のキット。

【請求項41】

DNAのメチル化ステータスに特異的な様式で前記DNAを選択的に修飾する試薬をさらに備える、請求項38～40のいずれか1項に記載のキット。

20

【請求項42】

DNAのメチル化ステータスに特異的な様式で前記DNAを選択的に修飾する前記試薬は、バイサルファイト試薬、メチル化感受性制限酵素、またはメチル化依存性制限酵素を含む、請求項41に記載のキット。

【請求項43】

前記バイサルファイト試薬は、重亜硫酸アンモニウムを含む、請求項42に記載のキット。

【請求項44】

前記少なくとも1つの第1、第2、第3、及び第4のオリゴヌクレオチドのうちの1つまたは複数は、捕捉オリゴヌクレオチド、核酸プライマーペア、核酸プローブ、及び侵襲性オリゴヌクレオチドから選択される、請求項33～43のいずれか1項に記載のキット。

30

【請求項45】

前記捕捉オリゴヌクレオチドは、固体支持体に結合している、請求項44に記載のキット。

【請求項46】

前記固体支持体は磁気ビーズである、請求項45に記載のキット。

【請求項47】

請求項33～46のいずれか1項に記載のキットであって、

i) S100A9、SELL、PADI4、APOBE3CA、S100A12、MMP9、FPR1、TYMP、及びSAT1から選択されるマーカー遺伝子の発現の遺伝子発現マーカー産物から第1の増幅DNAを生成するための第1のプライマーペアと、

40

ii) 前記第1の増幅DNAの領域に相補的な配列を含む第1のプローブと、

iii) 第2の増幅DNAを生成するための第2のプライマーペアと、

iv) 前記第2の増幅DNAの領域に相補的な配列を含む第2のプローブと、

v) 逆転写酵素と、

vi) 耐熱性DNAポリメラーゼと

を備える前記キット。

【請求項48】

前記第2の増幅DNAは、メチル化マーカー遺伝子または参照マーカー核酸から生成さ

50

れる、請求項 47 に記載のキット。

【請求項 49】

前記第 1 のプローブは、前記第 1 の増幅 DNA に実質的に相補的ではない第 1 のフラップ配列を有するフラップ部分をさらに含む、請求項 47 または 48 に記載のキット。

【請求項 50】

前記第 2 のプローブは、前記第 2 の増幅 DNA に実質的に相補的ではない第 2 のフラップ配列を有するフラップ部分をさらに含む、請求項 47 ～ 49 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 51】

請求項 49 または 50 に記載のキットであって、

v i i) 前記第 1 のフラップ配列に相補的な配列を含む FRET カセット、

v i i i) 前記第 2 のフラップ配列に相補的な配列を含む FRET カセット

のうちの 1 つまたは複数をさらに備える前記キット。

【請求項 52】

フラップエンドヌクレアーゼ、好ましくは FEN-1 エンドヌクレアーゼをさらに備える、請求項 49 ～ 51 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 53】

i) S100A9、SELL、PADI4、APOBE3CA、S100A12、MMP9、FPR1、TYMP、及び SAT1 から選択される遺伝子の発現の遺伝子発現マーカー産物から、第 1 の増幅 DNA を生成するための第 1 のプライマーペアと、

i i) 前記第 1 の増幅 DNA の領域に相補的な配列を含む第 1 のプローブと、

i i i) 第 2 の増幅 DNA を生成するための第 2 のプライマーペアと、

i v) 前記第 2 の増幅 DNA の領域に相補的な配列を含む第 2 のプローブと、

v) 逆転写酵素と、

v i) 耐熱性 DNA ポリメラーゼとを含む組成物。

【請求項 54】

対象からサンプリングされた血液から抽出された核酸をさらに含む、請求項 53 に記載の組成物であって、前記対象は、好ましくは、肺新生物を有するか、または有する疑いがある前記組成物。

【請求項 55】

前記核酸は、

- 細胞 RNA、
- 循環セルフリー RNA、
- 細胞 DNA、
- 循環セルフリー DNA

のうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 54 に記載の組成物。

【請求項 56】

前記第 2 のプライマーペアは、メチル化マーカー遺伝子または参照マーカー核酸から、第 2 の増幅 DNA を生成する、請求項 53 ～ 55 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 57】

前記第 2 のプライマーペアは、

- PLGLB2、GABARAP、NACA、EIF1、UBB、UBC、CD81、TMBIM6、MYL12B、HSP90B1、CLDN18、RAMP2、MFAP4、FABP4、MARCO、RGL1、ZBTB16、C10orf116、GRK5、AGER、SCGB1A1、HBB、TCF21、GMFG、HYAL1、TEK、GN G11、ADH1A、TGFB3、INPP1、ADH1B、STK4、ACTB、HNRNPA1、CASC3、及び SKP1 から選択される遺伝子から発現された RNA、
- U1 snRNA 及び U6 snRNA から選択される RNA、
- B3GALT6 DNA 及び β -アクチン DNA から選択される DNA

10

20

30

40

50

から選択される参照核酸から、第2の増幅DNAを生成する、請求項56に記載の組成物。

【請求項58】

前記第2のプライマーペアは、EMX1、GRIND2、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX.chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329から選択されるメチル化マーカー遺伝子から、第2の増幅DNAを生成する、請求項56に記載の組成物。

10

【請求項59】

前記第1のプロブ及び／または前記第2のプロブは、フルオロフォアを含む検出部分を含む、請求項53～58のいずれか1項に記載の組成物。

20

【請求項60】

前記第1のプロブは、前記第1の増幅DNAに実質的に相補的ではない第1のフラップ配列を有するフラップ部分をさらに含む、及び／または前記第2のプロブは、前記第2の増幅DNAに実質的に相補的ではない第2のフラップ配列を有するフラップ部分をさらに含む、請求項53～58のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項61】

請求項60に記載の組成物であって、

v i i) 前記第1のフラップ配列に相補的な配列を含むFRETカセット、

v i i i) 前記第2のフラップ配列に相補的な配列を含むFRETカセット

のうちの1つまたは複数をさらに含む前記組成物。

30

【請求項62】

フラップエンドヌクレアーゼ、好ましくはFEN-1エンドヌクレアーゼをさらに含む、請求項53～61のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項63】

6～10mMのMg⁺⁺を含むバッファーをさらに含む、請求項53～62のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項64】

請求項53～63のいずれか1項に記載の組成物を含む反応混合物。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本出願は、参照により本明細書に組み込まれる2019年8月27日に出願された米国仮特許出願第62／892,426号に基づく優先権を主張する。

【0002】

本明細書で提供されるのは、新生物形成の検出に関連する技術であり、特に、肺癌などの新生物の検出のための方法、組成物、及び関連する使用に関連する技術であるが、これらに限定されない。本発明の態様は、患者の血液からの抽出物をアッセイすることによって肺癌を検出するためのシステム及び方法に関する。特に、実施形態は、免疫細胞RNA発現または循環セルフリーRNAレベルを検出することにより、異なるステージの肺癌の

50

進行を判定するためのシステム及び方法を含む。

【背景技術】

【0003】

肺癌は、依然として、米国におけるがんによる死亡の中で最も多く、効果的なスクリーニング手法が切実に必要とされている。肺癌だけでも年間221,000人の死亡の原因となっている。治療法は存在するが、治療の有効性が損なわれる時点まで疾患が進行して初めて患者に投与されることが多い。

【0004】

がん治療における主要な課題は、疾患の初期段階で患者を同定することである。これは現在の方法では困難である。なぜなら、初期の癌性細胞集団または前癌性細胞集団は無症候性であり得、生検によってアクセスするのが困難な領域に位置する場合があるためである。よって、無症候性であり得る初期ステージを含め、疾患の全てのステージを同定するために使用され得る、ロバストで低侵襲性のアッセイは、がんの治療に実質的な利益をもたらすであろう。

【発明の概要】

【0005】

本明細書で開示されるシステム、デバイス、キット、組成物、及び方法は、各々、いくつかの態様を有し、それらのうちの単一のものが、それらの望ましい属性の唯一の理由となるものではない。クレームの範囲を制限することなく、いくつかの顕著な特徴をここで簡潔に説明する。より少ない、追加の、及び／または異なる構成要素、ステップ、特徴、目的、利益、及び利点を有する実施形態を含め、多数の他の実施形態も想定される。構成要素、態様、及びステップは、異なるかたちで配置され順序付けられてもよい。この説明を考慮すれば、特に「発明を実施するための形態」と題するセクションを読めば、本明細書で開示されるデバイス及び方法の特徴が、他の公知のデバイス及び方法と比べて、どのように利点をもたらすかが理解されよう。

【0006】

本技術は、複数の異なるタイプのマーカー分子についてサンプル（複数可）を分析することを含む、対象由来のサンプルまたはサンプルの組み合わせの特性決定を行う方法を提供する。例えば、いくつかの実施形態において、本技術は、対象から得られたサンプルにおけるDNA中の少なくとも1つのメチル化マーカー遺伝子の量を測定することを含む方法を提供し、対象から得られたサンプル中の少なくとも1つのRNAマーカーの量を測定すること、及び対象から得られたサンプル中の少なくとも1つのタンパク質マーカーの存在または非存在についてアッセイすることのうちの1つまたは複数を含み、いくつかの実施形態において、対象由来の単一のサンプルが、メチル化マーカーDNA（複数可）、マーカーRNA（複数可）、及びマーカータンパク質（複数可）について分析される。

【0007】

DNA、RNA及び／またはタンパク質マーカーの分析は、いずれかの特定の技術の使用に限定されない。DNA及びRNAを分析する方法は、例えば、増幅及びプローブハイブリダイゼーションを含む核酸検出アッセイを含むが、これらに限定されない。タンパク質を分析する方法は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）検出、タンパク質免疫沈降、ウェスタンブロット、免疫染色などを含むが、これらに限定されない。

【0008】

一実施形態は、対象、例えば、ヒトにおける、肺癌を検出する及び／または肺癌リスクを判定する手段として、対象由来のサンプル、例えば、対象からサンプリングされた血液の特性決定を行う方法である。この方法は、ヒト由来の血液サンプルを用意すること、血液サンプル中の標的遺伝子S100カルシウム結合タンパク質A9（S100A9）、セレクチンL（SELL）、ペプチジルアルギニンデイミナーゼ4（PAD14）、アポリポタンパク質B mRNA編集酵素触媒サブユニット3A（APOBE3CA）、S100カルシウム結合タンパク質A12（S100A12）、マトリックスメタロペプチダー

ゼ 9 (MMP 9)、ホルミルペプチド受容体 1 (FPR 1)、チミジンホスホリラーゼ (TYMP)、及び／またはスベルミジン／スベルミン N1-アセチルトランスフェラーゼ 1 (SAT 1) の標的遺伝子発現レベルを検出すること、血液サンプル中の参照遺伝子の参照遺伝子発現レベルを検出すること、ならびに、検出された標的遺伝子発現レベルを、検出された参照遺伝子発現レベルと比較して、肺新生物形成の存在または非存在を判定すること、または肺癌を有するヒトのリスクを判定することを含む。

【0009】

いくつかの実施形態において、本技術は、対象からサンプリングされた血液中の 1 つまたは複数の遺伝子発現産物の量を測定する方法であって、

a) 対象からサンプリングされた血液から、

i) S100A9、SELL、PADI4、APOBE3CA、S100A12、MMP9、FPR1、TYMP、及び SAT1 から選択されるマーカー遺伝子の発現の産物である、少なくとも 1 つの遺伝子発現マーカー、ならびに、

ii) 少なくとも 1 つの参照マーカー

を抽出することと、

b) a) で抽出された少なくとも 1 つの遺伝子発現マーカーの量及び少なくとも 1 つの参照マーカーの量を測定することと、

c) 少なくとも 1 つの参照マーカーの量に対するパーセンテージとしての、少なくとも 1 つの遺伝子発現マーカーの量の値を算出することであって、値は、対象からサンプリングされた血液中の少なくとも 1 つの遺伝子発現マーカーの量を示す算出することと

を含む方法を提供する。

【0010】

いくつかの実施形態において、抽出することは、全血、白血球を含む血液製剤、及び血漿を含む血液製剤から選択されるサンプルからマーカーを抽出することを含む。特定の実施形態において、少なくとも 1 つの遺伝子発現マーカーは、タンパク質または RNA を含む、特定の好ましい実施形態では、対象からサンプリングされた血液から抽出される RNA は、循環セルフリー RNA を含む。いくつかの実施形態において、対象からサンプリングされた血液から抽出される RNA は、免疫細胞によって発現された RNA を含む。本明細書で上述した実施形態のいずれかにおいて、対象からサンプリングされた血液から抽出される RNA は、mRNA を含む得る。

【0011】

本技術は、単一の遺伝子発現マーカーの測定に限定されず、本技術は、例えば、本明細書以下で詳細に説明するように、測定データを組み合わせて分析できるように、複数の遺伝子発現マーカーの測定を包含する。いくつかの実施形態において、本技術は、例えば、本技術を適用する際の便宜または効率のために、限定されたマーカーのセットの測定に適用される。例えば、上述の実施形態のいずれかにおいて、少なくとも 1 つの遺伝子発現マーカーは、好ましくは、2、3、4、5、6、7、8、または 9 つの遺伝子発現マーカーからなり得る。

【0012】

上述の実施形態のいずれかにおいて、少なくとも 1 つの参照マーカーは、PLGLB2、GABARAP、NACA、EIF1、UBB、UBC、CD81、TMBIM6、MYL12B、HSP90B1、CLDN18、RAMP2、MFAP4、FABP4、MARCO、RGL1、ZBTB16、C10orf116、GRK5、AGER、SCGB1A1、HBB、TCF21、GMFG、HYAL1、TEK、GNG11、ADH1A、TGFB3、INPP1、ADH1B、STK4、ACTB、HNRNP A1、CASC3、及び SKP1 から選択される遺伝子から発現される RNA またはタンパク質を含む得る。特定の好ましい実施形態において、少なくとも 1 つの参照マーカーは、RNA を含む。特定の実施形態において、参照マーカーは、U1 snRNA 及び U6 snRNA から選択される RNA を含む。

【0013】

上述の実施形態のいずれかに適用される場合、本技術は、少なくとも1つの遺伝子発現マーカーの量を測定することが、逆転写、ポリメラーゼ連鎖反応、核酸シーケンシング、質量分析、質量ベースの分離、及び標的捕捉、定量的パイロシーケンシング、フラップエンドヌクレアーゼアッセイ、PCRフラップアッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）検出、ならびにタンパク質免疫沈降のうちの1つまたは複数を使用することを含む実施形態を包含する。特定の実施形態において、測定は、マルチプレックス増幅を含む。

【0014】

いくつかの実施形態において、DNAも分析される。本明細書で提供されるのは、正常な肺組織及び良性結節では陰性のままでありながら、全てのタイプの肺癌のきわめて高度な識別を達成する、組織または血漿でアッセイされるメチル化マーカーの集合である。この集合から選択されるマーカーは、単独で、またはパネルにおいて、例えば、血液または体液の特性決定を行うために使用することができ、肺癌スクリーニング及び良性結節からの悪性結節の識別に適用される。いくつかの実施形態において、パネルにおけるマーカーは、ある形態の肺癌を別の形態の肺癌から区別するために、例えば、肺腺癌もしくは大細胞癌の存在を肺小細胞癌の存在から区別するために、または病理混合型癌を検出するために使用される。本明細書で提供されるのは、対象から採取されたサンプルから検出されたときに高いシグナル対ノイズ比及び低いバックグラウンドレベルをもたらすマーカーをスクリーニングするための技術である。

【0015】

EMX1、GRIND2、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329から選択されるアノテーションを有するメチル化マーカー及び／またはマーカーのパネル（例えば、染色体領域（複数可））が、肺癌サンプルにおけるメチル化マーカーのメチル化状態を、正常な（非癌性の）サンプルにおける対応するマーカーと比較することにより、複数の研究で同定された。

【0016】

本明細書に記載されるように、本技術は、肺癌を高度に識別し、いくつかの実施形態では肺癌のタイプを識別する、いくつかのメチル化マーカー及びそれらのサブセット（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12またはそれ以上のマーカーのセット）を提供する。

【0017】

したがって、対象からサンプリングされた血液中の1つまたは複数の遺伝子発現産物の量を測定する上述の実施形態のいずれかの技術は、

d) 対象からサンプリングされた血液から、少なくとも1つのメチル化マーカーDNA及び少なくとも1つの参照マーカーDNAを抽出することと、

e) 少なくとも1つのメチル化マーカーDNAの量を測定することであって、少なくとも1つのメチル化マーカーDNAは、EMX1、GRIND2、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC10

10

20

30

40

50

0129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329のうちの少なくとも1つに関連するヌクレオチド配列を含む測定することと、

f) 少なくとも1つの参照マーカーDNAの量を測定することと、

g) 参照マーカーDNAの量に対するパーセンテージとしての、少なくとも1つのメチル化マーカーDNAの量の値を算出することであって、値は、対象からサンプリングされた血液中の少なくとも1つのメチル化マーカーDNAの量を示す算出することとをさらに含み得る。

【0018】

本技術は、あるメチル化マーカーDNAの測定に限定されず、本技術は、例えば、本明細書以下で詳細に説明するように、異なるメチル化マーカーDNAの測定データを互いと組み合わせて、及び／またはRNA及び／またはタンパク質遺伝子発現マーカーの測定データと組み合わせて分析できるように、複数のメチル化マーカーDNAの測定を包含する。いくつかの実施形態において、本技術は、例えば、本技術を適用する際の便宜または効率のために、限定されたメチル化マーカーDNAのセットの測定に適用される。例えば、上述の実施形態のいずれかにおいて、少なくとも1つのメチル化マーカーDNAは、好ましくは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個のメチル化マーカーDNAからなり得る。特定の実施形態において、少なくとも1つのメチル化マーカーDNAは、BARX1、FLJ45983、HOPX、ZNF781、FAM59B、HOXA9、SOBP、及びIFFO1のうちの少なくとも1つに関連するヌクレオチド配列を含む。上述のうち任意の特定の実施形態において、少なくとも1つの遺伝子発現マーカーは、FPR1、PADI4、及びSELLから選択されるマーカー遺伝子の発現の産物を含む。

【0019】

特定の実施形態において、対象からサンプリングされた血液から抽出されるDNAは、循環セルフリーDNAを含む。他の実施形態では、DNAは細胞DNAを含む。上述の実施形態のいずれかにおいて、少なくとも1つのメチル化マーカーDNAの量の値を算出するために使用される少なくとも1つの参照マーカーDNAは、好ましくは、B3GALT6 DNA及びβ-アクチンDNAから選択され得る。

【0020】

上述のメチル化マーカーDNAを測定するための実施形態のいずれかには、DNAのメチル化ステータスに特異的な様式でDNAを選択的に修飾する試薬でメチル化マーカーDNAが処理される実施形態が含まれる。いくつかの実施形態において、試薬は、バイサルファイト試薬、メチル化感受性制限酵素、またはメチル化依存性制限酵素を含み、特定の好ましい実施形態では、バイサルファイト試薬は、重亜硫酸アンモニウムを含む。

【0021】

メチル化マーカーDNAの量を測定するいずれかの特定の方法に本技術を限定するものではないが、いくつかの実施形態において、少なくとも1つのメチル化マーカーDNAの量を測定することは、ポリメラーゼ連鎖反応、核酸シーケンシング、質量分析、メチル化特異的ヌクレアーゼ、質量ベースの分離、及び標的捕捉のうちの1つまたは複数を使用す

10

20

30

40

50

ることを含み、特定の好ましい実施形態では、測定は、マルチプレックス増幅を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのメチル化マーカーDNAの量を測定することは、メチル化特異的PCR、定量的メチル化特異的PCR、メチル化特異的DNA制限酵素分析、定量的バイサルファイトパイロシーケンシング、フラップエンドヌクレアーゼアッセイ、PCR-フラップアッセイ、及びバイサルファイトゲノムシーケンシングPCRからなる群から選択される1つまたは複数の方法を使用することを含み。

【0022】

本技術の実施形態は、対象からサンプリングされた血液の特性決定を行う方法であって、

i) 対象からサンプリングされた血液を処理して抽出DNA及び抽出RNAを生成することと、

ii) 抽出RNA中の2つ以上のマーカーRNAの量を測定することであって、マーカーRNAは、S100A9、SELL、PADI4、APOBE3CA、S100A12、MMP9、FPR1、TYMP、及びSAT1 RNAから選択される測定することと、

iii) 抽出RNA中の少なくとも1つの参照RNAの量を測定することであって、参照RNAは、CASC3A、SKP1、及びSTK4から選択される測定することと、

iv) 少なくとも1つの参照RNAの量に対するパーセンテージとしての、2つ以上のマーカーRNAの各々の量の値を算出することであって、各マーカーRNAの値は、対象からサンプリングされた血液中のマーカーRNAの量を示す算出することと、

v) 抽出DNAをバイサルファイト試薬で処理して、バイサルファイト処理済みDNAを生成することと、

vi) バィサルファイト処理済みDNA中の2つ以上のメチル化マーカーDNAの量を測定することであって、メチル化マーカーDNAは、EMX1、GRIND2、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARRHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329遺伝子から選択される測定することと、

vii) バィサルファイト処理済みDNA中の少なくとも1つの参照DNAの量を測定することであって、少なくとも1つの参照DNAは、B3GALT6 DNA及びβ-アクトチンDNAから選択される測定することと、

viii) バィサルファイト処理済みDNA中で測定された参照DNAの量に対するパーセンテージとしての、2つ以上のメチル化マーカーDNAの各々の量の値を算出することであって、各メチル化マーカーDNAの値は、対象からサンプリングされた血液中のメチル化マーカーDNAの量を示す算出することと

を含む方法を提供する。

【0023】

本明細書で上述したDNA及びRNAの分析を含む実施形態は、単一の採血チューブまたは採血バッグを含むがこれらに限定されない単一の採血デバイスに採取された血液からDNA及びRNAが単離される実施形態を包含する。

【0024】

本明細書で上述した実施形態のいずれも、対象が肺新生物を有するか、もしくは有する

疑いがある実施形態、及び／または、本技術が、上述の測定方法を使用して算出された値に基づいて対象における肺癌のリスクを評価することを含む実施形態を含む。例えば、いくつかの実施形態において、対象からサンプリングされた血液中の少なくとも1つの遺伝子発現マーカーの量及び／または少なくとも1つのメチル化マーカーDNAの量は、対象の肺癌リスクを示す。

【0025】

いくつかの実施形態において、マーカーのメチル化状態をアッセイするための設計は、アッセイ技術によって精査されるマーカーの標的領域における個々のCpG遺伝子座でのバックグラウンドメチル化を分析することを含む。例えば、いくつかの実施形態では、疾患、例えばがんと診断された対象から単離されたサンプルにおける、マーカーDNAの多数の個々のコピー（例えば、10,000超、好ましくは100,000超の個々のコピー）を検査して、メチル化の頻度を判定し、これらのデータを、疾患のない対象から単離されたサンプルにおけるマーカーDNAの同様に多数の個々のコピーと比較する。より高いシグナル対ノイズ、例えば、高い検出可能メチル化及び／または低減したバックグラウンドメチル化を有するCpG遺伝子座が、アッセイ設計における使用のために選択されるように、サンプルにおけるマーカーDNA中の個々のCpG遺伝子座における疾患関連メチル化及びバックグラウンドメチル化の頻度を比較することができる。例えば、各々が全体として参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第9,637,792号及び同第10,519,510号を参照のこと。いくつかの実施形態では、アッセイ結果に基づいてマーカーを「メチル化」または「非メチル化」と分類するには、CpG遺伝子座の全てが事前に判定されたメチル化ステータスを有する必要がある（例えば、全てがメチル化されている必要がある、またはメチル化されているものがあり得ない）ように、シグナル対ノイズの高いCpG遺伝子座の一群（例えば、マーカー領域内の2、3、4、5、またはそれ以上の個々のCpG遺伝子座）が、アッセイにより同時に精査される。

【0026】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの遺伝子発現マーカー及び／または少なくとも1つのメチル化マーカーDNAの量または存在もしくは非存在を測定することから選択される、アッセイのための試薬または材料を備えるキットが提供される。少なくとも1つの遺伝子発現マーカーは、RNAマーカーまたはタンパク質マーカーであり得る。

【0027】

例えば、特定のキットの実施形態は、

a) 対象からサンプリングされた血液中の少なくとも1つの遺伝子発現マーカーの量を測定するための試薬セットであって、少なくとも1つの遺伝子発現マーカーは、S100A9、SELL、PADI4、APOBE3CA、S100A12、MMP9、FPR1、TYMP、及びSAT1から選択されるマーカー遺伝子の発現から生成される試薬セット、

b) 対象からサンプリングされた血液中の少なくとも1つの参照マーカーの量を測定するための試薬セット

を提供する。

【0028】

いくつかの実施形態において、キットは、少なくとも1つの遺伝子発現マーカー及び少なくとも1つの参照マーカーを血液から抽出するための試薬セットをさらに備える。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの遺伝子発現マーカーは、RNA及びタンパク質のうちの1つまたは複数を含み、少なくとも1つの参照マーカーは、RNA、DNA、及びタンパク質のうちの1つまたは複数を含む。特定の実施形態において、キットは、

i) 少なくとも1つの第1のオリゴヌクレオチドであって、少なくとも1つの第1のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、S100A9、SELL、PADI4、APOBE3CA、S100A12、MMP9、FPR1、TYMP、及びSAT1から選択される遺伝子発現マーカーに関連するヌクレオチド配列を含む核酸鎖に特異的にハイブリダイズする少なくとも1つの第1のオリゴヌクレオチド、

10

20

30

40

50

i i) 少なくとも1つの第2のオリゴヌクレオチドであって、少なくとも1つの第2のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、参照マーカーに特異的にハイブリダイズし、参照マーカーは参照核酸である少なくとも1つの第2のオリゴヌクレオチドを備える。

【0029】

上述のキットの実施形態において、遺伝子発現マーカーに関連するヌクレオチド配列を含む核酸鎖は、RNA、cDNA、または増幅DNAから選択される。特定の実施形態において、参照核酸はRNAまたはDNAを含み、いくつかの実施形態では、参照遺伝子発現マーカーは、好ましくは、PLGLB2、GABARAP、NACA、EIF1、UBB、UBC、CD81、TMBIM6、MYL12B、HSP90B1、CLDN18、RAMP2、MFAP4、FABP4、MARCO、RGL1、ZBTB16、C10orf116、GRK5、AGER、SCGB1A1、HBB、TCF21、GMFG、HYAL1、TEK、GNG11、ADH1A、TGFB3、INPP1、ADH1B、STK4、ACTB、HNRNPA1、CASC3、及びSKP1から選択される遺伝子から発現されるRNAまたはタンパク質を含む。

10

【0030】

上述の実施形態のいずれかにおいて、本技術のキットは、

c) 対象からサンプリングされた血液中の少なくとも1つのメチル化マーカーDNAの量を測定するための試薬セットであって、少なくとも1つのメチル化マーカーDNAは、EMX1、GRIND2、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329のうちの少なくとも1つに関連するヌクレオチド配列を含む試薬セット

20

をさらに備え得る。

30

【0031】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つのメチル化マーカーDNAの量を測定するための試薬セットは、

i) 少なくとも1つの第3のオリゴヌクレオチドであって、少なくとも1つの第3のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、EMX1、GRIND2、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、D

40

50

NMT3A、FERMT3、NFIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329のメチル化メーカー遺伝子に関連するヌクレオチド配列を含む核酸鎖に特異的にハイブリダイズする少なくとも1つの第3のオリゴヌクレオチドを含む。

【0032】

上述のキットの実施形態は、少なくとも1つの第4のオリゴヌクレオチドをさらに備えてもよく、少なくとも1つの第4のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分は、参照マーカーDNA、好ましくは、B3GALT6 DNA及びβ-アクチンDNAから選択される参照マーカーDNAに特異的にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、メチル化メーカー遺伝子に関連するヌクレオチド配列を含む核酸鎖及び参照マーカーDNAのうちの少なくとも1つは、バイサルファイト処理済みDNAを含む。

10

【0033】

いくつかの実施形態において、上述したキットは、DNAのメチル化ステータスに特異的な様式でDNAを選択的に修飾する試薬をさらに備える。特定の実施形態において、DNAのメチル化ステータスに特異的な様式でDNAを選択的に修飾する試薬は、バイサルファイト試薬、メチル化感受性制限酵素、またはメチル化依存性制限酵素を含む。特定の好ましい実施形態において、バイサルファイト試薬は、重亜硫酸アンモニウムを含む。

【0034】

上記で提供されるキットの実施形態は、少なくとも1つの第1、第2、第3、及び第4のオリゴヌクレオチドのうちの1つまたは複数が、捕捉オリゴヌクレオチド、核酸プライマーペア、核酸プローブ、及び侵襲性オリゴヌクレオチドから選択されるキットをさらに包含し、特定の実施形態において、捕捉オリゴヌクレオチドは、例えば、共有結合または非共有結合（例えば、ビオチン-ストレプトアビジン結合または抗原-抗体結合）によって、固体支持体に結合している。好ましい実施形態では、固体支持体は磁気ビーズである。

20

【0035】

本明細書で上述した技術のキットのいずれかの実施形態は、

i) S100A9、SELL、PADI4、APOBE3CA、S100A12、MMP9、FPR1、TYMP、及びSAT1から選択されるマーカー遺伝子の発現の遺伝子発現マーカー産物から第1の増幅DNAを生成するための第1のプライマーペアと、

30

ii) 前記第1の増幅DNAの領域に相補的な配列を含む第1のプローブと、

iii) 第2の増幅DNAを生成するための第2のプライマーペアと、

iv) 前記第2の増幅DNAの領域に相補的な配列を含む第2のプローブと、

v) 逆転写酵素と、

vi) 耐熱性DNAポリメラーゼと

を備えるキットを含む。

【0036】

いくつかの実施形態において、第2の増幅DNAは、メチル化マーカー遺伝子または参照マーカー核酸から生成される。

【0037】

特定の実施形態において、第1のプローブは、前記第1の増幅DNAに実質的に相補的ではない第1のフラップ配列を有するフラップ部分をさらに含み、いくつかの実施形態において、第2のプローブは、前記第2の増幅DNAに実質的に相補的ではない第2のフラップ配列を有するフラップ部分をさらに含む。本技術のキットは、

40

vii) 前記第1のフラップ配列に相補的な配列を含むFRETカセット、

viii) 前記第2のフラップ配列に相補的な配列を含むFRETカセット

のうちの1つまたは複数を含む。

【0038】

本明細書で上述したキットのいずれも、フラップエンドヌクレアーゼをさらに備え得る。特定の好ましい実施形態において、フラップエンドヌクレアーゼは、FEN-1エンド

50

ヌクレアーゼ、例えば、古細菌生物由来の耐熱性 F E N - 1 エンドヌクレアーゼである。

【 0 0 3 9 】

本技術の適用は、さらに組成物を提供する。例えば、いくつかの実施形態において、本技術は、

i) S 1 0 0 A 9、S E L L、P A D I 4、A P O B E 3 C A、S 1 0 0 A 1 2、M M P 9、F P R 1、T Y M P、及び S A T 1 から選択される遺伝子の発現の遺伝子発現マーカー産物から、第 1 の増幅 DNA を生成するための第 1 のプライマーペアと、

i i) 前記第 1 の増幅 DNA の領域に相補的な配列を含む第 1 のプローブと、

i i i) 第 2 の増幅 DNA を生成するための第 2 のプライマーペアと、

i v) 前記第 2 の増幅 DNA の領域に相補的な配列を含む第 2 のプローブと、

v) 逆転写酵素と、

v i) 耐熱性 DNA ポリメラーゼと

を含む組成物を提供する。

【 0 0 4 0 】

いくつかの実施形態において、組成物は、対象からサンプリングされた血液から抽出された核酸をさらに含み、対象は、好ましくは、肺新生物を有するか、もしくは有する疑いがあるか、または肺癌を有するリスクがある。組成物のいくつかの実施形態において、核酸は、

- 細胞 RNA、
- 循環セルフリー RNA、
- 細胞 DNA、
- 循環セルフリー DNA

のうちの 1 つまたは複数を含む。

【 0 0 4 1 】

いくつかの実施形態において、第 2 のプライマーペアは、メチル化マーカー遺伝子または参照マーカー核酸から、第 2 の増幅 DNA を生成する。特定の好ましい実施形態において、第 2 のプライマーペアは、

- P L G L B 2、G A B A R A P、N A C A、E I F 1、U B B、U B C、C D 8 1、T M B I M 6、M Y L 1 2 B、H S P 9 0 B 1、C L D N 1 8、R A M P 2、M F A P 4、F A B P 4、M A R C O、R G L 1、Z B T B 1 6、C 1 0 o r f 1 1 6、G R K 5、A G E R、S C G B 1 A 1、H B B、T C F 2 1、G M F G、H Y A L 1、T E K、G N G 1 1、A D H 1 A、T G F B R 3、I N P P 1、A D H 1 B、S T K 4、A C T B、H N R N P A 1、C A S C 3、及び S K P 1 から選択される遺伝子から発現された RNA、
- U 1 s n R N A 及び U 6 s n R N A から選択される RNA、
- B 3 G A L T 6 DNA 及び β -アクトチン DNA から選択される DNA

から選択される参照核酸から、第 2 の増幅 DNA を生成する。

【 0 0 4 2 】

特定の実施形態において、第 2 のプライマーペアは、E M X 1、G R I N D 2、A N K R D 1 3 B、Z N F 7 8 1、Z N F 6 7 1、I F F O 1、H O P X、B A R X 1、H O X A 9、L O C 1 0 0 1 2 9 7 2 6、S P O C K 2、T S C 2 2 D 4、M A X . c h r 8 . 1 2 4、R A S S F 1、S T 8 S I A 1、N K X 6 _ 2、F A M 5 9 B、D I D O 1、M A X _ C h r 1 . 1 1 0、A G R N、S O B P、M A X _ c h r 1 0 . 2 2 6、Z M I Z 1、M A X _ c h r 8 . 1 4 5、M A X _ c h r 1 0 . 2 2 5、P R D M 1 4、A N G P T 1、M A X . c h r 1 6 . 5 0、P T G D R _ 9、D O C K 2、M A X _ c h r 1 9 . 1 6 3、Z N F 1 3 2、M A X c h r 1 9 . 3 7 2、T R H、S P 9、D M R T A 2、A R H G E F 4、C Y P 2 6 C 1、P T G D R、M A T K、B C A T 1、P R K C B _ 2 8、S T 8 S I A _ 2 2、F L J 4 5 9 8 3、D L X 4、S H O X 2、H O X B 2、M A X . c h r 1 2 . 5 2 6、B C L 2 L 1 1、O P L A H、P A R P 1 5、K L H D C 7 B、S L C 1 2 A 8、B H L H E 2 3、C A P N 2、F G F 1 4、F L J 3 4 2 0 8、B I N 2 _ Z、D N M T 3 A、F E R M T 3、N F I X、S 1 P R 4、S K I、S U C L G 2

10

20

30

40

50

、T B X 1 5、及びZ N F 3 2 9から選択されるメチル化マーカー遺伝子から、第2の増幅DNAを生成するように選択される。

【0043】

当業者には、上記の組成物が、2つのプライマーペアに限定されず、複数の異なる遺伝子発現マーカーから増幅DNAを生成するためのいくつかの異なるプライマーペア、及び／または、複数の異なるメチル化マーカー遺伝子から増幅DNAを生成するためのいくつかの異なるプライマーペアを含む組成物を包含することが認識されよう。組成物は、複数の異なる参照マーカー核酸から増幅DNAを生成するためのいくつかの異なるプライマーペアをさらに含み得る。

【0044】

上述の組成物において、第1のプローブ及び／または第2のプローブは、フルオロフォアを含む検出部分を含む。特定の実施形態において、本技術のプローブは、プローブがインタクトであるとき、例えば、5'ヌクレアーゼによって切断されていないとき、フルオロフォアからの発光がクエンチされるように、フルオロフォア及びクエンチ部分で標識され得る。

【0045】

いくつかの実施形態において、第1のプローブは、前記第1の増幅DNAに実質的に相補的ではない第1のフラップ配列を有するフラップ部分をさらに含む、及び／または、第2のプローブは、前記第2の増幅DNAに実質的に相補的ではない第2のフラップ配列を有するフラップ部分をさらに含む。特定の実施形態において、組成物は、

- v i i) 第1のフラップ配列に相補的な配列を含むFRETカセット、
 - v i i i) 第2のフラップ配列に相補的な配列を含むFRETカセット
- のうちの1つまたは複数を含み得る。

【0046】

上述の組成物のいずれも、フラップエンドヌクレアーゼ、好ましくはFEN-1エンドヌクレアーゼ、例えば、古細菌生物由来の耐熱性FEN-1をさらに含み得る。

【0047】

特定の実施形態において、上述の組成物は、 Mg^{++} 、例えば、 $MgCl_2$ を含むバッファーを含む。好ましくは、組成物は、標準的なPCRバッファーと比較して比較的高い Mg^{++} 及び低いKCl（例えば、6~10mM、好ましくは7.5mMの Mg^{++} 、及び0.0~0.8mMのKCl）を有するPCR-フラップアッセイバッファーを含む。

【0048】

本技術の実施形態は、本明細書で上述した組成物のうちのいずれか1つを含む反応混合物をさらに含む。

【0049】

いくつかの実施形態において、キットは、少なくとも2つのアッセイのための試薬または材料を備え、アッセイは、1) 少なくとも1つのメチル化DNAマーカー；2) 少なくとも1つのRNAマーカー；及び／または3) 少なくとも1つのタンパク質マーカーの量または存在もしくは非存在を測定することから選択される。好ましい実施形態において、少なくとも1つのメチル化DNAマーカーは、BARX1、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ZNF671、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、ANKRD13B、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、HOXA9、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、ZNF781、PTGDR、GRIN2D、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、EMX1、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12a、BHLHE23

10

20

30

40

50

、CAPN2、FGF14、FLJ34208、B3GALT6、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、ZDHHC1、ZNF329、IFFO1、及びHOPXからなる群から選択される。特定の好ましい実施形態において、少なくともRNA発現マーカーは、S100A9、SELL、PADI4、APOBE3CA、S100A12、MMP9、FPR1、TYMP、及びSAT1からなる群から選択される遺伝子から発現される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのタンパク質は、抗原、例えば、がん関連抗原を含み、いくつかの実施形態では、少なくとも1つのタンパク質は、抗体、例えば、がん関連抗原に対する自己抗体を含む。

【0050】

いくつかの実施形態において、前記混合物中のオリゴヌクレオチドは、レポーター分子を含み、好ましい実施形態において、レポーター分子は、フルオロフォアを含む。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、フラップ配列を含む。いくつかの実施形態において、混合物は、FRETカセット、FEN-1エンドヌクレアーゼ、及び／または耐熱性DNAポリメラーゼ、好ましくは細菌DNAポリメラーゼのうちの1つまたは複数を含み。

【0051】

[定義]

本発明の技術の理解を容易にするために、いくつかの用語及び語句を下記に定義する。さらなる定義は、詳細な説明の随所に記述されている。

【0052】

本明細書及び特許請求の範囲の全体を通して、以下の用語は、文脈上特に明記されていない限り、本明細書に明示的に関連付けられる意味を取る。本明細書で使用される「一実施形態において」という語句は、必ずしも同一の実施形態を指すとは限らないが、そうである場合もある。さらに、本明細書で使用される「別の実施形態では」という語句は、必ずしも異なる実施形態を指すとは限らないが、そうである場合もある。よって、後述するように、本発明の様々な実施形態は、本発明の範囲または精神から逸脱することなく、容易に組み合わせることができる。

【0053】

さらに、本明細書で使用される場合、「または(or)」という用語は、文脈上特に明記されていない限り、包括的な「または(or)」の操作詞であり、「及び／または」という用語と均等である。「に基づく」という用語は、文脈上特に明記されていない限り、排他的ではなく、記載されていない追加の要素に基づくことを許容する。さらに、本明細書全体を通して、「a」、「an」、及び「the」の意味は、複数の指示対象を含む。「中の(in)」の意味は、「中の(in)」及び「上の(on)」を含む。

【0054】

本出願の特許請求の範囲で 사용되는「から本質的になる」という移行句は、In re Herz, 537 F.2d 549, 551-52, 190 USPQ 461, 463 (CCPA 1976)で説明されているように、請求項の範囲を、請求項に係る発明の特定の材料またはステップ及び「基本的かつ新規の特性(複数可)に実質的に影響を及ぼさないもの」に限定する。例えば、列挙された要素「から本質的になる」組成物は、列挙されていない夾雑物が存在しても、純粋な組成物、すなわち、列挙された構成要素「からなる」組成物と比較して、列挙された組成物の機能を変化させないようなレベルで、夾雑物を含み得る。

【0055】

「することができる(can)」、「し得る(could)」、「し得る(might)」、「または「してもよい(may)」などの条件付き文言は、特に明記しない限り、または使用される文脈内で別様に理解されない限り、一般に、特定の実施形態が特定の特徵、要素、及び／またはステップを含むが、他の実施形態はこれらを含まないことを示すよう意図される。よって、そのような条件付き文言は、一般に、特徴、要素、及び／または

10

20

30

40

50

ステップが1つまたは複数の実施形態に何らかのかたちで必要とされること、あるいは1つまたは複数の実施形態が、ユーザ入力またはプロンプトの有無にかかわらず、これらの特徴、要素、及び／またはステップが任意の特定の実施形態に含まれるかどうか、または任意の特定の実施形態で行われるかどうかを判断するための論理を必然的に含むことを意味することを意図するものではない。

【0056】

「X、Y、及びZのうちの少なくとも1つ」という語句などの接続的文言は、特に明記しない限り、一般に使用される文脈で、項目、用語などがX、Y、またはZのいずれであってもよいことを意味するよう理解される。よって、このような接続的文言は、一般に、特定の実施形態が少なくとも1つのX、少なくとも1つのY、及び少なくとも1つのZの存在を必要とすることを意味することを意図するものではない。

10

【0057】

本明細書で使用される程度の文言、例えば「およそ」、「約」、「概」、及び「実質的に」などの用語は、記載された値、量、または特性に近く、依然として所望の機能を果たす、または所望の結果を達成する値、量、または特性を表す。

【0058】

本明細書で使用される場合、「メチル化」とは、C5位もしくはN4位のシトシンのシトシンメチル化、N6位のアデニン、または他のタイプの核酸のメチル化を指す。典型的な *in vitro* DNA増幅法は、増幅テンプレートのメチル化パターンを保持しないため、*in vitro*で増幅されたDNAは、通常、非メチル化型である。しかしながら、「非メチル化DNA」または「メチル化DNA」は、それぞれ、元のテンプレートが非メチル化型であった増幅DNA、または元のテンプレートがメチル化型であった増幅DNAを指す場合もある。

20

【0059】

したがって、本明細書で使用される「メチル化ヌクレオチド」または「メチル化ヌクレオチド塩基」とは、ヌクレオチド塩基にメチル部分が存在し、このメチル部分が認識されている典型的なヌクレオチド塩基には存在しないことを指す。例えば、シトシンは、そのピリミジン環にメチル部分を含まないが、5-メチルシトシンは、そのピリミジン環の5位にメチル部分を含む。したがって、シトシンはメチル化ヌクレオチドではなく、5-メチルシトシンはメチル化ヌクレオチドである。別の例において、チミンは、そのピリミジン環の5位にメチル部分を含む；しかしながら、チミンはDNAの典型的なヌクレオチド塩基であるため、本明細書の目的では、チミンは、DNAに存在する場合、メチル化ヌクレオチドとはみなされない。

30

【0060】

本明細書で使用される場合、「メチル化核酸分子」は、1つまたは複数のメチル化ヌクレオチドを含む核酸分子を指す。

【0061】

本明細書で使用される場合、核酸分子の「メチル化状態」、「メチル化プロファイル」、及び「メチル化ステータス」とは、核酸分子中の1つまたは複数のメチル化ヌクレオチド塩基の存在または非存在を指す。例えば、メチル化シトシンを含む核酸分子は、メチル化されているとみなされる（例えば、核酸分子のメチル化状態は、メチル化型である）。いかなるメチル化ヌクレオチドも含まない核酸分子は、非メチル化型とみなされる。いくつかの実施形態において、核酸は、特定の遺伝子座（例えば、特定の単一CpGジヌクレオチドの遺伝子座）または遺伝子座の特定の組み合わせにおいてメチル化されていなければ、同じ遺伝子または分子中の他の遺伝子座でメチル化されていても、「非メチル化型」と特性決定され得る。

40

【0062】

特定の核酸配列のメチル化状態（例えば、本明細書に記載される遺伝子マーカーまたはDNA領域）は、配列内の全塩基のメチル化状態を示す場合もあれば、または配列内の塩基のサブセット（例えば、1つまたは複数のシトシン）のメチル化状態を示す場合もあり

50

、あるいは、配列内でメチル化が生じる位置の正確な情報を提供するか否かにかかわらず、配列内の領域のメチル化密度に関する情報を示す場合もある。本明細書で使用される場合、「マーカー遺伝子」及び「マーカー」という用語は、マーカー領域がDNAのコード領域内にあるか否かにかかわらず、ある状態、例えば、がんに関連する、DNA、RNA、またはタンパク質（または他のサンプル成分）を指すよう同義に使用される。マーカーは、例えば、調節領域、フランキング領域、遺伝子間領域などを含み得る。同様に、サンプルの任意の成分、例えばタンパク質、RNA、炭水化物、小分子などに関して使用される「マーカー」という用語は、サンプル中でアッセイする（例えば、測定または別様に特性決定する）ことができ、かつ対象または対象由来のサンプルの状態に関連する成分を指す。「メチル化マーカー」という用語は、遺伝子またはDNAのメチル化状態が、ある状態、例えばがんに関連している、遺伝子またはDNAを指す。

10

【0063】

核酸分子中のヌクレオチド遺伝子座のメチル化状態は、核酸分子中の特定の遺伝子座におけるメチル化ヌクレオチドの存在または非存在を指す。例えば、核酸分子中の7番目のヌクレオチドにおけるシトシンのメチル化状態は、核酸分子中の7番目のヌクレオチドに存在するヌクレオチドが5-メチルシトシンであるときにメチル化型である。同様に、核酸分子中の7番目のヌクレオチドにおけるシトシンのメチル化状態は、核酸分子中の7番目のヌクレオチドに存在するヌクレオチドがシトシンである（そして5-メチルシトシンではない）ときに非メチル化型である。

【0064】

メチル化ステータスは、場合により、「メチル化値」（例えば、メチル化頻度、割合、比、パーセントなどを表す）によって表される、または示されることがある。メチル化値は、例えば、メチル化依存性制限酵素による制限消化の後に存在するインタクトな核酸の量を数量化することによって、またはバイサルファイト反応後の増幅プロファイルと比較することによって、またはバイサルファイト処理済み核酸の配列と未処理の核酸の配列とを比較することによって、生成することができる。したがって、値、例えばメチル化値は、メチル化ステータスを表し、したがって、遺伝子座の複数コピーにわたるメチル化ステータスの定量的指標として使用され得る。これは、サンプル中の配列のメチル化ステータスを閾値または基準値と比較することが望ましいときに特に有用である。

20

【0065】

本明細書で使用される場合、「メチル化頻度」または「メチル化パーセント(%)」は、分子または遺伝子座がメチル化されていない場合の数と比した、分子または遺伝子座がメチル化されている場合の数を指す。

30

【0066】

したがって、メチル化状態は、核酸（例えばゲノム配列）のメチル化の状態を表す。さらに、メチル化状態は、特定のゲノム遺伝子座における核酸セグメントのメチル化に関連する特性を指す。このような特性は、このDNA配列内のシトシン(C)残基のいずれかがメチル化されているかどうか、メチル化C残基（複数可）の位置、核酸のいずれかの特定の領域全体におけるメチル化Cの頻度またはパーセンテージ、及び、例えばアレルの起源における差異に起因する、メチル化におけるアレルの差異を含むが、これらに限定されない。「メチル化状態」、「メチル化プロファイル」、及び「メチル化ステータス」という用語は、生物学的サンプル中の核酸のいずれかの特定の領域全体における、メチル化Cまたは非メチル化Cの相対濃度、絶対濃度、またはパターンも指す。例えば、核酸配列内のシトシン(C)残基（複数可）がメチル化されている場合、「高メチル化型」または「メチル化が増加している」ということがある一方、DNA配列内のシトシン(C)残基（複数可）がメチル化されていない場合、「低メチル化型」または「メチル化が減少している」ということがある。同様に、核酸配列内のシトシン(C)残基（複数可）が、別の核酸配列（例えば、異なる領域由来または異なる個体由来など）と比較してメチル化されている場合、その配列は、他方の核酸配列と比較して高メチル化型である、またはメチル化が増加しているとみなされる。代替的に、DNA配列内のシトシン(C)残基（複数可）

40

50

が、別の核酸配列（例えば、異なる領域由来または異なる個体由来など）と比較してメチル化されていない場合、その配列は、他方の核酸配列と比較して低メチル化型である、またはメチル化が減少しているとみなされる。さらに、本明細書で使用される場合、「メチル化パターン」という用語は、核酸の領域にわたるメチル化ヌクレオチド及び非メチル化ヌクレオチドの集合部位を指す。2つの核酸は、メチル化ヌクレオチド及び非メチル化ヌクレオチドの数が領域全体で同じまたは同様であるが、メチル化ヌクレオチド及び非メチル化ヌクレオチドの位置が異なる場合、同じまたは同様のメチル化頻度またはメチル化パーセントを有するが、異なるメチル化パターンを有し得る。配列は、メチル化の程度が異なる（例えば、一方のメチル化が他方と比して増加または減少している）、頻度が異なる、またはパターンが異なる場合、「可変メチル化」、または「メチル化における差異」を有する、または「異なるメチル化状態」を有するといわれる。「可変メチル化」という用語は、がん陰性サンプル中の核酸メチル化のレベルまたはパターンと比較した、がん陽性サンプル中の核酸メチル化のレベルまたはパターンにおける差異を指す。手術後にがんが再発した患者と再発していない患者との間のレベルまたはパターンにおける差異を指す場合もある。可変メチル化、及びDNAメチル化の特異的なレベルまたはパターンは、例えば、正確なカットオフまたは予測特性を定義すれば、予後バイオマーカー及び予測バイオマーカーとなる。

10

【0067】

メチル化状態の頻度は、個体集団または単一個体由来のサンプルを表すために使用することができる。例えば、50%のメチル化状態の頻度を有するヌクレオチド遺伝子座は、事例の50%においてメチル化されており、事例の50%においてメチル化されていない。このような頻度を使用して、例えば、ヌクレオチド遺伝子座または核酸領域が個体集団または核酸の集合においてメチル化されている程度を表すことができる。よって、核酸分子の第1の集団またはプールにおけるメチル化が、核酸分子の第2の集団またはプールにおけるメチル化と異なる場合、第1の集団またはプールのメチル化状態の頻度は、第2の集団またはプールのメチル化状態の頻度と異なる。このような頻度は、例えば、ヌクレオチド遺伝子座または核酸領域が単一の個体においてメチル化されている程度を表すために使用することもできる。例えば、このような頻度を使用して、組織サンプル中の細胞群が、ヌクレオチド遺伝子座または核酸領域においてメチル化型または非メチル化型である程度を表すことができる。

20

30

【0068】

本明細書で使用される「ヌクレオチド遺伝子座」とは、核酸分子中のヌクレオチドの位置を指す。メチル化ヌクレオチドのヌクレオチド遺伝子座とは、核酸分子中のメチル化ヌクレオチドの位置を指す。

【0069】

典型的に、ヒトDNAのメチル化は、シトシンがグアニンの5'に位置している隣接するグアニン及びシトシンを含むジヌクレオチド配列（CpGジヌクレオチド配列とも称される）において生じる。ヒトゲノムにおいて、CpGジヌクレオチド内のほとんどのシトシンはメチル化されているが、CpGアイランドとして知られる、特定のCpGジヌクレオチドリッチなゲノム領域内では、いくつかはメチル化されていないままである（例えば、Antequera, et al. (1990) Cell 62: 503-514を参照のこと）。

40

【0070】

本明細書で使用される場合、「CpGアイランド」は、全ゲノムDNAと比較して増加した数のCpGジヌクレオチドを含むゲノムDNAのG:Cリッチ領域を指す。CpGアイランドは、少なくとも100、200、またはそれ以上の塩基対の長さであり得、ここで、領域のG:C含有量は少なくとも50%であり、予想頻度に対する観察されるCpG頻度の比は0.6である；いくつかの事例において、CpGアイランドは、少なくとも500塩基対の長さであり得、ここで、領域のG:C含有量は少なくとも55%であり、予想頻度に対する観察されるCpG頻度の比は0.65である。予想頻度に対する観察され

50

る CpG 頻度は、Gardiner-Garden et al (1987) J. Mol. Biol. 196: 261-281 に提示される方法に従って算出することができる。例えば、予想頻度に対する観察される CpG 頻度は、式 $R = (A \times B) / (C \times D)$ に従って算出することができ、式中、R は、予想頻度に対する観察される CpG 頻度の比であり、A は、分析される配列内の CpG ジヌクレオチドの数であり、B は、分析される配列内のヌクレオチドの総数であり、C は、分析される配列内の C ヌクレオチドの総数であり、D は、分析される配列内の G ヌクレオチドの総数である。メチル化状態は、典型的には、CpG アイランド中で、例えばプロモーター領域において判定される。しかし、ヒトゲノムにおける他の配列が CpA 及び CpT などの DNA メチル化を起こしやすいことは理解されよう (Ramsahoye (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 5237-5242、Salmon and Kaye (1970) Biochim. Biophys. Acta. 204: 340-351、Grafstrom (1985) Nucleic Acids Res. 13: 2827-2842、Nyce (1986) Nucleic Acids Res. 14: 4353-4367、Woodcock (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 145: 888-894 を参照のこと)。

10

【0071】

本明細書で使用される場合、「メチル化特異的試薬」とは、核酸分子のメチル化状態に応じて核酸分子のヌクレオチドを修飾する試薬を指し、すなわち、メチル化特異的試薬は、核酸分子のメチル化状態を反映する様式で核酸分子のヌクレオチド配列を変化させ得る化合物もしくは組成物または他の薬剤を指す。このような試薬で核酸分子を処理する方法は、核酸分子を試薬と接触させ、必要により追加のステップと併せて、ヌクレオチド配列の所望の変化を達成することを含み得る。このような方法は、非メチル化ヌクレオチド（例えば、各非メチル化シトシン）が異なるヌクレオチドへと修飾されるような様式で適用され得る。例えば、いくつかの実施形態において、このような試薬は、非メチル化シトシンヌクレオチドを脱アミノ化して、デオキシウラシル残基を生成することができる。例示的な試薬はバイサルファイト試薬である。

20

【0072】

「バイサルファイト試薬」という用語は、本明細書で開示されるように、メチル化型及び非メチル化型の CpG ジヌクレオチド配列を区別するために有用な、バイサルファイト、二亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、またはこれらの組み合わせを含む試薬を指す。前記処理の方法は、当技術分野（例えば、各々が参照により全体として本明細書に組み込まれる PCT/EP2004/011715 及び WO2013/116375）において知られている。いくつかの実施形態において、バイサルファイト処理は、n-アルキレングリコールもしくはジエチレングリコールジメチルエーテル（DME）などであるがこれらに限定されない変性溶媒の存在下で、またはジオキサンもしくはジオキサン誘導体の存在下で行われる。いくつかの実施形態において、変性溶媒は、1%～35%（v/v）の濃度で使用する。いくつかの実施形態において、バイサルファイト反応は、クロマン誘導体、例えば、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8, -テトラメチルクロマン2-カルボン酸、またはトリヒドロキシ安息香酸及びその誘導体、例えば、没食子酸（参照により全体として本明細書に組み込まれる PCT/EP2004/011715 を参照のこと）などであるがこれらに限定されない、スカベンジャーの存在下で実施される。特定の好ましい実施形態において、バイサルファイト反応は、例えば WO2013/116375 に記載されているように、亜硫酸水素アンモニウムでの処理を含む。

30

40

【0073】

メチル化特異的試薬による核酸ヌクレオチド配列の変化は、各メチル化ヌクレオチドが異なるヌクレオチドへと修飾された核酸分子をもたらすこともある。

【0074】

「メチル化アッセイ」という用語は、核酸配列内の 1 つまたは複数の CpG ジヌクレオ

50

チド配列のメチル化状態を判定するための任意のアッセイを指す。

【0075】

本明細書で使用される場合、所与のマーカー（または一緒に使用されるマーカーのセット）の「感度」は、新生物性サンプルと非新生物性サンプルとを区別する閾値を上回るDNAメチル化値を報告するサンプルのパーセンテージを指す。いくつかの実施形態において、陽性は、閾値（例えば、疾患と関連する範囲）を上回るDNAメチル化値を報告する、組織学的に確認された新生物形成と定義され、偽陰性は、閾値（例えば、疾患なしと関連する範囲）を下回るDNAメチル化値を報告する、組織学的に確認された新生物形成と定義される。したがって、感度の値は、既知の疾患サンプルから得られた所与のマーカーについてのDNAメチル化測定値が疾患関連測定値の範囲内にある確率を反映する。ここで定義されるように、算出された感度値の臨床的関連性は、所与のマーカーが臨床状態を有する対象に適用されたときにその状態の存在を検出する確率の推定を表す。

10

【0076】

本明細書で使用される場合、所与のマーカー（または一緒に使用されるマーカーのセット）の「特異性」は、新生物性サンプルと非新生物性サンプルとを区別する閾値を下回るDNAメチル化値を報告する非新生物性サンプルのパーセンテージを指す。いくつかの実施形態において、陰性は、閾値（例えば、疾患なしと関連する範囲）を下回るDNAメチル化値を報告する、組織学的に確認された非新生物性サンプルと定義され、偽陰性は、閾値（例えば、疾患と関連する範囲）を上回るDNAメチル化値を報告する、組織学的に確認された非新生物性サンプルと定義される。したがって、特異性の値は、既知の非新生物性サンプルから得られた所与のマーカーについてのDNAメチル化測定値が非疾患関連測定値の範囲内にある確率を反映する。ここで定義されるように、算出された特異性値の臨床的関連性は、所与のマーカーが臨床状態を有しない患者に適用されたときにその状態の非存在を検出する確率の推定を表す。

20

【0077】

本明細書で使用される場合、「選択されたヌクレオチド」は、核酸分子に典型的に存在する4つのヌクレオチド（DNAの場合はC、G、T、及びA、RNAの場合はC、G、U、及びA）のうちの1つのヌクレオチドを指し、典型的に存在するヌクレオチドのメチル化誘導体を含み得る（例えば、Cが選択されたヌクレオチドである場合、選択されたヌクレオチドの意味には、メチル化型と非メチル化型の両方のCが含まれる）が、メチル化型の選択されたヌクレオチドとは、典型的にメチル化されているヌクレオチドを具体的に指し、非メチル化型の選択されたヌクレオチドとは、典型的に非メチル化型形態で存在するヌクレオチドを具体的に指す。

30

【0078】

「メチル化特異的制限酵素」という用語は、その認識部位のメチル化状態に依存して核酸を選択的に消化する制限酵素を指す。認識部位がメチル化されていない場合またはヘミメチル化されている場合に特異的に切断する制限酵素（メチル化感受性酵素）の場合、認識部位が一方または両方の鎖でメチル化されていれば、切断は生じない（または著しく低減した効率で生じる）。認識部位がメチル化されている場合にのみ特異的に切断する制限酵素（メチル化依存性酵素）の場合、認識部位がメチル化されていなければ、切断は生じない（または著しく低減した効率で生じる）。好ましいのは、認識配列がCGジヌクレオチドを含む（例えば、認識配列がCGCGまたはCCCCGGGなどの）メチル化特異的制限酵素である。いくつかの実施形態でさらに好ましいのは、このジヌクレオチド中のシトシンが炭素原子C5においてメチル化されている場合に切断しない制限酵素である。

40

【0079】

「プライマー」という用語は、例えば、制限消化物から核酸断片として天然に発生するか、または合成的に生成されるかにかかわらず、核酸テンプレート鎖に相補的なプライマー伸長産物の合成が誘導される条件下（例えば、ヌクレオチド及びDNAポリメラーゼなどの誘導剤の存在下、ならびに好適な温度及びpH）におかれたとき、合成の開始点として作用することができるオリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、最大の増幅効率のた

50

めに一本鎖であることが好ましいが、代替的に二本鎖であってもよい。二本鎖の場合、プライマーはまず、伸長産物を調製するために使用される前に、その鎖を分離させるよう処理される。好ましくは、プライマーは、オリゴデオキシリボヌクレオチドである。一般に、プライマーは、誘導剤の存在下で伸長産物の合成をプライミングするのに十分な長さである。プライマーの正確な長さは、温度、プライマー供給源、及び方法の使用を含む、多くの要因に依存する。

【0080】

「プローブ」という用語は、精製された制限消化物におけるように天然に発生するか、または合成的に、組換えで、もしくはPCR増幅によって生成されるかにかかわらず、別の目的のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチド（例えば、ヌクレオチドの配列）を指す。プローブは、一本鎖または二本鎖であり得る。プローブは、特定の遺伝子配列の検出、同定、及び単離において有用である（例えば、「捕捉プローブ」）。本発明で使用される任意のプローブは、いくつかの実施形態において、酵素（例えば、ELISA、ならびに酵素ベースの組織化学的アッセイ）、蛍光性、放射性、及び発光性のシステムを含むがこれらに限定されない、任意の検出システムにおいて検出可能であるように、任意の「レポーター分子」で標識されてもよいことが想定される。本発明がいずれかの特定の検出システムまたは標識に限定されることを意図しない。

【0081】

本明細書で使用される「標的」という用語は、例えば、プローブ結合、増幅、単離、捕捉などによって、他の核酸から選別されることが求められる核酸を指す。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応に関して使用される場合、「標的」は、ポリメラーゼ連鎖反応に使用されるプライマーが結合する核酸の領域を指し、一方、標的DNAが増幅されないアッセイで使用される場合、例えば、侵襲的切断アッセイのいくつかの実施形態において、標的は、プローブ及び侵襲性オリゴヌクレオチド（例えば、INVADEオリゴヌクレオチド）が結合して侵襲的切断構造を形成する部位を含み、その結果、標的核酸の存在を検出することができる。「セグメント」は、標的配列内の核酸の領域として定義される。二本鎖核酸に関して使用される場合、「標的」という用語は、二重鎖標的の特定の鎖、例えば、コード鎖に限定されず、例えば、二本鎖遺伝子または参照DNAの一方または両方の鎖に関して使用され得る。

【0082】

本明細書で使用される場合、血液由来の核酸に関して使用される「セルフリー」及び「循環セルフリー」という用語は、同義に使用され、血液中に見出されるが血液中の細胞内にはない核酸、例えば、DNA及びRNA種を指す。血液から抽出された核酸に関して本明細書で使用されるこれらの用語は、対象からサンプルを採取する前、及び血液サンプルから核酸を抽出する前の、核酸の性質及び位置を指す。

【0083】

「マーカー」という用語は、本明細書で使用される場合、例えば、マーカー物質の存在、非存在、または状態（例えば、メチル化状態）に基づいて、非正常細胞（例えば、がん細胞）を正常細胞（非癌性細胞）から区別するために使用され得る物質（例えば、核酸、もしくは核酸の領域、またはタンパク質）を指す。本明細書で使用される場合、マーカーの「正常な」メチル化とは、正常細胞、例えば、非癌性細胞に典型的に見られるメチル化の程度を指す。

【0084】

本明細書で使用される「新生物」という用語は、組織のあらゆる新しく異常な増殖を指し、がんを含むがこれに限定されない。よって、新生物は前悪性新生物または悪性新生物であり得る。

【0085】

「新生物特異的マーカー」という用語は、本明細書で使用される場合、新生物の存在を示すために使用され得る任意の生物学的な材料または要素を指す。生物学的材料の例は、核酸、ポリペプチド、炭水化物、脂肪酸、細胞成分（例えば、細胞膜及びミトコンドリア

10

20

30

40

50

）、及び全細胞を含むが、これらに限定されない。いくつかの事例において、マーカーは、特定の核酸領域（例えば、遺伝子、遺伝子内領域、特定の遺伝子座など）である。マーカーである核酸の領域は、例えば、「マーカー遺伝子」、「マーカー領域」、「マーカー配列」、「マーカー遺伝子座」などと呼ばれることがある。

【0086】

「サンプル」という用語は、その最も広い意味で使用される。ある意味では、動物の細胞または組織または体液を指す場合がある。別の意味では、生物学的サンプル及び環境的サンプルだけでなく、任意の供給源から得られた標本または培養物を指す。生物学的サンプルは、植物または動物（ヒトを含む）から得ることができ、例えば、液体、固体、組織、及び気体を包含する。環境的サンプルは、表面物質、土壌、水、及び工業用サンプルなどの環境物質を含む。これらの例は、本発明に適用可能なサンプルのタイプを限定するものと解釈されてはならない。サンプルに関して本明細書で使用される場合、供給源または対象から、例えば患者から採取された「サンプル」という用語は、単一の物理的検体に限定されず、複数の部分で採取されたサンプルも包含し、例えば、血液の「サンプル」は、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の異なる採血チューブもしくは他の採血デバイス（例えばバッグ）、または異なる採血デバイスの組み合わせで採取されてもよい。

【0087】

本明細書で使用される場合、「患者」または「対象」という用語は、本技術によって提供される様々な検査の対象となる生物を指す。「対象」という用語は、動物、好ましくは、ヒトを含む哺乳動物を含む。好ましい実施形態において、対象は霊長動物である。さらに好ましい実施形態において、対象はヒトである。さらに診断方法に関しては、好ましい対象は、脊椎動物対象である。好ましい脊椎動物は温血性であり、好ましい温血性脊椎動物は哺乳動物である。好ましい哺乳動物は、最も好ましくはヒトである。本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、ヒトと動物の両方の対象を含む。よって、獣医学的治療用途が本明細書で提供される。したがって、本発明の技術は、ヒトなどの哺乳動物、ならびに絶滅の危機に瀕しているために重要なシベリアトラなどの哺乳動物、ヒトによる消費のために農場で飼養される動物などの経済的に重要な動物、及び／またはペットとしてもしくは動物園で飼育される動物といった、ヒトにとって社会的に重要な動物の診断のために提供される。このような動物の例は、ネコ及びイヌなどの肉食動物、ブタ、雄ブタ、及びイノシシを含むブタ類、ウシ、雄ウシ、ヒツジ、キリン、シカ、ヤギ、バイソン、及びラクダなどの反芻動物及び／または有蹄類動物、ひれ足動物、ならびにウマを含むが、これらに限定されない。よって、家畜化されたブタ類、反芻動物、有蹄類動物、ウマ（競走馬を含む）などを含むがこれらに限定されない家畜の診断及び治療も提供される。本明細書において開示される主題は、対象の肺癌を診断するためのシステムをさらに含む。このシステムは、例えば、生物学的サンプルの採取元である対象における肺癌リスクのスクリーニングまたは肺癌の診断のために使用され得る市販のキットとして提供され得る。本発明の技術に従って提供される例示的なシステムは、本明細書に記載されるマーカーのメチル化状態を評価することを含む。

【0088】

核酸の文脈における「増幅する」または「増幅」という用語は、典型的には少量のポリヌクレオチド（例えば、単一のポリヌクレオチド分子）から始まり、増幅産物またはアンプリコンが一般に検出可能である、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの一部分の複数コピーの生成を指す。ポリヌクレオチドの増幅は、多様な化学的及び酵素的なプロセスを包含する。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）またはリガーゼ連鎖反応（LCR；例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる米国特許第5,494,810号を参照のこと）における、標的またはテンプレートDNA分子の1コピーまたは数コピーからの、複数のDNAコピーの生成は、増幅の形態である。さらなるタイプの増幅は、アレル特異的PCR（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる、米国特許第5,639,611号を参照のこと）、アセンブリPCR（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる、米国特許第5,965,408号を参照のこと）、ヘリカーゼ依

存性増幅（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる、米国特許第7,662,594号を参照のこと）、ホットスタートPCR（例えば、各々が参照により全体として本明細書に組み込まれる、米国特許第5,773,258号及び同第5,338,671号を参照のこと）、配列間特異的PCR、インバースPCR（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる、Triglia, et al. (1988) Nucleic Acids Res., 16:8186を参照のこと）、ライゲーション媒介性PCR（例えば、各々が参照により全体として本明細書に組み込まれる、Guilfoyle, R. et al., Nucleic Acids Research, 25:1854-1858 (1997)、米国特許第5,508,169号を参照のこと）、メチル化特異的PCR（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる、Herman, et al., (1996) PNAS 93(13) 9821-9826を参照のこと）、ミニプライマーPCR、マルチプレックスライゲーション依存性プローブ増幅（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる、Schouten, et al., (2002) Nucleic Acids Research 30(12): e57を参照のこと）、マルチプレックスPCR（例えば、各々が参照により全体として本明細書に組み込まれる、Chamberlain, et al., (1988) Nucleic Acids Research 16(23) 11141-11156、Ballabio, et al., (1990) Human Genetics 84(6) 571-573、Hayden, et al., (2008) BMC Genetics 9:80を参照のこと）、ネステッドPCR、オーバーラップ伸長PCR（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる、Higuchi, et al., (1988) Nucleic Acids Research 16(15) 7351-7367を参照のこと）、リアルタイムPCR（例えば、各々が参照により全体として本明細書に組み込まれる、Higuchi, et al., (1992) Biotechnology 10:413-417、Higuchi, et al., (1993) Biotechnology 11:1026-1030を参照のこと）、逆転写PCR（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる、Bustin, S. A. (2000) J. Molecular Endocrinology 25:169-193を参照のこと）、固相PCR、TAIL (thermal asymmetric interlaced) PCR、及びタッチダウンPCR（例えば、各々が参照により全体として本明細書に組み込まれる、Don, et al., Nucleic Acids Research (1991) 19(14) 4008、Roux, K. (1994) Biotechniques 16(5) 812-814、Hecker, et al., (1996) Biotechniques 20(3) 478-485を参照のこと）を含むが、これらに限定されない。ポリヌクレオチドの増幅は、デジタルPCRを使用して達成することもできる（例えば、Kalinina, et al., Nucleic Acids Research. 25;1999-2004, (1997)、Vogelstein and Kinzler, Proc Natl Acad Sci USA. 96;9236-41, (1999)、国際特許公開第WO05023091号A2、米国特許出願公開第20070202525号を参照のこと；これらは各々、参照により全体として本明細書に組み込まれる）。

【0089】

「ポリメラーゼ連鎖反応」（「PCR」）という用語は、クローニングまたは精製なしで、ゲノムまたは他のDNAもしくはRNAの混合物における標的配列のセグメントの濃度を増加させる方法を記載している、K. B. Mullisの米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号、及び同第4,965,188号の方法を指す。標的配列を増幅するこのプロセスは、大過剰の2つのオリゴヌクレオチドプライマーを、所望の標的配列を含むDNA混合物に導入した後に、DNAポリメラーゼの存在下でサーマルサイクリングを正確な順番で行うことからなる。2つのプライマーは、二本鎖標的配列の

10

20

30

40

50

それぞれの鎖に相補的である。増幅をもたらすには、混合物を変性し、次いでプライマーを標的分子内の相補配列にアニーリングする。アニーリング後、プライマーをポリメラーゼで伸長させて、新しい相補鎖ペアを形成させる。変性、プライマーアニーリング、及びポリメラーゼ伸長のステップは、所望の標的配列の増幅されたセグメントを高濃度で得るために、何度も繰り返すことができる（例えば、変性、アニーリング及び伸長が1「サイクル」を構成する；多数の「サイクル」を用いてよい）。所望の標的配列の増幅されたセグメントの長さは、プライマーの互いに対する相対位置によって判定され、したがって、この長さは制御可能なパラメータである。プロセスの繰り返しの態様のために、この方法は「ポリメラーゼ連鎖反応」（「PCR」）と呼ばれる。標的配列の所望の増幅されたセグメントが混合物中の（濃度に関して）主要な配列になるので、それらは「PCR増幅された」と言われ、「PCR産物」または「アンプリコン」である。当業者には、「PCR」という用語が、例えば、リアルタイムPCR、ネステッドPCR、逆転写PCR（RT-PCR）、単一プライマーPCR及びAP-PCR（arbitrarily primed PCR）などを使用する、最初に記載された方法の多くの変形を包含することが理解されよう。

10

20

30

40

50

【0090】

本明細書で使用される場合、「核酸検出アッセイ」という用語は、目的の核酸のヌクレオチド組成を判定する任意の方法を指す。核酸検出アッセイは、DNAシーケンシング方法、プローブハイブリダイゼーション方法、構造特異的切断アッセイ（例えば、INVAADERアッセイ（Hologic, Inc.）であり、例えば、各々があらゆる目的で参照により全体として本明細書に組み込まれる、米国特許第5,846,717号、同第5,985,557号、同第5,994,069号、同第6,001,567号、同第6,090,543号、及び同第6,872,816号、Lyamichev et al., Nat. Biotech., 17:292（1999）、Hall et al., PNAS, USA, 97:8272（2000）、ならびに米国特許第9,096,893号に記載されている）、酵素ミスマッチ切断方法（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる、Variagenics、米国特許第6,110,684号、同第5,958,692号、同第5,851,770号）、上述のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、分岐ハイブリダイゼーション方法（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる、Chiron、米国特許第5,849,481号、同第5,710,264号、同第5,124,246号、及び同第5,624,802号）、ローリングサークル複製（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる、米国特許第6,210,884号、同第6,183,960号、及び同第6,235,502号）、NASBA（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる、米国特許第5,409,818号）、分子ビーコン技術（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる、米国特許第6,150,097号）、E-sensor技術（参照により全体として本明細書に組み込まれる、Motorola、米国特許第6,248,229号、同第6,221,583号、同第6,013,170号、及び同第6,063,573号）、サイクリングプローブ技術（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる、米国特許第5,403,711号、同第5,011,769号、及び同第5,660,988号）、Dade Behringシグナル増幅方法（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる、米国特許第6,121,001号、同第6,110,677号、同第5,914,230号、同第5,882,867号、及び同第5,792,614号）、リガーゼ連鎖反応（例えば、Baranay Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 189-93（1991））、及びサンドイッチハイブリダイゼーション方法（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる、米国特許第5,288,609号）を含むが、これらに限定されない。

【0091】

いくつかの実施形態において、標的核酸が増幅され（例えばPCRにより）、増幅された核酸が、侵襲的切断アッセイを使用して同時に検出される。増幅アッセイと組み合わせ

た検出アッセイ（例えば、侵襲的切断アッセイ）を行うよう構成されたアッセイが、あらゆる目的で参照により全体として本明細書に組み込まれる米国特許第 9, 096, 893 号に記載されている。QuARTS 法と呼ばれる、増幅と侵襲的切断を合わせたさらなる検出構成が、例えば、米国特許第 8, 361, 720 号、同第 8, 715, 937 号、同第 8, 916, 344 号、同第 9, 212, 392 号、及び米国特許出願第 15 / 841, 006 号に記載されており、これらは各々、あらゆる目的で参照により本明細書に組み込まれる。本明細書で使用される「侵襲的切断構造」という用語は、i) 標的核酸、ii) 上流核酸（例えば、侵襲的または「INVADER」オリゴヌクレオチド）、及び iii) 下流核酸（例えば、プローブ）を備える切断構造を指し、上流及び下流核酸は、標的核酸の連続領域にアニーリングし、上流核酸の 3' 部分と、下流核酸と標的核酸との間に生じた二重鎖との間に、重複が生じる。重複は、上流核酸の重複する塩基（複数可）が標的核酸と相補的であるか否かにかかわらず、また、これらの塩基が天然塩基か非天然塩基にかかわらず、上流及び下流核酸における 1 つまたは複数の塩基が、標的核酸塩基に対して同じ位置を占めるところで生じる。いくつかの実施形態において、下流の二重鎖と重複する上流核酸の 3' 部分は、例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる米国特許第 6, 090, 543 号に開示されているように、例えば芳香環構造などの、非塩基化学部分である。いくつかの実施形態において、核酸のうちの 1 つまたは複数の塩基は、例えば、核酸ステムループなどの共有結合を介して、または非核酸化学結合（例えば、多炭素鎖）を介して、互いに結合していてもよい。本明細書で使用される場合、「フラップエンドヌクレアーゼアッセイ」という用語は、上述のように、「INVADER」侵襲的切断アッセイ及び QuARTS アッセイを含む。

10

20

【0092】

「プローブオリゴヌクレオチド」または「フラップオリゴヌクレオチド」という用語は、フラップアッセイに関して使用される場合、侵襲性オリゴヌクレオチドの存在下で標的核酸と相互作用して切断構造を形成するオリゴヌクレオチドを指す。

【0093】

「侵襲性オリゴヌクレオチド」という用語は、プローブと標的核酸との間のハイブリダイゼーション領域に隣接する位置で標的核酸にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを指し、侵襲性オリゴヌクレオチドの 3' 末端は、プローブと標的との間のハイブリダイゼーション領域と重複する部分（例えば、化学部分、あるいは 1 つまたは複数のヌクレオチド）を含む。侵襲性オリゴヌクレオチドの 3' 末端ヌクレオチドは、標的のヌクレオチドと塩基対を形成する場合もしない場合もある。いくつかの実施形態において、侵襲性オリゴヌクレオチドは、その 3' 末端に、標的鎖にアニーリングするプローブオリゴヌクレオチドの一部分の 5' 末端に位置する配列と実質的に同じである配列を含む。

30

【0094】

本明細書で使用される「フラップエンドヌクレアーゼ」または「FEN」という用語は、一方の鎖に一本鎖 5' オーバーハングすなわちフラップを含む二重鎖を有する DNA 構造に対して、構造特異的エンドヌクレアーゼとして作用し、この一方の鎖を、もう一方の核酸鎖によって（例えば、一本鎖 DNA と二本鎖 DNA との間の接合部に重複するヌクレオチドが存在するように）変位させる、核酸分解酵素、典型的には 5' ヌクレアーゼのクラスを指す。FEN は、一本鎖 DNA と二本鎖 DNA との接合部におけるホスホジエステル結合の加水切断を触媒し、オーバーハング、すなわちフラップを遊離させる。フラップエンドヌクレアーゼは、Ceska 及び Savers (Trends Biochem. Sci. 1998 23: 331-336) ならびに Liu et al (Annu. Rev. Biochem. 2004 73: 589-615; 参照により全体として本明細書に組み込まれている) によって概説されている。FEN は、個々の酵素、マルチサブユニット酵素である場合もあれば、別の酵素またはタンパク質複合体（例えば、DNA ポリメラーゼ）の活性として存在する場合もある。

40

【0095】

フラップエンドヌクレアーゼには耐熱性があり得る。例えば、アーカイブの好熱菌生物

50

由来の F E N - 1 フラップエンドヌクレアーゼには、典型的に耐熱性がある。本明細書で使用される場合、「F E N - 1」という用語は、真核生物または古細菌生物由来の非ポリメラーゼフラップエンドヌクレアーゼを指す。例えば、W O 0 2 / 0 7 0 7 5 5、及び米国特許第 7, 1 2 2, 3 6 4 号、及び K a i s e r M . W . , e t a l . (1 9 9 9) J . B i o l . C h e m . , 2 7 4 : 2 1 3 8 7 を参照のこと。これらは全て、あらゆる目的で参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【0096】

本明細書で使用される場合、「切断されたフラップ」という用語は、フラップアッセイの切断産物である一本鎖オリゴヌクレオチドを指す。

【0097】

「カセット」という用語は、フラップ切断反応に関して使用される場合、例えば、フラップ切断アッセイで形成された、一次または第 1 の切断構造における、フラップまたはプローブオリゴヌクレオチドの切断に応答して検出可能シグナルを生成するよう構成されたオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの組み合わせを指す。好ましい実施形態において、カセットは、フラップオリゴヌクレオチドの切断により生成された非標的切断産物にハイブリダイズして、第 2 の重複する切断構造を形成し、その結果、カセットが、同じ酵素、例えば F E N - 1 エンドヌクレアーゼによって切断され得るようにする。

【0098】

いくつかの実施形態において、カセットは、ヘアピン部分（すなわち、カセットオリゴヌクレオチドの一部が反応条件下で同じオリゴヌクレオチドの第 2 の部分にハイブリダイズして二重鎖を形成する領域）を含む単一のオリゴヌクレオチドである。他の実施形態では、カセットは、反応条件下で二重鎖を形成することができる相補的部分を含むオリゴヌクレオチドを少なくとも 2 つ含む。好ましい実施形態において、カセットは、標識、例えばフルオロフォアを含む。特に好ましい実施形態では、カセットは、F R E T 効果を生み出す標識された部分を含む。

【0099】

本明細書で使用される場合、「F R E T」という用語は、蛍光共鳴エネルギー移動、すなわち、複数の部分（例えばフルオロフォア）が、例えば、それらの間で、またはフルオロフォアからフルオロフォア以外（例えばクエンチャー分子）に、エネルギーを移動させるプロセスを指す。状況によっては、F R E T は、励起されたドナーフルオロフォアが、より低いエネルギーのアクセプターフルオロフォアに、短距離（例えば約 1 0 n m 以下）の双極子間相互作用を介してエネルギーを移動させることを伴う。他の状況では、F R E T は、ドナーからの蛍光エネルギーの損失、及びアクセプターフルオロフォアの蛍光の増加を伴う。さらに他の形態の F R E T では、エネルギーが、励起されたドナーフルオロフォアから、非蛍光分子（例えば、「ダーク」クエンチ分子、例えば、「B H Q」クエンチャー、B i o s e a r c h T e c h n o l o g i e s）へと交換され得る。F R E T は、当業者に知られており、説明されている（例えば、各々が参照により全体として本明細書に組み込まれる、S t r y e r e t a l . , 1 9 7 8 , A n n . R e v . B i o c h e m . , 4 7 : 8 1 9 , S e l v i n , 1 9 9 5 , M e t h o d s E n z y m o l . , 2 4 6 : 3 0 0 , O r p a n a , 2 0 0 4 B i o m o l E n g 2 1 , 4 5 - 5 0 , O l i v i e r , 2 0 0 5 M u t a n t R e s 5 7 3 , 1 0 3 - 1 1 0 を参照のこと）。

【0100】

例示的なフラップ検出アッセイでは、侵襲性オリゴヌクレオチド及びフラップオリゴヌクレオチドを標的核酸にハイブリダイズさせて、上述のように重複を有する第 1 の複合体を生成する。不對の「フラップ」がフラップオリゴヌクレオチドの 5 ' 末端に含まれている。第 1 の複合体は、フラップオリゴヌクレオチドを切断して 5 ' フラップ部分を遊離させる、フラップエンドヌクレアーゼ、例えば F E N - 1 エンドヌクレアーゼの基質である。二次反応では、遊離した 5 ' フラップ産物が、F R E T カセット上の侵襲性オリゴヌクレオチドとして機能し、F R E T カセットが切断されるようにフラップエンドヌクレアー

10

20

30

40

50

ぜによって認識される構造を再び作出する。FRETカセットの切断によってフルオロフォアとクエンチャーとが分離すると、バックグラウンドの蛍光を超える検出可能な蛍光シグナルが生成される。

【0101】

本明細書で使用される場合、「PCR-フラップアッセイ」という用語は、PCRによる標的増幅と、増幅された標的DNAを含む第1の重複切断構造、ならびに、第1の重複切断構造から切断された5'フラップ、及び標識されたレポーターオリゴヌクレオチド、例えば、「FRETカセット」または5'ヘアピンFRETレポーターオリゴヌクレオチドを含む、第2の重複切断構造の形成による、増幅DNAの検出とを組み合わせたアッセイ構成を指す。本明細書で使用されるPCR-フラップアッセイにおいて、アッセイ試薬は、DNAポリメラーゼ、FEN-1エンドヌクレアーゼ、標的核酸に相補的な部分を含む一次プローブ、及びFRETカセットまたは5'ヘアピンFRETレポーターを含む混合物を含み、標的核酸がPCRにより増幅され、増幅された核酸が同時に検出される（すなわち、検出が標的増幅の過程で起こる）。PCR-フラップアッセイは、米国特許第8,361,720号、同第8,715,937号、及び同第8,916,344号に記載されているQuARTSアッセイ、米国特許第10,648,025号に記載されている、より長い標的的特異的領域を有するプローブオリゴヌクレオチド（Long probe Quantitative Amplified Signal、「LQAS」）を使用したフラップアッセイ、ならびに米国特許第9,096,893号の（例えば、同特許の図1に図解されているような）増幅アッセイを含み、これらは各々、参照により全体として本明細書に組み込まれる。

10

20

【0102】

本明細書で使用される場合、「PCR-フラップアッセイ試薬」という用語は、PCR-フラップアッセイにおいて標的配列を検出するための1つまたは複数の試薬を指し、この試薬は、DNAポリメラーゼ、FEN-1エンドヌクレアーゼ、及びFRETカセットまたは5'ヘアピンFRETレポーターを含む混合物中に、標的配列の存在下で標的核酸の増幅及びフラップ切断構造の形成に関与することが可能な核酸分子を含む。

【0103】

核酸増幅またはシグナル増幅の検出に関して本明細書で使用される「リアルタイム」という用語は、例えばインキュベーションまたはサーマルサイクリング中の反応において、反応の進行中に産物またはシグナルの蓄積を検出または測定することを指す。このような検出または測定は、連続的に行ってもよく、または増幅反応の進行中の複数の別個の点で行ってもよく、または組み合わせであってもよい。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応において、検出（例えば蛍光の検出）は、サーマルサイクリングの全体または一部で連続的に行ってもよく、あるいは1つまたは複数のサイクル中の1つまたは複数の点で一過性に行ってもよい。いくつかの実施形態において、PCRまたはQuARTS反応のリアルタイム検出は、複数のサイクルの各々、または全てのサイクルにおいて、同じ点（例えば、サイクル中のある時点、またはサイクル中の温度ステップ）で蛍光のレベルを判定することによって達成される。増幅のリアルタイム検出は、増幅反応「中の」検出と呼ばれる場合もある。

30

40

【0104】

本明細書で使用される場合、「定量的増幅データセット」という用語は、標的サンプル、例えば標的DNAの、定量的増幅中に得られるデータを指す。定量的PCRまたはQuARTSアッセイの場合、定量的増幅データセットは、増幅中、例えば複数の、または全てのサーマルサイクル中に得られた、蛍光値の集合である。定量的増幅のデータは、反応中のいずれかの特定の点で収集されたデータに限定されず、蛍光は、各サイクル中の個別の点で、または各サイクル全体で連続的に測定され得る。

【0105】

リアルタイムPCR及びPCR+INVADERアッセイ中に収集されたデータに関して本明細書で使用される「Ct」及び「Cp」という略語は、陽性シグナルを示す所定の

50

閾値をシグナル（例えば蛍光シグナル）が超過するサイクルを指す。シグナル対濃度の決定因子として使用される閾値を算出するためには様々な方法が使用されており、この値は一般に「超過閾値」（ C_t ）または「超過点」（ C_p ）のいずれかとして表される。本明細書で提示される方法の実施形態では、 C_p 値または C_t 値のいずれかを使用して、リアルタイムシグナルを分析し、アッセイまたはサンプル中のバリエーション及び／または非バリエーション構成成分のパーセンテージを判定することができる。

【0106】

本明細書で使用される場合、「キット」という用語は、材料を送達するための任意の送達システムを指す。反応アッセイの文脈において、このような送達システムは、反応試薬（例えば、適切な容器中のオリゴヌクレオチド、酵素など）及び／または補助材料（例えば、バッファ、アッセイを行うための説明書など）の保管、1つの場所から別の場所への輸送、または送達を可能にするシステムを含む。例えば、キットは、関連する反応試薬及び／または補助材料を収容する1つまたは複数の格納手段（例えば箱）を含む。本明細書で使用される場合、「断片化キット」という用語は、全キット構成要素の小部分を各々が含む2つ以上の別個の容器を備える送達システムを指す。容器は、意図されるレシピエントと一緒に送達されても別々に送達されてもよい。例えば、第1の容器は、アッセイで使用するための酵素を含んでよく、第2の容器は、オリゴヌクレオチドを含む。

10

【0107】

本明細書で使用される「システム」という用語は、特定の目的で使用するための物品の集合を指す。いくつかの実施形態において、物品は、例えば、物品、紙、または記録可能な媒体（例えば、DVD、CD、フラッシュドライブなど）で提供される情報としての使用説明書を備える。いくつかの実施形態において、説明書は、ユーザをオンラインの場所、例えばウェブサイトへ誘導する。

20

【0108】

本明細書で使用される場合、「情報」という用語は、事実またはデータのあらゆる集合を指す。インターネットを含むがこれに限定されないコンピュータシステム（複数可）を使用して保存または処理される情報に関して、この用語は、任意のフォーマット（例えば、アナログ、デジタル、光学など）で保存される任意のデータを指す。本明細書で使用される場合、「対象に関連する情報」という用語は、対象（例えば、ヒト、植物、または動物）に関する事実またはデータを指す。「ゲノム情報」という用語は、核酸配列、遺伝子、メチル化のパーセンテージ、アレル頻度、RNA発現レベル、タンパク質発現、遺伝子型に相関する表現型などを含むがこれらに限定されない、ゲノムに関する情報を指す。「アレル頻度情報」とは、アレルの同一性、アレルの存在と対象（例えばヒト対象）の特性との間の統計的相関、個体または集団におけるアレルの存在または非存在、1つまたは複数の特定の特性を有する個体にアレルが存在する尤度のパーセンテージなどを含むがこれらに限定されない、アレル頻度に関する事実またはデータを指す。

30

【図面の簡単な説明】

【0109】

【図1-1】実施例2に記載する肺癌に関連するマーカーを選択するためのRRBS（Reduced Representation Bisulfite Sequencing）の結果を比較する表を提示し、各横列は、示されているマーカー領域（染色体ならびに開始位置及び停止位置によって同定されている）の平均値を示す。各組織型（正常（Norm）、腺癌（Ad）、大細胞癌（LC）、小細胞癌（SC）、扁平上皮細胞癌（SQ）及び未確定癌（UND））の平均メチル化を、正常対象由来のバフィーコートサンプル（WBCまたはBC）の平均メチル化と比較した比が、各領域について示され、各領域で同定された遺伝子及び転写物が示されている。肺腺癌に関連するマーカーを選択するためのRRBSの結果を比較する表を提示する。

40

【図1-2】図1-1の欄を参照。

【図1-3】図1-1の欄を参照。

【図1-4】図1-1の欄を参照。

50

【図 1-5】図 1-1 の欄を参照。

【図 1-6】図 1-1 の欄を参照。

【図 2-1】実施例 2 に記載する肺癌に関連するマーカーを選択するための R R B S (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) の結果を比較する表を提示し、各横列は、示されているマーカー領域（染色体ならびに開始位置及び停止位置によって同定されている）の平均値を示す。各組織型（正常（Norm）、腺癌（Ad）、大細胞癌（LC）、小細胞癌（SC）、扁平上皮細胞癌（SQ）及び未確定癌（UND））の平均メチル化を、正常対象由来のバフィーコートサンプル（WBC または BC））の平均メチル化と比較した比が、各領域について示され、各領域で同定された遺伝子及び転写物が示されている。肺大細胞癌に関連するマーカーを選択するための R R B S の結果を比較する表を提示する。

10

【図 2-2】図 2-1 の欄を参照。

【図 2-3】図 2-1 の欄を参照。

【図 2-4】図 2-1 の欄を参照。

【図 2-5】図 2-1 の欄を参照。

【図 2-6】図 2-1 の欄を参照。

【図 2-7】図 2-1 の欄を参照。

【図 2-8】図 2-1 の欄を参照。

【図 2-9】図 2-1 の欄を参照。

【図 2-10】図 2-1 の欄を参照。

20

【図 2-11】図 2-1 の欄を参照。

【図 2-12】図 2-1 の欄を参照。

【図 2-13】図 2-1 の欄を参照。

【図 2-14】図 2-1 の欄を参照。

【図 2-15】図 2-1 の欄を参照。

【図 2-16】図 2-1 の欄を参照。

【図 3-1】実施例 2 に記載する肺癌に関連するマーカーを選択するための R R B S (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) の結果を比較する表を提示し、各横列は、示されているマーカー領域（染色体ならびに開始位置及び停止位置によって同定されている）の平均値を示す。各組織型（正常（Norm）、腺癌（Ad）、大細胞癌（LC）、小細胞癌（SC）、扁平上皮細胞癌（SQ）及び未確定癌（UND））の平均メチル化を、正常対象由来のバフィーコートサンプル（WBC または BC））の平均メチル化と比較した比が、各領域について示され、各領域で同定された遺伝子及び転写物が示されている。肺小細胞癌に関連するマーカーを選択するための R R B S の結果を比較する表を提示する。

30

【図 3-2】図 3-1 の欄を参照。

【図 3-3】図 3-1 の欄を参照。

【図 3-4】図 3-1 の欄を参照。

【図 3-5】図 3-1 の欄を参照。

【図 3-6】図 3-1 の欄を参照。

40

【図 3-7】図 3-1 の欄を参照。

【図 3-8】図 3-1 の欄を参照。

【図 3-9】図 3-1 の欄を参照。

【図 3-10】図 3-1 の欄を参照。

【図 3-11】図 3-1 の欄を参照。

【図 3-12】図 3-1 の欄を参照。

【図 3-13】図 3-1 の欄を参照。

【図 3-14】図 3-1 の欄を参照。

【図 3-15】図 3-1 の欄を参照。

【図 3-16】図 3-1 の欄を参照。

50

【図 3-17】図 3-1 の欄を参照。
【図 3-18】図 3-1 の欄を参照。
【図 3-19】図 3-1 の欄を参照。
【図 3-20】図 3-1 の欄を参照。
【図 3-21】図 3-1 の欄を参照。
【図 3-22】図 3-1 の欄を参照。
【図 3-23】図 3-1 の欄を参照。
【図 3-24】図 3-1 の欄を参照。
【図 3-25】図 3-1 の欄を参照。
【図 3-26】図 3-1 の欄を参照。
【図 3-27】図 3-1 の欄を参照。
【図 3-28】図 3-1 の欄を参照。
【図 3-29】図 3-1 の欄を参照。
【図 3-30】図 3-1 の欄を参照。
【図 3-31】図 3-1 の欄を参照。
【図 3-32】図 3-1 の欄を参照。
【図 3-33】図 3-1 の欄を参照。
【図 3-34】図 3-1 の欄を参照。

【図 4-1】実施例 2 に記載する肺癌に関連するマーカーを選択するための R R B S (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) の結果を比較する表を提示し、各横列は、示されているマーカー領域（染色体ならびに開始位置及び停止位置によって同定されている）の平均値を示す。各組織型（正常（Norm）、腺癌（Ad）、大細胞癌（LC）、小細胞癌（SC）、扁平上皮細胞癌（SQ）及び未確定癌（UND））の平均メチル化を、正常対象由来のパフィーコートサンプル（WBC または BC）の平均メチル化と比較した比が、各領域について示され、各領域で同定された遺伝子及び転写物が示されている。肺扁平上皮細胞癌に関連するマーカーを選択するための R R B S の結果を比較する表を提示する。

【図 4-2】図 4-1 の欄を参照。
【図 4-3】図 4-1 の欄を参照。
【図 4-4】図 4-1 の欄を参照。
【図 4-5】図 4-1 の欄を参照。
【図 4-6】図 4-1 の欄を参照。
【図 4-7】図 4-1 の欄を参照。
【図 4-8】図 4-1 の欄を参照。

【図 5-1】未変換形態及びバイサルファイト変換後形態のアッセイ標的領域の核酸配列、ならびに検出オリゴヌクレオチドを対応する配列番号と共に示す表を提示する。標的核酸、特に標的 DNA（バイサルファイト変換 DNA を含む）は、便宜上、一本鎖として示されているが、本技術の実施形態は、表示された配列の相補鎖を包含することが理解される。例えば、プライマー及びフラップオリゴヌクレオチドは、示されている標的鎖、または示されている標的鎖に相補的な鎖にハイブリダイズするよう選択され得る。

【図 5-2】図 5-1 の欄を参照。
【図 5-3】図 5-1 の欄を参照。
【図 5-4】図 5-1 の欄を参照。
【図 5-5】図 5-1 の欄を参照。
【図 5-6】図 5-1 の欄を参照。
【図 5-7】図 5-1 の欄を参照。
【図 5-8】図 5-1 の欄を参照。
【図 5-9】図 5-1 の欄を参照。
【図 5-10】図 5-1 の欄を参照。
【図 5-11】図 5-1 の欄を参照。

【図 5-12】図 5-1 の欄を参照。

【図 5-13】図 5-1 の欄を参照。

【図 5-14】図 5-1 の欄を参照。

【図 5-15】図 5-1 の欄を参照。

【図 5-16】図 5-1 の欄を参照。

【図 5-17】図 5-1 の欄を参照。

【図 6】血液サンプルを分析してヒトの肺癌リスクを判定する 1 つの方法の例示的なワークフローを示す。

【図 7-1】RNA 検出による FPR1 遺伝子発現に焦点を当てた実験のデータを示す。パネル A は、真陽性がん率と偽陽性がん率の関係を示すデータの訓練セットの線チャートである。パネル B は、真陽性がん率と偽陽性がん率の関係を示す検証データセットの線チャートである。パネル C は、非喫煙者、正常喫煙者、及び異なるステージの肺癌患者から採取した白血球中の FPR1 RNA 発現レベルを示すドットプロットであり、正常喫煙者のタバコに対するわずかな感度を示している。

10

【図 7-2】図 7-1 の欄を参照。

【図 8-1】S100A12 遺伝子に焦点を当てた実験のデータを示す。パネル A は、真陽性がん率と偽陽性がん率の関係を示すデータの訓練セットの線チャートである。パネル B は、真陽性がん率と偽陽性がん率の関係を示す検証データセットの線チャートである。パネル C は、非喫煙者、正常喫煙者、及び異なるステージの肺癌患者から採取した白血球中の S100A12 RNA 発現レベルを示すドットプロットである。

20

【図 8-2】図 8-1 の欄を参照。

【図 9-1】MMP9 遺伝子に焦点を当てた実験のデータを示す。パネル A は、真陽性がん率と偽陽性がん率の関係を示すデータの訓練セットの線チャートである。パネル B は、真陽性がん率と偽陽性がん率の関係を示す検証データセットの線チャートであり、FPR1 と比較した改善を示している。パネル C は、非喫煙者、正常喫煙者、及び異なるステージの肺癌患者から採取した白血球中の MMP9 RNA 発現レベルを示すドットプロットである。

【図 9-2】図 9-1 の欄を参照。

【図 10-1】SAT1 遺伝子に焦点を当てた実験のデータを示す。パネル A は、真陽性がん率と偽陽性がん率の関係を示すデータの訓練セットの線チャートである。パネル B は、真陽性がん率と偽陽性がん率の関係を示す検証データセットの線チャートである。パネル C は、非喫煙者、正常喫煙者、及び異なるステージの肺癌患者から採取した白血球中の SAT1 RNA 発現レベルを示すドットプロットである。

30

【図 10-2】図 10-1 の欄を参照。

【図 11】標的遺伝子としての FPR1 及び参照遺伝子としての STK4 を使用した実験の結果を示す。パネル A は、FPR1 比と、FPR1 断片の 100 万当たりのキロベース当たりの正規化 (FPKM) との関係を示すドットプロットである。パネル B は、STK4 と比較した FPR1 の真陽性率及び偽陽性率の比を示す線グラフである。

【図 12】標的遺伝子としての S100A12 及び参照遺伝子としての STK4 を使用した方法の例示的な実施形態を示す。パネル A は、S100A12 比と S100A12 FPKM との関係を示すドットプロットである。パネル B は、STK4 と比較した S100A12 の真陽性率及び偽陽性率の比を示す線グラフである。

40

【図 13】標的遺伝子としての MMP9 及び参照遺伝子としての STK4 を使用した方法の例示的な実施形態を示す。パネル A は、MMP9 比と MMP9 FPKM との関係を示すドットプロットである。パネル B は、STK4 と比較した MMP9 の真陽性率及び偽陽性率の比を示す線グラフである。

【図 14】肺癌の異なるステージにおける標的遺伝子としての S100A12 と MMP9 の両方の RNA 発現レベルを比較するデータを示す散布図である。FPKM 正規化を使用し、データには、訓練セットと検証セットの両方の全てのサンプルが含まれている。

【図 15】がん患者、良性患者、及び正常患者における標的遺伝子としての S100A1

50

2とSAT1の両方のRNA発現レベルを比較するデータを示す散布図である。FPKM正規化を使用した。破線の区切り線は、視覚化のみを目的としている。

【図16】がん患者、良性患者、及び正常患者における標的遺伝子としてのS100A12とTYMPの両方のRNA発現レベルを比較するデータを示す散布図である。STK4正規化を使用した。破線の区切り線は、視覚化のみを目的としている。

【発明を実施するための形態】

【0110】

本明細書で提供されるのは、マーカー分析物の選択、ならびに、複数の異なるタイプのマーカー分析物、例えば、DNA、RNA、及びタンパク質などのマーカー分子についてサンプル（複数可）を分析することを含む、対象由来のサンプルまたはサンプルの組み合わせの特性決定を行う方法に関連する技術である。例えば、いくつかの実施形態において、本技術は、対象から得られたサンプルにおける、特定のメチル化ステータスを有する（例えば、メチル化型または非メチル化型の）DNA中の少なくとも1つのメチル化マーカー遺伝子の量を測定することを含む方法を提供し、対象から得られたサンプル中の少なくとも1つのRNAマーカーの量を測定すること、及び対象から得られたサンプル中の少なくとも1つのタンパク質マーカーの存在もしくは非存在または量についてアッセイすることのうちの1つまたは複数をさらに含む。いくつかの実施形態において、対象由来の単一のサンプルが、メチル化マーカーDNA（複数可）、マーカーRNA（複数可）、及びマーカータンパク質（複数可）について分析される。

【0111】

様々な実施形態のこの詳細な説明では、説明目的のために、開示される実施形態が十分に理解されるように多数の特定の詳細が記述される。しかしながら、当業者には、これらの様々な実施形態が、これらの特定の詳細があってもなくても実践され得ることが理解されよう。他の例では、構造及びデバイスがブロック図形態で示される。さらに、当業者であれば、方法が提示され実施される特定の順番が例示的であることを容易に理解することができ、この順番を変更しても、本明細書で開示される様々な実施形態の精神及び範囲に依然として含まれ得ることが想定される。

【0112】

本明細書で参照される全ての特許、出願、公開出願及び他の刊行物は、参照される資料を参照することにより、全体として本明細書に組み込まれる。本明細書において、用語または語句が、参照により本明細書に組み込まれる特許、出願、公開特許及び他の刊行物に記述されている定義に反するか、さもなければ矛盾するかたちで使用される場合、本明細書における使用が、参照により本明細書に組み込まれる定義に優先する。下記の説明は、次のセクションに分割される：

I. RNAマーカー分析（定量的RNA分析及び定量的タンパク質分析を含む）、ならびに

II. メチル化マーカー分析

I. RNAマーカー分析

A. 定量的RNA分析

実施形態は、血液中の核酸発現、特に循環セルフリー核酸または免疫細胞の核酸発現を分析することにより、がんのリスクがある患者が疾患を有し得るかどうかを判定するシステム及び方法に関する。がんを有し得る患者の判定は、RNAの蓄積または発現レベルをアッセイするための血液由来の検体で行うことができ、このような分析は、発現マイクロアレイ、核酸シーケンシング、nCounter、またはリアルタイムPCRによって行うことができる。いくつかの実施形態において、参照核酸のサブセットの発現レベルが、がんを有する患者において増加することが知られている標的核酸のサブセットの発現レベルと比較される。参照核酸のサブセットは、多くの無疾患患者由来の血液を分析し、これらの患者内で安定したレベルで発現される遺伝子を選択することによって見出され得る。参照核酸のサブセットは、複数の組織型（例えば、結腸、肺、腎臓、肝臓など）から採取された固形組織検体を分析し、患者の血液中で安定したレベルで発現される遺伝子を選択

することによって見出すこともできる。

【0113】

一実施形態が図6のフロー図に示されている。示されているように、プロセス100は、開始段階105で始まり、次いで、血液サンプルがヒトから得られる段階110に移る。血液サンプルは、肺癌を有する疑いがあるヒト患者から採取してもよいが、患者が肺癌を有することが分かっている場合、がんのタイプまたはステージのより徹底的な分析が所望される場合がある。プロセス100は次いで段階115に移り、ここで、サンプルの劣化を可能な限り最小限に抑えるよう、分析しようとする血液サンプルが室温または氷上の採血チューブで実験室に搬送される。血液サンプルが実験室で受領されると、プロセス100は、下記でより詳細に説明するように、RNAが血液から抽出される段階120に移る。RNAが抽出された後、プロセス100は段階125に移り、ここで、サンプル中の特定のRNAのレベルを測定することにより、1つまたは複数の標的遺伝子の遺伝子発現レベルと、場合により1つまたは複数の参照遺伝子の遺伝子発現レベルとが検出される。遺伝子発現を検出し、標的遺伝子及び参照遺伝子を選択する方法については、下記でより詳細に説明する。特定の標的遺伝子の遺伝子発現レベルが判定されたら、プロセス100は、患者における標的遺伝子発現レベルの測定に基づいて、肺癌を有するまたは発症する患者のリスクを判定するよう、分析が行われる段階130に移る。プロセス100は次いで、終了段階135で終了する。

10

【0114】

いくつかの実施形態において、標的遺伝子のサブセットは、がんに罹患した個体から採取された血液または固形腫瘍検体において転写物の蓄積または発現レベルが上昇する遺伝子进行分析することによって選択され得る。

20

【0115】

いくつかの実施形態において、標的遺伝子のサブセットは、がんに罹患した個体から採取された血液または固形腫瘍検体において転写物の蓄積または発現レベルが低下する遺伝子を含む。

【0116】

いくつかの実施形態において、参照遺伝子のサブセットは、正常個体において、転写物の蓄積または発現レベルが、がん患者と比較して変化しない遺伝子を含む。これらの実施形態において、蓄積または発現レベルが血液または固形腫瘍検体中で上昇する標的遺伝子のサブセットは、1つまたは複数の参照遺伝子と組み合わせて選択される。

30

【0117】

いくつかの実施形態において、本開示の技術の態様は、がんに罹患した患者では、ホルミルペプチド受容体遺伝子(FPR1)、S100A12、MMP9、SAT1、及びTYMPのRNAレベルの発現が変化するという発見に関連する。例えば、FPR1、S100A12、MMP9、SAT1、及びTYMPのRNAレベルは、後述するように、肺癌を有する患者において上昇することが見出された。さらに、FPR1のRNAレベルは、STK4、ACTB、及びHNRNP A1といった他の参照遺伝子のRNAレベルと比較して上昇することが示された。

【0118】

いくつかの実施形態において、標的遺伝子が分かると、複数の検体から多数の候補を分析し、がん患者からの遺伝子発現において標的遺伝子と参照遺伝子との差が最大であるものを選択することによって、参照遺伝子を選択することができる。いくつかの実施形態において、参照遺伝子は、多くの遺伝子の転写物の蓄積または発現レベルを調べ、最も低い変動性を有するものを見出すことによって選択され得る。いくつかの実施形態において、参照遺伝子は、その個々の蓄積または発現レベルに基づいてではなく、がんにおけるその相対的な蓄積または発現レベルの変化がないことに基づいて選択される。

40

【0119】

所与のがんタイプにおける標的遺伝子(及びいくつかの実施形態では参照遺伝子)が分かると、がん患者及びがんがアッセイされる患者から採取された血液中で、発現プロファ

50

イルを測定することができる。血漿または白血球は、標準的な採血以上のリスクを呈することなく、多くの一次医療診療所内で採取及び調製され得るので、いくつかの実施形態における標的遺伝子と参照遺伝子との間の相対的なRNAの蓄積または発現レベルは、価値あるがんバイオマーカーであり得る。さらに、いくつかの実施形態における標的遺伝子及び参照遺伝子は、高信頼度でアッセイすることができれば、現在のがんアッセイに対していくつかの利点を有し得る。例えば、いくつかの実施形態において、この方法は、発生初期ステージのがん、少ない症状を呈するがん、良性状態から区別することが困難ながん、または従来の生検アッセイではアクセス可能であり得ない身体領域で発生している可能性のあるがんを検出することができる。

【0120】

RNase活性の増加は、腫瘍によく見られる。このRNase活性は、腫瘍増殖を阻害し得、がんに対する免疫系の応答の一部であり得る。細胞傷害性T細胞は、IFN- γ を介してがん細胞のアポトーシスを引き起こす場合があり、このアポトーシスは、RNase LなどのRNaseの活性化をもたらし得る。腫瘍増殖に起因する低酸素状態によって引き起こされ得る壊死を介した細胞の死も、RNaseの放出に寄与し得る。肺癌患者の血漿は、増加したRNase活性を有することが知られている (Marabella et al., (1976) "Serum ribonuclease in patients with lung carcinoma," *Journal of Surgical Oncology*, 8 (6): 501-505, Reddi et al. (1976) "Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 73 (7): 2308-2310)。肺細胞には血漿中で見出されるものと同様のRNaseが含まれることも知られている (Neuwelt et al., (1978) "Possible Sites of Origin of Human Plasma Ribonucleases as Evidenced by Isolation and Partial Characterization of Ribonucleases from Several Human Tissues," *Cancer Research* 38: 88-93)。

【0121】

血漿中に存在するRNaseのレベルが高いほど、遊離RNAは、より急速に分解されやすくなる。よって、RNaseの放出に起因して、血漿RNA調製物中で検出可能なRNAが少なくなる場合がある。全てのRNAは低下したレベルで存在し得るが、遺伝子の正常の変動性が低い場合にのみ、この差を高レベルの正確度で検出することが可能であり得る。例えば、遺伝子の発現の正常範囲が10~100単位である場合、1単位の減少を正確に検出することは困難であり得る。しかしながら、遺伝子の発現が通常10~11単位である場合、1単位の減少は容易に検出可能である (例えば、10単位未満のあらゆる値は減少を示す)。

【0122】

いくつかの実施形態において、標的遺伝子はFPR1である。FPR1は、肺及びがんにおいて複数の役割を果たす。FPR1は、肺線維芽細胞で発現し (VanCompernelle et al. (2003) *J Immunol.* 171 (4): 2050-6)、肺の創傷修復に必要である (Shao (2011) *Am J Respir Cell Mol Biol* 44: 264-269)。線維芽細胞は、腫瘍と戦う免疫細胞の誘引 (Gemperle (2012) *PLOS One* 7 (11): 1-7, e50195) と、腫瘍を保護する間質の生成 (Wang (2009) *Clin Cancer Res* 15 (21): 6630-6638) の両方において重要であることが知られている。FPR1は、腫瘍内の他の癌遺伝子の活性を悪化させる場合もある (Huang (2007) *Cancer Res* 67 (12): 5906-5913)。肺癌で過剰発現しているという証拠はないが、FPR1は、RNA安定化によって調節されることが知られている (Mandal (2007) *J Immunol*

l 178:2542-2548、Mandal (2005) J Immunol 175:6085-6091)。これらの役割を所与とすると、FPR1 RNAは、腫瘍増殖を増大させるために腫瘍細胞によって（例えば、増殖のための創傷修復システムを活性化する、または保護的間質を増殖させることによって）、あるいは免疫応答を増大させる（例えば、さらなる免疫細胞を誘引する）ために免疫細胞によって、意図的に分泌される可能性がある。

【0123】

いくつかの実施形態において、標的遺伝子は、特に自然免疫機能に関連している、カルグラニユリンC及びEN-RAGE（細胞外で新たに同定されたRAGE結合タンパク質）としても知られるS100カルシウム結合タンパク質A12（S100A12）である。S100A12は、食細胞によって発現され、組織炎症部位で放出される。これは、脳損傷後に細胞外空間へ放出された後に炎症誘発性になる内因性DAMPである。終末糖化産物の受容体（RAGE）は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、加齢と共に増加する終末糖化産物（AGE）の特異的な細胞表面反応部位である。AGEとRAGEとの間の相互作用は、慢性炎症に関連付けられている。炎症細胞及び血管細胞でRAGE相互作用が起こると、MMPの発現が増加する。ヒトs100A12 mRNA配列は、GenBank受入番号NM005621として公的に利用可能である。ヒトS100A12アミノ酸配列は、GenPept受入番号NP05612として公的に利用可能である。

【0124】

いくつかの実施形態において、標的遺伝子は、炎症部位への好中球の遊走のプロセスに関与するミエロイド関連タンパク質（MRP）を含む。MRPタンパク質は、S100タンパク質のサブファミリーであり、MRPファミリーの3つのメンバー、すなわち、それぞれ10.6、13.5及び10.4 kDaの分子量を有し、好中球のサイトゾルで豊富に発現し、単球ではより低いレベルで発現する、S100A8、S100A9及びS100A12がさらに特性決定されている。S100A8及びS100A9は、活性化された内皮細胞、特定の上皮細胞、ケラチノサイト、ならびに好中球及び単球で分化したHL-60及びTHP-1によっても発現される。MRPはシグナルペプチド配列を欠いているため、顆粒ではなくサイトゾルに存在し、サイトゾルタンパク質の最大40%を占める。3つのMRPは、非共有結合したホモ二量体として存在する。さらに、カルシウムの存在下では、S100A8及びS100A9が会合して、S100A8/A9と呼ばれる非共有結合性のヘテロ二量体を形成する；これらは、MRP-8/14複合体、カルプロテクチン、p23、及び囊胞性線維症抗原としても知られている。S100A8は、MRP-8、L1抗原軽鎖、及びカルグラニユリンAとも呼ばれ、S100A9は、MRP-14、L1抗原重鎖、囊胞性線維症抗原、カルグラニユリンB、及びBEE22と呼ばれている。S100A12の他の名称は、p6、CAAF1、CGRP、MRP-6、EN-RAGE、及びカルグラニユリンCである。

【0125】

S100タンパク質のファミリーは、小さな（10～14 kDa）酸性カルシウム結合タンパク質の19メンバーを含む。これらは、一方が他方よりも2つ多くのアミノ酸を有する2つのEFハンド型カルシウム結合モチーフの存在を特徴とする。これらの細胞内タンパク質は、タンパク質のリン酸化、酵素活性、Ca²⁺ホメオスタシス、及び中間径フィラメントの重合の調節に関与している。S100タンパク質は、一般にホモ二量体として存在するが、いくつかはヘテロ二量体を形成し得る。S100タンパク質の半数以上は、細胞外空間にも見出され、細胞外空間において、特定の受容体を介してサイトカインのような活性を発揮する；1つは、最近、終末糖化産物の受容体（RAGE）として特性決定された。S100A8及びS100A9は、ミエロイド前駆体の産物である好中球及び単球に発現がほぼ完全に制限されるため、ミエロイド関連タンパク質（MRP）と呼ばれるS100タンパク質ファミリーのサブセットに属する。

【0126】

血清中の高濃度のMRPは、循環好中球の数またはそれらの活性の増加に関連する病状で生じ得る。S100A8/A9のレベル上昇 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 超) は、嚢胞性線維症、結核、及び若年性関節リウマチなどの様々な感染症及び炎症性病状に罹患した患者の血清中で観察される。これらは、関節リウマチ及び痛風に罹患した患者の滑液及び血漿でも非常に高いレベルで発現される。高レベルのMRP (最大 $13 \mu\text{g}/\text{ml}$) は、慢性骨髄性白血病患者及び慢性リンパ性白血病患者の血漿中に存在することも知られている。これらのタンパク質の存在は、さらに、再発患者の血液中の白血球細胞の出現に先行していた。S100A8/A9が細胞外に存在することは、MRPが活発に、あるいは細胞壊死の間に放出され得ることを示唆している。

【0127】

MRPはサイトゾルで発現し、これらが代替経路を介して分泌されることが示唆される。細胞外環境に放出されると、MRPは炎症誘発性機能を発揮する。これらの活性は、他のいくつかのS100タンパク質に共通している。例えば、S100は、ニューロンからの炎症誘発性サイトカインIL-6の放出を刺激し、神経突起の伸長を促進する。S100L (S100A2) は、好酸球に対して走化性をもち、ソリアシン (S100A7) は、好中球及びTリンパ球に対して走化性をもつが、単球に対しては走化性をもたない。S100A8、S100A9、及びS100A8/A9は、好中球に対して走化性をもち、 $10^{-9} \sim 10^{-10} \text{M}$ で最大の活性を示す。CP-10とも呼ばれるマウスS100A8は、 10^{-12}M の活性で、マウスミエロイド細胞の良好な強力な走化性因子であることが知られている。

【0128】

さらに、S100A12は、単球及び好中球に対して走化性をもち、マウスマクロファージ細胞株からTNF- α 及びIL-1 β の発現を誘導する。またMRPは、内皮への白血球の接着を刺激する。S100A9は、 β_2 インテグリンMac-1を活性化することにより、フィブリノーゲンへの好中球の接着を刺激する。

【0129】

最近、S100A8、S100A12、及びS100A8/A9もフィブリノーゲンへの好中球の接着を刺激することが実証された。S100A12と共にインキュベートした内皮細胞は、ICAM-1及びVCAM-1の表面発現を増加させ、その結果、リンパ球が内皮細胞に接着した。この誘導は、NF- κ Bの活性化の後に起こる。MRPは、直接的に、あるいは酸素代謝物と反応することにより、酸化バーストを阻害する。S100A9は、腹膜のBCG刺激マクロファージによって放出される H_2O_2 のレベルを低下させる。この効果は、ヒト及びマウスのS100A9を使用して観察できるが、S100A8では観察できない。S100A9とは異なり、S100A8は、OCL-アニオンによって効率的に酸化され、共有結合したS100A8ホモ二量体の形成、及びその走化性活性の (マウスS100A8で実証された) 喪失をもたらす得る。

【0130】

代替的に、MRPはサイトゾルタンパク質であるため、好中球をそれ自体の酸化バーストの有害効果から保護することができる。S100A9は、その侵害受容作用によって炎症性疼痛の制御に関与していることでも知られている。MRPの機能は*in vivo* でも調査されている。マウスに腹腔内注射すると、マウスS100A8は、4時間以内に好中球及びマクロファージの蓄積を刺激した。S100A12の阻害により、遅延型過敏症のマウスモデルにおける急性炎症及び大腸炎における慢性炎症が低減した。全てのMRPは、マウス空気嚢モデルで注射すると、炎症反応を誘導する。

【0131】

いくつかの実施形態において、標的遺伝子は、胚発生、生殖、及び組織リモデリングなどの正常な生理学的プロセス、ならびに関節炎及び転移などの疾患プロセスにおける細胞外マトリックスの分解に関与する、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) ファミリーのタンパク質をコードする。ほとんどのMMPは、細胞外プロテイナーゼによって切断されると活性化する、不活性のプロタンパク質として分泌される。この遺伝子によって

10

20

30

40

50

コードされる酵素は、I V 型及び V 型のコラーゲンを分解する。アカゲザルでの研究は、骨髄からの造血前駆細胞の I L - 8 誘導性動員にこの酵素が関与していることを示唆しており、マウスでの研究は、腫瘍関連組織リモデリングにおける役割を示唆している。

【0132】

MMP、特に MMP 9、2、及び 3 は、40 年以上にわたり、がんに関係するとされている。増大する証拠は、ECM 分解における役割に加えて、がん細胞の浸潤及び転移に重要である血管新生、リンパ血管新生、及び脈管形成におけるこれらの役割を示唆している。例えば、MMP 9 は、大腸癌及び膵臓癌などのいくつかのがんにおいて、その受容体に結合する隔絶された VEGF の生物学的利用能を増加させる。MMP 9 はまた、HCC の重要な増殖因子である TGF- β のタンパク質分解的活性化を媒介する。マトリックスメ
10
タロプロテイナーゼ (MMP) は、がん細胞の増殖、遊走、浸潤及び転移を促進するプロテアーゼである (Egeblad and Werb, 2002)。MAN1A1 の過剰発現は、MMP 9 mRNA 発現レベルを上昇させ、MAN1C1 の過剰発現は、MMP 9 mRNA 発現レベルを低下させた。MMP はあらゆる種類の細胞外マトリックスタンパク質を分解できるため、MMP 9 発現の減少は、細胞の遊走及び浸潤能力が阻害されていることを意味する。転移に関与することが知られている遺伝子は、MMP 9 及び CTTN を含む。MMP 9 は、哺乳動物において細胞外マトリックスのコラーゲンを分解する分泌型亜鉛メタロプロテアーゼの一群のメンバーである。MMP 9 の発現上昇は、多くの異なるがんタイプにおいて転移に関連付けられている (Turner et al. 2000、Osman et al. 2002)。CTTN は、頭頸部癌及び乳癌の扁平
20
上皮細胞癌において高頻度で増幅されることが見出されている 11q13 領域に存在する癌遺伝子であることが示されている (Schuuring et al. 1992、Schuuring et al. 1998)。

【0133】

いくつかの実施形態において、標的遺伝子は、BMP 2 及び EGFR を含む、腫瘍形成に関与する遺伝子であり得る。BMP 2 は、多くの細胞型で増殖、分化、及び他の機能を制御する、トランスフォーミング成長因子ベータスーパーファミリーのメンバーである。EGFR は、頭頸部 SCC を含む多くの異なるタイプのがんにおいて、最も高頻度で増幅され変異する遺伝子のうちの 1 つである (Santani et al. 1991、Dassonville et al. 1993、Grandis and Twardy 1993)。転移プロセスにおける役割が明確に定義されていない、他の同定された候補遺伝子は、GTSE1、EEF1A1 を含む。GTSE1 は、微小管局在タンパク質である。その発現は細胞周期によって調節されており、過剰発現すると G2/M 期の蓄積を誘導し得る (Monte et al. 2000)。GTSE1 は、p53 腫瘍抑制タンパク質のレベル及び活性を下方制御することができ、DNA 損傷後にアポトーシスを誘導するその能力を抑制することが実証されている (Monte et al. 2004)。EEF1A1 遺伝子は、アミノアシル-tRNA の 80S リボソームへの結合に関与する伸長因子 1 のアルファサブユニットをコードする。この遺伝子の腫瘍形成への関与は明らかではない。

【0134】

いくつかの実施形態において、標的遺伝子は SAT1 である。SAT1 遺伝子によってコードされるタンパク質は、アセチルトランスフェラーゼファミリーに属し、ポリアミン代謝の異化経路における律速酵素である。スペルミジン及びスペルミンのアセチル化を触媒し、ポリアミンの細胞内濃度及び細胞外への輸送の調節に関与している。この遺伝子の欠損は、禿髪性棘状毛嚢性角化症 (KFSD) に関連している。この遺伝子については、選択的スプライスによる転写物が見出されている。

【0135】

いくつかの実施形態において、標的遺伝子は TYMP である。TYMP 遺伝子 (旧称 ECGF1) は、チミジンホスホリラーゼと呼ばれる酵素を作るための説明を提供する。チミジンは、(化学修飾後に) DNA の構成要素として使用されるヌクレオシドとして知ら
40
50

れる分子である。チミジンホスホリラーゼは、チミジンを2つの小さな分子、2-デオキシリボース1-リン酸及びチミンに変換する。この化学反応は、細胞内のヌクレオシドのレベルを調節するのに役立つ、チミジンの分解における重要なステップである。チミジンホスホリラーゼは、ミトコンドリアと呼ばれる細胞構造で適切な量のチミジンを維持するにあたり、重要な役割を果たす。ミトコンドリアは、食物からのエネルギーを細胞が使用できる形態に変換する。ほとんどのDNAは核内の染色体にパッケージされているが、ミトコンドリアは少量の独自のDNA（ミトコンドリアDNAまたはmtDNAと呼ばれる）も有する。ミトコンドリアは、チミジンを含むヌクレオシドを使用して、必要に応じてmtDNAの新しい分子を構築する。TYMP遺伝子の約50種の変異が、ミトコンドリア神経胃腸脳症（MNGIE）を有するヒトにおいて同定されている。TYMP変異は、チミジンホスホリラーゼの活性を大幅に低減させるか、または消失させる。この酵素が不足すると、チミジンが体内に非常に高いレベルで蓄積することが可能になる。過剰なチミジンはmtDNAに損傷を与え、その通常の維持及び修復を妨害すると考えられている。その結果、変異がmtDNAに蓄積し、mtDNAが不安定になり得る。ミトコンドリアは、通常よりも少ないmtDNAを有する場合もある（mtDNAの枯渇）。これらの遺伝的变化は、ミトコンドリアの正常な機能を損なう。mtDNAの異常は、MNGIE疾患に特徴的な消化器系及び神経系の問題の根底にあるが、ミトコンドリアの欠損がどのように障害の特定の特徴を引き起こすのかは不明である。

10

【0136】

いくつかの実施形態において、参照遺伝子はSTK4である。STK4遺伝子によってコードされるタンパク質は、ストレス誘導性マイトジェン活性化タンパク質キナーゼカスケードの上流で作用する、酵母Ste20pキナーゼと構造的に類似した細胞質キナーゼである。コードされたタンパク質は、ミエリン塩基性タンパク質をリン酸化することができ、自己リン酸化を受ける。コードされたタンパク質のカスパーゼ切断断片は、ヒストンH2Bをリン酸化できることが示されている。このタンパク質によって触媒される特定のリン酸化は、アポトーシスと関連しており、このタンパク質が、このプロセスで観察されるクロマチン凝縮を誘導する可能性がある。

20

【0137】

いくつかの実施形態において、アッセイは、次の参照遺伝子：PLGLB2、GABARAP、NACA、EIF1、UBB、UBC、CD81、TMBIM6、MYL12B、HSP90B1、CLDN18、RAMP2、MFAP4、FABP4、MARCO、RGL1、ZBTB16、C10orf116、GRK5、AGER、SCGB1A1、HBB、TCF21、GMFG、HYAL1、TEK、GNG11、ADH1A、TGFB3、INPP1、ADH1B、STK4、ACTB、CASC3、SKP1、及びHNRNPA1のうちの1つまたは複数；ならびに次の標的遺伝子：CTSS、FPR1、FPR2、FPR1L1、FPR1L2、CXCR2、NCF2、S100A12、MMP9、SAT1、TYMP、APOBEC3A、SELL、S100A9、及びPADI4のうちの1つまたは複数を含み得る。

30

【0138】

回帰を使用して、患者のサンプルから生成されたデータポイントを標準に当てはめ、結果が標準の単位で表されるようにすることができる。いくつかの実施形態において、標準は、1つまたは複数の細胞株から作出されたRNAからなる。いくつかの実施形態において、標準は、合成RNAからなる場合がある。標準内の各RNAの断片の数は既知であってもよく、標準化された単位は、各標的に存在するRNA分子の数であり得る。

40

【0139】

アッセイは、異なる配列の成分もしくは類似の領域を標的とする異なる検出可能な標識を有する成分、同じ遺伝子の異なる領域を標的とする成分、または上記のR1aアッセイで挙げたものの以外の遺伝子の領域を標的とする成分を含み得る。

【0140】

結果は、ViomicsのNSCLC検査といったViomicsのがん検査の決定規

50

則を使用して評価され得る。一方の軸が特定の標的遺伝子と第1の参照遺伝子の比であり、他方の軸が標的遺伝子と第2の参照遺伝子の比であるプロットが作出され得る。

【0141】

細胞株対照を使用する場合、NSCLC及び正常サンプルの結果は互いに著しく異なる。いくらかの重複が存在するにもかかわらず、NSCLCサンプルは、細胞株対照に当てはめるとき、がんではないサンプルよりも著しく大きい、標的遺伝子発現と参照遺伝子発現の比を一貫して示す。

【0142】

細胞株対照ではなく合成RNA標準を使用した場合、同様の結果が得られる。重複の減少は、段階希釈の数の減少（6から3）から生じた、標準の変動性の減少に起因し得る。段階希釈の各ステップはエラーを導入し得る。

【0143】

結果は、第1の標的遺伝子発現の線形結合と第2の標的遺伝子発現の線形結合との間の単一の比率として解釈することもできる。決定規則は、所与の閾値を超えるスコアはがんを示し、閾値未満のスコアはがんがないことを示すと指定し得る。合成標準は、各マーカーの係数が1であり、各スコアが、 $\text{スコア} = \frac{\text{標的遺伝子}}{(\text{参照遺伝子1} + \text{参照遺伝子2})}$ として算出されるように設計することができる。

【0144】

例えば、上記のリストから選択される遺伝子の遺伝子発現値は、サンプルから判定され、典型的に得られる値の範囲にわたる合成標準のセット（例えば、段階希釈系列）から判定されたレベルと比較され得る。各遺伝子について、患者サンプルから判定された遺伝子発現レベルは、合成標準テンプレートで回帰分析を行って各遺伝子に蓄積レベル値を当てはめることにより判定された遺伝子発現レベルと比較される。回帰及び当てはめ値は、各遺伝子について個別に得られる。当てはめ値が得られたら、追加の分析（例えば、比率の計算）を行うことができる。

【0145】

これらのスコアは、閾値を超えるスコアが、患者サンプルの示す肺癌リスクが高いことを示すように、閾値と比較され得る。

【0146】

各標準の正しい濃度、係数、及び閾値は、がん患者とがんのない患者の両方から小さなサンプルセットでデータを収集し、次いで線形モデルを使用してこれらを分離することによって判定され得る。線形モデルは、ロジスティック回帰、もしくは線形カーネル関数を用いるサポートベクターマシンなどの統計的方法を介して生成してもよく、または線形モデルは、検査によって生成してもよい。

【0147】

除外基準を満たすサンプルが結果を報告しないように、除外基準を実装してもよい。これらの除外基準は、記載された実施形態のうちの1つの前または後に行われる他の検定を含み得る。除外基準は、検定自体の結果に基づいてもよい。例えば、いくつかの実施形態において、非常に少量のマーカーは、サンプルの劣化を示し、2つの参照遺伝子の発現レベル間の予想外に大きな比率は、夾雑があることを示し得る。いくつかの実施形態において、2つの参照遺伝子の比率が、遺伝子の蓄積レベルの比率の中央値と比較して10、5、4、3、または2倍を超えて異なる場合、サンプルは除外される。

【0148】

いくつかの実施形態において、この方法は、統計的距離判定を含み得る。いくつかの実施形態において、この方法は、ROC曲線によってのみ判定される固定カットオフとは対照的に、統計的距離に基づいてアッセイ結果（例えば、陽性または陰性の結果）を判定する。

【0149】

特異性に基づいて、結果は群（高信頼度、低信頼度など）に分けられ得る。この数は、信頼度の数値スコアを求めるために、何らかの簡単な式で変換されてもよい。

10

20

30

40

50

【0150】

いくつかの実施形態において、この方法は、人口統計学的属性または生活様式属性（複数可）と組み合わせたRNA発現の結果に基づいて、患者に存在するがんのタイプを予測するためのモデル及び導出を含み得る。

【0151】

RNA抽出の方法

RNA抽出の一般的な方法は、Ausubel et al. (1997) Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sonsを含め、分子生物学の標準的教本において開示されている。特に、RNA単離は、Qiagenなどの商業的製造元による精製キット、バッファセット、及びプロテアーゼを、製造元の説明書（QIAGEN Inc., Valencia, Calif.）に従って使用して行うことができる。例えば、Qiagen RNeasyミニカラムを使用し、培養下の細胞から全RNAを単離することができる。多数のRNA単離キットが市販されており、本開示の技術の方法で使用することができる。

10

【0152】

いくつかの実施形態において、全血サンプル中のRNAは、QIAamp（登録商標）RNA Blood Mini Kit（Qiagen, Germantown, MD）を使用して抽出され得る。全血などの生物学的物質から全RNAを精製するには、生物学的物質をRNA溶解／結合溶液と接触させた後、固体支持体と接触させる。RNA溶解／結合溶液を使用して生物学的物質を溶解し、RNAを放出させてから、これを固体支持体に加える。さらに、RNA溶解／結合溶液は、RNaseなどの有害な酵素の悪影響を防止する。RNA溶解／結合溶液は、培養された細胞もしくはペレット状の白血球を溶解するために、または標準的な96ウェルプレートなどの培養プレートに接着もしくは収集した細胞を溶解するために、首尾よく使用され得る。生物学的物質が組織塊または小さな粒子で構成されている場合、RNA溶解／結合溶液は、その効果的な溶解能力のために、そのような組織塊を粉砕してスラリーにするよう効果的に使用され得る。RNA溶解／結合溶液の体積は、細胞数または組織サイズに応じてスケールアップまたはダウンしてもよい。生物学的物質が溶解されたら、ライセートを固体支持体に直接加えてもよいし、前清浄化（pre-clear）用の膜に通して大きな粒子をライセートから除去してもよい。適切な製品の例は、Gentra Solid Phase RNA Pre-Clear Column（Gentra Systems, Inc., Minneapolis, Minn.）である。

20

30

【0153】

代替的に、RNA溶解／結合溶液を固体支持体に直接加え、これによってステップを省略し、方法をさらに単純化してもよい。この後者の方法では、RNA溶解／結合溶液を固体支持体に適用し、次いで固体支持体上で乾燥させた後、処理された固体支持体と生物学的物質を接触させてもよい。例えば、一実施形態において、Spin-X（登録商標）バスケット（Costar, Corning N.Y.）内に配置した固体支持体に、好適な体積のRNA溶解／結合溶液を直接加え、さらにこれを2mlのスピントチューブ内に配置する。固体支持体を少なくとも12時間40～80℃の温度で乾燥するまで加熱し、その後、余剰の未結合RNA溶解／結合溶液があれば除去し、次いで乾燥下で保存する。RNA溶解／結合溶液で前処理された固体支持体に生物学的物質を直接加え、これが好適に溶解され、核酸が放出されて固体支持体に結合するまで、少なくとも1分間、例えば少なくとも5分間インキュベートしてもよい。

40

【0154】

生物学的物質が細胞物質またはウイルス物質を含む場合、RNA溶解／結合溶液との直接接触、またはRNA溶解／結合溶液で前処理された固体支持体との接触は、細胞及び核膜、またはウイルスコートを可溶化及び／または破裂させ、これにより核酸ならびにタンパク質、リン脂質などといった他の夾雑物質が放出される。放出された核酸は、RNA複

50

合体化リチウム塩の存在下で固体支持体に選択的に結合する。任意選択の還元剤を用いると、RNAseを多く含む組織において必要であり得るRNAse活性の低減に役立つ。

【0155】

このインキュベーション期間の後、生物学的物質の残りは、遠心分離、ピペッティング、圧力、真空などの好適な手段により、または核酸が固体支持体に結合したままであるようにこれらの手段をRNA洗浄液と組み合わせて使用することにより、場合により除去される。タンパク質、リン脂質などを含む、核酸以外の生物学的物質の残りは、遠心分離によってまず除去され得る。これを行うことにより、ライセート中の未結合の夾雑物が固体支持体から分離される。複数の洗浄ステップにより、固体支持体から実質的に全ての夾雑物が除去され、固体支持体に優先的に結合したRNAが残る。

10

【0156】

その後、当業者に知られている適切な量のRNA溶出液を使用して、結合したRNAを溶出することができる。次いで、固体支持体を遠心分離するか、または圧力もしくは真空にかけて、RNAを固体支持体から遊離させることができ、次いで好適な容器に収集することができる。

【0157】

いくつかの実施形態において、この方法は、cfRNAを患者のサンプルから抽出し、抽出されたcfRNAをアッセイすることで開始してもよい。例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる、O'Driscoll, L. et al. (2008) "Feasibility and relevance of global expression profiling of gene transcripts in serum from breast cancer patients using whole genome microarrays and quantitative RT-PCR." Cancer Genomics Proteomics 5:94-104を参照のこと。いくつかの実施形態において、データの信頼性が保証されるよう、cfRNAを血漿または他のRNA源から単離するために、一貫性のある反復可能な方法が使用される。cfRNAを血液から得るためには、以下に挙げるプロトコールが使用され得るが、他の方法も想定される。

20

【0158】

cfRNA分子は、例えばQiagenのQIAamp（登録商標）循環核酸キットを使用して、血漿または他のサンプルから精製することができる。このキットのプロトコールは、参照により全体として本明細書に組み込まれる文書「QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook」第2版、2011年1月に記載されている。このプロトコールは、1mLの血漿から循環中の全核酸を精製する方法の一実施形態を提供する。簡単に説明すると、溶解試薬及びプロテアーゼを不活性キャリアRNAと共に加える。全核酸（DNA及びRNA）をカラムに結合させ、カラムを複数回洗浄し、次いでカラムから溶出させる。

30

【0159】

例えば、プロトコールは、次のようにステップを実行することによって行われ得る。100µl、200µl、または300µlのQIAGEN（登録商標）プロテインナーゼKを、50mLの遠心チューブにピペットで入れる。1mL、2mL、または3mLの血清または血漿を50mLチューブに加える。0.8mL、1.6mL、または2.4mLのバッファーACL（1.0µgのキャリアRNAを含む）を加える。キャップを閉じ、30秒間パルスボルテックスして混合し、視認できるボルテックスがチューブに生じることを確認する。効率的な溶解を確実にするために、サンプルとバッファーACLを十分に混合して、均質溶液を得る。この時点で手順を中断してはならない。

40

【0160】

溶解インキュベーションを開始するために、60℃で30分間インキュベートする。チューブを実験台に戻し、1.8mL、3.6mL、または5.4mLのバッファーACBをチューブ内のライセートに加える。キャップを閉じ、15～30秒間パルスボルテック

50

スして十分に混合する。チューブ内のライセートバッファA C B混合物を氷上で5分間インキュベートする。Q I A a m p（登録商標）M i n iカラムをQ I A v a c（登録商標）2 4 P l u sのV a c C o n n e c t o rに挿入する。2 0 m lのチューブエクステンダーを開いたQ I A a m p（登録商標）M i n iカラムに挿入する。サンプルの漏出を防ぐために、チューブエクステンダーがQ I A a m p（登録商標）M i n iカラムにしっかりと挿入されていることを確認する。

【0161】

採取チューブを下記のドライスピン用にとっておく。ライセートバッファA C B混合物をQ I A a m p（登録商標）M i n iカラムのチューブエクステンダーに適用する。真空ポンプのスイッチを入れる。全てのライセートがカラムに完全に吸引されたら、真空ポンプのスイッチを切り、圧力を0 m b a rに解放する。チューブエクステンダーを注意深く取り外して廃棄する。大量のサンプルライセート（3 m lのサンプルから開始する場合は約1 1 m l）は、真空力によってQ I A a m p（登録商標）M i n i膜を通過するのに最長1 0分間を必要とし得ることに留意されたい。真空圧を素早く簡便に解放するには、真空調節器（Q I A v a c（登録商標）C o n n e c t i n g S y s t e mの一部）を使用すべきである。相互汚染を避けるために、近傍のQ I A a m p（登録商標）M i n iカラムの上方にチューブエクステンダーを動かさないよう注意すること。

【0162】

6 0 0 μ lのバッファA C W 1をQ I A a m p（登録商標）M i n iカラムに適用する。カラムの蓋を開いたままにして、真空ポンプのスイッチを入れる。バッファA C W 1の全てがQ I A a m p（登録商標）M i n iカラムに吸引された後、真空ポンプのスイッチを切り、圧力を0 m b a rに解放する。7 5 0 μ lのバッファA C W 2をQ I A a m p（登録商標）M i n iカラムに適用する。カラムの蓋を開いたままにして、真空ポンプのスイッチを入れる。バッファA C W 2の全てがQ I A a m p（登録商標）M i n iカラムに吸引された後、真空ポンプのスイッチを切り、圧力を0 m b a rに解放する。7 5 0 μ lのエタノール（9 6 ~ 1 0 0 %）をQ I A a m p（登録商標）M i n iカラムに適用する。カラムの蓋を開いたままにして、真空ポンプのスイッチを入れる。エタノールの全てがスピンカラムに吸引されたら、真空ポンプのスイッチを切り、圧力を0 m b a rに解放する。Q I A a m p（登録商標）M i n iカラムの蓋を閉じる。真空マニホールドから取り外し、V a c C o n n e c t o rを廃棄する。Q I A a m p（登録商標）M i n iカラムを清潔な2 m lの採取チューブに入れ、フルスピード（2 0 , 0 0 0 $\times$ g ; 1 4 , 0 0 0 r p m）で3分間遠心分離する。

【0163】

Q I A a m p（登録商標）M i n iカラムを新しい2 m lの採取チューブに入れる。蓋を開け、アセンブリを5 6 $^{\circ}$ Cで1 0分間インキュベートして、膜を完全に乾燥させる。Q I A a m p（登録商標）M i n iカラムを清潔な1 . 5 m lの溶出チューブ（付属）に入れ、ステップ1 4の2 m l採取チューブを廃棄する。2 0 ~ 1 5 0 μ lのバッファA V EをQ I A a m p（登録商標）M i n i膜の中央に注意深く適用する。蓋を閉め、室温で3分間インキュベートする。溶出バッファA V Eが室温（1 5 ~ 2 5 $^{\circ}$ C）に平衡化されていることを確認する。少量（< 5 0 μ l）で溶出を行う場合、結合したD N Aが完全に溶出するように、溶出バッファを膜の中央に分注する必要がある。溶出体積はフレキシブルであり、下流用途の要件に従って適合することができる。回収される溶出液体積は、Q I A a m p（登録商標）M i n iカラムに適用された溶出体積よりも最大5 μ l少なくなる。マイクロ遠心機においてフルスピード（2 0 , 0 0 0 $\times$ g ; 1 4 , 0 0 0 r p m）で1分間遠心分離して核酸を溶出させる。上記の例のQ I A a m p（登録商標）C i r c u l a t i n g N u c l e i c A c i d H a n d b o o k 1 / 2 0 1 1は、当業者の知識を代表するものであり、限定的ではなく例示的なものである。本明細書では、上記方法の変形またはc f R N A精製の異なる手法を含む代替的な実施形態が想定され、本明細書で開示される方法及び組成物は、いずれかの特定のc f R N A精製方法に限定されるものではない。例示的なR N A方法については、下記の実施例1でさらに説明する。

【0164】

i. 遺伝子発現レベルを検出するシーケンシングベースの方法

いくつかの実施形態において、RNAレベルは、シーケンシング技術を使用してアッセイされ得る。シーケンシング技術の例は、パイロシーケンシング、例えば、「454」法 (Margulies et al., (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature 437:376-380、Ronaghi, et al. (1996) Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. Anal. Biochem. 242:84-89)、「Solexa」もしくはIlluminaタイプのシーケンシング (Fedurco et al., (2006), BTA, a novel reagent for DNA attachment of glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. Nucleic Acid Research 34, e22、Turcatti et al. (2008), A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. Nucleic Acid Research 36, e25)、SOLIDシーケンシング技術 (Shendure, J. et al. (2005) Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. Science 309, 1728-1732、McKernan, K. et al., (2006) Reagents, methods, and libraries for bead-based sequencing、米国特許出願第20080003571号)、Heliscope技術 (Harris, T. D. et al. (2008) Single-molecule DNA sequencing of a viral genome. Science 320, 106-109)、Ion Torrent技術 (Rothberg et al., (2011) An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature 475, 348-352)、SMRTシーケンシング技術 (Pacific Biosciences)、またはGridIONナノポアベースのシーケンシング (Oxford Nanopore Technologies、<http://www.nanoporetech.com/technology/the-gridion-system/the-gridion-system>) など、1つまたは複数の技術を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、Shendure and Ji, "Next-generation DNA sequencing", Nature Biotechnology 26 (10):1135-1145 (2008)、または当業者に利用可能な他の技術で説明されているような、任意の数のいわゆる「次世代」DNAシーケンシング法が使用され得る。DNA配列の判定のための他の方法も適用可能であり、本明細書で開示される実施形態は、特定の遺伝子座における塩基同一性を判定するいずれかの特定の方法に限定されてあらゆる他の方法を除外するものではない。

【0165】

いくつかの実施形態において、クローン増幅された分子及び単一の核酸分子の超並列シーケンシングを可能にする次世代シーケンシング (NGS) 技法が使用される。NGSの非限定的な例は、可逆的色素ターミネーターを使用する合成によるシーケンシング、及びライゲーションによるシーケンシングを含む。

【0166】

いくつかの実施形態では、検出される少なくとも1つのRNA分子、少なくとも1つの

10

20

30

40

50

第1のアダプター、少なくとも1つの第2のアダプター、及び二本鎖特異的RNAリガーゼを含むライゲーション反応組成物が形成される。第1のアダプターは、3'末端に少なくとも2つのリボヌクレオシドを含む第1のオリゴヌクレオチドと、第1のオリゴヌクレオチドと第2のオリゴヌクレオチドと一緒にハイブリダイズするときに一本鎖部分を含む第2のオリゴヌクレオチドとを含む。第2のアダプターは、5'リン酸基を含む第3のオリゴヌクレオチドと、第3のオリゴヌクレオチドと第4のオリゴヌクレオチドと一緒にハイブリダイズするときに一本鎖部分を含む第4のオリゴヌクレオチドとを含む。第1のアダプター及び第2のアダプターは、二本鎖特異的RNAリガーゼによってライゲーション反応組成物中のRNA分子にライゲーションされて、ライゲーション産物を形成する。第1のアダプター及び第2のアダプターは、それらの構造に起因して方向性のある様式でRNA分子とアニーリングし、各アダプターは、それがアニーリングされるRNA分子に、連続的にではなく同時にまたはほぼ同時にライゲーションされる（例えば、第2のアダプター及びRNA分子がリガーゼと組み合わせられ、第2のアダプターがRNA分子の3'末端にライゲーションされると、その後、第1のアダプターがライゲーション後のRNA分子-第2のアダプターと組み合わせられ、次いで第1のアダプターがRNA分子-第2のアダプターの5'末端にライゲーションされ、第2のアダプターのRNA分子へのライゲーションと、第1のアダプターのRNA分子へのライゲーションとの間には、介在する精製ステップがある。例えば、Elbashir et al., Genes and Development 15: 188-200, 2001、Berezikov et al., Nat. Genet. Supp. 38: S2-S7, 2006を参照のこと）。成分がライゲーション反応組成物に加えられる順序は限定的ではなく、成分は任意の順序で加えられ得ることが理解されるべきである。また、成分を加えるプロセス中に、リガーゼの存在下でアダプターを対応するRNA分子とライゲーションしてから、反応組成物の成分の全てを加えてもよいこと、例えば、限定ではないが、リガーゼの存在下で第2のアダプターを対応するRNA分子とライゲーションしてから、第1のアダプターを加えてもよいこと、そして、一方のアダプターがRNA分子にライゲーションされる時と、他方のアダプターがRNA分子にライゲーションされる時との間に精製手順がない限り、このような反応は本教示の意図される範囲内であることが理解されるべきである。RNA指向性DNAポリメラーゼ（RNA依存性DNAポリメラーゼと呼ばれることもある）をライゲーション産物と合わせて反応混合物を形成し、これを逆転写産物に好適な条件下でインキュベートする。逆転写産物を、リボヌクレアーゼ、典型的にリボヌクレアーゼH（RNase H）と合わせると、リボヌクレオシドの少なくとも一部が逆転写産物から消化されて、増幅テンプレートが形成される。

10

20

30

40

50

【0167】

次に、増幅テンプレートを、少なくとも1つのフォワードプライマー、少なくとも1つのリバースプライマー、及びDNA指向性DNAポリメラーゼ（DNA依存性DNAポリメラーゼと呼ばれることもある）と合わせて、増幅反応組成物を形成する。増幅産物の生成を可能にするのに好適な条件下で増幅反応組成物をサーモサイクルにかける。いくつかの実施形態において、増幅産物の少なくとも1つの種が検出される。いくつかの実施形態において、レポータープローブ及び／または核酸色素が、サンプル中のRNA種の少なくとも1つの存在を間接的に検出するために使用される。特定の実施形態において、増幅反応組成物は、例えばTaqMan（登録商標）プローブ、分子ビーコン、Scorpion（商標）プライマーなどだがこれらに限定されないレポータープローブ、あるいは例えばSYBR（登録商標）Greenまたは他の核酸結合色素もしくは核酸挿入色素だがこれに限定されない核酸色素をさらに含む。本教示の特定の実施形態では、検出は、定量的PCRを含むがこれに限定されない、リアルタイムまたはエンドポイント検出技法を含む。いくつかの実施形態において、増幅産物の少なくとも一部の配列が判定され、これにより、対応するRNA分子を同定することができる。いくつかの実施形態において、ライブラリー特異的ヌクレオチド配列を含む増幅産物のライブラリーが、出発物質中のRNA分子から生成され、ここで、増幅産物種のうちの少なくともいくつかは、バーコード配列も

しくはハイブリダイゼーションタグ、または一般的なマーカーもしくはアフィニティータグを含むがこれらに限定されない、例えばライブラリー特異的ヌクレオチド配列だがこれに限定されない、ライブラリー特異的識別子を共通して有する。いくつかの実施形態では、2つ以上のライブラリーが組み合わせられて分析され、次いで、結果がライブラリー特異的識別子に基づいてデコンボリューションされる。

【0168】

いくつかの実施形態において、1つのポリメラーゼ、すなわち、DNA指向性DNAポリメラーゼ活性とRNA指向性DNAポリメラーゼ活性の両方を含むDNAポリメラーゼのみが、逆転写反応組成物に用いられ、追加のポリメラーゼは使用されない。他の方法の実施形態では、RNA指向性DNAポリメラーゼとDNA指向性DNAポリメラーゼの両方が逆転写反応組成物に加えられ、追加のポリメラーゼは増幅反応組成物に加えられない。

10

【0169】

いくつかの実施形態において、サンプル中のRNA分子を検出する方法は、ライゲーション反応組成物を形成するように、少なくとも1つの第1のアダプター、少なくとも1つの第2のアダプター、及び二本鎖特異的RNAリガーゼ活性を含むポリペプチドとサンプルを合わせることであって、少なくとも1つの第1のアダプター及び少なくとも1つの第2のアダプターは、サンプルのRNA分子にライゲーションされて、同じライゲーション反応組成物においてライゲーション産物を形成する、合わせることで、ライゲーション産物のRNA分子またはその代用物を検出することを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの第1のアダプターは、10～60ヌクレオチドの長さを有し、かつ3'末端に少なくとも2つのリボヌクレオシドを含む第1のオリゴヌクレオチドと、第1のオリゴヌクレオチドに実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む第2のオリゴヌクレオチドであって、第1のオリゴヌクレオチド及び第2のオリゴヌクレオチドが二重鎖になるとき、1～8ヌクレオチドの一本鎖5'部分をさらに含む、第2のオリゴヌクレオチドとを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの第2のアダプターは、10～60ヌクレオチドの長さを有し、かつ5'リン酸基を含む第3のオリゴヌクレオチドと、第3のオリゴヌクレオチドに実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む第4のオリゴヌクレオチドであって、第3のオリゴヌクレオチド及び第4のオリゴヌクレオチドが二重鎖になるとき、1～8ヌクレオチドの一本鎖3'部分をさらに含む、第4のオリゴヌクレオチドとを含む。いくつかの実施形態において、一本鎖部分は、独立して、縮重ヌクレオチド配列、またはRNA分子の一部分に相補的である配列を有する。いくつかの実施形態において、第1及び第3のオリゴヌクレオチドは、異なるヌクレオチド配列を有する。ライゲーション反応組成物において、検出されるRNA分子は、少なくとも1つの第1のアダプターの一本鎖部分及び少なくとも1つの第2のアダプターの一本鎖部分とハイブリダイズする。

20

30

【0170】

いくつかの実施形態において、RNA分子またはその代用物を検出することは、ライゲーション産物を、i) RNA指向性DNAポリメラーゼ、ii) DNA依存性DNAポリメラーゼ活性及びRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含むDNAポリメラーゼ、またはiii) RNA指向性DNAポリメラーゼ及びDNA指向性DNAポリメラーゼと合わせることで；ライゲーション産物を逆転写して逆転写産物を形成することと；リボヌクレアーゼHを用いて逆転写産物からリボヌクレオシドのうちの少なくともいくつかを消化して増幅テンプレートを形成することと；増幅反応組成物を形成するように、増幅テンプレートを、少なくとも1つのフォワードプライマー、少なくとも1つのリバースプライマー、及びライゲーション産物がi)のように合わされる場合はDNA指向性DNAポリメラーゼと合わせることで；増幅反応組成物をサイクルにかけて少なくとも1つの増幅産物を形成し、増幅産物の少なくとも一部の配列を判定し、これによってRNA分子を検出することを含む。

40

【0171】

50

いくつかの実施形態において、RNAライブラリーを生成する方法は、ライゲーション反応組成物を形成するように、複数の異なるRNA分子を、複数の第1のアダプター種、複数の第2のアダプター種、及び二本鎖特異的RNAリガーゼと合わせることであって、少なくとも1つの第1のアダプターは、3'末端に少なくとも2つのリボヌクレオシドを含む第1のオリゴヌクレオチドと、第1のオリゴヌクレオチド及び第2のオリゴヌクレオチドと一緒にハイブリダイズするときに一本鎖部分を含む第2のオリゴヌクレオチドとを含み、少なくとも1つの第2のアダプターは、5'リン酸基を含む第3のオリゴヌクレオチドと、第3のオリゴヌクレオチド及び第4のオリゴヌクレオチドと一緒にハイブリダイズするときに一本鎖部分を含む第4のオリゴヌクレオチドとを含む、合わせることで、複数の異なるライゲーション産物種を形成するように、少なくとも1つの第1のアダプター及び少なくとも1つの第2のアダプターをRNA分子にライゲーションすることであって、第1のアダプター及び第2のアダプターは、同じライゲーション反応組成物においてRNA分子にライゲーションされる、ライゲーションすることを含む。この方法は、複数のライゲーション産物種をRNA指向性DNAポリメラーゼと合わせることで、複数のライゲーション産物種のうちの少なくともいくつかを逆転写して、複数の逆転写産物種を形成することと、リボヌクレアーゼH (RNase H)を用いて複数の逆転写産物のうちの少なくともいくつかからリボヌクレオシドのうちの少なくともいくつかを消化して複数の増幅テンプレート種を形成することと、複数の増幅テンプレート種を、少なくとも1つのフォワードプライマー、少なくとも1つのリバースプライマー、及びDNA指向性DNAポリメラーゼと合わせて、増幅反応組成物を形成することと、増幅反応組成物をサイクルにかけて、複数の増幅産物種を含むライブラリーを形成することであって、増幅産物種のうちの少なくともいくつかは、ライブラリー内の他の増幅産物種のうちの少なくともいくつかと共通する識別配列を含む、形成することとをさらに含む。

10

20

30

40

50

【0172】

いくつかの実施形態において、増幅産物の少なくとも一部の配列が判定され、これにより、目的のRNA分子が検出される。「シーケンシング」という用語は、本明細書では広義に使用され、伸長産物またはベクターインサートの少なくとも一部を含むがこれらに限定されない、RNAの少なくとも一部における少なくともいくつかの連続するヌクレオチドの順序を同定することを可能にする、当技術分野で知られる任意の技法を指す。シーケンシング技法のいくつかの非限定的な例は、Sangerのジデオキシターミネーター法ならびにMaxam及びGilbertの化学的切断法を含み、これらの方法の変形、すなわち、例えばビーズアレイなどのマイクロアレイまたはビーズへの増幅産物のハイブリダイゼーションだがこれに限定されないハイブリダイゼーションによるシーケンシング、パイロシーケンシング（例えば、Ronaghi et al., Science 281:363-65, 1998を参照のこと）、及び制限マッピングを含む。いくつかのシーケンシング方法は、キャピラリー電気泳動及びゲル電気泳動を含むがこれらに限定されない電気泳動、質量分析、ならびに単分子検出を含む。いくつかの実施形態において、シーケンシングは、直接シーケンシング、デュプレックスシーケンシング、サイクルシーケンシング、単一塩基伸長シーケンシング (SBE)、固相シーケンシング、またはこれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、シーケンシングは、例えばABI PRISM (登録商標) 377 DNA Sequencer、ABI PRISM (登録商標) 310、3100、3100-Avant、3730、または3730xL Genetic Analyzer、ABI PRISM (登録商標) 3700 DNA Analyzer、もしくはApplied Biosystems SOLiD (登録商標) System (全てApplied Biosystems製)、Genome Sequencer 20 System (Roche Applied Science)、または質量分析計だがこれらに限定されない計器を使用して、シーケンシング産物を検出することを含む。特定の実施形態において、シーケンシングは、エマルジョンPCR (例えば、Williams et al., Nature Methods 3(7):545-50, 2006を参照のこと)を含む。特定の実施形態において、シー

ケンシングは、例えば超並列シグネチャーシーケンシング (MPSS) だがこれに限定されないハイスループットシーケンシング技法を含む。MPSSの説明は、とりわけ、Zhou et al., Methods of Molecular Biology 331:285-311, Humana Press Inc., Reinartz et al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics, 1:95-104, 2002、Jongeneel et al., Genome Research 15:1007-14, 2005に見出すことができる。いくつかの実施形態において、シーケンシングは、dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP、dITP、またはこれらの組み合わせを含むがこれらに限定されず、dNTPのジデオキシリボヌクレオチドバージョンを含むdNTPを、増幅産物に組み込むことを含む。

10

【0173】

核酸分子の少なくとも一部分の配列を判定するのに有用であるさらなる例示的な技法は、エマルジョンベースのPCRとそれに続く任意の好適な超並列シーケンシングまたは他のハイスループット技法を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、増幅産物の少なくとも一部の配列を判定して対応するRNA分子を検出することは、増幅産物を定量化することを含む。いくつかの実施形態において、シーケンシングは、例えば、「Reagents, Methods, and Libraries For Bead-Based Sequencing」と題するPCT特許出願公開第WO06/084132号、及び「Reagents, Methods, and Libraries for Gel-Free Bead-Based Sequencing」と題する同第WO07/121489号に記載されているように、SOLiD (登録商標) System (Applied Biosystems) を使用して実施される。いくつかの実施形態において、増幅産物を定量化することは、リアルタイムもしくはエンドポイント定量的PCR、またはその両方を含む。いくつかの実施形態において、増幅産物を定量化することは、mRNA発現プロファイルまたはmiRNA発現プロファイルといった、検出されるRNA分子の発現プロファイルを生成することを含む。特定の実施形態において、増幅産物を定量化することは、例えば、TaqMan (登録商標) Gene Expression Assays及びTaqMan (登録商標) miRNA Assaysだがこれらに限定されない1つまたは複数の5'-ヌクレアーゼアッセイを含み、これらは、低密度アレイを含むがこれに限定されないマイクロフルイディクスデバイスを含んでもよい。当技術分野で知られる任意の好適な発現プロファイリング技法を、本開示の方法の様々な実施形態で用いることができる。

20

30

【0174】

当業者には、用いられるシーケンシング方法が典型的には本発明の方法の限定ではないことが理解されよう。むしろ、検出しようとする対応する増幅産物またはRNAの少なくとも一部、または増幅産物に由来するベクターインサートの少なくとも一部の、少なくともいくつかの連続したヌクレオチドの順序を提供する任意のシーケンシング技法は、典型的に本発明の方法に使用することができる。シーケンシング技法の説明は、とりわけ、McPherson、特に第5章、Sambrook and Russell、Ausubel et al., Siuzdak, The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology, MCC Press, 2003、特に第7章、及びRapleyに見出すことができる。いくつかの実施形態において、組み込まれていないプライマー及び／またはdNTPは、例えばExoSAP-IT (登録商標) 試薬 (USB Corporation) だがこれに限定されない、エキソヌクレアーゼI及びシュリンブアルカリホスファターゼによる消化を含むがこれに限定されない酵素分解により、シーケンシングステップの前に除去される。いくつかの実施形態において、組み込まれていないプライマー、dNTP、及び／またはddNTPは、ゲルもしくはカラム精製、沈降、濾過、ビーズ、磁気分離、またはハイブリダイゼーションベースのプルアウトにより、必要に応じて除去される (例えば、ABI

40

50

PRISM（登録商標）Duplex（商標）384 Well F/R Sequence Capture Kit、Applied Biosystems P/N 4308082を参照のこと）。

【0175】

当業者には、特定の実施形態において、用いられるシーケンシング／再シーケンシング技法のリード長が、効果的に検出され得るRNA分子のサイズの要因であり得ることが理解されよう（例えば、Kling, Nat. Biotech. 21(12):1425-27を参照のこと）。いくつかの実施形態において、第1のサンプルにおけるRNA分子から生成された増幅産物は、第1の識別配列（本明細書では「バーコード」と呼ばれることもある）または他のマーカーで標識され、第2のサンプルにおけるRNA分子から生成された増幅産物は、第2の識別配列または第2のマーカーで標識され、第1の識別配列を含む増幅産物及び第2の識別配列を含む増幅産物は、対応するサンプル中の対応するRNA分子の配列を判定する前にプールされる。特定の実施形態において、該当するライブラリーに特異的な識別子配列を各々が含む3つ以上の異なるRNAライブラリーが組み合わされる。いくつかの実施形態において、第1のアダプター、第2のアダプター、フォワードプライマー、リバースプライマー、またはこれらの組み合わせは、識別配列または識別配列の相補体を含む。

【0176】

いくつかの実施形態において、シーケンシングは、後述のように、Affymetrix Inc. (Sunnyvale, Calif.) のハイブリダイゼーションによるシーケンシングプラットフォーム、ならびに454 Life Sciences (Bradford, Conn.)、Illumina/Solexa (Hayward, Calif.)、及びHelicos Biosciences (Cambridge, Mass.) の合成によるシーケンシングプラットフォーム、ならびにApplied Biosystems (Foster City, Calif.) のライゲーションによるシーケンシングプラットフォームといった、市販されている技術を使用することを含む。Helicos Biosciencesの合成によるシーケンシングを使用して行われる単分子シーケンシングに加えて、他の単分子シーケンシング技術は、Pacific BiosciencesのSMRT（登録商標）技術、ION TORRENT（登録商標）技術、及び例えばOxford Nanopore Technologiesによって開発されたナノポアシーケンシングを含むが、これらに限定されない。

【0177】

いくつかの実施形態において、この方法は、(a) 複数の第1のプライマー中の2つ以上の第1のプライマーの3'領域と、RNAサンプル中の2つ以上のRNA分子との間に複合体が形成され、第1のプライマーの3'領域がランダムヌクレオチド配列及び第1のヌクレオチド配列タグを含む条件下で、複数の第1のプライマーをRNAサンプルにハイブリダイズさせること；(b) 複合体の複数の第1のプライマーを逆転写によって伸長させ、これによって2つ以上のRNA分子の相補的DNA (cDNA) 分子を生成すること；(c) 第2のヌクレオチド配列タグを含む複数の二本鎖ポリヌクレオチド分子を、2つ以上のcDNA分子に、(i) 複数の二本鎖ポリヌクレオチド分子中の二本鎖ポリヌクレオチド分子の3'オーバーハングと、cDNA分子の3'領域との間に複合体が形成され、3'オーバーハングが第2のランダムヌクレオチド配列を含み、かつ(ii) 複数の二本鎖ポリヌクレオチド分子中の二本鎖ポリヌクレオチド分子の相補的な第2の鎖の5'末端がcDNA分子の3'末端に隣接する条件下で、ハイブリダイズさせること；(d) 二本鎖ポリヌクレオチド分子の相補的な第2の鎖の5'末端を2つ以上のcDNA分子の3'末端に結合させ、これによって二本鎖ポリヌクレオチド分子の未結合の鎖を生成すること；(e) 二本鎖ポリヌクレオチド分子の未結合の鎖を除去し、これによって第1及び第2のヌクレオチド配列タグを含む複数の一本鎖cDNA分子を形成すること、ならびに(f) 複数の一本鎖cDNA分子を二本鎖cDNA分子に変換し、これによってRNAサンプル中のRNA分子の特定の鎖を表すcDNAライブラリーを作出することにより、RNAサ

ンプル中のRNA分子の特定の鎖を表す相補的DNA (cDNA) ライブラリーを作出することを含む。

【0178】

他の実施形態では、この方法は、(a) 複数の第1のプライマー中の2つ以上の第1のプライマーの3'領域と、RNAサンプル中の2つ以上のRNA分子との間に複合体が形成され、一本鎖プライマーの3'領域がランダムヌクレオチド配列及び第1のヌクレオチド配列タグを含む条件下で、複数の第1のプライマーをRNAサンプルにハイブリダイズさせること；(b) 複合体の第1のプライマーを逆転写によって伸長させ、これによって2つ以上のRNA分子の相補的DNA (cDNA) 分子を生成すること；(c) ある条件下で二本鎖ポリヌクレオチド分子をcDNA分子に結合させることであって、(c) 二本鎖ポリヌクレオチド分子の5'末端がcDNA分子に結合し、RNA分子が二本鎖ポリヌクレオチド分子の3'末端に結合せず、二本鎖DNA分子が第2のヌクレオチド配列タグを含む条件下で、二本鎖ポリヌクレオチド分子をcDNA分子に結合させること；(d) 前記RNA分子を除去すること；ならびに(e) 相補的な第2の鎖DNA分子を前記cDNA分子から合成し、これによってRNAサンプル中のRNA分子の特定の鎖を表すcDNAライブラリーを形成することにより、RNAサンプル中のRNA分子の特定の鎖を表すcDNAライブラリーを作出することを含む。

10

【0179】

いくつかの実施形態において、プライマーは、非ランダム配列、例えばポリTまたはポリA配列を使用してポリヌクレオチドにハイブリダイズしてもよく、非ランダム配列は、この実施形態のいくつかの形態では、標的とハイブリダイズするランダムまたは非ランダム非ポリTまたは非ポリT配列で終わる場合がある。別の例として、プライマーは、エクソン配列と実質的に相補的または実質的に同じのいずれかに対応する配列を含み得る。複数のポリヌクレオチドが同時に標的とされる場合、プライマーは、複数のポリヌクレオチドを標的とするものと同じであっても異なってもよい。

20

【0180】

いくつかの実施形態において、超並列シーケンシングは、Illuminaの合成によるシーケンシング及び可逆的ターミネーターに基づくシーケンシング化学(例えば、Bentley et al., Nature 6:53-59 [2009]に記載の通り)を使用する。いくつかの実施形態において、Illuminaのシーケンシング技術は、オリゴヌクレオチドアンカーが結合している平面的で光学的に透明な表面にRNA転写物の相補的DNA (cDNA) が結合することに依存する。テンプレートcDNAを末端修復して、5'-リン酸化平滑末端を生成し、Klenow断片のポリメラーゼ活性を使用して、平滑なリン酸化DNA断片の3'末端に単一のA塩基を付加する。この付加により、ライゲーション効率を増加させる単一のT塩基のオーバーハングを3'末端に有する、オリゴヌクレオチドアダプターにライゲーションするためのDNA断片が調製される。アダプターオリゴヌクレオチドは、フローセルアンカーに相補的である。限界希釈条件下で、アダプター修飾された一本鎖テンプレートDNAがフローセルに加えられ、アンカーへのハイブリダイゼーションによって固定化される。結合したDNA断片を伸長させ、ブリッジ増幅すると、同じテンプレートの約1,000コピーを各々が含む億単位のクラスターを有する超高密度シーケンシングフローセルが作出される。一実施形態において、相補的DNA (cDNA) をクラスター増幅に供する前に、PCRを使用して増幅する。

30

40

【0181】

いくつかの実施形態において、除去可能な蛍光色素を備えた可逆的ターミネーターを用いる合成によるロバストな4色DNAシーケンシング技術を使用して、テンプレートをシーケンシングする。高感度蛍光検出は、レーザー励起及び全内反射光学を使用して達成される。約20~40bp、例えば、36bpの短い配列リードが、リピートマスクされた参照ゲノムに対してアラインされ、参照ゲノムに対する短い配列リードのユニークマッピングが、特別に開発されたデータ分析パイプラインソフトウェアを使用して同定される。リピートマスクされていない参照ゲノムを使用することもできる。リピートマスクされた

50

参照ゲノムまたはリピートマスクされていない参照ゲノムのいずれが使用されるかにかかわらず、参照ゲノムにユニークにマッピングされるリードのみが計数される。第1のリードの完了後、テンプレートを *in situ* で再生して、断片の反対端から第2のリードを可能にすることができる。よって、DNA断片のシングルエンドシーケンシングを使用してもペアエンドシーケンシングを使用してもよい。サンプル中に存在するDNA断片の部分的なシーケンシングを行い、所定の長さ、例えば36bpのリードを含む配列タグを、既知の参照ゲノムにマッピングし、計数する。一実施形態において、cDNA分子のクローン増幅されたコピーの一端をシーケンシングし、Efficient Large-Scale Alignment of Nucleotide Databases (ELAND) ソフトウェアを使用するIllumina Genome Analyzerのバイオインフォマティクスアラインメント分析によって処理する。

10

【0182】

i i . RNA発現レベルを検出するPCRベースの方法

RNA抽出法によって生成されたサンプルは、高純度で、PCR阻害剤を含まない場合があり、例えば、様々なタイプのがんのアッセイとしてRNA相対発現をアッセイするために、いくつかの実施形態で使用されるqPCRに好適であり得る。

【0183】

いくつかの実施形態において、これらの方法は、アンプリコンを生成するためにPCRまたはqPCRを行うことを含む。PCR及びqPCRのプロトコルは、本明細書以下で例示されており、標的遺伝子及び参照遺伝子の検出及び／または同定のために本明細書に記載される組成物を使用する使用に直接適用または適合させることができる。

20

【0184】

いくつかの実施形態は、定量的PCR (qPCR) (リアルタイムPCRとも呼ばれる) を含む方法を提供する。qPCRは、定量的測定を行い、時間及び夾雑を低減させるという利点ももたらし得る。本明細書で使用される場合、「定量的PCR」(「qPCR」またはより具体的には「リアルタイムqPCR」) とは、反応産物のサンプリングを繰り返す必要なしに、発生中のPCR増幅の進行を直接モニタリングすることを指す。qPCRでは、反応産物は、それらが生成されるときにシグナル伝達機構(例えば蛍光)を介してモニタリングされ得、シグナルがバックグラウンドレベルを超えて上昇した後、しかし反応がプラトーに達する前に追跡される。蛍光の検出可能または「閾値」レベルを達成するのに必要なサイクルの数(本明細書ではサイクル閾値または「CT」と呼ばれる)は、PCRプロセスの開始時の増幅可能な標的の濃度に正比例し、リアルタイムでサンプル中の標的核酸の量の測度を提供するシグナル強度の測定を可能にする。

30

【0185】

PCR及びqPCR反応の準備をするには、反応混合物は、最小限の、テンプレート核酸(例えば、後述する陰性対照の場合を除き、検査サンプルに存在する)ならびにオリゴヌクレオチドプライマー及び／またはプローブを、好適なバッファー、塩など、及び適切な濃度の核酸ポリメラーゼと組み合わせて含む。本明細書で使用される場合、「核酸ポリメラーゼ」は、ヌクレオシド三リン酸の重合を触媒する酵素を指す。一般に、この酵素は、標的配列にアニーリングされたプライマーの3'末端で合成を開始し、合成が終結するまでテンプレートに沿って5'→3'方向に進む。適切な濃度は、本明細書に記載される方法において、この反応を触媒するものを含む。本明細書で開示される方法において有用な公知のDNAポリメラーゼは、例えば、E. coli DNAポリメラーゼI、T7 DNAポリメラーゼ、Thermus thermophilus (Tth) DNAポリメラーゼ、Bacillus stearothermophilus DNAポリメラーゼ、Thermococcus litoralis DNAポリメラーゼ、Thermus aquaticus (Taq) DNAポリメラーゼ及びPyrococcus furiosus (Pfu) DNAポリメラーゼ、FASTSTART (商標) Taq DNAポリメラーゼ、APTATAQ (商標) DNAポリメラーゼ (Roche)、KLENTAQ 1 (商標) DNAポリメラーゼ (AB peptides Inc.)、HO

40

50

T G O L D S T A R (商標) D N Aポリメラーゼ (E u r o g e n t e c)、K A P A T A Q (商標) H o t S t a r t D N Aポリメラーゼ、K A P A 2 G (商標) F a s t H o t S t a r t D N Aポリメラーゼ (K a p a B i o s y s t e m s s)、P H U S I O N (商標) H o t S t a r t D N Aポリメラーゼ (F i n n z y m e s) などを含む。

【0186】

上記の成分に加えて、本発明の方法の反応混合物は、プライマー、プローブ、及びデオキシリボヌクレオシド三リン酸 (d N T P) を含む。

【0187】

通常、反応混合物は、4つの天然に発生するヌクレオシド塩基に対応する4つの異なるタイプのd N T P、例えば、d A T P、d T T P、d C T P、及びd G T Pをさらに含む。いくつかの実施形態において、各d N T Pは、典型的には、約10～5000 μ M、通常は約20～1000 μ M、約100～800 μ M、または約300～600 μ Mの範囲の量で存在する。

【0188】

反応混合物は、一価イオン源、二価カチオン源、及び緩衝剤を含む水性緩衝媒体をさらに含むことができる。塩化カリウム、酢酸カリウム、酢酸アンモニウム、グルタミン酸カリウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウムなどの任意の簡便な一価イオン源を使用することができる。二価カチオンは、マグネシウム、マンガン、亜鉛などであり得、ここで、カチオンは、典型的にはマグネシウムである。塩化マグネシウム、酢酸マグネシウムなどを含む、任意の簡便なマグネシウムカチオン源を用いることができる。バッファー中に存在するマグネシウムの量は、0.5～10 mMの範囲であり得、約1～約6 mM、または約3～約5 mMの範囲とすることができる。バッファー中に存在し得る代表的な緩衝剤または塩は、トリス、トリシン、H E P E S、M O P Sなどを含み、緩衝剤の量は、典型的には約5～150 mM、通常は約10～100 mM、より一般的には約20～50 mMの範囲であり、特定の好ましい実施形態において、緩衝剤は、約6.0～9.5の範囲、例えば、約pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、または9.5のpHをもたらすのに十分な量で存在する。緩衝媒体中に存在し得る他の薬剤には、E D T A、E G T Aなどのキレート剤が含まれる。いくつかの実施形態では、反応混合物は、B S Aなどを含むことができる。さらに、いくつかの実施形態において、反応物は、特に試薬が長期間保存され得るマスターミックスとして提供される場合、トレハロースなどの凍結防止剤を含み得る。

【0189】

反応混合物を調製する際、様々な構成成分を任意の都合のよい順序で合わせることができる。例えば、バッファーをプライマー、ポリメラーゼ、次いでテンプレート核酸と合わせてもよく、または様々な構成成分の全てを同時に合わせて反応混合物を生成してもよい。

【0190】

代替的に、例えば、Q u a n t i f a s t P C Rミックス (Q i a g e n)、T A Q M A N (登録商標) U n i v e r s a l P C R M a s t e r M i x (A p p l i e d B i o s y s t e m s)、O M N I M I X (登録商標) もしくはS M A R T M I X (登録商標) (C e p h e i d)、I Q & # 8 4 8 2 ; S u p e r m i x (B i o - R a d L a b o r a t o r i e s)、L I G H T C Y C L E R (登録商標) F a s t S t a r t (R o c h e A p p l i e d S c i e n c e, I n d i a n a p o l i s, I N)、またはB R I L L I A N T (登録商標) Q P C R M a s t e r M i x (S t r a t a g e n e, L a J o l l a, C A)を含む、市販の混合済み試薬を、製造元の説明書に従って、または反応条件を改善するために改変して(例えば、必要に応じて、バッファー濃度、カチオン濃度、またはd N T P濃度の改変)、本明細書で開示される方法において利用してもよい。

【0191】

反応混合物は、プライマー伸長反応条件（「ポリメラーゼベースの核酸増幅産物をもたらすのに十分な条件」）、例えば、テンプレート鎖をテンプレートとして使用したプライマー分子の末端へのヌクレオチドの付加により、ポリメラーゼ媒介性プライマー伸長を可能にする条件に供され得る。多くの実施形態において、プライマー伸長反応条件は、増幅条件であり、この条件は、複数の反応サイクルを含み、各反応サイクルは、（１）変性ステップ、（２）アニーリングステップ、及び（３）重合ステップを含む。後述するように、いくつかの実施形態において、増幅プロトコルは、アニーリングに特化した特定の時間を含まず、代わりに、変性及び伸長に特化した特定の時間のみを含む。反応サイクルの数は、行われる適用形態に応じて異なるが、通常は少なくとも１５、より一般的には少なくとも２０であり、最高６０またはそれ以上であってもよく、異なるサイクルの数は、典型的には約２０～４０の範囲である。約２５を超える、通常は約３０を超えるサイクルが行われる方法の場合、酵素的プライマー伸長に好適な条件が維持されるように、反応混合物に追加のポリメラーゼを導入することが便利または望ましい場合がある。

10

【０１９２】

変性ステップは、反応混合物を高温に加熱し、反応混合物中に存在するあらゆる二本鎖またはハイブリダイズした核酸が解離するのに十分な時間にわたり、混合物を高温に維持することを含む。変性の場合、反応混合物の温度を、通常、約８５～１００℃、通常は約９０～９８℃、より一般的には約９３～９６℃の範囲の温度に上昇させ、この温度で約３～１２０秒の範囲、通常は約３秒からの時間にわたって維持する。

【０１９３】

変性に続いて、反応混合物は、テンプレートとしてハイブリダイズされる核酸を使用してプライマーが５'から3'の方向に伸長される様式で、混合物中に存在する（存在する場合）テンプレート核酸へのプライマーアニーリング、及びプライマー末端へのヌクレオチドの重合に十分な条件、例えば、プライマー伸長産物の酵素による生成に十分な条件に供され得る。いくつかの実施形態において、アニーリング及び伸長プロセスは、同じステップで起こる。これらの条件を達成するために下げられる反応混合物の温度は、通常、最適な効率及び特異性をもたらすように選択され、一般的には約５０～８５℃、通常は約５５～７０℃、より一般的には約６０～６８℃の範囲である。いくつかの実施形態において、アニーリング条件は、約１５秒～３０分、通常は約２０秒～５分、もしくは約３０秒～１分の範囲、または約３０秒の時間にわたって維持され得る。

20

30

【０１９４】

このステップは、場合により、アニーリングステップ及び伸長ステップの各々を１つ含むことができ、各ステップで温度及び時間の長さが変更及び最適化される。２ステップのアニーリング及び伸長の場合、アニーリングステップは上記のように進めることができる。テンプレート核酸へのプライマーのアニーリングに続いて、反応混合物はさらに、上記のようにプライマー末端にヌクレオチドを重合させるのに十分な条件に供される。重合条件を達成するためには、反応混合物の温度を、典型的に、約６５～７５℃、通常は約６７～７３℃の範囲の温度に上昇させるか、またはこの温度で維持し、約１５秒～２０分、通常は約３０秒～５分の範囲の時間にわたって維持する。いくつかの実施形態において、本明細書で開示される方法は、別個のアニーリング及び伸長ステップを含まない。むしろ、これらの方法は、変性及び伸長ステップを含み、特にアニーリングに特化したステップを含まない。

40

【０１９５】

変性、アニーリング、及び伸長の上記のサイクルは、典型的にサーマルサイクラーとして知られている自動化されたデバイスを使用して行われ得る。用いることのできるサーマルサイクラーは、本明細書の他の箇所、ならびに米国特許第５，６１２，４７３号、同第５，６０２，７５６号、同第５，５３８，８７１号、及び同第５，４７５，６１０号に記載されており、これらの開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０１９６】

本明細書に記載される方法は、非ＰＣＲベースの用途において、標的核酸配列を検出す

50

るために使用することもでき、この標的は、固体支持体上に固定化され得る。核酸配列を固体支持体上に固定化する方法は、Ausubel et al., eds. (1995) Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY) において説明されており、また、製造元により提供されているプロトコール、例えば、膜についてはPall Corporation、Schleicher & Schuell、磁気ビーズについてはDynal、培養プレートについてはCostar、Nalgenunc、ビーズアレイプラットフォームについてはLuminex及びBecton Dickinson、本明細書で提供される実施形態に従って有用な他の支持体についてはCPG, Incによって説明されている。

10

【0197】

同様の増幅または検出／数量化結果をもたらす、様々な試薬の正確な量、及びPCRまたは他の好適な増幅手順のための条件（例えば、バッファー条件、サイクリング時間など）の変更は、均等物とみなされる。一実施形態において、対象のqPCR検出は、サンプル中の標的核酸の50コピー未満（好ましくは25コピー未満、より好ましくは15コピー未満、さらにより好ましくは10コピー未満、例えば、5、4、3、2、または1コピー）を検出する感度を有する。

【0198】

いくつかの実施形態において、この方法は、テンプレートRNAのPCR増幅を含み得る。DNase処理を行ってRNAサンプルからDNA夾雑を除去してもよい。標的RNAを逆転写酵素でcDNAに変換してもよく、このステップは、PCR反応で使用したものと同一プライマーのうちの1つまたは複数を使用してもよい。標的cDNAは、例えば、血漿由来のcDNAまたは他のcDNAを増幅するための一貫性のある反復可能な方法によって増幅してもよい。いくつかの実施形態において、cDNA中の1つまたは複数の標的は、Taqman（登録商標）化学を介して増幅及び数量化され得る。このプロトコールは、RNA量を検出するための唯一の好適なプロトコールではない場合がある。しかしながら、プロトコールの変化は最終的な結果に大きな影響を与え得るので、cDNA合成及び増幅は一貫性のあるプロトコールを使用することが重要であり得る。

20

【0199】

いくつかの実施形態において、Qiagenアッセイ#QF00119602が、製造元のプロトコールに従って提供されるプライマー／プローブを使用したqPCRに使用され得る。AgilentのUniversal RNAをqPCRの標準として使用してもよい。

30

【0200】

RNA標準は、複数のランで結果を標準化するために使用され得る。この標準は、異なる希釈度でランすることができる。いくつかの実施形態において、合成標準が使用され得る。例えば、1つまたは複数のマーカーの正常範囲及びカットオフを検査してもよく、合成標準を得て直接使用してもよく、またはマーカーの予測されるレベルなどの予測されるレベルと同様のレベルになるように希釈するもしくは合わせてもよい。いくつかの実施形態において、合成標準は、患者サンプル中の予測されるレベル、またはこのレベルの1桁以内（例えば10倍高いまたは10倍低い）レベルで存在する。いくつかの実施形態において、合成標準は、患者サンプルについて予測されたレベル、またはこのレベルの5倍以内の差の（5倍高いまたは5倍低い）レベルで存在する。いくつかの実施形態において、合成標準は、患者サンプルについて予測されたレベル、またはこのレベルの2倍以内の差の（2倍高いまたは2倍低い）レベルで存在する。

40

【0201】

合成標準中の各合成RNAの適切なレベルを判定するには、多くの方法が使用され得る。一実施形態において、これらを代表するいくつかのサンプルをランして結果（例えば、標準に対するCt値または当てはめ値）を記録してもよい。次いで、各合成RNAを同じアッセイでランしてもよく、サンプルと同じスケール（例えば、標準に対するCtスコア

50

または当てはめ値)で結果を測定してもよい。検査により、どの標準を使用すべきかを判定することができる。例えば、50個のサンプルをランしてもよく、所与の遺伝子について33~38の範囲のCtスコアが得られる。1 μ L当たり 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 コピーの標準は、24、28、32、36、40、または44のCtスコアをもたらす。よって、アッセイ準備中、 10^5 標準を使用し、 10^4 及び 10^3 への希釈を行うことを決定できる。この戦略を使用すると、将来のサンプルをカバーするために、元の標準及び2つの希釈のみが必要である。同様の方法を使用して、同じマルチプレックスにおける他の標準の適切な濃度を選択することができる。この方法を使用すると、アッセイしようとする各転写物に異なる濃度を使用することができるので、マルチプレックス内の異なる遺伝子間に大きな不一致がある場合でも、単一の標準を使用することができる。本明細書で開示される方法を使用することにより、標準的なテンプレートでの増幅反応の回数を減らして、広範囲の蓄積レベルの転写物をアッセイすることができる。

10

【0202】

例えば、遺伝子Aが100~10,000コピー/ μ Lの範囲にあり、遺伝子Bが1,000,000~100,000,000コピーの範囲にあると予想される場合、10,000,000コピーの遺伝子Aと100,000,000コピーの遺伝子Bとの混合された合成標準を作出することができ、これにより、サンプルについて予想される全範囲をカバーするのに、10倍希釈系列で3つの標準のみが必要になる。このような合成標準を使用すると、いくつかの実施形態では、遺伝子aと遺伝子Bの両方の予想範囲をカバーする標準曲線を生成するためにqPCR反応プレートでランする必要のある標準または対照サンプルの数が劇的に低減する。この方法はまた、段階希釈中の配合によるピペティングによって導入される小さなエラーのリスクを最小限に抑える。

20

【0203】

いくつかの実施形態において、逆転写酵素PCR(RT-PCR)は、バイオマーカーのRNAレベル、例えば、mRNAまたはmiRNAレベルを判定するために使用される。RT-PCRを使用すると、異なるサンプル集団における、正常組織及び腫瘍組織における、薬物処置の有無にかかわらず、バイオマーカーのこのようなRNAレベルを比較すること、遺伝子発現のパターンの特性決定を行うこと、密接に関連するRNAを区別すること、ならびにRNA構造を分析することができる。

30

【0204】

典型的に、第1のステップは、サンプルからRNA、例えばmRNAを単離することである。出発物質は、ヒトサンプル、例えば、ヒト腫瘍または腫瘍細胞株、及び対応する正常組織または細胞株からそれぞれ単離された、全RNAであり得る。よって、RNAを、サンプル、例えば、腫瘍細胞または腫瘍細胞株から単離し、健康なドナー由来のプールDNAと比較してもよい。mRNA源が原発腫瘍である場合、mRNAを抽出することができる。

【0205】

RNAがmRNAを含むか、miRNAを含むか、または他のタイプのRNAを含むかにかかわらず、RT-PCRによる遺伝子発現プロファイリングは、RNAテンプレートを逆転写してcDNAにし、続いてPCR反応で増幅させることを含み得る。一般的に使用される逆転写酵素は、トリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素(AMV-RT)及びモロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素(MMLV-RT)を含むが、これらに限定されない。逆転写ステップは、典型的に、状況及び発現プロファイリングの目的に応じて、特定のプライマー、ランダムヘキサマー、ステムループプライマー、またはオリゴdTプライマーを使用してプライミングされる。例えば、抽出されたRNAは、GeneAmp RNA PCRキット(Perkin Elmer, Calif., USA)を製造元の説明に従って使用して、逆転写することができる。得られたcDNAは、次いで、後のPCR反応でテンプレートとして使用することができる。

40

【0206】

50

いくつかの実施形態において、PCRステップは、5' - 3'ヌクレアーゼ活性を有するが3' - 5'プルーフリーディングエンドヌクレアーゼ活性を欠いているTaq DNAポリメラーゼを用いる。TaqMan PCRは典型的に、TaqまたはTthポリメラーゼの5' - 3'ヌクレアーゼ活性を利用して、その標的アンプリコンに結合したハイブリダイゼーションプローブを加水分解するが、均等な5'ヌクレアーゼ活性を有する任意の酵素を使用してよい。PCR反応に典型的なアンプリコンを生成するためには、2つのオリゴヌクレオチドプライマーが使用される。第3のオリゴヌクレオチドまたはプローブは、2つのPCRプライマー間に位置するヌクレオチド配列を検出するように設計されている。このプローブはTaq DNAポリメラーゼ酵素によって伸長不可能であり、レポーター蛍光色素及びクエンチャー蛍光色素で標識される。レーザーにより誘導されたレポーター色素からの発光は、2つの色素がプローブ上にあり、それらが互いの近くに位置する場合、クエンチ色素によってクエンチされる。増幅反応中、Taq DNAポリメラーゼ酵素は、テンプレート依存性様式でプローブを切断する。結果として得られるプローブ断片は溶液中で解離し、放出されたレポーター色素からのシグナルには、第2のフルオロフォアのクエンチ効果がない。合成される新しい分子毎にレポーター色素の1分子が遊離し、クエンチされていないレポーター色素の検出は、データの定量的解釈の基礎を提供する。

10

【0207】

いくつかの実施形態において、TaqMan (商標) RT-PCRは、例えば、ABI PRISM 7700 (商標) Sequence Detection System (商標) (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA)、またはLightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)などの市販の機器を使用して行うことができる。一実施形態において、5'ヌクレアーゼの手順は、ABI PRISM 7700 (商標) Sequence Detection System (商標)などのリアルタイム定量的PCRデバイスで実行される。このシステムは、サーモサイクラー、レーザー、電荷結合デバイス(CCD)、カメラ、及びコンピュータからなる。このシステムは、サーモサイクラーで96ウェルフォーマットのサンプルを増幅する。増幅中、レーザーにより誘導された蛍光シグナルが、96ウェル全てで光ファイバーケーブルを通してリアルタイムで収集され、CCDで検出される。このシステムは、計器を動作させデータを分析するためのソフトウェアを含む。TaqManデータはまず、Ct、または閾値サイクルとして表される。蛍光値は、全てのサイクルで記録され、増幅反応中のその時点までに増幅された産物の量を表す。蛍光シグナルが統計的に有意であるとして最初に記録された点が、閾値サイクル(Ct)である。

20

30

【0208】

いくつかの実施形態において、エラー及びサンプル間変動の影響を最小限に抑えるために、内部標準を使用したRT-PCRが行われる。理想的な内部標準は、異なる組織間で一定のレベルで発現され、実験的処理の影響を受けない。遺伝子発現のパターンを正規化するために頻繁に使用されるRNAは、ハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)及びβ-アクチンのmRNAである。

【0209】

40

いくつかの実施形態において、リアルタイム定量的PCRは、二重標識されたFRET蛍光発生プローブ(例えば、TaqMan (商標) プローブ)を使用して、PCR産物の蓄積を測定することができる。リアルタイムPCRは、各標的配列の内部競合物質が正規化に使用される定量的競合PCRと、サンプルに含まれる正規化遺伝子またはRT-PCRのハウスキーピング遺伝子を使用する定量的比較PCRの両方に適合する。例えば、Held et al. (1996) Genome Research 6:986-994を参照のこと。

【0210】

いくつかの実施形態において、PCRフラップアッセイを使用してサンプル中のRNAを測定することができる。実施例1において詳細に説明するように、QuARTS及びL

50

Q A S / T E L Q A S フラップアッセイ技術は、ポリメラーゼベースの標的 D N A 増幅プロセスを、侵襲的切断ベースのシグナル増幅プロセスと組み合わせたものである。本明細書で後述するのは、サンプルからの R N A の定量化のために、逆転写と、これらのフラップアッセイ技術を組み合わせるアッセイである。

【0211】

i i i . 遺伝子発現レベルを検出する代替的方法

いくつかの実施形態において、R N A レベルは、マイクロアレイへのハイブリダイゼーション、n C o u n t e r、または同様のものを介してアッセイされ得る。例えば、差次的発現研究で一般的に使用されるアレイの1つのクラスには、マイクロアレイまたはオリゴヌクレオチドアレイが含まれる。これらのアレイでは、基質上で直接合成され、相補的ハイブリダイゼーションの原理に基づいて複雑な R N A またはメッセージ集団を精査するために使用される多数のプローブが利用される。典型的に、これらのマイクロアレイは、目的の遺伝子またはヌクレオチド配列の選択された領域にわたる比較的短い長さ（20量体～25量体）の16～20セットのオリゴヌクレオチドプローブペアを提供する。オリゴヌクレオチドアレイで使用されるプローブペアは、同じ R N A またはメッセージ鎖にハイブリダイズするように設計されたパーフェクトマッチプローブ及びミスマッチプローブも含む。パーフェクトマッチプローブは、目的のメッセージに完全に相補的である既知の配列を含み、ミスマッチプローブは、パーフェクトマッチプローブと異なる少なくとも1つのミスマッチヌクレオチドを含むことを除いては、その配列に関してパーフェクトマッチプローブに類似している。発現の分析中、多くのメッセージの発現レベルを同時に検証し定量化するために、サンプルヌクレオチド集団からのメッセージのハイブリダイゼーション効率が、パーフェクトマッチ及びミスマッチプローブに対して評価される。いくつかの実施形態では、遺伝子アレイ全体がマイクロアレイに印刷される。いくつかの実施形態では、標的遺伝子のうちの少なくとも1つと、参照遺伝子のうちの少なくとも1つとを含む遺伝子のサブセットが、マイクロアレイに含まれる。

【0212】

いくつかの実施形態では、例えば、N a n o s t r i n g t e c h n o l o g i e s によって提供される n C o u n t e r などのデバイスを使用して、分析を容易にすることができる。n C o u n t e r 分析システムは、完全に自動化された準備ステーション、デジタルアナライザー、C o d e S e t（分子バーコード）、ならびに分析を行うために必要な試薬及び消耗品の全てを備える統合システムである。n C o u n t e r システムでの分析は、1つの単純なワークフローにおける、溶液中ハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション後の処理、デジタルデータの取得、及び正規化からなる。いくつかの実施形態では、プロセスは自動化されている。いくつかの実施形態では、カスタムまたは事前設計されたバーコードプローブセットが、分析の一部として、包括的なシステム対照セットと事前に混合され得る。

【0213】

いくつかの実施形態は、i n s i t u ハイブリダイゼーションアッセイを使用して遺伝子発現レベルを検出する。i n s i t u ハイブリダイゼーションアッセイでは、固体支持体、典型的にはスライドガラスに細胞を固定する。いくつかの実施形態において、細胞を熱またはアルカリで変性させてもよい。次いで、細胞をハイブリダイゼーション溶液と適度な温度で接触させて、標識された特定のプローブのアニールリングを可能にする。プローブは、放射性同位元素または蛍光レポーターで標識されていることが好ましい。

【0214】

いくつかの実施形態において、F I S H（蛍光 i n s i t u ハイブリダイゼーション）は、高度の配列類似性を示す配列の部分のみに結合する蛍光プローブを使用する。F I S H は、細胞内の特定のポリヌクレオチド配列を検出し局在化するために、いくつかの実施形態で使用される細胞遺伝学的技法である。例えば、F I S H を使用して染色体上の D N A 配列を検出することができる。F I S H を使用して、組織サンプル内の特定の R N A、例えば m R N A を検出し局在化することもできる。F I S H では、高度の配列類似性を

示す特定のヌクレオチド配列に結合する蛍光プローブを示す。蛍光顕微鏡を使用して、蛍光プローブが結合しているかどうか、そしてどこに結合しているかを調べることができる。FISHは、特定のヌクレオチド配列、例えば転座、融合、切断、重複、及び他の染色体異常の検出に加えて、細胞及び組織内の特定の遺伝子コピー数及び／または遺伝子発現の時空間的パターンを定義するのに役立つ。

【0215】

いくつかの実施形態において、比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH）は、in situハイブリダイゼーションの動態を用いて、サンプルからの異なるDNAもしくはRNA配列のコピー数を比較するか、または、1つのサンプルにおける異なるDNAもしくはRNA配列のコピー数を、別のサンプル中の実質的に同一の配列のコピー数と比較する。CGHの多くの有用な適用形態において、DNAまたはRNAは、対象の細胞または細胞集団から単離される。比較は定性的であっても定量的であってもよい。コピー数情報は、参照ゲノム上の異なる位置間でのハイブリダイゼーションシグナル強度の比較から生じる。CGHの方法、技法、及び用途は、米国特許第6,335,167号及び米国出願第60/804,818号に記載されており、これらの関連する部分は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0216】

B. 定量的タンパク質分析

いくつかの実施形態において、遺伝子発現のレベルは、タンパク質発現レベルを検出することによって判定される。タンパク質ベースの検出技法は、免疫親和性アッセイを含む。抗体は、溶液サンプルから特定のタンパク質を免疫沈降させるため、または例えばポリアクリルアミドゲルによって分離されたタンパク質をイムノブロットするために使用され得る。免疫細胞化学的方法は、組織または細胞における特定のタンパク質多型を検出する際にも使用され得る。

【0217】

他の実施形態では、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、免疫放射測定アッセイ（IRMA）及び免疫酵素アッセイ（IEMA）、ならびにモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を使用するサンドイッチアッセイを含む、代替的な抗体ベースの技法を使用することもできる。例えば、米国特許第4,376,110号及び同第4,486,530号を参照のこと（これらはいずれも参照により本明細書に組み込まれる）。

【0218】

いくつかの実施形態では、免疫組織化学を使用して、タンパク質レベルを検出する。免疫組織化学（IHC）は、組織の細胞中の局在抗原（例えばタンパク質）が抗体を組織内の抗原に特異的に結合させるプロセスである。抗原結合性抗体は、例えば可視化を介して検出が可能になるタグにコンジュゲートまたは融合させることができる。いくつかの実施形態において、タグは、アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼといった、発色反応を触媒することができる酵素である。酵素は、抗体に融合させるか、または例えばビオチン-アビジン系を使用して非共有結合させることができる。代替的に、抗体は、フルオレセイン、ローダミン、DyLight FluorまたはAlexa Fluorなどのフルオロフォアでタグ付けしてもよい。抗原結合性抗体は、直接タグ付けしてもよく、またはタグを有する検出抗体にそれ自体を認識させてもよい。IHCを使用すると、1つまたは複数のタンパク質を検出できる。遺伝子産物の発現は、対照レベルと比較したその染色強度に関連し得る。

【0219】

いくつかの実施形態では、液体クロマトグラフィーまたは質量分析を使用して、タンパク質レベルを検出することができる。HPLC-顕微鏡タンデム質量分析技法では、タンパク質分解消化をタンパク質に行い、結果として生じるペプチド混合物を逆相クロマトグラフィー分離によって分離する。次いでタンデム質量分析を行い、そこから収集されたデータを分析する。Gatlin et al., Anal. Chem., 72:7

10

20

30

40

50

57-763 (2000)を参照のこと。

【0220】

本明細書で開示される方法の実施ならびに組成物及びキットでの使用に必要な遺伝子発現レベルデータを得るためのいくつかの方法及びデバイス、ならびに単一のデータ蓄積方法またはデバイスは、限定とみなされてはならない。

【0221】

II. メチル化マーカー分析

いくつかの実施形態では、マーカーは100塩基以下の領域であり、マーカーは500塩基以下の領域であり、マーカーは1000塩基以下の領域であり、マーカーは5000塩基以下の領域である、または、いくつかの実施形態では、マーカーは1塩基である。いくつかの実施形態において、マーカーは、高CpG密度のプロモーター中にある。

【0222】

この技術は、サンプルのタイプによって限定されない。例えば、いくつかの実施形態において、サンプルは、便サンプル、組織サンプル、痰、血液サンプル（例えば、血漿、血清、全血）、排泄物、または尿サンプルである。

【0223】

さらに、この技術は、メチル化状態を判定するために使用される方法において限定されない。いくつかの実施形態において、アッセイは、メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応、核酸シーケンシング、質量分析、メチル化特異的ヌクレアーゼ、質量ベースの分離、または標的捕捉を使用することを含む。いくつかの実施形態において、アッセイは、メチル化特異的オリゴヌクレオチドの使用を含む。いくつかの実施形態において、この技術は、メチル化状態を判定するため、超並列シーケンシング（例えば、次世代シーケンシング）、例えば、合成によるシーケンシング、リアルタイム（例えば、単分子）シーケンシング、ビーズエマルジョンシーケンシング、ナノポアシーケンシングなどを使用する。

【0224】

この技術は、可変メチル化領域（DMR）を検出するための試薬を提供する。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドが提供され、このオリゴヌクレオチドは、EMX1、GRIN2D、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX.chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIIX、SIPR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329から選択されるアノテーションを有する染色体領域；またはZNF781、BARX1、及びEMX1からなる群；SHOX2、SOBP、ZNF781、CYP26C1、SUCLG2、及びSKIからなる群；SLC12A8、KLHDC7B、PARP15、OPLAH、BCL2L11、MAX.chr12.526、HOXB2、及びEMX1からなる群；SHOX2、SOBP、ZNF781、BTACT、CYP26C1、及びDLX4からなる群；SHOX2、SOBP、ZNF781、CYP26C1、SUCLG2、及びSKIからなる群；ZNF781、BARX1、及びEMX1と、SOBP及び／またはHOXA9からなる群；BARX1、FLJ45983、SOBP、HOPX、IFFO1、及びZNF781からなる群；ならびにBARX1、FAM59B、HOXA9、SOBP、及びIFFO1からなる群を定義するマーカーのサブセットのいずれかから選択されるマーカーに

10

20

30

40

50

相補的な配列を含む。

【0225】

キットの実施形態、例えば、バイサルファイト試薬と、EMX1、GRIN2D、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFI X、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329から、好ましくは上記に列挙したマーカーのサブセットのいずれかから選択されるアノテーションを有する染色体領域を含み、がん（例えば、肺癌）を有しない対象に関連するメチル化状態を有する対照核酸とを備えるキットが提供される。いくつかの実施形態において、キットは、本明細書に記載されるように、バイサルファイト試薬及びオリゴヌクレオチドを備える。いくつかの実施形態において、キットは、バイサルファイト試薬と、かかる染色体領域の配列を含み、肺癌を有する対象に関連するメチル化状態を有する対照核酸とを備える。

10

20

【0226】

この技術は、組成物（例えば反応混合物）の実施形態に関連する。いくつかの実施形態では、EMX1、GRIN2D、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFI X、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329から、好ましくは上記に列挙したマーカーのサブセットのいずれかから選択されるアノテーションを有する染色体領域を含む核酸と、バイサルファイト試薬とを含む組成物が提供される。いくつかの実施形態は、EMX1、GRIN2D、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、

30

40

50

CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329から、好ましくは上記に列挙したマーカーのサブセットのいずれかから選択されるアノテーションを有する染色体領域を含む核酸と、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドとを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態は、EMX1、GRIN2D、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329から、好ましくは上記に列挙したマーカーのサブセットのいずれかから選択されるアノテーションを有する染色体領域を含む核酸と、メチル化特異的制限酵素とを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態は、EMX1、GRIN2D、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329から、好ましくは上記に列挙したマーカーのサブセットのいずれかから選択されるアノテーションを有する染色体領域を含む核酸と、ポリメラーゼとを含む組成物を提供する。

10

20

30

40

50

【0227】

対象から得られたサンプル中の新生物（例えば、肺癌）をスクリーニングするための、さらなる関連する方法の実施形態、例えば、EMX1、GRIN2D、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX1

5、及びZNF329から、好ましくは上記に列挙したマーカーのサブセットのいずれかから選択されるアノテーションを有する染色体領域内の塩基を含むサンプル中のマーカーのメチル化状態を判定することと；対象サンプルにおけるマーカーのメチル化状態を、肺癌を有しない対象由来の正常対照サンプルにおけるマーカーのメチル化状態と比較することと；対象サンプル及び正常対照サンプルにおけるメチル化状態の差の信頼区間及び／またはp値を判定することを含む方法が提供される。いくつかの実施形態において、信頼区間は、90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.9%、または99.99%であり、p値は、0.1、0.05、0.025、0.02、0.01、0.005、0.001、または0.0001である。方法のいくつかの実施形態は、EMX1、GRIN2D、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329から、好ましくは上記に列挙したマーカーのサブセットのいずれかから選択されるアノテーションを有する染色体領域を含む核酸を、バイサルファイト試薬と反応させて、バイサルファイト反応後の核酸を生成するステップと；バイサルファイト反応後の核酸をシーケンシングして、バイサルファイト反応後の核酸のヌクレオチド配列を用意するステップと；バイサルファイト反応後の核酸のヌクレオチド配列を、肺癌を有しない対象由来の染色体領域を含む核酸のヌクレオチド配列と比較して、2つの配列間の差を同定するステップと；差が存在する場合、新生物を有するものとして対象を同定するステップとを提供する。

10

20

30

40

50

【0228】

この技術により、対象から得られたサンプル中の肺癌をスクリーニングするためのシステムが提供される。システムの例示的な実施形態は、例えば、対象から得られたサンプル中の肺癌をスクリーニングするためのシステムであって、サンプルのメチル化状態を判定するよう構成された分析構成要素と、サンプルのメチル化状態を、データベースに記録された対照サンプルまたは参照サンプルのメチル化状態と比較するよう構成されたソフトウェア構成要素と、がん関連メチル化状態をユーザに警告するよう構成されたアラート構成要素とを備えるシステムを含む。いくつかの実施形態において、アラートは、複数のアッセイ（例えば、複数のマーカー、例えば、EMX1、GRIN2D、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15

、及び ZNF329 から、好ましくは上記に列挙したマーカーのサブセットのいずれかから選択されるアノテーションを有する染色体領域のメチル化状態を判定すること）の結果を受信し、複数の結果に基づいて報告する値または結果を算出する、ソフトウェア構成要素によって判定される。いくつかの実施形態は、ユーザ（例えば、医師、看護師、臨床医など）に報告する値もしくは結果及び／またはアラートを算出するのに使用するための、本明細書で提供される、EMX1、GRIN2D、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAXchr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及び ZNF329 から、好ましくは上記に列挙したマーカーのサブセットのいずれかから選択されるアノテーションを有する各染色体領域と関連する重み付きパラメータのデータベースを提供する。いくつかの実施形態では、複数のアッセイからの全ての結果が報告され、いくつかの実施形態では、対象の肺癌リスクを示す、複数のアッセイからの1つまたは複数の結果の複合に基づくスコア、値、または結果を提供するために、1つまたは複数の結果が使用される。

10

20

30

40

50

【0229】

システムのいくつかの実施形態では、サンプルは、EMX1、GRIN2D、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAXchr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及び ZNF329 から、好ましくは上記に列挙したマーカーのサブセットのいずれかから選択されるアノテーションを有する染色体領域を含む核酸を含む。いくつかの実施形態では、システムは、核酸を単離するための構成要素、サンプルを採取するための構成要素、例えば便サンプルを採取するための構成要素をさらに備える。いくつかの実施形態において、システムは、EMX1、GRIN2D、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAXchr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP

26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329から、好ましくは上記に列挙したマーカーのサブセットのいずれかから選択されるアノテーションを有する染色体領域を含む核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、データベースは、肺癌を有しない対象由来の核酸配列を含む。核酸、例えば、各核酸が、EMX1、GRIN2D、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329から、好ましくは上記に列挙したマーカーのサブセットのいずれかから選択されるアノテーションを有する染色体領域を含む配列を有する核酸のセットも提供される。

10

20

【0230】

関連するシステムの実施形態は、記載したような核酸のセット、及び核酸のセットに関連する核酸配列のデータベースを含む。いくつかの実施形態は、バイサルファイト試薬をさらに含む。そして、いくつかの実施形態は、核酸シーケンサーをさらに含む。

【0231】

特定の実施形態において、ヒト対象から得られたサンプルの特性決定を行う方法であって、a) ヒト対象からサンプルを得ることと；b) サンプル中の1つまたは複数のマーカーのメチル化状態をアッセイすることであって、マーカーが、次のマーカーの群：EMX1、GRIN2D、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329から、好ましくは上記に列挙したマーカーのサブセットのいずれかから選択されるアノテーションを有する染色体領域内の塩基を含む、アッセイすることと；c) アッセイされたマーカーのメチル化状態を、新生物を有しない対象でアッセイされたマーカーのメチル化状態と比較することを含む方法が提供される。

30

40

【0232】

いくつかの実施形態において、この技術は、生物学的サンプル中の本明細書で同定され

50

たマーカーのうちの1つまたは複数の存在及びメチル化状態を評価することに関連する。これらのマーカーは、本明細書で説明するように、1つまたは複数の可変メチル化領域（DMR）を含む。この技術の実施形態では、メチル化状態が評価される。したがって、本明細書で提供される技術は、遺伝子のメチル化状態を測定する方法において限定されない。例えば、いくつかの実施形態では、メチル化状態はゲノム走査法によって測定される。例えば、1つの方法は、制限ランドマークゲノム走査（Kawai et al. (1994) Mol. Cell. Biol. 14: 7421-7427）を含み、別の例は、MSAP-PCR（methylation-specific arbitrarily primed PCR）（Gonzalgo et al. (1997) Cancer Res. 57: 594-599）を含む。いくつかの実施形態において、特定のCpG部位におけるメチル化パターンの変化は、メチル化特異的制限酵素、特にメチル化感受性酵素によるゲノムDNAの消化の後、目的の領域のサザン分析を行うこと（消化サザン法）によってモニタリングされる。いくつかの実施形態において、メチル化パターンの変化の分析は、1つまたは複数のメチル化特異的制限酵素によるゲノムDNAの消化と、分析される領域のメチル化ステータスを示す切断または非切断の領域の分析とを含むプロセスを含む。いくつかの実施形態において、処理されたDNAの分析は、PCR増幅を含み、増幅結果は、DNAが制限酵素によって切断されたか否かを示す。いくつかの実施形態において、生成された増幅産物の存在、非存在、量、サイズ、及び配列のうちの1つまたは複数の評価して、目的のDNAのメチル化ステータスを分析する。例えば、Melnikov, et al., (2005) Nucl. Acids Res, 33(10): e93、Hua, et al., (2011) Exp. Mol. Pathol. 91(1): 455-60、及びSinger-Sam et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18: 687を参照のこと。さらに、メチル化分析の出発点としてDNAのバイサルファイト処理を利用する他の技法が報告されている。これらは、バイサルファイト変換DNAから増幅されたPCR産物のメチル化特異的PCR（MSP）（Herman et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9821-9826）及び制限酵素消化（Sadri and Hornsby (1996) Nucl. Acids Res. 24: 5058-5059、及びXiong and Laird (1997) Nucl. Acids Res. 25: 2532-2534）を含む。遺伝子変異の検出（Kuppuswamy et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1143-1147）及びアレル特異的発現の数量化（Szabo and Mann (1995) Genes Dev. 9: 3097-3108、及びSinger-Sam et al. (1992) PCR Methods Appl. 1: 160-163）のためのPCR技法が開発されている。このような技法は、PCRで生成されたテンプレートにアニーリングし、アッセイされる単一ヌクレオチドのすぐ5'側で終結する、内部プライマーを使用する。米国特許第7,037,650号に記載されている「定量的Ms-SNUPEアッセイ」を使用する方法が、いくつかの実施形態で使用される。

【0233】

いくつかの実施形態において、マーカーのメチル化状態をアッセイするための設計は、アッセイ技術によって精査されるマーカーの標的領域における個々のCpG遺伝子座でのバックグラウンドメチル化を分析することを含む。例えば、いくつかの実施形態では、疾患、例えばがんと診断された対象から単離されたサンプルにおける、マーカーDNAの多数の個々のコピー（例えば、10,000超、好ましくは100,000超の個々のコピー）を検査して、メチル化の頻度を判定し、これらのデータを、疾患のない対象から単離されたサンプルにおけるマーカーDNAの同様に多数の個々のコピーと比較する。より高いシグナル対ノイズ、例えば、高い検出可能メチル化及び／または低減したバックグラウンドメチル化を有するCpG遺伝子座が、アッセイ設計における使用のために選択されるように、サンプルにおけるマーカーDNA中の個々のCpG遺伝子座における疾患関連

メチル化及びバックグラウンドメチル化の頻度を比較することができる。例えば、各々が全体として参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第 9, 637, 792 号及び同第 10, 519, 510 号を参照のこと。いくつかの実施形態では、アッセイ結果に基づいてマーカーを「メチル化」または「非メチル化」と分類するには、CpG 遺伝子座の全てが事前に判定されたメチル化ステータスを有する必要がある（例えば、全てがメチル化されている必要がある、またはメチル化されているものがあり得ない）ように、シグナル対ノイズの高い CpG 遺伝子座の一群（例えば、マーカー領域内の 2、3、4、5、またはそれ以上の個々の CpG 遺伝子座）が、アッセイにより同時に精査される。

【0234】

メチル化状態を評価する際、メチル化状態は、特定の部位で（例えば、単一ヌクレオチドで、特定の領域または遺伝子座で、より長い目的の配列で、例えば、DNA の最長約 100 bp、200 bp、500 bp、1000 bp またはそれ以上の部分配列で）メチル化されている DNA の個々の鎖の、その特定の部位を含むサンプル中の DNA の全集団と比した割合またはパーセンテージとして表されることが多い。従来、非メチル化核酸の量は、キャリブレーションを使用した PCR によって判定される。次いで、既知量の DNA がバイサルファイト処理され、結果として生じるメチル化特異的配列が、リアルタイム PCR または他の指数関数的増幅、例えば、QuARTS アッセイ（例えば、米国特許第 8, 361, 720 号、同第 8, 715, 937 号、同第 8, 916, 344 号、及び同第 9, 212, 392 号、ならびに米国特許出願第 15 / 841, 006 号によって提供されている）のいずれかを使用して判定される。

【0235】

例えば、いくつかの実施形態では、方法は、外部標準を使用することによって、メチル化されていない標的の標準曲線を生成することを含む。この標準曲線は、少なくとも 2 点から構成され、メチル化されていない DNA についてのリアルタイム Ct 値を既知の定量的標準に関連させる。次いで、メチル化された標的についての第 2 の標準曲線が、少なくとも 2 点及び外部標準から構築される。この第 2 の標準曲線は、メチル化された DNA の Ct を、既知の定量的標準に関連させる。次に、メチル化された集団及びメチル化されていない集団について、検査サンプルの Ct 値が判定され、最初の 2 つのステップによって生成された標準曲線から、DNA のゲノム当量が算出される。目的の部位におけるメチル化のパーセンテージは、集団内の DNA の総量と比したメチル化 DNA の量から算出され、例えば、 $(\text{メチル化 DNA の数}) / (\text{メチル化 DNA の数} + \text{非メチル化 DNA の数}) \times 100$ である。

【0236】

また本明細書では、これらの方法を実践するための組成物及びキットが提供される。例えば、いくつかの実施形態において、1 つまたは複数のマーカーに特異的な試薬（例えば、プライマー、プローブ）が、単独で、またはセット（例えば、複数のマーカーを増幅するためのプライマーペアのセット）で提供される。検出アッセイを行うための追加の試薬（例えば、QuARTS、PCR、シーケンシング、バイサルファイト、または他のアッセイを行うための酵素、バッファー、陽性対照及び陰性対照）も提供され得る。いくつかの実施形態において、方法を行うために必要な、十分な、または有用な 1 つまたは複数の試薬を含むキットが提供される。また、試薬を含む反応混合物も提供される。さらに、反応混合物を完成させるように互い及び／または検査サンプルに加えられ得る複数の試薬を含むマスターミックス試薬セットが提供される。

【0237】

これらのアッセイ技術に好適な DNA を単離する方法は、当技術分野で知られている。特に、いくつかの実施形態は、参照により全体として本明細書に組み込まれる米国特許出願第 13 / 470, 251 号（「Isolation of Nucleic Acids」）に記載されている核酸の単離を含む。

【0238】

ゲノム DNA は、市販のキットの使用を含む任意の手段によって単離され得る。簡潔に

述べると、目的のDNAが細胞膜で被包されている場合、生物学的サンプルは一般に、酵素的、化学的、または機械的な手段によって破壊及び溶解される。次いで、例えばプロテイナーゼKで消化することにより、DNA溶液からタンパク質及び他の夾雑物が取り除かれ得る。次いで、ゲノムDNAが溶液から回収される。これは、塩析、有機抽出、または固相支持体へのDNAの結合を含む、多様な方法によって実施され得る。方法の選択は、時間、費用、及び必要とされるDNA量を含む、いくつかの要因に影響される。新生物性物質または前新生物性物質を含む全ての臨床的サンプルタイプ、例えば、細胞株、組織学的スライド、生検、パラフィン包埋組織、体液、便、結腸流出物、血漿、血清、全血、単離された血液細胞、血液から単離された細胞、及びこれらの組み合わせが、本発明の方法における使用に好適である。

10

【0239】

この技術は、サンプルを調製し、検査のための核酸を用意するために使用される方法において限定されない。例えば、いくつかの実施形態では、DNAは、例えば、米国特許出願第61／485386号に詳述されているような直接遺伝子捕捉を使用して、または関連する方法によって、便サンプルから、または血液から、または血漿サンプルから単離される。

【0240】

この技術は、肺癌に関連し得る、または肺癌の非存在を確定するために検査され得る、任意のサンプルの分析に関連する。例えば、いくつかの実施形態において、サンプルは、患者から得られる組織及び／または生物学的流体を含む。いくつかの実施形態において、サンプルは、分泌物を含む。いくつかの実施形態において、サンプルは、痰、血液、血清、血漿、胃分泌物、肺組織サンプル、肺細胞、または便から回収された肺DNAを含む。いくつかの実施形態において、対象はヒトである。このようなサンプルは、当業者には明らかであるような、当技術分野で知られる任意の数の手段によって得ることができる。

20

【0241】

A. 肺癌を検出するためのメチル化アッセイ

候補メチル化DNAマーカーが、選択された肺癌症例及び肺対照組織の偏りのない全メチロームシーケンシングによって同定された。上位マーカー候補は、255名の独立した患者でさらに評価され、そのうち119名が対照であり、そのうち37名は良性結節からのものであり、136の症例は全ての肺癌サブタイプを含むものであった。患者組織サンプルから抽出されたDNAをバイサルファイト処理し、次いで候補マーカー及び正規化遺伝子としてのβ-アクチン(ACTB)をQuARTS増幅(Quantitative Allele-Specific Real-time Target and Signal増幅)によってアッセイした。QuARTSアッセイ化学は、メチル化マーカー選択及びスクリーニングのための高度な識別をもたらす。

30

【0242】

個々のマーカー候補の受信者動作特性分析では、曲線下面積(AUC)は0.512～0.941の範囲であった。100%の特異性において、8つのメチル化マーカー(SLC12A8、KLHDC7B、PARP15、OPLAH、BCL2L11、MAX.12.526、HOXB2、及びEMX1)の複合パネルは、肺癌の全てのサブタイプで98.5%の感度をもたらした。さらに、8マーカーのパネルを使用した場合、良性肺結節は偽陽性をもたらさなかった。

40

【0243】

B. メチル化検出アッセイ及びキット

本明細書に記載されるマーカーは、多様なメチル化検出アッセイで利用される。5-メチルシトシンの存在について核酸を分析するために最も頻繁に使用される方法は、Frommerらによって説明された、DNA中の5-メチルシトシンの検出のためのバイサルファイト法(あらゆる目的で参照により全体として本明細書に明示的に組み込まれる、Frommer et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1827-31)またはその変形に基づいている。5-メチルシ

50

トシンをマッピングするバイサルファイト法は、シトシンは亜硫酸水素イオン（バイサルファイトとしても知られている）と反応するが、5-メチルシトシンは反応しないという観察に基づいている。この反応は通常、次のステップに従って行われる：まず、シトシンが亜硫酸水素塩と反応してスルホン化シトシンを形成する。次に、スルホン化反応中間体の自発的脱アミノ化が、スルホン化ウラシルをもたらす。最後に、スルホン化ウラシルがアルカリ性条件下で脱スルホン化されてウラシルを形成する。ウラシルがアデニンと塩基対を形成する（したがってチミンのように挙動する）のに対し、5-メチルシトシンはグアニンと塩基対を形成する（したがってシトシンのように挙動する）ため、検出が可能である。これにより、例えば、バイサルファイトゲノムシーケンシング（Grigg G, & Clark S, *Bioessays* (1994) 16: 431-36、Grigg G, *DNA Seq.* (1996) 6: 189-98）、例えば米国特許第5,786,146号に開示されているようなメチル化特異的PCR（MSP）によって、または、配列特異的プローブ切断を含むアッセイ、例えば、QuARTSフラップエンドヌクレアーゼアッセイ（例えば、Zou et al. (2010) “Sensitive quantification of methylated markers with a novel methylation specific technology” *Clin Chem* 56: A199、ならびに米国特許第8,361,720号、同第8,715,937号、同第8,916,344号、及び同第9,212,392号を参照のこと）を使用して、メチル化シトシンを非メチル化シトシンから識別することが可能になる。

10

20

【0244】

いくつかの従来技術は、分析しようとするDNAをアガロースマトリックスに封入し、これにより、DNAの拡散及び復元を防ぐこと（バイサルファイトは一本鎖DNAとしか反応しない）、ならびに沈殿ステップ及び精製ステップを高速透析に置き換えることを含む方法に関連している（Olek A, et al. (1996) “A modified and improved method for bisulfite based cytosine methylation analysis” *Nucleic Acids Res.* 24: 5064-6）。したがって、個々の細胞のメチル化ステータスを分析することが可能であり、この方法の有用性及び感度が例示される。5-メチルシトシンを検出する従来の方法の概説は、Rein, T., et al. (1998) *Nucleic Acids Res.* 26: 2255によって提供されている。

30

【0245】

バイサルファイト技法は、典型的に、バイサルファイト処理に続いて既知の核酸の短い特定の断片を増幅し、次いでこの産物をシーケンシング（Olek & Walter (1997) *Nat. Genet.* 17: 275-6）またはプライマー伸長反応（Gonzalgo & Jones (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 2529-31、WO95/00669、米国特許第6,251,594号）のいずれかによってアッセイして、個々のシトシン位置を分析することを含む。いくつかの方法は酵素消化を使用する（Xiong & Laird (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 2532-4）。ハイブリダイゼーションによる検出も当技術分野において説明されている（Olek et al., WO99/28498）。さらに、個々の遺伝子に関するメチル化検出のためのバイサルファイト技法の使用が説明されている（Grigg & Clark (1994) *Bioessays* 16: 431-6、Zeschnick et al. (1997) *Hum Mol Genet.* 6: 387-95、Feil et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22: 695、Martin et al. (1995) *Gene* 157: 261-4、WO9746705、WO9515373）。

40

【0246】

50

本発明の技術によるバイサルファイト処理と併せて、様々なメチル化アッセイ手順を使用することができる。これらのアッセイは、核酸配列内の1つまたは複数のCpGジヌクレオチド（例えば、CpGアイランド）のメチル化状態の判定を可能にする。このようなアッセイは、数ある技法の中でもとりわけ、バイサルファイト処理済み核酸のシーケンシング、PCR（配列特異的増幅のため）、サザンブロット分析、及びメチル化特異的制限酵素、例えば、メチル化感受性またはメチル化依存性酵素の使用を含む。

【0247】

例えば、バイサルファイト処理を使用することにより、メチル化パターン及び5-メチルシトシンの分布の分析のためにゲノムシーケンシングが簡略化されている（Frommer et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1827-1831）。さらに、バイサルファイト変換DNAから増幅されたPCR産物の制限酵素消化は、例えば、Sadri & Hornsby (1997) Nucl. Acids Res. 24: 5058-5059によって説明されているように、またはCOBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) (Xiong & Laird (1997) Nucleic Acids Res. 25: 2532-2534) として知られる方法で具体化されているように、メチル化状態の評価に利用される。

【0248】

COBRA（商標）分析は、少量のゲノムDNAの特定の遺伝子座でDNAメチル化レベルを判定するのに有用な定量的メチル化アッセイである（Xiong & Laird, Nucleic Acids Res. 25: 2532-2534, 1997）。簡潔に述べると、制限酵素消化を使用して、重亜硫酸ナトリウム処理済みDNAのPCR産物におけるメチル化依存性配列の差異を明らかにする。メチル化依存性配列の差異を、まず、Frommerら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1827-1831, 1992）によって説明されている手順に従い、標準的なバイサルファイト処理によってゲノムDNAに導入する。次いで、目的のCpGアイランドに特異的なプライマーを使用して、バイサルファイト変換DNAのPCR増幅を行い、その後、制限エンドヌクレアーゼ消化、ゲル電気泳動、及び特異的な標識されたハイブリダイゼーションプローブを使用した検出を行う。元のDNAサンプル中のメチル化レベルは、広範囲のDNAメチル化レベルの全域で直線的に定量的な様式で、消化されたPCR産物及び未消化のPCR産物の相対的な量によって表される。さらに、この技法は、顕微解剖されたパラフィン包埋組織サンプルから得られたDNAに高信頼度で適用され得る。

【0249】

COBRA（商標）分析のための典型的な試薬（例えば、典型的なCOBRA（商標）ベースのキットに見出され得るようなもの）は、特定の遺伝子座（例えば、特定の遺伝子、マーカー、遺伝子の領域、マーカーの領域、バイサルファイト処理済みDNA配列、CpGアイランドなど）に対するPCRプライマー；制限酵素及び適切なバッファー；遺伝子ハイブリダイゼーションオリゴヌクレオチド；対照ハイブリダイゼーションオリゴヌクレオチド；オリゴヌクレオチドプローブのためのキナーゼ標識キット；ならびに標識されたヌクレオチドを含み得るが、これらに限定されない。さらに、バイサルファイト変換試薬は、DNA変性バッファー；スルホン化バッファー；DNA回収試薬またはキット（例えば、沈殿、限外濾過、アフィニティーカラム）；脱スルホン化バッファー；及びDNA回収成分を含み得る。

【0250】

「Methylight（商標）」（蛍光標識リアルタイムPCR技法）（Eads et al., Cancer Res. 59: 2302-2306, 1999）、Ms-SNuPE（商標）（Methylation-sensitive Single Nucleotide Primer Extension）反応（Gonzalga & Jones, Nucleic Acids Res. 25: 2529-2531, 1997）、メチル化特異的PCR（「MSP」、Herman et al.

, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826, 1996、米国特許第5,786,146号)、及びメチル化CpGアイランド増幅(「MCA」、Toyota et al., Cancer Res. 59:2307-12, 1999)などのアッセイが、単独で、またはこれらの方法のうちの1つまたは複数と組み合わせて使用される。

【0251】

「HeavyMethyl(商標)」アッセイ技法は、バイサルファイト処理済みDNAのメチル化特異的増幅に基づいてメチル化の差異を評価する定量的な方法である。増幅プライマー間のCpG位置をカバーする、または増幅プライマーによってカバーされる、メチル化特異的ブロックングプローブ(「ブロッカー」)は、核酸サンプルのメチル化特異的な選択的増幅を可能にする。

10

【0252】

「HeavyMethyl(商標)Methylight(商標)」アッセイという用語は、Methylight(商標)アッセイの変形であるHeavyMethyl(商標)Methylight(商標)アッセイを指し、Methylight(商標)アッセイを、増幅プライマー間のCpG位置をカバーするメチル化特異的ブロックングプローブと組み合わせたものである。HeavyMethyl(商標)アッセイは、メチル化特異的増幅プライマーと組み合わせて使用してもよい。

【0253】

HeavyMethyl(商標)分析のための典型的な試薬(例えば、典型的なMethylight(商標)ベースのキットに見出され得るようなもの)は、特定の遺伝子座(例えば、特定の遺伝子、マーカー、遺伝子の領域、マーカーの領域、バイサルファイト処理済みDNA配列、CpGアイランド、またはバイサルファイト処理済みDNA配列もしくはCpGアイランドなど)に対するPCRプライマー;ブロックングオリゴヌクレオチド;最適化されたPCRバッファー及びデオキシヌクレオチド;ならびにTaqポリメラーゼを含み得るが、これらに限定されない。

20

【0254】

MSP(メチル化特異的PCR)は、メチル化特異的制限酵素の使用に関係なく、CpGアイランド内の実質的に全てのCpG部位群のメチル化ステータスの評価を可能にする(Herman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826, 1996、米国特許第5,786,146号)。簡潔に述べると、非メチル化シトシンをウラシルに変換するがメチル化シトシンは変換しない重亜硫酸ナトリウムによってDNAを修飾し、その後、この産物を、メチル化DNAに特異的なプライマーと非メチル化DNAに特異的なプライマーで増幅させる。MSPは、少量のDNAのみを必要とし、所与のCpGアイランド遺伝子座の0.1%のメチル化アレルに対する感度を示し、パラフィン包埋サンプルから抽出されたDNAに行うことができる。MSP分析のための典型的な試薬(例えば、典型的なMSPベースのキットに見出され得るようなもの)は、特定の遺伝子座(例えば、特定の遺伝子、マーカー、遺伝子の領域、マーカーの領域、バイサルファイト処理済みDNA配列、CpGアイランドなど)に対するメチル化型及び非メチル化型のPCRプライマー;最適化されたPCRバッファー及びデオキシヌクレオチド、ならびに特定のプローブを含み得るが、これらに限定されない。

30

40

【0255】

Methylight(商標)アッセイは、PCRステップ後にさらなる操作を必要としない、蛍光ベースのリアルタイムPCR(例えば、TaqMan(登録商標))を利用するハイスループット定量的メチル化アッセイである(Eads et al., Cancer Res. 59:2302-2306, 1999)。簡潔に述べると、Methylight(商標)プロセスは、標準的な手順に従い、重亜硫酸ナトリウム反応において、メチル化依存性配列の差異の混合されたプールに変換される、ゲノムDNAの混合サンプルにより始まる(バイサルファイトプロセスは、非メチル化シトシン残基をウラシルに変換する)。次いで、「偏りのある」反応において、例えば、既知のCpGジヌク

50

レオチドと重複するPCRプライマーを用いて、蛍光ベースのPCRが行われる。配列の識別は、増幅プロセスのレベルと蛍光検出プロセスのレベルの両方で行われる。

【0256】

MethyLight (商標) アッセイは、配列の識別がプローブハイブリダイゼーションのレベルで行われる、核酸、例えば、ゲノムDNAサンプル中のメチル化パターンの定量的検査として使用される。定量的なバージョンでは、PCR反応により、特定の推定メチル化部位と重複する蛍光プローブの存在下でメチル化特異的増幅がもたらされる。プライマーとプローブのいずれもが、いかなるCpGジヌクレオチドにも重ならない反応によって、インプットDNA量に対して偏りのない対照がもたらされる。代替的に、ゲノムメチル化の定性的検査は、既知のメチル化部位をカバーしない対照オリゴヌクレオチド (例えば、HeavyMethyl (商標) 及びMSP技法の蛍光ベースのバージョン)、または潜在的なメチル化部位をカバーするオリゴヌクレオチドのいずれかを用い、偏りのあるPCRプールをプローブすることによって達成される。

10

【0257】

MethyLight (商標) プロセスは、任意の好適なプローブ (例えば、「TaqMan (登録商標)」プローブ、Lightcycler (登録商標) プローブなど) を用いて使用される。例えば、いくつかの用途では、二本鎖ゲノムDNAが、重亜硫酸ナトリウムで処理され、TaqMan (登録商標) プローブを使用する、例えば、MSPプライマー及び／またはHeavyMethylブロッカーオリゴヌクレオチドならびにTaqMan (登録商標) プローブを用いる、2セットのPCR反応のうちの1つに供される。TaqMan (登録商標) プローブは、蛍光「レポーター」及び「クエンチャー」分子で二重標識され、GC含有量の比較的多い領域に特異的であるように設計されており、そのため、PCRサイクル中にフォワードプライマーまたはリバースプライマーよりも約10°C高い温度で融解する。これにより、TaqMan (登録商標) プローブをPCRアニーリング／伸長ステップ中に完全にハイブリダイズしたままにすることが可能である。Taqポリメラーゼは、PCR中に新たな鎖を酵素的に合成するに従い、最終的にはアニーリングされたTaqMan (登録商標) プローブに達する。次いで、Taqポリメラーゼの5'から3'へのエンドヌクレアーゼ活性が、TaqMan (登録商標) プローブを消化することにより、このプローブが変位し、蛍光レポーター分子が放出され、そのものはクエンチされていないシグナルが、リアルタイム蛍光検出システムを使用して定量的に検出される。

20

30

【0258】

MethyLight (商標) 分析のための典型的な試薬 (例えば、典型的なMethyLight (商標) ベースのキットに見出され得るようなもの) は、特定の遺伝子座 (例えば、特定の遺伝子、マーカー、遺伝子の領域、マーカーの領域、バイサルファイト処理済みDNA配列、CpGアイランドなど) に対するPCRプライマー; TaqMan (登録商標) またはLightcycler (登録商標) プローブ; 最適化されたPCRバッファー及びデオキシヌクレオチド; ならびにTaqポリメラーゼを含み得るが、これらに限定されない。

【0259】

QM (商標) (定量的メチル化) アッセイは、配列の識別がプローブハイブリダイゼーションのレベルで行われる、ゲノムDNAサンプル中のメチル化パターンの代替的な定量的検査である。この定量的なバージョンでは、PCR反応により、特定の推定メチル化部位と重複する蛍光プローブの存在下で偏りのない増幅がもたらされる。プライマーとプローブのいずれもが、いかなるCpGジヌクレオチドにも重ならない反応によって、インプットDNA量に対して偏りのない対照がもたらされる。代替的に、ゲノムメチル化の定性的検査は、既知のメチル化部位をカバーしない対照オリゴヌクレオチド (HeavyMethyl (商標) 及びMSP技法の蛍光ベースのバージョン)、または潜在的なメチル化部位をカバーするオリゴヌクレオチドのいずれかを用い、偏りのあるPCRプールをプローブすることによって達成される。

40

50

【0260】

QM (商標) プロセスは、増幅プロセスにおいて、任意の好適なプローブ、例えば、「TaqMan (登録商標)」プローブ、Lightcycler (登録商標) プローブを用いて使用され得る。例えば、二本鎖ゲノムDNAが、重亜硫酸ナトリウムで処理され、偏りのないプライマー及びTaqMan (登録商標) プローブに供される。TaqMan (登録商標) プローブは、蛍光「レポーター」及び「クエンチャー」分子で二重標識され、GC含有量の比較的多い領域に特異的であるように設計されており、そのため、PCRサイクル中にフォワードプライマーまたはリバースプライマーよりも約10℃高い温度で融出する。これにより、TaqMan (登録商標) プローブをPCRアニーリング／伸長ステップ中に完全にハイブリダイズしたままにすることが可能である。Taqポリメラーゼは、PCR中に新たな鎖を酵素的に合成するに従い、最終的にはアニーリングされたTaqMan (登録商標) プローブに達する。次いで、Taqポリメラーゼの5'から3'へのエンドヌクレアーゼ活性が、TaqMan (登録商標) プローブを消化することにより、このプローブが変位し、蛍光レポーター分子が放出され、そのもはやクエンチされていないシグナルが、リアルタイム蛍光検出システムを使用して定量的に検出される。QM (商標) 分析のための典型的な試薬 (例えば、典型的なQM (商標) ベースのキットに見出され得るようなもの) は、特定の遺伝子座 (例えば、特定の遺伝子、マーカー、遺伝子の領域、マーカーの領域、バイサルファイト処理済みDNA配列、CpGアイランドなど) に対するPCRプライマー；TaqMan (登録商標) またはLightcycler (登録商標) プローブ；最適化されたPCRバッファー及びデオキシヌクレオチド；ならびにTaqポリメラーゼを含み得るが、これらに限定されない。

10

20

【0261】

Ms-SNuPE (商標) 技法は、DNAのバイサルファイト処理に続いて単一ヌクレオチドプライマー伸長を行うことに基づいて特定のCpG部位におけるメチル化の差異を評価する定量的な方法である (Gonzalgo & Jones, Nucleic Acids Res. 25:2529-2531, 1997)。簡潔に述べると、ゲノムDNAを重亜硫酸ナトリウムと反応させて、非メチル化シトシンをウラシルに変換し、5-メチルシトシンは未変化のままにする。次いで、バイサルファイト変換DNAに特異的なPCRプライマーを使用して、所望の標的配列の増幅を行い、結果として生じる産物を単離し、目的のCpG部位でのメチル化の分析のためのテンプレートとして使用する。少量のDNA (例えば、顕微解剖された病変切片) を分析することができ、これにより、CpG部位のメチル化ステータスを判定するための制限酵素の利用が避けられる。

30

【0262】

Ms-SNuPE (商標) 分析のための典型的な試薬 (例えば、典型的なMs-SNuPE (商標) ベースのキットに見出され得るようなもの) は、特定の遺伝子座 (例えば、特定の遺伝子、マーカー、遺伝子の領域、マーカーの領域、バイサルファイト処理済みDNA配列、CpGアイランドなど) に対するPCRプライマー；最適化されたPCRバッファー及びデオキシヌクレオチド；ゲル抽出キット；陽性対照プライマー；特定の遺伝子座に対するMs-SNuPE (商標) プライマー；反応バッファー (Ms-SNuPE反応のため)；ならびに標識されたヌクレオチドを含み得るが、これらに限定されない。さらに、バイサルファイト変換試薬は、DNA変性バッファー；スルホン化バッファー；DNA回収試薬またはキット (例えば、沈殿、限外濾過、アフィニティークラム)；脱スルホン化バッファー；及びDNA回収成分を含み得る。

40

【0263】

RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) は、核酸をバイサルファイト処理して全ての非メチル化シトシンをウラシルに変換することから始まり、その後、制限酵素消化 (例えば、MspIなどのCG配列を含む部位を認識する酵素による) を行い、アダプターリガンドにカップリングした後に断片の完全なシーケンシングを行う。制限酵素の選択により、CpGが密な領域について断片が濃縮され、分析中に複数の遺伝子位置にマッピングされ得る余剰の配列の数

50

が低減する。したがって、RRBSは、シーケンシングのための制限断片のサブセットを選択することにより（例えば、分取ゲル電気泳動を使用したサイズ選択により）、核酸サンプルの複雑性を低減させる。全ゲノムのバイサルファイトシーケンシングとは対照的に、制限酵素消化によって生成される全ての断片が、少なくとも1つのCpGジヌクレオチドについてのDNAメチル化情報を含む。したがって、RRBSは、プロモーター、CpGアイランド、及びこれらの領域内に高頻度の制限酵素切断部位を含む他のゲノム特徴についてサンプルを濃縮させ、よって、1つまたは複数のゲノム遺伝子座のメチル化状態を評価するためのアッセイを提供する。

【0264】

RRBSの典型的なプロトコールは、核酸サンプルをMspIなどの制限酵素で消化するステップ、オーバーハングの充填及びAテーリングのステップ、アダプターをライゲーションするステップ、バイサルファイト変換のステップ、ならびにPCRのステップを含む。例えば、et al. (2005) “Genome-scale DNA methylation mapping of clinical samples at single-nucleotide resolution” Nat Methods 7: 133-6、Meissner et al. (2005) “Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis” Nucleic Acids Res. 33: 5868-77を参照のこと。

【0265】

いくつかの実施形態において、QuARTS (quantitative allele-specific real-time target and signal amplification) アッセイを使用して、メチル化状態を評価する。3つの反応は、各QuARTSアッセイにおいて連続して起こり、一次反応における増幅（反応1）及び標的プローブ切断（反応2）、ならびに二次反応におけるFRET切断及び蛍光シグナル生成（反応3）を含む。標的核酸が特異的プライマーで増幅されると、フラップ配列を含む特異的検出プローブがアンプリコンに緩く結合する。標的結合部位に特異的な侵襲性オリゴヌクレオチドが存在すると、5'ヌクレアーゼ、例えば、FEN-1エンドヌクレアーゼが、検出プローブとフラップ配列との間を切断することにより、フラップ配列を遊離させる。フラップ配列は、対応するFRETカセットの非ヘアピン部分に相補的である。したがって、フラップ配列は、FRETカセット上の侵襲性オリゴヌクレオチドとして機能し、FRETカセットのフルオロフォアとクエンチャーとの間の切断をもたらし、これが蛍光シグナルを生成する。この切断反応は、標的1つ当たり複数のプローブを切断し、したがってフラップ1つ当たり複数のフルオロフォアを放出し、指数関数的なシグナル増幅をもたらすことができる。QuARTSは、異なる色素を含むFRETカセットを使用することにより、単一の反応ウェルで複数の標的を検出することができる。例えば、各々があらゆる目的で参照により本明細書に組み込まれる、Zou et al. (2010) “Sensitive quantification of methylated markers with a novel methylation specific technology” Clin Chem 56: A199）、ならびに米国特許第8,361,720号、同第8,715,937号、同第8,916,344号、及び同第9,212,392号を参照のこと。

【0266】

いくつかの実施形態において、バイサルファイト処理済みDNAは、数量化の前に精製される。これは、当技術分野で知られている、限外濾過などだがこれに限定されない任意の手段によって、例えば、Microcon（商標）カラム（Millipore（商標）製）の手段によって行うことができる。精製は、改変された製造元のプロトコール（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれるPCT/EP2004/011715を参照のこと）に従って実施される。いくつかの実施形態において、バイサルファイト

処理済みDNAを、固体支持体、例えば、磁気ビーズに結合させ、DNAが支持体に結合している間に脱スルホン化及び洗浄を行う。このような実施形態の例は、例えば、各々が参照により全体として本明細書に組み込まれる、WO 2013 / 116375 及び米国特許第9,315,853号、及び米国特許出願第63 / 058,179号において提供されている。特定の好ましい実施形態において、支持体に結合したDNAは、支持体上での脱スルホン化及び洗浄の直後に、メチル化アッセイの準備ができています。いくつかの実施形態において、脱スルホン化DNAは、アッセイ前に支持体から溶出される。

【0267】

いくつかの実施形態において、処理済みのDNAの断片は、本発明によるプライマーオリゴヌクレオチドのセット（例えば、図5を参照のこと）及び増幅酵素を使用して増幅される。いくつかのDNAセグメントの増幅を、1つの同一の反応容器内で同時に実施することができる。典型的に、増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用して実施される。

10

【0268】

これらのアッセイ技術に好適なDNAを単離する方法は、当技術分野で知られている。特に、いくつかの実施形態は、各々が参照により全体として本明細書に組み込まれる、米国特許第9,000,146号、同第9,163,278号、及び同第10,704,081号に記載されているように、核酸の単離を含む。

【0269】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるマーカーは、便サンプルで行われるQUARTSアッセイに利用される。いくつかの実施形態において、DNAサンプルを生成する方法、特に、高度に精製され存在量の低い核酸を少量（例えば、100未満、60マイクロリットル未満）含み、DNAサンプルを検査するために使用されるアッセイ（例えば、PCR、INVADER、QuARTSアッセイなど）を阻害する物質を実質的に及び／または事実上含まない、DNAサンプルを生成する方法が提供される。このようなDNAサンプルは、患者から採取されたサンプル中に存在する遺伝子、遺伝子バリエーション（例えば、アレル）、もしくは遺伝子修飾（例えば、メチル化）の存在を定性的に検出する、またはそれらの活性、発現、もしくは量を定量的に測定する、診断アッセイに利用される。例えば、いくつかのがんは、特定の変異体アレルまたは特定のメチル化状態の存在と相関しており、したがって、そのような変異体アレルまたはメチル化状態の検出及び／または数量化は、がんの診断及び治療において予測的価値を有する。

20

30

【0270】

サンプル中には、多くの価値ある遺伝子マーカーがごく少量しか存在せず、このようなマーカーを生成する事象の多くは稀である。それ故、PCRなどの高感度の検出方法でさえ、存在量の低い標的を、アッセイの検出閾値を満たすまたはそれに取って代わるのに十分に提供するには、大量のDNAを必要とする。さらに、少量の阻害性物質が存在するだけでも、このような少量の標的を検出することを目的とするこれらのアッセイの正確度及び精度が損なわれる。したがって、本明細書では、このようなDNAサンプルを生成するための体積及び濃度の必要条件の管理を行う方法が提供される。

【0271】

40

いくつかの実施形態において、サンプルは、血液、血清、血漿、または唾液を含む。いくつかの実施形態において、対象はヒトである。このようなサンプルは、当業者には明らかであるような、当技術分野で知られる任意の数の手段によって得ることができる。セルフリーまたは実質的にセルフリーのサンプルは、遠心分離及び濾過を含むがこれらに限定されない、当業者に知られる様々な技法にサンプルを供することによって得ることができる。サンプルを得るために侵襲的技法を使用しないことが一般的に好ましいが、それでも、組織ホモジネート、組織切片、及び生検検体などのサンプルを得ることが好ましい場合がある。この技術は、サンプルを調製し、検査のための核酸を用意するために使用される方法において限定されない。例えば、いくつかの実施形態では、DNAは、例えば、米国特許第8,808,990号及び同第9,169,511号、ならびにWO 2012 / 1

50

55072に詳述されているような直接遺伝子捕捉を使用して、または関連する方法によって、便サンプルから、または血液から、または血漿サンプルから単離される。

【0272】

マーカーの分析は、1つの検査サンプル中で、さらなるマーカーと別々に実施することも、同時に実施することもできる。例えば、いくつかのマーカーを1つの検査に組み合わせて、複数のサンプルを効率的に処理し、ことによっては診断及び／または予後の正確度を高めることができる。さらに、当業者には、同じ対象由来の複数のサンプルを（例えば、連続した時点で）検査することの価値が認識されよう。このような連続的なサンプルの検査は、マーカーのメチル化状態の経時的な変化の同定を可能にし得る。メチル化状態の変化だけでなく、メチル化状態の変化がないことも、病状に関する有用な情報を提供することができ、これは、事象の発生からのおよその時間、救済可能な組織の存在及び量、薬物療法の妥当性、様々な療法の有効性の同定、ならびに将来の事象のリスクを含む対象の転帰の同定を含むが、これらに限定されない。

【0273】

バイオマーカーの分析は、多様な物理的フォーマットにおいて実施され得る。例えば、マイクロタイタープレートの使用または自動化を使用して、多数の検査サンプルの処理を容易にすることができる。代替的に、単一のサンプルフォーマットを發展させて、例えば、救急輸送または緊急治療室の状況における適時の早急処置及び診断を容易にすることができる。

【0274】

この技術の実施形態は、キットの形態で提供されることが想定される。キットは、本明細書に記載される組成物、デバイス、装置などの実施形態と、キットの使用説明書とを備える。このような説明書は、サンプルから分析物を調製するための、例えば、サンプルを採取し、サンプルから核酸を調製するための、適切な方法を説明するものである。キットの個々の構成要素は、適切な容器及びパッケージ（例えば、バイアル、箱、ブリストアパック、アンプル、瓶、ボトル、チューブなど）にパッケージ化され、構成要素は、キットの保管、搬送、及び／またはユーザによる使用の便宜上、適切な容器（例えば、1つまたは複数の箱）と一緒にパッケージ化される。液体成分（例えばバッファ）は、ユーザにより再構成されるために凍結乾燥された形態で提供されてもよい。キットは、キットの性能を評価、検証、及び／または保証するための対照または基準を含んでもよい。例えば、サンプル中に存在する核酸の量をアッセイするためのキットは、比較用に同じ核酸または別の核酸を既知濃度で含む対照を含み得、いくつかの実施形態では、対照核酸に特異的な検出試薬（例えばプライマー）を含み得る。キットは、臨床現場での使用に適切であり、いくつかの実施形態では、ユーザの家庭での使用に適切である。キットの構成要素は、いくつかの実施形態では、サンプルから核酸溶液を調製するためのシステムの機能を提供する。いくつかの実施形態において、システムの特定の構成要素は、ユーザによって提供される。

【0275】

III. 適用

いくつかの実施形態において、診断アッセイは、個体における疾患または状態の存在を同定する。いくつかの実施形態において、疾患は、がん（例えば、肺癌）である。

【0276】

いくつかの実施形態において、異常なメチル化が肺癌に関連しているマーカー（例えば、表1に挙げたマーカーから選択される1つまたは複数のマーカー、あるいは、好ましくはEMX1、GRIN2D、ANKRD13B、ZNF781、ZNF671、IFFO1、HOPX、BARX1、HOXA9、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ST8SIA1、NKX6__2、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、SOBP、MAX__chr10.226、ZMIZ1、MAX__chr8.145、MAX__chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR__9、

DOCK2、MAX__chr19.163、ZNF132、MAX chr19.372、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、MATK、BCAT1、PRKCB__28、ST8SIA__22、FLJ45983、DLX4、SHOX2、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2__Z、DNMT3A、FERMT3、NFIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、及びZNF329のうちの1つまたは複数）が使用される。いくつかの実施形態において、アッセイは、参照遺伝子（例えば、 β -アクチン、ZDHHC1、B3GALT6。例えば、各々があらゆる目的で参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第10,465,248号、及びWO2018/017740を参照のこと）の検出をさらに含む。

10

【0277】

いくつかの実施形態において、異常な発現が肺癌に関連しているマーカー（好ましくは、表3に挙げた1つまたは複数のマーカー：S100A9、SELL、PADI4、APOB3CA、S100A12、MMP9、FPR1、TYMP、及びSAT1）が使用され、サンプル中のRNA（例えば、mRNA）またはタンパク質のうちの1つまたは複数の測定によって検出される。いくつかの実施形態において、アッセイは、参照遺伝子（例えば、表3に示されるようなもの）の検出をさらに含む。

【0278】

いくつかの実施形態において、この技術は、患者（例えば、肺癌患者、初期ステージの肺癌患者、または肺癌を発症し得る患者）の治療に応用され、この方法は、本明細書で提供される1つまたは複数のマーカーのメチル化状態を判定することと、メチル化状態を判定した結果に基づいて患者に治療を投与することを含む。治療は、医薬化合物の投与、ワクチン、手術の実施、患者のイメージング、別の検査の実施であり得る。好ましくは、前記使用は、臨床的スクリーニングの方法、予後評価の方法、療法の結果をモニタリングする方法、特定の治療的処置に応答する可能性が最も高い患者を同定する方法、患者または対象をイメージングする方法、ならびに薬物スクリーニング及び開発の方法におけるものである。

20

【0279】

いくつかの実施形態において、この技術は、対象の肺癌を診断するための方法において応用される。本明細書で使用される「診断する」及び「診断」という用語は、対象が所与の疾患もしくは状態に罹患しているか否か、または将来的に所与の疾患もしくは状態を発症し得るか否かを、当業者が推定し、さらには判定することを可能にする方法を指す。当業者は、多くの場合、例えばバイオマーカーのような、そのメチル化状態が状態の存在、重篤度、または非存在を示す1つまたは複数の診断指標に基づいて、診断を行う。

30

【0280】

診断に加えて、臨床的ながんの予後は、がんの悪性度及び腫瘍再発の尤度を判定して、最も効果的な療法を計画することに関する。より正確に予後が判断できる場合、またはさらには、がんを発症する潜在的リスクが評価できる場合、適切な療法を選択することができる。いくつかの事例においては患者にそれほど過酷ではない療法を選択することができる。がんバイオマーカーの評価（例えば、メチル化状態の判定）は、良好な予後及び／または低いがん発症リスクを有し、治療を必要としない、または限られた治療しか必要としない対象を、がん発症またはがん再発の可能性がより高く、より集中的な治療が有効であり得る対象と分けるために有用である。

40

【0281】

したがって、本明細書で使用される場合、「診断を行う」または「診断する」は、本明細書で開示される診断バイオマーカーの測定に基づいて、臨床転帰の予測（医学的処置の有無にかかわらず）、適切な治療の選択（または治療が有効であるかどうか）、または現在の治療のモニタリング及び潜在的な治療の変更を行い得る、がん発症リスクの判定または予後の判定を行うことをさらに含む。

50

【0282】

さらに、この技術のいくつかの実施形態では、診断及び／または予後を容易にするために、経時的なバイオマーカーの複数の判定を行うことができる。バイオマーカーの時間的な変化は、臨床転帰を予測する、肺癌の進行をモニタリングする、及び／またはがんを対象とした適切な療法の有効性をモニタリングするために使用され得る。例えば、そのような実施形態では、効果的な療法の過程において、生物学的サンプル中の本明細書で開示される1つまたは複数のバイオマーカー（及び、モニタリングする場合、ことによっては1つまたは複数の追加のバイオマーカー（複数可））のメチル化状態の変化を経時的に見ることが期待され得る。

【0283】

この技術はさらに、対象のがんの予防または治療を開始または継続するかどうかを判定する方法に応用される。いくつかの実施形態において、この方法は、ある期間にわたり対象から一連の生物学的サンプルを用意することと；一連の生物学的サンプルを分析して、生物学的サンプルの各々における本明細書で開示される少なくとも1つのバイオマーカーのメチル化状態を判定することと；生物学的サンプルの各々におけるバイオマーカーのうちの1つまたは複数のメチル化状態の測定可能な変化を比較することを含む。ある期間にわたるバイオマーカーのメチル化状態における変化は、がん発症リスクを予測し、臨床転帰を予測し、がんの予防または治療を開始または継続するかどうか、及び現在の療法が効果的にがんを治療しているかどうかを判定するために使用され得る。例えば、治療の開始前に第1の時点を選択することができ、治療の開始後のある時点で第2の時点を選択することができる。異なる時点で採取されたサンプルの各々においてメチル化状態を測定し、定性的及び／または定量的な差異を記録することができる。異なるサンプルにおけるバイオマーカーレベルのメチル化状態の変化は、肺の発症リスク、予後、対象における治療有効性の判定、及び／またはがんの進行と関連し得る。

【0284】

好ましい実施形態において、本発明の方法及び組成物は、疾患を初期ステージで、例えば、疾患の症状が現れる前に、治療または診断するためのものである。いくつかの実施形態において、本発明の方法及び組成物は、臨床ステージで疾患を治療または診断するためのものである。

【0285】

上記のように、いくつかの実施形態では、1つまたは複数の診断バイオマーカーまたは予後バイオマーカーの複数の判定を行うことができ、マーカーの時間的な変化を使用して、診断または予後を判定することができる。例えば、診断マーカーを初回に、そして再度2回目に判定してもよい。このような実施形態において、初回から2回目へのマーカーの増加は、がんの特定のタイプもしくは重篤度、または所与の予後を診断するものであり得る。同様に、初回から2回目へのマーカーの減少は、がんの特定のタイプもしくは重篤度、または所与の予後を示すものであり得る。さらに、1つまたは複数のマーカーの変化の程度は、がんの重篤度及び将来の有害事象に関連し得る。特定の実施形態では、同じバイオマーカーの比較測定を複数の時点で行うことができ、また、所与のバイオマーカーを1つの時点で測定し、第2のバイオマーカーを第2の時点で測定することもでき、これらのマーカーの比較が診断情報を提供し得ることが、当業者には理解されよう。

【0286】

本明細書で使用される場合、「予後を判定する」という語句は、対象における状態の過程または転帰を当業者が予測することを可能にする方法を指す。「予後」という用語は、状態の過程もしくは転帰を100%の正確度で予測できることを指すものではなく、またはさらには、所与の過程もしくは転帰が発生する可能性が高いか低いかをバイオマーカーのメチル化状態に基づいて予測可能であることを指すものでもない。むしろ、当業者には理解されるであろうが、「予後」という用語は、特定の過程または転帰が発生する確率の増加、すなわち、所与の状態を呈する対象において過程または転帰が発生する可能性が、その状態を呈していない個体と比較すると高いことを指す。例えば、その状態を呈してい

10

20

30

40

50

ない個体では、所与の転帰（例えば、肺癌の罹患）の確率が非常に低い場合がある。

【0287】

いくつかの実施形態では、統計分析により、予後指標を有害転帰への素因と関連付ける。例えば、いくつかの実施形態において、がんを有しない患者から得られた正常対照サンプルのものと異なるメチル化状態は、統計的有意性のレベルによって判定されるように、ある対象ががん罹患する可能性が、対照サンプルのメチル化状態により類似するレベルを有する対象よりも高いことを示し得る。さらに、メチル化状態のベースライン（例えば「正常」）レベルからの変化は、対象の予後を反映するものであり得、メチル化状態の変化の程度は、有害事象の重篤度に関連し得る。統計的有意性は、2つ以上の集団を比較して信頼区間及び／またはp値を判定することによって判定されることが多い。例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれるDowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York, 1983を参照のこと。本発明の主題の例示的な信頼区間は、90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.9%、及び99.99%であり、例示的なp値は、0.1、0.05、0.025、0.02、0.01、0.005、0.001、及び0.0001である。

10

【0288】

他の実施形態では、本明細書で開示される予後バイオマーカーまたは診断バイオマーカーのメチル化状態の閾値変化度を確立することができ、生物学的サンプル中のバイオマーカーのメチル化状態の変化度は、メチル化状態の閾値変化度と単純比較される。本明細書で提供されるバイオマーカーについてのメチル化状態における好ましい閾値変化は、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約50%、約75%、約100%、及び約150%である。さらに他の実施形態において、「ノモグラム」を確立することができ、これにより、予後または診断の指標（バイオマーカーまたはバイオマーカーの組み合わせ）のメチル化状態が、所与の転帰に対する関連素因に直接関連付けられる。当業者は、集団の平均ではなく個々のサンプル測定値が参照されるので、この測定における不確実性はマーカー濃度の不確実性と同じであるとの理解のもとに、このようなノモグラムを使用して2つの数値を関連付けることに精通している。

20

【0289】

いくつかの実施形態において、生物学的サンプルから得られる結果が、対照サンプルから得られる結果と比較され得るように、対照サンプルは、生物学的サンプルと同時に分析される。さらに、標準曲線を用意してもよく、これを用いて生物学的サンプルに関するアッセイ結果が比較され得ることが想定される。このような標準曲線は、バイオマーカーのメチル化状態を、アッセイ単位の関数として、例えば、蛍光標識が使用される場合は蛍光シグナル強度の関数として提示する。複数のドナーから採取されたサンプルを使用する場合、標準曲線は、正常組織における1つまたは複数のバイオマーカーの対照メチル化状態について、また、肺癌を有するドナーから採取された組織における1つまたは複数のバイオマーカーの「リスクあり」レベルについても提供され得る。

30

【0290】

マーカーの分析は、1つの検査サンプル中で、さらなるマーカーと別々に実施することも、同時に実施することもできる。例えば、いくつかのマーカーを1つの検査に組み合わせて、複数のサンプルを効率的に処理し、ことによっては診断及び／または予後の正確度を高めることができる。さらに、当業者には、同じ対象由来の複数のサンプルを（例えば、連続した時点で）検査することの価値が認識されよう。このような連続的なサンプルの検査は、マーカーのメチル化状態の経時的な変化の同定を可能にし得る。メチル化状態の変化だけでなく、メチル化状態の変化がないことも、病状に関する有用な情報を提供することができ、これは、事象の発生からのおよその時間、救済可能な組織の存在及び量、薬物療法の妥当性、様々な療法の有効性の同定、ならびに将来の事象のリスクを含む対象の転帰の同定を含むが、これらに限定されない。

40

【0291】

50

バイオマーカーの分析は、多様な物理的フォーマットにおいて実施され得る。例えば、マイクロタイタプレートの使用または自動化を使用して、多数の検査サンプルの処理を容易にすることができる。代替的に、単一のサンプルフォーマットを発展させて、例えば、救急輸送または緊急治療室の状況における適時の早急処置及び診断を容易にすることができる。

【0292】

いくつかの実施形態では、対照メチル化状態と比較して、サンプル中の少なくとも1つのバイオマーカーのメチル化状態に測定可能な差異があれば、対象は肺癌を有すると診断される。逆に、生物学的サンプル中のメチル化状態の変化が同定されなければ、対象は、肺癌を有しない、がんのリスクがない、またはがんのリスクが低いものと同定され得る。これに関して、肺癌またはそのリスクを有する対象は、がんまたはそのリスクが低いまたは実質的にない対象から区別され得る。肺癌を発症するリスクを有する対象は、より集中的及び／または定期的なスクリーニングスケジュール下におくことができる。その一方、リスクが低い実質的にない対象は、これらの対象において肺癌のリスクが現れたことが、将来のスクリーニング、例えば、本発明の技術に従って行われるスクリーニングによって示されるようなときまで、スクリーニング手続きを受けることを避けることができる。

【0293】

上述したように、本発明の技術の方法の実施形態に応じて、1つまたは複数のバイオマーカーのメチル化状態における変化の検出は、定性的判定であってもよく、定量的判定であってもよい。したがって、肺癌を有するまたは肺癌の発症リスクがあるものとして対象を診断するステップは、特定の閾値の測定が行われ、例えば、生物学的サンプル中の1つまたは複数のバイオマーカーのメチル化状態が、所定の対照メチル化状態と異なることを示す。この方法のいくつかの実施形態において、対照メチル化状態は、バイオマーカーのいずれかの検出可能なメチル化状態である。対照サンプルが生物学的サンプルと同時に検査される方法の他の実施形態において、所定のメチル化状態は、対照サンプル中のメチル化状態である。この方法の他の実施形態において、所定のメチル化状態は、標準曲線に基づく、及び／または標準曲線によって同定される。この方法の他の実施形態において、所定のメチル化状態は、特異的な状態、または状態の範囲である。したがって、所定のメチル化状態は、当業者には明らかであろう許容可能な限度内で、実践されている方法の実施形態及び所望の特異性などに部分的に基づいて選択され得る。

【0294】

いくつかの実施形態において、肺癌を有するか、または有する疑いのある対象由来のサンプルが、1つまたは複数のメチル化マーカー、及び、異なるタイプの肺癌、例えば非小細胞癌（腺癌、大細胞癌、扁平上皮細胞癌）と小細胞癌とを区別するデータを提供する好適なアッセイ方法を使用してスクリーニングされる。例えば、腺癌及び小細胞癌では高度にメチル化されている（正常バフィーコート中のその遺伝子座における平均メチル化と比較した平均メチル化として示されている）が、大細胞または扁平上皮細胞癌では高度にメチル化されていないマーカー参照番号AC27（図2；PLEC）；他の全てのサンプルタイプよりも腺癌で高度にメチル化されているマーカー参照番号AC23（図1；ITPRIP1）；他の全てのサンプルタイプよりも大細胞癌で高度にメチル化されているマーカー参照番号LC2（図2；DOCK2）；他の全てのサンプルタイプよりも小細胞癌で高度にメチル化されているマーカー参照番号SC221（図3；ST8SIA4）；ならびに他の全てのサンプルタイプよりも扁平上皮細胞癌で高度にメチル化されているマーカー参照番号SQ36（図4、DOK1）を参照のこと。

【0295】

本明細書に記載されるように選択されるメチル化マーカーは、対象由来のサンプルの分析が肺新生物の存在を明らかにし、また、肺癌のタイプ、例えば、小細胞癌と非小細胞癌を区別するのに十分な情報を提供するように、単独で、または組み合わせて（例えば、パネルで）使用され得る。好ましい実施形態において、マーカーまたはマーカーの組み合わせは、腺癌、大細胞癌、及び扁平上皮細胞癌を区別するために、及び／または未確定もし

くは病理混合型の癌腫の特性決定を行うために十分なデータをさらに提供する。他の実施形態では、メチル化マーカーまたはそれらの組み合わせは、存在する肺癌のタイプにかかわらず、データを区別することなく、陽性結果（例えば、肺新生物の存在を示す結果）を提供するように選択される。

【0296】

近年、転移性腫瘍細胞を表す循環上皮細胞が、多くのがん患者の血液中で検出され得ることが明らかになっている。希少細胞の分子プロファイリングは、生物学的研究及び臨床的研究において重要である。用途は、疾患の予後及び個別化された治療のための、がん患者の末梢血中の循環上皮細胞（CEPC）の特性決定と多岐にわたる（例えば、Cristofanilli M, et al. (2004) N Engl J Med 351:781-791、Hayes DF, et al. (2006) Clin Cancer Res 12:4218-4224、Budd GT, et al., (2006) Clin Cancer Res 12:6403-6409、Moreno JG, et al. (2005) Urology 65:713-718、Pantel et al., (2008) Nat Rev 8:329-340、及びCohen SJ, et al. (2008) J Clin Oncol 26:3213-3221を参照のこと）。したがって、本開示の実施形態は、血漿または全血中のメチル化マーカーの存在を同定することによって、対象における転移癌の存在を存在するための組成物及び方法を提供する。

【0297】

また、本明細書には、マルチプレックス逆転写及び前増幅に続いて、LQAS PCR-フラップアッセイを含むアッセイが記載される（逆転写及び前増幅と組み合わせたLQASアッセイは、RT-TELQASアッセイ（「Reverse Transcription-Target Enrichment Long probe Quantitative Amplified Signal」の略）と呼ばれる）。RT-TELQASアッセイでは、標的RNA、例えば、サンプル由来の全RNAを、例えば、20UのMMLV逆転写酵素、1.5UのGoTaq（登録商標）DNAポリメラーゼ、10mMのMOPSバッファー、pH7.5、7.5mMのMgCl₂、250μMの各dNTP、及びオリゴヌクレオチドプライマー（例えば、12種の標的に対して、等モル量（例えば、各プライマー200nM）または異なる標的RNAの増幅効率を調整するように変更した量の、12種のプライマーペア／24種のプライマー）を含む、RT-前増幅反応物で処理し、逆転写に適度な温度（例えば、42℃）でインキュベートし、その後、限定された数のサーマルサイクル（例えば、95℃、63℃、70℃の10サイクル）により、含まれているプライマーペアに対応する標的配列の前増幅を行う。サーマルサイクリングの後、RT-前増幅反応物のアリコート（例えば、10μL）を、後述するようにLQAS PCR-フラップアッセイで使用する。RT-TELQAS及びRT-LQASアッセイにおける検出に好適なRNAは、いずれかの特定のタイプのRNA標的に限定されない。例えば、組織、細胞由来のあらゆる様式のRNA、または血液由来の循環セルフリーRNA、例えばタンパク質コーディングメッセンジャーRNA（mRNA）、マイクロRNA（miRNA）、piRNA、tRNA、及び他の非コードRNA分子（ncRNA）（例えば、参照により全体として本明細書に組み込まれる、SU Umu, et al. “A comprehensive profile of circulating RNAs in human serum,” RNA Biology 15(2):242-250 (2018)を参照のこと）が、本明細書で後述するRT-TELQAS法及びRT-LQAS法を使用してアッセイされ得る。

【0298】

好ましい実施形態において、これらの方法は、標準的なPCRバッファーと比較して比較的高いMg⁺⁺及び低いKCl（例えば、6～10mM、好ましくは7.5mMのMg⁺⁺、及び0.0～0.8mMのKCl）を有するPCR-フラップアッセイバッファーを含む反応混合物中で行われる。典型的なPCRバッファーは、1.5mM MgCl₂

、20mM トリス-HCl、pH 8、及び50mM KClであり、PCR-フラップアッセイバッファーは、7.5mM MgCl₂、10mM MOPS、0.3mM トリス-HCl、pH 8.0、0.8mM KCl、0.1μg/μL BSA、0.0001% Tween-20、及び0.0001% IGEPAL CA-630を含む。驚くべきことに、本明細書で後述するRTLQAS法及びRTLTELQAS法では、RTLQASフラップアッセイの逆転写及びTELQAS法のRT-前増幅を含む全ての増幅ステップが、同じPCR-フラップアッセイバッファー中で行われる。マルチプレックス前増幅を使用する場合、同じプライマーペアを前増幅標的濃縮及び定量的PCR-フラップアッセイに使用することができ、すなわち、プライマーはネステッドプライマーである必要がない。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第10,704,081号を参照のこと。

10

【0299】

[実施例]

以下の実施例は、本発明を説明するために提供されているが、限定するものではない。理解を容易にするべく、技術提案の解釈を助けるために特定の実施形態が提供される。すなわち、これらの実施形態は、例示のみを目的とし、断じて本発明の範囲を限定するものではない。特に明記しない限り、実施形態は具体的な条件を示すものではなく、従来の条件または製造元の推奨条件に従っている。

【0300】

実施例1

RNA単離、DNA単離、タンパク質単離の方法。

20

【0301】

以下に、分析前のRNA単離、DNA単離、及びタンパク質サンプル調製の例示的な方法を示す。

【0302】

血液からのRNA単離

血液サンプルを、後のRNA検出に好適な採血チューブ（例えば、PAXgene Blood RNA Tube、Qiagen, Inc.）に採取する。サンプルは直ちにアッセイしても、将来の分析まで凍結してもよい。RNAは、標準的な方法、例えば、Qiasymphony PAXgene blood RNAキット（製品番号：762635）により、製造元の説明に従って、サンプルから抽出される。RTLQASで検査する前に、RNAサンプルを希釈してもよい（例えば、10mM トリス-HCl、pH 8.0、0.1mM EDTA中で1:50）。

30

【0303】

細胞及び血漿からのDNA単離

細胞株の場合、例えば、「Maxwell（登録商標）RSC ccfDNA Plasma Kit」（Promega Corp., Madison, WI）を使用して、細胞馴化培地からゲノムDNAを単離することができる。キットのプロトコールに従い、血漿の代わりに1mLの細胞馴化培地（CCM）を使用し、キットの手順に従って処理する。溶出体積は100μLであり、そのうち70μLを一般的にバイサルファイト変換に使用する。

40

【0304】

4mLの血漿サンプルからDNAを単離するための例示的な手順は次の通りである：

- 4mLの血漿サンプルに、300μLのプロテインゼK（20mg/mL）を加え、混合する。
- 1μg/μLの魚DNA 3μLを血漿-プロテインゼK混合物に加える。
- 2mLの血漿溶解バッファーを血漿に加える。

【0305】

血漿溶解バッファーは次の通りである：

- 4.3Mチオシアン酸グアニジン

50

ー 10% IGEPAL CA-630 (オクチルフェノキシポリ (エチレンオキシ) エタノール、分岐)

(5.3 gのIGEPAL CA-630と45 mLの4.8 Mチオシアン酸グアニジン を合わせたもの)

● 混合物を55℃で1時間、500 rpmで振盪しながらインキュベートする。

● 以下を加えて混合する：

○ 3 mLの血漿溶解バッファー

○ 2 mLの100%イソプロパノール

○ 200 μ Lの磁性シリカ結合ビーズ (ビーズ16 μ g/ μ L)

(場合により、溶解バッファーとイソプロパノールを、各添加後に混合する、及び/または場合により、混合物に加える前に予備混合する) 10

● 30℃で30分間、500 rpmで振盪しながらインキュベートする。

● チューブ (複数可) を磁石に付け、ビーズを収集させる。上清を吸引して廃棄する。

● 結合ビーズを含む容器に750 μ LのGuHCl-EtOHを加えて混合する。

【0306】

GuHCl-EtOH洗浄バッファーは次の通りである：

ー 3 M GuHCl (塩酸グアニジン)

ー 57% EtOH (エチルアルコール)

● 400 rpmで1分間振盪する。

● サンプルをディープウェルプレートまたは2 mLマイクロ遠心チューブに移す。 20

● チューブを磁石に付け、ビーズを10分間収集させる。上清を吸引して廃棄する。

● 1000 μ Lの洗浄バッファー (10 mM トリスHCl、80% EtOH) をビーズに加え、30℃で3分間振盪しながらインキュベートする。

● チューブを磁石に付け、ビーズを収集させる。上清を吸引して廃棄する。

● 500 μ Lの洗浄バッファーをビーズに加え、30℃で3分間振盪しながらインキュベートする。

● チューブを磁石に付け、ビーズを収集させる。上清を吸引して廃棄する。

● 250 μ Lの洗浄バッファーを加え、30℃で3分間振盪しながらインキュベートする。

● チューブを磁石に付け、ビーズを収集させる。残りのバッファーを吸引して廃棄する。 30

● 250 μ Lの洗浄バッファーを加え、30℃で3分間振盪しながらインキュベートする。

● チューブを磁石に付け、ビーズを収集させる。残りのバッファーを吸引して廃棄する。

● ビーズを70℃で15分間振盪しながら乾燥させる。

● 125 μ Lの溶出バッファー (10 mM トリスHCl、pH 8.0、0.1 mM EDTA) をビーズに加え、65℃で25分間振盪しながらインキュベートする。

● チューブを磁石に付け、ビーズを10分間収集させる。

● DNAを含む上清を吸引し、新しい容器またはチューブに移す。

【0307】

バイサルファイト変換

40

I. 亜硫酸水素アンモニウムを使用したDNAのスルホン化

1. 各チューブで、64 μ LのDNA、7 μ Lの1 N NaOH、ならびに0.2 mg/mLのBSA及び0.25 mg/mLの魚DNAを含む9 μ Lのキャリア溶液を合わせる。

【0308】

2. 42℃で20分間インキュベートする。

【0309】

3. 120 μ Lの45%亜硫酸水素アンモニウムを加え、66℃で75分間インキュベートする。

【0310】

50

4. 4℃で10分間インキュベートする。

【0311】

II. 磁気ビーズを使用した脱スルホン化

材料

- 磁気ビーズ (Promega MagneSil Paramagnetic Particles、Promegaカタログ番号AS1050、 $16\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。
- 結合バッファー：6.5～7M塩酸グアニジン。
- 変換後洗浄バッファー：10mMトリスHCl (pH8.0)を含む80%エタノール。
- 脱スルホン化バッファー：70%イソプロピルアルコール、0.1N NaOHを脱スルホン化バッファーに選択した。

10

【0312】

サンプルは、基本的に後述するような温度及び混合速度でサンプルを混合またはインキュベートするための任意の適切なデバイスまたは技術を使用して混合する。例えば、Thermomixer (Eppendorf) がサンプルの混合またはインキュベーションのために使用され得る。例示的な脱スルホン化は次の通りである：

1. ボトルを1分間ボルテックスすることにより、ビーズストックを十分に混合する。

【0313】

2. $50\mu\text{L}$ のビーズを2.0mLチューブ (例えばUSA Scientific 製) にアリコートする。

20

【0314】

3. $750\mu\text{L}$ の結合バッファーをビーズに加える。

【0315】

4. ステップIのスルホン化DNA $150\mu\text{L}$ を加える。

【0316】

5. 混合する (例えば、1000RPM、30℃で30分間)。

【0317】

6. チューブをマグネットスタンドに置き、5分間放置する。チューブをスタンドに置いた状態で、上清を除去し、廃棄する。

【0318】

7. $1,000\mu\text{L}$ の洗浄バッファーを加える。混合する (例えば、1000RPM、30℃で3分間)。

30

【0319】

8. チューブをマグネットスタンドに置き、5分間放置する。チューブをスタンドに置いた状態で、上清を除去し、廃棄する。

【0320】

9. $250\mu\text{L}$ の洗浄バッファーを加える。混合する (例えば、1000RPM、30℃で3分間)。

【0321】

10. チューブを磁気ラックに置く；1分後に上清を除去し、廃棄する。

40

【0322】

11. $200\mu\text{L}$ の脱スルホン化バッファーを加える。混合する (例えば、1000RPM、30℃で5分間)。

【0323】

12. チューブを磁気ラックに置く；1分後に上清を除去し、廃棄する。

【0324】

13. $250\mu\text{L}$ の洗浄バッファーを加える。混合する (例えば、1000RPM、30℃で3分間)。

【0325】

14. チューブを磁気ラックに置く；1分後に上清を除去し、廃棄する。

50

【0326】

15. 250 μ L の洗浄バッファーをチューブに加える。混合する（例えば、1000 RPM、30℃で3分間）。

【0327】

16. チューブを磁気ラックに置く；1分後に上清を除去し、廃棄する。

【0328】

17. 蓋を開けた状態で全てのチューブを30℃で15分間インキュベートする。

【0329】

18. 磁気ラックからチューブを取り出し、70 μ L の溶出バッファーをビーズに直接加える。

10

【0330】

19. ビーズを溶出バッファーと共にインキュベートする（例えば、1000 RPM、40℃で45分間）。

【0331】

20. チューブを磁気ラックに約1分間置く；上清を取り除いて取っておく。

【0332】

次いで、変換されたDNAを、後述のように、検出アッセイ、例えば、前増幅及び／またはフラップエンドヌクレアーゼアッセイで使用する。

【0333】

核酸のバイサルファイト処理のさらなる実施形態については、米国特許第10,704,081号及び2020年7月29日に出願された米国特許出願第63/058,179号を参照されたい。これらは各々、あらゆる目的で参照により全体として本明細書に組み込まれ、本明細書に記載される技術で適用され得る。

20

【0334】

いくつかの実施形態において、RNA及びDNAは、対象由来の異なる血液サンプルから単離される。例えば、RNAの最適な保存及び／または単離のために構成された第1の採取チューブと、DNAの最適な保存及び単離のために構成された第2の採取チューブとに、血液を採取してもよく、この様式で採取された血液の一部から、RNA及びDNAを抽出してもよい。他の実施形態において、RNA及びDNAはいずれも、例えば、DNAとRNAの両方の最適な保存及び単離のために構成された採取チューブ（例えば、セルフリーDNAとセルフリーRNAの両方の保存及び単離のための、NORGEN Biotek Corp. のcf-DNA/cf-RNA Preservative Tubes（カタログ番号63950））を使用して、単一の採血サンプルから抽出される。

30

【0335】

いくつかの実施形態において、RNA及びDNAは、例えば、RT-LQAS/RT-TELQAS反応において一緒にアッセイされる。いくつかの実施形態において、RNA及びDNAは、上述のように、別々に単離され、及び／または別々に、例えばバイサルファイトで処理され、いくつかの実施形態では、RNA及びDNAは一緒に処理され、例えば、両方がバイサルファイト処理及び後の精製中に存在し、アッセイ反応物と一緒に加えられる。

40

【0336】

フラップエンドヌクレアーゼアッセイ

QuARTS及びLQAS/TELQASフラップアッセイ技術は、ポリメラーゼベースの標的DNA増幅プロセスを、侵襲的切断ベースのシグナル増幅プロセスと組み合わせたものである。QuARTS技術は、例えば、米国特許第8,361,720号、同第8,715,937号、同第8,916,344号、及び同第9,212,392号に記載されており、より長い標的的特異的領域を有するプローブオリゴヌクレオチドを使用するフラップアッセイ（Long probe Quantitative Amplified Signal、「LQAS」）は、米国特許第10,648,025号に記載されており、これらは各々、あらゆる目的で参照により全体として本明細書に組み込まれる。本

50

明細書に記載される Q u A R T S アッセイでは、フラップオリゴヌクレオチドは、12塩基の標的特異的領域を有し、一方 L Q A S アッセイは、少なくとも13塩基の標的特異的領域を有するフラップオリゴヌクレオチドを使用し、増幅のために異なるサーマルサイクリング手順を使用する。Q u A R T S 及び L Q A S 反応により生成される蛍光シグナルは、リアルタイムPCRと同様の様式でモニタリングされ、サンプル中の標的核酸の量の定量化が可能である。

【0337】

例示的な Q u A R T S 反応は、典型的に、およそ 200 ~ 600 nmol / L (例えば、500 nmol / L) の各プライマー及び検出プローブ、およそ 100 nmol / L の侵襲性オリゴヌクレオチド、およそ 600 ~ 700 nmol / L の各 F R E T カセット (FAM、例えば、H o l o g i c , I n c . により商業的に供給されているもの ; H E X 、例えば、B i o S e a r c h T e c h n o l o g i e s により商業的に供給されているもの ; 及び Q u a s a r 670、例えば、B i o S e a r c h T e c h n o l o g i e s により商業的に供給されており、「ブラックホール」クエンチャー、例えば、B i o S e a r c h T e c h n o l o g i e s の B H Q - 1、B H Q - 2、または B H Q - 3 を含むもの)、6.675 ng / μ L の F E N - 1 エンドヌクレアーゼ (例えば、C l e a v a s e (登録商標) 2.0、H o l o g i c , I n c .)、30 μ L 反応体積中1単位の T a q D N A ポリメラーゼ (例えば、G o T a q (登録商標) D N A ポリメラーゼ、P r o m e g a C o r p . , M a d i s o n , W I)、10 mmol / L の 3 - (n - モルホリノ) プロパンスルホン酸 (M O P S)、7.5 mmol / L の M g C l ₂、及び 250 μ mol / L の各 d N T P を含む。例示的な Q u A R T S サイクリング条件は、下記の表に示す通りである。いくつかの用途において、数量化サイクル (C_q) の分析により、サンプル中の標的 D N A 鎖の初期数 (例えば、コピー数) の測度がもたらされる。

【0338】

【表1】

ステージ	温度/時間	サイクル数
変性	95°C / 3 分	1
増幅 1	95°C / 20 秒	10
	67°C / 30 秒	
	70°C / 30 秒	
増幅 2	95°C / 20 秒	37
	53°C / 1 分	
	70°C / 30 秒	
冷却	40°C / 30 秒	1

【0339】

例示的な L Q A S 反応物は、典型的に、およそ 200 ~ 600 nmol / L の各プライマー、およそ 100 nmol / L の侵襲性オリゴヌクレオチド、およそ 500 nmol / L の各フラップオリゴヌクレオチドプローブ及び F R E T カセットを含む。L Q A S 反応物は、例えば、次のサーモサイクリング条件に供され得る：

【0340】

10

20

30

40

50

【表 2】

ステージ	温度/時間	サイクル数
変性	95°C / 3 分	1
増幅	95°C / 20 秒	40
	63°C / 1 分	
	70°C / 30 秒	
冷却	40°C / 30 秒	1

10

【0341】

QuARTS 及び LQAS アッセイのためのマルチプレックス標的増幅

バイサルファイト変換 DNA のマルチプレックス標的増幅

インプットサンプルからバイサルファイト処理済み DNA のほとんどまたは全てを前増幅するために、単一の大容量マルチプレックス増幅反応において、大量の処理済み DNA を使用することができる。例えば、DNA は、上述のように、例えば Maxwell Promega 血液キット # AS1400 を使用して、細胞株（例えば、DFCI032 細胞株（腺癌）；H1755 細胞株（神経内分泌）から抽出される。この DNA を、例えば、上述のようにバイサルファイト変換する。

20

【0342】

前増幅は、例えば、7.5 mM の $MgCl_2$ 、10 mM の MOPS、0.3 mM の トリス-HCl、pH 8.0、0.8 mM の KCl、0.1 $\mu g / \mu L$ の BSA、0.0001 % の Tween-20、0.0001 % の IGEPAL CA-630、250 μM の各 dNTP、オリゴヌクレオチドプライマー（例えば、12 種の標的に対して、等モル量（例えば、各プライマー 200 ~ 500 nM を含むがこれに限定されない範囲）、または異なる標的領域の増幅効率のバランスを取るよう調整された個々のプライマー濃度の、12 種のプライマーペア / 24 種のプライマー）、0.025 単位 / μL の HotStar GoTaq 濃縮物、及び 20 ~ 50 体積 % のバイサルファイト処理済み標的 DNA（例えば、50 μL の反応混合物中に 10 μL の標的 DNA、または 125 μL の反応混合物中に 50 μL の標的 DNA）を含む反応混合物中で行う。サーマルサイクリング時間及び温度は、反応物及び増幅容器の容量に適切となるよう選択する。例えば、反応物は、次のようなサイクルにかけられ得る：

30

【0343】

【表 3】

ステージ	温度/時間	サイクル数
ブレインキュベーション	95°C / 5 分	1
増幅 1	95°C / 30 秒	10 ~ 12
	64°C / 30 秒	
	72°C / 30 秒	
冷却	4°C / 保持	1

40

【0344】

サーマルサイクリング後、前増幅反応物のアリコート（例えば、10 μL ）を、魚 DNA ありまたはなしで、10 mM トリス、0.1 mM EDTA で 500 μL に希釈する。希釈した前増幅 DNA のアリコート（例えば、10 μL ）を、例えば上述のような QuARTS PCR-フラップアッセイで使用する。2015 年 10 月 30 日に出願された米

50

国特許出願第62／249，097号、2016年10月26日に出願された出願第15／335，096号、及び2016年10月26日に出願されたPCT／US16／58875も参照のこと。これらは各々、あらゆる目的で参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【0345】

前増幅とLQASを組み合わせたアッセイは、TELQASアッセイ（「Target Enrichment Long probe Quantitative Amplified Signal」の略）と呼ばれる。

【0346】

前増幅されたサンプルを使用し、QuARTS及びTELQAS反応を次のように準備する：

【0347】

【表4】

マスターミックス(反応毎)	反応毎の体積(μL)
水(分子生物学グレード)	15.50
10倍オリゴミックス*	3.00
20倍QuARTS/LQAS酵素ミックス**	1.50
マスターミックスの総量	20.0
反応ミックス	
マスターミックス	20
前増幅サンプル	10
最終反応体積	10

*10倍オリゴヌクレオチドミックス＝2 μMの各プライマーならびに5 μMの各プローブ及びFRETオリゴヌクレオチド

**20倍酵素ミックスは、1単位／μLのGoTaq Hot startポリメラーゼ（Promega）、292 ng／μLのCleavase 2.0フラップエンドヌクレアーゼ（Hologic）を含む。

【0348】

上記のように、QuARTSアッセイのフラップオリゴヌクレオチドは、12塩基の標的特異的領域を有し、一方LQASアッセイは、少なくとも13塩基の標的特異的領域を有するフラップオリゴヌクレオチドを使用し、異なるサーマルサイクリング条件に供される。

【0349】

QuARTS反応物は、次のサーモサイクリング条件に供される：

【0350】

10

20

30

40

50

【表 5】

QuARTS アッセイ反応サイクル:				シグナル取得
ステージ	温度/時間	ランプ速度 (°C/秒)	サイクル数	
プレインキュ ベーション	95°C / 3 分	4.4	1	なし
増幅 1	95°C / 20 秒	4.4	5	なし
	63°C / 30 秒	2.2		なし
	70°C / 30 秒	4.4		なし
増幅 2	95°C / 20 秒	4.4	40	なし
	53°C / 1 分	2.2		あり
	70°C / 30 秒	4.4		なし
冷却	40°C / 30 秒	2.2	1	なし

10

【0351】

TELQAS 反応物は、次のサーモサイクリング条件に供される：

【0352】

【表 6】

TELQAS アッセイ反応サイクル:				シグナル取得
ステージ	温度/時間	ランプ速度 (°C/秒)	サイクル数	
プレインキュ ベーション	95°C / 3 分	4.4	1	なし
増幅	95°C / 20 秒	4.4	40	なし
	63°C / 1 分	2.2		あり
	70°C / 30 秒	4.4		なし
冷却	40°C / 30 秒	2.2	1	なし

20

30

【0353】

RNA 検出のための LQAS / TELQAS (「RT-LQAS」または「RT-TELQAS」)

例示的な RT-LQAS 反応物は、20 U の MMLV 逆転写酵素 (MMLV-RT)、219 ng の Cleavase (登録商標) 2.0、1.5 U の GoTaq (登録商標) DNA ポリメラーゼ、200 nM の各プライマー、各 500 nM のプローブ及び FRET オリゴヌクレオチド、10 mM の MOPS バッファー、pH 7.5、7.5 mM の MgCl₂、ならびに 250 μM の各 nNTP を含む。例示的なプロトコールは次の通りである：

1. 要求される必要なオリゴヌクレオチドミックスを -20 °C の冷凍庫から取り出し、解凍する。

40

【0354】

2. 対照を -80 °C から室温で短時間解凍し、次いで氷上に置く。

【0355】

3. サンプルプレートを -80 °C から室温で短時間解凍し、次いで氷上に置く。

【0356】

4. 適切なサイズのチューブでオリゴ混合物のマスターミックスを調製する。

【0357】

5. MMLV-RT を H₂O で 1 : 20 に希釈する

【0358】

50

【表 7】

mRNA 逆転写 10 倍マスターミックスの配合	
成分	μL/反応
Nuclease Free-H ₂ O (Promega)	14.5
NF H ₂ O で希釈した MMLV_RT	1.0
10 倍オリゴミックス	3.00
20 倍酵素ミックス	1.5
マスターミックス総量(μL)	20.0
サンプル体積(μL)	10
最終的な RT-LQAS 反応体積(μL)	30

10

【0359】

6. プレートレイアウトに従って、マトリックスピペットまたは8チャンネルP20ピペットを使用し、20 μL のマスターミックスを96ウェルRT-LQASプレートにピペティングして入れる。

【0360】

7. 10 μL のサンプル、対照、キャリブレータをロードする（プレートレイアウトに従う）。

【0361】

8. プレートを密封し、手短に遠心分離する。

20

【0362】

9. 以下の反応条件でプレートをランする

反応は、典型的に、リアルタイムで（例えば、連続的に、またはいくつかもしくは全てのサイクルで同じ時点で）蛍光データを収集するよう構成されたサーマルサイクラーでランする。例えば、Roche LightCycler 480計器またはApplied Biosystem QuantStudioDX Real-Time PCR計器が、次の条件下で使用され得る：

【0363】

【表 8】

RT-LQAS アッセイ反応サイクル:				
ステージ	温度/時間	ランプ速度 (°C/秒)	サイクル数	シグナル取得
逆転写	42°C/30 分	4.4	1	なし
プレインキュ ベーション	95°C/3 分	4.4	1	なし
増幅	95°C/20 秒	4.4	45	なし
	63°C/1 分	2.2		シングル
	70°C/30 秒	4.4		なし
冷却	40°C/30 秒	2.2	1	なし

40

【0364】

いくつかの実施形態において、RT-LQASアッセイは、上述のように、マルチプレックス逆転写ステップと、前増幅ステップ、例えば、サンプル中で2、5、10、12、またはそれ以上の標的（すなわち1つの標的よりも多くの任意の数の標的）を前増幅させるステップとを含み得、「RT-TELQAS」と呼ばれ得る。好ましい実施形態において、RT-前増幅は、例えば、20 UのMMLV逆転写酵素、1.5 UのGoTaq（登録商標）DNAポリメラーゼ、10 mMのMOPSバッファー、pH 7.5、7.5 mMのMgCl₂、250 μMの各dNTP、及びオリゴヌクレオチドプライマー（例えば、

50

12種の標的に対して、等モル量（例えば、各プライマー200nM）、または異なる標的の増幅効率のバランスを取るよう調整された個々のプライマー濃度の、12種のプライマーペア／24種のプライマー）を含む反応混合物中で行う。サーマルサイクリング時間及び温度は、反応物及び増幅容器の容量に適切となるよう選択する。例えば、反応物は、次のようなサイクルにかけられ得る：

【0365】

【表9】

ステージ	温度／時間	サイクル数
RT	42°C / 30 分	1
	95°C / 3 分	1
増幅	95°C / 20 秒	10
	63°C / 30 秒	
	70°C / 30 秒	
冷却	4°C / 保持	1

10

【0366】

サーマルサイクリング後、RT-前増幅反応物のアリコート（例えば、10μL）を、魚DNAありまたはなしで、10mMトリス、0.1mMEDTAで500μLに希釈する。希釈した前増幅DNAのアリコート（例えば、10μL）を、上述のようなLQAS／TELQASPCRフラップアッセイで使用する。いくつかの実施形態において、LQAS／TELQASPCRフラップアッセイは、追加量の同じプライマーペアを使用して行われる。

20

【0367】

実施例2

メチル化マーカの選択及び検査

マーカ選択プロセス：

RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) データを、16の腺癌肺癌組織、11の大細胞肺癌組織、14の小細胞肺癌組織、24の扁平上皮細胞肺癌組織、及び18の非癌肺組織から取得し、26名の健康な患者からバフィーコートサンプルのRRBS結果も取得した。

30

【0368】

バイサルファイト変換型のヒトゲノム配列とのアラインメントの後、各CpGアイランドにおける平均メチル化を各サンプルタイプ（すなわち、組織またはバフィーコート）について計算し、次の基準に基づいてマーカ領域を選択した：

- 領域は50塩基対以上になるように選択した。
- QuARTSフラップアッセイの設計では、a) プロンプ領域、b) フォワードプライマー結合領域、及びc) リバースプライマー結合領域の各々の下に最低1つのメチル化CpGがあるように領域を選択した。フォワードプライマー及びリバースプライマーについては、メチル化CpGがプライマーの3'末端に近いが、3'末端ヌクレオチドにはないことが好ましい。例示的なフラップエンドヌクレアーゼアッセイオリゴヌクレオチドを図5に示す。
- 目的の領域内のいずれかのCpGにおけるバフィーコートのメチル化は、>0.5%以下であることが好ましい。
- 目的の領域内のがん組織のメチル化は、>10%であることが好ましい。
- 組織分析のために設計されたアッセイでは、目的の領域内の正常組織のメチル化は、好ましくは<0.5%である。

40

50

【 0 3 6 9 】

異なる肺癌組織型の R R B S データを図 2 ～ 5 に示す。上記の基準に基づいて、下記の表に示したマーカーを選択し、図 5 に示すように、これらについて Q u A R T S フラップアッセイを設計した。

【 0 3 7 0 】

【表 1 0 - 1 】

表 1

マーカー名	ゲノム座標
AGRN	chr1:968467-968582、鎖=+
ANGPT1	chr8:108509559-108509684、鎖=-
ANKRD13B	chr17:27940470-27940578、鎖=+
ARHGEF4	chr2:131792758-131792900、鎖=-
B3GALT6	chr1: 1163595-1163733、鎖=+
BARX1	chr9:96721498-96721597、鎖=-
BCAT1	chr12:25055868-25055986、鎖=-
BCL2L11	chr2: 111876620-111876759、鎖=-
BHLHE23	chr20:61638462-61638546、鎖=-
BIN2	chr12:51717898-51717971、鎖=-
BIN2_Z	chr12:51718088-51718165、鎖=+
CAPN2	chr1:223936858-223936998、鎖=+
chr17_737	chr17:73749814-73749919、鎖=-
chr5_132	chr5:132161371-132161482、鎖=+
chr7_636	chr7:104581684-104581817、鎖=-
CYP26C1	chr10: 94822396-94822502、鎖=+
DIDO1	chr20:61560669-61560753、鎖=-
DLX4	chr17:48042426-48042820、鎖=-
DMRTA2	chr1:50884390-50884519、鎖=-
DNMT3A	chr2:25499967-25500072、鎖=-
DOCK2	chr5:169064370- 169064454、鎖=-
EMX1	chr2: 73147685-73147792、鎖=+
FAM59B	chr2:26407701-26407828、鎖=+
FERMT3	chr11:63974820-63974959、鎖=+
FGF14	chr13:103046888-103046991、鎖=+
FLJ34208	chr3:194208249-194208355、鎖=+
FLJ45983	chr10:8097592-8097699、鎖=+
GRIN2D	chr19:48918160-48918300、鎖=-
HIST1H2BE	chr6:26184248-26184340、鎖=+
HOPX	chr4:57521932-57522261 5'pad=0 3'pad=0 鎖=-
IFFO1	chr12:6665277-6665348 鎖=+
HOXA9	chr7:27205002-27205102、鎖=-

【 0 3 7 1 】

10

20

30

40

50

【表 10 - 2】

HOXB2	chr17:46620545-46620639、鎖=-
KLHDC7B	chr22: 50987199-50987256、鎖=+
LOC100129726	chr2:43451705-43451810、鎖=+
MATK	chr19:3786127-3786197、鎖=+
MAX.chr10.22541891-22541946	chr10:22541881-22541975、鎖=+
MAX.chr10.22624430-22624544	chr10:22624411-22624553、鎖=-
MAX.chr12.52652268-52652362	chr12:52652262-52652377、鎖=-
MAX.chr16.50875223-50875241	chr16:50875167-50875274、鎖=-
MAX.chr19.16394489-16394575	chr19:16394457-16394593、鎖=-
MAX.chr19.37288426-37288480	範囲=chr19:37288396-37288512、鎖=-
MAX.chr8.124173236-124173370	chr8:124173231-124173386、鎖=-
MAX.chr8.145105646-145105653	chr8:145105572-145105685、鎖=-
MAX_Chr1.110	chr1:110627118-110627224 鎖=-
NFIX	chr19:13207426-13207513、鎖=+
NKX2-6	chr8:23564052-23564145、鎖=-
OPLAH	chr8:145106777-145106865、鎖=-
PARP15	chr3:122296692-122296805、鎖=+
PRDM14	chr8:70981945-70982039、鎖=-
PRKAR1B	chr7:644172-644237、鎖=+
PRKCB_28	chr16:23847607-23847698、鎖=-
PTGDR	chr14:52735270-52735400、鎖=-
PTGDR_9	chr14:52735221-52735300、鎖=+
RASSF1	chr3:50378408-50378550、鎖=-
SHOX2	chr3:157821263-157821382、鎖=-
SHROOM1	chr5:132161371-132161425、鎖=+
SIPR4	chr19:3179921-3180068 鎖=-
SKI	chr1:2232328-2232423、鎖=+
SLC12A8	chr3:124860704-124860791、鎖=+
SOBP	chr6: 107956176-107956234、鎖=+
SP9	chr2:175201210-175201341、鎖=-
SPOCK2	chr10:73847236-73847324、鎖=-
ST8SIA1	chr12:22487518-22487630、鎖=+
ST8SIA1_22	chr12:22486873-22487009、鎖=-
SUCLG2	chr3:67706477-677065610、鎖=-
TBX15 領域 1	chr1:119527066-119527655、鎖=+

10

20

30

40

【0372】

50

【表 10-3】

TBX15 領域 2	chr1:119532813-119532920 鎖=-
TRH	chr3:129693481-129693580、鎖=+
TSC22D4	chr7:100075328-100075445、鎖=-
ZDHHC1	chr16:67428559-67428628、鎖=-
ZMIZ1	chr10:81002910-81003005、鎖=+
ZNF132	chr19:58951403-58951529、鎖=-
ZNF329	chr19: 58661889- 58662028、鎖=-
ZNF671	chr19:58238790-58238906、鎖=+
ZNF781	chr19: 38183018-38183137、鎖=-

10

【0373】

選択されたマーカーのバフィーコートとの交差反応性の分析。

【0374】

1) バフィーコートのスクリーニング

健康な患者の血液 10 mL から得られたバフィーコートから抽出した DNA で、上記リストのマーカーをスクリーニングした。DNA は、Promega Maxwell RSC システム (Promega Corp., Fitchburg, WI) を使用して抽出し、Zymo EZ DNA Methylation (商標) Kit (Zymo Research, Irvine, CA) を使用して変換した。バイサルファイト変換 β -アクチン DNA (「BTACT」) とのバイプレックス反応を使用し、標的ゲノム DNA のおよそ 40,000 の鎖を使用し、上述のような QuARTS フラップエンドヌクレアーゼアッセイを使用してサンプルを検査して、交差反応性を検査した。すると、3 つのマーカーのアッセイが有意な交差反応性を示した：

20

【0375】

【表 11】

マーカー	交差反応性%
HIST1H2B	72.93%
chr7_636	3495.47%
chr5_132	0.20%

30

【0376】

2) 組織のスクリーニング

264 の組織サンプルを、下記の表 2 に示すように、様々な商業的供給源及び非商業的供給源 (Asuragen、BioServe、Conversant Bio、Cureline、Mayo Clinic、MD Anderson、及び PrecisionMed) から得た。

【0377】

40

【表 12】

症例数	病理	サブタイプ	詳細
82	正常	NA	喫煙者 68 名、喫煙歴なし 34 名、喫煙歴不明 17 名
37	正常	良性結節	
7	NSCLC	気管支肺胞上皮	
13	NSCLC	大細胞	
2	NSCLC	神経内分泌	
42	NSCLC	扁平上皮細胞	
68	NSCLC	腺癌	
4	SCLC	小細胞	
9	NSCLC	カルチノイド	

10

【0378】

病理学者が組織切片を検査し、組織学的に明確な病変に丸をつけて顕微解剖を指示した。全核酸の抽出は、Promega Maxwell RSCシステムを使用して行った。ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）スライドをこすり、Maxwell（登録商標）RSC DNA FFPE Kit（#AS1450）を使用し、製造元の手順を使用し、ただしRNase処理ステップを省略して、DNAを抽出した。同じ手順をFFPEカールにも使用した。凍結パンチ生検サンプルの場合、RSC DNA FFPEキットの溶解バッファーとMaxwell（登録商標）RSC Blood DNAキット（#AS1400）を使用した、改変された手順を利用し、RNaseステップを省略した。サンプルを10mMトリス、0.1mM EDTA、pH8.5で溶出し、10μLを使用して6つのマルチプレックスPCR反応を準備した。

20

【0379】

以下のマルチプレックスPCRプライマーミックスを10倍濃度（10倍＝各プライマー2μM）で作った：

● マルチプレックスPCR反応物1は、次の各マーカーからなるものであった：BARX1、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、PARP15、MAX.chr8.145105646-145105653、ST8SIA1__22、ZDHHC1、BIN2__Z、SKI、DNMT3A、BCL2L11、RASSF1、FERMT3、及びBTACT。

30

● マルチプレックスPCR反応物2は、次の各マーカーからなるものであった：ZNF671、ST8SIA1、NKX6-2、SLC12A8、FAM59B、DIDO1、MAX__Chr1.110、AGRN、PRKCB__28、SOBP、及びBTACT。

● マルチプレックスPCR反応物3は、次の各マーカーからなるものであった：MAX.chr10.22624430-22624544、ZMIZ1、MAX.chr8.145105646-145105653、MAX.chr10.22541891-22541946、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50875223-50875241、PTGDR__9、ANKRD13B、DOCK2、及びBTACT。

40

● マルチプレックスPCR反応物4は、次の各マーカーからなるものであった：MAX.chr19.16394489-16394575、HOXB2、ZNF132、MAX.chr19.37288426-37288480、MAX.chr12.52652268-52652362、FLJ45983、HOXA9、TRH、SP9、DMRTA2、及びBTACT。

● マルチプレックスPCR反応物5は、次の各マーカーからなるものであった：EMX1、ARHGEF4、OPLAH、CYP26C1、ZNF781、DLX4、PTGDR、KLHDC7B、GRIN2D、chr17__737、及びBTACT。

● マルチプレックスPCR反応物6は、次の各マーカーからなるものであった：TBX

50

15、MATK、SHOX2、BCAT1、SUCLG2、BIN2、PRKAR1B、SHROOM1、S1PR4、NFIX、及びBTACT。

【0380】

各マルチプレックスPCR反応は、0.2 μMの反応バッファー、0.2 μMの各プライマー、0.05 μMのHotstart Go Taq (5 U/μL)の最終濃度となるように準備し、40 μLのマスターミックスを10 μLのDNAテンプレートと合わせて50 μLの最終反応体積となるようにした。

【0381】

マルチプレックスPCRのサーマルプロファイルは、95 °で5分間のプレインキュベーションステージと、95 °で30秒間、64 °で30秒間、72 °で30秒間の10サイクルの増幅と、4 °で冷却し、さらなる処理まで保持するステージとを伴った。マルチプレックスPCRが完了したら、PCR産物を、20 ng/μLの魚DNA（例えば、水中またはバッファー中、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第9,212,392号を参照のこと）の希釈剤を使用して1:10に希釈し、10 μLの希釈した増幅サンプルを各QuARTSアッセイ反応に使用した。

【0382】

各QuARTSアッセイは、2つのメチル化マーカー及び参照遺伝子としてのBTACTからなるトリプレックス形式で構成した。

● マルチプレックスPCR産物1からは、次の7つのトリプレックスQuARTSアッセイをランした：(1) BARX1、LOC100129726、BTACT；(2) SPOCK2、TSC22D4、BTACT；(3) PARP15、MAXchr8145105646-145105653、BTACT；(4) ST8SIA1__22、ZDHHC1、BTACT；(5) BIN2__Z、SKI、BTACT；(6) DNMT3A、BCL2L11、BTACT；(7) RASSF1、FERMT3、及びBTACT。

● マルチプレックスPCR産物2からは、次の5つのトリプレックスQuARTSアッセイをランした：(1) ZNF671、ST8SIA1、BTACT；(2) NKX6-2、SLC12A8、BTACT；(3) FAM59B、DIDO1、BTACT；(4) MAX__Chr1110、AGRN、BTACT；(5) PRKCB__28、SOBP、及びBTACT。

● マルチプレックスPCR産物3からは、次の5つのトリプレックスQuARTSアッセイをランした：(1) MAXchr1022624430-22624544、ZMIZ1、BTACT；(2) MAXchr8145105646-145105653、MAXchr1022541891-22541946、BTACT；(3) PRDM14、ANGPT1、BTACT；(4) MAXchr1650875223-50875241、PTGDR__9、BTACT；(5) ANKRD13B、DOCK2、及びBTACT。

● マルチプレックスPCR産物4からは、次の5つのトリプレックスQuARTSアッセイをランした：(1) MAXchr1916394489-16394575、HOXB2、BTACT；(2) ZNF132、MAXchr1937288426-37288480、BTACT；(3) MAXchr1252652268-52652362、FLJ45983、BTACT；(4) HOXA9、TRH、BTACT；(5) SP9、DMRTA2、及びBTACT。

● マルチプレックスPCR産物5からは、次の5つのトリプレックスQuARTSアッセイをランした：(1) EMX1、ARHGEF4、BTACT；(2) OPLAH、CYP26C1、BTACT；(3) ZNF781、DLX4、BTACT；(4) PTGDR、KLHDC7B、BTACT；(5) GRIN2D、chr17__737、及びBTACT。

● マルチプレックスPCR産物6からは、次の5つのトリプレックスQuARTSアッセイをランした：(1) TBX15、MATK、BTACT；(2) SHOX2、BCAT1、BTACT；(3) SUCLG2、BIN2、BTACT；(4) PRKAR1B

10

20

30

40

50

、SHROOM1、BTACT；(5)S1PR4、NFIX、及びBTACT。

【0383】

3) データ分析：

組織データの分析では、正常組織で<0.5%メチル化及びがん組織で>10%メチル化のRRBS基準に基づいて選択されたマーカーを含めた。これにより、さらに分析するための51種のマーカーが得られた。

【0384】

マーカーの感度を判定するために、以下を行った：

1. 各マーカーのメチル化%は、その特定のマーカーで得られた鎖の値をACTB(β-アクチン)の鎖の値で割ることによって計算した。

【0385】

2. 各マーカーの最大メチル化%は、正常組織で測定した。これが100%の特異性として定義される。

【0386】

3. 各マーカーのがん組織陽性は、そのマーカーの正常組織の最大メチル化%よりも多かったがん組織の数として判定した。

【0387】

51種のマーカーの感度を以下に示す。

【0388】

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 1】

表 2

マーカー	正常の最大メチル化%	がん(N=136)		
		陰性数	陽性数	感度
BARX1	1.665	66	70	51%
LOC100129726	1.847	109	27	20%
SPOCK2	0.261	86	50	37%
TSC22D4	0.618	70	66	49%
MAX.chr8.124	0.293	45	91	67%
RASSF1	1.605	79	57	42%
ZNF671	0.441	73	63	46%
ST8SIA1	1.56	119	17	13%
NKX6_2	15.58	102	34	25%
FAM59B	0.433	85	51	38%
DIDO1	2.29	93	43	32%
MAX_Chrl.110	0.076	85	51	38%
AGRN	2.16	66	70	51%
SOBP	38.5	110	26	19%
MAX_chr10.226	0.7	52	84	62%
ZMIZ1	0.025	72	64	47%
MAX_chr8.145	5.56	57	79	58%
MAX_chr10.225	0.77	72	64	47%
PRDM14	0.22	35	101	74%
ANGPT1	1.6	99	37	27%
MAX.chr16.50	0.27	92	44	32%
PTGDR_9	4.62	82	54	40%
ANKRD13B	7.03	93	43	32%
DOCK2	0.001	71	65	48%
MAX_chr19.163	0.61	56	80	59%
ZNF132	1.3	83	53	39%
MAX chr19.372	0.676	79	57	42%
HOXA9	16.7	53	83	61%
TRH	2.64	61	75	55%
SP9	14.99	75	61	45%
DMRTA2	7.9	55	81	60%

【 0 3 8 9 】

10

20

30

40

50

【表 13-2】

ARHGEF4	7.41	113	23	17%
CYP26C1	39.2	101	35	26%
ZNF781	5.28	44	92	68%
PTGDR	6.13	76	60	44%
GRIN2D	16.1	113	23	17%
MATK	0.04	93	43	32%
BCAT1	0.64	75	61	45%
PRKCB_28	1.68	57	79	58%
ST8SIA_22	1.934	55	81	60%
FLJ45983	8.34	39	97	71%
DLX4	15.1	41	95	70%
SHOX2	7.48	32	104	76%
EMX1	11.34	34	102	75%
HOXB2	0.114	61	75	55%
MAX.chr12.526	5.58	34	102	75%
BCL2L11	10.7	44	92	68%
OPLAH	5.11	29	107	79%
PARP15	3.077	42	94	69%
KLHDC7B	8.86	38	98	72%
SLC12A8	0.883	34	102	75%

10

20

【0390】

マーカーの組み合わせを使用して特異性及び感度を増加させることができる。例えば、8つのマーカーSLC12A8、KLHDC7B、PARP15、OPLAH、BCL2L11、MAX.chr12.526、HOXB2、及びEMX1の組み合わせは、検査したがん組織の全てで、100%の特異性で、98.5%の感度（134／136のがん）をもたらした。

30

【0391】

いくつかの実施形態において、マーカーは、例えば、特定のがんタイプまたはタイプの組み合わせに対して感度及び特異性を示すマーカーの使用による、特定のタイプの肺癌組織、例えば、腺癌、大細胞癌、扁平上皮細胞癌、または小細胞癌に関連する、高感度かつ特異的な検出のために選択される。

【0392】

組織でアッセイされたメチル化DNAマーカーのこのパネルは、正常な肺組織及び良性結節では陰性のままでありながら、全てのタイプの肺癌のきわめて高度な識別を達成する。このマーカーパネルのアッセイは、血液または体液ベースの検査にも適用することができ、例えば、肺癌スクリーニング及び悪性結節と良性結節の識別に応用される。

40

【0393】

実施例3

血漿サンプルでの30マーカーセットの検査

実施例2のマーカーのリストから、30種のマーカーを、295名の対象（肺癌64名、正常対照231名）由来の血漿サンプルにおけるDNAの検査で使用するために選択した。DNAを各対象の2mLの血漿から抽出し、実施例1に記載したようにバイサルファイトで処理した。バイサルファイト変換DNAのアリコートを、実施例1に記載したように、2つのマルチプレックスQuARTSアッセイで使用した。分析のために選択したマーカーは次の通りである：

1. BARX1

50

2. B C L 2 L 1 1
 3. B I N 2 _ Z
 4. C Y P 2 6 C 1
 5. D L X 4
 6. D M R T A 2
 7. D N M T 3 A
 8. E M X 1
 9. F E R M T 3
 10. F L J 4 5 9 8 3
 11. H O X A 9
 12. K L H D C 7 B
 13. M A X . c h r 1 0 . 2 2 6 2 4 4 3 0 - 2 2 6 2 4 5 4 4
 14. M A X . c h r 1 2 . 5 2 6 5 2 2 6 8 - 5 2 6 5 2 3 6 2
 15. M A X . c h r 8 . 1 2 4 1 7 3 2 3 6 - 1 2 4 1 7 3 3 7 0
 16. M A X . c h r 8 . 1 4 5 1 0 5 6 4 6 - 1 4 5 1 0 5 6 5 3
 17. N F I X
 18. O P L A H
 19. P A R P 1 5
 20. P R K C B _ 2 8
 21. S 1 P R 4
 22. S H O X 2
 23. S K I
 24. S L C 1 2 A 8
 25. S O B P
 26. S P 9
 27. S U C L G 2
 28. T B X 1 5
 29. Z D H H C 1
 30. Z N F 7 8 1

これらのマーカーの、標的配列、バイサルファイト変換後の標的配列、及びアッセイオリゴヌクレオチドは、図5に示す通りであった。各変換標的に使用したプライマー及びフラップオリゴヌクレオチド（プローブ）は、次の通りであった：
 【0394】

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1】

表 3

マーカー	オリゴヌクレオチド名	成分	配列(5'-3')	配列番号
BARX1	BARX1_FP	フォワードプライマー	CGTTAATTTGTTAGATAGAGGGC G	23
	BARX1_RP	リバーズプライマー	ACGATCGTCCGAACAACC	24
	BARX1_Pb_A5	フラップオリゴ	CCACGGACGCGCCTACGAAAA/3 C6/	25
SLC12A8	SLC12A8_FP	フォワードプライマー	TTAGGAGGGTGGGGTTCG	289
	SLC12A8_RP	リバーズプライマー	CTTTCCTCGCAAAACCGC	290
	SLC12A8_Pb_A1	フラップオリゴ	CCACGGACGGGAGGGCGTAGG/3 C6/	291
PARP15	PARP15_FP	フォワードプライマー	GGTTGAGTTTGGGGTTCG	236
	PARP15_RP	リバーズプライマー	CGTAACGTAAAATCTCTACGCCC	237
	PARP15_Pb_A5	フラップオリゴ	CCACGGACGCGCTCGAACTAC/3 C6/	238
MAX.Chr8.124	MAX.Chr8.124_FP	フォワードプライマー	GGTTGAGGTTTTTCGGGTTTTTAG	203
	MAX.Chr8.124_RP	リバーズプライマー	CCTCCCCACGAAATCGC	204
	MAX.Chr8.124_Pb_A1	フラップオリゴ	CGCCGAGGGCGGGTTTTTCGT/3C6 /	205

【 0 3 9 5】

【表 1 4 - 2】

SHOX2	SHOX2_FP	フォワードプライマー	GTTCGAGTTTAGGGGTAGCG	269
	SHOX2_RP	リバーズプライマー	CCGCACAAAAAACCGCA	270
	SHOX2_Pb_A5	フラップオリゴ	CCACGGACGATCCGCAAACGC/3 C6/	271
ZDHC1	ZDHC1FP	フォワードプライマー	GTCGGGGTCGATAGTTTACG	348
	ZDHC1RP_V3	リバーズプライマー	ACTCGAACTCACGAAAACG	349
	ZDHC1Probe_v3_A1	フラップオリゴ	CGCCGAGGGACGAACGCACG/3C6 6/	350

【 0 3 9 6】

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 3】

BIN2_Z	BIN2_FP_Z	フォワード プライマー	GGGTTTATTTTATAGGTAGCGTTC G	50
	BIN2_RP_Z	リバーズプ ライマー	CGAAATTTTCGAACAAAAATTAA AACTCGA	51
	BIN2_Pb_A5_Z	フラップオ リゴ	CCACGGACGGTTCGAGGTTAG/3 C6/	52
SKI	SKI_FP	フォワード プライマー	ACGGTTTTTTCGTTATTTTACGG G	279
	SKI_RP	リバーズプ ライマー	CAACGCCTAAAAACACGACTC	280
	SKI_Pb_A1	フラップオ リゴ	CGCCGAGGGGCGGTTGTTGG/3C6 /	281
DNMT3A	DNMT3A_FP	フォワード プライマー	GTTACGAATAAAGCGTTGGCG	93
	DNMT3A_RP	リバーズプ ライマー	AACGAAACGTCTTATCGCGA	94
	DNMT3A_Pb_A5	フラップオ リゴ	CCACGGACGGAGTGC GCGTTC/3 C6/	95
BC2L11	BCL2L11_FP	フォワード プライマー	CGTAATGTTTCGCGTTTTTCG	35
	BCL2L11_RP	リバーズプ ライマー	ACTTTCTTCTACGTAATCTTTTC CGA	36
	BCL2L11_Pb_A1	フラップオ リゴ	CGCCGAGGGCGGGGTCGGGC/3C 6/	37

【 0 3 9 7 】

【表 1 4 - 4】

TBX15	TBX15_Reg2_FP	フォワード プライマー	AGGAAATTGCGGGTTTTTCG	332
	TBX15_Reg2_RP	リバーズプ ライマー	CCAAAAATCGTCGCTAAAAATC AAC	334
	TBX15_Reg2_Pb_A5	フラップオ リゴ	CCACGGACGCGCGCATTCAC/3C 6/	335
FERMT3	FERMT3_FP	フォワード プライマー	GTTTTCGGGGATTATATCGATTC G	118
	FERMT3_RP	リバーズプ ライマー	CCCAATAACCCGCAAAATAACC	119
	FERMT3_Pb_A1	フラップオ リゴ	CGCCGAGGCGACTCGACCTC/3C6 /	120
PRKCB_28	PRKCB_28_FP	フォワード プライマー	GGAAGGTGTTTTGCGCG	249
	PRKCB_28_RP	リバーズプ ライマー	CTTCTACAACCACTACACCGA	250
	PRKCB_28_Pb_A5	フラップオ リゴ	CCACGGACGGCGCGCGTTTAT/3C 6/	251

10

20

30

40

50

【 0 3 9 8 】

【 表 1 4 - 5 】

SOBP_HM	SOBP_HM_FP	フォワード プライマー	TTTCGGCGGGTTTCGAG	294
	SOBP_HM_RP	リバーズプ ライマー	CGTACCGTTCACGATAACGT	295
	SOBP_HM_Pb _A1	フラップオ リゴ	CGCCGAGGGGCGGTCGCGGT/3C 6/	296
MAX.chr8. 145	MAX.Chr8.145 _FP	フォワード プライマー	GCGGTATTAGTTAGAGTTTTAGT CG	211
	MAX.Chr8.145 _RP	リバーズプ ライマー	ACAACCCTAAACCCTAAATATCG T	212
	MAX.Chr8.145 _Pb_A5	フラップオ リゴ	CCACGGACGGACGGCGTTTTT/3C 6/	213
MAX.chr1 0.226	MAX.Chr10.22 6_FP	フォワード プライマー	GGGAAATTTGTATTTTCGTAAAAT CG	178
	MAX.Chr10.22 6_RP	リバーズプ ライマー	ACAACCTAATTATCTACGTAACA TCGT	179
	MAX_Chr10.2 26_Pb_A1	フラップオ リゴ	CGCCGAGGGCGGTTAAGAAA/3C 6/	180
MAX.chr1 2.52	MAX.Chr12.52 _FP	フォワード プライマー	TCGTTTCGTTTTTGTTCGTTATCG	183
	MAX.Chr12.52 _RP	リバーズプ ライマー	AACCGAAATACAACCTAAAAACG C	184
	MAX.Chr12.52 PbA1	フラップオ リゴ	CCACGGACGCGAACCCCGCAA/3 C6/	185

10

20

【 0 3 9 9 】

30

40

50

【表 1 4 - 6】

FLJ45983	FLJ45983_FP	フォワード プライマー	GGGCGCGAGTATAGTCG	133
	FLJ45983_RP	リバーズプ ライマー	CAACGCGACTAATCCGC	134
	FLJ45983_Pb_ A1	フラップオ リゴ	CGCCGAGGCCGTCACCTCCA/3C6 /	135
HOXA9	HOXA9_FP	フォワード プライマー	TTGGGTAATTATTACGTGGATTC G	148
	HOXA9_RP	リバーズプ ライマー	ACTCATCCGCGACGTC	149
	HOXA9_Pb_A 5	フラップオ リゴ	CCACGGACGCGACGCCCAACA/3 C6/	150
EMX1	EMX1_FP	フォワード プライマー	GGCGTCGCGTTTTTTTAGAGAA	108
	EMX1_RP	リバーズプ ライマー	TTCCTTTTCGTTCGTATAAAATTT CGTT	109
	EMX1PbA1	フラップオ リゴ	CGCCGAGGATCGGGTTTTAG/3C6 /	110

10

20

【 0 4 0 0】

【表 1 4 - 7】

SP9	SP9_FP	フォワード プライマー	TAGCGTCGAATGGAAGTTCGA	315
	SP9_RP	リバーズプ ライマー	GCGCGTAAACATAACGCACC	317
	SP9_Pb_A5	フラップオ リゴ	CCACGGACGCCGTACGAATCC/3 C6/	318
DMRTA2	DMRTA2_FP	フォワード プライマー	TGGTGTTTACGTTCGGTTTTTCGT	88
	DMRTA2_RP	リバーズプ ライマー	CCGCAACAACGACGACC	89
	DMRTA2_Pb_ A1	フラップオ リゴ	CGCCGAGGCGAACGATCACG/3C 6/	90
OPLAH	FPrimerOPLA H	フォワード プライマー	cGTcGcGTTTTTcGGTTATACG	231
	RPrimerOPLA H	リバーズプ ライマー	CGCGAAACTAAAAAACCGCG	232
	ProbeA5OPLA H	フラップオ リゴ	CCACGGACG- GCACCGTAAAC/3C6/	233
CYP26C1	CYP26C1_FP	フォワード プライマー	TGGTTTTTTGGTTATTTTCGGAATC GT	70
	CYP26C1_RP	リバーズプ ライマー	GCGCGTAATCAACGCTAAC	71
	CYP26C1_Pb_ A1	フラップオ リゴ	CGCCGAGGCGACGATCTAAC/3C6 /	72

30

40

50

【 0 4 0 1 】

【 表 1 4 - 8 】

ZNF781	ZNF781F.prim er	フォワード プライマー	CGTTTTTTTGTTCGAGTGCG	373
	ZNF781R.prim er	リバーズプ ライマー	TCAATAACTAAACTCACCGCGTC	374
	ZNF781probe. A5	フラップオ リゴ	CCACGGACGGCGGATTTATCG/3 C6/	375
DLX4	DLX4_FP	フォワード プライマー	TGAGTGCCTAGTGTTCGG	80
	DLX4_RP	リバーズプ ライマー	CTCCTCTACTAAAACGTACGATA AACA	81
	DLX4_Pb_A1	フラップオ リゴ	CGCCGAGGATCGTATAAAAC/3C6 /	82
SUCLG2	SUCLG2_HM _FP	フォワード プライマー	TCGTGGGTTTTTAATCGTTTCG	321
	SUCLG2_HM _RP	リバーズプ ライマー	TCACGCCATCTTTACCGC	322
	SUCLG2_HM _Pb_A5	フラップオ リゴ	CCACGGACGCGAAAATCTACA/3 C6/	323

10

20

30

40

50

【 0 4 0 2 】

【表 1 4 - 9】

KLHDC7 B	KLHDC7B_FP	フォワード プライマー	AGTTTTCGGGTTTTGGAGTTCGT TA	158
	KLHDC7B_RP	リバーズプ ライマー	CCAAATCCAACCGCCGC	159
	KLHDC7B_Pb _A1	フラップオ リゴ	CGCCGAGGACGGCGGTAGTT/3C6 /	160
S1PR4_H M	S1PR4_HM_F P	フォワード プライマー	TTATATAGGCGAGGTTGCGT	284
	S1PR4_HM_R P	リバーズプ ライマー	CTTACGTATAAATAATACAACCA CCGAATA	285
	S1PR4_HM_P b_A5	フラップオ リゴ	CCACGGACGACGTACCAAACA/3 C6/	286
NFIH_H M	NFIH_HM_FP	フォワード プライマー	TGGTTCGGGCGTGACGCG	221
	NFIH_HM_RP	リバーズプ ライマー	TCTAACCCCTATTTAACCAACCGA	222
	NFIH_HM_Pb _A1	フラップオ リゴ	CGCCGAGGGCGGTTAAAGTG/3C 6/	223
参照 DNA	オリゴヌクレ オチド名	成分	配列(5'-3')	
ゼブラフ イッシュ 合成 (RASSF1) BT 変換 後)†	ZF_RASSF1_F P	BT フォワ ードプライ マー	TGCGTATGGTGGGCGAG	394
	ZF_RASSF1_ RP	BT リバー スプライマ ー	CCTAATTTACACGTCAACCAATC GAA	395
	ZF_RASSF1_P b_A5	BT フラッ プオリゴ	CCACGGACGGCGCGTGC GTTT/3C 6/	397

【 0 4 0 3】

【表 1 4 - 1 0】

B3GALT6*	B3GALT6_FP _V2	フォワード プライマー	GGTTTATTTTGGTTTTTTGAGTTT TCGG	386
	B3GALT6_RP	リバーズプ ライマー	TCCAACCTACTATATTACGCGA A	387
	B3GALT6_Pb _A1	フラップオ リゴ	CCACGGACGGCGGATTTAGGG/3 C6/	388
BTACT	ACTB_BT_FP 65	フォワード プライマー	GTGTTTGT TTTT TTTGATTAGGTGT TTAAGA	381
	ACTB_BT_RP 65	リバーズプ ライマー	CTTTACACCAACCTCATAACCTT ATC	382
	ACTBBTPbA3	フラップオ リゴ	GACGCGGAGATAGTGTGTGG/3 C6/	383

【 0 4 0 4】

* B 3 G A L T 6 マーカーは、がんメチル化マーカーと参照標的の両方として使用される

10

20

30

40

50

。参照により全体として本明細書に組み込まれる、2016年7月19日に出願された米国特許出願第62／364，082号を参照のこと。

【0405】

†ゼブラフィッシュの参照DNAについては、参照により全体として本明細書に組み込まれる、2016年7月19日に出願された米国特許出願第62／364，049号を参照のこと。

【0406】

上述のように血漿から調製されたDNAを、実施例1に記載したように、2つのマルチプレックス前増幅反応で増幅した。マルチプレックス前増幅反応は、次のマーカーの組み合わせを増幅する試薬を含んだ。

【0407】

【表15】

表4

マルチプレックスミックス1	マルチプレックスミックス2
B3GALT6 (参照)	B3GALT6 (参照)
ZF_RASSF1 (参照)	ZF_RASSF1 (参照)
BARX1	CYP26C1
BCL2L11	DLX4
BCL2L11	DMRTA2
BIN2_Z	EMX1
DNMT3A	HOXA9
FERMT3	KLHDC7B
PARP15	MAX.chr8.125
PRKCB_28	MAX_chr10.226
SHOX2	NFIX
SLC12A8	OPLAH
SOBP	S1PR4
TBX15_Reg2	SP9
ZDHHC1	SUCLG2
	ZNF781

【0408】

前増幅の後、前増幅混合物のアリコートをして10mMトリスHCl、0.1mM EDTAで1：10に希釈し、次いで、実施例1に記載したようにトリプレックスQuARTS PCRフラップアッセイでアッセイした。第1群のトリプレックス反応は、マルチプレックスミックス1からの前増幅材料を使用し、第2群の反応は、マルチプレックスミックス2からの前増幅材料を使用した。トリプレックスの組み合わせは次の通りであった：

第1群：

ZF__RASSF1-B3GALT6-BTACT (ZBAトリプレックス)
 BARX1-SLC12A8-BTACT (BSA2トリプレックス)
 PARP15-MAX.chr8.124-BTACT (PMAトリプレックス)
 SHOX2-ZDHHC1-BTACT (SZA2トリプレックス)
 BIN2__Z-SKI-BTACT (BSAトリプレックス)
 DNMT3A-BCL2L11-BTACT (DBAトリプレックス)
 TBX15-FERMT3-BTACT (TFAトリプレックス)
 PRKCB__28-SOBP-BTACT (PSA2トリプレックス)

第2群：

ZF__RASSF1-B3GALT6-BTACT (ZBAトリプレックス)
 MAX.chr8.145-MAX__chr10.226-BTACT (MMA2トリ

10

20

30

40

50

ブレックス)

MAX.chr12.526-FLJ45983-BTACT (MFAトリプレックス)

HOXA9-EMX1-BTACT (HEAトリプレックス)

SP9-DMRTA2-BTACT (SDAトリプレックス)

OPLAH-CYP26C1-BTACT (OCAトリプレックス)

ZNF781-DLX4-BTACT (ZDAトリプレックス)

SUCLG2-KLHDC7B-BTACT (SKAトリプレックス)

S1PR4-NFIX-BTACT (SNAトリプレックス)

各トリプレックスの頭字語は、各遺伝子名の最初の文字を使用する（例えば、HOXA9-EMX1-BTACTの組み合わせ＝「HEA」）。ある頭字語が、マーカーの異なる組み合わせについて、または別の実験から繰り返される場合、その頭字語を有する第2の群は2の数字を含む。上記に挙げたトリプレックスの各メンバーのFRETカセットで使用される色素レポーターは、それぞれFAM-HEX-Quasar670である。

【0409】

標的DNA配列を含むプラスミドを使用して、定量的反応を校正した。各キャリブレーションプラスミドについて、魚DNA希釈剤（10mMトリス-HCl、0.1mM EDTA中20ng/mLの魚DNA）中で1μL当たり10～10⁶コピーの標的鎖を有する10倍キャリブレーション希釈ストックの系列を調製した。トリプレックス反応には、トリプレックスの標的の各々を含むプラスミドを有する混合ストックを使用した。1μL当たり1×10⁵コピーで各プラスミドを有する混合物を調製し、これを使用して1:10希釈系列を作った。未知のサンプル中の鎖は、Cp対Log（プラスミドの鎖）をプロットすることにより生成された標準曲線を使用して逆算した。

【0410】

受信者動作特性（ROC）曲線分析を使用し、各マーカーの曲線下面積（AUC）を算出した。これを、95%包含区間の上限によってソートして下記の表に示す。

【0411】

10

20

30

40

50

【表 16】

表 5

マーカー名	AUC	90%特異性での 感度
CYP26C1	0.940	80%
SOBP	0.929	80%
SHOX2	0.905	73%
SUCLG2	0.905	64%
NFIX	0.895	63%
ZDHHC1	0.890	69%
BIN2_Z	0.872	59%
DLX4	0.856	56%
FLJ45983	0.834	67%
HOXA9	0.824	53%
TBX15	0.813	53%
ACTB	0.803	50%
S1PR4	0.802	55%
SP9	0.782	38%
FERMT3	0.773	36%
ZNF781	0.769	55%
B3GALT6	0.746	39%
BTACT	0.742	44%
BCL2L11	0.732	39%
PARP15	0.673	31%
DNMT3A	0.689	20%
MAX.chr12.526	0.668	33%
MAX.chr10.226	0.671	30%
SLC12A8	0.655	19%
BARX1	0.663	25%
KLHDC7B	0.604	10%
OPLAH	0.571	14%
MAX.chr8.145	0.572	16%
SKI	0.521	14%

【0412】

これらのマーカーは、がん患者のサンプルを正常対象のサンプルから区別するうえで非常に良好に機能した（上記ROCの表を参照のこと）。マーカーを組み合わせて使用すると感度が改善した。例えば、データのロジスティックフィット、ならびにSHOX2、SOBP、ZNF781、BTACT、CYP26C1、及びDLX4のマーカーを使用した6マーカーフィットを使用すると、ROC曲線分析は、0.973の曲線下面積（AUC）を与えた。この6マーカーフィットを使用すると、92.2%の感度が93%の特異性で得られる。SHOX2、SOBP、ZNF781、CYP26C1、SUCLG2、及びSKIを使用した場合、AUCが0.97982のROC曲線が与えられた。

【0413】

実施例 4

第2の独立試験群のアーカイブ血漿を盲検法で検査した。各群の肺癌症例及び対照（明らかに健康な喫煙者）は、年齢及び性別（23症例、80対照）でバランスを取った。実施例1に記載したように、マルチプレックスPCRに続いてQuARTS（Quantitative Allele-Specific Real-time Target and Signal増幅）アッセイを使用し、血漿から抽出されたDNA上のメチル化DNAマーカのバイサルファイト後の数量化を行った。この実験では、実施例3の上位の各メチル化マーカをを検査して、肺癌検出に最適なマーカパネルを同定した（2ml／患者）。

【0414】

結果：13種の高性能メチル化DNAマーカをを検査した（CYP26C1、SOBP、SUGLG2、SHOX2、ZDHHC1、NFIIX、FLJ45983、HOXA9、B3GALT6、ZNF781、SP9、BARX1、及びEMX1）。データは、ロジスティック回帰フィット及び回帰二分木手法の2つの方法を使用して分析した。ロジスティックフィットモデルは、0.96のAUCならびに91%の全体的感度及び90%の特異性を有する4マーカパネル（ZNF781、BARX1、EMX1、及びSOBP）を同定した。回帰二分木手法を使用したデータの分析は、0.96のAUCならびに96%の全体的感度及び94%の特異性を有する4つのマーカ（ZNF781、BARX1、EMX1、及びHOXA9）を同定した。いずれの手法でも、B3GALT6を総DNAインプットの標準化マーカとして使用した。血漿中でアッセイされたメチル化DNAマーカのこれらのパネルは、全てのタイプの肺癌に対して高い感度及び特異性を達成した。

【0415】

実施例5

肺癌の区別

上述の方法を使用すると、特定のタイプの肺癌に関連するメチル化の検出において高い性能を呈するメチル化マーカが選択される。

【0416】

肺癌を有する疑いのある対象について、サンプル、例えば、血漿サンプルが採取され、DNAがサンプルから単離され、例えば、実施例1に記載したようなバイサルファイト試薬で処理される。変換されたDNAは、実施例1に記載したように、マルチプレックスPCRに続いて、異なるメチル化マーカまたはメチル化マーカの組み合わせに対して同定可能な異なるシグナルを提供するよう構成されたQuARTSフラップエンドヌクレアーゼアッセイを使用して分析され、これにより、対象における1つまたは複数の異なるタイプの肺癌（例えば、腺癌、大細胞癌、扁平上皮細胞癌、及び／または小細胞癌）の存在を特異的に同定するよう構成されたデータセットが提供される。好ましい実施形態では、肺癌の存在を示すアッセイ結果の存在または非存在を示し、存在する場合は、1つまたは複数の同定されたタイプの肺癌の存在をさらに示す、レポートが生成される。いくつかの実施形態において、対象由来のサンプルが、ある期間または治療の過程にわたって採取され、アッセイ結果が、がんの病状の変化をモニタリングするために比較される。

【0417】

異なるタイプの肺癌に対する感度を示すマーカ及びマーカパネルは、例えば、存在するがんのタイプ（複数可）の分類、病理混合型の同定、及び／または経時的ながんの進行及び／または治療への応答のモニタリングに利用される。

【0418】

実施例6

実施例1に記載したように、マルチプレックスPCRに続いてQuARTS（Quantitative Allele-Specific Real-time Target and Signal増幅）アッセイを使用し、血漿から抽出されたDNA上のメチル化DNAマーカのバイサルファイト後の数量化を行った。これらのマーカの、標的配列、バイサルファイト変換後の標的配列、及びアッセイオリゴヌクレオチドは、図5に

示す通りであった。各変換標的に使用したプライマー及びフラップオリゴヌクレオチド（プローブ）は、次の通りであった：

【 0 4 1 9 】

【 表 1 7 - 1 】

表 6

マーカー	オリゴ 名	成分	配列 (5' -3')	配列 番号	アーム
BARX1	BARX1_FP	プライマー	CGTTAATTTGTTAGATAGAGGGC G	23	5-FAM

10

【 0 4 2 0 】

20

30

40

50

【表 17-2】

	BARX1_RP ユニバーサル	プライマー	TCCGAACAACCGCCTAC	26	
	BARX1_Pb_A5_63_v6	フラップ オリゴ	AGGCCACGGACG CGAAAAATCCACGC/3C6/	405	
FLJ45983	FLJ45983_F P_v4	プライマー	CGAGGTTATGGAGGTGACG	409	5-FAM
	FLJ45983_RP_v4	プライマー	CGAATACTACCCGTTAAACACG	410	
	FLJ45983_Pb_A5_63_v4	フラップ オリゴ	AGGCCACGGACG GGCGGATTAGTCGCG/3C6/	411	
HOXA9	HOXA9_FP	プライマー	TTGGGTAATTATTACGTGGATTG	148	5-FAM
	HOXA9_RP_v2	プライマー	CAACTCATCCGCGACG	423	
	HOXA9_Pb_A5_63	フラップ オリゴ	AGGCCACGGACG GTCGACGCCCAACAA/3C6/	424	
HOPX	HOPX_214_9_FP	プライマー	GTAGCGCGTAGGGATTATGTCG	417	5-FAM
	HOPX_214_9_RP	プライマー	TTTCCACCTAATCCTCTATAAAAC CGC	418	
	HOPX_214_9_Pb_A5	フラップ オリゴ	AGGCCACGGACG CTCGGATCTCCGC/3C6/	419	
ZNF781	ZNF781_F.primers	プライマー	CGTTTTTTTGTTCGAGTGCG	373	5-FAM
	ZNF781_R.primers	プライマー	TCAATAACTAACTACCGCGTC	374	
	ZNF781_Pb_A5_63_v2	フラップ オリゴ	AGGCCACGGACG GCGGATTTATCGGGTTATAGT/3 C6/	435	
HOXB2	HOXB2_FP	プライマー	GTTAGAAGACGTTTTTCGGGG	153	1-HEX
	HOXB2_RP	プライマー	AAAACAAAAATCGACCGCA	154	
	HOXB2_Pb_A1_63	フラップ オリゴ	CGCGCCGAGG GCGTTAGGATTTATTTTTTTTTT CGA/3C6/	425	
IFFO1	IFFO1_FP_HQ_corrected	プライマー	CGGGATAGAGTCGATTAATTAG GC	428	1-HEX
	IFFO1_RP	プライマー	TAACTTCCCCTCGACCCG	429	
	IFFO1_Pb_A1_63	フラップ オリゴ	CGCGCCGAGG CGGTTGCGGTAGCGG/3C6/	430	
SOBP	SOBP_HM_FP	プライマー	TTTCGGCGGGTTTCGAG	294	1-HEX
	SOBP_HM_RP	プライマー	CGTACCGTTCACGATAACGT	295	
	SOBP_HM_Pb_A1_63	フラップ オリゴ	CGCGCCGAGG TTACAAACCGCGACCG/3C6/	431	

【0421】

【表 17-3】

TRH	TRH_FP	プライマー	TTTCGTTGATTTTATTCGAGTCGTC	432	1-HEX
	TRH_RP	プライマー	GAACCTCTTCAAATAAACCGC	433	
	TRH_Pb_A1_63	フラップオリゴ	CGCGCCGAGG CGTTTGGCGTAGATATAAGC/3C6/	434	
FAM59B	FAM59B_FP_V3	プライマー	GTCGAGCGTTTGGTGCG	406	1-HEX
	FAM59B_RP_V3	プライマー	CTCGTCGAAATCGAAACGC	407	
	FAM59B_Pb_A1_63_V3	フラップオリゴ	CGCGCCGAGG GCGATAGCGTTTTTTATTGTGCG/3C6/	408	

10

*全てのメチル化アッセイは、バイサルファイト変換後のB3GALT6マーカーのアッセイとトリプレックスし、Quasarに報告した：

【0422】

【表 18】

マーカー	オリゴヌクレオチド名	成分	配列(5'-3')	配列番号	
B3GALT6 (BST)	B3GALT6_FP_V2	プライマー	GGTTTATTTTGGTTTTTTTGAGTTTT CGG	386	3-Quasar
	B3GALT6_RP	プライマー	TCCAACCTACTATATTTACGCGAA	387	
	B3GALT6_Pb_A3_63	フラップオリゴ	ACGGACGCGGAG GCGGATTTAGGGTATTTAAGGAG/ 3C6/	436	

20

【0423】

上述のように血漿から調製されたDNAを、実施例1に記載したように、マルチプレックス前増幅反応で増幅した。前増幅の後、前増幅混合物のアリコートをして10mMトリスHCl、0.1mM EDTAで1:10に希釈し、次いで、実施例1に記載したようにトリプレックスQUARTS PCR-フラップアッセイでアッセイした。トリプレックスの組み合わせは次の通りであった：

30

【0424】

【表 19】

トリプレックスアッセイ
BARX1/HOXB2/B3GALT6 (BHB)
FLJ45983/IFFO1/B3GALT6 (FIB)
HOXA9/SOBP/B3GALT6 (HSB)
HOPX 2149/TRH/B3GALT6 (HTB)
ZNF781/FAM59B/B3GALT6 (ZFB)

40

【0425】

標的DNA配列を含むプラスミドを使用して、定量的反応を校正した。各キャリブレーションプラスミドについて、魚DNA希釈剤（10mMトリス-HCl、0.1mM EDTA中20ng/mLの魚DNA）中で1μL当たり10~10⁶コピーの標的鎖を有する

50

10倍キャリブレーション希釈ストックの系列を調製した。トリプレックス反応には、トリプレックスの標的の各々を含むプラスミドを有する混合ストックを使用した。1 μ L 当たり 1×10^5 コピーで各プラスミドを有する混合物を調製し、これを使用して1:10希釈系列を作った。未知のサンプル中の鎖は、Cp対Log（プラスミドの鎖）をプロットすることにより生成された標準曲線を使用して逆算した。

【0426】

B3GALT6鎖に対するメチル化%を使用した受信者動作特性（ROC）曲線分析を使用し、各マーカーの曲線下面積（AUC）を算出した。これを下記の表に示す。

【0427】

【表20】

マーカー名	AUC
BARX1	0.754
FLJ45983	0.709
HOXA9	0.800
HOPX	0.654
ZNF781	0.760
HOXB2	0.700
IFFO1	0.788
SOBP	0.717
FAM59B	0.685

10

20

【0428】

BARX1、FLJ45983、SOBP、HOPX、IFFO1、及びZNF781のマーカーを使用した6マーカーロジスティックフィットを使用すると、ROC曲線分析は、0.85881の曲線下面積（AUC）を示す。マーカーを組み合わせて使用すると、単一のマーカーと比較して感度が改善した。

【0429】

実施例7

肺癌検出感度を改善する、mRNA及びメチル化マーカーの組み合わせ

FPR1 mRNA（ホルミルペプチド受容体1）の発現レベルは、血液中で検出可能な肺癌マーカーであることが以前に示されている（Morris, S., et al., Int J Cancer., (2018) 142:2355-2362）。いくつかの実施形態において、上述のメチル化マーカーアッセイは、1つまたは複数の発現マーカーの測定と組み合わせて使用される。例示的な複合アッセイは、1つのサンプルまたは同じ対象由来の複数のサンプルにおける、FPR1 mRNAレベルの測定及びメチル化マーカーDNA（複数可）の検出（例えば、実施例1～6に記載の通り）を含む。

【0430】

FPR1配列（NM_001193306.1 Homo sapiensホルミルペプチド受容体1（FPR1）、転写物バリエーション1のmRNAは、配列番号437に示されている。前掲のMorrisらによって説明されているように、血液サンプルを、後のRNA検出に好適な採血チューブ（例えば、PAXgene Blood RNA Tube; Qiagen, Inc.）に採取する。サンプルは直ちにアッセイしても、将来の分析まで凍結してもよい。RNAは、標準的な方法、例えば、Qiasymphony PAXgene blood RNAキットにより、サンプルから抽出される。RNA、例えば、mRNAマーカーのレベルは、サンプル中に存在する特定のRNAの測定に好適なアッセイ、例えば、RT-PCRを使用して判定される。いくつかの実施形態において、逆転写ステップを含むQuARTSフラップエンドヌクレアーゼアッセイ反応が使用される。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第15/587,806

30

40

50

号を参照のこと。好ましい実施形態において、RT-PCRまたはRT-QuARTSアッセイのためのアッセイプローブ及び／またはプライマーは、アッセイが対応するゲノム遺伝子座を検出するのではなくmRNA標的を特異的に検出するように、エクソンジャンクション（複数可）にまたがるように設計される。

【0431】

例示的なRT-QuARTS反応物は、20UのMMLV逆転写酵素（MMLV-RT）、219ngのCleavase（登録商標）2.0、1.5UのGoTaq（登録商標）DNAポリメラーゼ、200nMの各プライマー、各500nMのプローブ及びFRETオリゴヌクレオチド、10mMのMOPSバッファー、pH7.5、7.5mMのMgCl₂、ならびに250μMの各dNTPを含む。反応は、典型的に、リアルタイムで（例えば、連続的に、またはいくつかもしくは全てのサイクルで同じ時点で）蛍光データを収集するよう構成されたサーマルサイクラーでランする。例えば、Roche LightCycler 480システムが、次の条件下で使用され得る：42℃で30分間（RT反応）、95℃で3分間、95℃で20秒間、63℃で30秒間、70℃で30秒間の10サイクル、続いて95℃で20秒間、53℃で1分間、70℃で30秒間の35サイクル、及び40℃で30秒間保持。

【0432】

いくつかの実施形態において、RT-QuARTSアッセイは、実施例1で上述したように、マルチプレックス前増幅、例えば、サンプル中の2、5、10、12、またはそれ以上の標的（すなわち1つの標的よりも多くの任意の数の標的）を前増幅させるステップを含み得る。好ましい実施形態において、RT-前増幅は、例えば、20UのMMLV逆転写酵素、1.5UのGoTaq（登録商標）DNAポリメラーゼ、10mMのMOPSバッファー、pH7.5、7.5mMのMgCl₂、250μMの各dNTP、及びオリゴヌクレオチドプライマー（例えば、12種の標的に対して、等モル量（例えば、各プライマー200nM）、または異なる標的の増幅効率のバランスを取るよう調整された個々のプライマー濃度の、12種のプライマーペア／24種のプライマー）を含む反応混合物中で行う。サーマルサイクリング時間及び温度は、反応物及び増幅容器の容量に適切となるよう選択する。例えば、反応物は、次のようなサイクルにかけられ得る：

【0433】

【表21】

ステージ	温度／時間	サイクル数
RT	42℃/30分	1
	95℃/3分	1
増幅1	95℃/20秒	10
	63℃/30秒	
	70℃/30秒	
冷却	4℃/保持	1

【0434】

サーマルサイクリング後、前増幅反応物のアリコート（例えば、10μL）を、魚DNAありまたはなしで、10mMトリス、0.1mMEDTAで500μLに希釈する。希釈した前増幅DNAのアリコート（例えば、10μL）を、上述のようなQuARTS PCR-フラップアッセイで使用する。

【0435】

いくつかの実施形態において、DNA標的、例えば、メチル化DNAマーカー遺伝子、変異マーカー遺伝子、及び／またはRNAマーカーに対応する遺伝子などが、例えば、上

記の実施例 1 で説明したように、Q u A R T S アッセイ反応において逆転写された c D N A と共に増幅及び検出され得る。いくつかの実施形態において、D N A 及び c D N A は、単一チューブ反応において、すなわち、試薬の混合と出力データの収集との間のいかなる時点でも反応容器を開ける必要なしに、同時増幅及び検出される。他の実施形態では、同じサンプル由来または異なるサンプル由来のマーカー D N A は、バイサルファイト変換ステップありまたはなしで、別々に単離され得、R T - Q u A R T S アッセイにおいてサンプル R N A と組み合わせられ得る。さらに他の実施形態において、R N A 及び／または D N A サンプルは、上述のように前増幅され得る。

【0436】

M o r r i s では、ハウスキーピング遺伝子 (H N R N P A 1) に対する F P R 1 m R N A 比の R O C 曲線分析により、89%の特異性で68%の感度がもたらされ、メチル化マーカー B A R X 1、F A M 5 9 B、H O X A 9、S O B P、及び I F F O 1 を使用した R O C 曲線分析では、92.3%の特異性で77.2%の感度がもたらされる。これらのアッセイを一緒に使用すると、82%の特異性で92.7%の理論感度がもたらされる。

【0437】

この分析は、1つまたは複数のメチル化マーカーの検出と合わせた、F P R 1 m R N A のレベルの複合アッセイにより、いずれかの方法単独と比較して改善された感度を有するアッセイがもたらされることを示す。異なるクラスのマーカーを組み合わせるがん検出アッセイは、初期ステージと後期ステージとの間の生物学的差異ならびにがんの異なる生物学的応答または原因を検出することができるという利点を有する。当業者には明らかであるが、F P R 1 以外に、または F P R 1 に加えて、L u n X m R N A (Y u , e t a l . , 2014, C h i n J C a n c e r R e s . , 26:89-94) などの m R N A 標的を含む、他の R N A 標的をメチル化マーカーと組み合わせ、感度を向上させることができる。

【0438】

実施例 8

肺癌検出感度を改善する、m R N A マーカー及び D N A マーカーの組み合わせの R T - L Q A S アッセイ

R N A については、R N A アッセイのための P A X g e n e B l o o d R N A チューブ、及び D N A アッセイのための B D V a c u t a i n e r P P T 血漿調製チューブ (B D B i o s c i e n c e s) に血液を採取し、製造元の説明に従ってサンプルを保存した。Q I A s y m p h o n y P A X g e n e B l o o d R N A K i t (I D : 762635) を製造元の説明に従って使用し、Q i a g e n Q I A s y m p h o n y 計器で R N A サンプルを抽出した。R T - L Q A S での検査の前に、R N A サンプルを 10mM トリス H C l、p H 8.0、0.1mM E D T A で 1:50 に希釈した。D N A は実施例 1 に記載したように抽出した。サンプルは次の通りであった：

R N A 試験：

肺癌を有する対象由来の 155 サンプル

健康な正常対象由来の 317 サンプル

D N A 試験：

肺癌を有する対象由来の 102 サンプル

健康な正常対象由来の 142 サンプル

プライマー及びプローブは、下記の表 3 に示すように、8つの m R N A と 3つの参照遺伝子の組み合わせを検出するように設計した。

【0439】

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 1】

表 3

シンボル	名称	機能
FPR1	ホルミルペプチド受容体 1 受入番号: NM_001193306	タンパク質は宿主の防御及び炎症において重要である
S100A12	S100 カルシウム結合タンパク質 A12 受入番号: NM_005621	炎症プロセス及び免疫応答の調節に関与する
TYMP	チミジンホスホリラーゼ 受入番号: NM_001113755	in vivo で血管新生を促進する
APOBEC3A	アポリポタンパク質 B mRNA 編集酵素触媒サブユニット 3A 受入番号: NM_145699	活発な DNA 脱メチル化のプロセスを介して遺伝子発現のエピジェネティックな調節に関与し得る
MMP9	マトリックスメタロペプチダーゼ 9 受入番号: NM_004994	細胞外マトリックスの局所的なタンパク質分解及び白血球の遊走において不可欠な役割を果たし得る
SELL	セレクチン L 受入番号: NM_000655	内皮細胞への白血球の結合及びその後のローリングに必要であり、それらの二次リンパ器官及び炎症部位への遊走を促進する

10

20

【 0 4 4 0 】

30

40

50

【表 2 2 - 2】

S100A9	S100 カルシウム結合タンパク質 A9 受入番号: NM_002965	炎症プロセス及び免疫応答 の調節に関与する
PADI4	ペプチジルアルギニンデアミナー ゼ 4 受入番号: NM_012387	顆粒球及びマクロファージ の発生に関与して炎症及び 免疫応答をもたらす得る
参照遺伝子	名称	機能
CASC3	CASC3 エクソンジャンクション複 合体サブユニット 受入番号: NM_007359	タンパク質はエクソンジャ ンクション複合体(EJC)の主 な成分である
SKP1	S 期キナーゼ関連タンパク質 受入番号: NM_006930	SCF (SKP1-CUL1-F-box タ ンパク質)ユビキチンリガー ゼ複合体の成分
STK4	セリン/トレオニンキナーゼ 4 受入番号: NM_006282	ストレス活性化アポトーシ ス促進性キナーゼ
HNRNPA1	異種核リボヌクレオタンパク質 A1 受入番号: NM_002136	RNA 結合タンパク質

10

20

【0 4 4 1】

上記に挙げた標的核酸のプライマー及びフラップオリゴヌクレオチドプローブを図 6 に示す。RT-LQAS アッセイは、上記の実施例 1 で説明したように行った。分析では、次のように算出した %RNA レベルを使用した：

- RT-LQAS 及びキャリブレーション用の合成 RNA 標的を使用して mRNA レベルの鎖の値を算出する；
- 3 つの参照遺伝子（CASC3、SKP1、STK4）の鎖レベルを平均する；
- 測定されたマーカーの mRNA 鎖を 3 つの参照遺伝子の鎖の平均で割る；
- %RNA の ROC 分析を行う

30

これらの RNA マーカーを個別に使用し、受信者動作特性（ROC）曲線分析を使用して分析した LQAS アッセイの性能、各 RNA マーカーの曲線下面積（AUC）を算出した。これを下記にまとめる：

【0 4 4 2】

40

50

【表 2 3】

RNA マーカー	AUC	90%特異性での感度
S100A9	0.76286	45.80%
SELL	0.72854	43.90%
PADI4	0.81801	57.40%
APOBE3CA	0.72034	38.10%
S100A12	0.76801	50.10%
MMP9	0.76518	49.70%
FPR1	0.66952	27.10%
TYMP	0.54448	16.80%

10

【0 4 4 3】

肺癌を有する対象由来の102サンプル及び健康な正常対象由来の142サンプルを使用し、RNAとメチル化DNAの両方の分析を行った。高性能のmRNAマーカーペアPADI4及びSELLを使用すると、組み合わせたRNAマーカーのロジスティックフィットは、曲線下面積が0.85626であり、90%の特異性で63.7%の感度を示した。高性能のDNAメチル化マーカーペアHOXA9及びIFFO1を使用すると、組み合わせたDNAメチル化アッセイのロジスティックフィットは、曲線下面積が0.091677であり、90%の特異性で78.4%の感度を示した。これらのmRNAマーカー及びDNAメチル化マーカーの結果の組み合わせは、0.95070の曲線下面積をもたらし、90%の特異性で90.2%の感度を示した。

20

【0 4 4 4】

実施例 9

肺癌検出感度を改善する、タンパク質（例えば、自己抗体）及びメチル化マーカーの組み合わせ

肺腫瘍及び他の固形腫瘍における腫瘍関連抗原は、自己抗体の形態で液性免疫応答を誘発する場合があります、これらの抗体は、疾患過程の非常に早い段階、例えば、症状の発現前に存在することが観察されている（あらゆる目的で参照により全体として本明細書に組み込まれる、Chapman CJ, Murray A, McElveen JE, et al. Thorax 2008; 63: 228-233を参照のこと）。しかしながら、肺癌を検出するための自己抗体の検出感度は比較的低い。例えば、腫瘍抗原NY-ESO-1（受入番号P78358、配列番号442として示される配列；CTAG1Bとしても知られている）に対する自己抗体は、非小細胞肺癌（NSCLC；Chapman、前掲）の良好なマーカーであることが文献で示されているが、単独で有用であるほど十分な感度はない。1つまたは複数の腫瘍関連自己抗体の検出を、1つまたは複数のメチル化マーカーの検出と組み合わせると、より感度の高いアッセイがもたらされる。

30

【0 4 4 5】

血液サンプルを採取し、前掲のChapmanによって説明されているように、標準的な方法、例えば、ELISA検出を使用して、自己抗体を検出する。サンプルから単離されたDNA中のメチル化及び／または変異マーカーの検出は、上記の実施例1で説明したように行う。

40

【0 4 4 6】

NY-ESO-1自己抗体のみの検出は、95%の特異性で40%の感度をもたらす（Tureci, et al., Cancer Letters 236(1): 64 (2006)。上述のように、BARX1、FAM59B、HOXA9、SOBP、及びIFFO1マーカーの組み合わせのメチル化をアッセイすると、92.3%の特異性で77.2%の感度がもたらされる。この自己抗体マーカーの分析を、メチル化マーカーのこの組み合わせのアッセイと組み合わせると、87.7%の特異性で、86.3%の複合理

50

論感度がもたらされる。

【0447】

この分析は、自己抗体のレベルと1つまたは複数のメチル化マーカーの分析との複合アッセイにより、いずれかの方法単独と比較して改善された感度を有するアッセイが得られることを示す。異なるクラスのマーカーを組み合わせるがん検出アッセイは、初期ステージと後期ステージとの間の生物学的差異ならびにがんの異なる生物学的応答または原因を検出することができるという利点を有する。

【0448】

実施例10

肺癌検出感度を改善する、mRNA、メチル化マーカー（複数可）、及びタンパク質（例えば、自己抗体）の組み合わせ

対象における肺癌及び他のがんの検出を向上させるために、対象由来の1つサンプルまたは複数のサンプル中の、1つまたは複数のRNA、マーカーDNA、及び自己抗体の組み合わせの分析を行うことができる。サンプル調製ならびにDNA、RNA、及びタンパク質検出の方法は、上述の通りである。

【0449】

実施例7で記述したように、Morrisらによって報告されているハウスキーピング遺伝子（HNRNPA1）に対するFPR1 mRNA比の分析では、89%の特異性で68%の感度がもたらされ（Morris、前掲）、Chapmanにより報告されているNY-ESO-1自己抗体のみの検出では、95%の特異性で40%の感度がもたらされ、BARX1、FAM59B、HOXA9、SOBP、及びIFFO1マーカーの組み合わせのメチル化をアッセイすると、92.3%の特異性で77.2%の感度がもたらされた。mRNA、自己抗体マーカーの分析、及びメチル化マーカーのこの組み合わせのアッセイを組み合わせると、77.9%の特異性で95.6%の複合理論感度がもたらされ、このことは、mRNAのレベル及び自己抗体のレベルと1つまたは複数のメチル化マーカーの分析との複合アッセイにより、これらの方法のいずれか1つ単独と比較して改善した感度を有するアッセイがもたらされることを示している。

【0450】

上述のようなアッセイは、1つまたは複数の抗原を検出するアッセイの追加によってさらに向上し得る。当業者であれば、抗原の検出を、RNA（複数可）、メチル化マーカー遺伝子（複数可）、及び／または自己抗体（複数可）のいずれかの検出に、個々にまたは任意の組み合わせで追加してもよく、これにより全体的感度がさらに向上することを理解するであろう。

【0451】

実施例11

異なるステージのがんを有する対象由来のサンプルにおけるRNA発現

ステージI、ステージII、ステージIII、及びステージIVの非小細胞肺癌（「NSCLC」）を有することが分かっている患者から血液サンプルを採取した。比較のために、非喫煙者とタバコ喫煙者の両方で、既知の肺癌がないヒト（「無がん」と推定される個体）からも血液サンプルを採取した。既知の肺癌がないヒトでも、実際には別の未検出のがんを有し得る可能性がいくらかあった。これらの患者の存在は、この検査の偽陽性率の過大評価につながる（「健康な個体」からの「偽陽性」は、実際には、これらの個体におけるがんの存在を表し得るため）。血液サンプルをPAXgene Blood RNA Tubeに採取し、サンプルの劣化を最小限に抑えるよう、室温または氷上で検査施設に搬送した。サンプルが検査施設で受領された後、各血液サンプルから白血球RNAがQIAamp（登録商標）RNA Blood Mini Kitで抽出された。

【0452】

RNAが抽出された後、IlluminaのTruSeq Stranded Total RNA Library Prep Human/Mouse/Ratプロトコルを使用して、各血液サンプルのRNAからcDNAライブラリーを調製した。次に、各

10

20

30

40

50

血液サンプルの cDNA ライブラリーを Illumina NextSeq 550 System でシーケンシングして、全トランスクリプトームをプロファイリングし、各遺伝子の RNA 発現レベルを得た。以下の結果が得られた。

【0453】

図7～10を参照すると、白血球RNAの全トランスクリプトーム分析から、健康な個体と肺癌患者との間で有意な遺伝子発現の変化を示した標的遺伝子が同定された。遺伝子発現の変化は、おそらく、患者の腫瘍に対する免疫細胞の免疫応答を反映するものであった。これらの結果は、少なくとも本開示の標的遺伝子のRNA発現レベルを測定することで、ヒトにおける肺癌の存在を予測できることを示した。

【0454】

図7のパネルCに示されるように、各データ点は、個体の血液サンプルにおける標的遺伝子FPR1 (y軸)のRNA発現レベルを表すものであった。x軸は、健康な非喫煙者、健康なタバコ喫煙者、及びステージI～IVのNSCLC患者に個体を群分けしたものである。健康な個体と比較して、ステージI～IIIのNSCLCは、FPR1遺伝子発現レベルの有意な増加を伴った。さらに、FPR1遺伝子発現は、正常なタバコ喫煙者ではわずかに増加していた。

【0455】

図7のパネルA及びBには、訓練セットとして割り当てられたデータの部分と、検証セットとして割り当てられたデータの部分との受信者動作特性(ROC)曲線を示した。選択された各RNA発現閾値レベル(パネルCのy値の切片)において、真陽性率及び偽陽性率を算出した。特定の状態を有するものとして正しく同定されたNSCLC患者のパーセンテージが真陽性率(感度)を定義し、NSCLCを有しないものとして正しく同定された健康なヒトのパーセンテージが特異性を定義した。偽陽性率は(1-特異性)として定義された。ランダムな推測では、ROC曲線は対角線になり、曲線下面積(AUC)は0.5になる。検証セットのAUCは0.82であり、これにより、FPR1遺伝子発現がNSCLCリスクを予測することが実証された。

【0456】

同様に、図8のパネルCにおいて、各データ点は、個体の白血球サンプルにおける標的遺伝子S100A12 (y軸)のRNA発現レベルを表すものであった。x軸は、健康な非喫煙者、健康なタバコ喫煙者、及びステージI～IVのNSCLC患者に個体を群分けしたものである。健康な個体と比較して、ステージI～IIIのNSCLCは、S100A12遺伝子発現レベルの有意な増加を伴った。図8のパネルA及びBには、訓練セットとして割り当てられたデータの部分と、検証セットとして割り当てられたデータの部分とのROC曲線を示した。検証セットのAUCは0.93であり、これにより、S100A12遺伝子発現がNSCLCリスクを予測し、FPR1を標的遺伝子として使用するよりも著しく良好であったことが実証された。

【0457】

図9のパネルCにおいて、各データ点は、個体の白血球サンプルにおける標的遺伝子MMP9 (y軸)のRNA発現レベルを表すものであった。x軸は、健康な非喫煙者、健康なタバコ喫煙者、及びステージI～IVのNSCLC患者に個体を群分けしたものである。健康な個体と比較して、ステージI～IIIのNSCLCは、MMP9遺伝子発現レベルの有意な増加を伴った。さらに、MMP9遺伝子発現は、タバコ喫煙者ではわずかに増加していた。図9のパネルA及びBには、訓練セットとして割り当てられたデータの部分と、検証セットとして割り当てられたデータの部分とのROC曲線を示した。検証セットのAUCは0.93であり、これにより、MMP9遺伝子発現がNSCLCリスクを予測し、また、FPR1を標的遺伝子として使用するよりも著しく良好であったことが実証された。

【0458】

図10のパネルCにおいて、各データ点は、個体の白血球サンプルにおける標的遺伝子SAT1 (y軸)のRNA発現レベルを表すものであった。x軸は、健康な非喫煙者、健

10

20

30

40

50

康なタバコ喫煙者、及びステージⅠ～ⅣのNSCLC患者に個体を群分けしたものである。健康な個体と比較して、ステージⅠ～ⅢのNSCLCは、SAT1遺伝子発現レベルの有意な増加を伴った。図10のパネルA及びBには、訓練セットとして割り当てられたデータの部分と、検証セットとして割り当てられたデータの部分とのROC曲線を示した。検証セットのAUCは0.79であり、これにより、SAT1遺伝子発現がNSCLCリスクを予測したことが実証された。

【0459】

これらの実験結果は、本開示の標的遺伝子のRNA発現レベルを検出することで、ヒトにおける肺癌の存在を予測できたことを示した。

【0460】

実施例12

RNA発現レベルと参照遺伝子からの発現との比較

図11～13は、標的遺伝子のRNA発現レベルを参照遺伝子と比較することで、ヒトにおける肺癌の存在のより良好な予測が可能になり得ることを示す。

【0461】

図11のパネルAに示すように、各データ点は、1)健康である、2)良性肺腫瘍を有する、または3)肺癌と診断された個体から採取された白血球サンプルを表す。x軸(FPR1 FPKM)は、裸のFPR1発現レベルの断片の100万当たりのキロベース当たりの正規化を表す。y軸(FPR1比)は、FPR1発現レベルの参照遺伝子STK4発現レベルに対する比を表す。図11のパネルBに示すように、FPR1比についてROC分析を行ったところ、AUCは0.89であることが分かり、これは、FPR1発現のみを使用した場合の予測力を改善した(図7)。

【0462】

図12のパネルAに示すように、各データ点は、1)健康である、2)良性肺腫瘍を有する、または3)肺癌と診断された個体由来の白血球サンプルを表す。x軸(S100A12 FPKM)は、裸のS100A12発現レベルの断片の100万当たりのキロベース当たりの正規化を表す。y軸(S100A12比)は、S100A12発現レベルの参照遺伝子STK4発現レベルに対する比を表すものであった。図12のパネルBに示すように、S100A12比についてROC分析を行ったところ、AUCは0.94であり、これは、S100A12発現のみを使用した場合の予測力を改善した(図8)。

【0463】

図13のパネルAに示すように、各データ点は、健康である、良性肺腫瘍を有する、または肺癌を有する個体由来の白血球サンプルを表す。x軸(MMP9 FPKM)は、裸のMMP9発現レベルの断片の100万当たりのキロベース当たりの正規化を表す。y軸(MMP9比)は、MMP9発現レベルの参照遺伝子STK4発現レベルに対する比を表すものであった。図13のパネルBに示すように、MMP9比についてROC分析を行ったところ、AUCは0.94であり、これは、MMP9発現のみを使用した場合の予測力を改善した(図9)。

【0464】

これらの実験結果は、本開示の参照遺伝子と標的遺伝子のRNA発現レベルを比較することで、ヒトにおける肺癌の存在の予測が向上したことを示した。

【0465】

実施例13

マーカー遺伝子の組み合わせからのRNA発現レベル

図14～16は、2つの標的遺伝子のRNA発現レベルを一緒に使用することで、ヒトにおける肺癌の存在を予測できたことを示す。

【0466】

図14では、実施例12からの2つの最も予測的な標的遺伝子、例えば、S100A12及びMMP9のデータを使用して、二項分類器(破線で表される)を学習した。S100A12はY軸上にあり、MMP9はX軸上にある。示されているデータは、FPKM正

10

20

30

40

50

規化されている。各データ点は、1) 健康な非喫煙者、2) 健康なタバコ喫煙者、3) ステージⅠのNSCLCを有する、4) ステージⅡのNSCLCを有する、5) ステージⅢのNSCLCを有する、または6) ステージⅣのNSCLCを有する個体由来の血液サンプルを表す。分類器は、ステージⅠのNSCLCに対して0.87の感度、ステージⅡ～ⅢのNSCLCに対して0.88の感度、及び0.9の特異性を有していた。これは、S100A12及びMMP9の遺伝子発現データを組み合わせることで、肺癌リスクの良好な予測力がもたらされたことを実証する。

【0467】

代替的に、図15は、S100A12及びSAT1の遺伝子発現データを使用し、図16は、S100A12及びTYMPの遺伝子発現データを使用した。各データ点は、1) 健康である、2) 良性肺腫瘍を有する、または3) 肺癌と診断された個体由来の血液サンプルを表す。図15は、群間の距離を最大化するよう選択された遺伝子を示す。これにより、データに対する検出エラー及び分析前の変数の影響が最小限に抑えられる。図16は、S100A12に直交するマーカーを見出そうと試みるものである。TYMPは、良性結節をがんと区別するのに非常に良好であり、つまり、CTスキャンにおいて発見される結節の良好な反射検査の一部として使用され得ることが見出された。

【0468】

特許、特許出願、記事、書籍、論文、及びインターネットウェブページを含むがこれらに限定されない、本出願において引用される全ての文献及び同様の資料は、参照により全体としてあらゆる目的のために明示的に組み込まれる。特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術的用語及び科学的用語は、本明細書に記載される様々な実施形態が属する技術分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。組み込まれた参考文献における用語の定義が、本発明の教示において提供される定義と異なると思われる場合、本発明の教示において提供される定義が優先するものとする。

【0469】

本発明の特定の実施形態を説明してきたが、これらの実施形態は、単なる例として提示したものであり、本開示の範囲を限定することを意図するものではない。実際、本明細書に記載される新規の方法及びシステムは、他の多様な形態で具体化することができる。さらに、記載された組成物、方法、システム、及び本技術の使用の様々な改変、省略、置換、及び変形は、記載された技術の範囲及び精神から逸脱することなく、当業者には明らかになるであろう。本技術を特定の例示的な実施形態との関連で説明してきたが、特許請求される本発明は、このような特定の実施形態に不当に限定されてはならないことを理解されたい。実際、薬理学、生化学、医学、または関連分野の当業者に明らかである、本発明を実施するための態様の記述に対する様々な改変は、以下の特許請求の範囲に含まれるよう意図される。添付のクレーム及びそれらの均等物は、本開示の範囲及び精神に入るような形態または改変をカバーすることを意図している。したがって、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲を参照することによってのみ定義される。

【0470】

本開示の範囲は、本明細書中の本セクションまたは他の箇所における好ましい実施形態の特定の開示によって限定されることを意図せず、本明細書中の本セクションもしくは他の箇所において提示される、または将来提示されるクレームによって定義され得る。特許請求の範囲中の文言は、特許請求の範囲で用いられる文言に基づいて広く解釈されるべきであり、本明細書または本出願の出願手続き中に説明される例に限定されない。これらの例は、非排他的であると解釈されるべきである。

【0471】

特定の態様、実施形態、または例に関連して説明された特徴、材料、特性、または群は、適合性がない場合を除き、本明細書中の本セクションまたは他の箇所に記載された任意の他の態様、実施形態、または例に適用可能であると理解されるべきである。本明細書（あらゆる添付のクレーム、要約及び図面を含む）で開示された特徴の全て、及び／またはそのように開示された任意の方法もしくはプロセスのステップの全ては、かかる特徴及び

／またはステップの少なくともいくつかが相互排他的である組み合わせを除き、任意の組み合わせで組み合わせることができる。保護対象は、いずれかの前述の実施形態の詳細に制限されない。保護対象は、本明細書（あらゆる添付のクレーム、要約及び図面を含む）において開示された特徴のうちのあらゆる新規の1つもしくははあらゆる新規の組み合わせ、またはそのように開示された任意の方法もしくははプロセスのステップのうちのあらゆる新規の1つもしくははあらゆる新規の組み合わせに及ぶ。

【0472】

さらに、別個の実施態様の文脈で本開示に記載される特定の特徴は、単一の実施態様で組み合わせて実現してもよい。逆に、単一の実施態様の文脈で記載される様々な特徴を、複数の実施態様で別々に、または任意の好適な部分的組み合わせで実現することもできる。さらに、複数の特徴は特定の組み合わせにおいて作用すると上述されている場合があるが、特許請求される組み合わせにおける1つまたは複数の特徴は、場合によっては、その組み合わせから切り離してもよく、この組み合わせは、部分的組み合わせまたは部分的組み合わせの変形として特許請求され得る。

【0473】

さらに、工程が特定の順序で図面に示されるまたは明細書に記載される場合があるが、望ましい結果を達成するために、このような工程が、示された特定の順序または連続した順序で行われる必要もなければ、全ての工程が行われる必要もない。図示または説明されていない他の工程を、例示的な方法及びプロセスに組み込んでもよい。例えば、1つまたは複数の追加の工程を、記載された任意の工程の前に、後に、それと同時に、またはそれらの間に行ってもよい。さらに、他の実施態様では、工程を再整理したり並べ替えたりしてもよい。当業者には、いくつかの実施形態において、例示及び／または開示されるプロセスで行われる実際のステップが、図に示されたものと異なり得ることが理解されよう。実施形態に応じて、上述の特定のステップを削除することができ、他のステップを追加することができる。さらに、上記で開示された特定の実施形態の特徴及び属性を、異なるかたちで組み合わせ、追加の実施形態を形成してもよく、それらは全て、本開示の範囲内に入る。また、上述の実施態様における様々なシステム構成要素の分離は、全ての実施態様においてそのような分離を必要とするものとして理解されるべきではなく、記載された構成要素及びシステムが、概して、単一の製品と一緒に統合され得ること、または複数の製品にパッケージ化され得ることが理解されるべきである。例えば、エネルギー貯蔵システムを形成するために、本明細書に記載されるエネルギー貯蔵システムの構成要素のいずれかを、別々に提供することも、または一緒に統合する（例えば、一緒にパッケージ化する、または一緒に取り付ける）こともできる。

【0474】

本開示の目的のために、特定の態様、利点、及び新規の特徴が本明細書に記載されている。必ずしも、そのような利点の全てが、いずれかの特定の実施形態に従って達成され得るとは限らない。よって、例えば、本明細書で教示または示唆され得る他の利点を必ずしも達成するとは限らないが、本明細書で教示される1つの利点または一群の利点を達成する様式で、本開示が具体化または実施され得ることが、当業者には認識されるであろう。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1 - 1】

参照番号	染色体	開始位置	停止位置	平均B Cマウント	平均正逆相	平均大逆相	平均小逆相	平均上度	平均未定逆相	Norm/BC	A/B/C	LC/BC	SC/BC	SO/BC	UN/BC
AC1	10	8409298	8409299	0%	1%	1%	1%	2%	0%	1.31	42.51	39.95	44.51	15.74	54.97
AC2	2	7214720	7214720	1%	3%	3%	24%	50%	28%	1.25	23.10	30.83	54.70	30.96	84.51
AC3	20	3743550	3743581	1%	1%	21%	6%	9%	8%	1.55	33.32	9.43	7.37	15.07	12.89
AC4	19	378937	378923	0%	1%	19%	20%	5%	95%	4.69	66.90	69.62	19.25	26.13	195.13
AC5	2	7472654	7472657	1%	4%	38%	41%	68%	31%	49%	3.10	27.46	34.21	49.28	23.18
AC6	12	26058015	26058162	0%	1%	10%	18%	25%	10%	35%	1.51	27.62	50.51	68.55	27.10
AC7	12	5240959	52401020	1%	1%	12%	19%	3%	1%	1.59	24.05	36.73	5.60	2.56	36.75
AC8	1	156863477	156863554	1%	3%	24%	18%	32%	14%	2.42	20.38	15.99	26.82	11.70	10.87
AC9	8	145108333	145108339	0%	2%	24%	25%	9%	25%	4.89	59.66	71.50	22.47	67.77	65.19
AC10	7	27135674	27135679	0%	0%	10%	10%	7%	1%	1.74	44.26	42.10	29.73	4.44	172.75
AC11	7	27135672	27135623	0%	0%	15%	21%	7%	2%	4.72	91.85	132.84	43.76	10.27	270.85
AC12	6	145108742	145108927	0%	2%	20%	34%	10%	21%	5.40	61.70	106.02	37.02	66.54	45.20
AC13	11	830323	830362	0%	1%	19%	9%	7%	1%	3.96	60.14	31.27	24.44	3.55	5.93
AC14	3	124860573	124860665	0%	1%	12%	34%	12%	3%	1.55	26.73	84.15	28.68	91.45	97.00
AC15	2	87183509	87183539	1%	1%	14%	7%	15%	13%	2.04	26.57	14.00	39.21	23.54	26.84
AC16	1	6791423	6791507	0%	1%	14%	20%	7%	0%	4.95	46.31	57.89	20.10	17.71	151.74
AC17	1	698477	698584	1%	1%	22%	22%	2%	12%	2.07	40.71	35.39	3.60	18.61	15.35
AC18	14	101033520	101033520	0%	2%	18%	7%	40%	5%	4.29	38.37	14.15	82.74	10.45	28.35
AC19	17	27462359	27467467	0%	0%	10%	7%	28%	4%	2.69	61.89	42.49	170.64	26.04	31.95
AC20	8	145105570	145105675	1%	3%	30%	26%	9%	23%	3.15	23.77	25.41	9.23	26.54	22.59
AC21	9	86137543	86137628	1%	1%	13%	9%	3%	7%	1.79	24.24	16.71	5.68	13.54	22.99

【図 1 - 2】

(続)

参照番号	染色体	開始位置	停止位置	平均B Cマウント	平均正逆相	平均大逆相	平均小逆相	平均上度	平均未定逆相	Norm/BC	A/B/C	LC/BC	SC/BC	SO/BC	UN/BC
AC1	10	20021	NN_0020335	1%	1%	14%	7%	15%	13%	2.04	26.57	14.00	39.21	23.54	26.84
AC2	2	7214720	NN_001172735.NM_015468	1%	3%	24%	18%	32%	14%	2.42	20.38	15.99	26.82	11.70	10.87
AC3	20	3743550	NN_001172735.NM_015468	1%	1%	21%	6%	9%	8%	1.55	33.32	9.43	7.37	15.07	12.89
AC4	19	378937	NN_0023778.NM_139355.NM_1393	0%	1%	19%	20%	5%	95%	4.69	66.90	69.62	19.25	26.13	195.13
AC5	2	7472654	NN_001176002.NM_005504.NM_005504.NM_001176009.NM_001176009	1%	4%	38%	41%	68%	31%	49%	3.10	27.46	34.21	49.28	23.18
AC6	12	26058015	NN_001194463.NM_024428	0%	1%	10%	18%	25%	10%	35%	1.51	27.62	50.51	68.55	27.10
AC7	12	5240959	NN_001194463.NM_024428	1%	1%	12%	19%	3%	1%	1.59	24.05	36.73	5.60	2.56	36.75
AC8	1	156863477	NN_001194463.NM_024428	1%	3%	24%	18%	32%	14%	2.42	20.38	15.99	26.82	11.70	10.87
AC9	8	145108333	NN_001194463.NM_024428	0%	2%	20%	34%	10%	21%	5.40	61.70	106.02	37.02	66.54	45.20
AC10	7	27135674	NN_001194463.NM_024428	0%	0%	15%	21%	7%	2%	4.72	91.85	132.84	43.76	10.27	270.85
AC11	7	27135672	NN_001194463.NM_024428	0%	0%	15%	21%	7%	2%	4.72	91.85	132.84	43.76	10.27	270.85
AC12	6	145108742	NN_001194463.NM_024428	0%	2%	20%	34%	10%	21%	5.40	61.70	106.02	37.02	66.54	45.20
AC13	11	830323	NN_001194463.NM_024428	0%	1%	19%	9%	7%	1%	3.96	60.14	31.27	24.44	3.55	5.93
AC14	3	124860573	NN_001194463.NM_024428	0%	1%	12%	34%	12%	3%	1.55	26.73	84.15	28.68	91.45	97.00
AC15	2	87183509	NN_001194463.NM_024428	1%	1%	14%	7%	15%	13%	2.04	26.57	14.00	39.21	23.54	26.84
AC16	1	6791423	NN_001194463.NM_024428	0%	1%	14%	20%	7%	0%	4.95	46.31	57.89	20.10	17.71	151.74
AC17	1	698477	NN_001194463.NM_024428	1%	1%	22%	22%	2%	12%	2.07	40.71	35.39	3.60	18.61	15.35
AC18	14	101033520	NN_001194463.NM_024428	0%	2%	18%	7%	40%	5%	4.29	38.37	14.15	82.74	10.45	28.35
AC19	17	27462359	NN_001194463.NM_024428	0%	0%	10%	7%	28%	4%	2.69	61.89	42.49	170.64	26.04	31.95
AC20	8	145105570	NN_001194463.NM_024428	1%	3%	30%	26%	9%	23%	3.15	23.77	25.41	9.23	26.54	22.59
AC21	9	86137543	NN_001194463.NM_024428	1%	1%	13%	9%	3%	7%	1.79	24.24	16.71	5.68	13.54	22.99

【図 1 - 3】

(続)

参照番号	染色体	開始位置	停止位置	平均BCマウント	平均正逆相	平均大逆相	平均小逆相	平均相平上度	平均未定逆相	Norm/BC	A/B/C	LC/BC	SC/BC	SO/BC	UN/BC	
AC22	19	36800350	36800447	0%	1%	11%	15%	2%	8%	1.89	29.45	41.75	5.10	22.89	1.28	
AC23	2	96991059	96991212	0%	1%	15%	6%	4%	7%	6.00	176.53	76.65	61.37	50.29	50.29	
AC24	1	2161937	2160285	0%	0%	12%	17%	64%	8%	1.37	45.20	63.35	232.04	20.22	56.05	
AC25	19	5881757	5866181	1%	1%	20%	12%	8%	7%	2.71	98.53	22.37	17.50	12.28	8.10	
AC26	2	97181166	97182633	0%	1%	13%	6%	18%	12%	2.11	42.20	25.78	55.43	67.24	67.24	
AC27	8	14501381	14501375	0%	0%	28%	8%	32%	2%	5.69	361.21	60.01	44.31	30.71	144.38	
AC28	17	26690039	26690117	0%	1%	13%	14%	6%	1%	10.25	110.92	118.15	55.00	11.44	105.40	
AC29	19	58661880	58662026	1%	1%	15%	6%	7%	3%	2.75	27.79	11.83	12.58	5.68	7.42	
AC30	12	50291919	50291912	1%	2%	17%	20%	4%	7%	2.26	22.36	27.00	5.77	9.22	24.93	
AC31	1	32237895	32237860	1%	3%	22%	25%	44%	10%	14%	27.8	22.43	25.97	45.37	10.13	14.59
AC32	1	65731622	65731666	1%	2%	27%	35%	11%	12%	2.00	31.36	39.05	13.18	14.20	10.04	
AC33	16	2184589	2184604	0%	2%	15%	23%	18%	2%	12.77	119.07	189.49	148.49	13.07	209.70	
AC34	7	100075307	100075425	0%	2%	21%	18%	54%	15%	3.87	45.55	39.16	116.14	32.72	34.94	
AC35	1	44031569	44031658	0%	2%	24%	18%	21%	21%	4.80	75.23	55.94	66.66	64.67	56.57	
AC36	16	2184589	2184604	0%	2%	15%	23%	18%	2%	12.77	119.07	189.49	148.49	13.07	209.70	
AC37	16	21847478	21847920	0%	1%	15%	12%	6%	2%	25.58	263.90	23.97	199.65	41.02	268.01	
AC38	19	3785977	3786032	0%	1%	14%	24%	3%	5%	5.84	54.36	93.77	12.00	19.42	135.15	
AC39	19	3785977	3786032	1%	2%	19%	22%	28%	19%	2.72	25.92	30.28	34.85	24.73	40.51	
AC40	13	3726523	3726523	1%	2%	19%	22%	28%	19%	2.72	25.92	30.28	34.85	24.73	40.51	
AC41	2	2543185	25432624	0%	1%	10%	11%	31%	3%	7%	23.1	25.69	26.41	77.49	6.89	18.37
AC42	20	6163472	61639536	0%	1%	13%	11%	1%	5%	1%	5.21	56.31	41.95	4.97	19.39	63.96
AC43	1	2523192	2523192	1%	2%	16%	20%	6%	2%	2.51	24.19	35.92	54.93	15.92	24.40	
AC44	3	5037468	50378540	0%	1%	13%	14%	6%	1%	6.77	84.68	86.94	406.60	36.31	101.31	

【図 1 - 4】

(続)

染色体	染色体番号	開始位置	停止位置	距離	平均BCマウント	平均正逆相	平均大逆相	平均小逆相	平均上度	平均未定逆相	Norm/BC	A/B/C	LC/BC	SC/BC	SO/BC	UN/BC
AC22	19	LOC64419	NF_033748	+	0	3018	+	0	1	844189	1	1	1	1	1	1
AC23	2	TPRP1	NM_176495,NM_001160,SS2,NM_0_0	+	0	476,-486,-3,-10	+	0	1	150771	1	1	1	1	1	1
AC24	1	SKI	NM_001553,NM_000306	+	0	5404	+	0	0	6497	0	0	0	0	0	0
AC25	19	ZNF-359	NM_024620	-	0	391	-	0	0	70973	1	1	1	1	1	1
AC26	19	CH2	97151166-97153453	-	0	1	-	0	0	5339	0	0	0	0	0	0
AC27	8	PLEG	NM_021381,NM_01383,NM_010445,NM_021318,NM_01380,NM_021384,NM_021382,NM_021379	-	0	1524,3031,37262,24036,11888,97,4446,144	-	0	0	23009	1	1	1	1	1	1
AC28	17	SARF1	NM_015017	+	1	43	+	0	1	23009	1	1	1	1	1	1
AC29	19	ZNF-359	NM_024620	-	0	358	-	0	0	70973	1	1	1	1	1	1
AC30	12	PM2	NM_021626	-	0	159	-	0	0	13807	1	1	1	1	1	1
AC31	1	MAX-CT3	32237855-32237860	-	0	0	-	0	0	2	0	0	0	0	0	0
AC32	1	DNAJC8	NM_014787	+	0	1190	+	0	1	9629	1	1	1	1	1	1
AC33	16	FRKB	NM_002738,NM_212635	+	0	287,287	+	0	1	5579	1	1	1	1	1	1
AC34	7	TSC22D4	NM_050935	+	1	1595	+	0	1	81628	1	1	1	1	1	1
AC35	1	PTPRF	NM_002640,NM_130440	+	0	35053,50053	+	0	1	5792	1	1	1	1	1	1
AC36	16	FRKB	NM_002738,NM_212635	+	0	287,287	+	0	1	5579	1	1	1	1	1	1
AC37	16	FRKB	NM_002738,NM_212635	+	0	339,339	+	0	1	5579	1	1	1	1	1	1
AC38	10	MATK	NM_002378,NM_130955,NM_1993	-	0	15835,348,438	-	0	1	4145	1	1	1	1	1	1
AC39	19	MAX-CT3	32237852-32237861	-	0	0	-	0	0	2	0	0	0	0	0	0
AC40	13	FGF14	NM_176520	-	0	7220	-	0	1	2259	1	1	1	1	1	1
AC41	20	ELCHL23	NM_006006	-	0	46	-	0	1	124408	1	1	1	1	1	1
AC42	3	HASCC1	NM_170714,NM_007182,NM_170712,-150,-2832,-3801	-	0	120,-150,-2832,-3801	-	0	1	11188	1	1	1	1	1	1
AC43	3	HASCC1	MAX-CT3	32237855-32237860	-	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
AC44	3	HASCC1	MAX-CT3	32237855-32237860	-	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0

【図 1 - 5】

(続き)

染色体 参照番号	染色体	開始位置	停止位置	平均B Cアライメント	平均正常 アライメント	平均肺線 アライメント	平均肺大動脈 アライメント	平均肺小動脈 アライメント	平均肺平上皮 アライメント	平均未確定肺動 アライメント	NormBC	A/B/C	LC/BC	SC/BC	SO/BC	UN/BC
AC45	8	904351131	604391182	0%	1%	14%	18%	4%	1%	26%	1.44	31.01	40.63	8.77	1.90	57.44
AC46	19	372654236	37265510	0%	1%	15%	22%	20%	19%	27%	1.30	33.22	55.94	79.85	48.81	68.07
AC47	1	372654236	37265510	0%	1%	15%	22%	20%	19%	27%	1.30	33.22	55.94	79.85	48.81	68.07
AC48	15	651103368	65110440	0%	1%	11%	21%	5%	25%	2%	5.61	51.82	68.18	22.13	114.94	10.41
AC49	17	17677469	17677534	1%	1%	17%	7%	0%	19%	11%	0.71	21.31	8.72	0.57	29.63	14.12

【図 1 - 6】

(続き)

染色体 参照番号	染色体	開始位置	停止位置	遺伝子	遺伝子 ID	T s 距離	遺伝子 ID	遺伝子 ID	遺伝子 ID	遺伝子 ID	遺伝子 ID	遺伝子 ID	遺伝子 ID	遺伝子 ID	遺伝子 ID	遺伝子 ID
AC45	8	904351131	604391182	遺伝子	NC_022687	+	0	498	+	0	498	+	0	498	+	0
AC46	19	372654236	37265510	遺伝子	NC_022687	-	0	498	-	0	498	-	0	498	-	0
AC47	1	372654236	37265510	遺伝子	NC_022687	-	0	498	-	0	498	-	0	498	-	0
AC48	15	651103368	65110440	遺伝子	NC_022687	-	0	498	-	0	498	-	0	498	-	0
AC49	17	17677469	17677534	遺伝子	NC_022687	-	0	498	-	0	498	-	0	498	-	0

【図 2 - 1】

染色体 参照番号	染色体	開始位置	停止位置	平均B Cアライメント	平均正常 アライメント	平均肺線 アライメント	平均肺大動脈 アライメント	平均肺小動脈 アライメント	平均肺平上皮 アライメント	平均未確定肺動 アライメント	NormBC	A/B/C	LC/BC	SC/BC	SO/BC	UN/BC
LC1	16	234473271	23447395	0%	1%	15%	11%	6%	2%	19%	40.10	255.47	205.59	105.27	55.31	539.16
LC2	5	18094343	18094448	0%	1%	10%	11%	40%	2%	13%	26.00	255.47	205.59	105.27	55.31	539.16
LC3	5	42902028	42902093	0%	4%	27%	38%	43%	23%	50%	26.14	178.02	252.75	269.47	158.43	334.25
LC4	7	37480702	37480767	0%	0%	3%	19%	6%	1%	10%	5.21	38.35	238.74	72.25	6.26	203.41
LC5	16	234473271	23447395	0%	1%	15%	11%	6%	2%	19%	40.10	255.47	205.59	105.27	55.31	539.16
LC6	16	234473271	23447395	0%	2%	16%	11%	7%	1%	14%	17.31	84.75	205.59	6.56	132.86	247.56
LC7	16	234473271	23447395	0%	2%	15%	11%	6%	2%	19%	12.77	119.07	168.48	148.48	15.87	209.76
LC8	16	234473271	23447395	0%	1%	15%	11%	6%	2%	19%	26.56	105.27	205.59	105.27	55.31	539.16
LC9	16	234473271	23447395	0%	1%	15%	11%	6%	2%	19%	26.56	105.27	205.59	105.27	55.31	539.16
LC10	7	37480702	37480767	0%	0%	3%	19%	6%	1%	10%	5.21	38.35	238.74	72.25	6.26	203.41
LC11	5	42902028	42902093	0%	5%	20%	38%	43%	23%	50%	18.40	82.13	141.52	245.59	158.56	254.67
LC12	1	110627264	110627325	0%	1%	5%	22%	52%	8%	31%	3.49	23.92	137.94	259.25	38.55	152.65
LC13	18	58511421	58511483	0%	1%	3%	22%	12%	6%	0%	3.89	17.87	129.28	71.80	35.25	1.25
LC14	12	45464143	45464184	0%	1%	15%	15%	5%	2%	9%	6.52	36.99	121.11	43.30	15.20	72.91
LC15	17	2699059	26990617	0%	1%	13%	14%	0%	1%	12%	10.25	110.62	119.15	55.00	11.44	105.40
LC16	20	47443970	47443981	0%	1%	6%	10%	4%	2%	9%	8.95	64.06	110.72	40.66	17.90	96.24
LC17	17	46975164	46975237	0%	1%	8%	20%	0%	7%	11%	4.38	43.34	103.94	33.52	37.61	56.26
LC18	6	145106742	145106827	0%	2%	26%	34%	10%	21%	14%	5.40	81.76	103.02	31.02	68.54	45.26
LC19	17	75447960	75447970	0%	0%	2%	13%	2%	0%	5%	1.26	17.71	107.93	17.41	2.23	37.60
LC20	4	102711879	102711893	0%	2%	8%	23%	12%	11%	19%	8.25	32.43	99.18	50.15	48.17	90.95
LC21	11	4359585	43595855	0%	3%	6%	28%	78%	21%	20%	9.70	18.97	60.05	265.28	70.81	68.97
LC22	17	42373267	42373268	0%	0%	1%	18%	26%	16%	32%	1.27	71.79	96.06	167.27	111.61	268.81
LC23	19	3785977	3786032	0%	1%	14%	24%	3%	5%	34%	5.84	54.36	93.77	12.00	18.42	135.15
LC24	2	182322274	182322403	0%	1%	9%	11%	10%	2%	8%	7.64	78.53	92.41	84.05	18.74	72.85

【図 2 - 2】

(続き)

染色体 参照番号	染色体	開始位置	停止位置	平均B Cアライメント	平均正常 アライメント	平均肺線 アライメント	平均肺大動脈 アライメント	平均肺小動脈 アライメント	平均肺平上皮 アライメント	平均未確定肺動 アライメント	NormBC	A/B/C	LC/BC	SC/BC	SO/BC	UN/BC
LC1	18	58511421	58511483	0%	1%	3%	22%	12%	6%	0%	3.89	17.87	129.28	71.80	35.25	1.25
LC2	5	42902028	42902093	0%	5%	20%	38%	43%	23%	50%	18.40	82.13	141.52	245.59	158.56	254.67
LC3	5	42902028	42902093	0%	5%	20%	38%	43%	23%	50%	18.40	82.13	141.52	245.59	158.56	254.67
LC4	7	37480702	37480767	0%	0%	3%	19%	6%	1%	10%	5.21	38.35	238.74	72.25	6.26	203.41
LC5	16	234473271	23447395	0%	1%	15%	11%	6%	2%	19%	40.10	255.47	205.59	105.27	55.31	539.16
LC6	16	234473271	23447395	0%	2%	16%	11%	7%	1%	14%	17.31	84.75	205.59	6.56	132.86	247.56
LC7	16	234473271	23447395	0%	2%	15%	11%	6%	2%	19%	12.77	119.07	168.48	148.48	15.87	209.76
LC8	16	234473271	23447395	0%	1%	15%	11%	6%	2%	19%	26.56	105.27	205.59	105.27	55.31	539.16
LC9	16	234473271	23447395	0%	1%	15%	11%	6%	2%	19%	26.56	105.27	205.59	105.27	55.31	539.16
LC10	7	37480702	37480767	0%	0%	3%	19%	6%	1%	10%	5.21	38.35	238.74	72.25	6.26	203.41
LC11	5	42902028	42902093	0%	5%	20%	38%	43%	23%	50%	18.40	82.13	141.52	245.59	158.56	254.67
LC12	1	110627264	110627325	0%	1%	5%	22%	52%	8%	31%	3.49	23.92	137.94	259.25	38.55	152.65
LC13	18	58511421	58511483	0%	1%	3%	22%	12%	6%	0%	3.89	17.87	129.28	71.80	35.25	1.25
LC14	12	45464143	45464184	0%	1%	15%	15%	5%	2%	9%	6.52	36.99	121.11	43.30	15.20	72.91
LC15	17	2699059	26990617	0%	1%	13%	14%	0%	1%	12%	10.25	110.62	119.15	55.00	11.44	105.40
LC16	20	47443970	47443981	0%	1%	6%	10%	4%	2%	9%	8.95	64.06	110.72	40.66	17.90	96.24
LC17	17	46975164	46975237	0%	1%	8%	20%	0%	7%	11%	4.38	43.34	103.94	33.52	37.61	56.26
LC18	6	145106742	145106827	0%	2%	26%	34%	10%	21%	14%	5.40	81.76	103.02	31.02	68.54	45.26
LC19	17	75447960	75447970	0%	0%	2%	13%	2%	0%	5%	1.26	17.71	107.93	17.41	2.23	37.60
LC20	4	102711879	102711893	0%	2%	8%	23%	12%	11%	19%	8.25	32.43	99.18	50.15	48.17	90.95
LC21	11	4359585	43595855	0%	3%	6%	28%	78%	21%	20%	9.70	18.97	60.05	265.28	70.81	68.97
LC22	17	42373267	42373268	0%	0%	1%	18%	26%	16%	32%	1.27	71.79	96.06	167.27	111.61	268.81
LC23	19	3785977	3786032	0%	1%	14%	24%	3%	5%	34%	5.84	54.36	93.77	12.00	18.42	135.15
LC24	2	182322274	182322403	0%	1%	9%	11%	10%	2%	8%	7.64	78.53	92.41	84.05	18.74	72.85

【圖 2-3】

(続き)

参照番号	施設名	四角位置	停止位置	平均JCT入ラベ	平均正常歩	平均脱路歩	平均大脱路	平均小脱路	平均脱路上段	平均未定形路	Normal	A/B/C	LC/B/C	SC/B/C	80/B/C	UN/B/C
LC28	3	50378408	50378540	0%	1%	13%	14%	62%	6%	16%	6.77	64.98	89.04	406.60	38.31	101.31
LC28	5	15709830	15709831	0%	1%	9%	18%	11%	2%	13%	6.53	46.71	89.03	53.16	11.52	64.27
LC27	8	12471738	12471739	0%	1%	11%	15%	49%	14%	26%	7.50	63.79	86.86	276.90	78.49	186.03
LC28	4	42153504	42153501	0%	0%	5%	13%	6%	1%	10%	24.77	36.03	85.34	33.84	7.67	70.70
LC29	19	17340407	17340450	0%	1%	5%	2%	6%	6%	14%	5.69	25.47	84.33	17.37	34.47	76.96
LC30	3	12486055	12486055	0%	1%	12%	34%	12%	31%	39%	1.55	26.73	84.15	25.63	91.45	97.00
LC31	7	21489255	21489253	0%	0%	4%	15%	4%	12%	13%	3.22	32.77	82.00	24.55	6.84	70.31
LC32	12	25055673	25055697	0%	0%	10%	22%	49%	14%	40%	4.32	36.30	77.51	103.62	44.17	140.37
LC33	3	18411847	18411819	0%	2%	13%	26%	43%	19%	41%	6.97	38.31	74.48	123.47	55.43	117.27
LC34	8	14310653	14510638	0%	2%	14%	28%	9%	25%	26%	4.80	39.66	71.50	22.47	82.71	95.19
LC35	7	46020054	46020022	0%	1%	11%	34%	21%	12%	29%	2.80	22.12	79.90	43.00	25.10	59.41
LC38	2	17309757	17309761	0%	1%	4%	16%	7%	4%	3%	3.23	17.04	66.46	30.35	19.33	11.52
LC37	9	17689637	17689623	0%	1%	19%	20%	5%	7%	64%	4.66	66.90	66.62	19.20	26.13	195.19
LC37	7	37497703	37497693	0%	5%	3%	12%	8%	0%	3%	17.32	38.86	52.84	35.24	1.07	96.29
LC38	6	40042638	40042630	0%	1%	21%	42%	49%	34%	11%	7.31	33.32	64.23	56.83	54.50	96.83
LC40	10	22541897	22541890	0%	2%	13%	22%	49%	16%	24%	5.71	36.96	63.36	141.74	52.16	69.90
LC41	1	2185937	21860156	0%	0%	12%	17%	64%	6%	16%	1.37	45.20	63.35	20.44	20.22	99.05
LC42	1	22330968	22330967	0%	1%	7%	18%	43%	18%	23%	2.13	26.78	63.20	158.61	57.13	99.20
LC43	5	12951816	12953114	0%	1%	8%	12%	26%	2%	14%	3.69	41.84	62.47	93.83	9.07	77.02
LC44	11	12856487	12856473	0%	0%	6%	3%	13%	7%	3%	25%	15.22	60.97	32.31	14.84	120.57
LC46	1	85731423	85731507	0%	1%	14%	29%	7%	6%	5%	4.05	40.31	57.68	20.18	17.71	15.74
LC46	7	14249404	14249404	0%	1%	7%	11%	5%	2%	23%	3.42	34.83	57.96	28.63	12.03	122.00

【圖 2-5】

(続き)

染色体	座位位置	平均CpGスコア	平均正常	平均癌腫	平均大腸癌	平均小腸癌	平均腫瘍上皮	平均大腸癌・小腸癌	Norm/BC	Ad/BC	LC/BC	SC/BC	SO/BC	U/BC
大腸癌・小腸癌	停止位置	平均CpGスコア	平均正常	平均癌腫	平均大腸癌	平均小腸癌	平均腫瘍上皮	平均大腸癌・小腸癌						
LC47	1 18175684	18125801	0%	0%	3%	11%	6%	0%	2.20	15.93	57.68	1.19	32.64	2.04
LC48	1 32376139	32276164	1%	5%	3%	33%	66%	14%	7.85	3.83	57.57	100.17	23.62	48.87
LC49	1 44331019	44041659	0%	0%	2%	24%	18%	21%	1.93	4.00	75.23	50.94	66.97	50.37
LC50	20 81500682	81506719	0%	1%	0%	13%	62%	19%	5.65	34.19	56.55	283.74	78.08	115.84
LC51	3 122596109	12259828	0%	3%	1%	23%	65%	25%	5.87	39.97	54.78	151.39	57.48	143.28
LC52	8 145104291	145104382	0%	0%	0%	13%	3%	12%	10.30	26.23	54.77	13.90	48.64	41.94
LC53	4 142032131	142021277	1%	2%	7%	34%	11%	7%	3.04	10.87	54.63	18.35	12.07	33.96
LC54	4 15180145	15180131	0%	2%	0%	18%	19%	8%	1.90	17.13	53.63	61.30	27.48	61.58
LC55	1 111217635	111217602	0%	1%	0%	10%	3%	4%	2.24	22.37	55.55	19.59	10.91	63.94
LC56	3 124890104	124890768	0%	1%	10%	21%	9%	35%	1.98	23.37	51.32	20.78	84.00	51.30
LC57	12 235596015	235596112	0%	1%	10%	18%	25%	10%	1.51	27.62	55.51	69.55	27.10	95.52
LC58	17 48342482	48023808	1%	3%	24%	47%	58%	35%	3.87	35.97	55.24	59.12	28.78	48.43
LC59	12 107133254	107133254	0%	2%	0%	24%	2%	3%	17.30	32.38	40.38	4.01	6.33	34.97
LC60	19 374044151	374044219	0%	1%	0%	20%	19%	17%	2.12	15.07	47.57	42.20	30.02	33.33
LC61	12 82513351	82214413	0%	0%	1%	11%	5%	1%	9.38	6.48	47.47	17.50	5.70	35.62
LC62	10 84243101	84243117	0%	1%	4%	1%	3%	1%	3.24	13.88	46.30	10.58	4.91	27.68
LC63	5 189942111	189943414	0%	1%	9%	13%	30%	2%	2.2%	37.12	48.14	92.41	5.95	71.09
LC64	12 23555854	23555854	1%	3%	14%	27%	30%	17%	5.55	23.31	55.41	55.11	28.60	63.14
LC65	3 131150509	131150673	1%	2%	48%	40%	16%	3%	2.26	31.11	44.55	17.84	2.82	44.4

【圖 2-4】

(続き)

遺伝子	染色体	位置	遺伝	エクソ内	T S 距離	C P O A 遺伝子	Enter ID	遺伝子名
大組別	参照番号	染色体	位置	遺伝	エクソ内	T S 距離	C P O A 遺伝子	遺伝子名
LC28	3	RASBF1	NM_170714.NM_007162.NM_170715.NM_007163.NM_007164.NM_007165.NM_007166.NM_007167.NM_007168.NM_007169.NM_007170.NM_007171.NM_007172.NM_007173.NM_007174.NM_007175.NM_007176.NM_007177.NM_007178.NM_007179.NM_007180.NM_007181.NM_007182.NM_007183.NM_007184.NM_007185.NM_007186.NM_007187.NM_007188.NM_007189.NM_007190.NM_007191.NM_007192.NM_007193.NM_007194.NM_007195.NM_007196.NM_007197.NM_007198.NM_007199.NM_007200.NM_007201.NM_007202.NM_007203.NM_007204.NM_007205.NM_007206.NM_007207.NM_007208.NM_007209.NM_007210.NM_007211.NM_007212.NM_007213.NM_007214.NM_007215.NM_007216.NM_007217.NM_007218.NM_007219.NM_007220.NM_007221.NM_007222.NM_007223.NM_007224.NM_007225.NM_007226.NM_007227.NM_007228.NM_007229.NM_007230.NM_007231.NM_007232.NM_007233.NM_007234.NM_007235.NM_007236.NM_007237.NM_007238.NM_007239.NM_007240.NM_007241.NM_007242.NM_007243.NM_007244.NM_007245.NM_007246.NM_007247.NM_007248.NM_007249.NM_007250.NM_007251.NM_007252.NM_007253.NM_007254.NM_007255.NM_007256.NM_007257.NM_007258.NM_007259.NM_007260.NM_007261.NM_007262.NM_007263.NM_007264.NM_007265.NM_007266.NM_007267.NM_007268.NM_007269.NM_007270.NM_007271.NM_007272.NM_007273.NM_007274.NM_007275.NM_007276.NM_007277.NM_007278.NM_007279.NM_007280.NM_007281.NM_007282.NM_007283.NM_007284.NM_007285.NM_007286.NM_007287.NM_007288.NM_007289.NM_007290.NM_007291.NM_007292.NM_007293.NM_007294.NM_007295.NM_007296.NM_007297.NM_007298.NM_007299.NM_007300.NM_007301.NM_007302.NM_007303.NM_007304.NM_007305.NM_007306.NM_007307.NM_007308.NM_007309.NM_007310.NM_007311.NM_007312.NM_007313.NM_007314.NM_007315.NM_007316.NM_007317.NM_007318.NM_007319.NM_007320.NM_007321.NM_007322.NM_007323.NM_007324.NM_007325.NM_007326.NM_007327.NM_007328.NM_007329.NM_007330.NM_007331.NM_007332.NM_007333.NM_007334.NM_007335.NM_007336.NM_007337.NM_007338.NM_007339.NM_007340.NM_007341.NM_007342.NM_007343.NM_007344.NM_007345.NM_007346.NM_007347.NM_007348.NM_007349.NM_007350.NM_007351.NM_007352.NM_007353.NM_007354.NM_007355.NM_007356.NM_007357.NM_007358.NM_007359.NM_007360.NM_007361.NM_007362.NM_007363.NM_007364.NM_007365.NM_007366.NM_007367.NM_007368.NM_007369.NM_007370.NM_007371.NM_007372.NM_007373.NM_007374.NM_007375.NM_007376.NM_007377.NM_007378.NM_007379.NM_007380.NM_007381.NM_007382.NM_007383.NM_007384.NM_007385.NM_007386.NM_007387.NM_007388.NM_007389.NM_007390.NM_007391.NM_007392.NM_007393.NM_007394.NM_007395.NM_007396.NM_007397.NM_007398.NM_007399.NM_007400.NM_007401.NM_007402.NM_007403.NM_007404.NM_007405.NM_007406.NM_007407.NM_007408.NM_007409.NM_007410.NM_007411.NM_007412.NM_007413.NM_007414.NM_007415.NM_007416.NM_007417.NM_007418.NM_007419.NM_007420.NM_007421.NM_007422.NM_007423.NM_007424.NM_007425.NM_007426.NM_007427.NM_007428.NM_007429.NM_007430.NM_007431.NM_007432.NM_007433.NM_007434.NM_007435.NM_007436.NM_007437.NM_007438.NM_007439.NM_007440.NM_007441.NM_007442.NM_007443.NM_007444.NM_007445.NM_007446.NM_007447.NM_007448.NM_007449.NM_007450.NM_007451.NM_007452.NM_007453.NM_007454.NM_007455.NM_007456.NM_007457.NM_007458.NM_007459.NM_007460.NM_007461.NM_007462.NM_007463.NM_007464.NM_007465.NM_007466.NM_007467.NM_007468.NM_007469.NM_007470.NM_007471.NM_007472.NM_007473.NM_007474.NM_007475.NM_007476.NM_007477.NM_007478.NM_007479.NM_007480.NM_007481.NM_007482.NM_007483.NM_007484.NM_007485.NM_007486.NM_007487.NM_007488.NM_007489.NM_007490.NM_007491.NM_007492.NM_007493.NM_007494.NM_007495.NM_007496.NM_007497.NM_007498.NM_007499.NM_007500.NM_007501.NM_007502.NM_007503.NM_007504.NM_007505.NM_007506.NM_007507.NM_007508.NM_007509.NM_007510.NM_007511.NM_007512.NM_007513.NM_007514.NM_007515.NM_007516.NM_007517.NM_007518.NM_007519.NM_007520.NM_007521.NM_007522.NM_007523.NM_007524.NM_007525.NM_007526.NM_007527.NM_007528.NM_007529.NM_007530.NM_007531.NM_007532.NM_007533.NM_007534.NM_007535.NM_007536.NM_007537.NM_007538.NM_007539.NM_007540.NM_007541.NM_007542.NM_007543.NM_007544.NM_007545.NM_007546.NM_007547.NM_007548.NM_007549.NM_007550.NM_007551.NM_007552.NM_007553.NM_007554.NM_007555.NM_007556.NM_007557.NM_007558.NM_007559.NM_007560.NM_007561.NM_007562.NM_007563.NM_007564.NM_007565.NM_007566.NM_007567.NM_007568.NM_007569.NM_007570.NM_007571.NM_007572.NM_007573.NM_007574.NM_007575.NM_007576.NM_007577.NM_007578.NM_007579.NM_007580.NM_007581.NM_007582.NM_007583.NM_007584.NM_007585.NM_007586.NM_007587.NM_007588.NM_007589.NM_007590.NM_007591.NM_007592.NM_007593.NM_007594.NM_007595.NM_007596.NM_007597.NM_007598.NM_007599.NM_007600.NM_007601.NM_007602.NM_007603.NM_007604.NM_007605.NM_007606.NM_007607.NM_007608.NM_007609.NM_007610.NM_007611.NM_007612.NM_007613.NM_007614.NM_007615.NM_007616.NM_007617.NM_007618.NM_007619.NM_007620.NM_007621.NM_007622.NM_007623.NM_007624.NM_007625.NM_007626.NM_007627.NM_007628.NM_007629.NM_007630.NM_007631.NM_007632.NM_007633.NM_007634.NM_007635.NM_007636.NM_007637.NM_007638.NM_007639.NM_007640.NM_007641.NM_007642.NM_007643.NM_007644.NM_007645.NM_007646.NM_007647.NM_007648.NM_007649.NM_007650.NM_007651.NM_007652.NM_007653.NM_007654.NM_007655.NM_007656.NM_007657.NM_007658.NM_007659.NM_007660.NM_007661.NM_007662.NM_007663.NM_007664.NM_007665.NM_007666.NM_007667.NM_007668.NM_007669.NM_007670.NM_007671.NM_007672.NM_007673.NM_007674.NM_007675.NM_007676.NM_007677.NM_007678.NM_007679.NM_007680.NM_007681.NM_007682.NM_007683.NM_007684.NM_007685.NM_007686.NM_007687.NM_007688.NM_007689.NM_007690.NM_007691.NM_007692.NM_007693.NM_007694.NM_007695.NM_007696.NM_007697.NM_007698.NM_007699.NM_007700.NM_007701.NM_007702.NM_007703.NM_007704.NM_007705.NM_007706.NM_007707.NM_007708.NM_007709.NM_007710.NM_007711.NM_007712.NM_007713.NM_007714.NM_007715.NM_007716.NM_007717.NM_007718.NM_007719.NM_007720.NM_007721.NM_007722.NM_007723.NM_007724.NM_007725.NM_007726.NM_007727.NM_007728.NM_007729.NM_007730.NM_007731.NM_007732.NM_007733.NM_007734.NM_007735.NM_007736.NM_007737.NM_007738.NM_007739.NM_007740.NM_007741.NM_007742.NM_007743.NM_007744.NM_007745.NM_007746.NM_007747.NM_007748.NM_007749.NM_007750.NM_007751.NM_007752.NM_007753.NM_007754.NM_007755.NM_007756.NM_007757.NM_007758.NM_007759.NM_007760.NM_007761.NM_007762.NM_007763.NM_007764.NM_007765.NM_007766.NM_007767.NM_007768.NM_007769.NM_007770.NM_007771.NM_007772.NM_007773.NM_007774.NM_007775.NM_007776.NM_007777.NM_007778.NM_007779.NM_007780.NM_007781.NM_007782.NM_007783.NM_007784.NM_007785.NM_007786.NM_007787.NM_007788.NM_007789.NM_007790.NM_007791.NM_007792.NM_007793.NM_007794.NM_007795.NM_007796.NM_007797.NM_007798.NM_007799.NM_007800.NM_007801.NM_007802.NM_007803.NM_007804.NM_007805.NM_007806.NM_007807.NM_007808.NM_007809.NM_007810.NM_007811.NM_007812.NM_007813.NM_007814.NM_007815.NM_007816.NM_007817.NM_007818.NM_007819.NM_007820.NM_007821.NM_007822.NM_007823.NM_007824.NM_007825.NM_007826.NM_007827.NM_007828.NM_007829.NM_007830.NM_007831.NM_007832.NM_007833.NM_007834.NM_007835.NM_007836.NM_007837.NM_007838.NM_007839.NM_007840.NM_007841.NM_007842.NM_007843.NM_007844.NM_007845.NM_007846.NM_007847.NM_007848.NM_007849.NM_007850.NM_007851.NM_007852.NM_007853.NM_007854.NM_007855.NM_007856.NM_007857.NM_007858.NM_007859.NM_007860.NM_007861.NM_007862.NM_007863.NM_007864.NM_007865.NM_007866.NM_007867.NM_007868.NM_007869.NM_007870.NM_007871.NM_007872.NM_007873.NM_007874.NM_007875.NM_007876.NM_007877.NM_007878.NM_007879.NM_007880.NM_007881.NM_007882.NM_007883.NM_007884.NM_007885.NM_007886.NM_007887.NM_007888.NM_007889.NM_007890.NM_007891.NM_007892.NM_007893.NM_007894.NM_007895.NM_007896.NM_007897.NM_007898.NM_007899.NM_007900.NM_007901.NM_007902.NM_007903.NM_007904.NM_007905.NM_007906.NM_007907.NM_007908.NM_007909.NM_007910.NM_007911.NM_007912.NM_007913.NM_007914.NM_007915.NM_007916.NM_007917.NM_007918.NM_007919.NM_007920.NM_007921.NM_007922.NM_007923.NM_007924.NM_007925.NM_007926.NM_007927.NM_007928.NM_007929.NM_007930.NM_007931.NM_007932.NM_007933.NM_007934.NM_007935.NM_007936.NM_007937.NM_007938.NM_007939.NM_007940.NM_007941.NM_007942.NM_007943.NM_007944.NM_007945.NM_007946.NM_007947.NM_007948.NM_007949.NM_007950.NM_007951.NM_007952.NM_007953.NM_007954.NM_007955.NM_007956.NM_007957.NM_007958.NM_007959.NM_007960.NM_007961.NM_007962.NM_007963.NM_007964.NM_007965.NM_007966.NM_007967.NM_007968.NM_007969.NM_007970.NM_007971.NM_007972.NM_007973.NM_007974.NM_007975.NM_007976.NM_007977.NM_007978.NM_007979.NM_007980.NM_007981.NM_007982.NM_007983.NM_007984.NM_007985.NM_007986.NM_007987.NM_007988.NM_007989.NM_007990.NM_007991.NM_007992.NM_007993.NM_007994.NM_007995.NM_007996.NM_007997.NM_007998.NM_007999.NM_008000.NM_008001.NM_008002.NM_008003.NM_008004.NM_008005.NM_008006.NM_008007.NM_008008.NM_008009.NM_008010.NM_008011.NM_008012.NM_008013.NM_008014.NM_008015.NM_008016.NM_008017.NM_008018.NM_008019.NM_008020.NM_008021.NM_008022.NM_008023.NM_008024.NM_008025.NM_008026.NM_008027.NM_008028.NM_008029.NM_008030.NM_008031.NM_008032.NM_008033.NM_008034.NM_008035.NM_008036.NM_008037.NM_008038.NM_008039.NM_008040.NM_008041.NM_008042.NM_008043.NM_008044.NM_008045.NM_008046.NM_008047.NM_008048.NM_008049.NM_008050.NM_008051.NM_008052.NM_008053.NM_008054.NM_008055.NM_008056.NM_008057.NM_008058.NM_008059.NM_008060.NM_008061.NM_008062.NM_008063.NM_008064.NM_008065.NM_008066.NM_008067.NM_008068.NM_008069.NM_008070.NM_008071.NM_008072.NM_008073.NM_008074.NM_008075.NM_008076.NM_008077.NM_008078.NM_008079.NM_008080.NM_008081.NM_008082.NM_008083.NM_008084.NM_008085.NM_008086.NM_008087.NM_008088.NM_008089.NM_008090.NM_008091.NM_008092.NM_008093.NM_008094.NM_008095.NM_008096.NM_008097.NM_008098.NM_008099.NM_008100.NM_008101.NM_008102.NM_008103.NM_008104.NM_008105.NM_008106.NM_008107.NM_008108.NM_008109.NM_008110.NM_008111.NM_008112.NM_008113.NM_008114.NM_008115.NM_008116.NM_008117.NM_008118.NM_008119.NM_008120.NM_008121.NM_008122.NM_008123.NM_008124.NM_008125.NM_008126.NM_008127.NM_008128.NM_008129.NM_008130.NM_008131.NM_008132.NM_008133.NM_008134.NM_008135.NM_008136.NM_008137.NM_008138.NM_008139.NM_008140.NM_008141.NM_008142.NM_008143.NM_008144.NM_008145.NM_008146.NM_008147.NM_008148.NM_008149.NM_008150.NM_008151.NM_008152.NM_008153.NM_008154.NM_008155.NM_008156.NM_008157.NM_008158.NM_008159.NM_008160.NM_008161.NM_008162.NM_008163.NM_008164.NM_008165.NM_008166.NM_008167.NM_008168.NM_008169.NM_008170.NM_008171.NM_008172.NM_008173.NM_008174.NM_008175.NM_008176.NM_008177.NM_008178.NM_008179.NM_008180.NM_008181.NM_008182.NM_008183.NM_008184.NM_008185.NM_008186.NM_008187.NM_008188.NM_008189.NM_008190.NM_008191.NM_008192.NM_008193.NM_008194.NM_008195.NM_008196.NM_008197.NM_008198.NM_008199.NM_008200.NM_008201.NM_008202.NM_008203.NM_008204.NM_008205.NM_008206.NM_008207.NM_008208.NM_008209.NM_008210.NM_008211.NM_008212.NM_008213.NM_008214.NM_008215.NM_008216.NM_008217.NM_008218.NM_008219.NM_008220.NM_008221.NM_008222.NM_008223.NM_008224.NM_008225.NM_008226.NM_008227.NM_008228.NM_008229.NM_008230.NM_008231.NM_008232.NM_008233.NM_008234.NM_008235.NM_008236.NM_008237.NM_008238.NM_008239.NM_008240.NM_008241.NM_008242.NM_008243.NM_008244.NM_008245.NM_008246.NM_008247.NM_008248.NM_008249.NM_008250.NM_008251.NM_008252.NM_008253.NM_008254.NM_008255.NM_008256.NM_008257.NM_008258.NM_008259.NM_008260.NM_008261.NM_008262.NM_008263.NM_008264.NM_008265.NM_008266.NM_008267.NM_008268.NM_008269.NM_008270.NM_008271.NM_008272.NM_008273.NM_008274.NM_008275.NM_008276.NM_008277.NM_008278.NM_008279.NM_008280.NM_008281.NM_008282.NM_008283.NM_008284.NM_008285.NM_008286.NM_008287.NM_008288.NM_008289.NM_008290.NM_008291.NM_008292.NM_008293.NM_008294.NM_008295.NM_008296.NM_008297.NM_008298.NM_008299.NM_008300.NM_008301.NM_008302.NM_008303.NM_008304.NM_008305.NM_008306.NM_008307.NM_008308.NM_008309.NM_008310.NM_008311.NM_008312.NM_008313.NM_008314.NM_008315.NM_008316.NM_008317.NM_008318.NM_008319.NM_008320.NM_008321.NM_008322.NM_008323.NM_008324.NM_008325.NM_008326.NM_008327.NM_008328.NM_008329.NM_008330.NM_008331.NM_008332.NM_008333.NM_008334.NM_008335.NM_008336.NM_008337.NM_008338.NM_008339.NM_008340.NM_008341.NM_008342.NM_008343.NM_008344.NM_008345.NM_008346.NM_008347.NM_008348.NM_008349.NM_008350.NM_008351.NM_008352.NM_008353.NM_008354.NM_008355.NM_008356.NM_008357.NM_008358.NM_008359.NM_008360.NM_008361.NM_008362.NM_008363.NM_008364.NM_008365.NM_008366.NM_008367.NM_008368.NM_008369.NM_008370.NM_008371.NM_008372.NM_008373.NM_008374.NM_008375.NM_008376.NM_008377.NM_008378.NM_008379.NM_008380.NM_008381.NM_008382.NM_008383.NM_008384.NM_008385.NM_008386.NM_008387.NM_008388.NM_008389.NM_008390.NM_008391.NM_008392.NM_008393.NM_008394.NM_008395.NM_008396.NM_008397.NM_008398.NM_008399.NM_008400.NM_008401.NM_008402.NM_008403.NM_008404.NM_008405.NM_008406.NM_008407.NM_008408.NM_008409.NM_008410.NM_008411.NM_008412.NM_008413.NM_008414.NM_008415.NM_008416.NM_008417.NM_008418.NM_008419.NM_008420.NM_008421.NM_008422.NM_008423.NM_008424.NM_008425.NM_008426.NM_008427.NM_008428.NM_008429.NM_008430.NM_008431.NM_008432.NM_008433.NM_008434.NM_008435.NM_008436.NM_008437.NM_008438.NM_008439.NM_008440.NM_008441.NM_008442.NM_008443.NM_008444.NM_008445.NM_008446.NM_008447.NM_008448.NM_008449.NM_008450.NM_008451.NM_008452.NM_008453.NM_008454.NM_008455.NM_008456.NM_008457.NM_008458.NM_008459.NM_008460.NM_008461.NM_008462.NM_008463.NM_008464.NM_008465.NM_008466.NM_008467.NM_008468.NM_008469.NM_008470.NM_008471.NM_008472.NM_008473.NM_008474.NM_008475.NM_008476.NM_008477.NM_008478.NM_008479.NM_008480.NM_008481.NM_008482.NM_008483.NM_008484.NM_008485.NM_008486.NM_008487.NM_008488.NM_008489.NM_008490.NM_008491.NM_008492.NM_008493.NM_008494.NM_008495.NM_008496.NM_008497.NM_008498.NM_008499.NM_008500.NM_008501.NM_008502.NM_008503.NM_008504.NM_008505.NM_008506.NM_008507.NM_008508.NM_008509.NM_008510.NM_008511.NM_008512.NM_008513.NM_008514.NM_008515.NM_008516.N					

【圖 2-6】

(続き)

[illegible]

1	染色体

公司	名称
地址	

[illegible]

【圖 2-7】

(続き)

[illegible]

【圖 2-9】

(続き)

[illegible]

【圖 2-8】

(続き)

大腸癌患者番号	遺伝子	変異物	頻度	エクソノ	TSS距離	CpGオクルド	Ensembl ID	遺伝子カタル
LC68	20 PPP1R1B	NM_011772:NM_015568	+	0 323,323	-	1	28051	タンパク質合成リターダー4-1、腫瘍性伝導因子、ラファニート1 6.0
LC68	7 GNB2	NM_004272	+	0 2402	-	-	27683	アギンスタンタンパク質結合タンパク質 (Gタンパク)、ヘテロ二量体タンパク質
LC69	2 MAX,OT2	T8861889-1	-	-	-	-	-	-
LC70	6 PHOX1A	NM_024504	-	1 1602	-	1	93978	DNA結合タンパク質1.4
LC71	20 SHLHE23	NM_024606	-	1 166	-	1	124008	ヒトタンパク質ファミリーAタンパク質ファミリーメンバー-8.9
LC72	5 MAX,OT4	7220824-7	-	-	-	-	-	-
LC73	1 DNAJC5	NM_014787	+	0 1163	-	1	9829	アポアミリジンC、メンバー6
LC74	1 GUPC2	NM_011655	+	1 146	-	1	54010	アポアミリジンCタンパク質ファミリー、メンバー2
LC75	7 TSG2D24	NM_003935	-	1 1595	-	1	91928	TSG22タンパク質ファミリー、メンバー4
LC76	2 EMTA	NM_004097	+	0 3117	-	1	2018	アポアミリジンCタンパク質ファミリー、メンバー2
LC78	12 ASC1	NM_004316	+	1 624	-	1	429	EMY4タンパク質ファミリー、メンバー4
LC79	10 MAX,OT10	22024410-2	-	-	-	-	-	achete-sode結合未知タンパク質1 (Drosophila)
LC80	8 TSP-PL5	NM_033512	-	1 951	-	1	86453	TSPY重複5
LC81	2 MAX,OT2	68006887-6	-	0 152	-	1	648059	伝導因子、Gタンパク結合、タンパク質タンパク質1
LC82	15 LOC44809	NM_030652	+	0 1212	-	1	100621	タンパク質タンパク質1
LC83	12 GNAQIP	NM_181711	+	1 212	-	1	94059	伝導因子、Gタンパク結合、タンパク質タンパク質1
LC84	7 MAX,OT1	32237895-32237899	-	-	-	-	-	-
LC85	10 MAX,OT10	22024410-2	-	-	-	-	-	-
LC86	4 MAX,OT4	7220824-7	-	-	-	-	-	-
LC87	20 PREX1	NM_024620	-	0 221	-	1	97980	タンパク質タンパク質1、タンパク質タンパク質1、タンパク質タンパク質1

【図 2-10】

(続き)

[illegible]

【図 2-10】

(続き)

[illegible]

【図 2 - 1 1】

(続き)

大連市 公園番号	染色灰	間伐位置	停止位置	平均C9タイプ	平均正層	平均静沈	平均大断面	平均小断面	平均扁平上段	平均末端静沈	Norm/BC	A/B/C	LC/BC	SC/BC	SO/BC	UNDB/C
LC112	11	13894305	13864872	1%	3%	14%	25%	6%	11%	31%	3.40	18.30	29.63	7.65	12.51	36.31
LC113	5	13487082	14807043	0%	1%	5%	13%	35%	5%	17%	3.15	10.58	29.38	80.54	10.94	30.68
LC114	4	895890	8880023	1%	3%	13%	21%	15%	34%	2.85	12.04	28.02	19.05	14.14	31.71	31.82
LC115	14	9273525	9233545	1%	3%	15%	29%	15%	15%	0.3%	3.50	12.50	28.03	17.71	81.62	81.62
LC116	18	12254368	11225436	0%	1%	3%	10%	1%	2%	1%	2.01	9.01	28.44	3.56	4.24	14.73
LC117	6	2903514	2903514	0%	1%	2%	13%	21%	2%	1%	1.56	3.30	28.42	4.50	4.96	1.60
LC118	8	27585031	27585031	1%	1%	17%	23%	6%	24%	23%	1.61	19.39	26.37	1.7	1.92	61.08
LC119	8	23368459	23368438	1%	2%	12%	23%	33%	12%	85%	2.76	14.60	27.91	36.65	14.91	81.68
LC120	19	30077795	30077796	1%	1%	13%	19%	10%	3%	14%	1.60	16.08	27.33	13.50	4.20	20.21
LC121	12	23950183	23959248	1%	5%	19%	37%	54%	29%	64%	4.03	13.90	39.72	21.30	47.09	47.09
LC122	12	50393678	50393612	1%	2%	17%	20%	4%	7%	19%	2.26	22.38	27.00	5.77	9.22	24.93
LC123	14	43739293	49738373	1%	2%	23%	29%	14%	7%	62%	1.14	14.48	26.07	11.7	8.92	14.09
LC124	2	25439165	25439162	0%	1%	10%	11%	3%	5%	3%	2.31	25.80	29.41	71.48	6.86	18.37
LC125	1	32327050	32327050	1%	3%	22%	25%	44%	10%	14%	2.76	22.62	25.97	43.37	10.13	14.59
LC126	5	32713586	32713669	2%	5%	25%	42%	17%	11%	33%	3.07	15.18	25.58	10.48	6.68	20.43
LC127	8	145105570	145106515	1%	3%	30%	26%	9%	29%	23%	3.15	29.77	23.41	9.23	28.54	22.95
LC128	12	52407041	52407138	1%	1%	12%	16%	1%	2%	12%	1.38	19.11	26.37	2.04	2.86	19.50
LC129	27	1795748	17758529	1%	5%	25%	36%	38%	24%	69%	3.66	17.21	25.70	26.35	16.93	48.45
LC130	2	99433970	99433970	1%	3%	24%	31%	81%	32%	49%	2.57	25.18	25.18	66.32	26.30	45.23

【図 2 - 1 2】

(続き)

遺伝子 染色体番号	遺伝子 染色体番号	転写物	病	エピソード	Ts 距離	CpGアライメント	Enter ID	遺伝子 染色体番号
LC1219	11 SPON1	NM_006169	+	0 973	-	0	10418	スポンジニン 細胞外マトリックスタンパク質
LC1113	5 MAX chr5:13487382-134874483	-	-	0 -	-	0	-	-
LC1114	4 MAX chr4:895890-8959023	-	-	0 -	-	1	-	-
LC1115	14 PTGDR	NM_000953	-	0 995	-	1	9770	プロスタグランジンD2受容体 (D2)
LC1116	18 CIDEA	NM_001797917.NC_034468	-	0 -11-53	-	1	1146	細胞内消化因子D F F A 膜タンパク質
LC1117	8 SERPINE3	NM_0040155	-	0 49	-	1	5272	セロリジンプロテナーゼ阻害剤、グループレグ (セロリジンプロテナーゼ阻害剤、グループレグ)
LC1118	6 LOC10132851	NP_033451.NP_033650	-	1 319.614	-	1	10933663	セロリジンプロテナーゼ阻害剤、グループレグ (セロリジンプロテナーゼ阻害剤、グループレグ)
LC1119	8 NCX2A	NM_00138221	+	0 -137	-	1	137814	NK 受容体関連、細胞因子 (NK 受容体関連、細胞因子)
LC120	19 VST192B	NM_00146339	+	0 305	-	1	342855	ヴェット及び肺腫瘍ドメイン含有 2 B (ヴェット及び肺腫瘍ドメイン含有 2 B)
LC121	12 BCA*1	NM_00177692.NM_003504.NM_01778904.NM_001776991.NM_001	-	0 48310.48210- 951.48210-174	-	1	566	分岐鎖アミノ酸トランスフェラーゼ、1 サイトソーム (分岐鎖アミノ酸トランスフェラーゼ、1 サイトソーム)
LC122	12 FAL2	NM_012326	-	0 -159	-	1	23017	α-アミロイドン阻害剤、2 (α-アミロイドン阻害剤、2)
LC123	14 P1595	NM_000953	-	0 793	-	1	5729	プロスタグランジンD2受容体 (D2)
LC124	2 MAX chr2:2430185-2431094	-	-	0 -	-	0	-	-
LC125	1 MAX chr1:32237854-32237880	-	-	0 1022	-	1	4893	サイトソーム膜タンパク質受容体 (サイトソーム膜タンパク質受容体)
LC126	5 NFR3	NM_000908	-	0 -	-	0	-	-
LC127	9 MAX chr5:14503570-14510575	-	-	0 -	-	1	-	-
LC128	12 GRASP3	NM_181711	+	1 294	-	1	190822	GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1) (GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1))
LC129	7 HOXA7	NM_008868	-	0 548	-	1	3204	ホモセリン受容体、7 (ホモセリン受容体、7)
LC130	2 C2orf55	NM_207362	-	1 115414	-	1	343900	第2 膜タンパク質、2 (第2 膜タンパク質、2)

【図 2 - 1 3】

(続き)

選出番号	選出区	選出位置	停止位置	平均日C/Aマブ	平均正常時アラート	平均異常時アラート	平均最大距離アラート	平均最小距離アラート	平均隣近平上改アラート	平均突発急降應アラート	Norm/C	A/B/C	L/C/B/C	S/C/B/C	U/D/B/C	
大腸癌マブ番号	LC131	1240101562	124010715	1%	3%	7%	31%	28%	11%	18%	2.57	5.42	24.837	20.86	8.77	13.33
	LC137	33520317	33520314	2%	6%	21%	44%	31%	17%	55%	3.20	11.14	24.40	21.20	0.72	31.25
	LC138	18122560	18122469	1%	1%	5%	11%	12%	1%	2%	1.54	10.77	24.72	13.2	14.12	2.96
	LC134	44808501	44808501	0%	1%	5%	11%	5%	6%	6%	1.38	10.77	24.70	10.80	12.84	3.79
	LC135	108440848	108440700	1%	3%	23%	35%	58%	23%	23%	2.73	19.07	24.47	45.83	18.88	23.23
	LC136	2003051	2003104	1%	1%	2%	18%	9%	3%	0%	1.13	2.43	24.28	13.65	4.40	0.45
	LC137	57618781	57618831	2%	4%	21%	37%	78%	30%	61%	2.54	23.93	24.70	19.55	39.33	1.33
	LC138	3604210	3604210	1%	2%	4%	22%	41%	13%	55%	1.88	3.00	23.37	43.13	13.79	57.80
	LC139	233356253	233356269	1%	0%	6%	18%	3%	3%	13%	1.44	9.03	22.92	37.2	3.92	21.84
	LC140	52535105	52536240	2%	15%	21%	17%	8%	6%	43%	2.35	15.48	22.60	16.61	10.21	48.02
	LC141	10593820	10593877	1%	2%	17%	23%	14%	6%	53%	2.01	16.70	22.74	12.57	5.11	44.83
	LC142	110027121	110027221	1%	3%	7%	23%	39%	7%	33%	2.37	6.35	22.70	36.30	6.54	30.01
	LC143	143598229	143598225	1%	1%	6%	12%	5%	2%	16%	2.48	15.03	22.64	19.72	4.31	29.27
	LC144	145893047	145893043	1%	4%	9%	30%	14%	7%	29%	3.07	6.14	22.63	10.90	5.54	22.04
	LC146	143393654	143393645	1%	1%	13%	22%	26%	11%	11%	1.45	0.50	22.10	82.48	23.48	21.17
	LC148	118312919	118312909	1%	3%	13%	22%	28%	5%	11%	2.57	12.05	22.08	23.61	4.33	9.25
	LC147	7771798	777179841	1%	1%	12%	22%	3%	4%	28%	1.14	11.00	21.80	32.71	3.86	26.04
	LC148	155412295	155412375	1%	1%	5%	12%	6%	2%	10%	2.01	10.12	21.79	11.77	3.85	19.36
	LC149	70947017	70947014	1%	2%	19%	31%	46%	18%	38%	1.50	13.00	21.67	13.72	13.18	26.96
	LC150	65116814	65116558	1%	9%	13%	9%	18%	1%	1%	1.58	12.74	21.62	13.62	26.30	1.28
	LC151	52535577	52535870	1%	2%	6%	14%	6%	4%	21%	2.38	8.07	21.61	8.65	6.18	32.65
	LC152	10335281	10335223	1%	3%	3%	25%	3%	7%	31%	1.13	2.73	21.57	21.89	5.76	25.28

【図 2 - 1 4】

(続き)

[illegible]

【図 2-15】

(続き)

調査番号	調査区	図位位置	停止位置	平均B/Cのラウンド	床正算値	平均断面値	早期掘入値	平均断面値	平均断面と深度	平均断面と底層	NormalBC	AsBC	LCBC	SCBC	SBBC	UNDBC
LC163	9	114075	114141	1%	1%	7%	18%	6%	3%	10%	1.46	11.00	21.51	9.65	4.36	14.41
LC164	2	26407587	80326526	1%	1%	5%	12%	62%	27%	18%	1.32	9.78	21.33	11.80	48.01	28.67
LC165	7	80326526	80326526	4%	15%	33%	15%	7%	18%	21%	1.18	9.12	20.92	26.15	4.01	11.05
LC166	2	80326526	80326526	1%	1%	10%	13%	43%	4%	3%	2.08	11.62	21.28	10.07	5.17	32.81
LC167	2	80326526	80326526	1%	1%	23%	18%	11%	5%	34%	2.16	11.92	21.28	10.07	4.68	32.81
LC168	1	73511982	73512047	1%	2%	5%	21%	12%	10%	16%	2.00	4.64	21.05	12.33	10.20	15.92
LC169	7	48352435	48352434	2%	4%	18%	51%	64%	10%	45%	1.74	7.35	20.92	26.15	4.19	18.31
LC170	2	83590493	83590493	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1.74	7.35	20.92	26.15	4.19	18.31
LC171	4	83590493	83590493	1%	3%	6%	14%	12%	6%	23%	2.12	8.71	20.70	16.12	9.42	7.48
LC172	1	62777482	62777471	1%	2%	10%	22%	48%	31%	93%	1.59	9.29	20.97	45.05	29.57	95.90
LC173	2	74760527	74760527	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1.59	9.29	20.97	45.05	29.57	95.90
LC174	2	74760527	74760527	1%	1%	5%	16%	13%	7%	23%	1.42	5.07	20.96	15.46	7.00	23.49
LC175	9	1232777744	1232777744	1%	2%	12%	2%	1%	7%	4%	1.31	3.68	20.35	3.27	11.71	7.54
LC176	12	106576940	106576932	2%	3%	13%	32%	4%	11%	39%	1.93	7.98	20.27	3.46	7.05	24.97
LC177	2	10153751	10153751	2%	1%	15%	35%	32%	33%	30%	2.31	5.28	20.27	3.46	7.05	24.97
LC178	2	14726570	14726533	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	2.71	8.64	20.16	19.04	7.96	18.74
LC179	7	50432351	50432351	1%	2%	4%	6%	20%	11%	3%	1.96	20.12	11.47	24.15	15.92	18.74
LC180	6	687893	6877229	1%	4%	25%	48%	31%	24%	9%	1.75	12.22	21.04	11.47	10.21	35.10

【図 2-16】

(続き)

[illegible]

【圖 3 - 1】

小池地区への貢献 事業番号	路線名称	区間位置	停止位置	平均日交通量	平均日交通量 道路幅員別	平均日交通量 道路幅員別	平均日交通量 道路幅員別	Norm/CB	A/D/CB	L/CBC	S/CBC	S&D	U/D&B		
SC1	5	429950270	0%	4%	8%	21%	43%	32%	39%	37.37	88.03	220.17	459.99	335.17	627.38
SC2	11	143295088	0%	3%	6%	29%	73%	21%	20%	6.70	18.97	99.05	269.28	70.17	68.08
SC3	11	143295795	0%	2%	9%	26%	71%	10%	6.70	27.57	14.20	217.40	95.19	33.11	10.38
SC4	9	143295797	0%	3%	6%	28%	73%	10%	6.70	27.57	14.20	217.40	95.19	33.11	10.38
SC5	9	124132767	0%	3%	6%	28%	73%	10%	15.56	54.71	31.77	249.90	40.50	249.29	58.00
SC6	17	274673599	27.467357	0%	0%	10%	7%	25%	2.66	61.89	42.49	170.84	36.54	31.55	31.55
SC7	11	143295595	143297132	0%	4%	6%	16%	65%	14%	13.56	10.65	61.89	42.49	168.75	25.95
SC8	6	1439303478	0%	4%	6%	10%	48%	19%	25%	14.98	19.03	54.99	104.94	96.01	97.14
SC9	19	174032326	174032720	0%	3%	6%	44%	5%	22%	9.35	14.66	13.94	15.55	14.36	14.36
SC10	3	1222967076	122296828	0%	3%	17%	23%	65%	25%	61.77	39.97	34.76	151.39	57.49	143.28
SC11	10	22341891	22341898	0%	2%	13%	22%	48%	19%	24%	36.56	63.36	141.74	52.16	66.80
SC12	7	10073507	10073507	0%	2%	21%	18%	54%	15%	18.82	38.71	45.55	39.16	118.74	32.72
SC14	8	144328573	144328948	0%	2%	10%	13%	32%	22%	5.38	32.52	41.01	101.91	21.45	68.46
SC15	9	96721507	96721504	1%	3%	11%	22%	77%	28%	2.66	11.97	24.03	63.04	20.71	28.71
SC16	8	70881067	70881026	1%	4%	26%	39%	65%	38%	5.02	30.29	41.51	74.33	66.72	74.33
SC18	3	138565957	138565705	1%	4%	15%	29%	50%	25%	58.95	6.02	21.20	39.97	69.59	34.74
SC21	2	694336270	694336580	1%	3%	24%	31%	81%	32%	2.54	19.21	25.16	68.32	26.30	45.23
SC20	14	334022904	33402304	1%	4%	24%	21%	71%	15%	3.48	22.10	18.50	16.55	13.58	45.45
SC21	1	223393705	223393773	1%	4%	15%	30%	65%	24%	41.19	14.28	28.90	62.96	22.93	26.92
SC22	7	27205919	27205981	1%	7%	25%	50%	63%	42%	41.98	5.20	10.79	36.52	60.30	37.75
SC23	17	40342862	40342868	1%	3%	24%	4%	56%	23%	4.81	3.67	25.93	30.24	59.12	26.78
SC24	11	31626305	31626314	0%	4%	19%	39%	14%	39%	3.41	14.93	30.62	71.29	10.47	45.33
SC25	2	71116233	71116268	1%	4%	14%	24%	62%	15%	3.15	4.02	12.56	21.37	57.76	13.59
SC26	2	233146226	233146351	1%	2%	7%	16%	42%	15%	2.14	6.38	19.07	51.86	6.30	17.68
SC27	16	53955158	53955201	1%	5%	11%	31%	64%	13%	4.22	3.53	9.03	23.92	50.49	10.38
SC28	2	74728554	74728577	1%	4%	35%	47%	38%	31%	3.10	2.48	34.21	49.28	22.18	35.41

【図 3 - 2】

(続き)

[illegible]

30

40

【圖 3 - 3】

(続き)

[illegible]

【図 3 - 5】

(続き)

[illegible]

【圖 3 - 4】

(続き)

小紋除くカラー番紙	発色条件	遺伝子名	転写産物	遺伝子内	TSS位置	CGアライメント	Ensembl ID	遺伝子名
SC39	12	MAX.CH12.133487464.133481521				0	-	遺伝子なし
SC31	10	MAX.CH10.2262450-2264375				0	-	転写産物なし
SC32	20	DICD1	NM_033091.NM_001163399.NM_013659.NM_001967.NM_001193370	08427-25592842-284427-2559-2559	08427-25592842-284427-2559-2559	0	111063	転写産物なし
SC33	1	C2CQ4D	NM_001138003	1	1623	1	100191040	C2C2カクタン阻害剤ドメイン含有4D
SC34	5	MAX.CH1.6918378.NM_18253				1	7015	シグナルペプチド含有
SC35	7	NGP1	NM_001693378.NM_152438	0	252-262	1	33010	シグナルペプチド含有
SC36	19	CACHA1A	NM_017222.NM_022835.NM_017421.NM_000665.NM_001174	1	108-108-108-108-108	1	719	カルシウムイオンチャネル、電位依存性
SC37	11	PAX6	NM_000260.NM_001064.NM_031127612	0	702872628-3638	1	5000	ペプティド結合
SC38	1	TAL1	NM_0018189	0	0-1151	1	6888	T細胞分化因子1-遺伝子家族1
SC39	5	TEF1	NM_001193378.NM_18253	0	0-357-357	1	7015	シグナルペプチド含有
SC41	18	MAX.CH18.16384457-16384475				0	0	転写産物なし
SC42	14	SECY1	NM_001159531.NM_120638	0	744-2468	0	57598	細胞外マトリックス結合ドメイン含有
SC43	2	MAX.CH2.11160477-1116131				0	0	阻害剤結合ドメイン含有
SC44	3	SHOX2	NM_001163872.NM_106884.NM_000935	0	2655-2655-2655	1	4474	Short alphaヘリックス2
SC45	20	MAX.CH20.36967822-3697683				0	0	転写産物なし
SC46	8	INXO2-B	NM_001138271	0	0-137	0	0	NK2転写因子阻害、遺伝子発現
SC47	20	VXK1	NM_014483.NM_194245	0	931-931	1	33913	細胞外マトリックス結合
SC48	2	GAD1	NM_000817.NM_134445	0	57283748	1	2571	グルタミン酸脱炭素酵素ドメイン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、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、537、538、539、540、541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、561、562、563、564、565、566、567、568、569、570、571、572、573、574、575、576、

【図 3 - 6】

(続き)

[illegible]

【図 3 - 6】

(続き)

【圖 3-7】

(続き)

[illegible]

【圖 3-8】

(続き)

[illegible]

【図 3 - 9】

(続き)

小池元一が前線 参照番号	染色床	開封位置	停止位置	平均L/Cの平均	平均正常時	平均経線数	平均節大細数	平均節小細数	平均節上段	平均節下段	Norm./C	A/D/C	L/C/B/C	S/C/B/C	S/D/B/C	U/D/B/C
SG19	14	60952634	60962356	3%	5%	14%	20%	57%	15%	58%	1.90	4.35	7.09	5.23	20.49	
SG10	11	14326267	14309716	1%	1%	5%	16%	63%	16%	11%	1.76	10.37	39.66	119.53	31.77	31.43
SG11	2	68666653	68666653	0%	1%	32%	32%	69%	28%	87%	5.39	24.49	27.27	27.35	22.00	31.41
SG12	1	6286157	62862026	1%	7%	32%	25%	61%	33%	61%	5.31	19.42	15.86	45.08	17.31	44.69
SG13	1	73353579	72333146	2%	3%	20%	32%	64%	19%	74%	1.79	10.73	17.31	44.61	5.54	39.26
SG14	1	39908533	39908574	2%	6%	18%	13%	86%	13%	77%	3.83	10.23	17.34	39.03	7.64	44.50
SG15	1	72103627	72103627	1%	1%	10%	4%	23%	6%	16%	1.81	6.06	10.99	30.61	9.42	17.37
SG16	9	972186	972250	3%	5%	10%	31%	63%	14%	39%	1.89	3.89	11.26	26.69	4.95	14.22
SG18	8	76316557	76316676	2%	4%	10%	17%	42%	19%	43%	1.88	8.43	6.63	22.18	9.85	25.03
SG19	4	13566365	13566358	2%	4%	21%	25%	32%	13%	31%	1.70	13.70	16.37	21.03	9.34	43.21
SG19	17	27640477	27640568	0%	1%	2%	6%	59%	22%	25%	3.44	21.83	34.20	238.66	87.69	99.86
SG111	1	12165761	12165877	0%	1%	14%	17%	58%	21%	37%	3.72	23.05	27.86	92.49	13.90	33.78
SG112	10	94824222	94824264	1%	6%	11%	30%	63%	19%	54%	5.15	7.55	20.17	42.86	13.14	37.12
SG113	1	31442978	31442982	1%	2%	10%	17%	27%	7%	9%	2.58	10.59	19.10	30.03	7.86	9.86
SG114	12	94742401	94742401	1%	3%	14%	13%	40%	0%	13%	2.31	10.31	13.01	20.63	7.02	12.05
SG15	1	11062672	11062676	0%	0%	2%	12%	17%	11%	11%	10.10	25.49	36.85	126.67	24.94	105.67
SG16	14	45007704	45007704	0%	0%	0%	3%	51%	1%	4%	0.68	0.77	4.09	6.46	7.90	131.10
SG17	12	10400864	10401003	1%	3%	2%	16%	68%	19%	23%	5.01	3.26	10.34	14.96	35.53	
SG118	2	97193850	97193859	1%	1%	14%	7%	16%	13%	16%	2.04	26.37	14.00	30.21	23.54	29.64
SG119	22	19154841	19154500	0%	0%	18%	24%	48%	33%	46%	16.82	46.38	72.02	146.30	101.74	140.35
SG120	7	12195508	12195608	1%	0%	6%	11%	44%	15%	35%	6.86	5.54	7.95	30.55	10.22	24.53
SG121	19	17791728	17791720	0%	0%	2%	1%	53%	1%	15%	1.35	4.33	4.03	155.54	2.85	45.50
SG122	22	28198280	28198289	0%	1%	4%	3%	22%	3%	18%	242	11.11	8.68	64.31	7.42	45.69
SG123	2	97183166	97183253	0%	1%	13%	8%	18%	12%	21%	1.71	42.20	25.78	55.43	37.48	67.24

【図 3-10】

(続き)

細胞系	遺伝子	転写物	領域	エクソン内	T _s 重複	CpG アドレス性	Enzire ID	遺伝子名とレベル
小細胞肺癌細胞	SC99	NM_174378	-	0	130	-	317671	第18染色体短臂上にある遺伝子 転写本数 9
SC108	MAX chr11.1463627-14636716	-	-	-	-	-	-	第18染色体短臂上にある遺伝子 転写本数 9
SC109	MEIS1	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC110	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC111	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC112	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC113	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC114	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC115	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC116	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC117	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC118	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC119	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC120	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC121	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC122	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC123	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC124	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC125	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC126	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC127	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC128	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC129	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC130	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC131	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC132	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC133	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC134	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC135	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC136	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC137	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC138	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC139	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC140	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC141	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC142	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC143	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC144	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC145	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC146	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC147	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC148	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC149	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC150	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC151	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC152	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC153	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC154	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1
SC155	SR	NM_002398	-	-	4106	-	4211	Meis1 オホミックス 1

【図 3 - 1 1】

(続き)

小計番号 小計番号	関係役	停止位置	平均のC/Aの差	正常 平均	平均前 後差	平均前小 後差	平均前平 均上差	平均前平 均差	Norm/BC	A/B/C	LC/BC	SC/BC	SO/BC	UND/BC
SG124	6	1620378	1%	6%	4%	10%	45%	21%	4.88	2.02	8.68	44.83	17.72	10.09
SG125	7	1620379	2%	7%	11%	12%	46%	22%	4.89	2.03	8.69	44.84	17.73	10.10
SG126	8	1440137/5	0%	0%	20%	6%	32%	2%	5.69	301.23	80.03	36.71	144.38	
SG127	14	101033514	0%	2%	16%	7%	40%	5%	4.20	36.37	14.15	82.74	10.45	29.35
SG128	1	72237983	1%	2%	18%	26%	52%	19%	2.51	24.19	38.91	85.03	12.62	34.40
SG129	2	72237984	1%	2%	18%	26%	52%	19%	2.51	24.19	38.91	85.03	12.62	34.40
SG130	17	12350531	2%	2%	10%	6%	54%	11%	1.38	5.77	4.55	6.33	12.32	
SG131	19	43889217	3%	7%	13%	43%	34%	20%	2.98	8.19	17.60	57.17	10.67	26.25
SG132	2	118989215	1%	6%	24%	41%	80%	34%	2.62	3.11	18.18	28.19	15.99	23.85
SG133	2	65381426	2%	3%	6%	6%	15%	22%	1.28	3.07	4.62	20.61	7.25	10.58
SG134	9	131007357	1%	2%	7%	10%	20%	5%	1.68	7.04	9.68	20.01	5.98	11.03
SG135	10	131007358	1%	2%	7%	10%	20%	5%	1.68	7.04	9.68	20.01	5.98	11.03
SG136	8	124173216	0%	1%	11%	15%	49%	14%	2.50	43.78	85.65	276.65	78.49	168.03
SG137	8	108469597	1%	1%	14%	3%	62%	7%	5.8%	1.01	15.24	87.53	8.05	63.81
SG138	9	123631476	0%	1%	3%	2%	33%	6%	1.50	1.41	10.40	124.61	6.16	20.32
SG139	10	123631481	0%	1%	3%	2%	33%	6%	1.50	1.41	10.40	124.61	6.16	20.32
SG140	12	57618831	2%	4%	21%	37%	78%	30%	6.1%	12.94	23.92	50.79	19.55	39.93
SG141	19	17958907	17958902	0%	2%	10%	16%	22%	46.2	16.12	159.54	344.13	136.00	214.13
SG142	2	43435173	43435122	0%	4%	11%	91%	14%	6.52	10.71	44.90	255.13	59.72	100.72
SG143	12	11865311	11865355	0%	1%	0%	27%	7%	7.16	1.05	46.36	214.21	10.66	34.36
SG144	9	21965268	21965573	1%	2%	11%	75%	13%	1.57	2.60	13.05	68.72	16.10	31.68
SG145	10	94822484	94822576	1%	5%	8%	22%	35%	4.67	7.48	20.48	53.91	15.39	29.40
SG146	10	50939353	50939389	1%	2%	6%	16%	19%	4%	1.71	5.92	37.29	45.29	5.68
SG147	8	193837552	193837594	1%	2%	4%	13%	14%	0.73	0.96	6.01	47.13	0.91	2.78

【図 3 - 1 2】

(続き)

[illegible]

【図 3 - 1 3】

(続き)

[illegible]

【図 3 - 1 4】

(続き)

[illegible]

【図 3 - 1 5】

(続き)

[illegible]

【図 3 - 17】

(続き)

[illegible]

【図 3 - 1 6】

(続き)

[illegible]

【図 3 - 1 8】

(続き)

小腸菌参照番号	染色体	遺伝子	配列	エクソン/イントロン	T A 相違	C G アラビド	Enterob ID	遺伝子ファミリー
5	MAX_0745	10333548	10333742	+	-	0	109883	アデニル酸イライター-4
SC184	14	ADCV4	NM_138247.NM_001185362.NM_01185668	+	-	1	1450; 445; 4459	1
SC185	1	MAX_071	3223780; 32237810	+	-	0	118568	1
SC186	14	TEC	NM_173849	+	1	1167	14756	penicillinase-like protein
SC187	19	GICR	NM_138501	+	0	0	1924	penicillinase-like protein
SC188	15	MAX_0715	20352738; 20352817	+	-	0	1	1
SC189	15	MAX_0715	10480776; 104802258	+	-	0	1	1
SC200	22	TUXX	NM_059932.NM_090047.NM_093646	+	-	0	1438; 1438; 1438	01899
SC201	5	MAX_0745	42895328; 42899353	+	-	0	1	1
SC202	5	MAX_0745	42895328; 42899353	+	-	0	1	1
SC203	12	BAGALNT1	NM_001478	+	1	5562	2583	ペクター1, 4-N-アセチル-β-D-ガラクトシド6-リン酸トランスフェラーゼ1
SC204	12	BAGAT1	NM_05178552.NM_05558544.NM_07176044.NM_00176081.NM_00176803	+	-	0	55; 4655; 126	ペクター1, 4-N-アセチル-β-D-ガラクトシド6-リン酸トランスフェラーゼ1
SC205	2	LOC100179726	NR_027251	+	1	-2412	100120726	ペクターポリクサス
SC206	2	LOC100179726; 1630172	NR_027251	+	1	-2412	100120726	ペクターポリクサス
SC207	9	PAX5	NM_016734	+	0	-3407	5076	ペクターポリクサス
SC208	5	MAX_0745	10333748; 10333885	+	-	0	1	1
SC209	8	SOX17	NM_022454	+	0	-3199	64321	GATV (後継膜タンパク質) ポリクサス17
SC210	2	AFB3	NM_002283.NM_00102156	+	0	3629; 274	0	3889
SC211	13	LEC11	NM_070151.NM_00101108	+	0	481; 481	11061	A-4-β-D-ガラクトシド6-リン酸-3-自由糖鎖結合タンパク質
SC212	2	MAX_0745	95401460; 95401460	+	0	1	1	1
SC213	2	HXD4	NM_014621	+	0	1116	0	3233
SC214	5	MAX_0745	10333425; 10333478	+	-	0	1	1
SC216	9	MAX_0745	10333476; 138627493	+	-	0	1	1
SC218	15	SKCR1	NM_007031887	+	0	7542	390588	β-D-ガラクトシド6-リン酸-3-自由糖鎖結合タンパク質
SC217	17	BTBD17	NM_001034646	+	1	5180	398419	BTBD17 (PODZドメインを含む) 17

95		
94		
93	參照第27	辦公休

274

1	46
2	66

3

【図 3 - 19】

(続き)

小規模企業 支援基金	募集枠	開始位置	停止位置	平均日CPIアップ	平均日定常 メンテナンス	平均日脆弱 メンテナンス	平均日大損 メンテナンス	平均日小損 メンテナンス	平均日自己 メンテナンス	Normal	ADBC	LCBC	SCBC	UNDBC		
SC0216	6	2003/14	2003/05	0%	1%	2%	13%	21%	2%	1%	1.58	3.30	28.42	44.90	4.38	1.60
SC0219	1	10/30/06/1	10/30/07/1	0%	1%	6%	10%	21%	4%	19%	6.54	35.25	44.05	91.51	18.41	82.35
SC0220	10	12/01/04/1	12/01/04/0	2%	4%	9%	32%	57%	15%	24%	2.62	5.68	18.94	35.60	9.12	15.78
SC0221	5	10/24/01/2	10/24/02/3	0%	5%	6%	11%	63%	13%	10%	41.30	62.03	68.85	479.51	95.95	77.29
SC0222	14	6/09/07/4	6/07/08/0	3%	5%	31%	26%	64%	28%	64%	2.07	10.76	9.12	22.28	9.02	22.37
SC0223	1	22/05/24/1	22/05/24/1	1%	5%	11%	20%	50%	5%	29%	5.74	14.55	37.83	54.48	7.33	40.64
SC0224	12	2/03/05/4	2/03/05/4	1%	3%	14%	27%	30%	17%	30%	5.05	23.18	44.87	51.11	28.90	93.14
SC0225	12	4/10/04/5	4/10/04/2	0%	1%	2%	3%	11%	1%	4%	2.43	6.24	6.50	39.21	4.13	15.23
SC0226	1	4/06/05/1	4/06/06/1	0%	1%	24%	13%	51%	16%	48%	4.42	22.37	17.39	47.83	15.43	45.63
SC0227	2	3/04/5/6/0	3/04/5/6/7	0%	2%	15%	17%	21%	7%	22%	7.67	47.98	55.02	69.82	24.31	72.43
SC0228	2	2/4/03/04	2/4/03/01	1%	2%	3%	6%	44%	15%	17%	3%	5.50	16.17	37.75	20.51	34.54
SC0229	4	6/59/2/5	6/59/2/3	0%	1%	4%	14%	14%	7%	18%	3.88	6.94	36.29	88.66	16.16	46.41
SC0230	10	5/27/07/0	5/27/07/5	0%	0%	11%	13%	33%	7%	24%	0.41	1.18	22.78	71.20	13.46	14.52
SC0231	0	6/06/05/42	6/06/05/4	1%	3%	10%	29%	44%	29%	24%	2.42	6.95	10.76	40.90	20.93	22.65
SC0232	12	2/05/01/83	2/05/02/48	1%	5%	19%	37%	54%	29%	64%	4.03	13.60	27.03	39.72	21.36	47.09
SC0233	14	8/09/06/21	8/09/06/31	1%	2%	6%	5%	48%	6%	37%	1.50	4.85	3.76	34.78	4.76	28.23
SC0234	14	7/10/04/24	7/10/04/20	1%	3%	2%	13%	42%	6%	24%	1.84	4.40	1.39	30.93	3.53	17.37
SC0235	6	2/6/27/4/8	2/6/27/3/8	2%	3%	4%	28%	39%	9%	34%	1.84	2.40	17.99	25.11	5.79	22.17
SC0236	17	7/20/21/56	7/20/21/56	0%	1%	2%	3%	27%	1%	9%	2.51	1.92	7.56	73.93	3.66	25.72
SC0237	6	13/07/09/11	13/07/09/11	2%	4%	11%	18%	44%	10%	18%	1.83	5.86	4.98	22.78	5.22	9.41
SC0238	8	2/17/54/37	2/17/55/68	1%	2%	7%	16%	23%	8%	14%	3.23	9.37	21.74	31.93	8.81	19.25

【図 3 - 2 1】

(続き)

小幡 香里子 一騎	池袋駅	固圀駅	止り位置	平均BC7.0以下	平均正當部	平均膝線	平均膝上線	平均膝上腰	平均未定部線	Norm.BC	AdB	LC.BC	SC.BC	SO.BC	UND.BC
SG239	4	17513697	17513607	2%	4%	5%	22%	35%	37%	2.24	3.27	13.71	23.04	4.52	23.04
SG240	9	94444634	94444124	2%	7%	6%	17%	44%	43%	3.20	2.74	8.49	21.60	6.05	33.33
SG241	11	19263615	19263612	2%	4%	5%	18%	54%	13%	2.47	0.32	3.32	10.14	10.14	7.44
SG242	22	31481121	31481159	0%	1%	5%	9%	59%	28%	2.63	15.70	28.55	170.11	15.93	81.64
SG243	6	27059742	27059869	0%	2%	4%	4%	38%	3%	4.04	10.35	10.26	10.70	8.90	110.25
SG244	7	22253886	22253943	1%	1%	3%	3%	13%	10%	1.55	4.46	5.60	26.78	8.83	16.46
SG245	11	516824	516795	0%	6%	6%	6%	24%	6%	1.64	2.41	3.50	13.97	39.68	15.71
SG246	22	31481626	31481910	1%	2%	12%	10%	59%	18%	1.46	6.89	8.87	34.17	4.41	12.41
SG247	17	48838503	48838606	1%	2%	3%	5%	21%	6%	2.71	3.51	6.21	24.43	5.92	7.43
SG248	10	26727698	26728120	0%	2%	4%	6%	19%	24%	11.37	38.27	43.76	130.11	15.00	180.22
SG249	7	23535854	23536064	1%	1%	6%	5%	47%	16%	1.38	5.78	5.37	45.60	2.76	15.09
SG250	9	94444127	94444240	1%	5%	3%	14%	45%	44%	2.41	2.74	12.60	43.62	10.94	39.33
SG251	17	37321244	37321212	0%	1%	2%	3%	16%	4%	1.92	6.27	9.76	56.07	21.36	16.09
SG252	11	15858377	15858356	1%	3%	1%	1%	13%	13%	2.42	20.18	15.82	26.82	11.79	10.87
SG253	1	11685847	11685835	1%	3%	24%	19%	33%	14%	4.22	20.18	15.82	26.82	11.79	10.87
SG254	4	40233084	40237022	3%	5%	30%	33%	74%	77%	1.58	9.71	11.35	24.36	7.07	25.14
SG255	16	24220768	24220758	0%	0%	1%	0%	10%	1%	2.62	1.85	22.40	26.94	8.01	13.13
SG256	19	44221599	44221596	0%	0%	0%	45%	1%	1%	2.62	1.85	22.40	26.94	8.01	13.13
SG257	19	13955078	13955068	1%	3%	3%	4%	37%	9%	1.86	2.62	9.53	4.40	37.32	8.87
SG258	1	32410360	32410416	1%	0%	1%	2%	20%	8%	2.28	2.33	3.16	46.05	14.55	45.81
SG259	15	55446910	55446913	0%	1%	1%	5%	18%	8%	4.22	4.26	17.63	124.48	83.79	26.93

【図 3 - 2 0】

(続き)

[illegible]

【図 3 - 2 2】

(続き)

[illegible]

【図 3 - 2 2】

(続き)

【図 3 - 2 3】

(続き)

小断面 参照値	断面形状	陸地位置	停止位置	平均B/Cの上下	平均正常断面	平均断面積	平均前小断面	平均前上床	平均水面定着率	Norm/B/C	A/B/C	LC/B/C	SC/B/C	SG/B/C	UND/B/C
SC260	12	25102040	25102115	0%	0%	2%	7%	30%	6%	46%	0.98	1.54	6.05	5.12	37.73
SC261	12	25102040	25102103	0%	0%	0%	0%	24%	4%	40%	1.38	1.02	29.21	97.73	163.70
SC262	5	160004211	160004214	0%	1%	9%	13%	30%	2%	22%	3.71	29.12	46.14	93.41	5.35
SC263	7	36359500	36359534	1%	4%	23%	13%	33%	5%	12%	3.30	16.65	10.00	29.57	3.82
SC264	20	44746081	44746088	1%	2%	5%	6%	25%	3%	7%	1.71	5.43	6.38	3.23	6.91
SC265	17	70216030	70216034	2%	4%	17%	23%	46%	16%	70%	1.74	8.10	19.23	23.33	7.56
SC266	2	24343185	24343264	0%	1%	10%	11%	31%	3%	23%	25.98	28.41	49.98	19.37	6.89
SC267	19	16022754	16022763	1%	3%	26%	23%	40%	19%	40%	2.71	20.95	19.27	32.56	15.43
SC268	6	15357573	15357578	2%	3%	3%	23%	65%	16%	33%	1.62	2.76	12.83	8.20	17.06
SC269	12	54813868	54812467	1%	2%	12%	18%	28%	9%	9%	1.67	11.36	14.63	26.03	8.56
SC270	17	36204483	36204540	2%	4%	6%	12%	44%	9%	44%	2.57	3.62	7.26	25.84	5.35
SC271	11	64109276	64109358	0%	4%	16%	19%	40%	9%	21%	13.17	51.71	50.08	126.96	27.78
SC272	5	10955057	10953450	0%	4%	11%	20%	50%	3%	29%	4.01	11.13	19.49	50.32	2.86
SC273	12	22480883	22487058	0%	1%	5%	11%	26%	12%	43%	1.71	19.90	40.32	104.42	164.13
SC274	19	65238816	65238842	0%	1%	6%	15%	24%	17%	33%	6.00	94.83	176.68	277.57	203.93
SC275	9	124132450	124132450	0%	0%	0%	0%	11%	0%	0%	4.00	1.95	2.34	49.53	1.56
SC276	5	37634916	37635022	0%	5%	9%	28%	55%	37%	42%	3.33	7.76	25.11	46.29	33.19
SC277	1	61519409	61519521	1%	3%	3%	9%	32%	10%	19%	4.48	4.18	12.69	46.99	13.76
SC278	19	14671553	14671616	2%	4%	11%	23%	53%	15%	42%	2.08	5.76	12.68	29.57	7.57
SC279	3	186548031	186548076	1%	1%	2%	4%	23%	6%	2%	1.18	2.18	3.54	22.27	5.47

【図 3 - 2 5】

(続き)

[illegible]

【図 3 - 2 4】

(続き)

染色体	遺伝子	転写物	読み内	TSS位置	CpGアライメント	Enter ID	遺伝子名/トランスクリプター		
SC269	12	9CA11	NM_001789502.NM_005504.NM_01176031	-	1	353,332,353	分岐点Aノミ/トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1		
SC281	12	9CA11	NM_001789502.NM_005504.NM_01176031	-	0	353,333,353	トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1		
SC282	5	DOCK2	NM_004846	+	0	-30	1794	トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1	
SC283	7	PCNT	NM_003088	+	0	3297	0624	トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1	
SC284	20	CD40	NM_001250.NM_152854	+	0	-224,224	0	958	トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1
SC285	17	MAX	NM_001789502.NM_004834	-	0	-	-	-	トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1
SC286	2	MAX	NM_001789502.NM_004834	-	0	-	-	-	トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1
SC287	19	MAX	NM_001789502.NM_004834	-	0	-	-	-	トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1
SC288	6	MAX	NM_001789502.NM_004834	-	0	-	-	-	トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1
SC289	12	ITGA5	NM_002025	-	0	954	0	3878	トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1
SC290	17	LOC284100	NM_004834	-	0	309500	0	284100	トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1
SC291	11	GDCC3B	NM_003251	+	0	560	0	283254	トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1
SC292	5	ANKRD3B	NM_001789502.NM_005504.NM_01176031	-	0	-353	1	631748	トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1
SC293	12	100A1	NM_003251	-	0	705	1	0439	トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1
SC294	19	ZNF871	NM_024833	-	1	172	1	7981	トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1
SC295	9	STOM	NM_001789502.NM_005504.NM_01176031	-	0	-30	1	2040	トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1
SC296	5	GONF	NM_003251	-	0	101310	1	04008077	トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1
SC297	1	MAX	NM_001789502.NM_005504.NM_01176031	-	0	-	0	1	トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1
SC298	19	APC2	NM_005883	-	0	171098	1	10297	トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1
SC299	3	100A1	NM_003251	+	0	-283,283	0	6440	トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1、トランスクリプター-2-1

【圖 3-26】

(続き)

小細胞がん分類 参照番号	染色体 異常	遺伝子	発症物	患 者	コホート内 症例	T 分期	Clinical Stage	Enteric ID	遺伝子変異 ペイランド
SC260	8	BP1-H222	NM_152414	+	0	-2764	0	27319	連続再発タリプタマール+インターフェロンβ、インターフェロンβ2
SC261	9	MAX chr1 9p17.337.2-9p17.3746	-	-	0	-	1	-	-
SC262	1	MAX chr1 11p22.17-11p22.1221	-	-	0	-	1	-	-
SC263	21	CBS	NM_011780555.NM_001178005.N NM_008146.NM_001180423	+	0	1549,1549,1117	1	975	シタラビウム+インターフェロンα-2
SC264	17	(QF-BP1)	SC chr17 17p11.3151107.6-151107.6	+	0	-1379,-1379	1	10642	インターフェロンα2+インターフェロンβ2
SC265	9	BARX1	NM_021570	+	0	2193	1	58033	配合シタラビウム
SC266	6	MAX chr6 17p57.1374-17p57.1528	-	-	0	-	1	-	-
SC267	6	MAX chr6 17p57.1374-17p57.1528	-	-	0	-	1	-	-
SC268	1	PROX1	NM_007763	+	0	-2647	1	5320	0.03450 9p1.31-9p1.31
SC269	6	GMO3	NM_001500	+	0	3521549	1	2762	GDP+インターフェロンα2+インターフェロンβ2
SC270	6	MAX chr6 3p25.3558-3p25.36006	-	-	0	-	1	-	-
SC271	6	NRN1	NM_018588	+	0	3335	1	51269	インターフェロンα2+インターフェロンβ2
SC272	1	TRAF3	NM_016411	+	0	1711	1	25893	インターフェロンα2+インターフェロンβ2
SC273	1	TRAF3	NM_016411	+	0	1711	1	25893	インターフェロンα2+インターフェロンβ2
SC274	17	C17orf48	NM_152443	+	0	125	1	124763	第17染色体再発+インターフェロンα2
SC275	13	PDCAF	NM_005650.NM_002949	+	0	1435,1475	1	5109	インターフェロンα2
SC276	2	EMX1	NM_004697	+	0	3245	1	2019	0.0304 8p11.0-8p11.0
SC277	6	SLC3D3	NM_00100783	+	0	1066	1	340146	第6染色体再発+インターフェロンα2
SC278	1	MAX chr1 2p11.12349.1-2p11.12481	-	-	0	-	1	-	-
SC279	5	GDNF	NM_001180445.NM_001180485.N NM_005144.NM_19231	+	0	1213,1213,5068,677	1	2366	グリアル腫瘍+インターフェロンβ2
SC300	19	C19orf45	NM_003239	+	1	5480	1	1087	腫瘍腫瘍+インターフェロンβ2
SC301	9	BARX1	NM_021570	+	1	2224	1	58033	BARX1+インターフェロンα2
SC302	20	NKX2-2	NM_005059	+	0	1208	1	4821	NK2+インターフェロンα2
SC303	19	C19orf45	NM_003239	+	1	5480	1	1087	腫瘍腫瘍+インターフェロンβ2
SC304	19	C19orf45	NM_003239	+	1	11375-11376	1	5285	サイトヘン2

【図 3 - 2 7】

(続き)

小細胞用カラー首絞 参照番号	染色体	開始位置	停止位置	平均B C/A ランド	平均正常姉妹	平均姉妹姉妹	平均姉妹大姉妹	平均姉妹小姉妹	平均姉妹平上段	平均姉妹平上段	平均姉妹平上段	Norm/B C	Ad B/C	LC/B/C	SC/B/C	SO/B/C	UND/B/C
SC205	8	10440524	10440524	1%	2%	11%	18%	30%	18%	3%	1.88	0.31	15.77	25.30	15.66	2.40	
SC206	5	148792249	148792285	0%	3%	1%	5%	23%	13%	17%	17.71	6.75	24.00	147.02	94.05	59.42	
SC207	6	44110771	44110772	0%	1%	1%	7%	14%	5%	10%	2.29	1.84	17.47	34.31	13.05	24.44	
SC208	19	3810357	3810357	1%	2%	18%	13%	29%	17%	28%	1.78	1.67	11.59	24.34	15.34	29.69	
SC209	17	243020410	243020410	2%	4%	20%	28%	42%	15%	48%	2.20	11.26	15.81	22.98	9.32	25.30	
SC210	17	43333204	43333204	1%	4%	11%	4%	41%	12%	11%	1.45	6.50	22.16	82.48	23.48	21.17	
SC211	5	13437362	13437363	0%	1%	5%	13%	35%	5%	17%	3.15	10.56	28.38	60.54	10.94	38.65	
SC212	10	101300100	101300155	1%	3%	10%	16%	24%	5%	7%	3.69	13.71	22.13	33.20	8.17	9.10	
SC213	5	31534545	31534545	2%	5%	13%	25%	50%	33%	32%	8.38	18.84	32.37	35.14	21.61		
SC214	20	38013131	38013210	0%	2%	4%	4%	20%	7%	11%	9.17	23.33	24.85	124.06	40.05	68.15	
SC215	3	10554303	10554480	0%	0%	0%	3%	11%	4%	2%	3.51	1.45	20.47	107.48	30.06	15.42	
SC216	12	25050015	25050016	0%	1%	10%	10%	25%	10%	35%	1.51	27.82	30.51	60.55	27.10	95.52	
SC217	8	151550700	151550700	1%	3%	3%	17%	49%	11%	11%	2.07	1.70	11.91	33.83	7.40	7.57	
SC218	12	122231765	122231920	1%	1%	1%	7%	18%	2%	1%	1.59	2.48	12.95	35.04	3.13	2.54	
SC219	3	142807149	142807232	1%	1%	3%	4%	24%	1%	10%	0.83	4.11	5.33	32.87	1.38	13.04	
SC220	19	5997056	5997125	2%	4%	12%	29%	49%	9%	30%	2.12	6.20	14.79	24.80	4.33	18.25	
SC221	11	76730874	76730881	1%	8%	30%	27%	32%	19%	64%	10.49	41.11	30.46	11.09	58.31		
SC222	19	2257385	2257400	2%	4%	15%	18%	65%	10%	22%	2.23	8.48	10.23	37.40	5.68	12.69	
SC223	3	15426353	15426353	1%	5%	3%	12%	36%	14%	7%	7.07	7.72	17.80	50.01	21.03	10.07	

【図 3 - 2 8】

(続き)

小細胞用カラー首絞 参照番号	染色体	開始位置	停止位置	平均B C/A ランド	平均正常姉妹	平均姉妹姉妹	平均姉妹大姉妹	平均姉妹小姉妹	平均姉妹平上段	平均姉妹平上段	平均姉妹平上段	Norm/B C	Ad B/C	LC/B/C	SC/B/C	SO/B/C	UND/B/C
SC224	8	148792249	148792285	0%	3%	1%	5%	23%	13%	17%	17.71	6.75	24.00	147.02	94.05	59.42	
SC225	5	13437362	13437363	0%	1%	5%	13%	35%	5%	17%	3.15	10.56	28.38	60.54	10.94	38.65	
SC226	10	101300100	101300155	1%	3%	10%	16%	24%	5%	7%	3.69	13.71	22.13	33.20	8.17	9.10	
SC227	5	31534545	31534545	2%	5%	13%	25%	50%	33%	32%	8.38	18.84	32.37	35.14	21.61		
SC228	20	38013131	38013210	0%	2%	4%	4%	20%	7%	11%	9.17	23.33	24.85	124.06	40.05	68.15	
SC229	3	10554303	10554480	0%	0%	0%	3%	11%	4%	2%	3.51	1.45	20.47	107.48	30.06	15.42	
SC230	12	25050015	25050016	0%	1%	10%	10%	25%	10%	35%	1.51	27.82	30.51	60.55	27.10	95.52	
SC231	8	151550700	151550700	1%	3%	3%	17%	49%	11%	11%	2.07	1.70	11.91	33.83	7.40	7.57	
SC232	12	122231765	122231920	1%	1%	1%	7%	18%	2%	1%	1.59	2.48	12.95	35.04	3.13	2.54	
SC233	3	142807149	142807232	1%	1%	3%	4%	24%	1%	10%	0.83	4.11	5.33	32.87	1.38	13.04	
SC234	19	5997056	5997125	2%	4%	12%	29%	49%	9%	30%	2.12	6.20	14.79	24.80	4.33	18.25	
SC235	11	76730874	76730881	1%	8%	30%	27%	32%	19%	64%	10.49	41.11	30.46	11.09	58.31		
SC236	19	2257385	2257400	2%	4%	15%	18%	65%	10%	22%	2.23	8.48	10.23	37.40	5.68	12.69	
SC237	3	15426353	15426353	1%	5%	3%	12%	36%	14%	7%	7.07	7.72	17.80	50.01	21.03	10.07	

【図 3 - 2 9】

(続き)

小細胞用カラー首絞 参照番号	染色体	開始位置	停止位置	平均B C/A ランド	平均正常姉妹	平均姉妹姉妹	平均姉妹大姉妹	平均姉妹小姉妹	平均姉妹平上段	平均姉妹平上段	平均姉妹平上段	Norm/B C	Ad B/C	LC/B/C	SC/B/C	SO/B/C	UND/B/C
SC238	1	16760724	16760725	0%	1%	5%	1%	13%	1%	1%	1%	7.00	23.41	52.76	62.10	15.82	79.50
SC239	19	43863725	43863725	2%	5%	20%	17%	47%	19%	47%	1.94	8.78	7.43	20.22	4.38	10.74	
SC240	9	139159286	139159286	0%	1%	1%	1%	1%	2%	28%	5.80	6.02	8.81	135.14	13.04	185.99	
SC241	19	13208376	13208376	1%	1%	2%	6%	30%	2%	5%	5%	1.07	8.35	32.16	2.49	5.48	
SC242	21	26934474	26934474	0%	1%	8%	10%	22%	4%	20%	5.32	65.57	61.25	138.68	27.77	121.89	
SC243	6	108905025	108905025	0%	2%	2%	7%	50%	4%	25%	3.58	4.28	15.50	103.25	8.22	48.89	
SC244	7	158701661	158701661	1%	1%	1%	6%	17%	5%	6%	1.70	1.82	1.48	21.71	0.40	0.60	
SC245	4	77140806	77140806	1%	4%	13%	16%	33%	12%	52%	4.93	18.42	19.77	42.81	14.00	83.25	
SC246	5	28323223	28323223	2%	5%	15%	19%	35%	15%	49%	2.10	8.33	8.10	23.50	6.78	21.33	
SC247	15	29521540	29521540	1%	5%	8%	22%	41%	17%	23%	3.41	3.62	14.78	27.38	11.77	15.51	
SC248	14	91177371	91177371	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1.85	3.75	3.10	11.01	4.39	37.35	
SC249	1	68634567	68634567	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	2.59	3.84	3.13	64.78	15.15	35.89	
SC250	1	21390599	21390599	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1.41	4.52	37.03	6.29	7.19		
SC251	21	30042030	30042030	1%	2%	4%	22%	41%	13%	55%	1.88	3.80	23.37	43.13	13.73	57.60	
SC252	3	170137439	170137439	2%	5%	15%	34%	49%	33%	62%	2.78	9.08	20.29	19.46	10.46	38.27	
SC253	6	158243942	158243942	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1.38	1.60	2.72	38.48	1.88	14.51	
SC254	12	125544960	125544960	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	3.25	1.48	24.32	68.16	12.02	0.81	
SC255	12	19080501	19080501	0%	0%	0%	8%	23%	0%	4%	0.76	0.41	20.08	57.07	0.76	9.84	
SC256	10	118312018	118312018	1%	3%	15%	26%	28%	5%	11%	2.57	12.68	22.08	25.81	4.33	9.25	
SC257	13	25321012	25321012	1%	2%	2%	6%	26%	16%	28%	2.12	2.30	7.65	31.63	19.72	31.63	
SC258	7	94158753	94158753	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1.61	10.63	12.81	27.46	7.28	24.73	
SC259	4	66605982	66605982	1%	2%	13%	21%	23%	11%	23%	2.18	11.75	18.47	24.32	9.50	20.20	

【図 3 - 3 0】

(続き)

小細胞用カラー首絞 参照番号	染色体	遺伝子	転写番号	領域	エクソン内	隣接	CPG ID	Ensembl ID	遺伝子名
SC260	1	RCSD1	NM_058862	+	0	261	1	92241	RCSD1ドメイン含有1
SC261	19	KATNAL2	NM_033303	+	1	352	1	83473	カタリニン-2のサブユニットA様2
SC262	9	MAX chr5 139159286-139189348	NM_046228.NM_017457	+	0	112111271	1	9266	ライヘン2
SC263	5	CON2	NM_00397990	+	1	43	1	645121	サイクリン2ファミリー、メンバー2
SC264	21	MR15SHG	NM_01458	+	1	16	1	114014	(遺伝子発現調節因子) absent in melanoma 1
SC265	6	AMN	NM_074624	+	1	1101	0	202	
SC266	7	MAX chr7 150701605-150701795		+	0	0	0	0	
SC267	1	TAL1	NM_003189	0	-	2343	1	6886	T細胞抗原決定子1サブクラス1
SC268	5	MAX chr5 77140806-77140806		+	0	0	1	+	
SC269	15	MAX chr15 29521540-29521540		+	0	0	1	+	
SC270	6	MAX chr6 29521540-29521881		+	0	0	1	+	Ras及びRan結合ドメイン3
SC271	14	RIN3	NM_024832	+	0	513	1	76860	ラリジン
SC272	9	PLN2	NM_01122	+	0	258	1	123	プレナム2
SC273	9	PLN2	NM_01122	+	0	258	1	123	プレナム2
SC274	1	KULP1	NM_001148310	+	0	2513	1	18990	第1免疫細胞シグナルトランスド プレナム8
SC275	21	CLIG8	NM_053277	+	0	343	1	34102	クロロフィル結合タンパク質6
SC276	3	CTN1	NM_055565.NM_0556102	+	0	4557719	1	51429	シグナル伝達タンパク質9
SC277	6	SNR3	NM_018224	+	0	351	0	1	
SC278	12	MAX chr12 125544960-125544960		+	0	0	1	+	
SC279	12	CACNA2D4	NM_172384	+	0	121859	1	93569	カルシウムチャンネル、電位依存性 アミラチン6/カルチオグラフィット4
SC280	10	MAX chr10 118312018-118312018		+	0	0	1	+	
SC281	13	MAX chr13 25321012-25321012		+	0	0	1	+	
SC282	9	PLN3	NM_008384	+	0	2471	1	4783	遺伝子、インターロキン3調節性
SC283	4	MAX chr4 8960582-89605982		+	0	0	1	+	

【図 3 - 3 1】

(続き)

小細胞がん参照番号	染色体	開結位置	停止位置	平均B.C.アライメント	平均正常線	平均腫瘍線	平均腫瘍大線	平均腫瘍小線	平均腫瘍上皮	平均腫瘍平滑	平均未分化線	Norm.BC	Ad.BC	LC.BC	SC.BC	SO.BC	UND.BC
SC350	5	77148097	77147074	2%	2%	10%	19%	35%	9%	24%	13%	5.91	8.99	20.76	5.24	14.34	5.24
SC351	3	14411147	10411819	0%	0%	13%	25%	43%	19%	41%	9.97	30.31	44.49	129.02	58.83	111.27	58.83
SC352	3	2989976	2980965	0%	0%	5%	19%	32%	8%	9%	3.14	18.20	29.96	7.08	18.46	7.08	18.46
SC353	17	41389552	41389512	0%	0%	2%	21%	6%	15%	9%	0.60	4.16	55.55	15.12	39.77	15.12	39.77
SC356	10	77168201	77168360	1%	2%	3%	7%	29%	5%	9%	1.99	2.00	7.70	29.70	5.27	7.70	5.27
SC356	11	126243348	126243401	2%	5%	17%	29%	48%	41%	65%	2.48	6.04	13.91	22.93	19.19	31.01	19.19
SC357	10	119260757	119260702	1%	1%	1%	9%	28%	3%	6%	1.03	1.30	10.19	32.99	3.39	6.47	3.39
SC358	18	21198263	21198532	0%	1%	10%	8%	17%	5%	6%	4.08	33.90	26.89	56.35	15.34	21.73	15.34
SC359	1	877482	8277571	1%	2%	10%	22%	48%	31%	59%	1.59	9.26	20.87	45.88	28.57	58.50	28.57
SC360	1	2989151	2989207	1%	3%	5%	19%	32%	10%	18%	3.23	4.95	19.45	34.02	10.98	17.08	10.98
SC361	1	44031599	44031656	0%	2%	24%	16%	21%	21%	18%	4.80	73.23	56.94	66.06	64.07	56.57	64.07
SC362	2	27232734	27232702	0%	5%	12%	21%	48%	20%	34%	2.43	6.01	10.74	23.94	10.31	18.04	10.31
SC363	14	77591546	77591007	0%	1%	2%	17%	10%	2%	3%	3.66	4.59	0.87	84.89	37.49	37.51	37.49
SC364	13	33924448	33924460	1%	2%	4%	12%	37%	5%	11%	1.76	2.62	8.52	26.18	3.74	7.69	3.74
SC367	1	20359559	20359624	1%	1%	2%	2%	13%	2%	2%	1.20	3.53	3.97	24.55	3.16	3.16	3.16
SC368	10	5030424	50303465	1%	3%	11%	4%	25%	6%	40%	4.08	16.14	6.73	42.96	10.09	68.03	10.09
SC369	12	12334190	12334441	0%	1%	1%	9%	24%	9%	0%	4.31	9.32	40.26	134.03	25.97	6.00	25.97
SC370	15	41787438	41787449	1%	4%	19%	11%	43%	18%	2%	3.99	19.40	11.22	47.23	16.98	1.89	16.98
SC371	13	41787592	41787634	1%	6%	15%	13%	48%	18%	3%	5.95	13.44	13.55	46.26	18.80	3.53	13.55
SC372	8	38323572	38323553	0%	1%	4%	1%	10%	8%	6%	2.27	17.87	2.23	48.12	26.23	27.48	26.23

【図 3 - 3 2】

(続き)

小細胞がん参照番号	染色体	開結位置	停止位置	平均B.C.アライメント	平均正常線	平均腫瘍線	平均腫瘍大線	平均腫瘍小線	平均腫瘍上皮	平均腫瘍平滑	平均未分化線	Norm.BC	Ad.BC	LC.BC	SC.BC	SO.BC	UND.BC
SC380	5	MAX.chr5.77148097	77147074	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC382	3	GP1	GP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC383	3	GP1	GP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC384	17	NH1	NH1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC385	10	NCRNA0045	NCRNA0045	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC386	11	BARX2	BARX2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC387	10	EMX2C	EMX2C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC388	18	ANFRD28	ANFRD28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC389	1	MAX.chr1.827485.8277971	8277971	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC390	1	MAX.chr1.158443.NM_021214	158443	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC391	1	MAX.chr1.158443.NM_021214	158443	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC392	1	P1PFR	P1PFR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC393	14	MAX.chr14.7756146.77561507	77561507	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC394	5	MAX.chr5.252524.4.2525242	4.2525242	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC395	15	ITPKA	ITPKA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC396	13	MAX.chr13.3352448.33524560	33524560	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC397	1	ATP2B4	ATP2B4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC398	19	KLHL	KLHL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC399	12	MAX.chr12.1265241.126524241	126524241	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC400	15	ITPKA	ITPKA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC401	15	ITPKA	ITPKA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC402	8	FGFR1	FGFR1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

【図 3 - 3 3】

(続き)

小細胞がん参照番号	染色体	開結位置	停止位置	平均B.C.アライメント	平均正常線	平均腫瘍線	平均腫瘍大線	平均腫瘍小線	平均腫瘍上皮	平均腫瘍平滑	平均未分化線	Norm.BC	Ad.BC	LC.BC	SC.BC	SO.BC	UND.BC
SC373	22	42470432	42470400	0%	1%	2%	1%	11%	0%	1%	1.87	4.82	27.76	31.05	10.18	2.50	2.50
SC374	2	74782068	74782223	0%	1%	1%	10%	15%	22%	12%	2.00	2.81	35.72	55.98	79.79	42.48	42.48
SC376	1	2035898746	203589782	0%	0%	0%	2%	3%	17%	2%	3%	1.78	6.34	14.03	90.60	6.86	16.53
SC377	14	247160133	247160195	1%	2%	12%	9%	29%	11%	2%	1.26	8.82	6.65	21.71	8.98	1.18	1.18
SC378	7	27180525	27180554	1%	2%	21%	31%	37%	19%	86%	3.72	24.32	35.89	42.10	20.22	94.49	20.22
SC379	1	259414714	25941474	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
SC380	7	27185748	27185828	1%	5%	25%	35%	38%	24%	62%	3.88	17.21	25.20	26.33	18.93	48.45	18.93
SC381	5	178957576	17895765	1%	2%	15%	18%	41%	17%	24%	3.97	28.20	34.64	78.81	31.81	45.24	31.81
SC382	22	28118164	28118198	0%	2%	6%	7%	17%	2%	18%	3.07	11.31	13.16	33.76	38.76	38.56	38.56
SC383	4	13524353	13524376	1%	2%	7%	21%	28%	11%	23%	3.50	10.37	32.37	43.87	17.49	30.14	30.14
SC384	20	3052753	3052851	1%	3%	17%	19%	35%	11%	15%	5.20	29.24	32.93	60.92	19.81	26.66	19.81
SC387	1	78511734	78511827	1%	2%	15%	32%	24%	19%	51%	2.81	18.47	33.63	28.26	16.15	62.64	16.15
SC388	14	62271606	62271600	0%	1%	1%	15%	25%	2%	2%	4.07	2.61	62.74	103.40	7.25	7.45	7.25
SC389	1	259414714	25941474	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1.43	9.41	34.37	33.30	4.75	4.09	4.09
SC391	18	58000006	58000041	1%	2%	11%	9%	35%	4%	16%	1.66	9.97	6.70	34.81	3.53	15.72	3.53
SC392	4	1181145	1181117	0%	1%	3%	1%	13%	2%	47%	13.21	6.11	53.93	28.35	7.75	7.75	7.75
SC393	5	134878621	13487908	1%	2%	5%	21%	40%	6%	35%	3.43	6.08	33.63	65.55	9.28	58.82	9.28
SC394	1	221052431	221052476	1%	2%	10%	17%	20%	2%	40%	3.56	15.30	26.04	30.31	2.76	60.01	2.76
SC396	2	23527285	23527325	1%	3%	4%	5%	32%	9%	17%	3.87	5.99	6.44	43.13	11.79	23.75	11.79

【図 3 - 3 4】

(続き)

小細胞がん参照番号	染色体	開結位置	停止位置	平均B.C.アライメント	平均正常線	平均腫瘍線	平均腫瘍大線	平均腫瘍小線	平均腫瘍上皮	平均腫瘍平滑	平均未分化線	Norm.BC	Ad.BC	LC.BC	SC.BC	SO.BC	UND.BC
SC373	22	FAM109B	NM_001022934	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC374	2	DOK1	NM_001187960.NM_001361	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC376	1	ATP2B4	NM_001001393.NM_001684	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC378	7	HCAX7	NM_014430	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC379	1	HCAX7	NM_014430	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC380	7	HCAX7	NM_014430	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC381	5	MAX.chr5.178957576.17895765	17895765	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC382	22	NH1	NM_002430	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC383	5	MAX.chr5.77288924.77288718	77288718	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC384	1	PTPRU	NM_133178.NM_133177.NM_0611	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC385	4	MAX.chr4.13524353.13524376	13524376	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC387	20	GP-C2	NM_005135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC388	14	MAX.chr14.82271606.62271600	62271600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC390	13	MAX.chr13.218449.54.21848843	54.21848843	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC391	4	SPON2	NM_012445.NM_001186021.NM_012445	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC393	5	MAX.chr5.134878621.13487908	13487908	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC394	1	MAX	NM_021658	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SC396	2	MAX.chr2.23527285.23527325	23527325	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

【圖 4-1】

屋上・上屋緑化 環境基準適合率	染色係 数	周縁位置	停止位置	平均日コララビ ド	平均乾燥 率	平均乾燥大 断面	平均乾燥小 断面	平均断面上皮 率	平均未定断 面	Norm./C	Ad./RC	LC/RC	SC/RC	SO/RC	UND/B	
S01	17	38347792	38347942	0%	0%	1%	6%	16%	14%	1.33	0.67	29.58	67.04	72.74	6.92	
S02	19	58951416	58951527	1%	1%	1%	11%	14%	10%	0.66	13.66	16.97	19.94	21.09	20.26	
S03	11	14426827	14426716	1%	1%	5%	16%	62%	16%	1.78	10.37	30.66	118.53	31.77	21.41	
S04	18	44526868	44526871	1%	1%	6%	5%	22%	18%	7%	1.31	10.36	90.77	29.96	12.12	
S05	22	50867219	50867265	1%	3%	32%	35%	62%	36%	2.08	21.27	23.15	23.49	28.61	18.76	
S06	3	124800573	124800685	0%	1%	12%	34%	12%	37%	38%	1.55	29.73	28.68	91.45	97.00	
S07	17	42327627	42327686	0%	0%	11%	15%	26%	18%	32%	1.27	71.79	85.05	167.27	117.62	206.97
S08	3	124800704	124800768	0%	1%	10%	21%	9%	35%	22%	1.98	23.37	51.32	20.78	84.00	51.60
S09	8	145106333	145106439	0%	2%	24%	25%	9%	25%	20%	4.89	59.06	71.50	22.47	62.77	65.19
S010	2	97193508	97193639	1%	1%	14%	7%	16%	13%	16%	2.04	26.57	14.00	30.21	23.54	28.94
S011	0	98960342	98960634	1%	1%	10%	20%	44%	28%	24%	8.56	18.79	40.59	22.50	22.50	22.50
S012	5	42965477	42965526	0%	2%	35%	60%	39%	62%	18.40	82.13	141.02	245.53	156.95	254.67	
S013	1	44031599	44031656	0%	2%	20%	24%	21%	19%	4.80	75.23	64.54	66.66	94.87	56.57	
S014	11	14926795	14926853	0%	2%	9%	26%	78%	27%	6.70	27.47	84.26	249.95	96.19	33.11	
S015	1	8274428	82744711	1%	2%	10%	22%	43%	31%	59%	1.59	0.26	20.67	45.68	20.37	56.50
S016	5	37634845	37634910	2%	5%	13%	29%	50%	39%	3.32	6.38	16.94	3.37	25.14	19.14	
S017	2	73147709	73147760	1%	3%	24%	38%	50%	50%	2.95	29.10	39.89	54.79	39.19	64.15	
S018	8	124803238	124803363	0%	4%	12%	28%	50%	30%	24.55	77.59	185.42	325.38	198.95	362.13	
S019	8	1241732356	124173386	0%	1%	11%	15%	49%	14%	25%	7.50	63.79	88.68	276.50	78.49	166.63
S020	11	14926988	14926955	0%	3%	6%	25%	76%	21%	20%	8.70	18.97	99.05	288.28	70.81	68.97
S021	2	29407507	29407639	1%	1%	5%	12%	62%	16%	1.73	9.78	21.33	112.60	49.01	26.07	
S022	5	42965102	42965171	0%	4%	8%	21%	43%	32%	59%	37.37	88.00	220.17	456.68	335.17	627.38
S023	6	28303447	28303515	0%	0%	12%	1%	9%	19%	14%	5.68	197.56	14.33	149.06	301.34	226.02

【圖 4-3】

(続き)

[illegible]

【圖 4-2】

(続き)

[illegible]

【圖 4-4】

(続き)

[illegible]

【圖 4-5】

(続き)

屋上太陽電池パネル 設置標準番号	架設位置	平均正常傾斜	平均屋根傾斜	平均太陽傾斜	平均小傾斜	平均前面上度	平均太陽前傾角	NormBC	A4/BC	LC/BC	SC/BC	SD/BC	UND/BC		
SQ45 13	65110474	65110558	1%	1%	1%	9%	12%	9%	18%	1%	1.58	21.62	26.30	1.26	
SQ46 17	58490183	58490183	0%	1%	1%	5%	8%	18%	8%	4.22	17.93	132.48	63.78	28.58	
SQ47 2	97153166	97153253	0%	1%	13%	6%	18%	12%	21%	1.71	42.20	25.75	55.43	37.48	67.24
SQ48 2	11089159	110891945	1%	3%	1%	33%	42%	28%	26%	4.14	18.40	42.45	53.71	35.66	36.69
SQ49 7	14334987	14349551	1%	2%	5%	12%	28%	8%	25%	2.56	61.77	18.13	42.66	32.86	12.23
SQ50 17	17627469	17627534	1%	1%	17%	7%	0%	19%	11%	0.77	21.31	8.72	0.57	23.63	14.12
SQ51 3	194205259	194205403	0%	1%	2%	5%	17%	19%	0%	13.82	28.44	67.56	24.94	276.52	0.50
SQ52 1	22533688	225336997	0%	1%	7%	18%	45%	16%	29%	2.1	26.28	62.00	156.81	57.13	99.50
SQ53 10	25052592	25052592	0%	1%	7%	25%	25%	30%	30%	0.09	60.03	175.86	244.93	56.95	56.95
SQ54 12	23255387	23255387	0%	1%	10%	22%	24%	12%	44%	4.32	36.81	71.31	103.32	441.1	140.07
SQ55 11	68627463	68627465	0%	1%	2%	9%	3%	18%	9%	3.04	8.24	32.82	11.51	68.07	32.14
SQ56 5	32711026	327110310	0%	1%	2%	7%	3%	12%	9%	1.27	5.55	13.90	7.35	20.20	16.40
SQ57 1	46832071	46832852	1%	1%	5%	11%	11%	13%	13%	2.20	7.44	18.31	18.34	20.30	1.03
SQ58 3	32443502	32443156	0%	0%	1%	8%	2%	10%	1%	1.22	1.50	20.54	5.05	26.69	2.69
SQ59 15	90315850	90315883	0%	0%	0%	4%	0%	13%	0%	0.84	0.00	10.45	0.72	34.01	0.00
SQ60 17	43339264	43339345	1%	1%	4%	11%	41%	12%	11%	1.45	8.50	22.19	82.48	23.48	21.77
SQ61 9	37292426	37292410	0%	1%	14%	22%	30%	29%	27%	1.76	39.23	55.64	78.55	40.81	66.01
SQ62 8	14510262	14510342	0%	1%	8%	15%	3%	12%	10%	3.80	26.23	54.77	13.90	49.84	41.04
SQ63 8	14510447	145104276	0%	1%	5%	13%	3%	11%	7%	9.51	43.98	126.04	32.55	112.97	73.75
SQ64 3	172312901	172312124	0%	2%	10%	1%	4%	20%	25%	2.50	56.41	12.31	68.47	85.16	85.16

【圖 4-7】

(続き)

[illegible]

【圖 4-6】

(続き)

[illegible]

【圖 4-8】

(続き)

染色体	遺伝子	転写物	異	Y 染色体	CpG アラナド	Enter ID	遺伝子名
5p15.3 染色体異常	SH2	NM_005069	+	0	47320	6443	longo-related protein 2 (Ctscgalla)
9p24.3 染色体異常	MAX	NM_002221	-	0	1789	5707	Max1 (Ctscgalla)
10p15.3 染色体異常	PP4G	NM_002234	-	+	9576	2003	Protein phosphatase 4 gamma (Ctscgalla)
19p13.3 染色体異常	NR2F6	NM_002234	-	+	9576	2003	Nuclear receptor subfamily 2, group 2, member 6 (Ctscgalla)

【図 5 - 1】

[illegible]

【図 5 - 3】

(続き)

[illegible]

【圖 5 - 2】

(続き)

[illegible]

【図 5 - 4】

(続き)

[illegible]

30

【図 5 - 5】

(続き)

[illegible]

【圖 5 - 7】

(続き)

[illegible]

【圖 5 - 6】

(続き)

[illegible]

【圖 5-8】

(続き)

[illegible]

【圖 5 - 9】

(続き)

[illegible]

【図 5 - 10】

(続き)

[illegible]

【図 5 - 1 1】

(続き)

[illegible]

【図 5 - 1 2】

(続き)

[illegible]

【図 5 - 1 3】

(続き)

[illegible]

【図 5 - 1 5】

(続き)

[illegible]

【図 5 - 1 4】

(続き)

[illegible]

【圖 5 - 1 6】

(続き)

[illegible]

【図 5 - 1 5】

(続き)

[illegible]

【圖 5 - 1 6】

(続き)

[illegible]

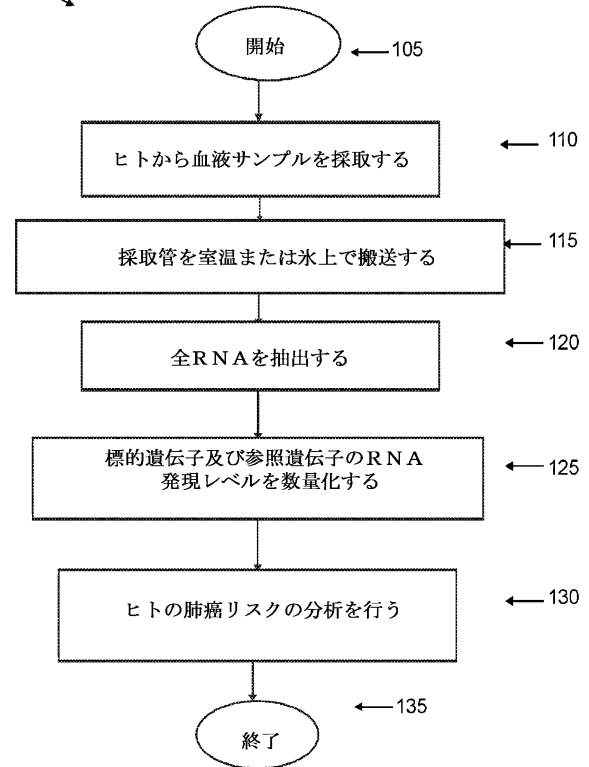
【図 5 - 17】

(続き)

配列番号	説明	配列 (余り 3 で示されている)
配列番号 4.56	MMPP フラップドアイ V1 (7-Δ5)	AGGCGACGAGCGCTGGGTGAGAGTCTCTCG/
配列番号 4.57	SELL フラップドアイ V3	TATCATTTGGGCGCAGGAG
配列番号 4.58	SELL フラップドアイ V3	TACCGAGGCGATTATATGG
配列番号 4.59	SELL フラップドアイ V3 (7-Δ1)	CGCGCGGAGGAGTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.60	SELL フラップドアイ V3 (7-Δ3)	AGGCGCGGAGGAGTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.61	PADH フラップドアイ V1	AGACATGGAGACAGTGGAT
配列番号 4.62	PADH フラップドアイ V1	GGAGCGTTTGTGTGGG
配列番号 4.63	PADH フラップドアイ V1 (7-Δ1)	CGCGCGGAGGAGTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.64	PADH フラップドアイ V1 (7-Δ3)	AGGCGCGGAGGAGTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.65	S100A9 フラップドアイ V2	TGGGAAAGATCTGGAAATTTCTE
配列番号 4.66	S100A9 フラップドアイ V2	AGGCGCGGAGGAGTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.67	S100A9 フラップドアイ V2 (7-Δ1)	CGCGCGGAGGAGTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.68	S100A9 フラップドアイ V2 (7-Δ3)	AGGCGCGGAGGAGTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.69	S100A9 フラップドアイ V2 (7-Δ5)	AGGCGCGGAGGAGTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.70	S100A12 フラップドアイ V5	TGCTTACAAAGGAGCTTCCA
配列番号 4.71	S100A12 フラップドアイ V5	CGCTTGGAAATTTCTGATGACAG
配列番号 4.72	S100A12 フラップドアイ V5 (7-Δ1)	AGGCGCGGAGGAGTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.73	S100A12 フラップドアイ V5 (7-Δ3)	AGGCGCGGAGGAGTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.74	TMPP フラップドアイ V1	GGATTCATGTCATCCAGGCC
配列番号 4.75	TMPP フラップドアイ V1	TCTGACCGAGTACAGAGC
配列番号 4.76	TMPP フラップドアイ V1 (7-Δ1)	CGCGCGGAGGAGTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.77	TMPP フラップドアイ V1 (7-Δ3)	AGGCGCGGAGGAGTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.78	TMPP フラップドアイ V1 (7-Δ5)	TGTCTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.79	SIK4 フラップドアイ V5	TGTCTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.80	SIK4 フラップドアイ V5 (7-Δ1)	AGGCGCGGAGGAGTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.81	SIK4 フラップドアイ V5 (7-Δ3)	AGGCGCGGAGGAGTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.82	SKP1 フラップドアイ V1	GCCTGCGCTCTCTTAC
配列番号 4.83	SKP1 フラップドアイ V1	TCTCTAGAGACTCTGGAAC
配列番号 4.84	SKP1 フラップドアイ V1 (7-Δ1)	AGGCGCGGAGGAGTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.85	SKP1 フラップドアイ V1 (7-Δ3)	AGGCGCGGAGGAGTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.86	CASC3a フラップドアイ V1	TCCGAGAAACAGATCACC
配列番号 4.87	CASC3a フラップドアイ V1 (7-Δ1)	CGCGCGGAGGAGTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.88	CASC3a フラップドアイ V1 (7-Δ3)	AGGCGCGGAGGAGTATTAATCTCTGTGGAT/36/
配列番号 4.89	HNRNPAL フラップドアイ V4	TTTGTAGCTTTGACGACATGAC
配列番号 4.90	HNRNPAL フラップドアイ V4	GGCATTCACAGATGGATTTCT
配列番号 4.91	HNRNPAL フラップドアイ V4 (7-Δ5)	AGGCGCGGAGGAGTATTAATCTCTGTGGAT/36/

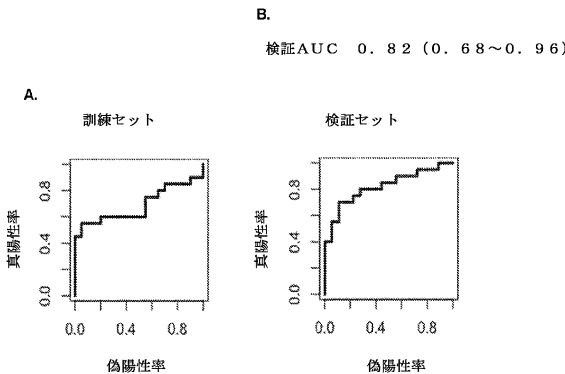
【図 6】

100



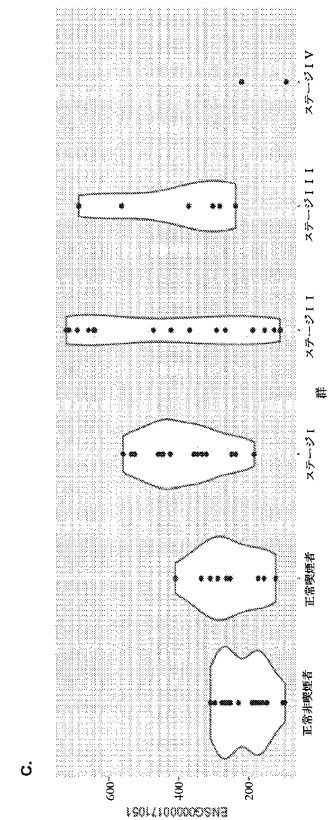
【図 7 - 1】

FPR1 mRNA



【図 7 - 2】

(続き)



10

20

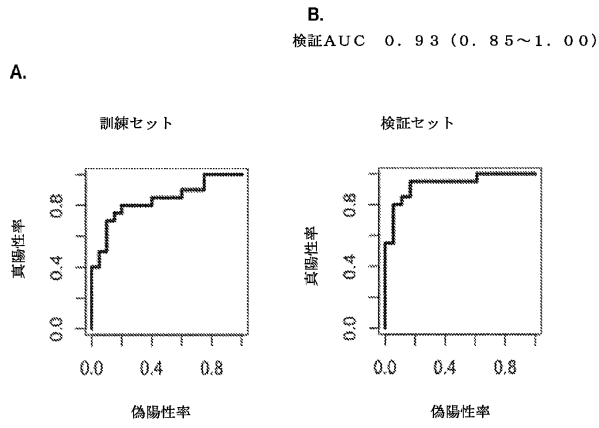
30

40

50

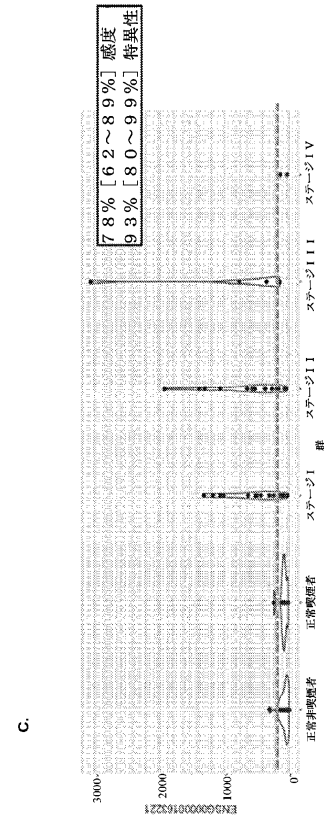
【図 8 - 1】

S100A12 mRNA



【図 8 - 2】

(続き)

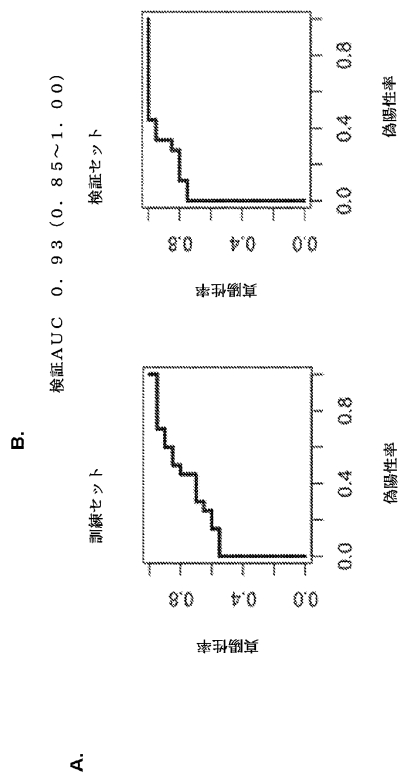


10

20

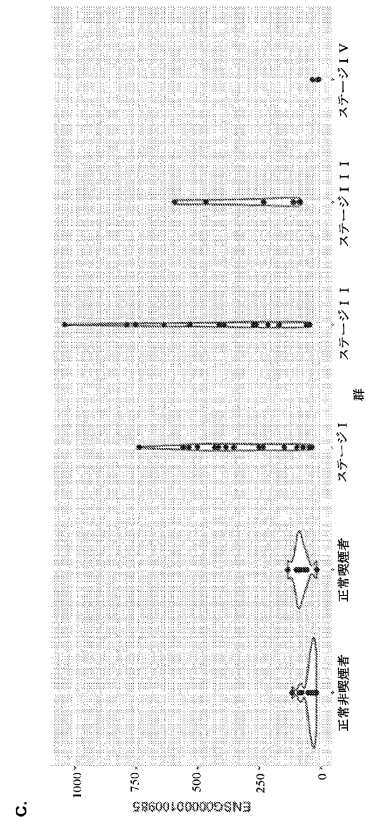
【図 9 - 1】

MMP9 mRNA



【図 9 - 2】

(続き)



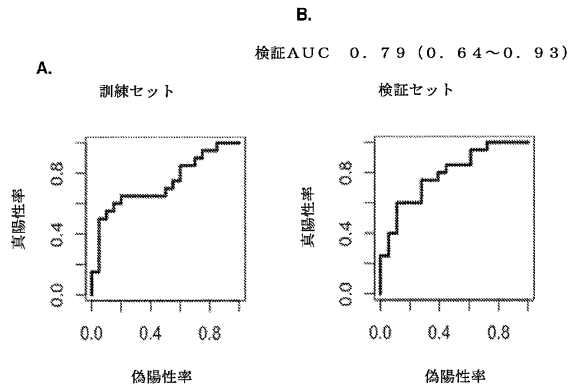
30

40

50

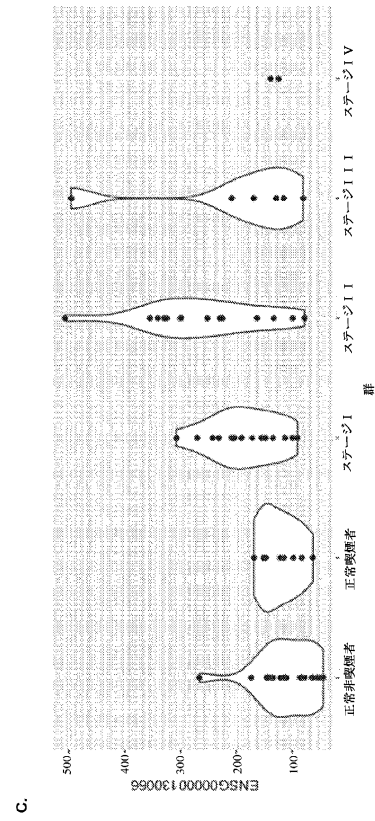
【図 10-1】

SAT1 mRNA



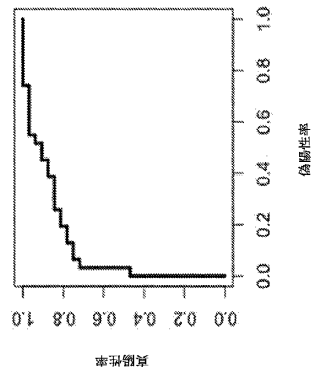
【図 10-2】

(続き)



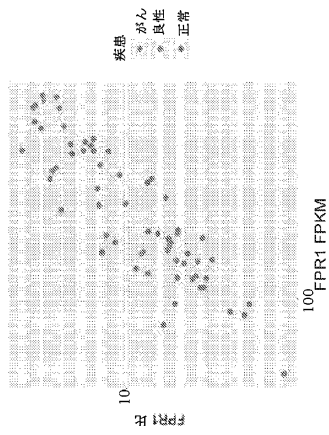
【図 11】

B. STK4に対する比
AUC 0.89 (0.81~0.97)



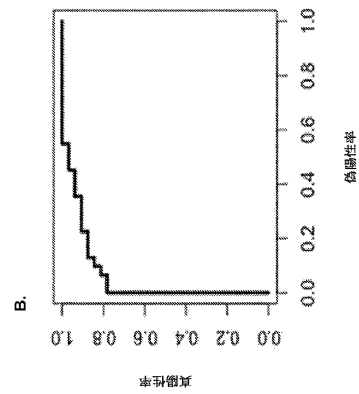
FRP1 mRNA

A.



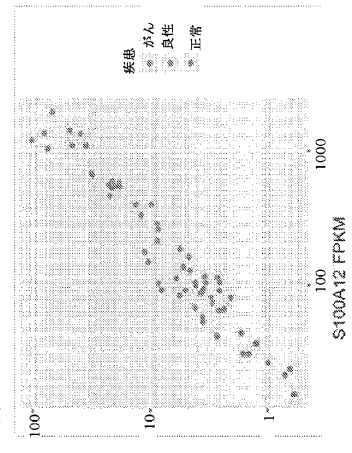
【図 12】

B. STK4に対する比
AUC 0.94 (0.89~1.00)



S100A12 mRNA

A.



10

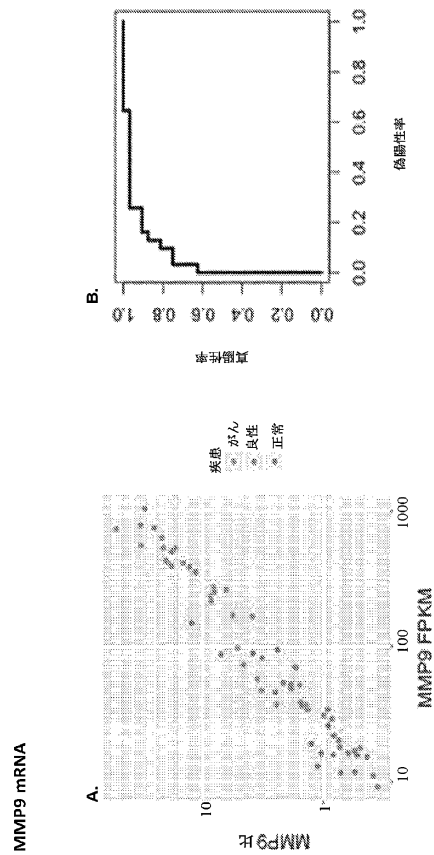
20

30

40

50

【図 13】



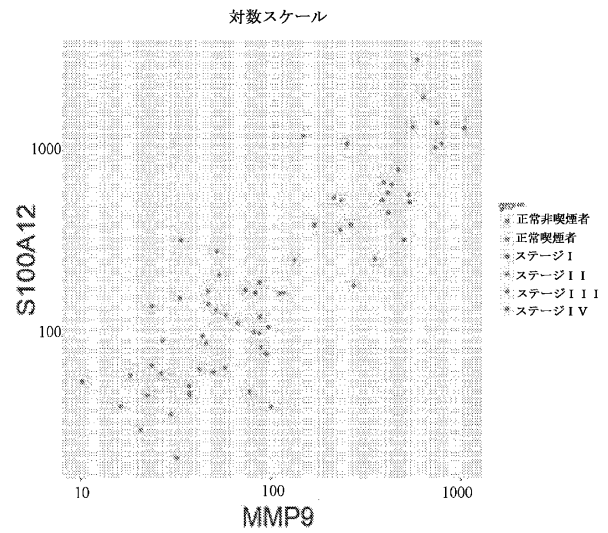
【図 14】

S100A12 + MMP9 mRNA

感度 (ステージ I) : 87% (64~97%)

感度 (ステージ I ~ I I I) : 88% (74~96%)

特異性 : 90% (75~97%)

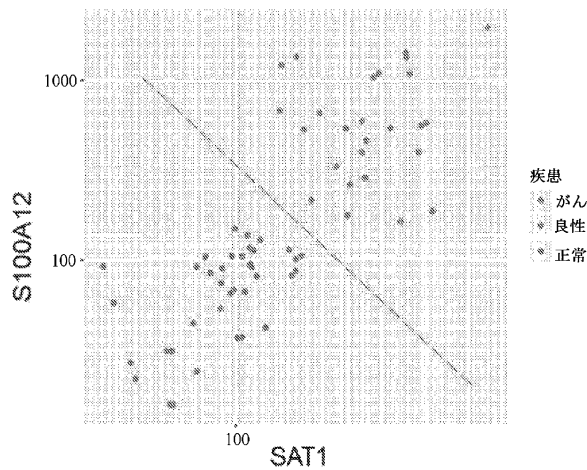


10

20

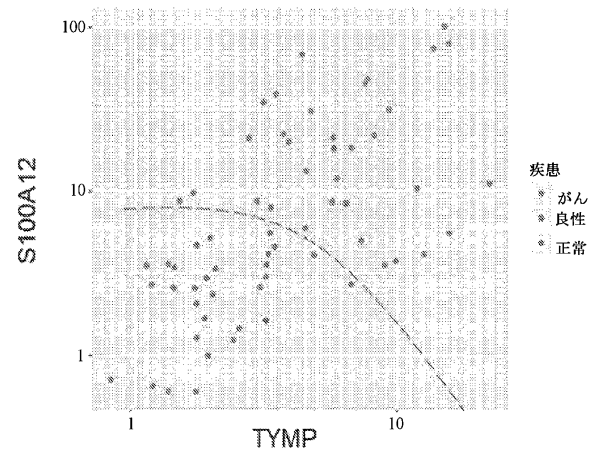
【図 15】

S100A12 + SAT1 mRNA: ノイズ低減



【図 16】

S100A12 + TYMP mRNA: 直交



30

40

【配列表】

2022546504000001.app

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2020/048270
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/6886(2018.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 1/6886; A61P 35/00; C12M 1/34; C12Q 1/68; G01N 33/574		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: gene expression marker, RNA marker, DNA methylation marker, reference gene, cfRNA, cfDNA, lung neoplasia		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016-0333424 A1 (VIOMICS INC.) 17 November 2016 See paragraphs [0007], [0010], [0030], [0040]-[0041], [0054], [0056]; claims 1-2, 5, 7, 9, 12-13, 19; table 1.	1-4, 30-32, 53-57
Y		25, 58
Y	US 2017-0335401 A1 (EXACT SCIENCES CORPORATION et al.) 23 November 2017 See abstract; paragraphs [0105], [0144]; claims 1-2, 21.	25, 58
X	MORRIS, SCOTT et al., 'Whole blood FPR1 mRNA expression predicts both non-small cell and small cell lung cancer', International Journal of Cancer, 2018, vol. 142, pp. 2355-2362 See abstract; pages 2356-2357, 2359-2361.	1-4, 30-32, 53-57
A	US 2019-0085406 A1 (GUARDANT HEALTH, INC.) 21 March 2019 See the whole document.	1-4, 25, 30-32, 53-58
A	US 2011-0318738 A1 (JONES, DAVID et al.) 29 December 2011 See the whole document.	1-4, 25, 30-32, 53-58
PX	WO 2020-112869 A1 (EXACT SCIENCES DEVELOPMENT COMPANY, LLC et al.) 04 June 2020 See examples 7, 9; claims 1-40.	1-4, 25, 30-32, 53-58
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 December 2020 (07.12.2020)		Date of mailing of the international search report 07 December 2020 (07.12.2020)
Name and mailing address of the ISA/KR International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer HEO, Joo Hyung Telephone No. +82-42-481-5373

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/048270

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 9,12,14,18,20-21,23,34,38-39,42-43,45-46,48,61
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 9, 12, 14, 18, 20-21, 23, 34, 38-39, 42-43, 45-46, 48, 61 are regarded to be unclear because they refer to claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).
3. ☒ Claims Nos.: 5-8,10-11,13,15-17,19,22,24,26-29,33,35-37,40-41,44,47,49-52,59-60,62-64
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

20

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US2020/048270

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2016-0333424 A1	17/11/2016	EP 2809810 A1 EP 2809810 B1 JP 2015-503356 A JP 2019-162102 A US 2013-0196332 A1 US 9422592 B2 WO 2013-103889 A1	10/12/2014 13/11/2019 02/02/2015 26/09/2019 01/08/2013 23/08/2016 11/07/2013
US 2017-0335401 A1	23/11/2017	CN 109563546 A EP 3452616 A1 KR 10-2019-0004768 A US 10385406 B2 US 2019-0330702 A1 WO 2017-192221 A1	02/04/2019 13/03/2019 14/01/2019 20/08/2019 31/10/2019 09/11/2017
US 2019-0085406 A1	21/03/2019	CN 110546272 A EP 3443066 A1 EP 3610032 A2 JP 2020-516281 A US 2018-0305738 A1 US 2020-0131567 A1 WO 2017-181146 A1 WO 2018-191702 A2	06/12/2019 20/02/2019 19/02/2020 11/06/2020 25/10/2018 30/04/2020 19/10/2017 18/10/2018
US 2011-0318738 A1	29/12/2011	WO 2010-074924 A1	01/07/2010
WO 2020-112869 A1	04/06/2020	None	

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TWE EN

ート サウスウェスト 200

200 First Street SW, Rochester, Minnesota 55905
, United States of America

(74)代理人 110000338

特許業務法人HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK

(72)発明者 モーリス, スコット

アメリカ合衆国, 53719 ウィスコンシン州, マディソン, エンデヴァー レーン 5505,
シー／オー エグザクト サイエンス デベロップメント カンパニー, エルエルシー

(72)発明者 マレリー, デヴィッド

アメリカ合衆国, 53719 ウィスコンシン州, マディソン, エンデヴァー レーン 5505,
シー／オー エグザクト サイエンス デベロップメント カンパニー, エルエルシー

(72)発明者 アラーウィ, ハティム ティー.

アメリカ合衆国, 53719 ウィスコンシン州, マディソン, エンデヴァー レーン 5505,
シー／オー エグザクト サイエンス デベロップメント カンパニー, エルエルシー

(72)発明者 リドガード, グラハム ピー.

アメリカ合衆国, 53719 ウィスコンシン州, マディソン, エンデヴァー レーン 5505,
シー／オー エグザクト サイエンス デベロップメント カンパニー, エルエルシー

(72)発明者 ギ阿克モプロス, マリア

アメリカ合衆国, 53719 ウィスコンシン州, マディソン, エンデヴァー レーン 5505,
シー／オー エグザクト サイエンス デベロップメント カンパニー, エルエルシー

(72)発明者 カイザー, マイケル ダブリュー.

アメリカ合衆国, 53719 ウィスコンシン州, マディソン, エンデヴァー レーン 5505,
シー／オー エグザクト サイエンス デベロップメント カンパニー, エルエルシー

(72)発明者 アールクイスト, デビッド エー.

アメリカ合衆国, 55902 ミネソタ州, ロチェスター, ファースト ストリート サウスウェス
ト 200, シー／オー マヨ ファウンデーション フォア メディカル エデュケーション アンド
リサーチ

(72)発明者 テイラー, ウィリアム アール.

アメリカ合衆国, 55902 ミネソタ州, ロチェスター, ファースト ストリート サウスウェス
ト 200, シー／オー マヨ ファウンデーション フォア メディカル エデュケーション アンド
リサーチ

(72)発明者 マホーニー, ダグラス ダブリュー.

アメリカ合衆国, 55902 ミネソタ州, ロチェスター, ファースト ストリート サウスウェス
ト 200, シー／オー マヨ ファウンデーション フォア メディカル エデュケーション アンド
リサーチ

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ03 QQ08 QQ28 QQ42 QQ52 QR08 QR32
QR35 QR55 QR62 QR72 QR77 QS25 QS34 QX01