

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7649745号
(P7649745)

(45)発行日 令和7年3月21日(2025.3.21)

(24)登録日 令和7年3月12日(2025.3.12)

(51)国際特許分類	F I			
C 1 2 Q 1/6813(2018.01)	C 1 2 Q	1/6813	Z	
C 1 2 Q 1/6844(2018.01)	C 1 2 Q	1/6844	Z	
C 1 2 Q 1/6869(2018.01)	C 1 2 Q	1/6869	Z	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	M	
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	G 0 1 N	33/68		
請求項の数 15 (全78頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願2021-536193(P2021-536193)	(73)特許権者	516116448
(86)(22)出願日	令和1年12月20日(2019.12.20)		エムディーエヌエー ライフ サイエンス
(65)公表番号	特表2022-514924(P2022-514924 A)		ズ インコーポレイテッド
(43)公表日	令和4年2月16日(2022.2.16)		アメリカ合衆国, 19801 デラウェア州, ウィルミントン, オレンジ ストリート 1209, コーポレーション
(86)国際出願番号	PCT/US2019/068098	(74)代理人	110000338
(87)国際公開番号	WO2020/132596		弁理士法人 HARAKENZO WORLD PATENT & TRADE MARK
(87)国際公開日	令和2年6月25日(2020.6.25)	(72)発明者	クリード, ジェニファー
審査請求日	令和4年12月20日(2022.12.20)		カナダ, ヴィー1ダブリュー 5エイチ7
(31)優先権主張番号	62/784,403		ブリティッシュ コロンビア, ケロウナ
(32)優先日	平成30年12月22日(2018.12.22)		, レン プレイス 168-515
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		最終頁に続く
(31)優先権主張番号	62/931,173		
(32)優先日	令和1年11月5日(2019.11.5)		
	最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 子宮内膜症に関連するミトコンドリアDNA欠失

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳動物被検体由来の生物学的サンプルにおいて、欠失を有しているヌクレオチド配列を有する異常なミトコンドリアDNA (mtDNA) 分子を同定する方法であり、

一旦再環状化されると、前記mtDNAは第1および第2のヌクレオチドからなるジャンクションポイントを含み、

配列番号1に関して：

前記欠失はヌクレオチド5377~14048を含み、

第1のヌクレオチドはヌクレオチド5362~5377の間にあり、且つ

第2のヌクレオチドはヌクレオチド14048~14063の間にあり；

前記方法が、前記哺乳動物被検体における子宮内膜症を検出および/または観察するための方法であり、

前記生物学的サンプルにおける、前記異常なmtDNAの量を定量すること、および前記定量された量を基準値と比較することを含み；

前記定量された量が前記基準値よりも高い場合に、子宮内膜症が検出される、方法。

【請求項2】

前記第1のヌクレオチドは5362位にあり、且つ、前記第2のヌクレオチドは14049位にある、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記異常な m t D N A は、配列番号 7 5 に記載の前記ヌクレオチド配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記同定は、前記生物学的サンプルを、以下と接触させることを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法：

a) 前記ジャンクションポイントを含んでいる前記異常な m t D N A の前記ヌクレオチド配列の一部に相補的なヌクレオチド配列を有している核酸プローブ；

b) 核酸プライマー対、前記プライマーの 1 つが、前記ジャンクションポイントを含んでいる前記異常な m t D N A の前記ヌクレオチド配列の一部に相補的なヌクレオチド配列を有している、；または

c) 核酸プライマー対、前記プライマーの各々が、前記ジャンクションポイントに隣接する前記異常な m t D N A のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有している。

【請求項 5】

前記プライマー対の前記プライマーの前記 1 つが、配列番号 8 3 に記載のヌクレオチド配列を有している、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記プライマー対の他のプライマーが配列番号 8 2 に記載のヌクレオチド配列を有している、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

哺乳動物被検体由来の生物学的サンプルにおいて、以下によってコードされたヌクレオチド配列を有している融合転写物を同定する方法：

a) m t D N A が再環状化された後にジャンクションポイントを生じる欠失を有している異常なミトコンドリア D N A (m t D N A) 分子の少なくとも一部分、ここで前記ジャンクションポイントが、配列番号 1 のヌクレオチド 5 3 6 2 : 1 4 0 4 9 の間にあり、前記一部分が前記ジャンクションポイントを含むか；または

b) 請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に規定した異常なミトコンドリア D N A (m t D N A) 分子の少なくとも一部分であり、ここで前記一部分が前記ジャンクションポイントを含み、

前記方法が、前記哺乳動物被検体における子宮内膜症を検出および/または観察するための方法であり、

前記生物学的サンプルにおける、前記融合転写物の量を定量すること、および前記定量された量を基準値と比較することを含み；

前記定量された量が前記基準値よりも高い場合に、子宮内膜症が検出される、方法。

【請求項 8】

前記方法は、以下を含む、請求項 7 に記載の方法：

a) 前記生物学的サンプルを、前記転写されたジャンクションポイントを有している前記融合転写物の前記ヌクレオチド配列に相補的な核酸配列を有している核酸プローブと接触させること；または

b) 前記融合転写物の翻訳産物を同定すること。

【請求項 9】

前記融合転写物が、配列番号 7 7 に記載の前記ヌクレオチド配列を有するか、または前記翻訳産物が、配列番号 7 9 に記載のアミノ酸配列を有している、請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記生物学的サンプルは、前記被検体から取得した血液、組織、または月経液である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

哺乳動物被検体由来の生物学的サンプルにおいて、欠失したミトコンドリア D N A (m t D N A) 分子を同定する方法であり、

前記欠失は、配列番号 1 のヌクレオチド 5 3 6 2 ~ 1 4 0 4 9 を含み、

10

20

30

40

50

前記方法が、前記哺乳動物被検体における子宮内膜症を検出および／または観察するための方法であり、

前記生物学的サンプルにおける、前記欠失したm t D N Aの量を定量すること、および前記定量された量を基準値と比較することを含み、

前記定量された量が前記基準値よりも高い場合に、子宮内膜症が検出される、方法。

【請求項 1 2】

前記生物学的サンプルは、前記被検体から取得した血液、組織、または月経液である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するためのキットであって、

10

前記キットは、以下の少なくとも 1 つを含む、キット：

a) 核酸プライマー対、前記プライマーの 1 つは、前記ジャンクションポイントを含む前記異常な m t D N A の前記ヌクレオチド配列の一部分に相補的なヌクレオチド配列を有している；または

b) 核酸プライマー対、前記プライマーの各々は、前記ジャンクションポイントに隣接する前記異常な m t D N A のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有している。

【請求項 1 4】

前記キットは、以下の少なくとも 1 つを含む、請求項 1 3 に記載のキット：

a) 前記異常な m t D N A 分子の 1 つ以上の融合転写物に相補的なプライマーおよび／またはプローブ；あるいは

20

b) 前記異常な m t D N A 分子によってコードされたタンパク質に結合するように適合されている、結合剤。

【請求項 1 5】

前記結合剤が、抗体または抗原結合断片である、請求項 1 4 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

〔関連出願への相互参照〕

本出願は、パリ条約に基づいて 2 0 1 8 年 1 2 月 2 2 日に出願された米国特許出願第 6 2 / 7 8 4 , 4 0 3 号、及び 2 0 1 9 年 1 1 月 5 日に出願された米国特許出願第 6 2 / 9 3 1 , 1 7 3 号に対する優先権を主張する。このような先行出願の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0 0 0 2】

〔配列表に関する説明〕

本出願に関連する配列表は、A S C I I フォーマットで本明細書と同時に提出されており、参照により本明細書に組み込まれる。配列表を含むテキストファイルのタイトルは、“Sequence_listing.txt”で、2 0 1 9 年 1 2 月 1 7 日に作成され、大きさは約 1 1 9 キロバイトである。

【0 0 0 3】

〔説明の属する技術分野〕

本説明は概して、子宮内膜症を検出／診断および／または観察するための新規バイオマーカーおよび方法に関する。この説明はまた、本主題の方法において有用なユニークな検体および／または試薬に関する。

40

【0 0 0 4】

〔背景〕

子宮内膜症は、出産可能年齢の女性の最大 5 ~ 1 0 % に発生する負担の大きい疾患であり、よくある不妊症の原因である [1 ~ 7 , 5 8]。この疾患は、子宮外で増殖する子宮内膜組織（上皮細胞および間質）の存在を特徴とする。このような異所性子宮内膜組織は、骨盤腹膜および卵管、卵巣、腸管および膀胱、並びにまれにより遠位の身体部位に認められる [8 ~ 1 1]。子宮内膜症の女性は、高い頻度で非月経時の骨盤部疼痛、有痛性月経痙攣、性交時の疼痛、倦怠感、および不妊症などの消耗性症状に悩まされることが多く

50

[1 2]、Q O Lの大幅な低下につながる可能性がある[1 3]。その高い罹患率および有意な疾病率を考慮すると、子宮内膜症は世界的に非常に重大な経済的損失をもたらし、毎年数百億ユーロと推定される[1 4]。

【 0 0 0 5 】

残念ながら、子宮内膜症の診断は長い過程であることが多く、その結果、治療が遅れることになる。子宮内膜症を診断するための現在の「ゴールドスタンダード」は、腹腔鏡外科手術とそれに続く組織検体の病理組織学的確認である[5 , 1 5]。時宜を得た診断を下すことは、報告の遅延[1 6]および症状の誤った解釈[1 7]によってさらに困難になり、患者が高価で侵襲的な腹腔鏡処置を受けるのをためらう場合にはさらに遅れ得る。実際、子宮内膜症の診断における遅延は、10年を超える可能性がある[1 6]。これらの遅延により、大多数の女性が、確定診断が下されるまでに中等度から重度の症状に発展し、その結果、疾病率、治療費、およびQ O Lの低下の増加を招く可能性がある[1 4]。したがって、子宮内膜症の早期発見を容易にし、実行可能なリアルタイムの結果を提供することができる、信頼性の高い、非侵襲的な試験が必要である。しかしながら、子宮内膜症を検出するための非侵襲的な方法は、現在利用可能ではない。

10

【 0 0 0 6 】

分子バイオマーカーは、ヒトの疾患を測定、検出、および予測するツールとして広く用いられている[1 8 ~ 2 4]。しかしながら、子宮内膜症特異的バイオマーカーの探索は困難であることが証明されている[2 5]。いくつかの主要な課題には、標準化されていない、検体採取、分析方法、およびデータ解釈並びにバイオマーカーの特異性の欠如があるが[1 7]、世界子宮内膜症研究財団(W E R F) E P H e c tプロトコル[2 6]を含む、生物学的標本の採取および保存の方法と子宮内膜症データの報告とを調和させるために、近年の努力がなされている。血液、組織、および尿からの様々な候補バイオマーカーが報告されているが、臨床使用への転換に成功したものはない。これらの候補の多くは、疾患組織からの生検、月経の特定段階での採取の必要性など、サンプル採取に特有の制限があるか、または炎症によって誘導される調節様式(例えば、遺伝子発現、DNAメチル化)の変化に依存する。炎症によって誘導される調節様式の変化は、他の婦人科の障害と重複する可能性があり[1 0 , 1 7]、偽陽性検出の可能性を増加させ得る。このように、理想的なバイオマーカーは、健康な細胞または体液から検出可能であり、且つ一過性の疾患、炎症が生成する、または周期的な生理学的変化とは独立しているであろう。

20

30

【 0 0 0 7 】

ミトコンドリアゲノムは、あまり探求されていないバイオマーカーリポジトリを表す。図1に示すとおり、ミトコンドリアゲノムは、電子伝達に不可欠な残りの13個の遺伝子の正確な翻訳を保証する2個のrRNAおよび22個のtRNAを含む24個の遺伝子の相補体をコードする。標的のミトコンドリアDNA(mtDNA)は、高い突然変異頻度、限定されたDNA修復能力、すべての有核細胞に存在すること、および高いコピー数(細胞あたり数千のゲノム)に起因して、診断の観点から魅力的である[2 7]。その結果、低頻度の突然変異や欠失事象であっても、ヘテロプラスミックなミトコンドリア集団から確実に増幅することができる。実際、mtDNA突然変異は、骨、脳、乳房、肺、結腸直腸、胃、卵巣、前立腺、および子宮内膜組織を含む複数の身体部位にわたるいくつかのがんのバイオマーカーとして十分に記載されている[2 8 ~ 3 7]。核ゲノムは30億個以上の塩基対を有しているのに対して、ミトコンドリア(mt)ゲノムは比較的小さく、16,569個の核酸塩基対を有している。さらに、一旦受精が起こった卵子内のミトコンドリアのクローン性増殖を考えると、典型的に所与の個体におけるすべてのmtDNAゲノムは、同一である。mtゲノムは、特定の長さの配列に隣接するリピートモチーフが散在する、円形で、イントロンのないDNA分子であるという点でも珍しい。これらのリピート間の配列は、十分に理解されていない状況下で欠失する傾向がある。さらに、このような欠失はしばしば、フランキングリピート配列の一方または両方の少なくとも一部を含んでいる。以下でさらに述べるとおり、一旦欠失を構成する配列が除去されると、残りの「親」mtDNAは再環状化して「大サブリモン(sublimon)」を形成する。同様に

40

50

、欠失した配列も再環状化して「小サブリモン」を形成することがある。mtゲノム中のリピート数を考えると、多くの欠失の可能性がある。これらの欠失の中で最もよく知られている例の1つは、種々の病態と関連している4977bp「共通欠失 (common deletion)」である。前記共通欠失も子宮内膜症のマーカーとして検討されたが[54]、特異性に欠けていることから、このような欠失が本疾患の有効なマーカーとなることは示唆されなかった。ある種のミトコンドリアDNA欠失は、いくつかの特定の状態および加齢に関連する障害と以前から関連している([59]～[64]参照)。mtDNAゲノムのヌクレオチド5371～14058間の8686bpの欠失も発表されているが([65])、疾患の段階や状態との相関は全く認められていない。

【0008】

場合によっては、mtDNAの欠失および他の大規模なmtDNAの再配列が、転写可能な突然変異mtDNA配列を生じ、結果的にミトコンドリア融合転写物を生じることがある。ミトコンドリア融合転写物と疾患の段階との間の関連の例は、例えば、本出願人の以前の出願番号：PCT/CA2006/000652；PCT/CA2007/001711；PCT/CA2009/000351；およびPCT/CA2010/000423に記載されており、これらの開示全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0009】

子宮内膜がんの研究中に、子宮内膜におけるMtDNA改変が検出されている[37～40]。しかしながら、これらの研究では、mtDNAゲノム内のコンセンサ領域または子宮内膜の疾患と相関する特定のmtDNA改変は明らかにされなかった。その結果、これらの研究は、mtDNA改変が子宮内膜症の検出のためのバイオマーカーとして使用できるという結論を示唆しなかった。さらに、以前の研究は、ミトコンドリア融合転写物および子宮内膜の疾患または段階の関連を導いていないと考えられる。

【0010】

したがって、公知の方法における少なくとも1つの欠陥に対処する、子宮内膜の疾患および/または状態を検出する正確かつ/またはより有効な手段が必要とされている。

【0011】

〔説明の概要〕

一態様において、本説明は、被検体における子宮内膜症を検出、診断、および/または観察するための方法、試薬、および/またはキットを提供する。本説明は、子宮内膜症に関連するものとして本明細書中で同定されているミトコンドリアDNA (mtDNA) バイオマーカー、その融合転写物および/または翻訳された融合タンパク質の使用を含む。本発明の方法は、スクリーニングされる被検体から得られる生物学的サンプルを使用して実施され得る。このようなサンプルは、組織(例えば、生検組織)、月経液、循環血液、または血清もしくは血漿のような血液派生物を含み得る。現在記載されている方法は、被検体から非侵襲的に取得したサンプルに対して実施することができ、子宮内膜症を有しているかまたは発現していることが疑われ、さらなる侵襲的診断調査が必須であるかどうかを決定する効果的な手段として役立つ。

【0012】

一態様において、哺乳動物被検体における子宮内膜症を検出、診断、および/または観察する方法が提供され、この方法は、被検体由来の生物学的サンプルにおいて、再結合または再環状化されたmtDNAヌクレオチド配列におけるジャンクションポイントを生じる少なくとも1つの欠失を有している異常なミトコンドリアDNA (mtDNA) 分子を同定する工程を包含し、ジャンクションポイントは、配列番号1のmtDNAヌクレオチド配列のヌクレオチド対8469：13447、ヌクレオチド対7992：15730、ヌクレオチド対9191：12909、ヌクレオチド対9188：12906、ヌクレオチド対10367：12829、ヌクレオチド対6260：12814、ヌクレオチド対7973：9023、ヌクレオチド対9086：10313、ヌクレオチド対9079：14988、ヌクレオチド対7260：15540、ヌクレオチド対8431：10841、ヌクレオチド対8984：13833またはヌクレオチド対5362：14049に

10

20

30

40

50

ある。

【 0 0 1 3 】

一態様において、本方法は、生物学的サンプルを、異常な m t D N A にハイブリダイズするように設計された D N A プローブまたはプライマーと接触させることによって、異常な m t D N A を同定する工程を包含する。

【 0 0 1 4 】

一態様において、本方法は、異常な m t D N A 分子の融合転写物を同定する工程を包含する。

【 0 0 1 5 】

別の態様において、本方法は、異常な m t D N A 分子によってコードされる融合タンパク質を同定する工程を包含する。

10

【 0 0 1 6 】

一態様において、哺乳動物被検体由来の生物学的サンプルにおいて、欠失を有している異常なミトコンドリア D N A (m t D N A) 分子を同定する方法が提供され、欠失は、配列番号 1 の m t D N A ヌクレオチド配列のヌクレオチド 5 3 6 2 ~ 1 4 0 4 9 ; ヌクレオチド 8 4 6 9 ~ 1 3 4 4 7 ; ヌクレオチド 7 9 9 2 ~ 1 5 7 3 0 ; ヌクレオチド 9 1 9 1 ~ 1 2 9 0 9 ; ヌクレオチド 9 1 8 8 ~ 1 2 9 0 6 ; ヌクレオチド 1 0 3 6 7 ~ 1 2 8 2 9 ; ヌクレオチド 6 2 6 0 ~ 1 2 8 1 4 ; ヌクレオチド 7 9 7 3 ~ 9 0 2 3 ; ヌクレオチド 9 0 8 6 ~ 1 0 3 1 3 ; ヌクレオチド 9 0 7 9 ~ 1 4 9 8 8 ; ヌクレオチド 7 2 6 0 ~ 1 5 5 4 0 ; ヌクレオチド 8 4 3 1 ~ 1 0 8 4 1 ; または ヌクレオチド 8 9 8 4 ~ 1 3 8 3 3 の間のヌクレオチド配列を含み、一旦再環状化されると、m t D N A はジャンクションポイントを含んでいる。

20

【 0 0 1 7 】

別の態様において、哺乳動物被検体由来の生物学的サンプルにおいて、欠失を有している異常なミトコンドリア D N A (m t D N A) 分子を同定する方法が提供され、一旦再環状化されると、m t D N A は第 1 および第 2 のヌクレオチドからなるジャンクションポイントを含み、配列番号 1 に関して：

a) 欠失はヌクレオチド 5 3 7 7 ~ 1 4 0 4 8 を含み、第 1 のヌクレオチドはヌクレオチド 5 3 6 2 ~ 5 3 7 7 の間にあり、第 2 のヌクレオチドはヌクレオチド 1 4 0 4 8 ~ 1 4 0 6 3 の間にある；

30

b) 欠失はヌクレオチド 8 4 8 3 ~ 1 3 4 4 6 を含み、第 1 のヌクレオチドはヌクレオチド 8 4 6 9 ~ 8 4 8 3 の間にあり、第 2 のヌクレオチドはヌクレオチド 1 3 4 4 6 ~ 1 3 4 6 0 の間にある；

c) 欠失はヌクレオチド 7 9 9 3 ~ 1 5 7 2 2 を含み、第 1 のヌクレオチドはヌクレオチド 7 9 8 5 ~ 7 9 9 3 の間にあり、第 2 のヌクレオチドはヌクレオチド 1 5 7 2 2 ~ 1 5 7 3 0 の間にある；

d) 欠失はヌクレオチド 9 1 9 6 ~ 1 2 9 0 8 を含み、第 1 のヌクレオチドはヌクレオチド 9 1 9 1 ~ 9 1 9 6 の間にあり、第 2 のヌクレオチドはヌクレオチド 1 2 9 0 8 ~ 1 2 9 1 2 の間にある；

e) 欠失はヌクレオチド 9 1 9 6 ~ 1 2 9 0 5 を含み、第 1 のヌクレオチドはヌクレオチド 9 1 8 8 ~ 9 1 9 6 の間にあり、第 2 のヌクレオチドはヌクレオチド 1 2 9 0 5 ~ 1 2 9 1 3 の間にある；

40

f) 欠失はヌクレオチド 1 0 3 6 8 ~ 1 2 8 2 5 を含み、第 1 のヌクレオチドはヌクレオチド 1 0 3 6 4 ~ 1 0 3 6 8 の間にあり、第 2 のヌクレオチドはヌクレオチド 1 2 8 2 5 ~ 1 2 8 2 9 の間にある；

g) 欠失はヌクレオチド 6 2 6 1 ~ 1 2 8 1 3 を含み、第 1 のヌクレオチドはヌクレオチド 6 2 6 0 ~ 6 2 7 1 の間にあり、第 2 のヌクレオチドはヌクレオチド 1 2 8 1 3 ~ 1 2 8 2 4 の間にある；

h) 欠失はヌクレオチド 7 9 8 4 ~ 9 0 2 2 を含み、第 1 のヌクレオチドはヌクレオチド 7 9 7 3 ~ 7 9 8 4 の間にあり、第 2 のヌクレオチドはヌクレオチド 9 0 2 2 ~ 9 0 3

50

3の間にある；

i) 欠失はヌクレオチド9087~10303を含み、第1のヌクレオチドはヌクレオチド9077~9087の間にあり、第2のヌクレオチドはヌクレオチド10303~10313の間にある；

j) 欠失はヌクレオチド9086~14987を含み、第1のヌクレオチドはヌクレオチド9079~9086の間にあり、第2のヌクレオチドはヌクレオチド14987~14904の間にある；

k) 欠失はヌクレオチド7261~15531を含み、第1のヌクレオチドはヌクレオチド7252~7261の間にあり、第2のヌクレオチドはヌクレオチド15531~15540の間にある；

l) 欠失はヌクレオチド8440~10840を含み、第1のヌクレオチドはヌクレオチド8431~8440の間にあり、第2のヌクレオチドはヌクレオチド10840~10849の間にある；または

m) 欠失はヌクレオチド8994~13832を含み、第1のヌクレオチドはヌクレオチド8984~8994の間にあり、第2のヌクレオチドはヌクレオチド13832~13842の間にある。

【0018】

別の態様において、異常なmtDNA分子またはmtDNA欠失から生じる融合転写物および融合タンパク質を検出する方法が提供される。

【0019】

〔図面の簡単な説明〕

特定の実施形態の特徴は、添付の図面を参照する以下の詳細な説明においてより明らかになるであろう。

【0020】

図1は、ミトコンドリアのコード遺伝子を示す図である。

【0021】

図2A~2Jは、実施例1に論じられているような、子宮内膜組織における融合転写物1、4、14、16、120、122、193、400、516、および586の検出を示す。散布図は、10の融合転写物（転写物番号1（図2A）；4（図2B）；14（図2C）；16（図2D）；120（図2E）；122（図2F）；193（図2G）；400（図2H）；516（図2I）；および586（図2J）として区別されている）に特異的なプローブに対して試験された子宮内膜コントロール組織および子宮内膜症陽性組織の、標準化された結果を表す。各図のy軸は、標準化されている相対発光単位RLU（ $\log_2 LOQ Probe - \log_2 LOQ HK23$ ）を示し、HK23は、核のハウスキーパー転写物であるヒト-2-ミクログロブリンである。各図のx軸は、腹腔鏡検査時の医師の診断によって決定されるような組織診断を示し、子宮内膜コントロール=0.0、子宮内膜症陽性=1.0である。

【0022】

図3は、配列番号1のmtDNAゲノム、遺伝子位置、および本明細書に記載の、欠失されたmtDNAの10の部分の位置（すなわち、「プローブ」または「標的」）を示す、mtDNAの融合転写物マップを示す。前記位置は、各欠失の長さにもたがる線によって示されている。

【0023】

図4AおよびBは、実施例2の1.2kbおよび3.7kb欠失の診断精度を示し、症候性コントロールサンプルおよび子宮内膜の疾患状態が確認された患者由来のサンプルを比較している。1.2kbおよび3.7kb欠失は、症候性の患者検体と子宮内膜症（すべてのサブタイプ/段階を合わせた）が確認された患者由来の検体を区別する能力について評価された。受信者操作者特性曲線を作成し、曲線下にある面積を算出した。略語：CI = 信頼区間；ROC = 受信者操作者特性；Std = 標準；vs = 対。

【0024】

10

20

30

40

50

図5 A ~ 5 Dは、症候性コントロールサンプルと異なる子宮内膜疾患サブタイプのサンプルとの間を区別することにおける、実施例2の1.2 kb欠失の診断精度を示す。1.2 kb欠失を、症候性患者の検体と子宮内膜症のサブタイプ（腹膜、卵巣、深部浸潤）によって層別化された患者由来の検体とを区別する能力について評価した。図5 Aは、症候性コントロール由来の検体と、腹膜、卵巣または深部に浸潤している子宮内膜症の患者由来の検体について、標準化された1.2 kb欠失の分布を示す。箱の境界は、25thおよび75thのパーセンタイル、中央の線は中央値、ひげは90th（頂部）および10th（底部）パーセンタイルを表す。ドットは、外れ値（左）を表す。記述統計学を各群について要約する（右）。図5 B ~ 5 Dにおいて、1.2 kb欠失についての受信者操作者特性曲線を作成し、診断精度を示す曲線下にある面積を算出した。略語：C I = 信頼区間；D e v = 偏差；D I E = 深部浸潤性子宮内膜症；N = 各群の検体数；R O C = 受信者操作者特性；S t d = 標準；v s = 対。

10

【0025】

図6 A ~ 6 Dは、症候性コントロールサンプルと子宮内膜疾患サブタイプのサンプルとを区別することにおける、実施例2の3.7 kb欠失の診断精度を示す。3.7 kb欠失は、症候性患者の検体と子宮内膜症のサブタイプ（腹膜、卵巣、深部浸潤）によって層別化された患者由来の検体とを区別する能力について評価された。図6 Aは、症候性コントロールおよび腹膜、卵巣もしくは深部浸潤性子宮内膜症の患者由来のサンプル検体についての、標準化された3.7 kb欠失の分布を示す。箱の境界は、25thおよび75thパーセンタイルを表し、中央の線は中央値を表し、ひげは90thパーセンタイル（頂部）および10th（底部）パーセンタイルを表す。ドットは、外れ値（左）を表す。記述統計学を各群について要約する（右）。図6 B ~ 6 Dにおいて、3.7 kb欠失についての受信者操作者特性曲線を作成し、曲線下にある面積を算出し、診断精度を示した。略語：C I = 信頼区間；D e v = 偏差；D I E = 深部浸潤性子宮内膜症；N = 各群の検体数；R O C = 受信者操作者特性；S t d = 標準；v s = 対。

20

【0026】

図7 A ~ 7 Cは、症候性コントロールサンプルと既知の疾患段階を有している患者由来のサンプルとを区別することにおける実施例2の1.2 kb欠失の診断精度を示す。1.2 kb欠失は、症候性患者検体と子宮内膜症の段階（低または高い）によって層別化された患者由来の検体とを区別する能力について評価された。図7 Aは、症候性コントロールと子宮内膜症の低い（I / I I）または高い（I I I / I V）段階を有している患者由来の検体とについての、標準化された1.2 kb欠失の分布を示す。箱の境界は、25thパーセンタイルおよび75thパーセンタイルを表し、中央の線は中央値を表し、ひげは90thパーセンタイル（頂部）および10thパーセンタイル（底部）を表す。ドットは、外れ値（左）を表す。記述統計学を各群について要約する（右）。図7 Bおよび7 Cにおいて、1.2 kb欠失について受信者操作者特性曲線を作成し、診断精度を示す、曲線の下にある面積を算出した。略語：C I = 信頼区間；D e v = 偏差；N = 各群の検体数；R O C = 受信者操作者特性；S t d = 標準；v s = 対。

30

【0027】

図8 A ~ 8 Cは、症候性コントロールサンプルと既知の疾患段階を有している患者由来のサンプルとの区別における実施例2の3.7 kb欠失の診断精度を示す。3.7 kb欠失は、症候性患者の検体と子宮内膜症の段階（低または高い）によって層別化された患者由来の検体とを区別する能力について評価された。図8 Aは、症候性コントロールおよび子宮内膜症の低い（I / I I）または高い（I I I / I V）段階を有している患者からの検体についての、標準化された3.7 kb欠失の分布を示す。箱の境界は、25thパーセンタイルおよび75thパーセンタイルを表し、中央の線は中央値を表し、ひげは90パーセンタイル（頂部）と10パーセンタイル（底部）とを表す。ドットは、外れ値（左）を表す。記述統計学を各群について要約する（右）。図8 Bおよび8 Cにおいて、3.7 kb欠失について受信者操作者特性（R O C）曲線を作成し、診断精度を示す、曲線の下にある面積を算出した。略語：C I = 信頼区間；D e v = 偏差；N = 各群の検体数；R

40

50

ROC = 受信者操作者特性 ; S t d = 標準 ; v s = 対。

【 0 0 2 8 】

図 9 は、子宮内膜症陽性のサンプル、症候性コントロールサンプルおよび正常な健康コントロールサンプルの間にある、8 . 7 k b 欠失スコアの差異を示す散布図である。

【 0 0 2 9 】

図 1 0 は、子宮内膜症陽性サンプル、症候性コントロールサンプルおよび正常な健康なコントロールサンプル間にある、8 . 7 k b 欠失スコアの差異を示す箱髷図である。

【 0 0 3 0 】

図 1 1 は、子宮内膜症陽性の患者 対 健康 / 正常なコントロールを比較する 8 . 7 k b 欠失の ROC 曲線を示す。

10

【 0 0 3 1 】

図 1 2 は、8 . 7 k b 欠失 - 症候性 対 すべての子宮内膜疾患 - の診断精度を示す。8 . 7 k b 欠失は、ROC 曲線の下にある面積を算出することにより、症候性患者由来のサンプルと子宮内膜症が確認された患者由来のサンプル (すべてのサブタイプ / 段階を合わせた) を区別する能力について評価した。略語 : C I = 信頼区間 ; R O C = 受信者操作者特性 ; S t d = 標準 ; v s = 対。

【 0 0 3 2 】

図 1 3 A ~ 1 3 B は、サブタイプによる 8 . 7 k b 欠失 - コントロール 対 疾患 - の診断精度をさらに示す。これらの図は、8 . 7 k b 欠失アッセイが症候性の参加者由来のサンプルと子宮内膜症サブタイプ (腹膜、卵巣、深部浸潤) によって層別化された参加者由来のサンプルとを区別できるかどうかの研究を示す。図 1 3 A は、無症候性および症候性コントロール、腹膜、卵巣または深部浸潤性子宮内膜症の参加者由来の検体についての標準化された 8 . 7 k b 欠失の分布を示す。箱の境界は 2 5 t h および 7 5 t h パーセントイルを表し、中央の線は中央値を表し、ひげは 9 0 t h (頂部) および 1 0 t h (底部) パーセントイルを表す。ドットは、外れ値 (左) を表す。また、記述統計学を、各群について要約する。図 1 3 B ~ 1 3 D は、診断精度を示すために算出された、ROC 曲線の下にある面積を示す。略語 : A s C o n = 無症候性コントロール ; C I = 信頼区間 ; D e v = 偏差 ; D I E = 深部浸潤性子宮内膜症 ; N = 各群の検体数 ; R O C = 受信者操作者特性 ; S y m C o n = 症候性コントロール ; S t d = 標準 ; v s = 対。

20

【 0 0 3 3 】

図 1 4 A ~ 1 4 C は、8 . 7 k b 欠失 - コントロール 対 段階による疾患 - の診断精度をさらに示す。これらの図は、8 . 7 k b 欠失アッセイが症候性の参加者由来のサンプルと、子宮内膜症の段階 I / I I および I I I / I V により層別化された参加者由来のサンプルとの間を区別できるかどうかを示す。図 1 4 A は、症候性コントロール、子宮内膜症の低い (I / I I) または高い (I I I / I V) 段階を有している参加者由来の検体についての、標準化された 8 . 7 k b 欠失の分布を示している。箱の境界は、2 5 t h および 7 5 t h パーセントイルを表し、中央の線は中央値を表し、ひげは 9 0 t h (頂部) および 1 0 t h (底部) パーセントイルを表す。ドットは、外れ値 (左) を表す。記述統計学を各群について要約する。図 1 4 B および 1 4 C は、診断精度を示すために算出された、ROC 曲線の下にある面積を示す。略語 : C I = 信頼区間 ; D e v = 偏差 ; N = 各群の検体数 ; R O C = 受信者操作者特性 ; S y m C o n = 症候性コントロール ; S t d = 標準 ; v s = 対。

40

【 0 0 3 4 】

図 1 5 は、子宮内膜症に対する 8 . 7 k b 欠失の疾患特異性を、さらに示す。この図は、女性のがん (子宮内膜がん、卵巣がんおよび乳がんが挙げられる) における 8 . 7 k b 欠失の頻度の評価をまとめている。子宮内膜がん、卵巣がん、乳がん、症候性コントロール、および腹膜、卵巣もしくは深部浸潤性子宮内膜症の参加者由来の検体についての、標準化された 8 . 7 k b 欠失の分布。箱の境界は 2 5 t h および 7 5 t h パーセントイルを表し、中央の線は中央値を表し、ひげは 9 0 t h (頂部) および 1 0 t h (底部) パーセントイルを表す。ドットは、外れ値 (左) を表す。

50

【 0 0 3 5 】

図 1 6 は、子宮内膜症陽性サンプル、症候性コントロールサンプルおよび正常な健常コントロールサンプルの間にある 4 . 8 k b 欠失のスコアの差異を示す散布図である。

【 0 0 3 6 】

図 1 7 は、子宮内膜症陽性サンプル、症候性コントロールサンプルおよび正常な健常コントロールサンプルの間にある 4 . 8 k b 欠失スコアの差異を示す箱髷図である。

【 0 0 3 7 】

図 1 8 は、子宮内膜症陽性患者および症候性コントロールからのデータを比較する、4 . 8 k b 欠失の R O C を示す。

【 0 0 3 8 】

図 1 9 は、子宮内膜症陽性患者 対 健常 / 正常コントロールからのデータを比較する 4 . 8 k b 欠失の R O C を示す。

【 0 0 3 9 】

図 2 0 は、本明細書に係る欠失の発生を示す。

【 0 0 4 0 】

〔 詳細な説明 〕

別途定義されないかぎり、本明細書において用いられるすべての技術的および科学的な用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般に理解されるのと同じ意味をもつ。本発明の実施または試験のための適切な材料および方法を以下に記載するが、本明細書に記載されるものと類似または同等の他の公知の材料および方法を使用することができる。

【 0 0 4 1 】

m t D N A に関して本明細書中で使用される場合、用語「欠失」、「欠失断片」、または「欠失配列」は、野生型または天然に存在する m t D N A ゲノムから除去または欠失されるヌクレオチド配列またはセグメントを意味すると理解される。

【 0 0 4 2 】

用語「野生型 m t D N A 」または「天然に存在する m t D N A 」は、改訂された C a m c r i d g e R e f e r e n c e S e q u e n c e (r C R S) (2 0 0 1 、 G e n B a n k アクセッション番号 : N C _ 0 1 2 9 2 0 . 1) をいい、これは、本明細書中で配列番号 1 として提供される。この配列は 1 6 5 6 9 b p の長さとして同定されるが、ヌクレオチドの実際の数 は 1 6 5 6 8 である。当技術分野において公知のとおり、この配列は、3 1 0 7 位にギャップヌクレオチドまたはプレースホルダーヌクレオチドを含んでいる。

【 0 0 4 3 】

m t D N A に関して本明細書中で使用される場合、用語「突然変異」または「異常」は、用語「欠失」と同義であると理解される。

【 0 0 4 4 】

本説明の文脈において使用される場合、用語「突然変異 m t D N A 」または「異常な m t D N A 」は、そのゲノム配列中に少なくとも 1 つの欠失 (上記で規定したとおり) を有している m t D N A 分子を意味するものとして理解される。

【 0 0 4 5 】

用語「ジャンクション」または「ジャンクションポイント」は、再環状化された m t D N A 分子のヌクレオチド配列中の位置を意味すると理解され、これは、欠失の除去に続く残りの m t D N A ゲノム配列のヌクレオチドの再接合、またはスプライシングを含む。本明細書中でさらに議論されるとおり、欠失事象は、典型的には、欠失の除去後に再接合された m t D N A 分子に対応する親配列と、欠失部分に対応する欠失配列とからなる、2 つの新しい配列断片の作製をもたらす。一般に、親配列は、欠失配列よりも長い。しばしば、そして上記で議論されたとおり、長い断片および短い断片の両方は、再環状化して、それぞれ、大サブリモンおよび小サブリモンとして知られるものを形成する。理解されるとおり、両方のサブリモンは、それらのヌクレオチド配列において固有のジャンクションポイントを有している。したがって、ジャンクションまたはジャンクションポイントという用語は、大サブリモンまたは小サブリモンのいずれかに言及するために使用することがで

10

20

30

40

50

きる。

【0046】

「欠失を有している」という語句は、欠失配列が除去されるヌクレオチド配列を有しているmtDNA分子をいうと理解される。換言すれば、「欠失を有しているmtDNA」という語句は親核酸を指す。従って、「共通欠失を有しているmtDNA」とは、4977bpの欠失配列を含まない配列を有しているmtDNA分子を意味する。

【0047】

本明細書中で使用される場合、用語「検出する」は、特定の特徴の生物学的サンプル中の存在を確定もしくは同定および/または測定もしくは定量することを意味すると理解される。一態様において、用語「検出する」は、ミトコンドリアDNA(mtDNA)配列、より詳細には欠失を有しているmtDNAの同定をいうために本明細書中で使用される。用語「検出する」は、ミトコンドリア融合転写物および/またはそのようなmtDNA分子によってコードされるタンパク質の同定をいうためにも使用され得る。後者の場合、タンパク質は、本明細書中では「融合タンパク質」と呼ばれ、欠失事象後の再接合したmtDNAの翻訳から生じるアミノ酸配列を含む。このようなmtDNAは、親mtDNA、または異常なmtDNAもしくは欠失配列を含み得る。

【0048】

本明細書中で使用される場合、用語「診断する」は、疾患の状態もしくは疾患の段階の同定、あるいは疾患の状態もしくは疾患の段階の高い存在確率または増加した存在確率の決定を意味すると理解される。例えば、本説明に関して、本明細書中に記載されるmtDNA分子または融合転写物が検出される場合に、子宮内膜症の段階または状態の存在のより高い確率が存在すると見なされる、または「診断される」。この段階もしくは状態の実際の診断または臨床的診断は、生検サンプルまたは他のそのような手段の検査の際に臨床医によってなされることが理解される。したがって、いくつかの場合において、用語「検出する」および「診断する」は、本明細書中で交換可能に使用され得る。

【0049】

本明細書中で使用される場合、用語「生物学的サンプル」は、目的の分子が得られ得る細胞または核酸を含んでいる組織または体液をいうと理解される。生物学的サンプルは、供給源から得たまま直接的に使用され得るか、またはサンプルの特徴を変更するための前処理に最初に供され得るかのいずれかであり得る。一態様において、生物学的サンプルは、血液、特に循環血液であり、本明細書中で使用される場合、用語「血液」は、血漿および/または血清のような血液派生物を含むことが意図されると理解される。別の態様において、生物学的サンプルは、月経血を含む月経液である。別の態様において、生物学的サンプルは、被検体から得られる組織サンプルである。一態様において、循環血液は、生物学的サンプルとして使用され得る。本説明の目的のための血液サンプルは、被検体の身体上の任意の源から採取されることが理解される。これには、注射器などによって静脈源から採取された血液、月経液サンプルの収集、または指刺しによって採取された血液のような毛細管血液が含まれるが、これらに限定されない。循環血液(上記のように、血液派生物を含む)を使用する現在記載されている方法を用いることは、不必要に痛みを伴う危険な侵襲的処置を受けずに、このような状態を有していることが疑われる個体における子宮内膜症の存在を検出する効果的な手段を提供する。上述のように、現在記載されている方法が子宮内膜症の存在を示唆する状況において、診断は、臨床的評価、およびおそらく腹腔鏡検査/手術または生検サンプルの解析を依然として必要とする。従って、一態様において、特に生物学的サンプルとして循環血液(または上記のようなその1つ以上の派生物)を使用する場合、現在記載される方法は、子宮内膜症の存在を示唆する1つ以上の徴候を有しているこれらの個体を含んでいる患者の亜集団に対して実施されることが理解される。また、現在記載されている方法は、子宮内膜症をスクリーニングする初期段階として、一般集団の構成員に対して実施してもよいことも理解される。言い換えれば、現在記載されている方法は、徴候のない被検体(すなわち、症状を呈さない個体)に対して実施してもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 0 】

本明細書中で使用される場合、「ミトコンドリア融合転写物」または「融合転写物」という語句は、m t D N A 配列の転写の結果として産生される R N A 転写物をいう。

【 0 0 5 1 】

本明細書中で使用される場合、用語「変異体」は、天然に存在する配列とは異なるが、その必須のまたは機能的な特性を保持している核酸配列をいう。一態様において、用語「変異体」は、野生型配列に対して変化する配列をいう。一般に、m t D N A の場合、変異体は全体的に密接に類似しており、そして多くの領域において、選択された m t D N A 配列と同一である。本説明の文脈において、変異体は、スプライシングされた遺伝子のジャンクションポイントのヌクレオチドの少なくとも1つを含んでもよく、それに隣接する1つ以上のヌクレオチドをさらに含んでもよい。一態様において、変異体配列は、本明細書中に記載される所与の m t D N A 配列またはその相補鎖に対して、少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一である。

10

【 0 0 5 2 】

本明細書で使用される場合、「実質的に類似する」という語句は、機能的には同じであるが、それぞれの核酸配列において異なっている核酸を指す。一態様において、互いに実質的に類似する2つの配列を「変異体」と呼ぶことがある。従って、2つの核酸分子は、それぞれの核酸配列間の1つ以上のヌクレオチドの差異が、それらの機能的特性またはそのような核酸によってコードされる任意のポリペプチドの機能的特性を変化させない場合、実質的に類似であると考えられ得る。理解されるように、遺伝暗号の縮重のために、塩基対の変化は、コードされたアミノ酸配列に何の変化ももたらさない。

20

【 0 0 5 3 】

「実質的な相補性」という語句は、核酸分子のヌクレオチド配列間の十分に高い度合いの相補性をいい、それらの間のハイブリダイゼーションを可能にするが、必ずしも100%の相補性ではない。例えば、標的配列に対して実質的な相補性を有しているプライマーまたはプローブは、標的配列に対して80%~99%の配列同一性を有し得る。一態様において、本明細書中で使用される場合、実質的な相補性は、配列間の少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性をいう。

30

【 0 0 5 4 】

本明細書で使用される場合、用語「断片」は、所与のミトコンドリアゲノム配列の一部、またはそれに対する相補鎖である核酸配列をいう。一態様において、そのような「一部分」は、スプライシングされた遺伝子のジャンクションポイントを含んでいるヌクレオチドの少なくとも2つを含み、それらに隣接する1つ以上のヌクレオチドをさらに含み得る。すなわち、前記部分は、欠失の除去後に、再結合された、または再環状化された D N A 配列を含んでいる。本明細書中に記載される断片は、長さが少なくとも約150ヌクレオチド(n t)、少なくとも約75 n t、少なくとも約50 n t、少なくとも約40 n t、少なくとも約30 n t、少なくとも約20 n t、または好ましくは少なくとも約15 n tである。特定の最小ヌクレオチド長が上記に列挙されるが、本明細書中に記載される場合、任意の大きさの断片(例えば、50、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、4000、5000、6000、7000、8000またはそれを上回るヌクレオチド)もまた検討されることが理解される。

40

【 0 0 5 5 】

配列の長さの文脈において、本明細書中で使用される場合、用語「約」は、具体的に列挙された値、またはいずれかの末端もしくは両方の末端において、数個の(5個、4個、3個、2個、または1個)ヌクレオチドだけ大きい値もしくは小さい値を含む。

【 0 0 5 6 】

本明細書中で使用される場合、用語「プローブ」または「プライマー」は、標的分子の

50

ヌクレオチド配列の一部とプローブ/プライマーのヌクレオチド配列の少なくとも一部のとの相補性に起因して、標的核酸と二重鎖構造を形成するか、または標的核酸と「ハイブリダイズする」オリゴヌクレオチド分子をいう。標的核酸分子は、いくつかの場合において、天然に存在する核酸分子の断片であり得る。本明細書中に記載されるプローブは、当技術分野において公知の方法に従って標識され得る。本明細書中に記載されるプローブまたはプライマーは、当業者に公知であるような適切なハイブリダイゼーション条件下で使用されることが理解される。本明細書中のプローブはまた、ハイブリダイズプローブと称され得る。本明細書中に記載されるプローブおよびプライマーは、当業者によって理解されるように、任意の長さであり得る。単なる例として、現在記載されているプローブおよびプライマーは、約150、140、130、120、100、90、80、70、60、50、40、30、25、20、15、または10ヌクレオチド(nt)の長さを有し得る。1つの好ましい態様において、本明細書に記載されるプローブおよび/またはプライマーは、約12~約35ntの長さ、または好ましくは約18~約25ntの長さ、およびより好ましくは約15ntの長さである。当業者によって理解されるように、プローブは、プライマーよりも長いヌクレオチド長を有し得る。従って、いくつかの場合において、本明細書に記載されるプローブは、約50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1500、2000、または2500ヌクレオチドの長さを有し得る。本説明は、いかなる特定のプローブまたはプライマーの長さにも限定されない。

10

20

【0057】

用語「含む(comprise)」、「含む(comprises)」、「含んだ(comprised)」または「含んでいる(comprising)」が、本説明において使用され得る。本明細書(明細書および/または特許請求の範囲を含む)において使用される場合、これらの用語は、述べられた特徴、整数、工程、または構成要素の存在を明記するものとして解釈されるべきである。しかし、これらは関連技術分野における当業者に明らかであるように、1つ以上の他の特徴、整数、工程、構成要素、またはそれらの群の存在を排除するものではない。したがって、本明細書において使用される場合、用語「含んでいる(comprising)」は、「少なくとも一部から成っている」ことを意味する。その用語を含む本明細書中の記載を解釈する場合、それぞれの記載中のその用語によって前置きされる特徴はすべて存在する必要があるが、他の特徴も存在することができる。「含む(comprise)」および「含んだ(comprised)」などの関連する用語は、同じ方法で解釈されるべきである。

30

【0058】

用語「および/または」は、「および」または「または」を意味し得る。

【0059】

本明細書中に別段の記載がない限り、任意の要素を識別するために使用される冠詞「a」は、1つのみの限定を構成することが意図されず、代わりに、「少なくとも1つ」または「1つ以上」を意味すると理解される。

【0060】

本明細書中に記載されるとおり、本発明者らは、新規mtDNA欠失を同定した。当該新規mtDNA欠失は、一態様において、子宮内膜症に関連し、そしてそれ故にそのような状態についての正確な診断マーカーを構成する。本発明者らはまた、新規mtDNA融合転写物を同定した。当該新規mtDNA融合転写物は、一態様において、子宮内膜症に関連する。これらの態様の両方について、以下にさらに論じる。融合転写物から生じる翻訳産物もまた、本説明によって包含される。

40

【0061】

一態様において、本発明の記載は、月経中に月経液に排出される子宮内膜細胞は、異所性および/または正所性の子宮内膜病変中に存在する子宮内膜様細胞と同じ遺伝的プロファイルを有しているであろうという本発明者らの仮説に関する。本発明者らは、ヒトミトコンドリアゲノムの大規模欠失のマッピングから得られた知見、これらの欠失の高頻度の

50

観察、および転写活性化変異 m t D N A 分子の他の疾病型における証拠を用いて、ミトコンドリア欠失および融合転写物が、異所性および/または正所性の子宮内膜病変中に存在する子宮内膜様細胞中に存在する可能性があるという仮説をさらに立てた。

【 0 0 6 2 】

これらの仮説を検証するために、ミトコンドリアゲノム全体にわたる予測されたダイレクトリピート (direct repeat) およびインダイレクトリピート (indirect repeat) に基づいて、268のミトコンドリア融合転写物を選択し、子宮内膜症のバイオマーカーとしての使用のためにスクリーニングした。子宮内膜症を有しているサンプルを子宮内膜症を有さないサンプルと区別する場合に特に有用であるとして、多数の m t D N A 欠失および対応する融合転写物が本発明者らによって同定された。これらの欠失および融合転写物について、以下にさらに論じる。これらの m t D N A 分子は、ミトコンドリア転写機構によって転写可能なオープンリーディングフレーム (O R F) を有している融合配列を産生し、融合転写物を生じる。そのような融合転写物によってコードされたタンパク質産物または融合タンパク質もまた、産生されることが予想される。

10

【 0 0 6 3 】

< (1 . 0) m t D N A 欠失、融合転写物、翻訳産物 >

((1 . 1) ミトコンドリア D N A (m t D N A) 突然変異)

上述したとおり、m t D N A 突然変異は一般に、m t D N A 野生型配列の一部分の欠失を含む。本説明は、特定の m t D N A 突然変異、具体的には m t D N A ゲノム配列の欠失と、子宮内膜症との関連性に基づいている。

20

【 0 0 6 4 】

本説明に従って、候補ゲノム配列を決定するために、配列欠失から生じるジャンクションポイントが最初に同定された。配列欠失は主に、5'末端および3'末端で欠失される配列に隣接しているダイレクトなまたはインダイレクトなリピートエレメントによって同定された。ゲノムからヌクレオチドの一部を除去し、その後、残ったゲノムを連結すると、新規のジャンクションポイントが作成される。

【 0 0 6 5 】

ジャンクションポイントの同定において、スプライシングされた遺伝子を同定するために、ジャンクションポイントに隣接している遺伝子のヌクレオチドを決定した。典型的には、スプライシングされた遺伝子は、第1の遺伝子由来の開始コドンおよび第2の遺伝子の終止コドンを含み、連続した転写物、すなわち、両方のスプライシングされた遺伝子の最初から最後まででのリーディングフレームを保持するものとして発現され得る。また、遺伝子配列内に含まれた別の開始コドンまたは終止コドンを用いてもよい可能性もある。

30

【 0 0 6 6 】

ミトコンドリアゲノムにおける大規模な欠失は、しばしば突然変異プロセスから生じる2つの産物をもたらす。これらの産物は、1) 短い配列 (一態様において、欠失した m t D N A 配列に相当し得る) および 2) 長い配列 (一態様において、残りの m t D N A ゲノム配列に相当し得る) の m t D N A ゲノムの両方の部分の再環状化の結果である。欠失の大きさに応じて、欠失が残りの m t D N A よりも大きくてもよいことが理解されるであろう。この状況は例えば、欠失配列の長さが約 8 2 0 0 b p より大きい場合に生じる。しばしば、短い配列および長い配列の両方が再環状化して、それぞれ、小サブリモンおよび大サブリモンとして知られるものを形成する。小さな構成要素が不十分な数のヌクレオチドである場合には、再環状化は不可能であり、その場合、突然変異プロセスは大サブリモンをもたらすだけである。本明細書中で議論されるとおり、大サブリモンおよび小サブリモンの両方が同定され得て、それによって、両方の分子が、子宮内膜症を検出、診断、および/または観察するために使用されることを可能にする。

40

【 0 0 6 7 】

((1 . 2) 融合転写物)

ミトコンドリアゲノムにおける大規模な再配列突然変異は、融合転写物の生成をもたらす。それ故に、子宮内膜症に関連する m t D N A 再配列は、子宮内膜症にも関連する融合

50

転写物をもたらすであろうことが予想された。従って、子宮内膜症の診断および観察のための、そのような転写物をコードする m t D N A およびそれに向けられたプローブの使用が、本明細書中に提供される。

【 0 0 6 8 】

本説明は、子宮内膜症を予測、診断、および/または観察するための方法において有用な、融合転写物並びに関連するハイブリダイゼーションプローブおよびプライマーの同定を提供する。当業者は、そのような分子が、天然に存在する転写物の単離を通して、または代わりに、本発明の方法に従って単離された m t D N A 分子の組換え発現によって、誘導され得ることを理解する。議論されるとおり、そのような m t D N A 分子は、典型的には第 1 の遺伝子由来の開始コドンと第 2 の遺伝子の終止コドンとを有しているスプライシングされた遺伝子を含んでいる。従って、それに由来する融合転写物は、スプライシングされた遺伝子に関連するジャンクションポイントを含んでいる。

10

【 0 0 6 9 】

((1 . 3) 翻訳産物)

本明細書に記載の融合転写物に基づいて、本説明はまた、対象融合転写物の翻訳から生じる推定タンパク質、すなわち「融合タンパク質」のアミノ酸配列を提供する。本説明はまた、融合転写物の少なくとも一部分、具体的には m t D N A の転写された融合部位またはジャンクションポイントを含んでいる一部分、の翻訳産物を提供する。

【 0 0 7 0 】

本説明の融合タンパク質は、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、疎水性電荷相互作用クロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法によって、生物学的サンプルから回収および精製され得る。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィー (「 H P L C 」) が精製のために使用される。

20

【 0 0 7 1 】

生物学的サンプル中の融合タンパク質レベルのアッセイは、種々の技術を使用して起こり得る。例えば、組織におけるタンパク質発現は、古典的な免疫組織学的方法を用いて研究され得る (Jalkanen et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, M., et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987))。タンパク質発現を検出するために有用な他の方法としては、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) およびラジオイムノアッセイ (R I A) などのイムノアッセイが挙げられる。適切な抗体アッセイ標識は、当技術分野において公知であり、酵素標識 (例えば、グルコースオキシダーゼ)、および放射性同位体 (例えば、ヨウ素 (< 1 2 5 > I、< 1 2 1 > I)、炭素 (< 1 4 > C)、硫黄 (< 3 5 > S)、トリチウム (< 3 > H)、インジウム (< 1 1 2 > I n)、およびテクネチウム (< 9 9 m > T c))、および蛍光標識 (例えば、フルオレセインおよびローダミン)、およびビオチンを含む。

30

【 0 0 7 2 】

本説明のポリペプチドはまた、当技術分野において公知の組換え技術によって産生され得る。典型的には、これは、目的のタンパク質またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含んでいる発現ベクターを用いた適当な宿主細胞の形質転換 (トランスフェクション、形質導入、または感染を含む) を含む。

40

【 0 0 7 3 】

(抗体およびタンパク質結合剤)

本説明のアッセイにおいて使用するためのタンパク質特異的抗体は、本明細書に記載の野生型もしくは発現された融合タンパク質、またはその抗原性ポリペプチド断片に対して産生され得て、これは、担体タンパク質 (例えば、アルブミン) とともに、動物系 (例えば、ウサギまたはマウス) に提示され得てもよく、またはそれが十分に長い場合 (少なくとも約 2 5 アミノ酸) は、担体なしで提示されてもよい。抗体が記載されているが、タン

50

パク質の同定に特異的な任意の他の適切な結合剤もまた使用され得ることが理解される。いずれにせよ、抗体または結合剤は、欠失を表すまたは示するようなタンパク質の領域に特異的に結合する方法によって、本明細書に記載の融合タンパク質を同定することができる。一態様において、融合タンパク質は、欠失事象後の mtDNA 分子（大サブリモンまたは小サブリモンのいずれか）のジャンクションポイントの翻訳を表す特有のアミノ酸プロファイルを有している。

【0074】

本明細書中で使用される場合、用語「抗体」(Ab)または「モノクローナル抗体」(Mab)は、ミトコンドリア融合タンパク質に特異的に結合し得るか、または「特異性」を有している、無傷な分子、および抗体断片、またはその抗原結合断片（例えば、Fab および F(ab')₂断片など）を含むことを意味する。Fab および F(ab')₂断片は、無傷な抗体のFc断片を欠き、循環からより迅速に消え、そして無傷な抗体の非特異的組織結合がより少ない可能性がある（Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)）。従って、これらの断片が好ましい。

10

【0075】

本発明の抗体は、種々の方法のいずれかによって調製され得る。例えば、ミトコンドリア融合タンパク質またはその抗原性断片を発現する細胞は、ポリクローナル抗体を含んでいる血清の産生を誘導するために動物に投与され得る。一方法において、ミトコンドリア融合タンパク質の調製物を調製し、精製して、天然の汚染物質を実質的に含まないようにする。そのような調製物は、次に、より大きな比活性のポリクローナル抗血清を産生するために、動物に導入される。

20

【0076】

関連する方法において、本説明の抗体はモノクローナル抗体である。そのようなモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術を使用して調製され得る（Kohler et al., Nature 256:495 (1975); Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:511 (1976); Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:292 (1976); Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., (1981) pp. 563-681）。一般に、そのような手順は、ミトコンドリア融合タンパク質抗原またはミトコンドリア融合タンパク質発現細胞を用いて動物（好ましくはマウス）を免疫することを含む。

【0077】

一態様において、本説明は、本明細書中に記載された融合タンパク質に対する特異性を有している抗体または抗原結合断片を使用する免疫学的アッセイを包含する（上記のとおり）。そのような免疫学的アッセイは、任意の他の必要な試薬、テストストリップ、材料、取扱説明書などとともに抗体または抗原結合断片を含むキットによって容易にされ得る。

30

【0078】

（アッセイ）

生物学的サンプル中の融合タンパク質などの翻訳産物のレベルを測定することは、被検体における子宮内膜症の存在または進行を確定し得る。従って、一態様において、本説明は、子宮内膜症を予測、診断または観察するための方法を提供し、これは、1つ以上の生物学的サンプルを得ること、サンプルからミトコンドリア融合タンパク質を抽出すること、およびサンプル中の1つ以上の分子の量を定量し、かつ検出された量を基準値と比較することによってそのような分子についてサンプルをアッセイすること、を包含する。当業者によって理解されるとおり、基準値は、この方法が子宮内膜症を予測、診断または観察しようとするかどうかに基づく。したがって、基準値は、1つ以上の対照サンプルもしくは子宮内膜症について陽性でない生物学的サンプルから収集されたタンパク質データ、子宮内膜症について陽性である1つ以上の生物学的サンプルから収集されたタンパク質データ、および/または経時的に採取された1つ以上の生物学的サンプルから収集されたタンパク質データに関連し得る。

40

【0079】

サンプル中のタンパク質を定量するための技術は当技術分野において周知であり、例え

50

ば、古典的免疫組織学的方法 (Jalkanen et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, M., et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)) を含む。タンパク質発現を検出するために有用なさらなる方法には、ラジオイムノアッセイ (RIA) および酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) などのイムノアッセイが含まれる。

【0080】

一態様において、本説明は、哺乳動物における子宮内膜症を検出、診断または観察する方法を提供し、この方法は、少なくとも1つのミトコンドリア融合タンパク質の存在について哺乳動物由来の組織サンプルをアッセイする工程を包含する。

【0081】

< (2.0) プローブおよびプライマー >

10

((2.1) mtDNA プローブおよびプライマー)

適切なハイブリダイズ条件下で異常な mtDNA 配列にハイブリダイズすることができ mtDNA ハイブリダイゼーションプローブおよび/またはプライマーもまた、本明細書に記載される。任意の公知のハイブリダイゼーション方法を使用することができる。

【0082】

プローブおよび/またはプライマーは、本明細書中に記載される例示的な mtDNA 融合分子 (例えば、以下の表1に列挙される分子) に反対して、またはその断片もしくは変異体に対して直接的に生成され得る。例えば、本明細書中で議論された異常な mtDNA 配列は、目的の融合ヌクレオチド配列を含んでいる核酸配列を検出するプライマーまたはプローブを設計するために使用され得る。当業者によって理解されるとおり、これらの核酸分子にハイブリダイズするプライマーおよび/またはプローブは、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下または低度にストリンジェンシーな条件下でハイブリダイズし得る。そのような条件は当業者に公知であり、例えば、*Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, New York (1989)), 6.3.1 - 6.3.6 に記載される。

20

【0083】

いくつかの態様において、本明細書中に記載されるプローブおよびプライマーは、スプライシングされた遺伝子のジャンクションポイントを含んでいる異常な mtDNA の少なくとも一部分に相補的な配列を含んでいる。上記のとおり、この「部分」は、欠失の除去後に mtDNA ゲノム中に残存する少なくとも2つのヌクレオチドを含み、それによって、ジャンクションポイントを生じる。ジャンクションポイントは、本明細書中に A : B として特定され、「A」および「B」は、欠失配列の反対側の mtDNA ゲノムヌクレオチドを表すが、残存配列が再環状化された後に互いに隣接する。「部分」は、ジャンクションポイントに隣接する1つ以上のヌクレオチドをさらに含み得る。この点に関して、本説明は、ジャンクションポイント A : B に関与するおよび/または隣接するヌクレオチドを使用して、mtDNA 分子を選択する任意の適切な標的化機構を包含する。プライマーおよびプローブの配列は、標的配列へのハイブリダイゼーションをなお可能にしながら、1つ以上の塩基対によって改変され得ることが、本明細書においてさらに意図される。そのようなプライマーまたはプローブは、標的配列に対して「実質的な相補性」を有しているといわれる。上述のとおり、欠失事象の後、大サブリモンおよび小サブリモンの両方が結果として生じ得て、そのようなサブリモンの両方は、一旦分子が再環状化されると、上記で規定したようなそれぞれのジャンクションポイントを有している。

30

40

【0084】

さらに、本説明は、一態様において、欠失ジャンクションまたはジャンクションポイント A : B を順方向または逆方向にまたぐように設計されたプライマーを包含する。別の態様において、1つ以上のプライマーは、ジャンクションポイントに隣接する標的配列上の位置にハイブリダイズするように設計され得る。

【0085】

当技術分野において公知の様々なタイプのプローブが、本説明において使用するために検討されている。例えば、プローブはハイブリダイゼーションプローブであり得、その標

50

的ヌクレオチド配列への結合は、エチジウムブロミド、SYBR（登録商標）Green、SYBR（登録商標）Goldなどの一般的なDNA結合色素を使用して検出され得る。あるいは、プローブは、1つ以上の検出可能な標識を組み込み得る。検出可能な標識は、分子であるか、または直接的もしくは間接的に検出され得る分子であり、そしてその標的配列とハイブリダイズするプローブの能力が影響されないように選択される。核酸配列を標識する方法は、当技術分野において周知である（例えば、Ausubel et al, (1997 & 更新) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley & Sons, New Yorkを参照のこと）。

【0086】

本説明のプローブとの使用に適した標識には、放射性同位体、フルオロフォア、化学ルミノフォア、酵素、コロイド粒子、蛍光微粒子などの、直接検出することができるものが含まれる。当業者は、直接検出可能な標識は、標識の検出を可能にするために、基質、トリガー試薬、光などの追加の構成要素を必要とし得ることを理解する。本説明はまた、間接的に検出される標識の使用を意図する。

10

【0087】

上記のとおり、現在記載されたプローブおよびプライマーは、当業者によって理解されるとおり、任意の適切な長さであり得る。本説明のプローブおよびプライマーのヌクレオチド長は、上記で議論された。上記のとおり、本明細書中に記載されたプローブおよび/またはプライマーは、好ましくは約12～約25ヌクレオチド長、より好ましくは約12～約15 nt長であり得る。本明細書中に記載されたプライマーおよび/またはプローブは、好ましくは少なくともmtDNAリピート（すなわち、リピートされた）配列の大きさである長さであり得ることが理解される。本説明は、いかなる特定のプライマーまたはプローブの長さにも限定されない。

20

【0088】

本明細書中に記載されたプローブは、好ましくは本明細書中に記載された生物学的サンプル由来の核酸分子にハイブリダイズし、それによって、記載された方法を可能にする。従って、一態様において、子宮内膜症の検出において使用するためのハイブリダイゼーションプローブが提供され、このプローブは、本明細書中に記載された異常なmtDNA分子の少なくとも一部分もしくはmtDNAゲノム由来の欠失配列の一部分に相補的であるか、または実質的に相補的である。

30

【0089】

((2.2) 融合転写物プローブおよびプライマー)

一旦、融合転写物が特徴づけられると、プライマーまたはプローブは、生物学的サンプル中の転写物を標的とするように開発され得る。そのようなプライマーおよびプローブは、任意の公知の方法（上記のとおり）を使用して、または以下に提供される実施例において記載されるとおりに調製され得る。プローブは例えば、融合転写物について生成され得て、そして検出技術（例えば、Panomics（商標）によるQuantiGene（商標）2.0）は、サンプル中の転写物の存在を検出するために使用され得る。プライマーおよびプローブは、本明細書中に記載された例示的な融合転写物に対して、またはその断片もしくは変異体に対して直接生成され得る。例えば、本明細書中に説明された配列（例えば、以下の表2に列挙された配列）は、目的の融合配列を含んでいるRNA配列を検出するプローブまたはプライマーを設計するために使用され得る。

40

【0090】

当業者によって理解されるとおり、本明細書中に記載された融合転写物にハイブリダイズするように設計されたプローブおよびプライマーは、スプライシングされた遺伝子のジャンクションポイントを発現している転写物の少なくとも一部分に相補的な、または実質的に相補的な配列を含んでいる。この一部分は、発現されたジャンクションポイントに相補的なヌクレオチドの少なくとも2つを含み、そしてそれに隣接する1つ以上の相補的なヌクレオチドをさらに含み得る。この点に関して、本説明は、スプライシングされた遺伝子のジャンクションポイントに関与および隣接するヌクレオチドを使用する融合転写物を

50

選択する任意の適切な標的化機構を包含する。

【0091】

当技術分野において公知の種々の型のプローブおよび標識方法が、本明細書に記載された転写物プローブの調製のために意図される。そのような型および方法のいくつかの例が、ゲノム配列の検出に関して上記に記載されている。本説明の転写物プローブは、少なくとも約150nt、少なくとも約75nt、少なくとも約50nt、少なくとも約40nt、少なくとも約30nt、少なくとも約20nt、または好ましくは少なくとも約12~15ntの長さである。「少なくとも20ntの長さ」のプローブは、例えば、本発明のmtDNA配列に相補的な20以上の連続した塩基を含んでいることが意図される。もちろん、より大きなプローブ（例えば、50、150、500、600、2000ヌクレオチド）が好ましい。上記のとおり、18~25ntのプライマーまたはプローブが好ましい。

10

【0092】

いくつかの態様において、子宮内膜症の検出に使用するための1つ以上のハイブリダイゼーションプローブおよび/またはプライマーが提供され、1つ以上のプローブおよび/またはプライマーは、本明細書中に記載されたミトコンドリア融合転写物の少なくとも一部分に相補的、または実質的に相補的である。

【0093】

<(3.0)mtDNA欠失、融合転写物およびそれらのタンパク質産物を検出するためのアッセイ>

20

上記のとおり、本説明は、被検体由来の生物学的サンプルを使用して、被検体における子宮内膜症を検出、診断、および/または観察することにおいて有用なミトコンドリアDNAバイオマーカーを提供する。具体的には、そのような生物学的サンプルは、非侵襲的に収集された経絡液、循環血液、および/または組織（生検組織など）である。本説明は、従って、一態様において、子宮内膜症の早期かつ正確な検出を可能にする、経絡液または血液に基づく試験を提供し、それによって、不必要な最初のおよび繰り返される外科的処置を防止する。したがって、本明細書に記載された方法は、子宮内膜症が疑われるが検出されない場合に、不必要な腹腔鏡処置の必要性を低減する。本方法はまた、経時的な被検体における子宮内膜症の観察を可能にすることによって、子宮内膜症が再発したかどうかを決定することを補助する。

30

【0094】

((3.1)異常なmtDNAの測定)

本明細書に記載された方法によれば、生物学的サンプル中の1つ以上の本発明の異常なmtDNAマーカーのレベルを測定することは、被検体における子宮内膜症の存在またはステージまたは進行を決定し得る。本説明は、したがって、被検体における子宮内膜症を検出、診断および/または観察するための方法を提供し、当該方法は、サンプル中の1つ以上の異常なmtDNAマーカーの量を測定および/または定量することによって、本明細書に記載の1つ以上の異常なmtDNAバイオマーカー（すなわち「マーカー」）について、被検体由来の生物学的サンプルをアッセイすることを含む。一旦定量されると、マーカーの量は、基準値（すなわち、コントロール）と比較され得る。基準値は、その方法が子宮内膜症を検出、診断またはモニターしようとするかどうかに基づいていてもよい。例えば、子宮内膜症を検出または診断する場合、基準値は、健康な被検体、すなわち子宮内膜症に罹患していない被検体由来のサンプル中の異常なmtDNAの量を含み得る。そのようなサンプルは、「既知の非子宮内膜症の」（すなわち「無関係の」）生物学的サンプルとして本明細書中に記載され得る。あるいは、基準値は、子宮内膜症に罹患していることが知られている被検体由来のサンプル中の異常なmtDNAの量を含み得る。そのようなサンプルは、「既知の子宮内膜症の」（すなわち「関係する」）生物学的サンプルとして本明細書中に記載され得る。コントロールが非子宮内膜症源由来の値または量を含んでいる場合、それは、「非子宮内膜症の量」として本明細書中に記載され得る。本明細書中に記載された他の態様において、コントロールは、同じ生物学的サンプル由来の別の検

40

50

体の基準値を含み得る。いくつかの場合において、本明細書中にさらに記載されるとおり、異常なmtDNAの量は、同じ被検体から採取された核DNA（例えば1つ以上のハウスキーピング遺伝子（例えばrRNAをコードする遺伝子）をコードするもの）の量に対して、最初に正規化され得る。一態様において、使用される核DNA配列は、18S rRNAをコードし得る。mtDNAの正規化された値は、次いで、閾値と比較され得る。子宮内膜症を検出または診断する場合、被検体の異常なmtDNAの量の増加は、子宮内膜症を示す。子宮内膜症を観察する場合、生物学的サンプルが被検体から経時的に採取され得て、そして所定の期間にわたって比較され得る。本明細書中に記載された1つ以上の異常なmtDNAの量の経時的な増加は、被検体における子宮内膜症の発症、再発または進行を示す。

10

【0095】

現在記載された方法はまた、本明細書に記載された異常なmtDNAマーカのパネルについて生物学的サンプルをアッセイすることを包含し、そのようなパネルは、2個以上の被検体のmtDNAマーカを含んでいる。例えば、そのようなパネルは、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれより多い現在記載されたmtDNAマーカを含み得る。

【0096】

一態様において、哺乳動物における子宮内膜症を検出する方法が本明細書中にて提供され、この方法は、本明細書中に記載されるような突然変異mtDNA配列を認識し得るかまたはハイブリダイズし得る少なくとも1つのハイブリダイゼーションプローブとサンプルをハイブリダイズすることによって、異常なmtDNAの存在について哺乳動物被検体由来の生物学的サンプル（例えば、血液、月経液、組織サンプルなど）をアッセイすることを包含する。具体的には、本明細書中に記載されるとおり、そのようなプローブは、サンプルのmtDNA分子の一部とハイブリダイズするように適合されるヌクレオチド配列と共に提供され、そのような一部分は、本明細書中に記載されたジャンクションポイントを含んでいる。

20

【0097】

いくつかの態様において、本方法は、本説明中に記載されるとおり、異常なmtDNA分子にハイブリダイズするように適合された少なくとも2つのプライマーとサンプルをハイブリダイズすることによって、哺乳動物由来の生物学的サンプルをアッセイする工程を含む。一態様において、プライマーの1つは、本明細書中に記載されるようなジャンクションポイントを有しているmtDNAの一部に相補的であるヌクレオチド配列を用いて設計され得る。別の態様において、プライマーは、mtDNAのジャンクションポイントに隣接する領域にハイブリダイズするヌクレオチド配列を伴って提供され、ジャンクションポイントと重複するように適合され得る。

30

【0098】

別の態様において、本説明は子宮内膜症を検出するための方法を提供し、アッセイは、以下を含む：

a) 少なくとも1つのプローブが生物学的サンプルから抽出された異常ミトコンドリアDNA配列にハイブリダイズすることを可能にするために、本明細書中に記載された少なくとも1つのプローブを使用してハイブリダイゼーション反応を行う工程；

40

b) 少なくとも1つのプローブにハイブリダイズしたミトコンドリアDNAの量を定量することによって、サンプル中の少なくとも1つの異常ミトコンドリアDNA配列の量を定量する工程；および、

c) サンプル中のミトコンドリアDNAの量を、少なくとも1つの既知の基準値と比較する工程であり、ここでは、

基準値が子宮内膜症に関連しないmtDNAの量を含んでいる場合、サンプル中の異常なmtDNA量が高いほど、子宮内膜症が存在することを示す；または、

基準値が子宮内膜症に関連するmtDNAの量を含んでいる場合、サンプル中の異常なmtDNA量が低いほど、子宮内膜症が存在しないことを示す。

50

【 0 0 9 9 】

特定のミトコンドリア突然変異を同定することによって子宮内膜症を診断する方法およびスクリーニング手段もまた、本明細書中で意図される。任意の公知のハイブリダイゼーション方法を用いて、限定されるものではないが、分岐DNAおよびqPCR、シングルプレックスおよびマルチプレックスの両方を含むプローブおよび/またはプライマーベースの技術を包含する、そのような方法を実施することができる。野生型または突然変異した領域に適合しているオリゴヌクレオチドプローブ、およびコントロールプローブを有しているアレイ技術も使用することができる。マイクロアレイまたは遺伝子チップなどの市販のアレイは、本説明に記載の方法で使用するのに適している。

【 0 1 0 0 】

従って、生物学的サンプル中の本明細書に記載された異常なmtDNA分子を検出することによって、被検体における子宮内膜症を検出または診断することが可能である。さらに、被検体由来の連続して得られたサンプル中の異常なmtDNAの量を、経時的に、質的または量的に、測定および比較することによって、そのような被検体における子宮内膜症の進行を観察することができる。

【 0 1 0 1 】

((3 . 2) 融合転写物の測定)

生物学的サンプル中の本明細書に記載されたミトコンドリア融合転写物のレベルを測定することはまた、被検体における子宮内膜症の存在またはステージまたは進行を決定し得る。従って、子宮内膜症を検出、診断および/または観察するための方法が提供され、当該方法は、被検体から得られた1つ以上の生物学的サンプルからミトコンドリアRNAを抽出する工程、および本明細書に記載された異常なmtDNAに対応する融合転写物についてサンプルをアッセイする工程を包含する。そのようなアッセイは、サンプル中の1つ以上の融合転写物の量を定量し、そして検出された量を基準値と比較することを包含し得る。基準値は、この方法が子宮内膜症を診断またはモニターしようとするかどうかに基づく。したがって、基準値は、1つ以上の既知の非子宮内膜症の生物学的サンプルから、1つ以上の既知の子宮内膜症の生物学的サンプル、既知の非子宮内膜症もしくは既知の子宮内膜症のサンプルの集団から、および/または経時的に被検体から採取された1つ以上の生物学的サンプルから収集された転写物のデータに関連し得る。

【 0 1 0 2 】

一態様において、本明細書に記載された方法は、子宮内膜症を示す融合転写物マーカ-のパネルについて、被検体由来の1つ以上の生物学的サンプルをアッセイすることを包含し、このパネルは、本明細書に記載された2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個または10個のRNAマーカ-を含んでいる。

【 0 1 0 3 】

従って、一態様において、哺乳動物における子宮内膜症を検出する方法が提供され、当該方法は、哺乳動物由来の生物学的サンプル(例えば、血液、月経液、または組織)を、ミトコンドリア融合転写物の少なくとも一部分に相補的な核酸配列を有している少なくとも1つのハイブリダイゼーションプローブと前記サンプルをハイブリダイズさせることによって、本明細書に記載された少なくとも1つの融合転写物の存在についてアッセイする工程を包含し、この一部分は、ミトコンドリア融合転写物中に融合ジャンクションを含んでいる。

【 0 1 0 4 】

別の態様において、サンプルを少なくとも2つのプライマーとハイブリダイズさせることによって、哺乳動物由来の生物学的サンプルをアッセイする工程を含む方法が提供される。上記のとおり、プライマーの少なくとも1つは、融合ジャンクションを含んでいる融合転写物の一部分へのハイブリダイゼーションを可能にする配列を有し得る。他の態様において、プライマーは、融合ジャンクションのフランキング領域へのハイブリダイゼーションを可能にする配列を有し得る。

【 0 1 0 5 】

別の態様において、本発明は上記の方法を提供し、アッセイは、以下を含む：

a) 少なくとも1つの上記で言及したプローブを用いてハイブリダイゼーション反応を行い、少なくとも1つのプローブを相補的なミトコンドリア融合転写物にハイブリダイズさせる工程；

b) 少なくとも1つのプローブにハイブリダイズした転写物の量を定量することによって、サンプル中の少なくとも1つのミトコンドリア融合転写物の量を定量する工程；および、

c) サンプル中のミトコンドリア融合転写物の量を、少なくとも1つの既知の基準値と比較する工程であり、ここでは：

基準値が子宮内膜症に関連しないミトコンドリア融合転写物の量を含んでいる場合、サンプル中のその量が高いほど子宮内膜症が存在することを示す；および、

基準値が子宮内膜症に関連するmtDNAの量を含んでいる場合、サンプル中の異常なmtDNAのその量が少ないほど子宮内膜症が存在しないことを示す。

【0106】

((3 . 3) 翻訳タンパク質の検出)

本明細書中に記載された融合転写物の翻訳産物、タンパク質は、抗体または他のそのような特異的結合成分を利用する免疫学的アッセイなどの一般に公知の方法を使用して検出され得る。具体的には、そのような成分は、mtDNAの翻訳された融合部位またはジャンクションに特異的に結合する。

【0107】

< (4 . 0) キット >

本説明は、被検体の子宮内膜症のインビトロの検出、診断、および/または観察のための診断またはスクリーニング用キットを包含する。そのようなキットは、好ましくはアッセイを行うために必要とされ得る場合、試薬、指示書、ツール、および/または容器などと任意に組み合わせて、本明細書中に記載されるとおりの1つ以上のプローブまたはプライマーを含む。

【0108】

キットは、診断アッセイを行うために必要な試薬、例えば緩衝液、塩、検出試薬、抗血液凝固剤などを含むことができる。生物学的サンプルの単離および/または処理のための緩衝液および溶液のような他の成分もまた、キットに含まれ得る。キットの成分の1つ以上を凍結乾燥することができ、キットは、凍結乾燥された成分の再構成に適した試薬をさらに含むことができる。

【0109】

必要に応じて、本明細書に記載されたキットはまた、サンプリング手段、反応容器、混合容器、ならびに/または試験サンプルの収集および/もしくは調製を容易にするための他の成分を含み得る。キットはまた、必要に応じて、使用のための説明書を含み得、これは、紙の形態、またはディスク、CD、DVDなどのようなコンピュータ読み取り可能な形態で提供され得る。

【0110】

一態様において、本説明は、本明細書中に記載されたハイブリダイゼーションプローブおよびアッセイを行うための少なくとも1つの試薬を含む、子宮内膜症を検出および/または診断する目的でインビトロアッセイを行うためのキットを提供する。

【0111】

一態様において、本明細書中に記載されたキットは、本明細書中に記載された異常なmtDNAの少なくとも一部分または本明細書中に記載されたミトコンドリアRNA融合転写物の少なくとも一部分に相補的な少なくとも1つのハイブリダイゼーションプローブを含む。上記のように、一態様において、プローブがハイブリダイズする配列の一部分は、mtDNAまたは融合転写物におけるジャンクションポイントまたは融合ジャンクションを含む。一態様において、キットは、1つ以上のコントロール配列にハイブリダイズするように適合される1つ以上のプローブを含み得る。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 2 】

別の態様において、本明細書中に記載されたキットは、本明細書中に記載された異常な m t D N A の少なくとも一部分または本明細書中に記載されたミトコンドリア R N A 融合転写物の少なくとも一部分を増幅するための一対のプライマー（例えば、フォワードプライマーおよびリバースプライマー）を含む。一態様において、プライマーの少なくとも1つは、m t D N A または融合転写物中のジャンクションポイントまたは融合ジャンクションにハイブリダイズするように適合されたヌクレオチド配列を有している。別の態様において、プライマーの少なくとも1つは、m t D N A または融合転写物中のジャンクションポイントまたは融合ジャンクションに隣接する m t D N A または融合転写物の配列にハイブリダイズするように適合されたヌクレオチド配列を有している。一態様において、キットは、1つ以上のコントロール配列にハイブリダイズするように適合された1つ以上のプライマーまたはプライマー対を含み得る。

10

【 0 1 1 3 】

< (5 . 0) 例示的な m t D N A 突然変異、融合転写物、翻訳産物、プローブ、およびプライマー >

本明細書で請求された方法に有用であることが見出された m t D N A 突然変異（または異常な m t D N A ）および融合転写物が以下に記載される。推定翻訳産物もまた、提供され、そして同じ理由のために有用であると考えられる。被検体の m t D N A および融合転写物を検出するために有用なプローブおよびプライマー配列もまた、以下に提供される。

【 0 1 1 4 】

((5 . 1) 例示的な m t D N A 突然変異)

表 1 に、研究した異常な m t D N A 分子（すなわち、欠失を有している m t D N A 分子）を列挙する。列挙した配列は、野生型ミトコンドリアゲノム（配列番号 1 ）の修飾に基づき、融合または「 F U S 」表示が割り当てられている。提供される場合、「 A l t M e t 」は、代替の翻訳開始部位を指す。表 1 に列挙した配列は、被検体の欠失を除去した後、に再結合、または再環状化される m t D N A ゲノムの区域である。

20

【 0 1 1 5 】

30

40

50

【表 1】

表1:mtDNA異常

欠失ID	配列番号:	欠失名 (配列番号1を 基準にした、 欠失の位置)	スプライス された 遺伝子	mtDNA上の 位置	ジャンクション部位 (SEQ ID上の スプライス位置)	ランキング レポートの位置 (配列番号1を 基準にした)
1	2	FUS 8469:13447 (AltMet) ("5.0kb欠失" または 4977kb "common deletion") (8483-13446)	(ATP8) ~ (ND5)	8366-14148	8366-8469/13447- 14148 (配列番号2の ヌクレオチド 81-82)	[8470-8482] および 13447-13459
4	3	FUS 7992:15730 ("7.7kb欠失") (7993-15722)	(CO2) ~ (Cytb)	7586-15887	7586-7992/15730- 15887 (配列番号3の ヌクレオチド 407-408)	7986-7992 および [15723-15729]
14	4	FUS 9191:12909 (9196-12908)	(ATP6) ~ (ND5)	8527-14148	8527-9191/12909- 14148 (配列番号4の ヌクレオチド 665-666)	[9192-9195] および 12909-12911
14a	5	FUS 9188:12906 ("3.7kb欠失") (9196-12905)	(ATP6) ~ (ND5)	8527-14148	8527-9188/12906- 14148 (配列番号5の ヌクレオチド 662-663)	[9189-9195] および 12906-12912
16	6	FUS 10367:12829 (10368-12825)	(ND3) ~ (ND5)	10059- 14148	10059-10367/12829- 14148 (配列番号6の ヌクレオチド 309-310)	10365-10367 および [12826-12828]
120	7	FUS 6260:12814 ("6.5kb欠失") (6271-12813)	(CO1) ~ (ND5)	5904-14148	5904-6260/12814- 14148 (配列番号7の ヌクレオチド 357-358)	[6261-6270] および 12814-12823
122	8	FUS 7973:9023 ("1.0kb欠失") (7984-9022)	(CO2) ~ (ATP6)	7586-9207	7586-7973/9023- 9207 (配列番号8の ヌクレオチド 387-388)	[7974-7983] および 9023-9032

10

20

30

40

50

(続き)

193	9	FUS 9086:10313 ("1. 2kb欠失") (9087-10303)	(ATP6) ~ (ND3)	8527-10404	8527-9086/10313- 10404 (配列番号9の ヌクレオチド 560-561)	9078-9086 および [10304-10312]
400	10	FUS 9079:14988 (9086-14987)	(ATP6) ~ (CYTB)	8527-15887	8527-9079/14988- 15887 (配列番号10の ヌクレオチド 553-554)	[9080-9085] および 14988-14903
516	11	FUS 7260:15540 (7261-15531)	(CO1) ~ (CYTB)	5904-15887	5904-7260/15540- 15887 (配列番号11の ヌクレオチド 1357-1358)	7253-7260 および [15532-15539]
586	12	FUS 8431:10841 ("2. 4kb欠失") (8440-10840)	(ATP8) ~ (ND4)	8366-12137	8366-8431/10841- 12137 (配列番号12の ヌクレオチド 66-67)	[8432-8439] および 10841-10848
8590	74	FUS 8984:13833 ("4. 8kb欠失") (8994-13832)	(ATPase6) ~ (ND5)	8527-14101	8527-8984/13833- 14101 (配列番号74の ヌクレオチド 457-458)	[8985-8993] および 13833-13841
2767	75	FUS 5362:14049 ("8. 7kb欠失") (5377-14048)	(ND2) ~ (ND5)	4470-14101	4470-5362/14049- 14101 (配列番号75の ヌクレオチド 893-894)	[5363-5376] および 14049-14062

【 0 1 1 6 】

表1において、「欠失ID」は、スクリーニングされたものの中からmtDNA欠失を同定するための参照番号である。「配列番号」は、本明細書中において被検体のmtDNA欠失に割り当てられたヌクレオチド配列識別子を指す。「欠失名」は「FUS」表示を特定し、A:Bは、第一プライミング遺伝子の最後のミトコンドリアヌクレオチドと第二プライミング遺伝子の最初のミトコンドリアヌクレオチドとの間のジャンクションポイントを表す。「欠失の位置」は、親mtDNA分子から除去されたそれぞれの配列の一部分を特定する。次の列において、「スプライスされた遺伝子」は、欠失から生じるスプライシングされた遺伝子を特定する。この点に関して、ATP8はATPase8を表し、ATP6はATPase6を表し、CO2はCOIIを表し、CO1はCOIを表す。「mtDNAの位置」は、野生型mtDNAゲノムに対応するmtDNA配列のセグメント(すなわち、配列番号1)を特定する。「ジャンクション部位」は、(野生型mtDNAゲノム、配列番号1に基づいて)欠失の除去に続いて突然変異mtDNAのジャンクションポイントの位置を特定する。従って、例として、「ジャンクション部位」7586-7992/15730-15887を有している欠失ID番号4(配列番号3)の場合、欠失mtDNAセグメントは、ヌクレオチド7993~15729を含んでいる。このような場合、異常なmtDNAは、一旦再環状化されると、ヌクレオチド7992および15730にジャンクションを含んでいる。この列の括弧内の一部分は、それぞれの配列番号中のスプライスの位置を特定する。最後の列は、欠失のランキングリピート配列を特定する。角括弧内に示されたリピートは、第3列に示された欠失と共に除去される。

【 0 1 1 7 】

表1に示されるとおり、ランキングリピート配列の1つは、欠失配列と共に除去され

、その結果、欠失配列の一部を形成する。しかしながら、リピート配列の他方が、代わりに欠失と共に含まれる可能性がある。この欠失機構は、図20に示されており、図20は親mtDNA分子10を示しており、12および20はmtDNA分子の相対する末端を表し、16は欠失、または欠失配列(表1の第3列に列挙されているような)を表す。リピート配列は、14および18で表される。欠失事象の間に、リピート14または18のうちの1つが欠失16と共に除去され、その結果、欠失16の一部を形成する。このように、残りの親mtDNAは一旦再環状化されると、図20に示すように、セグメント12-18-20またはセグメント12-14-10を含んでいる。上記のように、1つのリピート全体が欠失配列に含まれると記載されているが、リピートの一方または両方の一部のみが欠失に含まれる可能性がある。

10

【0118】

本説明による突然変異mtDNA配列は、融合転写物の産生をもたらす任意の修飾を含むことができる。そのような修飾の非限定的な例には、挿入、転座、欠失、重複、組換え、再配置、またはそれらの組み合わせが含まれる。

【0119】

現在記載されているmtDNA突然変異を検出する工程は、当業者に公知の任意の技術から選択することができる。例えば、mtDNAの解析は、DNAを分岐させることによる標的の選択、mtDNAのシーケンシング、PCRによるmtDNAの増幅、サザン、ノーザン、ウェスタン、サウスウェスタンプロットハイブリダイゼーション、変性HPLC、マイクロアレイ、バイオチップもしくは遺伝子チップへのハイブリダイゼーション、分子マーカー解析、バイオセンサー、融解温度プロファイリング、または上記のいずれかの組み合わせを含むことができる。

20

【0120】

本明細書中で同定されたmtDNA配列の変異体または断片もまた検討される。本説明は、子宮内膜症を診断および/または観察するための、これらの配列の変異体または断片の使用を包含する。

【0121】

((5.2) 例示的な融合転写物)

本明細書中に記載された方法において使用するための例示的な融合転写物は、表2中に提供される。これらの融合転写物は検出され、実施例に示されるとおり、子宮内膜症の検出、診断および/または観察において有用であることが見出された。

30

【0122】

【表2】

表2:本発明の融合転写物

欠失ID	mtDNA欠失配列番号	転写物配列番号	融合転写物名	ランキング 遺伝子	欠失ジャンクション
1	2	13	FUS 8469:13447 (AltMet)	(ATP8) ~ (ND5)	8469:13447
4	3	14	FUS 7992:15730	(CO2) ~ (Cytb)	7992:15730
14	4	15	FUS 9191:12909	(ATP6) ~ (ND5)	9191:12909
14a	5	16	FUS 9188:12906	(ATP6) ~ (ND5)	9188:12906
16	6	17	FUS 10367:12829	(ND3) ~ (ND5)	10367:12829
120	7	18	FUS 6260:12814	(CO1) ~ (ND5)	6260:12814
122	8	19	FUS 7973:9023	(CO2) ~ (ATP6)	7973:9023
193	9	20	FUS 9086:10313	(ATP6) ~ (ND3)	9086:10313
400	10	21	FUS 9079:14988	(ATP6) ~ (CYTB)	9079:14988
516	11	22	FUS 7260:15540	(CO1) ~ (CYTB)	7260:15540
586	12	23	FUS 8431:10841	(ATP8) ~ (ND4)	8431:10841
8590	74	76	FUS 8984:13833	(ATPase6) ~ (ND5)	8984:13833
2767	75	77	FUS 5362:14049	(ND2) ~ (ND5)	5362:14049

40

50

【 0 1 2 3 】

表 2 において、「転写物番号」は、融合転写物に割り当てられた識別番号であり、また、表 1 の m t D N A 欠失 I D 番号に対応する。「m t D N A 欠失配列番号」は、表 1 の m t D N A 欠失配列識別子である。「転写物配列番号」は、被検体の融合転写物の配列識別子である。「融合転写物名」は「F U S」表示を示し、A : B は最初のスプライシングされた遺伝子の最後のミトコンドリアヌクレオチドと第 2 のスプライシングされた遺伝子の最初のミトコンドリアヌクレオチドとの間のジャンクションポイントを表す。「フランキング遺伝子」は、欠失から生じるスプライシングされた遺伝子を示す。「欠失ジャンクション」は、欠失の除去後の m t D N A 分子のジャンクションポイントの位置を示す。

【 0 1 2 4 】

天然に存在する融合転写物は、生物学的サンプルから抽出され、本説明の実施例に記載される方法のような、当技術分野で公知の任意の適切な方法に従って同定され得る。

【 0 1 2 5 】

融合転写物はまた、当該技術分野で公知の組換え技術によって産生され得る。一般的に、これは、目的の m t D N A 配列を含んでいる発現ベクターを用いる適切な宿主細胞の形質転換（トランスフェクション、形質導入、または感染を含む）を含む。

【 0 1 2 6 】

本明細書中で同定される融合転写物の変異体または断片もまた検討される。

【 0 1 2 7 】

((5 . 3) 融合転写産物の例示的翻訳産物)

m t D N A 欠失 1、4、14、16、120、122、193、400、516、586、8590、および 2767 の転写物に対応する推定アミノ酸配列を表 3 に提供する。

【 0 1 2 8 】

【表 3】

表3:本明細書の融合転写物に対応する推定のアミノ酸配列

欠失ID	欠失名	mtDNA欠失配列番号	転写物配列番号	アミノ酸配列番号
1	FUS 8469:13447 (AltMet)	2	13	24
4	FUS 7992:15730	3	14	25
14	FUS 9191:12909	4	15	26
14a	FUS 9188:12906	5	16	27
16	FUS 10367:12829	6	17	28
120	FUS 6260:12814	7	18	29
122	FUS 7973:9023	8	19	30
193	FUS 9086:10313	9	20	31
400	FUS 9079:14988	10	21	32
516	FUS 7260:15540	11	22	33
586	FUS 8431:10841	12	23	34および/または84
8590	FUS 8984:13833	74	76	78
2767	FUS 5362:14049	75	77	79

【 0 1 2 9 】

[実施例]

以下の実施例は、本発明の態様をさらに説明するために与えられている。実施例は、明細書の範囲を限定することを決して意図されていない。

【 0 1 3 0 】

(実施例 1 : 子宮内膜組織における大規模な融合転写物のスクリーニング)

融合転写物に対応する 268 プローブを、子宮内膜症患者から得られたサンプルにおける、コントロールサンプルに対して差異のある発現の証拠について、子宮内膜組織サンプルによってスクリーニングした。スクリーニング方法および結果をこれ以降に記載する。

【 0 1 3 1 】

プロープライブラリの生成

268プローブを、ヌクレオチド塩基対リピートを見つける独自のプログラムを用いて同定した。このプログラムは、5'および3'末端で欠失されるべき配列に隣接するダイレクトなりリピートエレメントおよびインダイレクトなりリピートエレメントに基づいて、16000を超える可能性のある欠失を同定した。268プローブの選択は、最小で8塩基対リピートが必要であるが；8塩基対リピートに満たない欠失もあり得るという基準に基づいていた。例として、欠失16のリピートは3bpである。

【 0 1 3 2 】

組織サンプル

大きな子宮内膜サンプル (> 0.49g) を得た。手術時に医師によって決定される組織の「状態」または診断、ならびに手術の(複数の)原因を表4に示す。

【 0 1 3 3 】

【表4】

表4: 組織サンプル

サンプルID	状態/外科処置のための理由
4360	子宮内膜症(卵巣嚢腫)
3461	子宮内膜症(卵巣子宮内膜腫)
3462	子宮内膜症(卵巣嚢腫、疼痛)
3463	コントロール(外科処置の7-8年前に子宮内膜症を有していた；見込まれる卵管結紮のための外科処置の時点に存在しない)
3464	コントロール(子宮筋腫)
3465	コントロール(見込まれる卵管逆転)
3466	コントロール(疑いのある卵巣嚢腫病変の除去)

【 0 1 3 4 】

表4に挙げられているサンプルを用いて、「生または凍結の動物組織」用のQuant i Gene (商標) サンプル処理キットを用いて、組織ホモジネートを調製した。各サンプルについて、60µLのプロテイナーゼKを含んでいる6mLの破碎溶液に加えられる前に、凍結した子宮内膜組織の4つの部分を、切断し、その重さを量った(それぞれ約100mg)。サンプルを、Qiagenの組織破壊プローブを用いてホモジナイズし、65で一晚インキュベートした。次いで、ホモジネートを、15分間の16000xgにおける2回の遠心分離によって、透明にした。上清を保存し、次の分岐DNAアッセイのための鋳型として利用した。代替的に、DNAを、QiagenのQiaAmp (商標) DNA Mini Kitを用いた組織用プロトコルにしたがって、組織ホモジネートから、または新たな凍結組織から直接に、抽出した。次いで、DNAをNanodrop (商標) 分光光度計で定量し、qPCR反応におけるその後の使用のために標準化した。

【 0 1 3 5 】

ミトコンドリアDNA欠失および得られる融合転写物は、多くの分子技術のうちの1つを用いて検出され得る。ここでは、分岐DNAおよび定量的PCR技術を、融合転写物および親の異常なmtDNA分子の検出のためにそれぞれ使用した。

【 0 1 3 6 】

分岐DNAプラットフォーム

組織サンプルに関して、PanomicsのQuantigene (商標) 2.0 protocol for “Capturing Target RNA from Fresh, Frozen, or FFPE Tissue Homogenates” にしたがった。水、溶解溶液、ブロッキング試薬およびプローブによって構成されているワーキングプローブセットを、最初に捕捉プレートに添加した。本実施例で使用したプローブ(または“捕獲プローブ”)は、表2に挙げられているそれぞれの融合転写物をコードするmtDNAのジャンクションポイントに結合するように設計された(相補的ヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

を有している)オリゴヌクレオチドを含む。特に、分岐DNA (bDNA) 分析に使用したプローブは、以下の表5に挙げられているプローブであった。

【0137】

次いで、ホモジネートを捕捉プレートに添加し、55で一晚インキュベートして、プローブ- 鋳型ハイブリダイゼーションを可能にした。一連の洗浄およびハイブリダイゼーション工程に続いて、化学発光基質を添加した。プローブ- 鋳型ハイブリッドに結合されているアルカリホスファターゼの分解は、相対発光単位 (RLU) として報告されている発光シグナルを生じる。各捕捉プレートを2回繰り返して読み取り、RLUをPromega GloMax (商標) ルミノメーターで測定した。RLU値を生物情報科学的に分析した。2つのプレート読み取りおよび3回の値を、それらが15%のCV (変動係数; すなわち、平均に対する標準偏差の比) を有していることを条件に、それぞれ平均化した。また、RLU値が所定のプローブについてバックグラウンドを上回っているか否かを決定した。具体的には、定量の下限、LOQ (LOQ = プローブのバックグラウンドのRLU平均 + 10のバックグラウンド平均の標準偏差) を算出し、サンプルRLUから差し引いた。次いで、サンプルRLU値を、分析を容易にするためにlog2値またはlog10値に変換した。最後に、任意の所定のプローブについて、サンプルRLUを、サンプルRLUから減算または除算することによって、サンプルRLUをハウスキーパー (HK) RLUに対して標準化した。プローブ1、4、14、16、120、122、193、400、516および586 (ここで、プローブ番号は、以上に与えられている融合転写物番号に対応する) を、3つの子宮内膜症陽性および4つのコントロール子宮内膜サンプルによって試験する、標準化された結果を、図2A ~ 2Jに示し、以下の表5にまとめる。

10

20

【0138】

【表5】

表5: 融合転写物の能力

転写物 / プローブ	平均の Log2LOQProbe - Log2LOQHK23 (コントロール)	平均の Log2LOQProbe - Log2LOQHK23 (Endo. Pos.)	コントロールおよび Endo. Pos. 間にある平均の差	有意性、P2	平均コピー数
1	-14.61	-11.32	-3.29	0.007	46.16
4	-16.54	-10.9	-5.64	0.12	89.99
14	-12.25	-9.2	-3.05	0.01	52.63
16	-13.91	-9.8	-4.12	0.01	64.9
120	-4.15	-0.62	-3.53	0.08	159082.93
122	-3.84	-0.76	-3.08	0.09	159914.28
193	-4.2	-1.45	-2.75	0.11	117468.11
400	-10.9	-7.71	-3.19	0.27	1074.81
586	-9.45	-6.7	-2.76	0.07	2489.43
516	-2.07	0.86	-2.93	0.12	550075.23

30

【0139】

表5は、コントロールおよび子宮内膜症陽性 (「Endo. Pos.」) の組織サンプル (図2A ~ 2Jに示される散布図に対応する) についての標準化された平均RLU値 (Log2LOQProbe - Log2LOQHK23) を示す。2つの組織群間の平均差および差の有意性が与えられている。所定の融合転写物 (すなわち、プローブ1、4、14、16、400、586、120、122、193および516) の平均コピー数も表5に示す。

40

【0140】

qPCR反応

qPCR分析を、転写物番号1、4、14、16、120、122、193、586、8590、および2767について行った (以下の表6を参照のこと)。精製DNA抽出物を、ヌクレアーゼなしの超純水を用いた0.25ng / μLの濃度に対して標準化した

50

。qPCR反応を、QiagenのQuantitect(商標) Sybr Green(登録商標) PCRキットを用いて、薄明下の室温においた。10 μ Lの鋳型を、標的に応じた100 μ Mのフォワードおよびリバースプライマー0.025~0.0625 μ Lのそれぞれと共に、12.5 μ Lの2Xマスターミックスに加えた。プライマー配列を特定のDNA標的のために設計し、これらの配列を表6(ジャンクションプライマー)および7(フランキングプライマー)に示す。本明細書に使用される場合、用語「ジャンクションプライマー」は、欠失の除去後にジャンクションポイントを形成するヌクレオチド対の少なくとも1つを有している標的DNA分子の領域にハイブリダイズするプライマーを意味すると理解される。従って、1つの態様において、ジャンクションプライマーは、ジャンクションポイントを形成する両方のヌクレオチド、または当該ヌクレオチドのうち

10

以下の表に示すように、いくつかの場合には、2組以上のプライマーを使用した。反応物を、PCRグレードのH₂Oを用いて25 μ Lの最終容量にした。反応混合物をChromo 4(商標)(Biorad)またはOpticon 2(商標)(MJ Research)リアルタイムPCRサイクラーのいずれかでサイクルにかけた。

【0141】

20

30

40

50

【表 6】

表6: 大規模mtDNA欠失を標的にするためのqPCR反応に使用されるジャンクションプライマー配列

欠失ID	方向	配列 (5' -3')	位置	Seq. 寄与	長さ
1 (8469: 13447)	Fwd	TCTACCCCCTCTAGAGCCC ACTGT (配列番号35)	8277- 8300		24
	Rev	CTAGGCTGCCAATGGTGA GGGAGGT ジャンクション (配列番号36)	13741- 13460 8482- 8470	CTAGGCTGCCAA TGGTGAGGGAGGT	25
4 (セット1) (7992: 15730)	Fwd 7983F	TGCGACTCCTAGCCGCAG ACCTCCTCATTC ジャンクション (配列番号37)	7983- 7992 15730- 15749	TGCGACTCCT AGCCGCAGACCTCCTC ATTC	30
	Rev 16053R	GGTACCCAAATCTGCTTCC CCATGAAAG (配列番号38)	16053- 16026		28
4 (セット2)	Fwd 7983F	TGCGACTCCTAGCCGCAG AC ジャンクション (配列番号39)	7983- 7992 15730- 15739	TGCGACTCCT AGCCGCAGAC	20
	Rev 15935R	(セット1と同じ)			
4 (セット3)	Fwd	CGCCATCATCCTAGTCCTC ATCGC (配列番号40)	7792- 7815		24
	Rev	GAATGAGGAGGTCTGCGG CTAGGAGTC ジャンクション (配列番号41)	15749- 15730 7992- 7986	GAATGAGGAGGTCTGC GGCT AGGAGTC	27

10

20

30

40

50

(続き)

14 (セット1) (9191: 12909)	Fwd 9178F	GTAAGCCTCTACCTACCT CCAACCTC ジャンクション (配列番号42)	9178- 9191 12909- 12920	GTAAGCCTCTACCT ACACTCCAACCTC	26
	Rev 13122R	GCGGATGAGTAAGAAGATT CCTG (配列番号43)	13122- 13100		23
14 (セット2) (9191: 12909)	Fwd 9178F	(セット1と同じ)			
	Rev 13024R	GGAGACCTAATTGGGCTG ATTTG (配列番号44)	13024- 13012		23
14 (セット3) (9188: 12906)	Fwd	GGCCGTACGCCTAACCGC TA (配列番号45)	8944- 9011		20
	Rev	GTTGTGGGTCTCATGAGTT GGAGTGTAGG ジャンクション (配列番号46)	12934- 12913 9195- 9189	GTTGTGGGTCTCATGA GTTGGA GTGTAGG	29
14a (9188: 12906)	Fwd	CCCTGGCCGTACGCCTAA CC (配列番号47)	8989- 9009		20
	Rev	ATTTGTTGTGGGTCTCATG AGTTGGAGTGTAGG ジャンクション (配列番号48)	12938- 12913 9195- 9189	ATTTGTTGTGGGTCTC ATGAGTTGGA GTGTAGG	33

10

20

30

40

50

(続き)

16 (10367: 12829)	Fwd 10354F	CCCTAAGTCTGGCCAACAC AGCAGC ジャンクション (配列番号49)	10354- 10367 12829- 12839	CCCTAAGTCTGGCC AACACAGCAGC	25
	Rev 13028R	GGGTGGAGACCTAATTGG GCTG (配列番号50)	13028- 13007		22
122 (7973: 9023)	Fwd	CGTCTGAACCTATCCTGCCC GC (配列番号53)	7773- 7794		21
	Rev	CAATTAGGTGCATGAGTAG GTGGCCTG ジャンクション (配列番号54)	9049- 9033 7983- 7974	CAATTAGGTGCATGAG T AGGTGGCCTG	27
193 (セット1) (9086: 10313)	Fwd	AAGGCACACCTACACCCCT T (配列番号55)	8918- 8937		20
	Rev	GAGGGATGACATAACTATT AGTGGCAGG ジャンクション (配列番号56)	10334- 10312 9086- 9081	GAGGGATGACATAACT ATTAGT GGCAGG	28
193 (セット2) (9086: 10313)	Fwd	AACCAATAGCCCTGGCCGT A (配列番号57)	8981- 9000		20
	Rev	GAGGGATGACATAACTATT AGTGGCAGGTTA ジャンクション (配列番号58)	10334- 10312 9086- 9078	GAGGGATGACATAACT ATTAGT GGCAGGTTA	31

10

20

30

40

50

(続き)

586 (8431: 10841)	Fwd	CTATAGCACCCCCTCTACC CC (配列番号59)	8264- 8284		21
	Rev	GATGCTAATAATTAGGCTG TGGGTGGT ジャンクション (配列番号60)	10867- 10849 8439- 8432	GATGCTAATAATTAGG CTG TGGGTGGT	27
8590 (8984: 13833)	Fwd	TGCCCTAGCCCACTTCTTA CC (配列番号80)	8895- 8915		21
	Rev	TAGTTGAGGTCTAGGGCTG TTGGTT ジャンクション (配列番号81)	13853- 13833 8984- 8981	TAGTTGAGGTCTAGGG CTG GGTT	25
2767 (5362: 14049)	Fwd	GGGCCATTATCGAAGAATT CACAAA (配列番号82)	5260- 5284		25
	Rev	GAGGTGATGATGGAGGTG GAGTAG ジャンクション (配列番号83)	14069- 14049 5362- 5360	GAGGTGATGATGGAG GTGGAG TAG	24

10

20

30

【 0 1 4 2 】

40

50

【表 7】

表7:大規模mtDNA欠失を標的にするためのqPCR反応に使用されるランキングプライマー配列

欠失ID	方向	配列 (5' -3')	位置	長さ
1 (8469: 13447)	Fwd	ACAGTGAAATGCCCAACTA (配列番号61)	8358-8377	20
	Rev	GCTCAGGCGTTTGTGTATGA (配列番号62)	13540-13559	20
4 (7992: 15730)	Fwd	CAACGATCCCTCCCTTACCA (配列番号63)	7855-7874	20
	Rev 16053R	AGTACGGATGCTACTTGTCCA (配列番号64)	15796-15816	21
14 (9191: 12909)	Fwd	GAAGCGCCACCCTAGCAATA (配列番号65)	9050-9063	20
	Rev	GGTGAGGCTTGGATTAGCGT (配列番号66)	12950-12969	20
16 (10367: 12829)	Fwd	AATCCACCCCTTACGAGTGC (配列番号67)	10156-10175	20
	Rev	(14と同じ)		
120 (6260: 12814)	Fwd	ACAACGTTATCGTCACAGCCC (配列番号68)	6064-6084	21
	Rev	GTGAGGCTTGGATTAGCGTT (配列番号69)	12949-12968	20

10

20

30

40

50

(続き)

120a (6260: 12814)	Fwd	ACAACGTTATCGTCACAGCCCATGC (配列番号51)	6064-6088	25
	Rev	GATTGCTTGAATGGCTGCTGTGTTGGC (配列番号52)	12852-12826	27
122 (7973: 9023)	Fwd	CTGAACCTACGAGTACACCGA (配列番号70)	7900-7920	21
	Rev	GTGTGAAAACGTAGGCTTGGA (配列番号71)	9152-9172	21
193 (9086: 10313)	Fwd	TCGAAACCATCAGCCTACTCA (配列番号72)	8957-8977	21
	Rev	CCAATTCGGTTCAGTCTAATCCT (配列番号73)	10385-10407	23

10

20

【 0 1 4 3 】

結果と考察

以上に示した通り、約 268 の融合転写物を、この研究の過程においてスクリーニングし、当該研究から、本明細書においてより詳細に論じられている通り、10 の子宮内膜症マーカーをさらなる研究のために選択した。特に、本明細書に記載されているように、欠失 ID 番号 1、4、14、16、120、122、193、400、516 および 586 (すなわち、それぞれ、配列番号 13 ~ 15 および 17 ~ 23 の転写物) に関連付けられている融合転写物の、子宮内膜組織における上昇したレベルは、子宮内膜症と関連付けられているとわかった。各転写物の存在を、ジャンクションポイントを有している転写物の部分に対して少なくとも相補的なヌクレオチド配列を有している各プローブについてアッセイすることによって決定した。

30

【 0 1 4 4 】

全ての融合転写物プローブの散布図および性能を、図 2A ~ 2J および表 5 に示す。図 3 は、ミトコンドリアゲノムの全体にある融合転写物の位置、ゲノム内の遺伝子位置、およびゲノム内にある本発明の 10 の mtDNA 融合転写物 (すなわち、「プローブ」または「標的」) の位置 (各欠失の長さにもたがる線によって示されている) を示す。前述の融合転写産物に対応するプローブを、3 つの子宮内膜症陽性および 4 つの子宮内膜症陰性の子宮内膜サンプルに対して試験した (表 1 を参照)。各サンプルについて、ハウスキーピング遺伝子転写物 HK23 (Human Beta-2-microglobulin)、HK25 (Human GAPD) および HK18 (Peptidyl-prolyl isomerase B) について得られた RLU 値に対して RLU 値を標準化した。

40

【 0 1 4 5 】

本試験の結果に基づいて、融合転写物 1、4、14、16、120、122、193、400、516、および 586 (すなわち、それぞれ配列番号 13 ~ 15 および 17 ~ 23 に示される配列を有している転写物) は、特に子宮内膜組織をアッセイすることによって、子宮内膜症の検出において使用され得ると結論付けられる。特に、本研究では、子宮

50

内膜組織サンプルにおける対象転写物の上昇したレベルが、子宮内膜症と非常に相関すると分かった。対象の融合転写物の検出は、それぞれの融合転写物の少なくとも一部のヌクレオチド配列に対して少なくとも十分に相補的なヌクレオチド配列を有している、以上で同定されたプローブを用いて実現され得る。当該一部は、前記プローブが各融合転写物にハイブリダイズするように、ジャンクションポイントを含んでいる。

【0146】

これらの知見に基づいて、同定された以上の欠失1、4、14、16、120、122、193、400、516、および586（すなわち、それぞれ配列番号2～4および6～12に示されるヌクレオチド配列を有している欠失）を有している、高レベルの異常mtDNAは子宮内膜症の検出に使用され得るとも結論付けられる。このような欠失は、再環状化後に親mtDNA（すなわち、再環状化された大サブリモン）のジャンクションポイントを同定することによって同定され得る。ジャンクションポイントは、ジャンクションポイントを含んでいるmtDNAヌクレオチド配列の少なくとも一部に対して、少なくとも実質的に相補的である（プローブがそれぞれのmtDNAにハイブリダイズするように）ヌクレオチド配列を有しているプローブを用いて、同定され得る。ジャンクションポイントはまた、プライマー（プライマーのうち少なくとも1つが、ジャンクションポイントを有しているmtDNAヌクレオチド配列に対して実質的に相補的であるヌクレオチド配列を有している）を用いて同定され得る。あるいは、上記プライマーは、ジャンクションポイントに隣接するmtDNA配列に対して少なくとも実質的に相補的であるヌクレオチド配列を有している対を含み得る。

【0147】

同様に、欠失はまた、再環状化後に欠失配列（すなわち、再環状化された小サブリモン）のジャンクションポイントを同定することによって同定され得ると結論付けることができる。

【0148】

融合転写産物（すなわち、それぞれ配列番号24～26、28～34、および84に示されるアミノ酸配列を有している融合タンパク質）からの翻訳産物もまた、このような検出方法に使用可能であり得る。

【0149】

従って、本明細書に記載されている通り、子宮内膜症の検出のための方法が提供され、ここで、この方法は、前記融合転写物または異常mtDNAの同定のためのプローブおよびプライマーの使用を含んでいる。これらのプローブおよびプライマーは、ミトコンドリアの前記融合転写物およびそれらの異常な親mtDNA分子のそれぞれに対して相補的な核酸配列を有している。特に、本明細書に記載されているプローブは、再結合（または再環状化）されたmtDNAに対応する、転写されたジャンクションポイントをコードする融合転写物に対して、少なくとも実質的に相補的であるように設計される。本明細書に記載されているプライマーは、好ましくはプライマー対の1つは、本明細書に記載されている欠失の除去に続いて再環状化されている異常mtDNAのジャンクションポイントに対して相補的であるヌクレオチド配列を有しているように設計される。他のプライマー対（プライマー対の1つが、再環状化されている欠失配列のジャンクションポイントに対して少なくとも実質的に相補的である、またはプライマー対がジャンクションポイントに隣接するmtDNAヌクレオチド配列に対して少なくとも実質的に相補的である）は、設計され得ることも理解されるだろう。

【0150】

（実施例2：循環血液サンプル中のmtDNA欠失の検出）

この実施例ではミトコンドリアDNA、mtDNA、欠失を、子宮内膜症の潜在的なバイオマーカーとして詳細に調べた。研究を、主として循環血液サンプルから得たmtDNA欠失に主に集中させた。7つの欠失を詳細に調べた。以下においてにさらに論じられている、これらの欠失のうち2つ「1.2 kb欠失」および「3.7 kb欠失」は、子宮内膜症の症状を有している妊娠可能な女性から採取された低侵襲性の血液検体を用いて、

バイオマーカーとして高い診断精度を有していると判断された。1.2 kb および 3.7 kb 欠失は、以上に論じられており、1.2 kb 欠失は、欠失「193」、3.7 kb 欠失は欠失「14」または「14a」と同定されている。これらの欠失の特性は、さきに、表1にまとめられているが、改めて表8に示されている。ここでいう「3.7 kb 欠失」への言及は欠失14または欠失14aである。

【0151】

【表8】

表8:実施例2において調査されたmtDNA異常

欠失ID	配列番号	欠失名	スプライスされた遺伝子	mtDNA位置	ジャンクション部位 (SEQ ID上のスプライス位置)
14	4	FUS 9191:12909 ("3.7kb 欠失")	(ATP6) ~ (ND5)	8527-14148	8527-9191/12909-14148 (配列番号4のヌクレオチド 665-666)
14a	5	FUS 9188:12906 ("3.7kb 欠失")	(ATP6) ~ (ND5)	8527-14148	8527-9188/12906-14148 (配列番号4のヌクレオチド 662-663)
193	8	FUS 9086:10313 ("1.2kb 欠失")	(ATP6) ~ (ND3)	8527-10404	8527-9086/10313-10404 (配列番号8のヌクレオチド 560-561)

【0152】

前述のように、1.2 kb 欠失は、野生型 mtDNA ゲノム (配列番号1) に基づくヌクレオチド 9087 ~ 10312 の欠失を指す。従って、このような欠失は、塩基 0 ~ 9086 および 10313 ~ 16568 を有している大サブリモン (再環状化されているとき、ヌクレオチド 9086 と 10313 との間にジャンクションを有している) を生じる。同様に、3.7 kb 欠失は、ヌクレオチド 9189 ~ 12905 の欠失を指し、塩基 0 ~ 9188 および 12906 ~ 16568 を有している大サブリモン (再環状化されているとき、ヌクレオチド 9188 と 12906 との間にジャンクションを有している) を生じる。

【0153】

上述の通り、大サブリモンの再環状化が論じられているが、再環状化されている小サブリモンが教示されているような独自のジャンクションポイントを有しているなら、このような小サブリモンの再環状化も適切である。本研究では、1.2 kb および 3.7 kb 欠失に対応する小サブリモンが、サンプルを配列決定する過程で同定された。したがって、本実施例における知見は、本明細書に記載の欠失から生じる小サブリモンの検出まで拡張され得る。

【0154】

方法

参加者および検体採取

この研究は、オックスフォード大学ジョン・ラドクリフエ病院のオックスフォード子宮内膜症医療センターにおける EndOx 研究の一部として、前もって登録された患者から採取された、同定されていない未処理の臨床検体を利用した。簡単に言うと、骨盤痛 (症候性) または卵管結紮 (無症候性) のために、疑いのある子宮内膜症について腹腔鏡検査を受ける予定の女性から検体を採取した。試験参加者は、18歳以上の年齢 (閉経前) の女性であり、妊娠していないと確認された。すべての検体は、National Research Ethics Service から適切な倫理委員会の承認 (Oxfordshire REC A, 09/H0604/58) を受

10

20

30

40

50

けた研究プロトコルのもとに入手した。全ての臨床検体は匿名化されて、入手元の患者の身元を保護した。本試験は、日米EU医薬品規制調和国際会議「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する調和三極ガイドライン」に準拠し、適用される各国の規制およびヘルシンキ宣言に定められた倫理原則に従って、設計、実施、報告された。全ての患者は、書面によるインフォームドコンセントを参加前に示した。

【0155】

手術前に血液検体および広範な臨床的な表現型データを採取した。標準化されたWERF EPHect procedures [26, 41-44]に従って、試験サンプルを採取し、輸送し、保存した。

【0156】

患者集団 / 試験コホート

本研究で用いた臨床検体は、無症候性コントロール、外科的に確認された子宮内膜症のない症候性コントロール、または外科的に確認された子宮内膜症の症例に分類された。無症候性コントロールは、子宮内膜症の臨床的な疑いがなく、外科的に子宮内膜症のないことを確認された予定の卵管結紮術を受けた患者から採取した検体と定められた。症候性コントロールは、臨床的に子宮内膜症が疑われるが、熟練の婦人科外科医による腹腔鏡によって可視化される子宮内膜症病変を認めない、疼痛またはその他の症状（不妊症を除く）を有している患者から採取した検体と定められた。

【0157】

子宮内膜症は、子宮内膜症の改訂米国生殖医学会（rASRM）分類を用いて手術外科医がスコア化した[45]。症例は疾患サブタイプ（腹膜、卵巣、深部の子宮内膜症）およびrASRMの段階（最小、軽度、中等度、および重度の疾患を表す段階IからIV）によって分類された。

【0158】

サンプルの取り扱い、処理、およびmtDNA増幅

DNA抽出

QIAcube HT（商標）システム（Qiagen、Crawley、UK）上で自動化されているQIAamp 96 QIAcube HT（商標）抽出キット（Qiagen、Crawley、UK）を用いて、200 μLの血漿から全DNAを抽出した。抽出したDNAを200 μLのAE緩衝液に溶出した。

【0159】

mtDNA欠失のリアルタイムqPCR

増幅を、96ウェルマイクロプレート（Bio-Rad、Hemel Hempstead、UK）を用いて20 μLの反応液において実施した。各ウェルは、5 μLの標準化されていないDNA鋳型、1 × SYBR Green（登録商標）マスターミックス、および250 nMのそれぞれのプライマーを含んでいた。反応に使用したプライマーを表9に示す。

【0160】

10

20

30

40

50

【表 9】

表9:1.2kb欠失および3.7kb欠失の増幅のために使用されるプライマー配列

欠失ID	プライマー方向	長さ	配列	配列番号
193 ("1.2kb 欠失")	Fwd	20	AACCAATAGCCCTGGCCGTA	57
	Rev (ジャンクション プライマー)	31	GAGGGATGACATAACTATTAGTGGCAGGTTA	58
14a ("3.7kb 欠失")	Fwd	20	GGCCGTACGCCTAACCGCTA	45
	Rev (ジャンクション プライマー)	29	GTTGTGGGTCTCATGAGTTGGAGTGTAGG	46

10

【0161】

PCRおよびSYBR Green (登録商標) Iの蛍光を、Chromo 4 (商標) Real-time PCR Detection System (Bio-Rad、Hemel Hempstead、UK)を用いて分析した。1.2kb欠失のサイクル条件は以下の通りであった：95 で3分、続いて95 で30秒、67 で30秒、および72 で30秒の5サイクル；続く各サイクルについて、アニーリング温度を0.5 ずつ減少させた。増幅条件は、95 で30秒、65 で30秒、72 で30秒の45サイクルであった。全ての他の欠失を、95 で30秒、58~65 で30秒、および72 で30秒の45サイクルの標準的なプロトコルで増幅した。増幅後、0.5 ごとに読み取る70 ~ 90 の融解曲線分析を行った。サンプルおよびコントロールの各プレートを、3回に分けて、3通り増幅した。

20

【0162】

18S rRNAによるReal-time qPCRの標準化

標的アンプリコン量を、18S rRNAの細胞核DNA遺伝子を用いて標準化した。増幅反応を、96ウェルマイクロプレートにおける20 μL反応液として行った。各ウェルは、5 μLの非標準化DNA鋳型、1x SYBR Green (登録商標) マスターミックス、および200 nMの各プライマーを含んでいた。増幅およびSYBR Green (登録商標) Iの蛍光を、Chromo 4リアルタイムPCR検出システムを用いて分析した。増幅条件は、95 で3分間、続いて95 で30秒、64.5 で30秒、および72 で30秒の40サイクルであった。増幅後、0.5 ごとに読み取る70 ~ 90 の融解曲線分析を行った。

30

【0163】

品質管理

定量サイクル(Cq)を、CFXマネージャーソフトウェア回帰モデル (Bio-Rad、Hemel Hempstead、UK)を用いて計算した。各欠失アンプリコンのCqを他コピーの細胞核標的である18S rRNA遺伝子アンプリコンのCqに対して標準化した。全てのサンプルを別々のプレート上で3通り増幅し、3つの複製物のうちの少なくとも2つが1.5 Cqの範囲内であり、かつ融点(Tm)が、存在するときの標的増幅産物と相反しない(欠失のTm 81 ± 2、18S rRNAのTm 82 ± 2)なら、適格とみなした。

40

【0164】

鋳型なしの2つのコントロールサンプルは、DNA抽出の各バッチと一緒に処理され、欠失標的および18S rRNA遺伝子の両方の増幅について陰性と確認された。鋳型なしの2つのコントロール反応液は、各PCRプレートに対して入れられ、欠失標的および

50

18S rRNA 遺伝子の両方の増幅について陰性と確認された。rho⁰の細胞性DNA (ミトコンドリア偽遺伝子増幅を検出するため)ならびに健常な男性の頬側スワブからのDNAおよびrho⁰の親細胞株から抽出されたDNA (ミトコンドリアの欠失前)を用いて、欠失プライマーの特異性を、評価した。

【0165】

標準的なPCR反応の最初のラウンドについて、確認済の子宮内膜症を有している患者から抽出されたDNAは、この段階の間に十分なDNA量を確保するために、Repli-G (商標)ミトコンドリアDNAキット (Qiagen)を用いて全ゲノム増幅を受けた。

【0166】

Rho⁰細胞の調製物

Rho⁰細胞を、これまで記述されている通りに調製した[46]。簡潔には、ヒトのオステオカルコマ細胞株143B (ATCC CRL-8303)からの細胞をエチジウムブロミドで処理して、細胞質ミトコンドリアDNAを枯渇させた。細胞を、ピルビン酸、L-グルタミン、ウリジン (50 μg/ml) および5% FBSを有している高グルコースのDMEMにおいて、コンフルエントまで増殖させた。

【0167】

統計解析

正式な標本規模の計算を実施せず、臨床検体の使用数は試験目的を満たすのに十分であると判断された。

【0168】

qPCRのために、標的をすべての検体から3通り増幅し、平均Cq値を計算した。われわれは、標準化された欠失値 (Cq) を、18S rRNA基準アンプリコンに対する欠失アンプリコンを定量することによって決定した。受信者操作特性 (ROC) 曲線および記述統計について、Graphpad Prism (商標) 5.0 (Graphpad software Inc, La Jolla, CA, USA)を用いて統計解析を行った。SPSS v17.0 (IBM Corp, Armonk, NY, USA)を用いて、相関および有意性試験を行った。われわれは、臨床的特徴を、カテゴリーデータについてカウントおよびパーセンテージを用いて、連続変数について平均値、標準偏差 (SD) および範囲を用いて、まとめた。2群の平均を、それぞれパラメトリック分布およびノンパラメトリック分布についてスチューデントt検定およびマンホイットニーU検定を用いて比較した。2変数間の相関をピアソン相関係数 (r) で評価した。子宮内膜症の存在に関して、ROC曲線を、6.5 kb欠失を除く全てについて作成した。ROCの曲線の下にある面積 (AUC)、ならびに選択されたカットオフ (以下に記載)における感度および特異性を、95%信頼区間 (CI) で計算した。すべての試験について、p値 < 0.05を統計学的に有意とみなした。

【0169】

結果

患者集団および臨床検体

1.2 kb および 3.7 kb 欠失の評価に用いた臨床検体を提供した患者についての人口統計学的特性および臨床特性を、表10にまとめる。

【0170】

10

20

30

40

50

【表 10】

表10:人口統計的および臨床的な特徴

特徴	1. 2kb欠失コホート N (%)	3. 7kb欠失コホート N (%)
合計	171	181
患者の年齢 ¹	34.2 (6.8)	34.4 (6.9)
ホルモン療法の進行状況 ²		
はい	48 (28.1)	55 (30.4)
いいえ	116 (67.8)	119 (65.7)
未確認	7 (4.1)	7 (3.9)
月経段階 ³		
月経でない	24 (14.0)	26 (14.4)
不正月経	12 (7.0)	15 (8.3)
月経期間	31 (18.1)	31 (17.1)
卵胞期	44 (25.7)	44 (24.3)
黄体期および持続的な	60 (35.1)	65 (35.9)
コントロール	28	32
患者の年齢 ¹	36.6 (6.9)	37.2 (6.8)
症候性	18 (64.3)	19 (58.4)
無症候性	10 (35.7)	13 (40.6)
症例	143	149
患者の年齢 ¹	33.7 (6.7)	33.8 (6.8)
子宮内膜症型		
腹膜	49 (34.3)	52 (34.9)
卵巣	45 (31.5)	47 (31.5)
深部浸潤	49 (34.3)	50 (33.6)
子宮内膜症の段階		
段階I	63 (44.1)	65 (43.6)
段階II	21 (14.7)	24 (16.1)
段階III	29 (20.3)	30 (20.1)
段階IV	28 (18.6)	28 (18.8)
不明	2 (1.4)	2 (1.3)

【0171】

略語：N = 患者 / 検体の数；SD = 標準偏差。（1）平均値（標準偏差）が示されており；検体採取時の年齢が得られた患者について、平均値および標準偏差を算出した。（2）検体採取から3ヵ月以内の患者の状態。（3）検体採取時の患者の月経状態。

【0172】

1. 2 kb および 3. 7 kb の評価に用いた患者および検体の臨床的および人口統計学的な特性は、類似し、かつ 18 S rRNA および先に述べられている合格基準を満たす各欠失について対にされている qPCR の結果をとまなう、これらのサンプルのみを含んでいる結果として異なる。

【0173】

1. 2 kb 欠失コホート

171 検体を 1. 2 kb 欠失の評価に使用した。検体を提供した患者の平均（SD）年齢は 34. 2（6. 8）歳であった。平均年齢は、それぞれ 36. 6（6. 9）歳および 33. 7（6. 7）歳の平均（SD）年齢であるコントロール群および症例群で同様であり、統計学的有意差はなかった（ $p = 0. 113$ ）。評価に用いた 171 の患者検体のうち、116（67. 8%）患者は、検体採取前の3ヶ月以内にホルモン療法なし、48（28. 1%）は、検体採取前の3ヶ月以内にホルモン療法あり、7（4. 1%）ははっきりしないと届け出た。月経周期のフェーズデータを、患者の正常な周期長に関連して、採血日前の最終月経期（LMP）を用いて算出した。24（14. 0%）の患者は月経なしと届け出ており - そのうち 19 はホルモン投与中、12（7. 0%）は月経不順、31（

18.1%)は月経期(LMP初日から1~5日の間)にある、44(25.7%)は卵胞期(LMPから5~14日)にある、60(35.1%)は黄体期+拡大月経期(LMPから15日以上)にあった。

【0174】

コントロール群は、合計28検体；症候性患者(不妊症以外の子宮内膜症に一致する症状を呈し、本疾患の手術なしが確認された)から採取した18検体(64.3%)、および卵管結紮術を予定している無症候性患者から採取した10検体(35.7%)を含んでいた。試験群は、4段階(rASRM I~IV)に分類された3つの疾患サブタイプ(腹膜、卵巣、深部浸潤[DI]子宮内膜症)の患者から採取した143検体を含んでいた。49検体(34.3%)は腹膜子宮内膜症の女性から、45検体(31.5%)は卵巣子宮内膜症の女性から、49検体(34.3%)は深部子宮内膜症の女性から採取した。63検体(44.1%)は段階Iの疾患を有している患者から、21検体(14.7%)は段階II、29検体(20.3%)は段階III、28検体(18.6%)は段階IVであった。2検体(1.4%)は、不明な疾患段階であった。

10

【0175】

3.7kb欠失コホート

3.7kb欠失評価には181検体を用いた。検体を提供した患者の平均(SD)年齢は34.4(6.9)歳であった。平均年齢はコントロール群および症例群で同様であり、平均(SD)年齢はそれぞれ37.2(6.8)歳と33.8(6.8)歳であり、統計学的有意差はなかった($p=0.166$)。119(65.7%)の患者が検体採取前の3カ月以内にホルモン療法なし、55名(30.4%)が検体採取前の3カ月以内にホルモン療法あり、7名(3.9%)がはっきりしないと届け出た。26(14.4%)の患者が月経なしと届け出、15(8.3%)が月経不順、31(17.1%)が月経期(1~5日)、44(24.3%)が卵胞期(5~14日)、65(35.9%)が黄体期+延長月経期(15日以上)であった。

20

【0176】

コントロール群は、症候性患者から採取した19検体(58.4%)および無症候性患者から採取した13検体(40.6%)の計32検体を含んでいた。試験群は149の検体を含んでいた。52検体(34.9%)は腹膜子宮内膜症の女性から、47検体(31.5%)は卵巣子宮内膜症の女性から、50検体(33.6%)は深部子宮内膜症の女性から採取した。65検体(43.6%)は段階Iの疾患を有している女性からで、24(16.1%)は段階II、30(20.1%)は段階III、28(18.8%)は段階IVであった。2検体(1.3%)は不明な疾患段階であった。

30

【0177】

mtDNA欠失および予備的評価 - 標準的PCR

配列組成、相対的に多くの欠失が報告されている[47]ミトコンドリアゲノムのメジャーarc内にある隣接する反復位置の存在、および子宮内膜組織におけるこれまでの以前の観察(データは示さず)に基づく評価のために、7つの候補欠失を最初に選択した。欠失を、以下のゲノム領域:CO2からATP6(1.0kb欠失);ATP6からND3(1.2kb欠失);ATP8からND4(2.4kb欠失);ATP6からND5(3.7kb欠失);ATP8からND5(5.0kb欠失);CO1からND5(6.5kb欠失);CO2からCytB(7.7kb欠失)内で選択した。標準的(定量的)なPCRの最初のラウンドおよびゲル電気泳動後の可視化を、欠失標的のそれぞれを予め限定するために用い、候補物のそれぞれが、(i)検出可能である;(ii)信頼できる検出にとって十分なコピー数である;(iii)予想されたアンプリコンサイズを有している;(iv)特異的であり、かつ核の偽遺伝子とともに増幅しないまたは非特異的な増幅産物を生成しないか否かを決定するために、用いた。

40

【0178】

予測された7つの欠失はすべて、循環する血漿において検出可能であった。しかしながら、5.0kbおよび6.5kb欠失は、rho⁰細胞DNAを増幅し、核ミトコンド

50

リア偽遺伝子 (numts) の潜在的な共増幅を示した。さらに、6.5 kb 欠失はコピー数が不十分であり、さらなる QPCR 試験を実行可能な候補と考えられなかった。7.7 kb および 2.4 kb 欠失はコピー数が少なかったが、QPCR 法では依然として検出可能であったので、さらなる評価に供された。5.0 kb 欠失は、健常な男性の類側スラブからの DNA を増幅し、疾患特異性の潜在的欠如を示した。7.7 kb 欠失も、このサンプルからの低レベルの増幅レベルを示した。

【0179】

残りの6つの欠失を、標的が、i) 全ゲノム増幅なしに十分なコピー数にある、ii) 十分な診断精度である、iii) より高感度の QPCR を用いて rho⁺ 細胞において検出可能であるか否か、および iv) アッセイの精度が許容可能であるか否かを決定するために、QPCR を用いてさらに評価した。許容可能な精度基準は、標的欠失のそれぞれについての3回の反復のうちの最小2回の間にある 1.5 Ct の最大偏差であった。

10

【0180】

臨床検体による予備的評価

残りの6つの候補物の予備的評価として、55の臨床検体；子宮内膜症が確認された患者由来の46検体、症候性コントロール患者由来の9検体のセットを用いて欠失を評価した。最初の QPCR 試験の後、2.4 kb 欠失は、不十分なコピー数を有していると決定され、1.0 kb 欠失は、rho⁺ 細胞から抽出された DNA を増幅し (numts の共増幅を示す)、7.7 kb 欠失は、低いストリンジェンシーのアニーリング温度においてのみ増幅した (ミスプライミング事象がより起こり得ることを意味する)。これらの候補欠失は、ここで計画されているようなアッセイの要件を満たさなかったが、より良好な配列特異性およびアッセイ感度を得るためのさらなるアッセイの最適化から利益を得るバイオマーカーとして、依然として存在し得る。

20

【0181】

最初に選択された7つの欠失のうち、1.2 kb および 3.7 kb 欠失は、信頼性のある簡単な検出を容易にするのに十分なコピー数で血漿中に存在した。このアッセイは、試験された PCR 条件で特異的であり、健常 (無症候性) コントロール検体および確認済の子宮内膜症患者からの検体を正確に区別した (データを示さず)。さらに、1.2 kb および 3.7 kb 欠失はいずれも、症候性コントロールおよび子宮内膜疾患症例 (すべてのサブタイプおよび段階を合わせた) との区別においても正確であった。1.2 kb 欠失の AUC (95% CI) は 0.8116 (0.6178 ~ 1.005) であり、統計学的に有意であった (p = 0.0034)。同様に、3.7 kb 欠失についての AUC (95% CI) は 0.8478 (0.6663 ~ 1.029) であり、これも有意であった (p = 0.0011; 表 11)。

30

【0182】

40

50

【表 1 1】

表11:欠失の予備的な評価

欠失ID (欠失 サイズ)	標準のPCR+可視化					定量的リアルタイムPCR (N=55)		
	細胞質に おいて 検出可能	十分な コピー数	標的 特異性 (rho 0)	標的 特異性 (増幅 サイズ)	疾患 特異性	十分な コピー数	診断の 正確さ AUC (95% CI)	p値
1 (5.0 kb)	はい	はい	いいえ	はい	いいえ	はい	0.82 (0.64 - 1.00)	
4 (7.7 kb)	はい	低い	可能	はい	可能	はい	0.84	
14a (3.7 kb)	はい	はい	はい	はい	はい	はい	0.85 (0.6663 - 1.029)	0.0011
120 (6.5 kb)	はい	いいえ	いいえ	いいえ	N/A	N/A		
122 (1.0 kb)	はい	はい	はい	はい	はい	はい	0.83 (0.64-1.01)	
193 (1.2 kb)	はい	はい	はい	はい	はい	はい	0.81 (0.6178 - 1.005)	0.0034
586 (2.4 kb)	はい	低い	はい	可能	はい	いいえ	0.82 (0.66-0.97)	

10

20

【 0 1 8 3】

略語：AUC = 曲線の下にある面積；CI = 信頼区間；N = 評価セットの検体数；PCR = ポリメラーゼ連鎖反応。

【 0 1 8 4】

1.2 kb および 3.7 kb 欠失の診断精度

臨床的に実施可能な、子宮内膜症のバイオマーカーとして1.2 kb および3.7 kb 欠失をさらに十分に評価するために、症候性コントロールおよび組み合わせた子宮内膜症の全タイプの間、子宮内膜症の3サブタイプおよび子宮内膜症の4段階の間を区別するこれらの欠失の能力を、より大規模な臨床検体集団を用いて決定した(表10)。1.2 kb 欠失の171検体および3.7 kb 欠失の181検体について、有効な対の結果(標的および18S遺伝子増幅の両方)が得られた。これらの分析は、臨床的に該当する患者集団(すなわち、疾患状態の外科的な確認を転帰として伴う子宮内膜症の症状を示している女性)をより正確に反映するために、症候性コントロールおよび確認済の疾患検体のみを用いて実施された。重要なことに、1.2 kb 欠失および3.7 kb 欠失は、それぞれ $p = 0.462$ および $p = 0.878$ において、症候性および無症候性コントロール検体の間にある差を検出しなかった。

30

40

【 0 1 8 5】

症候性コントロール 対 全疾患

55の臨床検体を用いた予備解析と同様に、1.2 kb 欠失および3.7 kb 欠失はいずれも、症候性コントロール検体および子宮内膜疾患検体(腹膜、卵巣、および深部の子宮内膜症検体を合わせた)を正確に区別した。1.2 kb 欠失のAUC(95% CI)は

50

0.7879 (0.6791 ~ 0.8967) であり、統計学的に有意であった ($p < 0.0001$)。3.7 kb 欠失の AUC (95% CI) は 0.807 (0.7063 ~ 0.9077) であり、これも有意であった ($p < 0.0001$; 図 4 A および 4 B)。受信者操作 (ROC) 曲線の座標を調べ、かつ閾値、すなわちカットオフを、感度を最適化するために選択した。1.2 kb 欠失を用いた症候性コントロールおよび子宮内膜症の全てのサブタイプ/段階の区別に -4.43 の閾値を適用すると、それぞれ 81.8% および 72.2% の感度および特異性の値を生じる。10.51 の閾値では、3.7 kb 欠失に対する感度は 85.1%、特異性は 57.9% であった (表 12)。

【0186】

【表 12】

表12:1.2kb欠失および3.7kb欠失の能力

	1.2kb欠失		3.7kb欠失	
	感度 (%)	特異性 (%)	感度 (%)	特異性 (%)
全疾患	81.8	72.2	85.0	57.9
腹膜	91.8	72.2	88.5	73.7
卵巣	75.6	72.2	80.9	68.4
深部浸潤	78.6	66.7	80.0	52.6
段階I/II	82.1	72.2	87.6	63.2
段階III/IV	80.7	72.2	84.5	52.6

【0187】

1.2 kb 欠失および 3.7 kb 欠失を組み合わせると、すべての症候性コントロール群およびすべての子宮内膜症との間で診断精度が向上し (AUC 0.827 (0.722 - 0.931)、症候性コントロール群および段階 I / I I の疾患の間で AUC 0.882 (0.784 - 0.980) であった (データ示さず))。

【0188】

サブタイプによる疾患 - 1.2 kb 欠失

子宮内膜症に対する任意の診断補助の重要な特徴は、すべての疾患サブタイプを正確に検出できることである。われわれは、症候性コントロール検体および腹膜、卵巣、および深部の子宮内膜症が確認された患者から採取した検体を区別する 1.2 kb 欠失の能力を評価した。各疾患サブタイプについての 1.2 kb 欠失の分布を図 5 A に示す。Ct 値の平均値 (SD) は、症候性コントロールでは -4.312 (2.075)、腹膜疾患では -7.187 (2.581)、卵巣疾患では -6.291 (2.344)、深部子宮内膜症では -6.193 (2.143) であった。標準化された 1.2 kb 欠失の量の、症候性コントロールの間にある差は、腹膜 ($p < 0.0001$)、卵巣 ($p = 0.003$)、および深部子宮内膜症 ($p = 0.0012$) について統計学的に有意であった。

【0189】

1.2 kb 欠失の診断精度を図に示す (AUC (95% CI) 値は、腹膜子宮内膜症の検出について 0.8549 (0.7425 ~ 0.9672)、 $p < 0.0001$ 、卵巣子宮内膜症の検出について 0.7457 (0.6118 ~ 0.8796)、 $p = 0.0025$ 、深部子宮内膜症について 0.7596 (0.6292 ~ 0.8901)、 $p = 0.0012$ である)。まとめると、これらのデータは 1.2 kb 欠失により、症候性コントロールから採取した検体と、腹膜、卵巣および深部子宮内膜症患者とを正確に区別することができたことを示している。1.2 kb 欠失を用いた症候性コントロールと腹膜子宮内膜症 tp の区別に -4.430 の閾値を適用すると、感度および特異性の値はそれぞれ 81.8% および 72.2% となる。-4.675 の閾値において、症候性コントロールと卵巣子宮内膜症との区別における 1.2 kb 欠失の感度および特異性は、それぞれ 75.6% および 72.2% である。-4.350 の閾値では、症候性コントロールと深部子宮内膜症との区別における 1.2 kb 欠失の感度および特異性がそれぞれ 78.6% および 6

10

20

30

40

50

6.7%である(表12)。

【0190】

サブタイプによる疾患 - 3.7 kb 欠失

各疾患サブタイプについての3.7 kb 欠失の分布を図6Aに示す。平均(SD) Ct値は、症候性コントロールについて11.12(2.239)、腹膜子宮内膜症について7.569(1.843)、卵巣子宮内膜症について8.549(2.089)、深部子宮内膜症について8.617(2.125)であった。症候性コントロール間にあるアンプリコン量の差は、腹膜子宮内膜症($p < 0.0001$)、卵巣子宮内膜症($p < 0.0001$)、深部子宮内膜症($p = 0.0072$)について統計的に有意であった。3つの疾患サブタイプそれぞれを検出する3.7 kb 欠失の診断精度を図6B~6Dに示す(AUC(95%CI)値は、腹膜子宮内膜症の検出について0.8978(0.8131~0.9824)、 $p < 0.0001$ 、卵巣子宮内膜症の検出について0.8158(0.7003~0.9313)、 $p < 0.0001$ 、深部子宮内膜症検出について0.7110(0.5746~0.8475)、 $p = 0.0071$ である。まとめると、これらのデータは、3.7 kb 欠失により、症候性コントロール、ならびに腹膜、卵巣および深部子宮内膜症の女性から採取された検体の間を、正確に区別することができたことを示している。3.7 kb 欠失を用いた症候性コントロールおよび腹膜子宮内膜症の区別のために閾値8.805を適用すると、感度および特異性の値はそれぞれ88.5%および73.7%となる。閾値8.910では、症候性コントロールと卵巣子宮内膜症との区別における3.7 kb 欠失の感度および特異性がそれぞれ80.9%および68.4%である。閾値11.01では、症候性コントロールと深部子宮内膜症との区別における3.7 kb 欠失の感度および特異性がそれぞれ80.0%および52.6%である(表12)。

【0191】

段階による疾患 - 1.2 kb 欠失

子宮内膜症に対するバイオマーカーのもうひとつの重要な特徴は、疾患の低い段階および高い段階の両方を検出できることである。次に、1.2 kb 欠失が、症候性コントロール検体と、確認済の、疾患の低い(I/II)または高い(III/IV)段階の検体とを区別する能力を評価した。段階I/IIおよび段階III/IVの疾患についての1.2 kb 欠失の分布を図7Aに示す。平均(SD) Ct値は、症候性コントロールでは-4.312(2.075)、段階I/IIでは-6.692(2.505)、段階III/IVでは-6.348(2.25)であった。症候性コントロール間の差は、段階I/II($p < 0.0001$)および段階III/IV($p = 0.001$)の疾患群について統計学的に有意であった。段階I/IIおよびIII/IVの差は統計学的に有意ではなかった($p = 0.406$)。

【0192】

1.2 kb 欠失の診断精度を図7A~7Cに示す(AUC(95%CI)値は、段階I/IIの検出について0.7989(0.6868~0.9111)、 $p < 0.0001$ 、段階III/IVの検出について0.7661(0.6398~0.8924)、 $p = 0.0007$ であった。このように、1.2 kb 欠失は、症候性コントロールと疾患のすべての段階とを正確に区別することができた。-4.430の閾値では、症候性コントロールと段階I/IIの子宮内膜症との区別における1.2 kb 欠失の感度および特異性がそれぞれ82.1%および72.2%である。-4.490の閾値では、症候性コントロールとIII/IV期子宮内膜症との区別における1.2 kb 欠失の感度および特異性がそれぞれ80.7%および72.2%である(表12)。

【0193】

段階による疾患 - 3.7 kb 欠失

段階I/IIおよびIII/IVの疾患についての3.7 kb 欠失の分布を図8Aに示す。平均(SD) Ct値は、症候性コントロールでは11.12(2.239)、段階I/IIでは8.243(2.156)、段階III/IVでは8.112(2.14)であった。症候性コントロール間の差は、段階I/II($p < 0.0001$)および段階

10

20

30

40

50

III / IV ($p = 0.0008$) の疾患群について統計学的に有意であった。3.7 kb 欠失の診断精度を図 8 B ~ 8 C に示す (AUC (95% CI) 値は、段階 I / II の検出について 0.8383 (0.7412 - 0.9353)、 $p < 0.0001$ 、段階 III / IV の検出について 0.7591 (0.6354 - 0.8837)、 $p = 0.0007$ であった。段階 I / II および III / IV の差は 3.7 kb 欠失について統計学的に有意であった ($p = 0.016$)。これらのデータは、3.7 kb 欠失が症候性コントロールと疾患の全段階とを正確に区別することができたことを示している。閾値 10.17 では、症候性コントロールと I / II 期子宮内膜症との区別における 3.7 kb 欠失の感度および特異性がそれぞれ 87.6% および 63.2% である。閾値 11.00 では、症候性コントロールと III / IV 期子宮内膜症との区別における 3.7 kb 欠失の感度および特異性がそれぞれ 84.5% および 52.6% である。

10

【 0 1 9 4 】

患者の年齢、検体の年齢、ホルモン療法および月経期との相関 - 1.2 kb 欠失

理想的なバイオマーカー試験は、検体採取の間における患者および検体の年齢、ホルモン療法による処置、ならびに月経期のタイミングと無関係に正確な結果を示すだろう。疾患検出に対するこれらのパラメーターの影響を表 13 にまとめる。

【 0 1 9 5 】

【 表 1 3 】

表13: 患者および検体の年齢、ホルモン療法、ならびに月経周期の影響

20

要素	ピアソン相関 (r)		p値		T検定 ⁽¹⁾ またはANOVA ⁽²⁾ p値	
	1.2 kb	3.7 kb	1.2 kb	3.7 kb	1.2 kb	3.7 kb
患者の年齢	0.030	0.1034	0.698	0.166	-	
検体の年齢	0.072	0.0628	0.353	0.4009	-	
ホルモンの進行状態 ⁽¹⁾	-		-		0.120	0.195
月経周期 ⁽²⁾	-		-		0.228	0.036

【 0 1 9 6 】

(1) T - t e s t を、子宮内膜症の検出に対するホルモン状態の影響を調べるために用いた。

30

【 0 1 9 7 】

(2) A N O V A を、子宮内膜症の検出に対する月経周期の影響を調べるために用いた。

【 0 1 9 8 】

1.2 kb 欠失について、疾患の検出および患者の年齢に相関はないと決定した；相関係数 (r) は $r = 0.030$ ($p = 0.698$) であった。また、疾患検出と、採取年ごとの検体年齢との相関は認められなかった ($r = 0.072$ 、 $p = 0.353$)。ホルモン状態 (検体採取前の 3 カ月以内に、ホルモン療法を受けているまたはホルモン療法を受けていない患者) で層別化すると、疾患検出における差は統計的に有意ではなかった ($p = 0.120$)。患者を月経期 (月経なし、月経不順、月経、卵胞期、黄体期 + 拡大月経) で層別化すると、1.2 kb 欠失による疾患検出に統計的有意差はなかった ($p = 0.228$)。

40

【 0 1 9 9 】

同様に、3.7 kb 欠失に基づく疾患検出は、患者の年齢 ($r = 0.1034$; $p = 0.166$) もしくは検体の年齢 ($r = 0.0628$; $p = 0.4009$) と有意に相関しなかった、またはホルモン療法によって有意に影響されなかった ($p = 0.195$)。3.7 kb 欠失による子宮内膜症の検出は、月経期と有意に相関し ($p = 0.036$)、期間にない患者と卵胞期にある患者との間の検出の差 ($p = 0.026$) に、1.72 の差をともなっははっきりと表れた。まとめると、これらのデータは、1.2 kb の精度およ

50

び臨床的に関連するこれらの変数によって有意に影響されないこと、ならびにび3.7 kb欠失の精度が、月経のフェーズによってわずかに影響されることを示している。

【0200】

考察

子宮内膜症は、生殖年齢の女性に非常に多くみられる疾患であり、大きな経済的負担と関連し、罹患した女性の生活の質の大幅な低下をもたらす。この臨床的問題に対する主要な供与因子の1つは、早期発見および介入を容易にするための診断ツールの欠如である。現在の診断上の最も基準になっている検査は、腹腔鏡による徹底した視診、理想的に続く疑わしい病変を組織学的に確認することである[5, 15]。利用可能な客観的データは、ごくわずかであるため、この方法の診断的価値はほとんど不明である。腹腔鏡検査の使用は、潜在的に不正確であり、組織学的確認の精度と組み合わせられてさえ、報告によれば60%から85%の範囲である[48 - 51]と一部には考えられている。標準的な診断方法は、疾患自体が非定型的に現れる症例、または経験の浅い外科医によって容易には視覚化されずに見落とされる疾患の初期段階において、さらに複雑になり得る。さらに、医学的介入が、外科処置の回避または遅延のための試みにおいて開始され得る場合、正確なバイオマーカー検査に基づく子宮内膜症の推定診断により、この治療を支持する必要な証拠が得られるだろう。したがって、特に疾患の経過の早期に、より定常的な結果を提供することができるように、現在の基準を改善することが明らかに必要である。

10

【0201】

今回の研究では、子宮内膜症の潜在的バイオマーカーとして2つの新規なmtDNA欠失を同定し、評価した。1.2 kbおよび3.7 kb欠失を標的とするアッセイは、健全な診断検査にとっての基準を満たし、低侵襲性の検体を利用し、かつ(臨床用途に首尾よく移されるなら)現在の診断実務に伴う診断までの時間の遅延を短縮し、外科処置前に医学的介入の機会を与えるのに潜在的に役立ち得る。診断閾値を設定した後において(上述の通り)、1.2 kb欠失アッセイの感度は81.8%であり、特異性は72.2%であった。3.7 kb欠失アッセイの診断能は、感度および特異性がそれぞれ85.1%および57.9%であり、ほぼ同じであった。従って、これらの欠失のいずれかに基づく診断アッセイは、現在の標準的な医療を補完し得る。特に重要なことは、後期段階の疾患は超音波を用いた現在の診療においてより容易に検出されるので、初期段階の疾患に対するこれらの欠失の診断精度である。一次診療施設では、陽性の検査結果は、経口避妊薬などの子宮内膜症に対する一次治療の開始を支持するか、または専門医への紹介のきっかけとなり得る。月経困難症を呈する女性のうち、推定で10%が、大部分が子宮内膜症に起因する続発性月経困難症を有している[52]。この集団において、1.2 kbおよび3.7 kb欠失は、97%の陰性予測率(NPV)をもって、子宮内膜症を極めて有効に排除する。二次診療施設では、陽性の検査結果は、ゴナドトロピン放出ホルモン拮抗薬などの二次薬による治療を開始するか、腹腔鏡下手術を進めるかを決定する指針になり得る。重要なことに、前者の施設では誤った偽陽性の結果に関わるリスクはあまり重要ではないため、検査の感度を最大化するために診断的カットオフ値を選択することができるが、後者の施設では特異性を最大化し、これらの介入に関わるリスクに対する、疾患のない女性のばくろを最小化するための異なる診断的カットオフ値が有益であり得る。

20

30

40

【0202】

診断精度に加えて、これら2つのバイオマーカーの、子宮内膜症を検出する能力は、患者の年齢、検体の年齢、またはホルモン状態と相関せず、3.7 kb欠失のみが、検体採取時の患者の月経周期のフェーズとわずかな相関を示した。この月経フェーズとの相関がより大規模な患者コホートにおいて存在するかどうか、または本研究で使用した検体数の人為的な結果であるかどうかを確認するためには、さらなる研究が必要である。われわれは、1.2 kbおよび3.7 kb欠失の両方が疾患の全てのサブタイプおよび段階を正確に検出することを実証した。外科処置、および組織学的な確認のためにあり得る切除の間における可視化を含んでいる現在の診断標準と対照的に、mtDNA欠失に基づくアッセイは血液検体のみを必要とし、外科的介入の前にまたは外科的介入に代えて、客観的な結

50

果をもたらす得る。したがって、臨床用途に首尾よく移されるなら、m t D N Aに基づくアッセイは、診断の遅延を縮小し [1 6]、疾患の経過において、これまで可能であったよりも早期に、処置可能な結果をもたらす得る。

【 0 2 0 3 】

実際の観点から、血液ベースのバイオマーカーアッセイの利用は、現在の標準的な医療を有効に改善するいくつかの利点を有している。検体は、静脈穿刺を介した採取のために容易かつ安価であり、採取と関連して併発する疾患状態になる見込みが低い。血液検体は、外来医のオフィスまたはクリニックで容易に採取でき、外科処置専用の空間および器材を要しない。m t D N Aの高いコピー数の結果として、標準的なD N A抽出方法が、濃縮手法なしに使用され、十分なD N Aが標準的な血液検体から回収されるので、試験の低い失敗率が見込まれる。前記アッセイは、臨床研究室において広く使用されている、費用効率のよいP C Rに基づく手法を使用し、アッセイは定量的であり、結果が容易に解釈される(すなわち、試験結果は、陽性または陰性の結果のいずれかに対応する、明確な診断カットオフを上回るまたは下回るのいずれかである)。最後に、月経フェーズとの相関がないこと、または最小であることは、サンプル採取の要件が単純化されることを保証し、静脈穿刺を予定するときに月経の時期を考慮しなくてよい。

10

【 0 2 0 4 】

上首尾な疾患管理における重要な要素は、疾患疫学を理解することである。他の婦人科疾患と重っている相対的に複雑な診断方法および症状のために、子宮内膜症の疫学は、十分に特徴づけられておらず、患者集団および地理的位置によって異なる [1、2、4、6]。本明細書に記載されているような分子アッセイの出現により、さらなるデータがより容易に入手可能になり、子宮内膜症の疫学に対する私の理解における、いくつかのギャップを埋めるのに役立ち得る。重要なことに、本研究では、広く利用可能な標準化されている方法を、検体採取および処理のために利用した。これにより、異なる研究および患者集団の全体にわたる検査結果をより直接的に比較することができるようになる [4 1 - 4 4、5 3]。

20

【 0 2 0 5 】

重要なことに、m t D N A欠失の位置は、子宮内膜症の病態生理学的な過程の解明を補助し得る。1 . 2 k b欠失および3 . 7 k b欠失とともに、呼吸鎖の複合体IおよびV (A T P合成酵素) およびいくつかのt R N Aをコードする遺伝子の全部または一部に影響する。これらの欠失は、ミトコンドリアの異常なA T Pシンターゼおよび複合体Iタンパク質をおそらく生じさせるが、m t D N Aのヘテロプラズミックな性質は、集団内での、ある程度の機能的補償をおそらく可能にしている。興味深いことに、本研究で試験した7つのうち最良の2つの候補は、ミトコンドリアゲノムにおいて互いに重複する領域内にある欠失である。1 . 2 k b欠失領域 (A T P 6 ~ N D 3) が、より大きな3 . 7 k b欠失 (A T P 6 ~ N D 5) 内に存在することを考えると、おそらく2つの欠失の診断精度が類似していることは驚くにあたらない。

30

【 0 2 0 6 】

ここに示されている基準に基づいて、1 . 2 k bおよび3 . 7 k bのm t D N A欠失は子宮内膜症と関連している ; しかし、このミトコンドリアゲノム領域が子宮内膜症の発症においてどのような機能的役割を果たしているかを理解するためには、さらなる試験が必要である。

40

【 0 2 0 7 】

この研究の制限としては、ホルモンおよび月経状態を届け出た患者の利用 (研究にとっての特定のデータ測定を採用するより正確さに劣り得る) が挙げられる。このデータは奨励されるが、より大きな独立したデータセットにおける複製および検証を必要とする。この研究は現在進行中である。

【 0 2 0 8 】

まとめ

以下は、以上に述べられている研究の概要である :

50

・子宮内膜症は、世界中の女性の10%までがかかる重大な健康上の負荷である。現在、診断は、外科的な可視化、続く組織学的確認に基づく。

【0209】

・診断は、他の婦人科疾患と重なる様々な臨床像および症状のため、しばしば複雑になる。その結果として、確定診断は、10年まで遅延させられ、高い死亡率および低い生活の質を罹患者にもたらす。

【0210】

・このように、疾患の経過において早期に処置可能な結果を出し得る、信頼性のある迅速な診断補助に対する明確な必要がある。

【0211】

・骨盤痛（症候性）または卵管結紮（無症候性）のために腹腔鏡検査を受ける予定の女性から試験検体を採取した。試験参加者は、18歳以上の（閉経前）女性であり、妊娠していないことが確認された。

【0212】

・7つの候補mtDNA欠失を同定し、評価して、各々が血漿中で検出可能であるかどうか、信頼できる検出のために十分なコピー数を有しているかどうか、予測されたアンプリコンサイズを有しているかどうか、特異的であるかどうか、細胞核の偽遺伝子を同時に増幅しなかったかどうか、または非特異的な増幅産物を生成しなかったかどうかを決定した。

【0213】

・6つの候補欠失を、それぞれが健全な診断アッセイの基準を満たしているかどうかを決定するためにQPCRおよび臨床検体によってさらに評価し、かつ子宮内膜症検体と対照検体との区別における正確さを評価した。有望なバイオマーカー候補として2つの欠失（1.2 kbおよび3.7 kb欠失）を選択した。

【0214】

・1.2 kbおよび3.7 kb欠失は全てのサブタイプおよび段階を含む子宮内膜症を正確に検出し、検出は患者または検体の年齢またはホルモン療法と関連しなかった。3.7 kb欠失は、2つのフェーズに限定して月経フェーズと有意に関連した。

【0215】

・ここに記述した1.2 kbおよび3.7 kb欠失を含んでいるミトコンドリアゲノムに由来するバイオマーカーは、臨床用途に対して有効に移され得る子宮内膜症の診断マーカーの探求において、ほぼ未踏査の有望な、目的を達する手段を提供する。

【0216】

・低侵襲性の検体に基づいて、これらのマーカーに基づくアッセイは、診断の遅延を短縮すること、および処置可能、客観的かつ迅速な検査結果を与えることにより、子宮内膜症に対する診断上の展望に前向きに影響し得る。

【0217】

結論

ミトコンドリアゲノムから得られたバイオマーカー、特にここに述べた1.2 kbおよび3.7 kb欠失は、臨床用途に対して有効に移され得る子宮内膜症の診断マーカーの探求において、ほぼ未踏査の有望な、目的を達する手段を提供する。低侵襲性の検体に基づいて、これらのマーカーに基づくアッセイは、患者由来の血液サンプル中の子宮内膜症を正確に診断すると認められ得る。このように、この記述は、子宮内膜症を診断するための迅速、正確かつ有効な手段を提供し、それにより、診断を得、かつ必要な処置プロトコルを管理することにおける遅延を短縮する。この記述は、mtDNA欠失（大きいサブリモンまたは小さいサブリモンのいずれかを含む）およびそれから生じる任意の融合転写物の1つ以上に対して対象診断が行われることを可能にする。同じ結論は、融合転写産物から生じる任意の翻訳産物にまで拡張され得る。

【0218】

（実施例3：子宮内膜症検出のための8.7 kb mtDNA欠失の同定）

10

20

30

40

50

本試験では、Fidelis Research (Sofia, Bulgaria) から入手した1組の10症例および10コントロールにおいて、次世代配列決定 (NGS) および独自のデータマイニングソフトウェアの組み合わせを用いて、8.7 kb 欠失 (欠失ID番号2767) を同定した。この同定のために使用された方法は、実施例4においてより詳細に記載される。われわれは、子宮内膜症の組織病変におけるこのバイオマーカーを、qPCRおよびNGSの両方を用いて直接に検出した。配列組成、相対的により多くの欠失が報告されている [47] ミトコンドリアゲノムの主要アーク内のフランキングリピート位置の存在、および子宮内膜組織における観察結果に基づいて、評価のために8.7 kb 欠失を選択した。この研究からのデータを、表14および図9~11に示す。

【0219】

10

【表14】

表14:8.7kb mtDNA欠失の同定

	子宮内膜症 陽性	症候性のコントロール	正常/健常なコントロール
評価数	14	10	12
最小	3.18	4.985	6.55
25%パーセンタイル値	3.678	6.04	7.753
中央値	5.158	7.028	8.82
75%パーセンタイル値	6.808	8.156	10.63
最大	7.86	10.44	11.78
範囲	4.68	5.455	5.23
平均	5.431	7.216	9.052
Std. 偏差	1.648	1.526	1.686
平均のStd. 誤差	0.4406	0.4824	0.4868
平均の下位95%CI	4.479	6.125	7.98
平均の上位95%CI	6.383	8.307	10.12
合計	76.04	72.16	108.6

20

30

【0220】

8.7 kb 欠失は、NADHデヒドロゲナーゼサブユニット2~5の間にある遺伝子のすべてまたは一部を除去する。標準的な(定量的な)PCRの最初のラウンドおよびゲル電気泳動後の可視化を、欠失標的のそれぞれを予め限定するために用い、候補物のそれぞれが、(i) 検出可能である；(ii) 信頼できる検出にとって十分なコピー数である；(iii) 予想されたアンプリコンサイズを有している；(iv) 特異的であり、かつ核の偽遺伝子とともに増幅しないまたは非特異的な増幅産物を生成しないか否かを決定するために、用いた。

40

【0221】

循環血漿において欠失を首尾よく検出し、かつqPCRによる更なる評価を行って、より高感度なqPCRを用いて、標的がrho 0細胞において検出可能であるかを決定した。われわれはまた、アッセイが十分な診断精度および許容可能な精度(3つの複製物のうち少なくとも2つの間にある1.5 Ctの最大偏差と定められる)を有しているかどうかを評価した。

【0222】

この欠失のさらなる研究は、実施例4に記載される。

【0223】

(実施例4：症候性の女性の血漿において子宮内膜症を検出するための8.7 kbのm

50

t DNA 欠失)

この実施例では 8.7 kb の mt DNA 欠失 (FUS 5362 : 14049) を、子宮内膜症を診断するための潜在的なバイオマーカーとして調べた (i) 診断精度の初期評価、続く ii) 女性由来の血漿におけるバイオマーカーの頻度を：子宮内膜症コントロールおよび症候性コントロール、ならびに子宮内膜がん、卵巣がん、および乳がんと比較することによる疾患特異性の評価を含む)。

【0224】

方法

診断精度 - 参加者およびサンプル採取

本研究は、骨盤痛に起因して子宮内膜症を疑われているために腹腔鏡検査を受けることを予定されている、18歳以上(閉経前)の、妊娠していない女性(症候性コントロールおよび子宮内膜症例)または卵管結紮術(無症候性コントロール)から、前もって採取された残りの血漿検体を用いた症例対照研究であった。本試験は、英国オックスフォード大学のジョン・ラドクリフ病院、オックスフォード子宮内膜症医療センターでの End Ox 試験の一部として実施された。

10

【0225】

サンプルおよびデータの採取、匿名化および処理は、以前に報告された通りであった [26, 41~44, 57]。試験の実施、関係当局の承認 (Oxfordshire REC A, 09/H0604/58) および同意手続きも以前に報告された通りであった [26, 41-44; 57]。

20

【0226】

診断精度 - 参加者集団 / コホート

採取されたサンプルは、コントロールサンプルまたは症例サンプルのいずれかに分類された。コントロール群は、a) 子宮内膜症の臨床的な疑いなしに予定されていた卵管結紮術を受け、かつ子宮内膜症でないことを外科的に確認済の参加者から採取された検体である無症候性コントロール群、b) 子宮内膜症の臨床的な疑いをともなった疼痛またはその他の症状(不妊症を除く)のある、経験豊富な婦人科外科医によって腹腔鏡による視認される子宮内膜症病変のない参加者から採取された症候性コントロール群とした。

【0227】

症例群は腹腔鏡検査中に子宮内膜症の存在が診断され、改訂米国生殖医学会 (rASRM) の段階 (I : 最小 ; II : 軽度 ; III : 中等度 ; IV : 重度) を用いて執刀する外科医によって分類された検体から構成されていた [45]。検体も、疾患サブタイプ：：腹膜、卵巣、深部浸潤性 (DI) の子宮内膜症によって分類した。

30

【0228】

疾患特異性 - 参加者およびサンプル採取

診断精度評価に基づく子宮内膜症例およびコントロールを疾患特異性の評価に利用し、OBIO (米国 El Segundo) およびオンタリオ腫瘍バンク (カナダ、トロント) から得た、残りの血漿サンプルと比較した。

【0229】

サンプルの取り扱い、処理、および mt DNA 増幅

採血および処理

全血を、10 ml の K2EDTA Vacutainers (登録商標) (BD Medical p/n BD366643) に採取し、採取の1時間以内に 2500 x g、10 分間、4 で遠心分離した。血漿層を除去し、分取し、DNA 抽出まで -80 で保存した。

40

【0230】

DNA 抽出

総デオキシリボ核酸 (DNA) を、QIACube (商標) HT システム (Qiagen, Crawley, UK) によって自動化されている、QIAamp (商標) 96 QIACube (商標) HT 抽出キット (Qiagen, Crawley, UK) を用いて

50

血漿 (2 0 0 μ L) から抽出し、抽出された DNA を、緩衝液 A E (2 0 0 μ L) によって溶出させた。

【 0 2 3 1 】

m t DNA 欠失の q P C R および 1 8 s r R N A を用いた q P C R の標準化

両方のリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (q P C R) 手順のために、われわれは、9 6 ウェルマイクロプレート (B i o - R a d 、 H e m e l H e m p s t e a d 、 U K) (非標準化 DNA 鋳型 (5 μ L) 、 S Y B R (登録商標) G r e e n マスターミックス、ならびに 8 . 7 k b 欠失および 1 8 S リボソームリボ核酸 (r R N A) にとっての 2 5 0 n M の各プライマーを各ウェルに含む) を用いて、2 0 μ L の反応液における増幅を行った。使用したプライマーを表 1 5 に示す。

10

【 0 2 3 2 】

【表 1 5 】

表15:8.7kb欠失の増幅のために使用されるプライマー配列

欠失ID	プライマー方向	長さ	配列	配列番号
2767 ("8.7kb 欠失")	Fwd	25	GGGCCATTATCGAAGAATTCACAAA	82
	Rev (ジャンクション プライマー)	24	GAGGTGATGATGGAGGTGGAGTAG	83

20

【 0 2 3 3 】

S Y B R G r e e n I の蛍光による定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q P C R) のために、C F X 9 6 タッチリアルタイム P C R 検出システム (B i o - R a d 、 H e m e l H e m p s t e a d 、 U K) を使用した。

【 0 2 3 4 】

8 . 7 k b 欠失および 1 8 S r R N A のサイクル条件は、9 5 で 3 0 秒、6 6 で 3 0 秒、および 7 2 で 3 0 秒の 4 5 サイクルであった。増幅後に、われわれは、0 . 5 ごとに読み取る 7 0 から 9 0 の融解曲線分析を行った。サンプルおよびコントロールの各プレートを、3 回に分けて、3 通り増幅した。

30

【 0 2 3 5 】

品質管理

品質管理は、以前に記載されたように行った [5 6] 。要約すると、定量サイクル (C q) を計算し、欠失アンプリコンの C q を、多コピーの細胞核標的である 1 8 s r R N A 遺伝子アンプリコンの C q に対して標準化した。われわれは、別々のプレート上で全てのサンプルを 3 通り増幅した。鋳型なしの 2 つのコントロールサンプルは、DNA 抽出の各バッチと一緒に処理され、欠失標的および 1 8 S r R N A 遺伝子の両方の増幅について陰性として確認された。

【 0 2 3 6 】

R h o 0 細胞調製物

R h o 0 細胞を、以前に記載されたように調製した [4 6 ; C r e e d 2 0 1 9] 。要約すると、ヒト骨肉腫細胞株 1 4 3 B (A T C C C R L 8 3 0 3) 由来の細胞をエチジウムブロミドで処理して、細胞質 m t DNA を枯渇させた。細胞を、ピルビン酸、L グルタミン、ウリジン (5 0 μ g / m L) および 5 % ウシ胎仔血清を含む高グルコースダルベッコ改変イーグル培地においてコンフルエントに増殖させた。

40

【 0 2 3 7 】

統計解析

正式な標本規模の計算を実施せず、臨床検体の使用数は試験目的を満たすのに十分であると判断された。q P C R のために、標的をすべての検体から 3 通り増幅させ、平均 C q

50

値を計算した。われわれは、標準化された欠失値 (Cq) を、18S rRNA 基準アンプリコンに対する欠失アンプリコンを定量することによって決定した。ROC、記述統計、相関および有意性試験について、Graphpad Prism (商標) 5.0 (Graphpad Software Inc、La Jolla、CA、USA) を用いて統計解析を行った。われわれは、カテゴリーデータについてカウントおよびパーセンテージを用いて臨床的特徴を要約し、連続変数については平均、標準偏差 (SD)、範囲を要約した。われわれは、臨床的特徴を、カテゴリーデータについてカウントおよびパーセンテージを用いて、連続変数について平均値、標準偏差 (SD) および範囲を用いて、まとめた。2群の平均を、それぞれパラメトリック分布およびノンパラメトリック分布についてスチューデント t 検定およびマンホイットニー U 検定を用いて比較した。2変数間の相関を、Spearman 相関 (r) または Mann-Whitney の U 検定または Kruskal-Wallis 検定で評価した。子宮内膜症の存在に関して、ROC 曲線を、6.5 kb 欠失を除く全てについて作成した。ROC の曲線の下にある面積 (AUC)、ならびに選択されたカットオフにおける感度および特異性を、95% 信頼区間 (CI) で計算した。すべての試験について、p 値 < 0.05 を統計学的に有意とみなした。

10

【0238】

結果

試験集団および臨床検体

検体を提供した参加者についての人口統計学的特性および臨床的特性を表 16 にまとめる。

20

【0239】

30

40

50

【表 16】

表16: 調査集団の人口統計的および臨床的な特徴

特徴	合計のN(%)	コントロールのN(%)	症例のN(%)
N	182	32	150
患者の年齢 ¹	34.4 (±6.9)	37.16 (±6.901)	33.78 (±6.820)
ホルモン療法の進行状況 ²			
はい	55 (30.2)	11 (34.5)	44 (29.3)
いいえ	120 (65.9)	19 (59.4)	101 (67.3)
未確認	7 (3.8)	2 (6.3)	5 (3.3)
原型の段階 ³			
月経でない	27 (14.8)	8 (25.0)	19 (12.7)
不正月経	15 (8.2)	2 (6.3)	13 (8.7)
月経期間	30 (16.5)	6 (18.8)	24 (16.0)
卵胞期	46 (25.3)	3 (9.4)	43 (28.7)
黄体期および持続的な	64 (35.2)	13 (40.6)	51 (34.0)
非子宮内膜症/子宮内膜症の型			
症候性	18 (9.9)	18 (56.3)	NA
非症候性	14 (7.7)	14 (43.8)	NA
腹膜	52 (28.6)	NA	52 (34.7)
卵巣	48 (26.4)	NA	48 (32.0)
深部浸潤	50 (27.5)	NA	50 (33.3)
子宮内膜症の段階			
段階I/II	NA	NA	91 (60.7)
段階III/IV	NA	NA	58 (38.7)
不明	NA	NA	1 (0.7)

【0240】

略語：N = 参加者 / 検体の数；SD = 標準偏差。（1）平均値（SD）が示されており；平均値およびSDは、検体採取時に年齢を提示した参加者について算出された。（2）検体採取後の3ヵ月以内の参加者の状態。（3）検体採取時の参加者の月経状態。

【0241】

全体として、コントロール群および症例群の平均（SD）年齢は、統計学的に有意に異なった：37.2（6.9）歳および33.8（6.8）歳、 $p = 0.0124$ 。参加者の大部分（121；66.5%）は、検体採取前の3ヵ月以内にホルモン療法を受けていなかった。月経でないと届け出た参加者のほとんどは、ホルモンを服用していた（20 / 26；76.9%）。

【0242】

採取した182検体のうち、32検体はコントロール群由来であり、症候性参加者からは18検体（9.49%）、無症候性参加者からは14検体（7.7%）であった。残りの150検体は、症例群由来であり、52の参加者（28.6%）が腹膜子宮内膜症であり、48の参加者（26.4%）が卵巣子宮内膜症、50の参加者（27.5%）がD I

子宮内膜症であり、かつ91(60.7%)がrASRMの段階I/II疾患、58(31.9%)が段階III/IVの疾患と分類された。182検体のうち178検体(97.8%)が、有効なアッセイ結果(2つの腹膜子宮内膜症サンプルおよび1つの卵巣子宮内膜症サンプル)を示し、1つの症候性コントロールサンプルは、範囲外の18S rRNA Cqのため、統計解析に関して無効であった。

【0243】

8.7kbmtDNA欠失の予備的評価 - 標準PCR

実施例3で上述したように、われわれは以前に、次世代配列決定(NGS)および独自のデータマイニングソフトウェアとの組み合わせを用いて、10症例および10コントロールのセットにおいて、8.7kb欠失を同定した。上述したように、循環血漿において欠失を首尾よく検出し、より高感度なqPCRを用いて、標的がrho細胞中で検出可能かどうかを決定するためにqPCRによるさらなる評価を行った。

10

【0244】

8.7kb欠失の診断精度

循環血漿および子宮内膜症病変における8.7kb欠失を上首尾に検出したので、8.7kb欠失が、症候性コントロール 対 すべての子宮内膜症の間; 3つのサブタイプ間; および改訂米国生殖医学会(r-ASRM)分類段階の間を、より大きな集団の臨床検体からの血漿において、区別可能かどうかを検討した。われわれは、臨床的に重要な患者集団(すなわち子宮内膜症の症状を呈するすべて)をより正確に反映するために、症候性コントロールおよび確認済の疾患のある参加者からの検体を主に用いた分析を、実施した。また、無症候性コントロール検体における欠失の頻度を測定したが、症候性対照検体と無症候性コントロール検体との間で8.7kb欠失に差は検出されなかった(p=0.681)。

20

【0245】

症候性コントロール 対 全疾患の比較

8.7kbアッセイを用いて、症候性コントロールおよび全ての子宮内膜症検体を良好に区別することができた。0.8007(0.7035~0.8979)のAUC(95%CI)は統計学的に有意であった(p<0.0001)。われわれはROC座標を調べ、感度を最適化するための閾値(6.650の閾値は症候性コントロールと子宮内膜症のすべてのサブタイプ/段階とを区別し、許容可能な感度および特異性値を示した(表17))を選択した。

30

【0246】

【表17】

表17: 65%特異性、カット76.65における8.7kb欠失の能力

	AUC [95% CI]	感度 (%) [95% CI]
全疾患	0.8007 [0.7035-0.8979]	80.95 [73.85-86.48]
腹膜	0.8882 [0.8043-0.9722]	94.00 [83.78-98.36]
卵巣	0.7766 [0.6572-0.8960]	76.60 [62.78-86.40]
深部浸潤	0.7359 [0.6057-0.8661]	72.00 [58.33-82.53]
段階I/II	0.8361 [0.7426-0.9295]	86.52 [77.00-92.12]
段階III/IV	0.7465 [0.6232-0.8697]	72.41 [59.80-82.25]

40

【0247】

サブタイプごとの疾患の検出

子宮内膜症の全ての疾患サブタイプを正確に検出できることが重要である。われわれの研究では、8.7kb欠失アッセイは、症候性コントロールからの検体と、腹膜子宮内膜症、卵巣子宮内膜症、DI子宮内膜症の患者からの検体とを区別した(図13A~13D)。平均(SD) Ct値は、無症候性コントロールについて6.724(1.192)

50

、症候性コントロールについて6.908(1.26)、腹膜疾患について4.086(2.134)、卵巣疾患について5.283(1.801)、D I子宮内膜症について5.617(1.767)であった。さらに、症候性コントロール間の標準化された8.7kb欠失の量の差は、腹膜子宮内膜症(p<0.0001)、卵巣子宮内膜症(p=0.0002)、およびD I子宮内膜症(p=0.0023)について統計学的に有意であった。

【0248】

8.7kb欠失アッセイの診断精度も、各サブタイプについて評価した(図13A~13D)。われわれは、症候性コントロールおよび疾患サブタイプから検体を正確に区別した:AUC(95%CI)は腹膜疾患の検出について0.8882(0.8043~0.9722;p<0.0001)、卵巣について0.7766(0.6572~0.8960;p=0.0008)、D I子宮内膜症について0.7359(0.6057~0.8661;p=0.0039)であった。さらに、6.65の閾値は、症候性コントロール対腹膜子宮内膜症、卵巣疾患およびD I疾患を区別するための、許容可能な感度および特異性の値を示した(表17)。

10

【0249】

r-ASRMの段階ごとの疾患の検出

子宮内膜症例を、2つの段階の群:r-ASRMの段階I/IIと段階III/IVに分類し、低い段階および高い段階の疾患の両方が、8.7kb欠失を用いて正確に同定されるかを検討した。8.7kb欠失アッセイは、症候性コントロールからの検体と、低い段階(段階I/II)および高い段階(段階III/IV)の患者からの検体とを区別し(図14A~14C)、平均(SD) Ct値は、症候性コントロールについて6.908(1.26)、低い段階の疾患について4.614(2.063)、高い段階の疾患について5.565(1.794)であった。

20

【0250】

受信者操作曲線によって評価された診断精度は、段階III/IV:AUC0.7465(0.6232~0.8697;p=0.0021)と比べて、段階I/II:AUC0.8361(0.7426~0.9295;p<0.0001)に対して最も高かった。6.65の閾値では、全ての段階についての感度および特異性は許容可能であった(表17)。

30

【0251】

患者の年齢、検体の年齢、ホルモン療法および月経期との相関

理想的なアッセイでは、診断精度は、患者および検体の年齢、ホルモン療法、ならびに月経期などの因子によって影響されないだろう。われわれは、Ct値と患者年齢(p=0.749)との間にも、Ct値と採取年齢による検体年齢(p=0.222)の間にも相関を認めなかった(表3)。同様に、ホルモン状態(p=0.838)または月経期(p=0.233)によって参加者を層別化したときに、Ct値における統計的な有意差は、見られなかった(表18)。

【0252】

【表18】

40

表18:患者および検体の年齢、ホルモン進行状態、ならびに月経周期

要素	スピアマン相関(r)	p値	クラスカル-ワル検定またはマンホイットニ-U検定p値
患者の年齢	0.016	0.749	-
検体の年齢	0.092	0.222	-
ホルモン進行状態	-	-	0.838
月経周期	-	-	0.233

50

【 0 2 5 3 】

Mann - Whitney U - Testを用いて、子宮内膜症の検出に対するホルモン状態の影響を判定した。Kruskal Wallisを用いて、子宮内膜症の検出に対する月経周期の影響を調べた。

【 0 2 5 4 】

子宮内膜症に対する 8 . 7 k b 欠失の疾患特異性の評価

他の女性疾患が 8 . 7 k b 欠失の高いレベルを示すか否かをさらに評価するために、子宮内膜がん (n = 1 2)、卵巣がん (n = 7 2)、乳がん (n = 5 1) であると後に診断された女性からの血漿サンプルを入手し、3つの子宮内膜症サブタイプ (腹膜、卵巣、深部浸潤性子宮内膜症) の血漿サンプルおよび症候性コントロール (図 1 4 A ~ 1 4 C) に対するマーカー頻度と比較した。有意に低い 8 . 7 k b 欠失が、3つすべてのがんにおいて検出され (p < 0 . 0 0 0 1)、子宮内膜症と比べて、子宮内膜症がんでは 6 4 倍未満の検出、卵巣がんでは 1 6 倍未満の検出、乳がんでは 8 倍未満の検出と測定された。この評価に基づく結果を表 1 9 に示す。

10

【 0 2 5 5 】

【 表 1 9 】

表19:子宮内膜症に対する8.7kb欠失の疾患特異性

	子宮内膜がん	卵巣がん	乳がん	症候性コントロール	腹膜	卵巣	死亡
N	12	72	51	17	53	48	50
平均	12.71	8.921	8.218	6.908	4.265	5.304	5.617
Std. 偏差	2.515	4.239	3.953	1.26	2.202	1.788	1.767
平均の Std. 誤差	0.7261	0.4996	0.5536	0.3056	0.3024	0.258	0.2499

20

【 0 2 5 6 】

表 1 9 に基づくデータを図 1 5 に示す。図 1 5 は、子宮内膜がん、卵巣がん、乳がん、症候性コントロール、ならびに腹膜、卵巣または深部浸潤性子宮内膜症の参加者からの検体についての標準化された 8 . 7 k b 欠失分布を示す。

30

【 0 2 5 7 】

考察

本研究では、子宮内膜症を検出するための見込みのあるアッセイとして、血漿サンプル中の 8 . 7 k b 欠失バイオマーカーレベルを測定することの有用性を実証した。われわれのアッセイは、子宮内膜症の腹膜サブタイプおよび低い段階 (いずれも一次診療施設において高頻度に出くわす) に見られる最良の実績をともなって、診断的な試験にとっての健全な基準を満たし、血液からの低侵襲性検体を利用し、かつ疾患のすべてのサブタイプおよび段階を正確に検出した。臨床用途に移されると、このアッセイは、診断までの時間を短縮し、外科処置の前における医学的な介入を可能にし得る。検体は、静脈穿刺を介した採取のために容易かつ安価であり、採取と関連して併発する疾患状態になる見込みが低い。

40

【 0 2 5 8 】

特に低い段階および腹膜の疾患に対する良好な診断精度によれば、8 . 7 k b 欠失アッセイは、卵巣および深部浸潤性子宮内膜症と異なって画像診断法では信頼性よく検出され得ない、特に低い段階および腹膜の疾患において、現在の標準的な医療を補強し得る。8 . 7 k b 欠失アッセイの相対的な単純さは、一次および二次診療施設のいずれにおける用途にとって実行可能であり得ることを意味する。血液サンプルは、外科処置専用の空間または器具を必要とせずに、初期医療においておく普通に採取されている。高いコピー数の m t D N A は、標準的な D N A 抽出方法が濃縮手法なしで使用され得ることを意味する。さらに、標準的な血液検体から回収される十分な D N A 量は、試験に関する高い失敗率を

50

まず示さない。リアルタイムPCRに基づく技術は、容易に解釈され定量的な結果をもたらす臨床検査室において使用されており、容易に解釈される定量的な結果を生じる。

【0259】

われわれの研究では、われわれは、欠失と、患者の年齢、検体の年齢、ホルモン状態または月経周期のフェーズとの間に相関がないことを示した。月経段階と相関しないことは、サンプル採取を予定するときに月経フェーズを考慮するなしに、サンプルを採取する要件を単純にする。

【0260】

他の婦人科疾患と重なる症状と合わさっている現在の複雑な診断プロセスは、子宮内膜症の疫学が十分に特徴づけられていないことを意味しており、これは、あらゆる病態の上首尾な管理における重要な要素である [1 , 2 , 4 , 6]。分子アッセイおよび新規バイオマーカーの出現は、子宮内膜症の疫学の理解を深めることを助ける、より容易に利用可能な、さらなるデータを提供するだろう。重要なことに、我々の研究は、検体を採取し、処理する、広く利用可能な標準化された方法を用いており、試験および患者集団にまたがる、検査結果のより直接的な比較を可能にする [41 - 44、53]。

10

【0261】

結論

ミトコンドリアに由来する8.7kb欠失バイオマーカーを用いた、上述のアッセイは、一次および二次診療施設のいずれでも使用され得る、子宮内膜症を診断するための、血液サンプルに基づく低侵襲性の方法である。このアッセイによって提供される相対的的単純な患者に優しいアプローチは、診断までの時間を短縮し、それによって本明細書に記載されている衰弱状態の管理を改良し、それによって患者の生活の質を向上させる。

20

【0262】

(実施例5：子宮内膜症検出のための4.8kb mtDNA欠失の同定)

以上に説明されている研究と同様の研究を、4.8kbのmtDNA欠失(欠失ID 8590)の頻度と子宮内膜症との相関を同定するために実施した。この分析のために実施例4の方法に従った。この研究に使用したプライマーを表20に示す。

【0263】

【表20】

表20:4.8kb欠失の増幅のために使用されるプライマー配列

30

欠失ID	プライマー方向	長さ	配列	配列番号
8590 ("4.8kb 欠失")	Fwd	21	TGCCCTAGCCCACTTCTTACC	80
	Rev (ジャンクション プライマー)	25	TAGTTGAGGTCTAGGGCTGTTGGTT	81

【0264】

子宮内膜症の検出における4.8kb欠失の有用性を示すデータを表21に提供し、図12~14に示す。

40

【0265】

【表 2 1】

表21:4. 8kb mtDNA欠失の同定

	Endo陽性	症候性コントロール	正常な健常なコントロール
評価数	14	10	12
最小	1.005	2.93	4.575
25%パーセンタイル値	1.67	4.771	5.85
中央値	3.033	5.945	6.89
75%パーセンタイル値	5.489	6.7	8.224
最大	9.47	11.74	8.93
範囲	8.465	8.81	4.355
平均	3.833	6.161	6.899
Std. 偏差	2.537	2.547	1.436
平均のStd. 誤差	0.6781	0.8053	0.4147
平均の下位95%CI	2.368	4.339	5.986
平均の上位95%CI	5.298	7.982	7.811
合計	53.67	61.61	82.79

10

20

【 0 2 6 6 】

以上の説明は特定の特定の実施形態に対する言及を含んでいるが、当該実施形態の種々の変更は当業者にとってあきらかであろう。本明細書に与えられているあらゆる実施例は、例示の目的のためにだけに含まれており、限定していると決して意図されていない。本明細書に与えられているあらゆる図面は、説明の種々の態様を図示することのみを目的にしており、限定するまたは大きさを表すと決して意図されていない。本明細書に添付されている特許請求の範囲は、以上に説明に述べられている好ましい実施形態によって限定されるべきではなく、全体として本明細書と一致する最も広い解釈を与えられるべきである。本明細書に挙げられている全文献の開示事項は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【 0 2 6 7 】

〔参考文献〕

[1] Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 24(2), 235-258 (1997).

[2] Kjerulff KH, Erickson BA, Langenberg PW. Chronic gynecological conditions reported by US women: findings from the National Health Interview Survey, 1984 to 1992. *Am J Public Health.* 86(2), 195-199 (1996).

[3] Houston DE, Noller KL, Melton LJ, Selwyn BJ, Hardy RJ. Incidence of pelvic endometriosis in Rochester, Minnesota, 1970-1979. *Am. J. Epidemiol.* 125(6), 959-969 (1987).

40

[4] Wheeler JM. Epidemiology of endometriosis-associated infertility. *J Reprod Med.* 34(1), 41-46 (1989).

[5] Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet.* 364(9447), 1789-1799 (2004).

[6] Vessey MP, Villard-Mackintosh L, Painter R. Epidemiology of endometriosis in women attending family planning clinics. *BMJ.* 306(6871), 182-184 (1993).

[7] Zondervan KT, Becker CM, Koga K, Missmer SA, Taylor RN, Vigano P. Endometriosis. *Nature Reviews Disease Primers.* 4(1), 9 (2018).

50

[8] Barlow DH, Kennedy S. Endometriosis: new genetic approaches and therapy. *Annu. Rev. Med.* 56, 345-356 (2005).

[9] Giudice LC. Clinical practice. Endometriosis. *N. Engl. J. Med.* 362(25), 2389-2398 (2010).

[10] Fassbender A, Vodolazkaia A, Saunders P, et al. Biomarkers of endometriosis. *Fertil. Steril.* 99(4), 1135-1145 (2013).

* * 子宮内膜症のバイオマーカーにおける最近の研究に関するレビュー

[11] SK, Kantawala KP, Menias CO. Beyond the boundaries-endometriosis: typical and atypical locations. *Curr Probl Diagn Radiol.* 40(6), 219-232 (2011).

[12] Berkley KJ, Rapkin AJ, Papka RE. The pains of endometriosis. *Science.* 308(5728), 1587-1589 (2005). 10

[13] Nnoaham KE, Hummelshoj L, Webster P, et al. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertil. Steril.* 96(2), 366-373.e8 (2011).

[14] Simoens S, Dunselman G, Dirksen C, et al. The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. *Hum. Reprod.* 27(5), 1292-1299 (2012).

[15] Dunselman G a. J, Vermeulen N, Becker C, et al. ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Hum. Reprod.* 29(3), 400-412 (2014).

[16] Hadfield R, Mardon H, Barlow D, Kennedy S. Delay in the diagnosis of endometriosis: a survey of women from the USA and the UK. *Hum. Reprod.* 11(4), 878-880 (1996). 20

[17] Ahn SH, Singh V, Tayade C. Biomarkers in endometriosis: challenges and opportunities. *Fertil. Steril.* 107(3), 523-532 (2017).

* * 子宮内膜症のバイオマーカーにおける最近の研究に関するレビュー

[18] Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat. Biotechnol.* 24(8), 971-983 (2006).

[19] Hu C, van der Heijden R, Wang M, van der Greef J, Hankemeier T, Xu G. Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877(26), 2836-2846 (2009). 30

[20] Liotta LA, Petricoin EF. Serum peptidome for cancer detection: spinning biologic trash into diagnostic gold. *J. Clin. Invest.* 116(1), 26-30 (2006).

[21] Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet.* 359(9306), 572-577 (2002).

[22] Petricoin EF, Belluco C, Araujo RP, Liotta LA. The blood peptidome: a higher dimension of information content for cancer biomarker discovery. *Nat. Rev. Cancer.* 6(12), 961-967 (2006).

[23] Zhang Z, Bast RC, Yu Y, et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 64(16), 5882-5890 (2004). 40

[24] Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell Proteomics.* 1(11), 845-867 (2002).

[25] May KE, Conduit-Hulbert SA, Villar J, Kirtley S, Kennedy SH, Becker CM. Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review. *Hum. Reprod. Update.* 16(6), 651-674 (2010).

[26] Rahmioglu N, Fassbender A, Vitonis AF, et al. Harmonization of Clinical and Laboratory Data to Improve Biomarker Discovery in Endometriosis: WERF EPHeCt. In: *Biomarkers for Endometriosis.* Springer, Cham, 199-226. 50

* * 子宮内膜症研究における標準化された方法の要約

[2 7] Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat. Rev. Genet.* 6(5), 389-402 (2005).

[2 8] Polyak K, Li Y, Zhu H, et al. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat. Genet.* 20(3), 291-293 (1998).

[2 9] Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, et al. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(3), 719-724 (2005).

[3 0] Creed J, Klotz L, Harbottle A, et al. A single mitochondrial DNA deletion accurately detects significant prostate cancer in men in the PSA “grey zone.” *World J Urol.* 36(3), 341-348 (2018). 10

[3 1] Parrella P, Xiao Y, Fliss M, et al. Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates. *Cancer Res.* 61(20), 7623-7626 (2001).

[3 2] Liang BC. Evidence for association of mitochondrial DNA sequence amplification and nuclear localization in human low-grade gliomas. *Mutat. Res.* 354(1), 27-33 (1996).

[3 3] Guo X-G, Guo Q-N. Mutations in the mitochondrial DNA D-Loop region occur frequently in human osteosarcoma. *Cancer Lett.* 239(1), 151-155 (2006). 20

[3 4] Alonso A, Martin P, Albarran C, et al. Detection of somatic mutations in the mitochondrial DNA control region of colorectal and gastric tumors by heteroduplex and single-strand conformation analysis. *Electrophoresis.* 18(5), 682-685 (1997).

[3 5] Liu VW, Shi HH, Cheung AN, et al. High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. *Cancer Res.* 61(16), 5998-6001 (2001).

[3 6] Dai JG, Xiao YB, Min JX, Zhang GQ, Yao K, Zhou RJ. Mitochondrial DNA 4977 BP deletion mutations in lung carcinoma. *Indian J Cancer.* 43(1), 20-25 (2006). 30

[3 7] Liu VWS, Yang HJ, Wang Y, et al. High frequency of mitochondrial genome instability in human endometrial carcinomas. *Br. J. Cancer.* 89(4), 697-701 (2003).

[3 8] Wang Y, Xue WC, Liu VWS, Ngan HYS. Detection of mosaic pattern of mitochondrial DNA alterations in different populations of cells from the same endometrial tumor. *Mitochondrion.* 7(1-2), 171-175 (2007).

[3 9] Semczuk A, Lorenc A, Putowski L, et al. Clinicoprostnical features of endometrial cancer patients with somatic mtDNA mutations. *Oncol. Rep.* 16(5), 1041-1045 (2006).

[4 0] Pejovic T, Ladner D, Intengan M, et al. Somatic D-loop mitochondrial DNA mutations are frequent in uterine serous carcinoma. *Eur. J. Cancer.* 40(16), 2519-2524 (2004). 40

[4 1] Rahmioglu N, Fassbender A, Vitonis AF, et al. World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonization Project: III. Fluid biospecimen collection, processing, and storage in endometriosis research. *Fertil. Steril.* 102(5), 1233-1243 (2014).

* 子宮内膜症研究のための調和のとれた方法

[4 2] Fassbender A, Rahmioglu N, Vitonis AF, et al. World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonisation Project: IV. Tissue collection, processing, and storage in endometriosis resea 50

rch. Fertil. Steril. 102(5), 1244-1253 (2014).

* 子宮内膜症研究のための調和のとれた方法

[4 3] Becker CM, Laufer MR, Stratton P, et al. World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonisation Project: I. Surgical phenotype data collection in endometriosis research. Fertil. Steril. 102(5), 1213-1222 (2014).

* 子宮内膜症研究のための調和のとれた方法

[4 4] Vitonis AF, Vincent K, Rahmioglu N, et al. World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonization Project: II. Clinical and covariate phenotype data collection in endometriosis research. Fertil. Steril. 102(5), 1223-1232 (2014). 10

* 子宮内膜症研究のための調和のとれた方法

[4 5] American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. Fertility and Sterility. 67(5), 817-821.

[4 6] King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. Science. 246(4929), 500-503 (1989).

[4 7] Brandon MC, Lott MT, Nguyen KC, et al. MITOMAP: a human mitochondrial genome database--2004 update. Nucleic Acids Res. 33(Database issue), D611-613 (2005). 20

[4 8] Stratton P, Winkel C, Premkumar A, et al. Diagnostic accuracy of laparoscopy, magnetic resonance imaging, and histopathologic examination for the detection of endometriosis. Fertil. Steril. 79(5), 1078-1085 (2003).

[4 9] Mettler L, Schollmeyer T, Lehmann-Willenbrock E, et al. Accuracy of laparoscopic diagnosis of endometriosis. JSLS. 7(1), 15-18 (2003).

* 子宮内膜症診断のための現在のゴールドスタンダードの評価

[5 0] Falcone T, Mascha E. The elusive diagnostic test for endometriosis. Fertil. Steril. 80(4), 886-888 (2003).

[5 1] Wykes CB, Clark TJ, Khan KS. Accuracy of laparoscopy in the diagnosis of endometriosis: a systematic quantitative review. BJOG. 111(11), 1204-1212 (2004). 30

[5 2] Harel Z. Dysmenorrhea in adolescents and young adults: etiology and management. J Pediatr Adolesc Gynecol. 19(6), 363-371 (2006).

[5 3] Casper RF. Introduction: new tools for enhancing collaborative endometriosis research. Fertil. Steril. 102(5), 1211-1212 (2014).

[5 4] Salahi, E., et al.; Mitochondrial DNA 4977-bp deletion in endometriosis. Genes & Genomics, 35(5), 563-567 (2013).

[5 5] Taylor HS. Diagnosing endometriosis: Is laparoscopy the gold standard? Supplement to OBG Management. S1-S2 (2019). 40

[5 6] Ballard K, Lowton K, Wright J. What's the delay? A qualitative study of women's experiences of reaching a diagnosis of endometriosis. Fertil. Steril. 86(5), 1296-301 (2006).

[5 7] Creed J, Maggrah A, Reguly B, Harbottle A. Mitochondrial DNA deletions accurately detect endometriosis in symptomatic females of child-bearing age. Biomark. Med. 13(4), 291-306 (2019).

[5 8] The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Endometriosis and infertility. Fertil. Steril. 81, 1441-1446 (2004).

[5 9] Nicholls, T.J., et al., Linear mtDNA fragments and unusual mtDNA re-arrangements associated with pathological deficiency of MGME1 exonuclease. 50

Hum Mol Genet., 23(23):6147-62 (2014).

[6 0] Zhang C. et al., Multiple mitochondrial DNA deletions in an elderly human individual. FEBS, 297, 1, 2, 34-38 (1992).

[6 1] Wei, Y.H., Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events. Mutat. Res., 275(3-6), 145-55 (1992).

[6 2] Tanaka, M. et al., Direct sequencing of deleted mitochondrial DNA in myopathic patients. Biochem Biophys Res Commun., 164(1):156-63, (1989).

[6 3] Kapsa, R. et al., A novel mtDNA deletion in an infant with Pearson syndrome. J Inherit Metab Dis., 17(5):521-6, (1974).

[6 4] Hseih, R.H., et al., Multiple rearrangements of mitochondrial DNA in unfertilized human oocytes. Fertil Steril., 77(5):1012-7, (2002).

[6 5] Hjelm, B.E. et al., http://mitobreak.portugene.com/cgi-bin/Mitobreak_individual_page.cgi?Name=5371:14058&Breaktype=Del&Species=Homsap&Published=Pub

【図面の簡単な説明】

【 0 2 6 8 】

【図 1】ミトコンドリアのコード遺伝子を示す図である。

【図 2 A】子宮内膜組織における融合転写物の検出を示す。

【図 2 B】子宮内膜組織における融合転写物の検出を示す。

【図 2 C】子宮内膜組織における融合転写物の検出を示す。

【図 2 D】子宮内膜組織における融合転写物の検出を示す。

【図 2 E】子宮内膜組織における融合転写物の検出を示す。

【図 2 F】子宮内膜組織における融合転写物の検出を示す。

【図 2 G】子宮内膜組織における融合転写物の検出を示す。

【図 2 H】子宮内膜組織における融合転写物の検出を示す。

【図 2 I】子宮内膜組織における融合転写物の検出を示す。

【図 2 J】子宮内膜組織における融合転写物の検出を示す。

【図 3】mtDNAの融合転写物マップを示す。

【図 4 A】実施例 2 の 1 . 2 k b および 3 . 7 k b 欠失の診断精度を示す。

【図 4 B】実施例 2 の 1 . 2 k b および 3 . 7 k b 欠失の診断精度を示す。

【図 5 A】症候性コントロールサンプルと異なる子宮内膜疾患サブタイプのサンプルとの間を区別することにおける、実施例 2 の 1 . 2 k b 欠失の診断精度を示す。

【図 5 B】症候性コントロールサンプルと異なる子宮内膜疾患サブタイプのサンプルとの間を区別することにおける、実施例 2 の 1 . 2 k b 欠失の診断精度を示す。

【図 5 C】症候性コントロールサンプルと異なる子宮内膜疾患サブタイプのサンプルとの間を区別することにおける、実施例 2 の 1 . 2 k b 欠失の診断精度を示す。

【図 5 D】症候性コントロールサンプルと異なる子宮内膜疾患サブタイプのサンプルとの間を区別することにおける、実施例 2 の 1 . 2 k b 欠失の診断精度を示す。

【図 6 A】症候性コントロールサンプルと子宮内膜疾患サブタイプのサンプルとを区別することにおける、実施例 2 の 3 . 7 k b 欠失の診断精度を示す。

【図 6 B】症候性コントロールサンプルと子宮内膜疾患サブタイプのサンプルとを区別することにおける、実施例 2 の 3 . 7 k b 欠失の診断精度を示す。

【図 6 C】症候性コントロールサンプルと子宮内膜疾患サブタイプのサンプルとを区別することにおける、実施例 2 の 3 . 7 k b 欠失の診断精度を示す。

【図 6 D】症候性コントロールサンプルと子宮内膜疾患サブタイプのサンプルとを区別することにおける、実施例 2 の 3 . 7 k b 欠失の診断精度を示す。

【図 7 A】症候性コントロールサンプルと既知の疾患段階を有している患者由来のサンプルとを区別することにおける実施例 2 の 1 . 2 k b 欠失の診断精度を示す。

【図 7 B】症候性コントロールサンプルと既知の疾患段階を有している患者由来のサンプルとを区別することにおける実施例 2 の 1 . 2 k b 欠失の診断精度を示す。

10

20

30

40

50

【図 7 C】症候性コントロールサンプルと既知の疾患段階を有している患者由来のサンプルとを区別することにおける実施例 2 の 1 . 2 k b 欠失の診断精度を示す。

【図 8 A】症候性コントロールサンプルと既知の疾患段階を有している患者由来のサンプルとの区別における実施例 2 の 3 . 7 k b 欠失の診断精度を示す。

【図 8 B】症候性コントロールサンプルと既知の疾患段階を有している患者由来のサンプルとの区別における実施例 2 の 3 . 7 k b 欠失の診断精度を示す。

【図 8 C】症候性コントロールサンプルと既知の疾患段階を有している患者由来のサンプルとの区別における実施例 2 の 3 . 7 k b 欠失の診断精度を示す。

【図 9】子宮内膜症陽性のサンプル、症候性コントロールサンプルおよび正常な健康コントロールサンプルの間にある、8 . 7 k b 欠失スコアの差異を示す散布図である。

10

【図 1 0】子宮内膜症陽性サンプル、症候性コントロールサンプルおよび正常な健康コントロールサンプル間にある、8 . 7 k b 欠失スコアの差異を示す箱髷図である。

【図 1 1】子宮内膜症陽性の患者 対 健康 / 正常なコントロールを比較する 8 . 7 k b 欠失の R O C 曲線を示す。

【図 1 2】8 . 7 k b 欠失 - 症候性 対 すべての子宮内膜疾患 - の診断精度を示す。

【図 1 3 A】サブタイプによる 8 . 7 k b 欠失 - コントロール 対 疾患 - の診断精度を示す。

【図 1 3 B】診断精度を示すために算出された、R O C 曲線の下にある面積を示す。

【図 1 3 C】診断精度を示すために算出された、R O C 曲線の下にある面積を示す。

【図 1 3 D】診断精度を示すために算出された、R O C 曲線の下にある面積を示す。

20

【図 1 4 A】8 . 7 k b 欠失 - コントロール 対 段階による疾患 - の診断精度を示す。

【図 1 4 B】8 . 7 k b 欠失 - コントロール 対 段階による疾患 - の診断精度を示す。

【図 1 4 C】8 . 7 k b 欠失 - コントロール 対 段階による疾患 - の診断精度を示す。

【図 1 5】子宮内膜症に対する 8 . 7 k b 欠失の疾患特異性を示す。

【図 1 6】子宮内膜症陽性サンプル、症候性コントロールサンプルおよび正常な健康コントロールサンプルの間にある 4 . 8 k b 欠失のスコアの差異を示す散布図である。

【図 1 7】子宮内膜症陽性サンプル、症候性コントロールサンプルおよび正常な健康コントロールサンプルの間にある 4 . 8 k b 欠失スコアの差異を示す箱髷図である。

【図 1 8】子宮内膜症陽性患者および症候性コントロールからのデータを比較する、4 . 8 k b 欠失の R O C を示す。

30

【図 1 9】子宮内膜症陽性患者 対 健康 / 正常コントロールからのデータを比較する 4 . 8 k b 欠失の R O C を示す。

【図 2 0】本明細書に係る欠失の発生を示す。

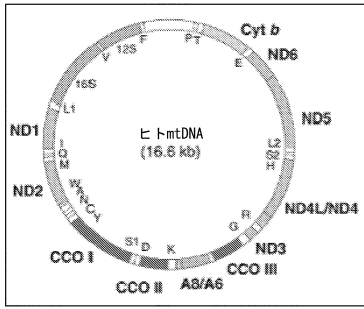
40

50

【 図面 】

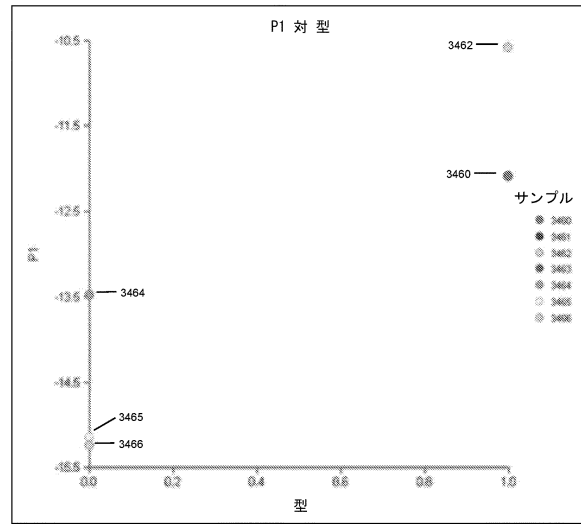
【 図 1 】

図 1



【 図 2 A 】

図 2A



10

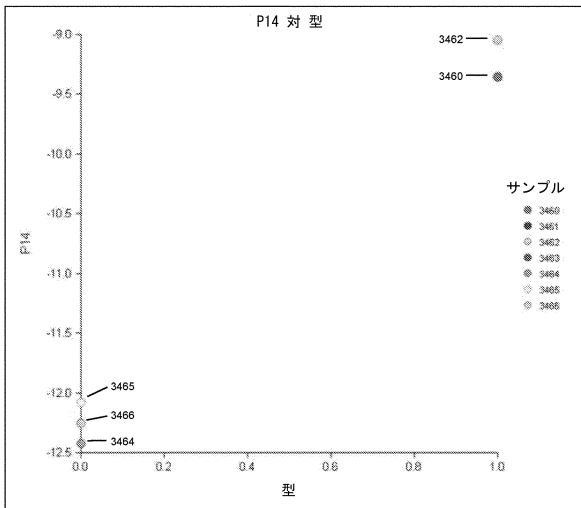
【 図 2 B 】

図 2B



【 図 2 C 】

図 2C



20

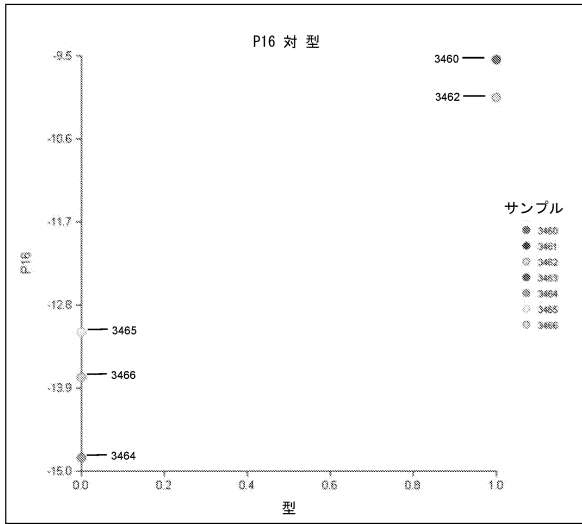
30

40

50

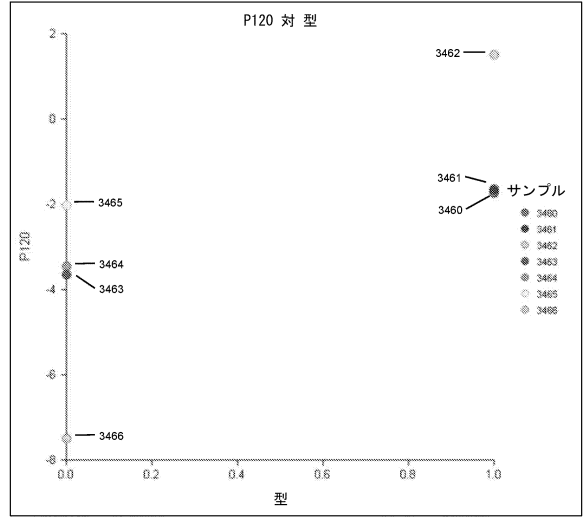
【図 2 D】

図 2D



【図 2 E】

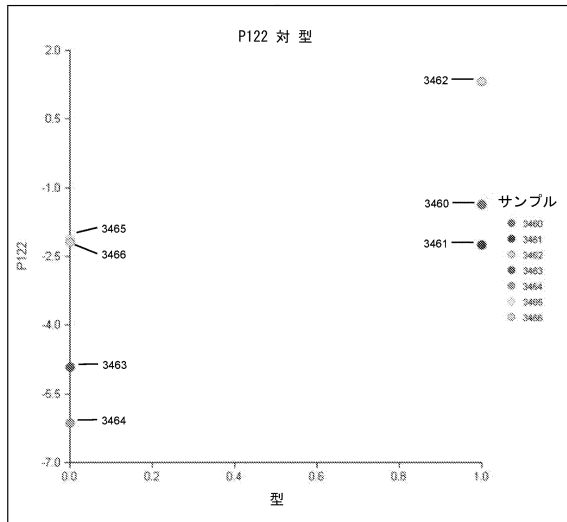
図 2E



10

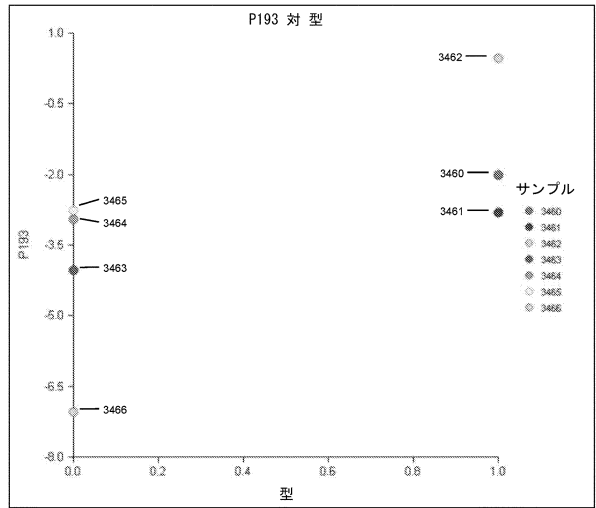
【図 2 F】

図 2F



【図 2 G】

図 2G



20

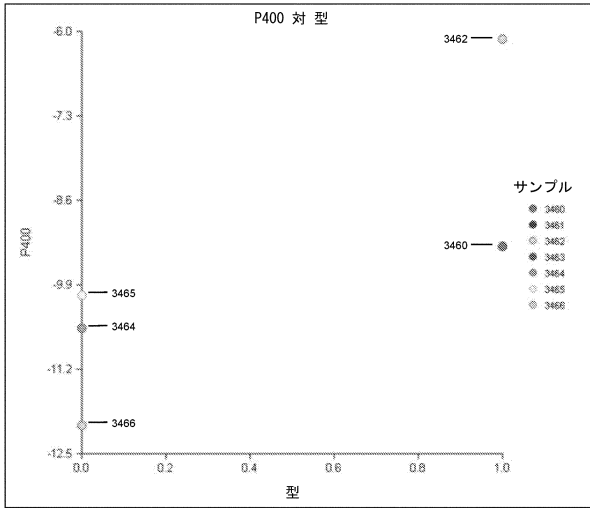
30

40

50

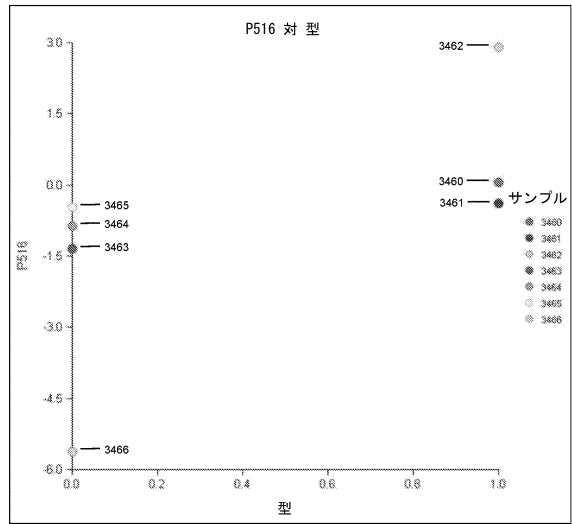
【 図 2 H 】

図 2H



【 図 2 I 】

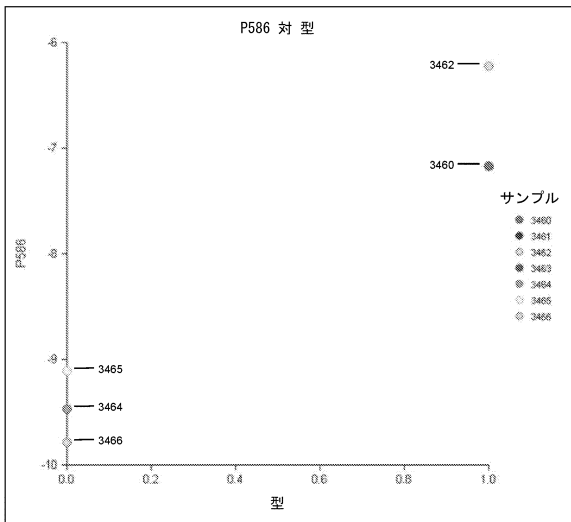
図 2I



10

【 図 2 J 】

図 2J



【 図 3 】

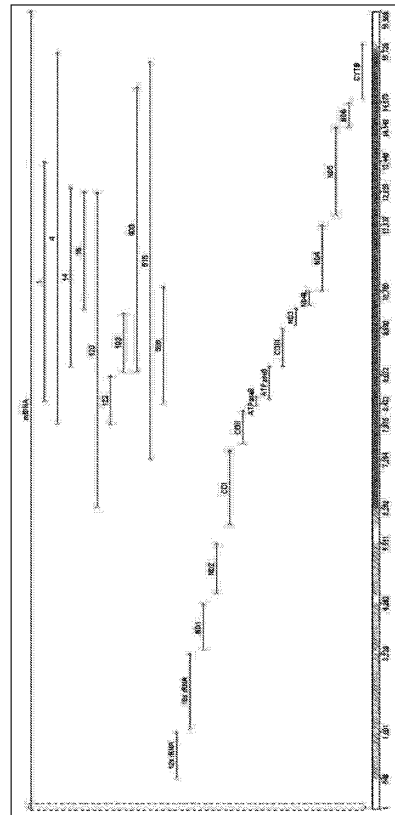


FIG. 3

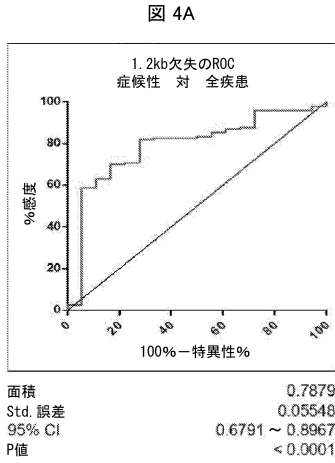
20

30

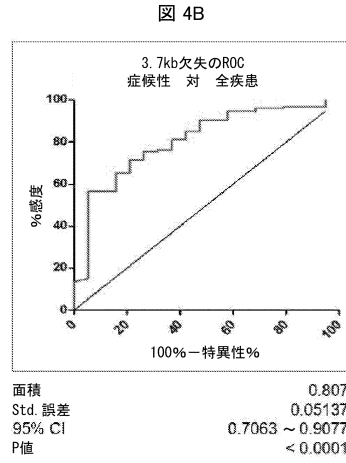
40

50

【 図 4 A 】

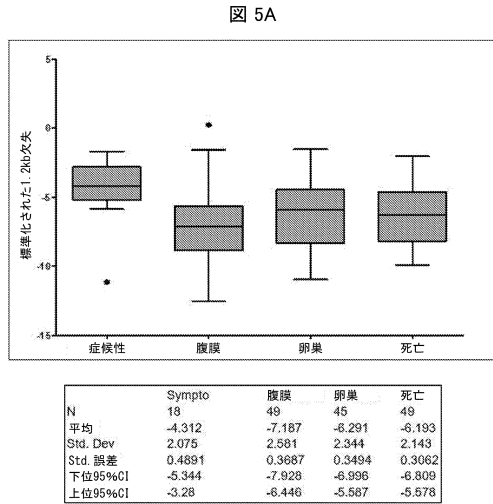


【 図 4 B 】

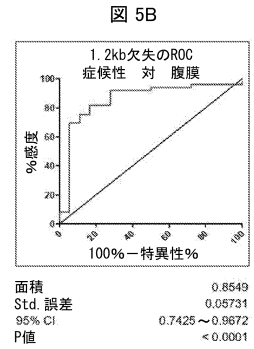


10

【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



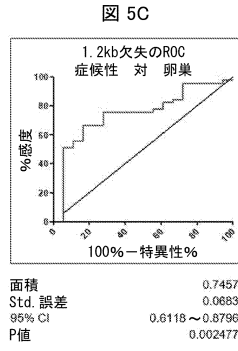
20

30

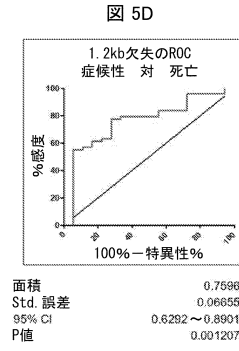
40

50

【 図 5 C 】

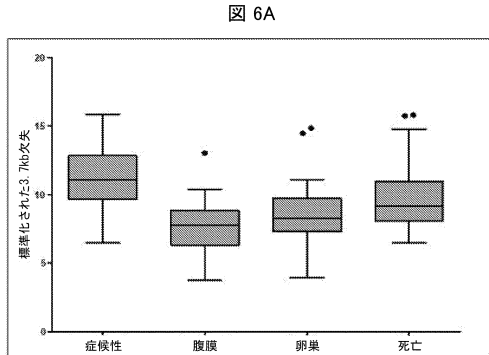


【 図 5 D 】



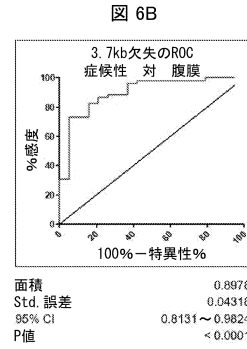
10

【 図 6 A 】



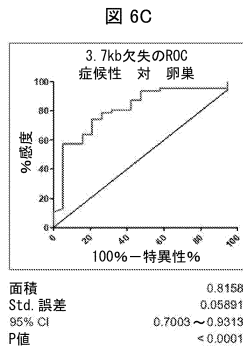
	Sympio	腹膜	卵巣	死亡
N	19	52	47	50
平均	11.12	7.569	8.549	9.617
Std. Dev	2.239	1.843	2.089	2.125
Std. 誤差	0.5136	0.2555	0.3047	0.3005
下位95%CI	10.04	7.056	7.936	9.013
上位95%CI	12.19	8.082	9.162	10.22

【 図 6 B 】

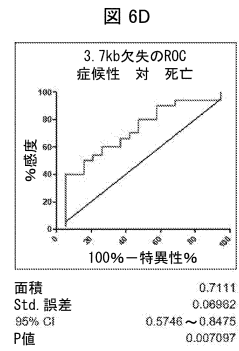


20

【 図 6 C 】



【 図 6 D 】



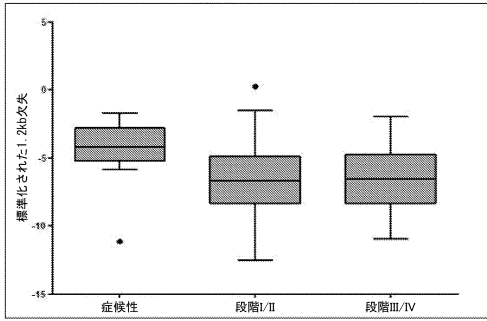
30

40

50

【 図 7 A 】

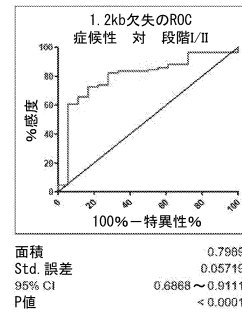
図 7A



	Sympto	段階I/II	段階III/IV
N	18	84	57
平均	-4.312	-6.892	-6.348
Std. Dev	2.075	2.505	2.25
Std. 誤差	0.4681	0.2733	0.2981
下位95%CI	-5.344	-7.236	-6.945
上位95%CI	-3.28	-6.148	-5.751

【 図 7 B 】

図 7B

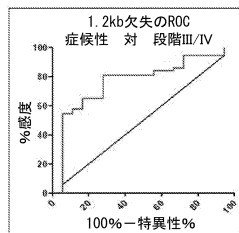


面積 0.7969
 Std. 誤差 0.05719
 95% CI 0.6868 ~ 0.9111
 P値 < 0.0001

10

【 図 7 C 】

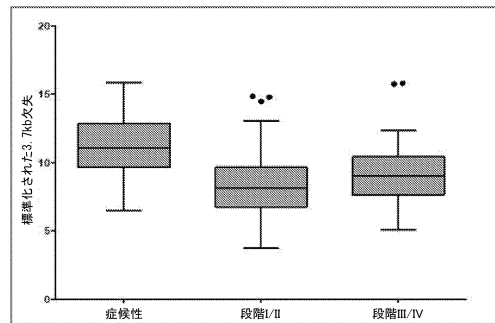
図 7C



面積 0.7661
 Std. 誤差 0.06443
 95% CI 0.6396 ~ 0.8924
 P値 0.0007129

【 図 8 A 】

図 8A



	Sympto	段階I/II	段階III/IV
N	19	89	58
平均	11.12	8.243	9.112
Std. Dev	2.239	2.156	2.14
Std. 誤差	0.5136	0.2285	0.2811
下位95%CI	10.04	7.789	8.549
上位95%CI	12.19	8.697	9.675

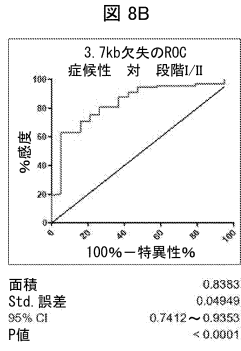
20

30

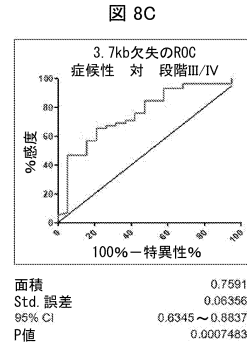
40

50

【 図 8 B 】

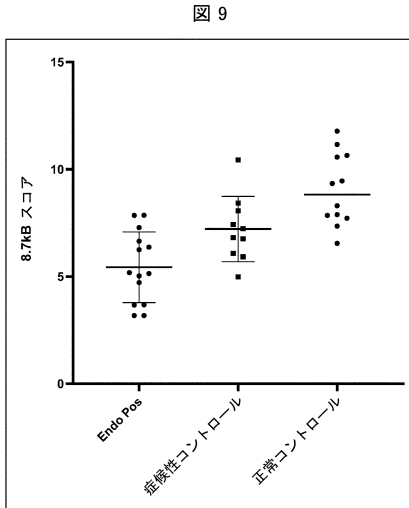


【 図 8 C 】

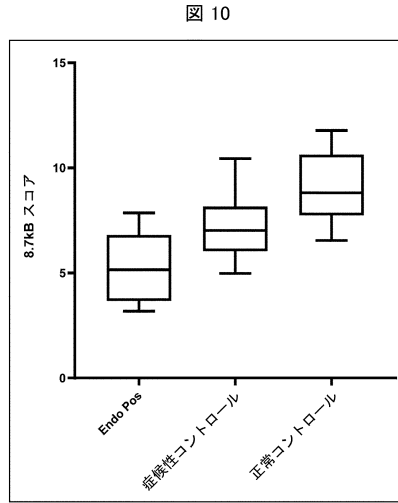


10

【 図 9 】



【 図 1 0 】



20

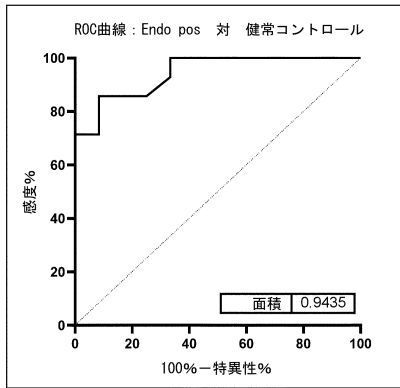
30

40

50

【 図 1 1 】

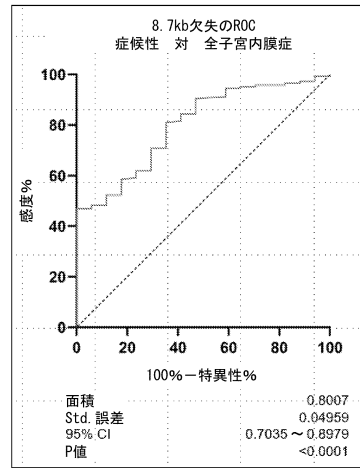
図 11



ROC曲線の下にある面積	
面積	0.9435
Std. 誤差	0.04138
95%信頼区間	0.8623 ~ 1.000
P値	0.0001
データ	
コントロール (BioRec正常コントロール)	12
患者 (Endo pos)	14
不足しているコントロール	0
不足している患者	10

【 図 1 2 】

図 12

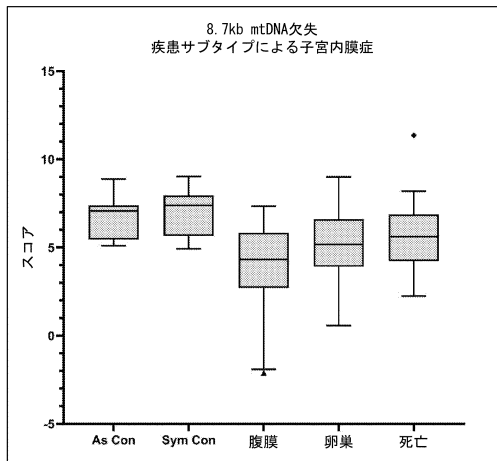


10

20

【 図 1 3 A 】

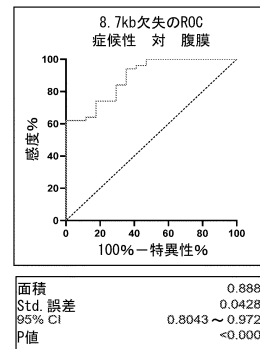
図 13A



	As Con	Sym Con	腹膜	卵巣	死亡
N	14	17	30	47	50
平均	6.724	6.908	4.086	5.283	5.617
Std. 偏差	1.192	1.26	2.134	1.801	1.767
平均のStd. 誤差	0.3185	0.3056	0.3018	0.2627	0.2499

【 図 1 3 B 】

図 13B



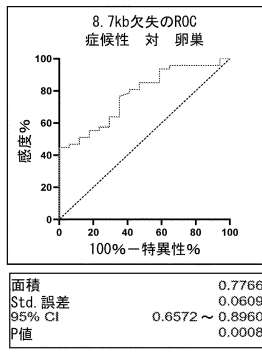
30

40

50

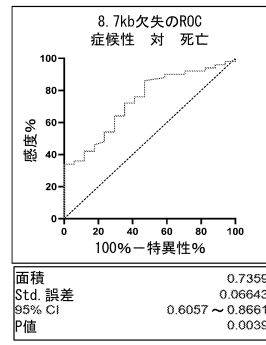
【図 1 3 C】

図 13C



【図 1 3 D】

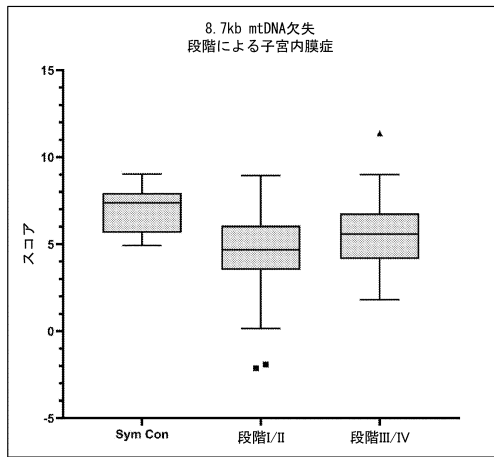
図 13D



10

【図 1 4 A】

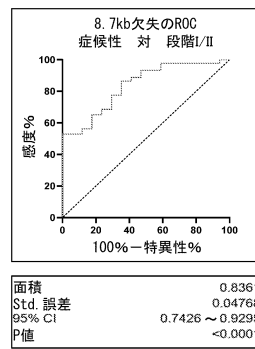
図 14A



	Sym Con	段階I/II	段階III/IV
N	17	89	58
平均	6.908	4.614	5.565
Std. 偏差	1.26	2.063	1.794
平均のStd. 誤差	0.3056	0.2187	0.2356

【図 1 4 B】

図 14B



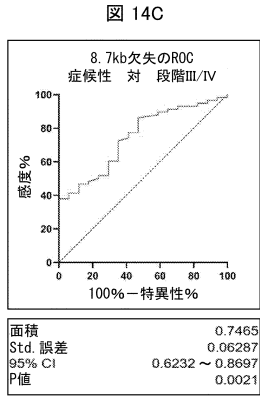
20

30

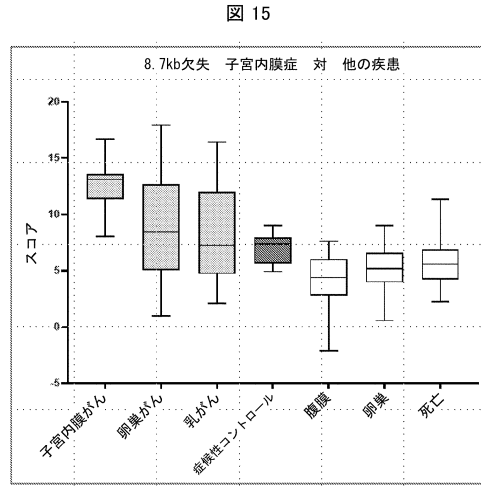
40

50

【 図 1 4 C 】

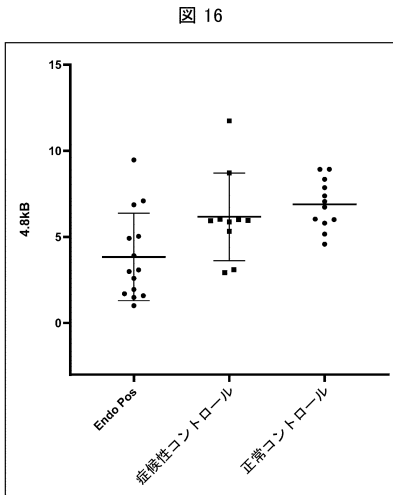


【 図 1 5 】

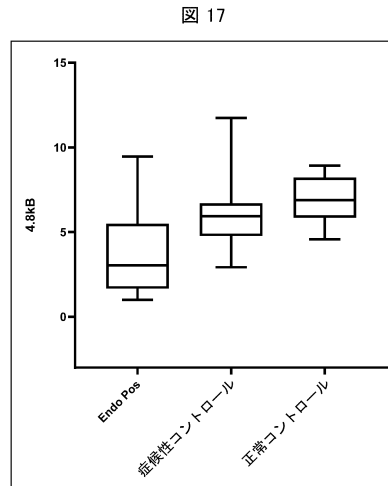


10

【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



20

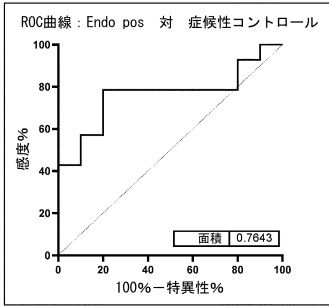
30

40

50

【図 18】

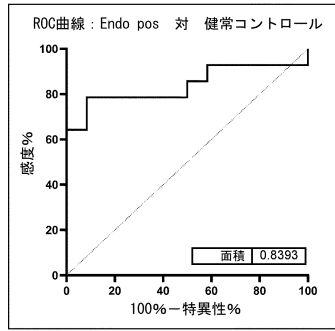
図 18



ROC曲線の下にある面積	
面積	0.7643
Std. 誤差	0.1007
95%信頼区間	0.5669 ~ 0.9616
P値	0.0303
データ	
コントロール (症候性コントロール)	10
患者 (Endo pos)	14
不足しているコントロール	0
不足している患者	10

【図 19】

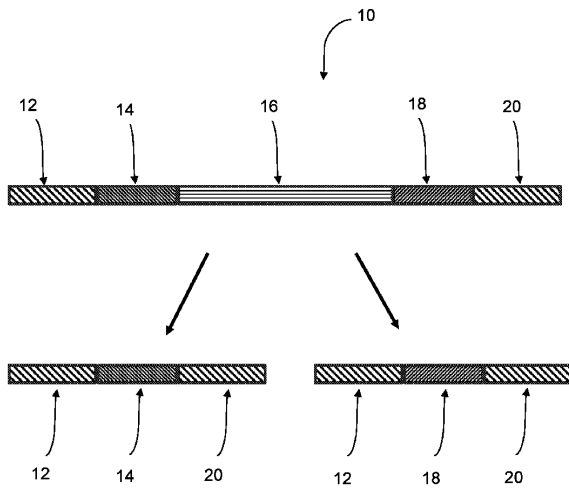
図 19



ROC曲線の下にある面積	
面積	0.8393
Std. 誤差	0.08494
95%信頼区間	0.6728 ~ 1.000
P値	0.0034
データ	
コントロール (正常コントロール)	12
患者 (Endo pos)	14
不足しているコントロール	0
不足している患者	10

10

【図 20】



20

Fig. 20

30

【配列表】

0007649745000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/11 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/6883(2018.01)
 C 1 2 M 1/34 (2006.01)

F I

G 0 1 N 33/53 D
 C 1 2 N 15/11 Z Z N A
 C 1 2 Q 1/6883 Z
 C 1 2 M 1/34 Z

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 マグラ, アンドレア

カナダ, ピー0ティー 1シー0 オンタリオ, アティコーカン, オブライエン ストリート 404
 ボックス 577

(72)発明者 レグリー, ブライアン

カナダ, ヴィー2アール 0ジー6 ブリティッシュ コロンビア, チリワック, マツクイ スト
 リート 5921

(72)発明者 ハーボトル, アンドリュー

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

(72)発明者 アッシャー, ロバート

イギリス, ディーエイチ4 4エイチエフ, ホートン - ル - スプリング, ニューボトル, ガーデン
 ストリート 4

審査官 西村 亜希子

(56)参考文献

米国特許出願公開第2008/0318237 (US, A1)

Ann. N.Y. Acad. Sci., 2005年, Vol.1042, pp.186-194

Genes Genom., 2013年, Vol.35, pp.563-567

FERTILITY AND STERILITY, 2013年03月13日, VOL:99, NR:7, PAGE(S):1980-1986,1986
 .E1-1986.E9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.02.021>

JOURNAL OF ASSISTED REPRODUCTION AND GENETICS, 2017年11月09日, VOL:35, NR:
 3, PAGE(S):533-538, <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-017-1082-4>

PLOS ONE, 2012年07月17日, VOL:7, NR:7, PAGE(S):E40668(1-12), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0040668>

Int. J. reprod. BioMed., 2018年09月, Vol.16, No.9, pp.571-576

FERTILITY AND STERILITY, 2011年, Vol.96, No.2, pp.384-388

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 15 /

C 1 2 Q

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

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q