

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年6月30日(30.06.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/103727 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/006467
- (22) 国際出願日: 2015年12月24日(24.12.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-263485 2014年12月25日(25.12.2014) JP
- (71) 出願人: 凸版印刷株式会社(TOPPAN PRINTING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1100016 東京都台東区台東一丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 國富 朋子(KUNITOMI, Tomoko); 〒1100016 東京都台東区台東一丁目5番1号凸版印刷株式会社内 Tokyo (JP). 北野 史朗(KITANO, Shiro); 〒1100016 東京都台東区台東一丁目5番1号凸版印刷株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 谷・阿部特許事務所(TANI & ABE, P.C.); 〒1070052 東京都港区赤坂2丁目6-20 Tokyo (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

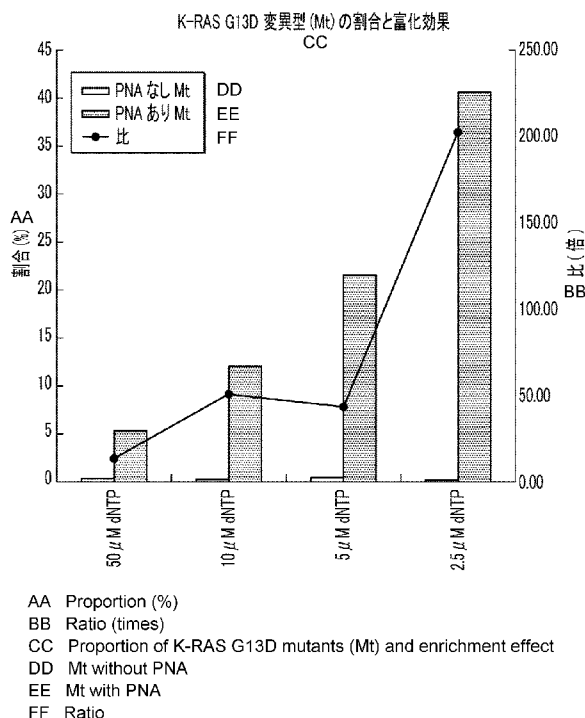
添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PROMOTING AMPLIFICATION OF SPECIFIC NUCLEIC ACID SEQUENCE

(54) 発明の名称: 特異的核酸配列の増幅促進方法



(57) Abstract: Provided is an enrichment method for a nucleic acid of interest (such as a somatic mutation) that increases the efficiency of inhibition by artificial nucleic acid in the nucleic acid amplification process and has good accuracy with a reduced possibility of equivocal positivity. As a result of in-depth research intended to overcome the above problem, the inventors understood that the target enrichment effect is dramatically improved and the proportion of target nucleic acid is dramatically improved after the nucleic acid amplification step, even if equivocal positivity of a constantly wrong proportion of equivocal positivity is obtained, by lowering the concentration of four types of deoxyribonucleotide triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) used in the nucleic acid amplification process; i.e., the concentration of dNTP, from the concentration usually used in the nucleic acid amplification process, and perfected the present invention, in which detection of the target nucleic acid is easily obtained.

(57) 要約: 核酸増幅過程に人工核酸による阻害効率を上昇させ、擬陽性の可能性を軽減した精度の良い、目的の核酸(体細胞変異など)の富化方法の提供。本発明者等は、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、核酸増幅過程に使用される4種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)、すなわちdNTPの濃度を通常の核酸増幅工程に使われる濃度よりも低濃度にするにより、標的の富化効果が劇的に向上し、例えば、擬陽性で一定の間違った標的核酸の割合を劇的に向上することが分かり、標

割合の擬陽性が得られたとしても、核酸増幅工程後、標的核酸の検出が容易に得られる本発明を完成させた。

WO 2016/103727 A1



-
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：特異的核酸配列の増幅促進方法

技術分野

[0001] 本発明は、試料中の微量の標的遺伝子の変異を検出するための、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)等により標的遺伝子の増幅効率を促進する方法に関する。

[0002] 特に本発明は、前記方法に用いるためのキットと、前記方法で増幅した標的遺伝子の遺伝子産物中の変異を検出する方法を含む。

背景技術

[0003] (1) 血中の循環遊離DNA(ccfDNA)の臨床検査における有用性
抹消血、血漿、および血清などの生体サンプル中の微量な遺伝子変異を検出することは臨床上有用である。とりわけ、臨床検査の場においては、出生前診断またはがん患者に対する分子標的薬の治療効果予測する際に、生体サンプル中の微量な標的遺伝子の変異を高効率に増幅し、高感度に検出することが求められている。

[0004] ヒトの血液中には微量のDNAが循環遊離DNA(ccfDNA)として存在することが知られており、ccfDNAに含まれる標的遺伝子を遺伝子診断に活用する試みがなされてきた。

[0005] ccfDNAとは、体内で細胞が死ぬ際に細胞の内容物とともに放出され血中に流れ込むDNAのことである。正常細胞が死んだときに放出される細胞の内容物は、通常、マクロファージなどの食細胞に捕捉され消化されるが、そのうち消化しきれなかったDNAがccfDNAとして血中に流れ込む。

[0006] がん細胞のように細胞増殖速度が速い細胞が死んだときに放出される細胞の内容物についても、食細胞が消化し切れなかったがん細胞由来のゲノムDNAが正常細胞由来の未消化のゲノムDNAと共にccfDNAとして血流を流れる。

- [0007] この他にセルフリーDNA（cfDNA）と呼ばれる、血中に流れ込んでいる細胞由来のDNAがある。本願では、cccDNA、cfDNAの両者を含むものとしてcccDNAとして説明する。また、これら血中に微量に含まれるDNAだけでなく常法で得られる、細胞核に存在する長い（大きな）DNAも対象にできることは当業者には容易に理解される。
- [0008] 定期的に被験者から採血をして、がん細胞由来のcccDNA中のがん関連遺伝子の変異等を追跡することで、がんを早期に発見できたり、がんに対する治療の効果を確認できたり、がんの再燃および／または再発を早期に発見することができる。近年では、cccDNAのこれらの可能性を肺がんおよび／または大腸癌等の治療における臨床検査に活用するための研究開発が活発になされている。
- [0009] ccfDNAを活用した遺伝子検査におけるさらなる試みとして、患者から経時的に採血をして、がん細胞の分子標的薬などに対する耐性獲得に関連する進化を追跡する試みがなされている。
- [0010] がん治療のための分子標的薬としては、例えば、ゲフェチニブ（イレッサ（登録商標））およびパニツマブ（ベクチビックス（登録商標））が知られている。これらの分子標的薬は、多くのがん細胞で過剰に発現し活性化している細胞増殖および／または細胞分裂に関与するタンパク質である上皮細胞増殖因子受容体（EGFR）を標的とし、EGFRのATPの結合部位にATPと競合的に結合してEGFRの活性を阻害する。すなわち、分子標的薬がATPの結合部位に結合されるとEGFRの自己リン酸化が妨害され、EGFRからのシグナル伝達が間接的に遮断され、がん細胞のアポトーシスが誘導される。しかし、これらの分子標的薬を数ヶ月服用すると、がん細胞が薬剤に対する耐性を獲得し、薬剤の効果が落ちることが確認されている。
- [0011] がん細胞のこれらの薬剤耐性の獲得には、K-RASなどの遺伝子の変異が関与している（非引用文献1：Diaz, L. A. Jr et al. Nature 486, 537-540（2012））。
- [0012] 例えば、肺がんでは、ゲフェチニブ（イレッサ）投与後の薬剤耐性を予測

する因子として、EGFR遺伝子のT790Mがモニタリングされ、大腸がんでは、KRASのコドン12、13、61などの変異が、セツキシマブ(アービタックス)投与後、血中に微量の変異として観察される。

[0013] つまり、ccfDNA中のKRAS遺伝子の核酸変異を経時的に検出することによって、がん細胞が分子標的薬などに対する耐性を進化させているかどうかを知ることができ、その知見は治療に役立てる上でも非常に重要な手段となり得る。

[0014] また、これらの多くのがん関連遺伝子の変異は、CEAおよびCA-19-9などとして知られる消化器系の腫瘍マーカーによる検出よりも早期のがんの兆候として現れることから、ccfDNA中のがん関連遺伝子の変異を検出することは、がんの早期発見にも有用であることが指摘されている。

[0015] これらのがん耐性に関与する遺伝子変異は、がんのヘテロジェナイティー(不均一性)なものとして、微量に存在している可能性も示唆されているので、ccfDNAだけでなく、FFPE(ホルマリン固定パラフィン包埋)切片などの組織サンプルにおける超高感度な遺伝子検出法が今後必要とされてくると推察できる。

[0016] しかしながら、試料中における全ccfDNA中のがん関連遺伝子の変異を有するccfDNAの割合は、0.01%~50%と非常に広範囲である。特に、全ccfDNA中のがん関連遺伝子の遺伝子変異を有するccfDNAが血中に微量にしか存在していない場合には、非常に高感度な遺伝子解析方法が必要である。

[0017] 遺伝子解析方法としてダイレクトシーケンシングが汎用されているが、体細胞変異などの検出においては検出感度が20%程度しかないので、臨床検査には不向きである。近年では、次世代シーケンサー(NGS: New Generation Sequencer)またはデジタルPCRなどの新しい技術により、ccfDNA中の遺伝子変異を検出する報告もある。

[0018] NGSなどによる遺伝子解析方法では、典型的なエラーレートが存在する。それらの遺伝子解析方法の検出限界(LOD: Limit of Dete

ction)は、約1%程度とされており、それ以下の感度では変異を観察することができない。また、NGSで高感度に変異を検出する場合には、Deep Sequencingをする必要があり、NGSの多項目にわたる検出能力をスポイルしてしまう。

[0019] (2) 遺伝子解析におけるペプチド核酸(PNA)の利用

コストが安く、これらの問題を解決するひとつの方法としては、PNAなどの人工核酸をPCRなどの核酸増幅過程に添加し、特定の核酸配列を人工核酸でクランピングすることによって反応溶液中の増幅を阻害することにより、反応液中の反応に寄与する標的となる変異配列を有する核酸を富化する方法が一般的に普及している。

[0020] ペプチド核酸(PNA: Peptide Nucleic Acid)とは、ニールセン等によって開発された、主鎖にペプチド構造を保持した、DNAまたはRNAに似た構造を持つ分子であり(非特許文献3: Nielsen, P. E. et al. Science Vol. 254, pp1497-1500)以下のような構造を有するものをいう。すなわち、DNAとRNAの主鎖を構成している糖(デオキシリボース、もしくはリボース)の代わりに、PNAではN-(2-アミノエチル)グリシンがアミド結合で結合したものが主鎖となっている。さらに、DNA等における核酸塩基に相当するプリン環またはピリミジン環が、PNAではメチレン基とカルボニル基を介して主鎖に結合している。PNAはDNA同様の分子認識を行う。PNA/DNAの2重鎖はDNA/DNAの2重鎖よりも強い結合を形成する。

[0021] このPNAの特性を利用して、サンプル中の低濃度の標的分子を高感度に検出する方法が開発されている。例えば、ダイレクトシーケンス前の核酸増幅工程において、野生型の核酸配列に結合するPNAを結合させる。次に、野生型以外の、変異している配列を富化する。このようにして、高感度にK-RAS遺伝子変異を検出する方法(特許文献1)がある。その他、LNAまたはPNAを組み合わせたリアルタイムPCR法によりがん細胞の変異遺伝子を検出する方法(特許文献2)などがある。これらの方法は、クランプ

したい配列の人工塩基を合成するだけで、簡単に目的の核酸を富化することができる。また、これらの方法は、NGSおよびデジタルPCRと比較してコストが安い。

[0022] (3) 遺伝子検査におけるDNAポリメラーゼの正確性に係る問題点

一方、遺伝子検査で用いられるPCR法で使用されるDNAポリメラーゼは、種類や反応条件によって、正確性(Fidelity)が低いものがあり、そのため、DNAポリメラーゼによる伸長時に、所望の鋳型の配列とは異なる塩基が挿入されることがある。

DNAポリメラーゼの正確性(Fidelity)は、ポリメラーゼの種類によって異なる。例えばDNAポリメラーゼの変異の頻度は、Taqポリメラーゼにおいては5.1%、その他の修正機能を有するプルーフリーディングポリメラーゼにおいては5.1%以下である。

[0023] すなわち、このDNAポリメラーゼの低い正確性によって、PCRの増幅反応中に間違った塩基が挿入された増幅産物を生成する。この増幅産物は、次の核酸増幅工程において間違えて変異が入った塩基配列に対してはPNAによりクランプできなくなる。そのため、目的とする、がん関連遺伝子の遺伝子変異とは異なる変異核酸が増幅され、それががん検査における遺伝子変異の検査において、擬陽性として検出されてしまう危険性がある。特に、0.1%以下の微量な変異を検出する際に、擬陽性の影響は顕著に現れる。これらを解決するためには、校正機能付きのDNAポリメラーゼを用いることで、擬陽性が軽減することも報告されている(非特許文献2)。しかしながら、校正機能付きDNAポリメラーゼは一般的に価格が高く、医療および／または医薬分野の開発に用いられるGMPグレードのものは、通常のTaqポリメラーゼに比べて種類が少ない。一方で、Taq DNAポリメラーゼは上述のような正確性の問題はあるが、安価で、製品の品質も安定的な、しかもライセンスフリーで利用できるという長所がある。

先行技術文献

特許文献

[0024] 特許文献1：特開2012-135290号公報

特許文献2：国際公開第2012/002477号

特許文献3：欧州特許出願公開第0332435号明細書

非特許文献

[0025] 非特許文献1：Diaz、L. A. Jr et al. Nature 486、
pp 537-540 (2012)

非特許文献2：Journal of Molecular Diagnostics,
July 2008, Vol. 10, No. 4.

非特許文献3：Nelsen, P. E. et al. Science Vol.
254、pp 1497-1500.

非特許文献4：Hindson, et.al., Analytical Chemistry,
2011, vol.83 (22) , pp. 8604-8610

非特許文献5：Wu, et.al., Genomics, 1989, vol.4, pp.560-569

非特許文献6：Ruano and Kidd, Nucleic Acids Research, 1989, vol.17,
pp. 8392

非特許文献7：Newton et.al., Nucleic Acids Research, 1989, vol.17,
pp. 7

非特許文献8：Orita et.al., Proceedings of the National Academy
of Sciences, USA, 1989, vol.86, pp.2766-2770

非特許文献9：Genomics, 1989, vol.5, pp.874-879

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0026] 本発明では、安価で製造品質が安定しており、ライセンスフリーで使用できるTaqポリメラーゼとPNAなどの人工核酸を用いて微量な標的遺伝子核酸の変異を含む領域を増幅させる方法を改良することを目的とする。さらに、また本発明は、前記改良された方法により、がんなどの検査に利用される遺伝子変異の検査において擬陽性を低減し、且つ核酸増幅後の標的とする変異の割合を劇的に増加する方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0027] 本発明者等は、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、人工核酸により野生型遺伝子核酸の増幅を阻害させることにより、標的遺伝子核酸である変異型の割合を劇的に向上させることができることを見出した。さらに、核酸増幅過程に使用される4種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸（ $dATP$ 、 $dCTP$ 、 $dGTP$ 、 $dTTP$ ）、すなわち $dNTP$ の濃度を通常の核酸増幅工程に使われる濃度よりも低濃度にすることで、標的遺伝子核酸の増幅効率を維持または向上させ、かつ、擬陽性の原因となるエラーを低減させることを見出した。
- [0028] すなわち、本発明者は、通常の核酸増幅反応において、人工核酸で野生型遺伝子の核酸配列をクランピングし、反応溶液中の $dNTP$ 濃度を減少させることで、DNAポリメラーゼによるエラーを軽減させ、かつ、標的核酸の割合を劇的に増やすことができることを明らかにした。
- [0029] 本発明に係るがん関連遺伝子の遺伝子変異を含む核酸領域の増幅効率を促進する方法は、下記（１）～（２４）である。
- [0030] （１）がん関連遺伝子である $K-RAS$ の遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する方法であって、
- （a）患者から採取したサンプルからDNAを抽出する工程と、
 - （b）前記遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する工程と、
- を含む。
- 前記遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する工程における反応は、
- （i）校正機能のないDNAポリメラーゼと、
 - （ii）前記遺伝子変異を含む核酸領域に対応する前記サンプル中の野生型遺伝子の領域に強力に結合する人工合成核酸と、および
 - （iii） $dNTP$ と、
- を反応剤として含み、
- 前記反応における前記 $dNTP$ 濃度が $2.5\mu M\sim 10\mu M$ であることを特徴とする。

[0031] (2) (1) に記載の方法における前記サンプルは、血液、血漿、および血清からなる群から選択され、

前記サンプルから抽出されるDNAが循環遊離DNA (ccfDNA) であることを特徴とする。

[0032] (3) (1) または (2) に記載の方法における、前記校正機能のないDNAポリメラーゼがTaq DNAポリメラーゼであることを特徴とする。

[0033] (4) (1) ~ (3) に記載の方法において、前記遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する工程における増幅反応はPCRであることを特徴とする。

[0034] (5) (1) ~ (4) に記載の方法は、前記人工合成核酸がペプチド核酸 (PNA) であることを特徴とする。

[0035] (6) (1) ~ (5) に記載の方法は、前記K-RASの遺伝子変異を検出する領域が、コドン12およびコドン13、コドン61またはコドン146であることを特徴とする。

[0036] (7) (6) に記載の方法において、

前記K-RASの遺伝子変異を含む領域に対応する野生型K-RAS遺伝子の領域に結合するPNAの配列は、

(a) K-RASのコドン12およびコドン13を含む核酸領域に結合させる場合は、

5 ' - A G C T G G T G G C G T A - 3 ' (配列番号 : 5)

(b) K-RASのコドン61を含む核酸領域に結合させる場合は、

5 ' - C A G G T C A A G A G G A - 3 ' (配列番号 : 6)

(c) K-RASのコドン146を含む核酸領域に結合させる場合は、

5 ' - G A A A C A T C A G C A A G A C A A G - 3 ' (配列番号 : 7)

であることを特徴とする。

[0037] (8) (6) または (7) に記載の方法において、

K-RASの遺伝子変異を増幅するプライマーの配列は、

(a) K-RASのコドン12およびコドン13を含む核酸領域を増幅す

る場合は、

フォワードプライマー：5 ‘-AGTCACATTTTTCATTATTT
TTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGA-3’ (配列番号
：8)

リバースプライマー：5 ‘-TCGTCCACAAAATGATTCTG
AATTAGCTGTATCG-3’ (配列番号：9)

(b) K-RASのコドン61を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー：5 ‘-AGCAAGTAGTAATTGATGG
AGAAACCTGTCTCT-3’ (配列番号：10)

リバースプライマー：5 ‘-CCAGTCCTCATGTACTGGTC
CCTC-3’ (配列番号：11)

(c) K-RASのコドン146を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー：5 ‘-AGTAGACACAAAACAGGC
TCAGGACTTA-3’ (配列番号：12)

リバースプライマー：5 ‘-AAATGACATAACAGTTATGA
TTTTGCAGAAAACAGATCTGTA-3’ (配列番号：13
)

であることを特徴とする。

[0038] (9) (6)に記載の方法に供する高感度K-RAS遺伝子変異検出キット
は、

プライマーと、

PNAと、

dNTPと、

DNAポリメラーゼと、

を含む請求項6に記載の方法に供するK-RAS遺伝子変異検出キットであ
って、

前記dNTPは、使用時の終濃度が2.5 μ M~10 μ Mに調製できるも
のであることを特徴とする。

[0039] (10) (9)に記載のキット前記DNAポリメラーゼが、前記プライマーおよび前記PNAが以下の配列が、

(a) K-RASのコドン12およびコドン13を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー：5 ‘-AGTCACATTTTCATTATTTT
TTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGA-3’ (配列番号：8)

リバースプライマー：5 ‘-TCGTCCACAAAATGATTCTG
AATTAGCTGTATCG-3’ (配列番号：9)

PNA：5 ‘-AGCTGGTGGCGTA-3’ (配列番号：5)

(b) K-RASのコドン61を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー：5 ‘-AGCAAGTAGTAATTGATGG
AGAAACCTGTCTCT-3’ (配列番号：10)

リバースプライマー：5 ‘-CCAGTCCTCATGTACTGGTC
CCTC-3’ (配列番号：11)

PNA：5 ‘-CAGGTCAAGAGGA-3’ (配列番号：6)

(c) K-RASのコドン146を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー：5 ‘-AGTAGACACAAAACAGGCT
CAGGACTTA-3’ (配列番号：12)

リバースプライマー：5 ‘-AAATGACATAACAGTTATGA
TTTTGCAGAAAACAGATCTGTA-3’ (配列番号：13)

PNA：5 ‘-GAAACATCAGCAAAGACAAG-3’ (配列番号：7)

であることを特徴とする。

[0040] (11) (9)または(10)に記載のキット前記DNAポリメラーゼが、Taq DNAポリメラーゼであることを特徴とする。

[0041] (12) がん関連遺伝子の遺伝子変異を含む核酸領域の核酸変異の検出方法

が、

(1) から (8) に記載のいずれか一項の方法に記載の工程と、

さらに (1) から (8) に記載のいずれか一項の方法により増幅した前記核酸領域の核酸の変異を検出する工程と、
を含むことを特徴とする方法。

[0042] (13) (12) に記載の方法が、デジタルPCRを用いることを特徴とする。

[0043] (14) がん関連遺伝子であるK-RASの遺伝子変異を含む核酸領域の増幅工程中に生じるミスリーディングをなくすまたは減少させる方法であって、

(a) 患者から採取したサンプルからDNAを抽出する工程と、

(b) 前記遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する工程と、

を含む。

また、前記遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する工程における反応は、

(i) 校正機能のないDNAポリメラーゼと、

(ii) 前記遺伝子変異を含む核酸領域に対応する前記サンプル中の野生型遺伝子の領域に結合する人工合成核酸と、および

(iii) dNTPと、

を反応剤として含み、

前記反応における前記dNTP濃度が $2.5\mu\text{M}$ ～ $10\mu\text{M}$ であることを特徴とする。

[0044] (15) (14) に記載の方法が、前記サンプルが血液、血漿、および血清からなる群から選択され、

前記サンプルから抽出されるDNAが循環遊離DNA (ccfDNA) であることを特徴とする。

[0045] (16) (14) または (15) に記載の方法が、前記遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する工程における増幅反応がPCRであることを特徴とする。

[0046] (17) (14) ～ (16) に記載の方法は、前記校正機能のないDNAが

リメラゼがTaq DNAポリメラーゼであることを特徴とする。

[0047] (18) (13) ~ (16) のいずれか一項に記載の方法が、前記人工合成核酸がペプチド核酸 (PNA) であることを特徴とする。

[0048] (19) (14) ~ (18) のいずれか一項に記載の方法は、前記K-RASの遺伝子変異を検出する領域が、コドン12およびコドン13、コドン61またはコドン146であることを特徴とする。

[0049] (20) (19) に記載の方法は、前記K-RASの遺伝子変異を含む領域に対応する野生型K-RAS遺伝子の領域に結合するPNAの配列は、

(a) K-RASのコドン12およびコドン13を含む核酸領域に結合させる場合は、

5 '−AGCTGGTGGCGTA−3' (配列番号：5)

(b) K-RASのコドン61を含む核酸領域に結合させる場合は、

5 '−CAGGTCAAGAGGA−3' (配列番号：6)

(c) K-RASのコドン146を含む核酸領域に結合させる場合は、

5 '−GAAACATCAGCAAAGACAAG−3' (配列番号：7)

であることを特徴とする。

[0050] (21) (19) または (20) に記載の方法は、

K-RASの遺伝子変異を増幅するプライマーの配列は、

(a) K-RASのコドン12およびコドン13を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー：5 '−AGTCACATTTTTCATTATTTT
TTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGA−3' (配列番号：8)

リバースプライマー：5 '−TCGTCCACAAAATGATTCTG
AATTAGCTGTATCG−3' (配列番号：9)

(b) K-RASのコドン61を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー：5 '−AGCAAGTAGTAATTGATGG

AGAAACCTGTCTCT-3' (配列番号：10)

リバースプライマー：5'-CCAGTCCTCATGTACTGGTC
CCTC-3' (配列番号：11)

(c) K-RASのコドン146を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー：5'-AGTAGACACAAAACAGGC
TCAGGACTTA-3' (配列番号：12)

リバースプライマー：5'-AAATGACATAACAGTTATGA
TTTTGCAGAAAACAGATCTGTA-3' (配列番号：13)

であることを特徴とする。

[0051] (22) (19)に記載の方法に供する高感度K-RAS遺伝子変異検出キットであって

プライマーと、

PNAと、

dNTPと、

DNAポリメラーゼと、

を含み、

前記dNTPは、使用時の終濃度が2.5 μM~10 μMに調製できるものであることを特徴とするキット。

[0052] (23) (22)に記載のキットは、前記プライマーおよび前記PNAが以下の配列が、

(a) K-RASのコドン12およびコドン13を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー：5'-AGTCACATTTTTCATTATTT
TTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGA-3' (配列番号：8)

リバースプライマー：5'-TCGTCCACAAAATGATTCTG
AATTAGCTGTATCG-3' (配列番号：9)

PNA : 5 ‘-AGCTGGTGGCGTA-3’ (配列番号 : 5)

(b) K-RASのコドン61を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー : 5 ‘-AGCAAGTAGTAATTGATGG
AGAAACCTGTCTCT-3’ (配列番号 : 10)

リバースプライマー : 5 ‘-CCAGTCCTCATGTACTGGTC
CCTC-3’ (配列番号 : 11)

PNA : 5 ‘-CAGGTCAAGAGGA-3’ (配列番号 : 6)

(c) K-RASのコドン146を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー : 5 ‘-AGTAGACACAAAACAGGCT
CAGGACTTA-3’ (配列番号 : 12)

リバースプライマー : 5 ‘-AAATGACATAACAGTTATGA
TTTTTGCAGAAAACAGATCTGTA-3’ (配列番号 : 13
)

PNA : 5 ‘-GAAACATCAGCAAAGACAAG-3’ (配
列番号 : 7)

であることを特徴とする。

[0053] (24) (22または23)に記載のキットは、前記DNAポリメラーゼが、Taq DNAポリメラーゼであることを特徴とする。

発明の効果

[0054] 本発明に係る特異的核酸配列の増幅促進方法は、増幅反応溶液中のdNTPの濃度を低くしてポリメラーゼ伸長時に起きるエラーを軽減することで擬陽性を低減させ、かつ、PNAなどの人工合成核酸を標的核酸の増幅工程で併用することにより、増幅産物中の標的核酸の増幅割合の比率を大幅に向上させ、生体サンプル中の微量の標的核酸の検出を高効率化することを可能にする。

図面の簡単な説明

[0055] [図1]各条件により核酸増幅後10の8乗倍希釈した際の、デジタルPCRにより測定した野生型産物のコピー数濃度を示す図である。図中の括弧内の番

号は〔表 2〕の条件の番号に相当する。

〔図 2〕各条件により核酸増幅後 10 の 8 乗倍希釈した際の、デジタル PCR により測定した変異型産物のコピー数濃度を示す図である。図中の括弧内の番号は〔表 2〕条件の番号に相当する。

〔図 3〕各条件により核酸増幅後 10 の 8 乗倍希釈した際の、デジタル PCR により測定した変異型産物の相対比を示す図である。図中の括弧内の番号は〔表 2〕の条件の番号に相当する。

〔図 4〕各 dNTP 濃度での PNA 有無による変異富化率の比較を示す図である。

発明を実施するための形態

[0056] (1) 定義

本発明において用語「がん関連遺伝子」、または「がん遺伝子」とは、正常細胞の生育に不可欠な機能を有する遺伝子であるが、野生型の遺伝子の塩基配列の変異等により活性が異常に亢進し細胞のがん化を促進する遺伝子であることをいい、がん原遺伝子（正常細胞の野生型遺伝子）を含む。

[0057] 本発明において用語「変異型遺伝子」または「変異型」とは、遺伝子の核酸配列中に変異を生じた遺伝子のことをいう。

[0058] 本発明において用語「核酸」または「核酸分子」とは、2 つ以上のヌクレオチド鎖、例えば DNA（デオキシリボ核酸）および RNA（リボ核酸）を意味する。本明細書に記載の核酸分子は、RNA、DNA（例えば、cDNA、ゲノム DNA、および合成 DNA 等）等であり得る。DNA は二本鎖または一本鎖であってもよい。DNA が一本鎖である場合には、センスまたはアンチセンスであってもよい。

[0059] 本発明において用語「増幅」とは、標的遺伝子等の核酸の増幅手段、例えば PCR 等によって増幅するものと、これにより得られた増幅産物中の特定の変異の塩基配列を検出するための増幅とがある。単に「増幅」と記載されている場合は前者のことを意味し、「検出のための増幅」との記載は後者のことを意味する。

[0060] 本発明において用語「人工合成核酸」または「人工核酸」とは、ペプチド核酸（PNA：Peptide Nucleic Acid）、架橋化核酸（BNA：Bridged Nucleic Acid）またはロックド核酸（LNA：Locked Nucleic Acid）のような人工的に合成された核酸をいう。

[0061] 本発明において用語「クランプ」または「クランピング」とは、特定のがん関連遺伝子の変異を増幅するにあたり、がん関連遺伝子の検出しようとする変異配列を有するがん関連遺伝子の核酸領域に対応する野生型のがん関連遺伝子の核酸領域に、人工合成核酸を特異的に結合させることをいう。

[0062] また、本発明において用語「クランプ阻害」とは、特定のがん関連遺伝子の変異を増幅するにあたり、検出しようとする変異配列を有するがん関連遺伝子の核酸領域に対応する野生型のがん関連遺伝子の核酸領域に、人工合成核酸を特異的に結合させることにより、野生型の増幅を阻害することをいう。

[0063] 本発明において用語「富化（enrichment）」とは、標的遺伝子、例えば変異の入ったがん関連遺伝子の野生型に対する相対的な量を増加させることをいう。

[0064] 本発明において用語「循環遊離DNA（ccfDNA）」とは、死んだ細胞から放出された血流中に含まれるDNAおよび／またはDNA断片のことをいう。

[0065] 本発明において用語「ミスリーディング」または「エラー」とは、PCR増幅等における、DNAポリメラーゼによる核酸の伸長時に、鋳型の配列とは異なる塩基が増幅産物に挿入されることをいう。ミスリーディングにより変異が入った遺伝子産物は、目的とする変異の入ったがん関連遺伝子とは区別されるものである。

[0066] （２）本願発明の概要

本出願に係る発明は、大きく以下の４つの発明である。

[0067] 第一の発明は、がん関連遺伝子であるK-RASの遺伝子変異を含む核酸

領域を増幅する方法の発明であり、

(a) 患者から採取したサンプルからDNAを抽出する工程と、

(b) 前記遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する工程と、

を含むものであり、(a)工程における遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する反応は、

(i) 校正機能のないDNAポリメラーゼと、

(ii) 前記遺伝子変異を含む核酸領域に対応する前記サンプル中の野生型遺伝子の領域に強力に結合する人工合成核酸と、および

(iii) $2.5\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$ の濃度のdNTPと、を含むことを特徴とする発明である。

[0068] 第二の発明は、第一の発明の方法に供する高感度K-RAS遺伝子変異検出キットの発明である。このキットは、プライマーとPNAを含み、これに限られるものではないが、前記プライマーおよび前記PNAのセットは、以下の(a)～(c)のセットを用いることができる。

[0069] (a) K-RASのコドン12およびコドン13を含む核酸領域を増幅する場合は、配列番号8のフォワードプライマー、配列番号9のリバースプライマー、および、配列番号5の人工合成核酸のセット

(b) K-RASのコドン61を含む核酸領域を増幅する場合は、配列番号10のフォワードプライマー、配列番号11のリバースプライマー、配列番号6の人工合成核酸のセット

(c) K-RASのコドン146を含む核酸領域を増幅する場合は、配列番号12のフォワードプライマー、配列番号13のリバースプライマー、および、配列番号7の人工合成核酸のセット。

[0070] 第三の発明は、第一の発明で増幅したK-RASの遺伝子変異を含む核酸の変異を、核酸配列を特定することにより検出する方法に係る発明である。検出には例えばデジタルPCRを用いることができる。

[0071] 第四の発明は、がん関連遺伝子であるK-RASの遺伝子変異を含む核酸領域を増幅させ、増幅工程中に生じるミスリーディングをなくすまたは減少

させる方法の発明である。

この方法の発明は、

(a) 患者から採取したサンプルからDNAを抽出する工程と、

(b) 前記遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する工程と、

を含むものであり、(a) 工程における遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する反応は、

(i) 校正機能のないDNAポリメラーゼと、

(ii) 前記遺伝子変異を含む核酸領域に対応する前記サンプル中の野生型遺伝子の領域に強力に結合する人工合成核酸と、および

(iii) $2.5\ \mu\text{M} \sim 10\ \mu\text{M}$ の濃度のdNTPと、を含むことを特徴とする。

[0072] (3) がん関連遺伝子であるK-RASの遺伝子変異について

本発明に係るがん関連遺伝子の遺伝子変異を含む核酸領域の増幅を促進する方法において検出する核酸の変異は、がん関連遺伝子に生じる体細胞変異を含む。そのようながん関連遺伝子に生じる体細胞変異には、例えば挿入、逆位、欠失、および／または点突然変異のような全ての形態の突然変異が含まれる。

[0073] 正常なK-RAS遺伝子のタンパク質産物は、正常細胞の細胞増殖において上皮成長因子受容体(EGFR)が出す細胞増殖のシグナルを核に伝達して、細胞増殖を促進する機能を有する。とりわけ、K-RAS遺伝子の変異は多くのがんの発生における必須の段階であるので、K-RASの遺伝子変異を検出することは、がんの早期発見、または、がんの再燃、分子標的薬に対するがん細胞の進化などを知る上で重要であることから、本発明においては、数多くあるがん関連遺伝子の中から特にK-RASの遺伝子変異を検出することを第一の目的とした。

[0074] これらの突然変異したK-RAS遺伝子は、一つの対立遺伝子(ヘテロ接合性)または双方の対立遺伝子(ホモ接合性)にそれぞれ見出される野生型K-RASとは異なり、体細胞性または生殖系列で見出され得る変異型K-

RASである。体細胞突然変異は、ある種の組織、例えば腫瘍組織でのみ生じるものであり、生殖細胞系列で遺伝するものではない。生殖系列突然変異は、体組織の任意のもので見出すことができる。

[0075] 本発明において「野生型遺伝子」または「野生型」とは、変異を生じておらず、本来の正常な機能を有する遺伝情報を含む遺伝子のことを意味する。

[0076] 本発明に係るがん関連遺伝子の遺伝子変異を含む核酸領域の増幅を促進する方法において検出する変異型のK-RASとしては、K-RAS遺伝子のエクソン2～4上のコドン12、13、61、および146のうちの1または2以上のアミノ酸置換を伴う突然変異したK-RASが好ましい。前記変異型のK-RASとしては、具体的には、K-RASタンパク質のG12A、G12C、G12D、G12R、G12S、G12V、G13D、Q61H、Q61L、Q61R、A146T、およびA146Vからなる群より選択される1または2以上の変異を有する変異型K-RASが挙げられる。

[0077] 各変異型の核酸（遺伝子）突然変異の態様を表1に示す。また、K-RASのアミノ酸配列を配列番号1に、K-RASのエクソン2上のコドン12を含む遺伝子配列を配列番号2に、K-RASのエクソン3上のコドン61を含む遺伝子配列を配列番号3に、K-RASのエクソン4上のコドン146を含む遺伝子配列を配列番号4に、それぞれ示す。

[0078]

[表1]

アミノ酸置換	核酸突然変異	エキソン
G12A	5571G>C	2
G12C	5570G>T	2
G12D	5571G>A	2
G12R	5570G>C	2
G12S	5570G>A	2
G12V	5571G>T	2
G13D	5574G>A	2
G13A	5574G>C	2
Q61H	23579A>C	3
Q61L	23578A>T	3
Q61R	23578A>G	3
A146T	25293G>A	4
A146V	25294C>T	4

[0079] 本発明に係るがん関連遺伝子の遺伝子変異を含む核酸領域の増幅を促進する方法における以下の各工程では、医学的重要性の観点から、高感度な検出が特に必要とされるK-RAS遺伝子由来核酸を測定対象とすることが好ましいが、K-RAS以外の遺伝子にも有効に適用できるものであり、K-RASに限定されるものではない。

[0080] 本発明において、K-RAS遺伝子由来核酸としては、K-RAS遺伝子のゲノムDNAの全長若しくはその部分、K-RAS遺伝子のmRNAの全長若しくはその部分、前記mRNAの全長若しくはその部分を鋳型として得たcDNA、またはこれらをポリメラーゼ連鎖反応（PCR）等によって人工的に増幅させた増幅産物等が挙げられる。

[0081] また、本発明において、検出するK-RAS遺伝子の変異は、K-RAS遺伝子のエクソン2～4上のコドン12、13、61、および146のうちの1または2以上のアミノ酸置換を伴う突然変異したK-RASが好ましい。

[0082] (4) 第一の発明（増幅する方法の発明）について

(a) 患者から採取したサンプルからDNAを抽出する工程

本発明に係るがん関連遺伝子の遺伝子変異を含む核酸領域の増幅を促進する方法の例として、血液サンプル中に含まれる循環遊離DNA (ccfDNA) のK-RASの遺伝子型を調べる。血液サンプルとしては、末梢血液自体であってもよく、血清または血漿であってもよい。血液サンプルは、腫瘍組織よりも低侵襲的に被験者から採取することができる。したがって、再発腫瘍患者のように、腫瘍組織の生体サンプルの採取が困難な被験者についても、サンプルの調整が容易にできる。

[0083] 本発明における「(a) 患者から採取したサンプルからDNAを抽出する工程」は、一般的に汎用されている核酸抽出方法を適用することで患者の血液からccfDNAを採取することができる。

[0084] 例えば、本工程の一実施形態としては、(i) 患者から血液を採血する工程と、(ii) 採取した血液をccfDNA抽出するために前処理をする工程と、(iii) 前処理した血液からccfDNAを抽出する工程を含めることができる。

[0085] 例えば、一実施形態として、血液サンプルからのccfDNAの抽出は、患者から採取した血液を遠心分離して、分離された血漿を回収し、回収した血漿中のccfDNAをキアゲン社のキット「QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit」等を用いて抽出することができる。

[0086] (b) 遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する工程

本発明における「(b) 前記遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する工程」における、増幅方法では、dNTP濃度を低濃度とし、PNAを用いること以外は、一般的に汎用されるPCR条件を適用することができる。

[0087] 本増幅工程においては、PNAなどの人工核酸は、過剰の野生型に結合して、野生型の増幅を阻害して、反応溶液中の微量の変異型を富化させる機能を果たす。また、本増幅工程においては、dNTP濃度を低濃度で用いることで、ミスリーディングを低減させることができる。PNAをPCR増幅の

際の反応溶液に添加し、同時に d N T P 量を 2.5 ~ 10 μ M と低濃度にするることにより、ミスリーディングを低減またはなくし、かつ、P C R の増幅効率を向上させることができる。したがって、その後の工程である K - R A S 遺伝子の変異型の検出を容易にすることが出来る。

[0088] P C R 反応液の組成、P C R 条件（温度サイクル、サイクルの回数等）は、当業者であれば、本明細書に記載のプライマーペアを用いた P C R において P C R 増幅産物が得られるように、予備実験等により適切に選択および設定をすることができる。

[0089] 例えば、P C R の一実施形態として、P C R の反応サイクルは、（i）鋳型となる患者の血液から抽出した c c f D N A を熱変性する工程と、（i i）プライマーの鋳型 D N A へのアニーリングする工程と、（i i i）耐熱性 D N A ポリメラーゼを用いたプライマーの伸長反応を行う工程とを含む工程を繰り返すことにより、遺伝子変異を有する特定の領域の塩基配列を増幅させることができる。

[0090] P C R の上記（i）～（i i i）の工程を含む反応サイクルは、例えば、サイクル数 20 ~ 50 回の間で設定し、P C R 産物を増幅することができる。サイクル数は予備実験等により適切に選択および設定をすることができる。

[0091] P C R の上記（i）～（i i i）の工程は、例えば一例では、（i）の工程は、2本鎖 D N A を通常 93 ~ 96 $^{\circ}$ C の温度範囲で、30 ~ 60 秒間処理することにより、それぞれ 1 本鎖の D N A に遊離させる。変性の温度は 93 $^{\circ}$ C でも十分な場合が多いが、94 $^{\circ}$ C まで上げたほうが無難である。標的配列によっては、95 $^{\circ}$ C まで上げてみるのがよい場合もある。

[0092] （i i）の工程において、熱処理して 1 本鎖になった鋳型 D N A とプライマーが、2 本鎖を形成してプライミング反応を起こすためには、アニーリングの温度をプライマーの T_m 以下の温度にすべきである。すなわち、プライマーと鋳型とのハイブリッドができるのに十分な低さで、しかも mismatches のハイブリッドの形成しないような十分な高さの温度に設定すべきである。

- [0093] 通常は、プライマーに用いるオリゴヌクレオチドの T_m を推定し、この T_m をアニーリング温度の基準値としてPCRを行う。温度は55℃、時間は30秒間が標準である。目的とする標的配列以外の非特異的増幅が見られるときは、例えば1℃～2℃間隔で温度を上げてみる。逆に、全く何も増幅されないときは、例えば1℃～2℃間隔で温度を下げてみる。
- [0094] (iii)の工程の温度および伸長反応に要する時間は、鋳型DNAの濃度、標的配列のサイズ、反応温度等により左右される。標的配列のサイズが1Kb以下の場合は1分間で十分である。それ以上のサイズの場合は、1Kbにつき1分間の割合で長くする。Taq DNAポリメラーゼによるDNA伸長速度は、70℃において約60ヌクレオチド/秒なので、このことを考慮に入れて伸長時間を適宜設定すればよい。
- [0095] さらに、PCR反応の開始時点での非特異的反応を避け、特異的な増幅の効率を高めるために、反応開始時に高温でPCR反応液の完全な混合を行うホットスタート法を用いてもよい。
- [0096] 具体的なPCRの反応条件の例は後述する実施例に記載されているが、これは一例に過ぎない。PCR反応におけるアニーリング温度、PCR反応の試薬の組成、アニーリング時間等の反応条件は、プライマーとなるオリゴヌクレオチド配列の長さおよび／または塩基組成に応じて、予備実験等により適切に選択および設定することができる。PCRの一連の操作は、市販のPCRキットまたはPCRに必要なサーマルサイクラーなどの装置を利用して、その操作説明書に従って行うことができる。
- [0097] 例えば、PCRの一実施形態として、PCR反応溶液には、患者の血液から上述した(4)患者から採取したサンプルからDNAを抽出する工程により採取したccfDNAを鋳型DNAとし、2.5μM～10μMの低濃度のdNTPmixと、これに限られるものではないが以下の(a)～(c)に示されるフォワードプライマー、リバースプライマーと人工合成核酸のセットと、MOPS緩衝溶液などの緩衝溶液と、Taq DNAポリメラーゼと、MgCl₂および／またはNaClなどの塩を含めることができる。

(a) K-RASのコドン12およびコドン13を含む核酸領域を増幅する場合は、配列番号8のフォワードプライマー、配列番号9のリバープライマー、および、配列番号5の人工合成核酸のセット

(b) K-RASのコドン61を含む核酸領域を増幅する場合は、配列番号10のフォワードプライマー、配列番号11のリバープライマー、配列番号6の人工合成核酸のセット

(c) K-RASのコドン146を含む核酸領域を増幅する場合は、配列番号12のフォワードプライマー、配列番号13のリバープライマー、および、配列番号7の人工合成核酸のセット。

[0098] また、本発明の一実施形態では、上記配列番号5、6および7と同じ配列を有するBNAまたはLNAなどの架橋化核酸をPCRの増幅反応においてPNAの代わりに用いることによって、PNAと同様の効果を得ることができる。

[0099] 例えば、PCR反応の一実施形態において、PCR反応溶液の組成物の各々の標準的な濃度は、これに限られるものでないが以下の範囲で調製することができる。鋳型となるccfDNAの濃度は1~10000コピー数/ μ Lの範囲で調製することができる。フォワードプライマーおよびリバープライマーの濃度を0.1~10 μ M、好ましくは0.2~2 μ Mの範囲で調製することができる。MOPS緩衝溶液の濃度およびpHを1~50mMおよびpH6.5~7.9の範囲で調製することができる。Taq DNAポリメラーゼの濃度を0.02~0.5U/ μ Lの範囲で調製することができる。MgCl₂の濃度を1.5~8.5mMの範囲で調製することができる。NaClの濃度を10~20mMの範囲で調製することができる。

[0100] 本発明に係るがん関連遺伝子の遺伝子変異を含む核酸領域の増幅を促進する方法において、特に核酸増幅反応で使用されるdNTPの濃度が重要である。dNTPの濃度は、好ましくは終濃度2.5 μ M~50 μ Mであり、より好ましくは2.5 μ M~5 μ Mであり、さらに好ましくは2.5 μ Mの範囲である。

[0101] また、本発明に係るがん関連遺伝子の遺伝子変異を含む核酸領域の増幅を促進する方法において、PNAによる擬陽性を低減できる濃度は、好ましくは終濃度0.1～10 μ Mであり、より好ましくは0.1～2 μ Mである。

[0102] 本発明に係るがん関連遺伝子の遺伝子変異を含む核酸領域の増幅を促進する方法で用いられるDNAポリメラーゼは、校正機能をもたないDNAポリメラーゼであることが好ましい。そのようなDNAポリメラーゼとしては、製造品質の安定性が保たれていること、ライセンスフリーで 사용할 ことを鑑みてTaq DNA Polymeraseが好ましいが、これに限定されるものではない。また、Taq DNA Polymeraseと同等の機能を有するいかなるDNAポリメラーゼも本発明で使用する ことができる。

[0103] (5) 第二の発明（キットの発明）について

本発明は、血液サンプル中のK-RAS遺伝子由来核酸の検出、および／または、検出されたK-RAS遺伝子由来核酸の遺伝子型の決定に用いられる試薬等を含むキットを包含する。このキットを用いることで、本発明に係るがん関連遺伝子の遺伝子変異を含む核酸領域の増幅を促進する方法をより簡便に行うことができる。

[0104] このようなキットを構成する試薬には、がん遺伝子の変異配列をPCR増幅するために用いるプライマーセットと、野生型遺伝子をクランピングするペプチド核酸または架橋化核酸と、dNTPと、DNAポリメラーゼ（好ましくはTaq DNAポリメラーゼ）を含み、さらにリガーゼなどの酵素、緩衝溶液（例えば、MOPS緩衝液）、塩、トレハロースを含んでいても良い。

[0105] 本発明に係るキットを構成するプライマーおよびPNA等の人工核酸の配列は、K-RASの変異配列を増幅できるものであれば特に限定されない。プライマー、RNA等は、適宜設計することができる。好ましくは、これに限られるものではないが、以下の(a)～(c)のセットを用いることができる。

[0106] (a) K-RASのコドン12およびコドン13を含む核酸領域を増幅する場合は、配列番号8のフォワードプライマー、配列番号9のリバープライマー、および、配列番号5の人工合成核酸のセット

(b) K-RASのコドン61を含む核酸領域を増幅する場合は、配列番号10のフォワードプライマー、配列番号11のリバープライマー、配列番号6の人工合成核酸のセット

(c) K-RASのコドン146を含む核酸領域を増幅する場合は、配列番号12のフォワードプライマー、配列番号13のリバープライマー、および、配列番号7の人工合成核酸のセット。

[0107] キットに含まれる更なる試薬としては、血液サンプルから核酸を抽出するための試薬、K-RASの特定の遺伝子型に特異的にハイブリダイズ可能なプローブ、または、プライマー（K-RAS遺伝子の突然変異の部位またはその隣接部位に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド）等が挙げられる。

[0108] また、当該キットには、特定の指示が記載された書面等が含まれていてもよい。その書面には、血液サンプル中のK-RAS遺伝子由来核酸の検出、その遺伝子型の決定方法についてのプロトコル、および／または、得られたK-RASの遺伝子型のステータスの結果からのEGFR阻害剤に対する感受性の判定するための基準についての指示が記載された書面等が含まれていてもよい。

[0109] これらのキットの使用形態のひとつには、例えば、キットに含まれる試薬を搭載した96ウェルプレートにサンプルを1～50 μ L添加し、汎用されているリアルタイムPCRで増幅反応を行うことができるものが含まれる。他の使用形態としては、検出にTaqManプローブを用いるものがある。具体的には、キットに含まれる96ウェルプレートに、TaqManプローブと試薬を添加して増幅産物の検出を行うこともできる。

[0110] 本キットを用いて増幅した増幅産物については、次世代シーケンサー、インベーター法など、汎用される遺伝子変異を検出する方法を用いて、その

遺伝子変異を検出する。

[0111] (6) 第三の発明（検出方法の発明）について

本出願に係る発明は、血液サンプル中のK-RASなどの遺伝子型を決定する場合は、核酸レベル（ゲノムDNAまたはmRNA）で検出するのが好ましい。

[0112] 第三の発明は、上記第一の発明で説明した工程、すなわち、

(a) 患者から採取したサンプルからDNAを抽出する工程と、

(b) 前記遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する工程と、

を含み、

(a) 工程における遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する反応は、

(i) 校正機能のないDNAポリメラーゼと、

(i i) 前記遺伝子変異を含む核酸領域に対応する前記サンプル中の野生型遺伝子の領域に強力に結合する人工合成核酸と、および

(i i i) $2.5 \mu\text{M} \sim 10 \mu\text{M}$ の濃度のdNTPと、を含むことと、

上記工程により増幅した前記核酸領域の核酸の変異を検出する工程と、を含むことを特徴とする発明である。

[0113] 第三の発明において、増幅する工程は、上記第一の発明の通りである。この第三の発明では、上記増幅の工程で、第二の発明のK-RAS遺伝子変異検出キットを用いることができる。

[0114] 血液サンプル中のK-RASなどの遺伝子由来核酸の検出、検出されたK-RAS遺伝子由来核酸の遺伝子型の決定、または、変異型のコピー数の同定は、常法により行うのが好ましい。

具体的には、当該血液サンプル中のccfDNAからK-RASの特定の領域について、本発明の上述の第二の発明に係るキットを使用して、第一の発明により増幅した増幅産物中のK-RAS遺伝子の存在の有無および野生型か変異型かの決定を、核酸配列を決定できる検出方法により決定するのが好ましい。

[0115] 例えば、血液サンプル中のK-RASの存在またはその変異型のコピー数

の同定は、血液サンプル中に含まれている c c f D N A の K - R A S 遺伝子由来核酸を、デジタル P C R を用いて検出することによって同定するのが好ましい。特にバイオラッド社のドロップレットデジタル P C R (d d P C R) の技術 (非特許文献 4 : H i n d s o n , et.al., A n a l y t i c a l C h e m i s t r y , 2011, vol.83 (22) , pp. 8604-8610) を利用することにより、高感度に検出することができる。

[0116] 検出にはバイオラッド社のデジタル P C R 用のキット「P r i m e r P C R d d P C R M u t a t i o n D e t e c t i o n A s s a y」を用いるのが好ましい。デジタル P C R の条件 (温度サイクル、サイクルの回数等) は、当業者であれば P C R 増幅産物が得られるように、予備実験等により適切に選択および設定をすることができる。

[0117] ドロップレットの数が多ければ多いほど、解析精度が高くなる。0. 0 1 % の突然変異を検出する性能を担保するためには、一つの突然変異を検出するために 1 0 , 0 0 0 ドロップレットが必要である。そのために、P C R のマスターミックス中の界面活性剤濃度を規定することが好ましい。

[0118] 例えば、D N A 伸長酵素などの保存液として用いられるエチレングリコールまたはグリセロールは、終濃度で 0. 1 5 % 以下に、または T r i t o n - X は、終濃度 0. 0 0 0 3 % 以下であることが好ましい。上記界面活性剤が、前記終濃度以上になるとドロップレットによるエマルジョン数が激減し、高感度に突然変異を検出することが困難になる。

[0119] また、血液サンプルから得られた核酸および核酸断片を用いて、P C R で、増幅反応を 1 5 ~ 5 0 サイクル行い、当該核酸中の検出すべき変異型 K - R A S のアリルコピー数 (a l l e l e c o p y n u m b e r) の絶対量を増幅させた後、 10^6 コピー数程度に希釈してから、公知の突然変異検出方法を行うこともできる。当該方法によれば、反応系に存在する変異型の全体数を増加させるため、突然変異の種類が増えても、変異型のアリルが物理的に存在せずに検出不能となる可能性を下げることができる。さらに、当該方法を、前記のデジタル P C R と組み合わせてもよい。

- [0120] その他の方法としては、例えば、血液サンプル中の核酸を鋳型としたPCR等により、K-RAS遺伝子中の変異部位をコードする領域を含む断片を増幅した後、この増幅産物に対して、K-RASの特定の遺伝子型に特異的にハイブリダイズ可能なプローブを接触させて会合体が形成されたか否かを高感度に検出する方法が挙げられる。ハイブリダイゼーションを行う前に、前記増幅産物の希釈物に対してエマルジョンPCRを行うことも好ましい。
- [0121] 前記プローブは、例えば放射性同位元素 (^3H 、 ^{32}P 、 ^{33}P 等)、蛍光剤（ローダミン、フルオレセン等）または発色剤で検出可能に標識される。また、当該プローブは、アンチセンスオリゴマー、例えばPNA、モルホリノーホスホロアミデート類、LNAであってもよい。なお、当該プローブの塩基長さは、約8ヌクレオチドから約100ヌクレオチド、または約10から約75、あるいは約15から約50、または約20から約30でありうる。
- [0122] 血液サンプル中のK-RASの存在およびその遺伝子型は、インベーター（登録商標）法（Michael Olivier, Mutation Research 573:103-110, 2005）を使用して分析することもできる。
- [0123] インベーター法とは、PCRなどによって調製された二本鎖DNA、あるいはmRNAに対して、部分的に三重塩基を形成するように、アレルプローブとインベーターオリゴがハイブリダイゼーションを行う。
- [0124] ここで、アレルプローブの5'末端の一部は、前記二本鎖DNAまたはmRNAと非相補的な配列（フラップ部）を有するように設計されているが、インベーターオリゴは完全にそれらに対して相補的な配列を有している。2種のアレルプローブは、それぞれ野生型、変異型に対して相補的になるように設計されている。上記二本鎖DNAまたはmRNAに対し競合的にハイブリダイゼーションを行い、完全な相補でハイブリダイゼーションした際に、フラップエンドヌクレアーゼが一部三重塩基になっている部分を認識する。そして、アレルプローブのフラップ部が、同反応系に存在する自己相補型FRETカセットにハイブリダイゼーションする。この時に、前記の一部三重

塩基になる部分ができ、目的の突然変異をフラップエンドヌクレアーゼが切断し、FRETカセット内の蛍光修飾されたDNA断片が遊離して、FRET内の消光物質と乖離するために蛍光を発する。理論上、一度切断されたアレルプローブのフラップ部は、別のFRETカセットに再度ハイブリダイゼーションすることができ、それによりシグナルが増幅され、非常に高感度に突然変異を検出できる。

[0125] 当該分野で汎用されているリガーゼ連鎖反応を、K-RAS遺伝子中の変異部位をコードする領域を含む断片を増幅させるために使用することができる（例えば、非特許文献5：Wu, et.al., Genomics, 1989, vol.4, pp.560-569を参照。）。また、変異特異的PCRとして知られている技術を使用することもできる（例えば、非特許文献6：Ruano and Kidd, Nucleic Acids Research, 1989, vol.17, pp.8392を参照。）。当該技術によれば、特定のK-RAS突然変異にその3'末端でハイブリダイズするプライマーが使用される。特定のK-RAS突然変異が存在していない場合は、増幅産物は観察されない。また、Amplification Refractory Mutation System (ARMS)（例えば、特許文献3：欧州特許出願公開第0332435号明細書、および、非特許文献7：Newton et.al., Nucleic Acids Research, 1989, vol.17, pp.7参照。）も使用することができる。

[0126] 血液サンプル中のK-RAS遺伝子由来核酸の検出または、検出されたK-RAS遺伝子由来核酸の遺伝子型の決定には、上述のデジタルPCRおよびインベーター法以外の検出手段である次世代シーケンサーまたはキャピラリーシーケンサーなども利用することができる。これらの手段を用いて、遺伝子の欠失、挿入、変換などの遺伝子変異を検出することができる。

[0127] その他の方法としては、具体的には、例えば、サンガー法を基礎とするシーケンス解析法を利用し、血液サンプル中のK-RAS遺伝子のゲノムDNA若しくはmRNA、またはこれらの増幅産物等の塩基配列を直接決定する方法が挙げられる。また、塩基配列の決定は、PCRを介して行うことも

できる。その他、遺伝子または周りのマーカー遺伝子に対する制限断片長多型（RFLP）プローブを、多型断片におけるアレルの改変または挿入をスコア付けするために使用することができる。一本鎖DNA高次構造多型（SSCP）解析もまた、アレルの塩基変化変異体を検出するために使用することができる（非特許文献8：Orita et.al., Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1989, vol.86, pp.2766-2770、および、非特許文献9：Genomics, 1989, vol.5, pp.874-879）。

[0128] （7）第四の発明（ミスリーディングをなくすかまたは減少させる発明）について

第四の発明は、上述したように、工程（a）と工程（b）を含み、ミスリーディングをなくすかまたは減少させる方法である。これらの発明は第一の発明と同じ条件を適用することができる。

[0129] 第四の発明により、増幅工程中のミスリーディングをなくすかまたは減少させることができる。

[0130] 第四の発明は、Taq DNAポリメラーゼのような校正機能をもたないDNAポリメラーゼを用いたとしても、増幅工程中のDNAポリメラーゼの性能に基づくミスリーディングをなくすかまたは減少させることができる。また、本発明では、第二の発明のキットを増幅工程において用いることができる。

[0131] （8）本願発明が適用可能な病態とがん関連遺伝子について

本発明に係るがん関連遺伝子の遺伝子変異を含む核酸領域の増幅を促進する方法において、抗がん剤に対する感受性、もしくは、耐性の獲得が予測されるがん種、あるいは再発が予測されるがん種は、EGFR仲介性腫瘍（癌）、すなわち、腫瘍形成にEGFRがある役割を担っている腫瘍であれば特に限定されるものではない。

[0132] 当該腫瘍には、脳、肝臓、腎臓、膀胱、乳房、胃、卵巣、結腸直腸、前立腺、膵臓、肺、外陰部、甲状腺、食道、肝臓の癌、肉腫、膠芽細胞腫、頭頸部、白血病およびリンパ性悪性疾患が含まれる。より詳細には、神経芽細胞

腫、腸癌（例えば、直腸癌、大腸癌、家族性大腸ポリポーシス癌および遺伝性非ポリポーシス大腸癌）、食道癌、口唇癌、喉頭癌、下咽頭癌、舌癌、唾液腺癌、胃癌、腺癌、甲状腺髄様癌、甲状腺動脈乳頭癌、腎臓癌、腎実質癌、卵巣癌、頸癌、子宮体癌、子宮内膜癌、絨毛癌、脾臓癌、前立腺癌、精巣癌、乳癌、尿管癌、メラノーマ、脳腫瘍（例えば、膠芽細胞腫、星状細胞腫、髄膜腫、髄芽細胞腫および末梢神経外胚葉性腫瘍）、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、急性リンパ性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性骨髄性白血病骨（AML）、慢性髄性白血病（CML）、成人T細胞白血病、肝細胞癌、胆嚢癌、気管支癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、多発性骨髄腫、基底細胞腫、奇形腫、網膜芽細胞腫、脈絡膜メラノーマ、精上皮腫、横紋筋肉腫、頭蓋咽頭腫（*cranio phary ng i o m a*）、骨肉腫、軟骨肉腫、筋肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫、ユーイング肉腫および形質細胞腫が含まれ得る。本発明に係る方法において対象となる腫瘍としては、大腸癌、結腸癌、直腸癌、肺癌、肝癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、腎癌、食道癌、頭頸部癌、子宮癌、および子宮頸癌からなる群より選択される1種または2種以上であることが好ましいが、これに限られるものではない。

[0133] 本発明の方法を適用できる「がん遺伝子」、または「がん関連遺伝」の具体例としては、ALK、EGFR、H-RAS、N-RAS、K-RAS、A-RAF、B-RAF（BRAF）、C-RAF、MEK、ERK、PIK3CA、PTEN、AKT、TP53（p53）、CTNNB1（ベータ-カテニン）、APC、KIT、JAK2、NOTCH、FLT3、RSK、ETS、ELK-1、SAP-1、MAPK経路に関連するがん関連遺伝子などが挙げられるが、これに限られるものではない。

[0134] 本発明に係るがん関連遺伝子の遺伝子変異を含む核酸領域の増幅を促進する方法において、抗がん剤に対する感受性、もしくは耐性の獲得が予測されるがん種、あるいは、再発が予測されるがん種は、原発巣（原発性腫瘍）であってもよく、転移巣（転移性腫瘍）であってもよい。また、再発性腫瘍で

あってもよい。さらに、腫瘍が、被験者の体内の複数個所に存在していてもよい。

[0135] 本発明に係るがん関連遺伝子の遺伝子変異を含む核酸領域の増幅を促進する方法は、抗がん剤の投与処置の適用の有無を判断する際、および／または早期再発診断に重要な情報を提供し得る。つまり、本発明に係る当該方法は、臨床医に有用な情報を提供でき、当該方法より得られた情報に基づき、臨床医らは適切な治療方法を決定することができる簡便な高感度検出方法を提供にする。

[0136] 本発明において使用される人工合成核酸の配列、フォワードプライマー、およびリバースプライマーは以下の通りである。配列番号は、本出願当初明細書に添付の配列表に対応する。

[0137] (人工合成核酸の配列)

前記K-RASの遺伝子変異を含む領域に対応する野生型K-RAS遺伝子の領域に結合するPNAの配列は、

(a) K-RASのコドン12およびコドン13を含む核酸領域に結合させる場合は、

5 'AGCTGGTGGCGTA-3' (配列番号: 5)

(b) K-RASのコドン61を含む核酸領域に結合させる場合は、

5 'CAGGTCAAGAGGA-3' (配列番号: 6)

(c) K-RASのコドン146を含む核酸領域に結合させる場合は、

5 'GAAACATCAGCAAAGACAAG-3' (配列番号: 7)

であることを特徴とする請求項6に記載の方法。

(フォワードプライマーおよびリバースプライマーの配列)

K-RASの遺伝子変異を増幅するプライマーの配列は、

(a) K-RASのコドン12およびコドン13を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー: 5 'AGTCACATTTTTCATTATTT

TTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGA-3' (配列番号 : 8)

リバースプライマー : 5 ' -TCGTCCACAAAATGATTCTG
AATTAGCTGTATCG-3' (配列番号 : 9)

(b) K-RASのコドン61を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー : 5 ' -AGCAAGTAGTAATTGATGG
AGAAACCTGTCTCT-3' (配列番号 : 10)

リバースプライマー : 5 ' -CCAGTCCTCATGTACTGGTC
CCTC-3' (配列番号 : 11)

(c) K-RASのコドン146を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー : 5 ' -AGTAGACACAAAACAGGC
TCAGGACTTA-3' (配列番号 : 12)

リバースプライマー : 5 ' -AAATGACATAACAGTTATGA
TTTTGCAGAAAACAGATCTGTA-3' (配列番号 : 13)

[0138] [実施例]

以下、実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0139] [実施例1]

K-RAS (G13D変異型) の反応系において、dNTPの終濃度を50 μ M、10 μ M、5 μ M、および2.5 μ Mに振り、ペプチド核酸 (PNA) の添加が有る場合と無い場合の合計8つの条件にてPCRを表2に示す試薬組成にて実施した。鋳型には、合成した人工遺伝子プラスミドを使用し、野生型が100% (100%Wt) のものと、G13D変異型が0.2% (0.2%G13D (0.2%Mt)、99.8%Wt) のものと、2種類で実施した。鋳型の終濃度は、ゲノムDNA 1000コピー/ μ L相当に値する5 fg/ μ Lとした。人工遺伝子プラスミドについては、ピコグリーンで濃度測定を行ったものを用いた。標的のインサート配列は、300 bpとし

、ベクター長は3.9 kbのものを用了。表2に記載の「プライマー1」および「プライマー2」は、それぞれ「配列番号8」および「配列番号9」のプライマーである。また、「ペプチド核酸」は「配列番号5」のペプチド核酸である。

[0140] PCR反応は96wellプレート上でライトサイクラー（Roche社製）を用いて実施した。

遺伝子変異を有する特定の領域の塩基配列を増幅させるPCRの反応サイクルは、（i）DNAを熱変性する工程と、（ii）プライマーの鋳型DNAへのアニーリングする工程と、および（iii）耐熱性DNAポリメラーゼを用いたプライマーの伸長反応を行う工程とを含む工程を繰り返すことにより行った。

反応容量10 μ Lとし、PCR温調条件は、（i）の工程は95℃、120秒で行い、（ii）の工程は95℃、5秒で行い、（iii）の工程は66℃、20秒で行った。（ii）の工程および（iii）の工程を連続して行うことを1サイクルとして、35サイクル行った。その後、97℃、120秒での処理を行った後、冷却して反応を終了した。

[0141]

[表2]

条件	1	2	3	4	5	6	7	8
各添加試薬	終濃度	終濃度	終濃度	終濃度	終濃度	終濃度	終濃度	終濃度
プライマー 1 (μM)	1	1	1	1	1	1	1	1
プライマー 2 (μM)	1	1	1	1	1	1	1	1
dNTPmix (μM)	50	10	5	2.5	50	10	5	2.5
MOPS緩衝液 pH7.7 (mM)	10	10	10	10	10	10	10	10
Taq DNA Polymerase (U/ μL)	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
Cleavase (U/ μL)	45	45	45	45	45	45	45	45
ペプチド核酸 (μM)	0.2	0.2	0.2	0.2	0	0	0	0
MgCl ₂ (mM)	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25
NaCl (mM)	15	15	15	15	15	15	15	15
100%Wt プラスミド (fg/ μL)	5	5	5	5	5	5	5	5

条件	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'
各添加試薬	終濃度	終濃度	終濃度	終濃度	終濃度	終濃度	終濃度	終濃度
プライマー 1 (μM)	1	1	1	1	1	1	1	1
プライマー 2 (μM)	1	1	1	1	1	1	1	1
dNTPmix (μM)	50	10	5	2.5	50	10	5	2.5
MOPS緩衝液 pH7.7 (mM)	10	10	10	10	10	10	10	10
Taq DNA Polymerase (U/ μL)	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
Cleavase (U/ μL)	45	45	45	45	45	45	45	45
ペプチド核酸 (μM)	0.2	0.2	0.2	0.2	0	0	0	0
MgCl ₂ (mM)	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25
NaCl (mM)	15	15	15	15	15	15	15	15
0.2%Wt プラスミド (fg/ μL)	5	5	5	5	5	5	5	5

[0142] さらにその増幅産物 16 種類を 10⁸倍に蒸留水にて希釈し、それらを鋳型とし、デジタルPCRを実施することで、各PCR産物中の野生型および変異型のPCR産物量の定量を行なった。これにより、dNTP濃度が、KRRASの野生型のクランプ効果、および／または変異富化率にどのように影響するかを検討した。また、PNAの有無によるエラー頻度についても確認を行った。デジタルPCRは、バイオラッド社製のQX-100システムを用いた。反応組成について表3に示す。単位はマイクロリットル (μL) である。

[0143] [表3]

10 ⁸ 希釈産物16種類	2 μ L
2x ddPCR スーパーmix	10 μ L
13D probe FAM	1 μ L
Wt Probe HEX	1 μ L
DW	6 μ L
total	20 μ L

[0144] 野生型および変異型のコピー数の同定のためのデジタルPCRの反応条件は、（１）前処理工程、（２）増幅工程、および（３）後処理工程の（１）～（３）の工程からなる。

（１）の前処理工程は95℃、10分間で行う。

（２）の増幅工程は、さらに（i）94℃、30秒間でアニーリングする工程と、（ii）55℃、60秒間で増幅する工程とを含む反応サイクルであって、（i）の工程の後に（ii）の工程で処理するサイクルを1サイクルとして、40サイクル処理することで標的核酸を増幅させる。

（３）の後処理工程は、98℃、10分間で行い、その後冷却して反応を終了させる。

[0145] <結果>

（１）K-RAS野生型の産物量について（図1）

各PCR産物中の野生型の産物量は、（１）～（４）、（１'）～（４'）、（５）～（８）および（５'）～（８'）のいずれの条件においても、dNTPの濃度が低くなるにつれて減少した。また、PNA添加によるクランピング効果により、野生型の産物量が減少し、増幅が阻害されていることがわかった。阻害は、dNTPの濃度が2.5 μ Mの時に最大を示すことがわかった。

[0146] （２）K-RAS G13D 変異型の産物量について（図2）

各PCR産物中の変異型の産物量は、PNAの添加により大幅に増加した（図2、（１'）～（４'）および（５'）～（８'）を比較）。また、野生型のみが存在するサンプルにおいても変異型が検出された（図2、（１）

ー（４））。これは、ミスリーディングによりG13Dが一定の割合で増幅されていることを示している。これらは先行文献（非特許文献2：Journal of Molecular Diagnostics, 2008, Vol. 10, No. 4）とも一致する。彼らは、この論文の中で、PNAクランプ時にTaqポリメラーゼによる間違った塩基が挿入され、特にアデニンが挿入されやすいことを証明している。一方、PNAなしの実験系では、野生型からG13Dの変異型の増幅は、dNTP濃度が50 μ Mでわずかに観察されているが、dNTP濃度を減らすと野生型の増幅量が低下するとともにミスリーディングによるK-RASのG13Dの変異型の増幅も検出されなくなる（図1および図2における（５）－（８））。

[0147] 野生型の産物量も変異型の産物量もdNTPの濃度が低くなると減少するが（図1、2）、変異型を含むサンプルにPNAを添加した系である図2の（1'）－（4'）の場合のみ、dNTPの濃度が低くなるにつれ変異型の産物量の増幅効率が大幅に向上した。

[0148] この結果は、図1および図2の増幅におよぼすdNTPの濃度変化の結果をあわせてみても、予想できない驚くべき発見であるといえる。

[0149] （３）K-RAS G13D 変異型の産物中の割合について（図3）

図3は、各条件におけるPCR産物における野生型の増幅量と変異型の産物量を合計した値に対するK-RAS変異型の産物量を表したものである。

[0150] 各PCR産物中の変異型の割合は、PNAを添加した0.2%の変異型を含むサンプルでのみ、dNTPの濃度の減少に伴い大幅に増加した（図3、（1'）－（4'））。これらは、dNTPの濃度を下げたことにより野生型の量が減少したことと（図1）、変異型の量が増大したこと（図2）による相乗効果である。これにより、サンプルに含まれる0.2%の変異型を最大約40%にまで富化出来たことを示す。

[0151] （４）PNA添加有無およびdNTP濃度変化によるK-RAS G13D 変異型の富化効果について（図4）

0.2%の変異型を含むサンプルにPNA添加しPCRを行うと、サンプ

ル中の変異型のPCR産物の割合が大幅に増加することが分かる。さらに、dNTPの濃度を下げてPCRを行うと、dNTPの濃度低下に伴い、変異型の割合が劇的に増加したことが分かる。dNTP濃度が50 μ Mの時では、富化効果がPNAありのサンプルはPNA添加なしのサンプルに比べて約1.4倍であったものが、dNTP濃度が2.5 μ Mでは、富化効果がPNAありのサンプルはPNA添加なしのサンプルに比べて約20.3倍まで向上した。

請求の範囲

- [請求項1] がん関連遺伝子であるK-RASの遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する方法であって、
- (a) 患者から採取したサンプルからDNAを抽出する工程と、
- (b) 前記遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する工程と、
- を含み、
- 前記遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する工程における反応は、
- (i) 校正機能のないDNAポリメラーゼと、
- (ii) 前記遺伝子変異を含む核酸領域に対応する前記サンプル中の野生型遺伝子の領域に結合する人工合成核酸と、および
- (iii) dNTPと、
- を反応剤として含み、
- 前記反応における前記dNTP濃度が2.5 μ M～10 μ Mであることを特徴とする方法。
- [請求項2] 前記サンプルが血液、血漿、および血清からなる群から選択され、
- 前記サンプルから抽出されるDNAが循環遊離DNA (ccfDNA) であることを特徴とする請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記校正機能のないDNAポリメラーゼがTaq DNAポリメラーゼであることを特徴とする請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する工程における増幅反応がPCRであることを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 前記人工合成核酸がペプチド核酸 (PNA) であることを特徴とする請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 前記K-RASの遺伝子変異を検出する領域が、コドン12およびコドン13、コドン61またはコドン146であることを特徴とする請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 前記K-RASの遺伝子変異を含む領域に対応する野生型K-RAS

S 遺伝子の領域に結合する PNA の配列は、

(a) K-RAS のコドン 12 およびコドン 13 を含む核酸領域に結合させる場合は、

5 ‘-AGCTGGTGGCGTA-3’ (配列番号：5)

(b) K-RAS のコドン 61 を含む核酸領域に結合させる場合は、

5 ‘-CAGGTCAAGAGGA-3’ (配列番号：6)

(c) K-RAS のコドン 146 を含む核酸領域に結合させる場合は、

5 ‘-GAAACATCAGCAAAGACAAG-3’ (配列番号：7)

であることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

[請求項 8]

K-RAS の遺伝子変異を増幅するプライマーの配列は、

(a) K-RAS のコドン 12 およびコドン 13 を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー：5 ‘-AGTCACATTTTTCATTA
TTTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGA-3’

(配列番号：8)

リバースプライマー：5 ‘-TCGTCCACAAAATGATT
CTGAATTAGCTGTATCG-3’ (配列番号：9)

(b) K-RAS のコドン 61 を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー：5 ‘-AGCAAGTAGTAATTGA
TGGAGAAACCTGTCTCT-3’ (配列番号：10)

リバースプライマー：5 ‘-CCAGTCCTCATGTACTG
GTCCCTC-3’ (配列番号：11)

(c) K-RAS のコドン 146 を含む核酸領域を増幅する場合は、

、

フォワードプライマー： 5 ‘-AGTAGACACAAAACA

GGCTCAGGACTTA-3' (配列番号：12)

リバースプライマー：5'-AAATGACATAACAGTTA
TGATTTTGCAGAAAACAGATCTGTA-3' (配
列番号：13)

であることを特徴とする請求項6または7に記載の方法。

[請求項9]

プライマーと、

PNAと、

dNTPと、

DNAポリメラーゼと、

を含む請求項6に記載の方法に供するK-RAS遺伝子変異検出キ
ットであって、

前記dNTPは、使用時の終濃度が2.5 μ M~10 μ Mに調製で
きるものであることを特徴とするキット。

[請求項10]

前記プライマーおよび前記PNAが以下の配列が、

(a) K-RASのコドン12およびコドン13を含む核酸領域を
増幅する場合は、

フォワードプライマー：5'-AGTCACATTTTCATTA
TTTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGA-3'
(配列番号：8)

リバースプライマー：5'-TCGTCCACAAAATGATT
CTGAATTAGCTGTATCG-3' (配列番号：9)

PNA：5'-AGCTGGTGGCGTA-3' (配列番号：
5)

(b) K-RASのコドン61を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー：5'-AGCAAGTAGTAATTGA
TGGAGAAACCTGTCTCT-3' (配列番号：10)

リバースプライマー：5'-CCAGTCCTCATGTACTG
GTCCCTC-3' (配列番号：11)

PNA : 5 ‘-CAGGTCAAGAGGA-3’ (配列番号 : 6)

(c) K-RASのコドン146を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー : 5 ‘-AGTAGACACAAAACAGGCTCAGGACTTA-3’ (配列番号 : 12)

リバースプライマー : 5 ‘-AAATGACATAACAGTTATGATTTTGCAGAAAACAGATCTGTA-3’ (配列番号 : 13)

PNA : 5 ‘-GAAACATCAGCAAAGACAAG-3’ (配列番号 : 7)

であることを特徴とする請求項9に記載のキット。

[請求項11] 前記DNAポリメラーゼが、Taq DNAポリメラーゼであることを特徴とする請求項9または10に記載のキット。

[請求項12] がん関連遺伝子の遺伝子変異を含む核酸領域の核酸変異の検出方法であって、

請求項1から8に記載のいずれか一項の方法に記載の工程と、

請求項1から8に記載のいずれか一項の方法により増幅した前記核酸領域の核酸の変異を検出する工程と、
を含むことを特徴とする方法。

[請求項13] デジタルPCRを用いることを特徴とする請求項12に記載の方法。

[請求項14] がん関連遺伝子であるK-RASの遺伝子変異を含む核酸領域の増幅工程中に生じるミスリーディングをなくすまたは減少させる方法であって、

(a) 患者から採取したサンプルからDNAを抽出する工程と、

(b) 前記遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する工程と、

を含み、

前記遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する工程における反応は、

(i) 校正機能のないDNAポリメラーゼと、

(ii) 前記遺伝子変異を含む核酸領域に対応する前記サンプル中の野生型遺伝子の領域に結合する人工合成核酸と、および

(iii) dNTPと、

を反応剤として含み、

前記反応における前記dNTP濃度が $2.5\mu\text{M}$ ～ $10\mu\text{M}$ であることを特徴とする方法。

[請求項15] 前記サンプルが血液、血漿、および血清からなる群から選択され、前記サンプルから抽出されるDNAが循環遊離DNA(ccfDNA)であることを特徴とする請求項14に記載の方法。

[請求項16] 前記遺伝子変異を含む核酸領域を増幅する工程における増幅反応がPCRであることを特徴とする請求項14または15に記載の方法。

[請求項17] 前記校正機能のないDNAポリメラーゼがTaq DNAポリメラーゼであることを特徴とする請求項14～16に記載の方法。

[請求項18] 前記人工合成核酸がペプチド核酸(PNA)であることを特徴とする請求項14～17のいずれか一項に記載の方法。

[請求項19] 前記K-RASの遺伝子変異を検出する領域が、コドン12およびコドン13、コドン61またはコドン146であることを特徴とする請求項14～18のいずれか一項に記載の方法。

[請求項20] 前記K-RASの遺伝子変異を含む領域に対応する野生型K-RAS遺伝子の領域に結合するPNAの配列は、

(a) K-RASのコドン12およびコドン13を含む核酸領域に結合させる場合は、

5 '—AGCTGGTGGCGTA—3' (配列番号：5)

(b) K-RASのコドン61を含む核酸領域に結合させる場合は、

5 '—CAGGTCAAGAGGA—3' (配列番号：6)

(c) K-RASのコドン146を含む核酸領域に結合させる場合は、

5 ‘-GAAACATCAGCAAAGACAAG-3’ (配列番号：7)

であることを特徴とする請求項19に記載の方法。

[請求項21]

K-RASの遺伝子変異を増幅するプライマーの配列は、

(a) K-RASのコドン12およびコドン13を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー：5 ‘-AGTCACATTTTTCATTA
TTTTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGA-3’

(配列番号：8)

リバースプライマー：5 ‘-TCGTCCACAAAATGATT
CTGAATTAGCTGTATCG-3’ (配列番号：9)

(b) K-RASのコドン61を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー：5 ‘-AGCAAGTAGTAATTGA
TGGAGAAACCTGTCTCT-3’ (配列番号：10)

リバースプライマー：5 ‘-CCAGTCCTCATGTACTG
GTCCCTC-3’ (配列番号：11)

(c) K-RASのコドン146を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー：5 ‘-AGTAGACACAAAACA
GGCTCAGGACTTA-3’ (配列番号：12)

リバースプライマー：5 ‘-AAATGACATAACAGTTA
TGATTTTGCAGAAAACAGATCTGTA-3’ (配列番号：13)

であることを特徴とする請求項19または20に記載の方法。

[請求項22]

プライマーと、

PNAと、

d N T P と、
D N A ポリメラーゼと、
を含む請求項 1 9 に記載の方法に供する高感度 K - R A S 遺伝子変異
検出キットであって、

前記 d N T P は、使用時の終濃度が 2 . 5 μ M ~ 1 0 μ M に調製で
きるものであることを特徴とするキット。

[請求項 23] 前記プライマーおよび前記 P N A が以下の配列が、

(a) K - R A S のコドン 1 2 およびコドン 1 3 を含む核酸領域を
増幅する場合は、

フォワードプライマー : 5 ' - A G T C A C A T T T T C A T T A
T T T T T A T T A T A A G G C C T G C T G A A A A T G A - 3 '

(配列番号 : 8)

リバースプライマー : 5 ' - T C G T C C A C A A A A T G A T T
C T G A A T T A G C T G T A T C G - 3 ' (配列番号 : 9)

P N A : 5 ' - A G C T G G T G G C G T A - 3 ' (配列番号 :
5)

(b) K - R A S のコドン 6 1 を含む核酸領域を増幅する場合は、

フォワードプライマー : 5 ' - A G C A A G T A G T A A T T G A
T G G A G A A C C T G T C T C T - 3 ' (配列番号 : 1 0)

リバースプライマー : 5 ' - C C A G T C C T C A T G T A C T G
G T C C C T C - 3 ' (配列番号 : 1 1)

P N A : 5 ' - C A G G T C A A G A G G A - 3 ' (配列番号 :
6)

(c) K - R A S のコドン 1 4 6 を含む核酸領域を増幅する場合は
、

フォワードプライマー : 5 ' - A G T A G A C A C A A A A C A G
G C T C A G G A C T T A - 3 ' (配列番号 : 1 2)

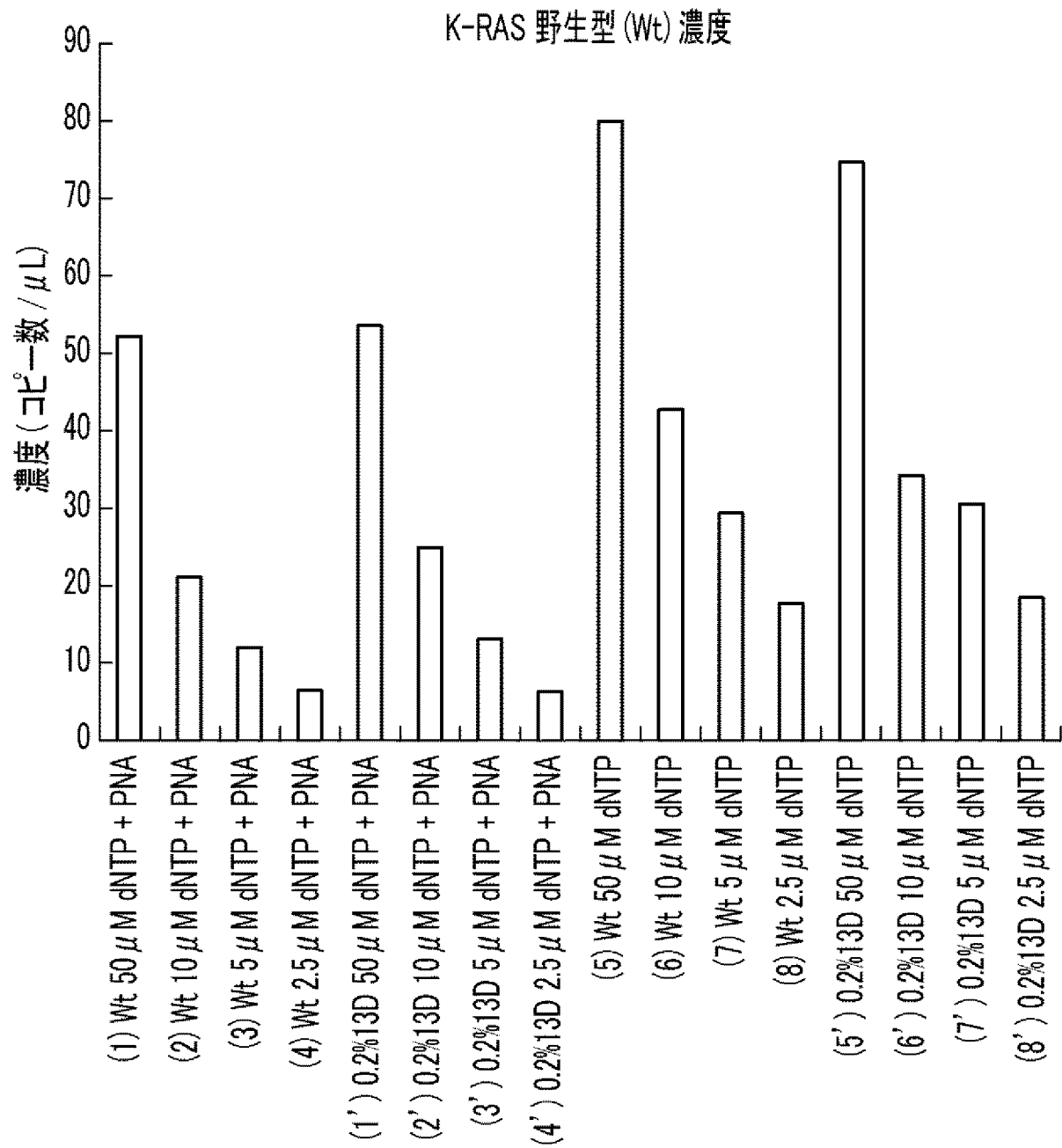
リバースプライマー：5' - AAATGACATAACAGTTA
TGATTTTGCAGAAAACAGATCTGTA - 3' (配列番号：13)

PNA：5' - GAAACATCAGCAAAGACAAG - 3'
(配列番号：7)

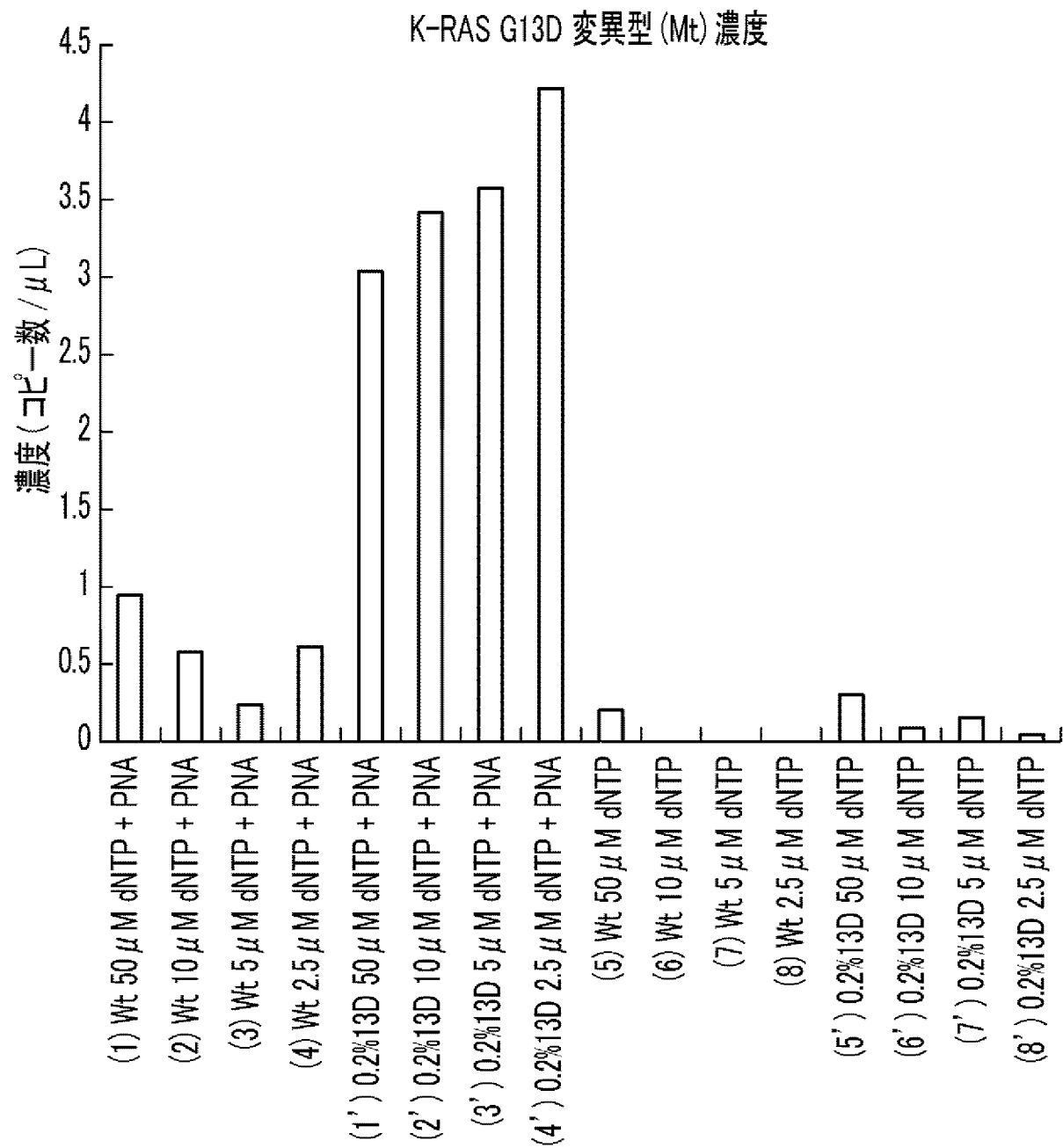
であることを特徴とする請求項22に記載のキット。

[請求項24] 前記DNAポリメラーゼが、Taq DNAポリメラーゼであることを特徴とする請求項22または23に記載のキット。

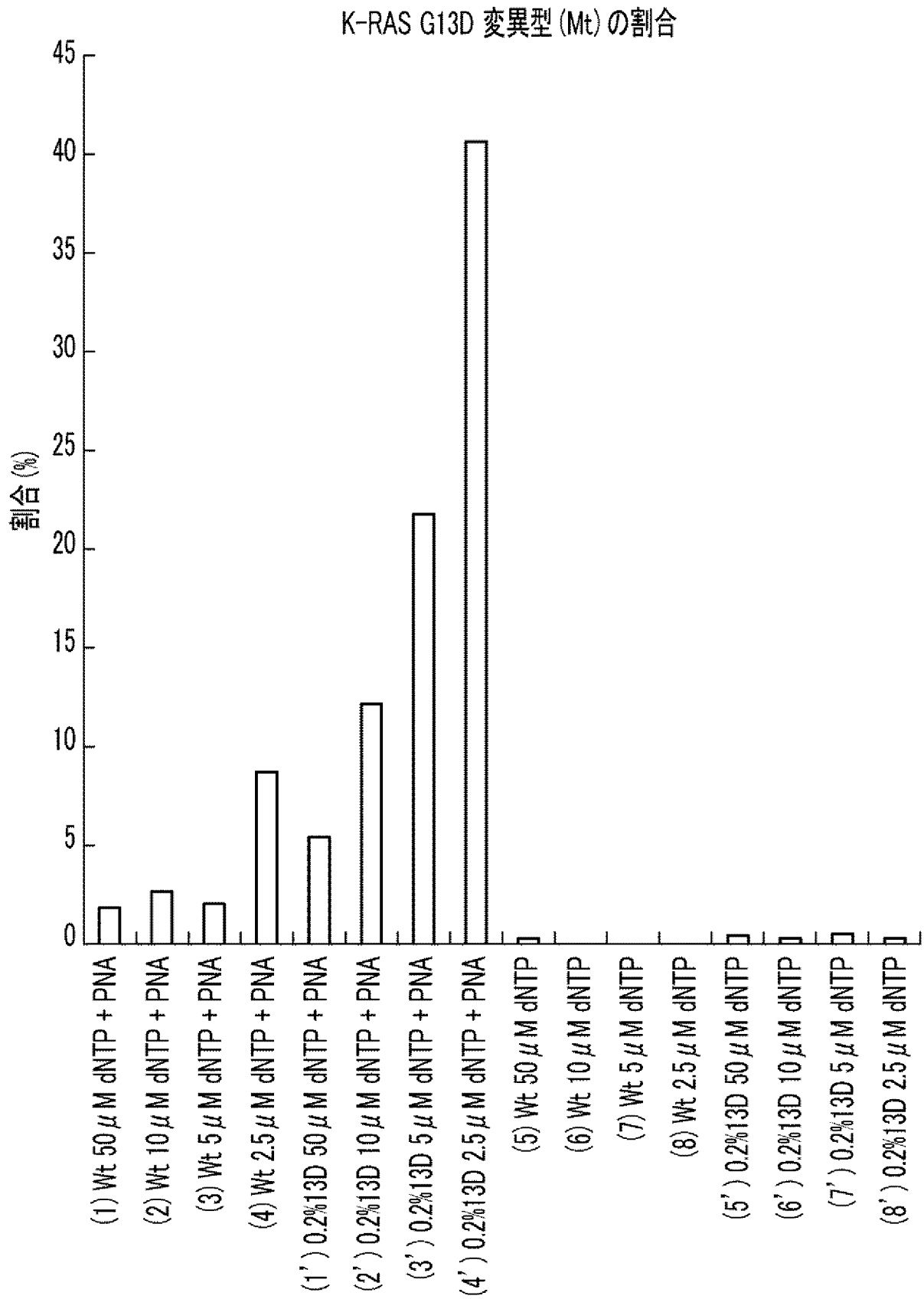
[図1]



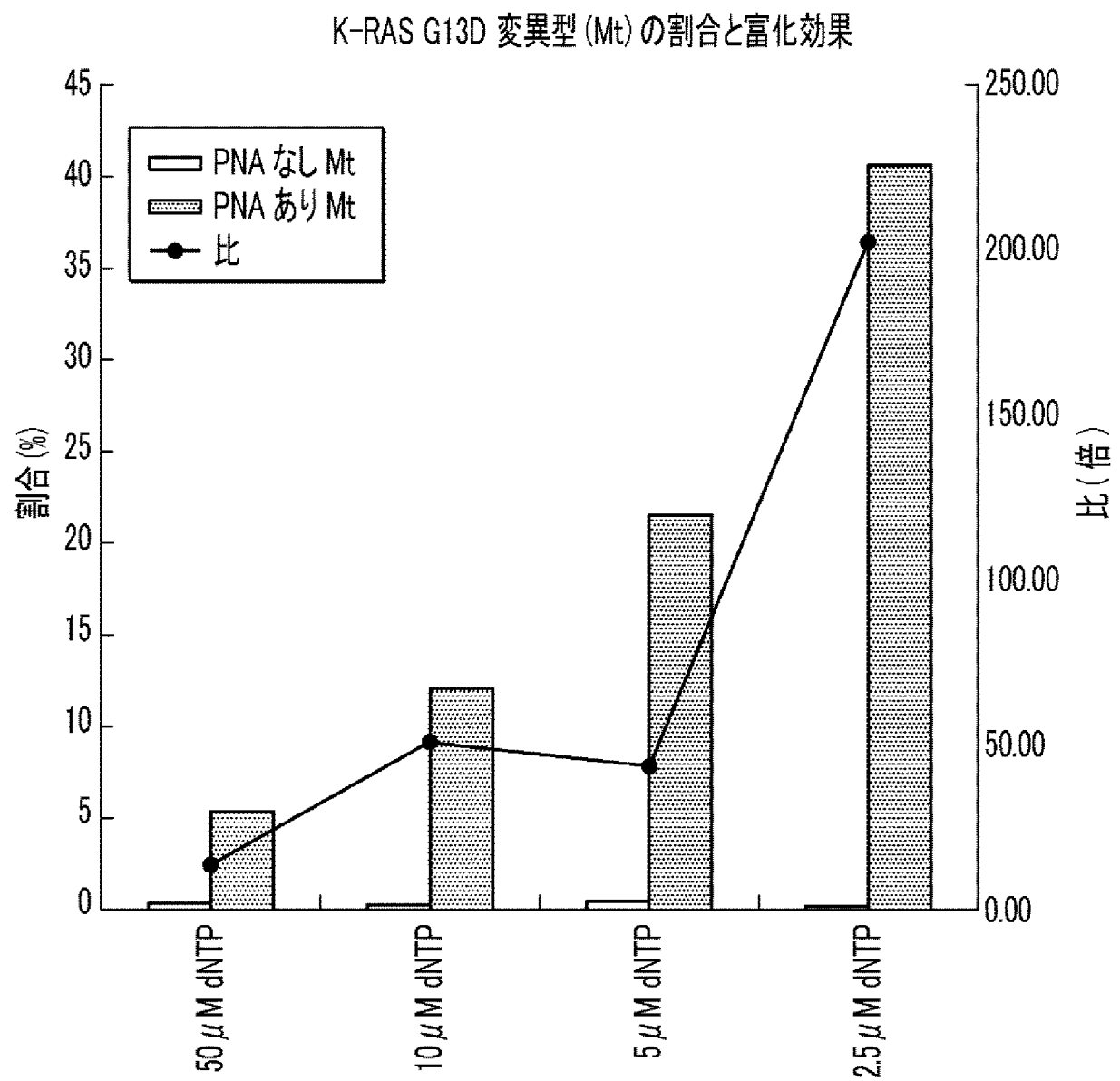
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/006467

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 11-506609 A (Trustees of Dartmouth College), 15 June 1999 (15.06.1999), claims 1, 4, 10, 17; pages 9 to 10; example 4 & US 6020124 A & WO 1996/040995 A1 example 4	1-24
Y	LORENZ T. C., Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies, Journal of Visualized Experiments, 2012, Vol.63, e3998, paragraph of 8. Manipulating PCR Reagents	1-24
Y	CN 102367478 A (Zhejiang University), 07 March 2012 (07.03.2012), paragraph [0011]; claim 1 (Family: none)	1-24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 February 2016 (18.02.16)

Date of mailing of the international search report
08 March 2016 (08.03.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/006467

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KOBUNAI T. et al., The frequency of KRAS mutation detection in human colon carcinoma is influenced by the sensitivity of assay methodology: A comparison between direct sequencing and real-time PCR, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, Vol.395, p.158-162, Table 2	6-8,10, 19-21,23
Y	WO 2014/148557 A1 (Toppan Printing Co., Ltd.), 25 September 2014 (25.09.2014), paragraph [0021]; table 1 & US 2016/0002741 A1 table 1 & CN 105074009 A	6-8,10, 19-21,23
Y	JP 2014-501533 A (Epistem Ltd.), 23 January 2014 (23.01.2014), claim 20; paragraph [0022] & US 2012/0214158 A1 & WO 2012/093262 A2 claim 20 & CN 103517992 A & KR 10-2014-0006844 A	6-8,10, 19-21,23

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 11-506609 A (トラスティーズ オブ ダートマス カレッジ) 1999.06.15, 請求項1、4、10、17、第9-10頁、実施例4等 & US 6020124 A & WO 1996/040995 A1 Example 4	1-24
Y	LORENZ T. C., Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies, Journal of Visualized Experiments, 2012, Vol. 63, e3998, 8. Manipulating PCR Reagents の項	1-24

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.02.2016

国際調査報告の発送日

08.03.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 悠美子

4N

4501

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	CN 102367478 A (浙江大学) 2012.03.07, 段落 0011、請求項 1 (ファミリーなし)	1-24
Y	KOBUNAI T. et al., The frequency of KRAS mutation detection in human colon carcinoma is influenced by the sensitivity of assay methodology: A comparison between direct sequencing and real-time PCR, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, Vol.395, p.158-162, Table 2	6-8, 10, 19-21, 23
Y	WO 2014/148557 A1 (凸版印刷株式会社) 2014.09.25, 段落 0021, 表 1 & US 2016/0002741 A1 Table 1 & CN 105074009 A	6-8, 10, 19-21, 23
Y	JP 2014-501533 A (エピスタム リミテッド) 2014.01.23, 請求項 20、段落 0022 & US 2012/0214158 A1 & WO 2012/093262 A2 claim 20 & CN 103517992 A & KR 10-2014-0006844 A	6-8, 10, 19-21, 23