(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2008-228621
(P2008-228621A)
(43)公開日　平成20年10月2日(2008.10.2)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12Q	1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	ZNAA	4B024
C12N	15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B063

審査請求 未請求　請求項の数 9　ＯＬ　（全 24 頁）

(21)出願番号　特願2007-70859(P2007-70859)
(22)出願日　平成19年3月19日(2007.3.19)

特許法第３０条第１項適用申請有り　第６８回日本血液学会　第４８回日本臨床血液学会総会　合同総会　予稿集

(71)出願人　504137912
国立大学法人　東京大学
東京都文京区本郷七丁目３番１号
(74)代理人　100089705
弁理士　社本　一夫
(74)代理人　100140109
弁理士　小野　新次郎
(74)代理人　100075270
弁理士　小林　泰
(74)代理人　100080137
弁理士　千葉　昭男
(74)代理人　100096013
弁理士　富田　博行
(74)代理人　100107386
弁理士　泉谷　玲子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】びまん性大細胞性リンパ腫をサブタイプ分けする方法

(57)【要約】
【課題】本発明は、びまん性大細胞性リンパ腫をサブタイプ分けするための新規な方法を提供することを目的とする。
【解決手段】
本発明の方法は、
びまん性大細胞性リンパ腫に罹患した患者由来の生体試料中のゲノムＤＮＡ若しくはｃＤＮＡ中の、Ｎｏｔｃｈ２タンパク質のＴＡＤ、ＰＥＳＴおよびそのＣ末端側をコードする核酸領域中において、１又は複数のアミノ酸配列の変異を生じさせるような、１又は複数の塩基の欠失、置換若しくは付加の塩基変異を有するタイプと、塩基変異を有しないタイプとを分類する
ことを特徴とする。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
びまん性大細胞性リンパ腫をサブタイプ分けする方法であって、
びまん性大細胞性リンパ腫に罹患した患者由来の生体試料中のゲノムＤＮＡ若しくはｃＤＮＡ中の、Ｎｏｔｃｈ２タンパク質のＴＡＤ、ＰＥＳＴおよびそのＣ末端側をコードする核酸領域中において、１又は複数のアミノ酸配列の変異を生じさせるような、１又は複数の塩基の欠失、置換若しくは付加の塩基変異を有するタイプと、塩基変異を有しないタイプとを分類する
ことを含む、前記方法。
【請求項２】
Ｎｏｔｃｈ２のＴＡＤ、ＰＥＳＴおよびそのＣ末端側をコードする核酸領域が、配列番号１の塩基６３７１－７６６９の塩基配列からなる、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
Ｎｏｔｃｈ２のＴＡＤ、ＰＥＳＴおよびそのＣ末端側をコードする核酸領域のうち、配列番号１の塩基７１２０、７４５４及び／又は７６１４に相当する塩基を含む領域において、１又は複数の塩基の欠失、置換若しくは付加の塩基変異を有するタイプと、塩基変異を有しないタイプとを分類する、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
Ｎｏｔｃｈ２のＴＡＤ、ＰＥＳＴおよびそのＣ末端側をコードする核酸領域のうち、配列番号１の塩基７１２０、７４５４及び／又は７６１４に相当する塩基が、欠失又は置換されている塩基変異を有するタイプと、塩基変異を有しないタイプとを分類する、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
Ｎｏｔｃｈ２タンパク質のＴＡＤ、ＰＥＳＴおよびそのＣ末端側をコードする核酸領域中の塩基変異によって、Ｎｏｔｃｈ２タンパク質の生物活性が亢進している、請求項１ないし４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法、ｄＨＰＬＣ法、ＰＣＲ－ＡＰＬＰ法、ＰＣＲ－ＲＦＬＰ法、ＤＮＡアレイからなるグループから選択される手法を用いて塩基変異を検出する、請求項１ないし５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
配列番号３と４の塩基配列からなるプライマー対、配列番号７と８の塩基配列からなるプライマー対、配列番号９と１０の塩基配列からなるプライマー対、並びに配列番号７と１０の塩基配列からなるプライマー対、から成るグループから選択されるプライマー対を用いたＰＣＲ工程を含む手法を用いて塩基変異を検出する、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
配列番号１の塩基７１２０、７４５４及び／又は７６１４に相当する塩基を含む４０－２０００塩基の長さの核酸領域をＰＣＲ反応により増幅するためのプライマー対を含む、びまん性大細胞性リンパ腫をサブタイプ分けする方法に使用するためのキット。
【請求項９】
配列番号３と４の塩基配列からなるプライマー対、配列番号７と８の塩基配列からなるプライマー対、配列番号９と１０の塩基配列からなるプライマー対、並びに配列番号７と１０の塩基配列からなるプライマー対から成るグループから選択されるプライマー対を含む、請求項８記載のキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、びまん性大細胞性リンパ腫をサブタイプ分けする方法及び当該方法に使用するためのキットに関する。
【背景技術】

【０００２】
びまん性大細胞リンパ腫
血液中の白血球は骨髄球系の細胞とリンパ球系の細胞に大まかに分類される。リンパ球系の細胞は成熟すると血管、リンパ管を通ってリンパ節に移動する。悪性リンパ腫はリンパ球の悪性腫瘍（すなわちリンパ球がクローン性に異常増殖する疾患）であり、リンパ節あるいはそのほかの様々なところに塊（しこり）を作る。
【０００３】
悪性リンパ腫はホジキン病と非ホジキンリンパ腫に大別される。さらに、非ホジキンリンパ腫は進行の早い（ａｇｇｒｅｓｓｉｖｅ）タイプと進行の遅い（ｉｎｄｏｌｅｎｔ）タイプに二分される。これらは、腫れたリンパ節（あるいはリンパ節以外の病変部位）を手術でとって（生検）、染色ないし免疫染色を行い顕微鏡で観察する、病理組織診断によって決定される。
【０００４】
「びまん性大細胞性リンパ腫」（ｄｉｆｆｕｓｅ　ｌａｒｇｅ　Ｂ－ｃｅｌｌ　ｌｙｍｐｈｏｍａ、ＤＬＢＣＬ）とは、非ホジキン性の悪性リンパ腫に属し、末梢性Ｂ細胞性腫瘍の一種である。大型異型細胞のびまん性浸潤が認められるＢ細胞性リンパ腫瘍として大別される。具体的には病理診断で大型（正常マクロファージの核と同等ないしこれより大きく、正常のリンパ球の２倍をこえる大きさ）のＢ細胞様の腫瘍細胞がびまん性に増殖する
という場合にＤＬＢＣＬであると判断される。
【０００５】
病理組織診断は治療方針（手術、化学療法、放射線療法など）を決定する参考になるとともに、治療後の予後もあるていど予測することが可能となる。ただし、ＤＬＢＣＬは、病理組織像、臨床像、染色体転座、遺伝子異常などの点でバリエーションに富み、一つの疾患単位というより、さまざまな疾患単位あるいはサブタイプを包含していると理解されている。病理組織像からは以下のようなサブタイプへの分類が用いられることがある。ただし、しばしば病理医のあいだで診断の一致を見ず、曖昧である。
【０００６】
Ｃｅｎｔｒｏｂｌａｓｔｉｃ（胚中心芽球性）
Ｉｍｍｕｎｏｂｌａｓｔｉｃ（免疫芽球性）
Ｔ　ｃｅｌｌ／ｈｉｓｔｉｏｃｙｔｅ　ｒｉｃｈ（Ｔ細胞／組織球に富む）
Ａｎａｐｌａｓｔｉｃ（アナプラスティック）
【０００７】
染色体転座検査では、２０－３０％でＢＣＬ２遺伝子の転座すなわちｔ（１４；１８）が、３０％程度にＢＣＬ６遺伝子を含む染色体３ｑ２７の以上が見られる。最近のＤＮＡマイクロアレイを用いた網羅的発現解析では、胚中心細胞と類似の遺伝子発現パターンを示す群と培養で活性化された末梢血Ｂ細胞と類似の遺伝子発現パターンを示す群とに分けられる。
【０００８】
しかしながら、病理組織診断など既知の診断技術のみでは明確な疾患単位やサブタイプを抽出することはできず、より正確、かつ簡便に疾患単位やサブタイプを抽出ための手法の開発が求められていた。
【０００９】
Ｎｏｔｃｈ
Ｎｏｔｃｈタンパク質は、ヘテロ二量体構造の細胞表面受容体である。Ｎｏｔｃｈは、複数の器官における発生細胞運命決定づけを指示するために繰り返し使用される。血球新生及び免疫系の発生の際に、Ｎｏｔｃｈは、Ｔ細胞／Ｂ細胞系列の特定及び脾臓の辺縁帯（ｍａｒｇｉｎａｌ　ｚｏｎｅ）Ｂ細胞の形成に重要な役割を果たす。初期の胚発生においては、Ｎｏｔｃｈは造血幹細胞の形成に必須である。Ｎｏｔｃｈシグナルは、進化的に保存されてきた経路であり、発生及び組織造血形成の多様な側面を制御する。

【００１０】
哺乳類では４種類のＮｏｔｃｈ遺伝子が発見されている（Ｎｏｔｃｈ１－４）。Ｎｏｔｃｈ受容体は、単一方向の膜貫通タンパク質であり、生合成中にゴルジ輸送ネットワーク中で切断され、ヘテロ二量体複合体を形成する。ヘテロ二量体は、細胞外サブユニット（N^{EC}）と膜貫通サブユニット（N^{TM}）の２つのサブユニットからなる。細胞外サブユニットは、Ｎ末端から膜貫通ドメインに向けて、ＥＧＦ様繰り返し配列（Ｎｏｔｃｈリガンド結合活性を有する）、Ｌｉｎ／Ｎｏｔｃｈ繰り返し配列（ＬＮＲ）（リガンドに無関係なシグナル伝達を抑制すると考えられている）、ヘテロ二量体形成ドメイン（HD^{N}（ｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒｉｚａｔｉｏｎ）ドメイン）を含む。膜貫通サブユニットは、Ｎｏｔｃｈ２のシグナル複数の機能的ドメインを含んでいる。具体的には、Ｎ末端からＣ末端の向きに、ヘテロ二量体形成ドメイン（HD^{C}（ｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒｉｚａｔｉｏｎ）ドメイン）、膜貫通ドメイン（ｔｒａｎｓｍｅｍｂｒａｎｅ ｄｏｍａｉｎ）、ＲＡＭドメイン、アンキリン繰り返し配列（ＡＮＫ）、転写活性化ドメイン（ＴＡＤドメイン）、Ｃ末端のＰＥＳＴドメインを含む。ＴＡＤドメインは、Ｎｏｔｃｈ１及び２にはＴＡＤドメインが存在するが、Ｎｏｔｃｈ３及び４には存在しない。非特許文献１は、Ｎｏｔｃｈおよびその免疫系に関する総説である。なお、HD^{N}ドメインはHD^{EC}ドメイン、HD^{C}ドメインHD^{TM}ドメインと呼称されることもある。

【００１１】
Ｎｏｔｃｈ１は、胸腺細胞の発生、具体的には、多分化性始原細胞のＴ細胞運命への決定づけ、並びに、未成熟の胸腺細胞における前Ｔ細胞受容体複合体の構築の発生に必要であることが知られている（非特許文献２、３）。また、Ｔ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｔ－ｃｅｌｌ Ａｃｕｔｅ ｌｙｍｐｈｏｂｌａｓｔｉｃ ｌｅｕｋｅｍｉａ（Ｔ－ＡＬＬ））の稀なケースでは、ｔ（７；９）型の染色体相互転座を有しており、これにより、短縮型で構成的に活性なＮｏｔｃｈ１が発現している（非特許文献３）。

【００１２】
非特許文献４及び５は、原発性Ｔ－ＡＬＬの５０％以上が、Ｎｏｔｃｈ１が活性化されるようなアミノ酸変異を有していることを報告している。異常の箇所は、HD^{N}ドメイン、HD^{C}ドメイン、ＴＡＤドメイン、ＰＥＳＴドメインと比較的多岐にわたっており、特にＨＤドメインの割合が高いことが報告されている（非特許文献４）。

【００１３】
一方、Ｎｏｔｃｈ２遺伝子は、成熟Ｂ細胞に特に優先的に発現されている（非特許文献６）。Ｎｏｔｃｈ２は、成熟したＢ細胞に選択的に発現する、膜貫通型受容体タンパク質であって、Ｎｏｔｃｈリガンドに応じたシグナル伝達に関与する。Ｎｏｔｃｈ２シグナルは、Ｂ細胞の後期発生のサブセット、辺縁帯（ｍａｒｇｉｎａｌ ｚｏｎｅ）Ｂ細胞中で、必須であることが知られている（非特許文献６、７）。しかしながら、Ｂ細胞悪性化におけるＮｏｔｃｈ２の役割は全く明らかにされていない。

【００１４】
以下に示す先行技術文献は、その内容が本明細書中に援用される。

【非特許文献１】Maillard et al., Immunity, Vol.19, 781-791, 2003
【非特許文献２】Ellisen et al., Cell, Vol.66, 649-, 1991
【非特許文献３】Radtke et al., Immunity Vol.10, 547-558, 1999
【非特許文献４】Weng et al., Science, Vol.306, 269-271, 2004
【非特許文献５】Lee et al., Leukemia, Vol.19, 1841-1843, 2005
【非特許文献６】Saito et al., Immunity, Vol.18, 675-685, 2003
【非特許文献７】Witt et al., Journal of Immunology, Vol.171, 2783-2788, 2003
【非特許文献８】Maillard, et al., Annu. Rev. Immunol. Vol.23, 945-74, 2005
【非特許文献９】Y. Nannya et al., Cancer Res. Vol.65, 6071, 2005
【非特許文献１０】L. Wang et al., Blood, Vol.102, 2597, 2003

【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】

【００１５】
本発明は、びまん性大細胞性リンパ腫からサブタイプを抽出するための新規な方法及び当該方法に使用するためのキットを提供することを目的とする。
【課題を解決するための手段】
【００１６】
本発明者らは上記問題の解決のために鋭意研究に努めた結果、びまん性大細胞性リンパ腫のうち、一部のサブタイプはＮｏｔｃｈ２タンパク質のＴＡＤ、ＰＥＳＴおよびそのＣ末端側（「ＰＥＳＴ周辺領域」）をコードする核酸領域中において塩基変異を有すること、そして、当該塩基変異を有するサブタイプではＮｏｔｃｈ２タンパク質の生物活性が亢進していることを見出し、本発明を想到した。
【００１７】
びまん性大細胞性リンパ腫をサブタイプ分けする方法
本発明は、びまん性大細胞性リンパ腫をサブタイプ分けするための新規な方法を提供する。
【００１８】
本発明の方法は、
びまん性大細胞性リンパ腫に罹患した患者由来の生体試料中のゲノムＤＮＡ若しくはｃＤＮＡ中の、Ｎｏｔｃｈ２タンパク質のＴＡＤ、ＰＥＳＴおよびそのＣ末端側（ＰＥＳＴ周辺領域）をコードする核酸領域中において、１又は複数のアミノ酸配列の変異を生じさせるような、１又は複数の塩基の欠失、置換若しくは付加の塩基変異を有するタイプと、塩基変異を有しないタイプとを分類する、ことを含む
ことを特徴とする。
【００１９】
「びまん性大細胞性リンパ腫」（ｄｉｆｆｕｓｅ　ｌａｒｇｅ　Ｂ－ｃｅｌｌ　ｌｙｍｐｈｏｍａ、ＤＬＢＣＬ）とは、非ホジキン性の悪性リンパ腫に属し、末梢性Ｂ細胞性腫瘍の一種である。大型異型細胞のびまん性湿潤が認められるＢ細胞性リンパ腫瘍として大別される。具体的には病理診断で大型（正常マクロファージの核と同等ないしこれより大きく、正常のリンパ球の2倍をこえる大きさ）のＢ細胞様の腫瘍細胞がびまん性に増殖するという場合にＤＬＢＣＬであると判断される。ただし、ＤＬＢＣＬは、病理組織像、臨床像、染色体転座、遺伝子異常などの点でバリエーションに富み、一つの疾患単位というより、さまざまな疾患単位あるいはサブタイプを包含しており、より詳細には種々の異なるサブタイプの総称である。本明細書において、「びまん性大細胞性リンパ腫」とは病理組織診断でＤＬＢＣＬと大別されたものをすべて含む。
【００２０】
「生体試料」は特に限定されず、患者の生体から得られゲノムDNAを利用可能な試料、あるいはｃＤＮＡを調製可能な試料であれば特に限定されない。例えば、血液、骨髄、腫瘍摘出物、針による腫瘍吸引物等が含まれる。
【００２１】
塩基変異を検出する核酸は、患者（ヒト）のゲノムＤＮＡ、その対応するｃＤＮＡのいずれでもよい。本発明の方法で利用するＮｏｔｃｈ２タンパク質のＴＡＤおよびＰＥＳＴおよびそのＣ末端側をコードする核酸領域は、単一のエキソン（エキソン３４）中に存在する。よって、例えばｃＤＮＡを用いた方法に使用可能なＰＣＲ用のプライマーが、ゲノムＤＮＡを用いた方法でも使用可能である。検査の簡便性の観点からはゲノムＤＮＡが望ましい。ゲノムＤＮＡの場合は例えば血液等の生体試料からゲノムＤＮＡを抽出・調製する必要なく塩基変異を検出するためのＰＣＲ等の工程に供することが可能である。しかしながら、検出感度の観点からはゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡを調整して利用する方が好ましい。生体試料からのｃＤＮＡの調製方法は公知の方法を用いて行うことが可能である。
【００２２】
「Ｎｏｔｃｈ２タンパク質」は、成熟したＢ細胞に選択的に発現する、膜貫通型受容体タンパク質であって、Ｎｏｔｃｈリガンドに応じたシグナル伝達に関与する。Ｎｏｔｃｈ

２シグナルは、Ｂ細胞の後期発生のサブセット、辺縁帯（ｍａｒｇｉｎａｌ　ｚｏｎｅ）Ｂ細胞の形成に、必須であることが知られている（非特許文献６、７）。

【００２３】

ヒトＮｏｔｃｈ２タンパク質をコードするｃＤＮＡの塩基配列は、限定されるわけではないが、ＧｅｎＢａｎｋ番号　ＮＭ＿０２４４０８に開示されており、本明細書に配列番号１として記載する。限定されるわけではないが、ヒトＮｏｔｃｈ２タンパク質は、好ましくは配列番号１に記載の塩基配列１－１１４３３のうち、塩基２５７－７６３５からなる塩基配列（塩基７６３６－７６３８は終始コドン）にコードされる、配列番号２に示される２２７９のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を有する。

【００２４】

１つ以上のコドンが同一のアミノ酸をコードする場合があり、遺伝暗号の縮重と呼ばれている。このため、配列番号１の塩基２５７－７６３５とは完全には一致していないＤＮＡ配列が、配列番号２と全く同一のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードすることがあり得る。こうした変異体ＤＮＡ配列は、サイレント（ｓｉｌｅｎｔ）突然変異から生じてもよいし、または遺伝的多型であってもよい。このような、配列番号１に対してアミノ酸配列に影響を与えない塩基変異のみを有する配列は、「Ｎｏｔｃｈ２タンパク質をコードする核酸領域中において、１又は複数のアミノ酸配列の変異を生じさせるような塩基変異を有しない」配列に含まれる。

【００２５】

Ｎｏｔｃｈ２タンパク質の構造は、例えばMaillard, et al. Annu. Rev. Immunol. 2005. 23:945-74（非特許文献８）に記載されている。Ｎｏｔｃｈ２タンパク質は、細胞外サブユニット（N^{EC}）と膜貫通サブユニット（N^{TM}）の２つのサブユニットに大別される。細胞外サブユニットは、Ｎ末端から膜貫通ドメインに向けて、ＥＧＦ様繰り返し配列（Ｎｏｔｃｈリガンド結合活性を有する）、Ｌｉｎ／Ｎｏｔｃｈ繰り返し配列（ＬＮＲ）（リガンドに無関係なシグナル伝達を抑制すると考えられている）、膜貫通ドメイン（HD^{N}（ｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒｉｚａｔｉｏｎ）ドメイン）、を含む。

【００２６】

膜貫通サブユニットは、Ｎｏｔｃｈ２のシグナル複数の機能的ドメインを含んでいる。具体的には、Ｎ末端からＣ末端の向きに、ヘテロ二量体形成ドメイン（HD^{C}（ｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒｉｚａｔｉｏｎ）ドメイン）、膜貫通ドメイン（ｔｒａｎｓｍｅｍｂｒａｎｅ　ｄｏｍａｉｎ）、ＲＡＭドメイン、アンキリン繰り返し配列（ＡＮＫ）、転写活性化ドメイン（ＴＡＤドメイン）、Ｃ末端のＰＥＳＴドメインを含む。ＲＡＭドメイン及びＡＮＫドメインは、下流のエフェクタータンパク質（群）と相互作用し、ＰＥＳＴドメインはＮｏｔｃｈ２タンパク質の安定性に寄与すると考えられている。ヒトＮｏｔｃｈ２タンパク質において、ＥＧＦ様繰り返し配列、ＬＮＲ、膜貫通ドメイン、ＲＡＭドメイン、ＡＮＫ、ＴＡＤドメイン、ＰＥＳＴドメインは、各々配列番号２のアミノ酸残基２６－１４１２、アミノ酸残基１４２５－１５４４、アミノ酸残基１６７８－１６９８、アミノ酸残基１７９９－１８２６、アミノ酸残基１８２７－２０３８、アミノ酸残基２０３９－２３８６並びにアミノ酸残基２３８７－２４４８に相当する。

【００２７】

ヒトＮｏｔｃｈ２タンパク質をコードするｃＤＮＡの塩基配列は、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ番号のＱ０４７２１に開示されている。ＰＥＳＴドメインをコードする核酸領域は、エキソン３４中塩基７４１５－７６００に相当する。本明細書の実施例では、Ｎｏｔｃｈ２タンパク質の半減期の増加、及び／又は生物活性の亢進と関連する塩基変異が３種類見出された。ＮＡ７１２０ＤｅｌＡ（ＡＡ２２８ＰＬＫＧＳＴＳｔｏｐ）はＰＥＳＴよりＮ末端よりのＴＡＤの中に、ＮＡ７４５４Ｃ／Ｔ（ＡＡ２４００Ｓｔｏｐ）はＰＥＳＴ中に、そしてＮＡ７６１４Ｇ／Ａ（ＡＡ２４５３Ｒ／Ｑ）はＰＥＳＴよりＣ末端側と、いずれもＰＥＳＴ領域を中心とするＰＥＳＴ周辺領域に塩基変異が存在した。よって、本発明の方法では、「ＰＥＳＴ周辺領域」、即ち、ＴＡＤ、ＰＥＳＴおよびそのＣ末端側を利用するものである。

【００２８】

ＰＥＳＴ周辺領域の塩基変異とびまん性大細胞性リンパ腫のサブタイプ分け

ＰＥＳＴ周辺領域、特にＰＥＳＴドメインはＮｏｔｃｈ２タンパク質の安定性に寄与すると考えられている。本発明者らは、病理診断でびまん性大細胞性リンパ腫と診断された患者６３名のうち５名（７．９％）において１又は複数のアミノ酸配列の変異を生じさせるような、１つ（又は複数）の塩基の欠失、置換若しくは付加の塩基変異を有することを見出した。これらのサブタイプでは、塩基変異によりＮｏｔｃｈ２タンパク質がＰＥＳＴドメイン中で未成熟のまま終始する、あるいは、アミノ酸変異を生じ、その結果、Ｎｏｔｃｈ２タンパク質の半減期の増加、及び／又は生物活性の亢進が生じることが見出された。

【００２９】

本発明者は、上記発見に基づき、Ｎｏｔｃｈ２タンパク質のＰＥＳＴドメインをコードする核酸領域中において、１又は複数のアミノ酸配列の変異を生じさせるような、１又は複数の塩基の欠失、置換若しくは付加の塩基変異の有無を指標に、びまん性大細胞性リンパ腫のサブタイプ分けを可能にした。

【００３０】

限定されるわけではないが、Ｎｏｔｃｈ２のＰＥＳＴ周辺領域をコードする核酸領域は、好ましくは配列番号１の塩基６３７１－７６６９の塩基配列からなる。遺伝子暗号の縮重により上記配列の同一のアミノ酸配列をコードする核酸配列も、「Ｎｏｔｃｈ２のＰＥＳＴ周辺領域をコードする核酸領域」に相当すると配列として、本発明に利用可能である。

【００３１】

本明細書の実施例１において後述するように、３名の患者及び細胞株では、配列番号１の塩基７４５４において塩基ＣがＴに変異していた。この塩基変異によりＮｏｔｃｈ２タンパク質の２４００番目のアミノ酸残基をコードするトリプレットコドンが終始コドンとなり、コードされるＮｏｔｃｈ２タンパク質は配列番号２のアミノ酸１－２３９９のアミノ酸配列からなる未成熟（短縮型）のものとなる。また、１名の患者では、配列番号１の塩基７１２０において塩基Ａが欠失していた。この塩基変異によりフレームシフトが生じ、コードされるアミノ酸配列は２２８８番目のアミノ酸残基以後はＰＬＫＧＳＴとなり、終始コドンが続く。コードされるＮｏｔｃｈ２タンパク質は、配列番号２のアミノ酸１－２２８８のアミノ酸配列＋ＬＫＧＳＴ、からなる未成熟（短縮型）のものとなる。さらに、別の１名の患者では、配列番号１の塩基７６１４において塩基ＧがＡに変異していた。この塩基変異によりＮｏｔｃｈ２タンパク質の２４５３番目のアミノ酸残基アルギニン（Ｒ）をコードするトリプレットコドンがグルタミン（Ｑ）をコードするトリプレットとなる。

【００３２】

よって、限定されるわけではないが、本発明の方法はその一態様において、Ｎｏｔｃｈ２のＰＥＳＴ周辺領域中でも特に、実施例において変異が確認された塩基を含む領域において、塩基変異を有するか否かをサブタイプ分けの指標とする。具体的には、Ｎｏｔｃｈ２のＰＥＳＴ周辺領域をコードする核酸領域のうち、配列番号１の塩基７１２０、７４５４及び／又は７６１４に相当する塩基を含む領域において、１又は複数の塩基の欠失、置換若しくは付加の塩基変異を有するタイプと、塩基変異を有しないタイプとを分類する。より好ましくは、Ｎｏｔｃｈ２のＰＥＳＴ周辺領域をコードする核酸領域のうち、配列番号１の塩基７１２０、７４５４及び／又は７６１４に相当する塩基が、欠失又は置換されている塩基変異を有するタイプと、塩基変異を有しないタイプとを分類する。

【００３３】

「１又は複数の」とは、Ｎｏｔｃｈ２のＰＥＳＴ周辺領域をコードする核酸領域の範囲内であれば、特に限定されない。好ましくは、１－５０、より好ましくは１－２０、さらに好ましくは１－１０、さらにより好ましくは１－数個、より好ましくは１－５個の塩基変異である、最も好ましくは１塩基変異（点突然変異）である。

【００３４】
本発明者らは、Ｎｏｔｃｈ２のＰＥＳＴ周辺領域をコードする核酸領域中に、１又は複数のアミノ酸配列の変異を生じさせるような塩基変異を有するサブタイプでは、Ｎｏｔｃｈ２タンパク質の生物活性が亢進している、ことを見出した。Ｎｏｔｃｈシグナルは、転写活性化を通じてさまざまな生物活性（未熟細胞の未分化性維持、例えば幹細胞の未分化性維持、幹細胞増幅、細胞分化抑制、個体発生期における側方特異性決定など）を発揮する。よって、「Ｎｏｔｃｈ２タンパク質の生物活性」とは、天然のＮｏｔｃｈ２タンパク質の有する任意の生物活性であれば特に限定されないが、例えば、転写活性化、細胞分化抑制効果、等の生物活性が含まれる。
【００３５】
具体的には、実施例４では、Ｎｏｔｃｈ２の生物活性に感受性のルシフェラーゼアッセイにおいて、塩基変異を有するサブタイプは塩基変異を有しないサブタイプと比較してルシフェラーゼ活性が、２７４３６４／３４８３０＝約７，９倍増加した。よって、本発明において「Ｎｏｔｃｈ２タンパク質の生物活性が亢進している」とは、例えば、「転写活性化」いう生物活性の強さが、塩基変異を有しない場合と比べて増加している、好ましくは１．５倍、より好ましくは３倍、さらに好ましくは７．９倍増加していることを意味する。
【００３６】
あるいは、実施例３の３５［Ｓ］－標識パルスチェイス分析では、塩基変異を有するＮｏｔｃｈ２タンパク質の半減期は、塩基変異を有しない場合の４０分から９０分に増加した。よって、本発明において「Ｎｏｔｃｈ２タンパク質の生物活性が亢進している」とは、生物活性の強さのみでなく生物活性が持続する時間が増加する、例えば、塩基変異を有しない場と比較して増加している、好ましくは１．５倍、より好ましくは３倍、さらに好ましくは５倍増加する場合も含む。
【００３７】
本発明は、病理診断によってびまん性大細胞性リンパ腫であると判別された病態について、さらにサブクラス分けする方法を提供するものである。本発明において塩基変異を有すると判別されたサブグループは、有しないサブグループと比較してＮｏｔｃｈ２タンパク質の安定性が向上し、また生物活性も増加している。本発明は、病理診断によってびまん性大細胞性リンパ腫であると判別された病態のうち、さらにこのように生物活性が亢進しているサブタイプを遺伝子レベルで効率同定することを可能にする。
【００３８】
塩基変異の検出方法
本発明において、塩基変異を検出するための方法は特に限定されず、単一の塩基若しくは複数の塩基の変異を検出するための公知の方法を使用することができる。
【００３９】
限定されるわけではないが、例えば、ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法、ＰＣＲ－ｄＨＰＬＣ法、ＰＣＲ－ＡＰＬＰ法、ＰＣＲ－ＲＦＬＰ法及びＤＮＡアレイからなるグループから選択される手法を用いて塩基変異を検出することが可能である。ＰＣＲ増幅産物の塩基配列を決定することによって変異を直接決定／確認することも可能である。
【００４０】
（１）ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法
ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法は、点突然変異を含む塩基変異による、一本鎖ＤＮＡの高次構造変異のゲル移動度の差を検出するものである。具体的には、一本鎖ＤＮＡは分子内水素結合などにより、その塩基配列に特異的な高次構造をとるため互いに相補的な一本鎖ＤＮＡアリルを電気泳動すると異なる位置に泳動される。ＤＮＡ断片内の一塩基置換によってもこの一本鎖ＤＮＡの高次構造は変化し、電気泳動の際変化のないものとこの成る移動を示す。このような多型を一本鎖ＤＮＡ高次構造多型（ｓｉｎｇｌｅ－ｓｔｒａｎｄ　ｃｏｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍ：ＳＳＣＰ）という。
【００４１】

ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法では、ＰＣＲ産物を一本鎖としたのち、ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い、ＤＮＡバンドシフトの違いを対照と比較することにより変異の有無を判定する。ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法の利点の１つは、既知の変異部位だけでなく、ＰＣＲ増幅産物の核酸領域中に存在する未知の変異部位についても迅速かつ容易にスクリーニングできることである。

【００４２】

ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法を利用した本発明の方法では、Ｎｏｔｃｈ２遺伝子のゲノム若しくはｃＤＮＡの塩基配列に基づき、サブタイプ分けをするための指標となる塩基部分を含むＰＥＳＴドメイン全体又は一部を増幅するように、プライマー対を使用する。上記プライマー対を用いて、ヒトゲノムＤＮＡ又はｃＤＮＡを鋳型に核酸増幅反応を行う。核酸増幅反応は、複製連鎖反応（ＰＣＲ）（サイキら、１９８５，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３０，ｐ．１３５０－１３５４）である。ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法では、ＰＣＲ産物をアクリルアミドゲル電気泳動における移動度の差を認識するので、ＰＣＲ産物の長さは、好ましくは５０－１０００　塩基、より好ましくは１５０－４００である。

【００４３】

核酸増幅のためのプライマー対は、Ｎｏｔｃｈ２遺伝子のゲノム若しくはｃＤＮＡの塩基配列に基づいて、公知の方法により作成することが可能である。具体的には、限定されるわけではないが、例えば、以下の条件：

１）各プライマーの長さが１５－３０塩基であること；

２）各プライマーの塩基配列中のＧ＋Ｃの割合が３０－７０％であること；

３）各プライマーの塩基配列中のＡ、Ｔ、ＧおよびＣの分布が部分的に大きく偏らないこと；

４）プライマー対によって増幅される核酸増幅産物の長さが４０－２０００塩基、好ましくは１５０－４００塩基であること；そして

５）各プライマー自身の塩基配列中、又はプライマー同士の塩基配列間に相補的な配列部分が存在しないこと

を満たすように、ＰＥＳＴ周辺領域の塩基配列と同じ塩基配列若しくは上記領域に相補的な塩基配列を有する一本鎖ＤＮＡを製造し、または、必要であればＰＥＳＴ周辺領域の塩基配列に対する結合特異性を失わないように修飾した上記一本鎖ＤＮＡを製造する

ことを含む方法により、プライマー対を作成できる。

【００４４】

上記条件を満たすように選択され、サブタイプ分けをするための指標となる塩基部分を含むＰＥＳＴ周辺領域の全体又は一部を増幅しうるものであれば、プライマー対の塩基配列は特に限定されない。好ましくは、プライマー対は、配列番号３と４の塩基配列からなるプライマー対、配列番号７と８の塩基配列からなるプライマー対、配列番号９と１０の塩基配列からなるプライマー対、並びに配列番号７と１０の塩基配列からなるプライマー対からなるプライマー対から群から選択される。

【００４５】

核酸増幅反応の手順及び条件は特に限定されず、当業者に周知である。当業者は、Ｎｏｔｃｈ２遺伝子の塩基配列、プライマー対の塩基配列および長さ等の種々の要因に応じて適宜、条件を採用することが可能である。一般には、プライマー対の長さが長い程、Ｇ＋Ｃの割合が高いほど、Ａ、Ｔ、ＧおよびＣの分布の偏りが小さい程、よりストリンジェントな条件（より高温度でのアニーリング反応および核酸伸長反応、より少ないサイクル数）で核酸増幅反応を行うことが可能である。よりストリンジェントな条件の採用により、特異性の高い増幅反応が可能となる。

【００４６】

増幅反応は、限定されるわけではないが、好ましくは変性反応を９０℃ないし９７℃で３０秒ないし２分、アニーリング反応を５３℃ないし６５℃で３０秒ないし２分、そして、伸長反応を７０℃ないし７５℃で３０秒ないし２分を１サイクルとし、これを２５サイクルないし５０サイクル行う。より好ましくは、変性反応を９４℃で１分、アニーリング

反応を５５℃で１分、そして、伸長反応を７２℃で１分を１サイクルとし、３５サイクル行う。あるいは、変性反応を９５℃で３０秒、アニーリング反応を５５℃で３０秒、そして、伸長反応を７２℃で３０秒を１サイクルとし、４５サイクル行う。

【００４７】

ＳＳＣＰ法においてより良い泳動パターンを得るために重要な要因の１つはゲルの濃度と組成である。ゲルの組成と組み合わせて泳動時における電圧も分離に影響しうる。一般に高電圧であれば、バンドが押され気味になり前のバンドと重なってしまうことがある。しかし高濃度のゲル（例えば１０％以上）で高電圧（例えば７００ボルト以上）をかけることにより、ピークパターンがシャープになり比較しやすい場合もある。あるいは、反対に電圧を低めにしてゆっくり流すと分離がよくなることもあるが、ピークがだらだらと出てしまい特徴が表われにくい場合もある。

【００４８】

当業者は判定しやすく変位がわかりやすいパターンを検出するために適当なプライマー対、ゲルの組成及び濃度、電圧を適宜選択可能である。

【００４９】

（２）ＰＣＲ－ｄＨＰＬＣ法

ＳＳＣＰ法と同様に、点突然変異を含む塩基変異による、一本鎖ＤＮＡの高次構造変異を検出するための方法として、ｄＨＰＬＣ（ｄｅｎａｔｕｒｉｎｇ ｈｉｇｈ ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ ｌｉｑｕｉｄ ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ（ｄＨＰＬＣ））も知られている。ｄＨＰＬＣは、ＰＣＲ産物を一本鎖とした後、ＳＳＣＰ法のアクリルアミドゲルの代わりにＨＰＬＣに供するものである。ｄＨＰＬＣ法は放射性同位元素（ＲＩ）を使用しない、という点において臨床検査での使用に好ましい。近年、特にＰＣＲ－ｄＨＰＬＣ法などで簡便に変異を検出する機器が改良されている。

【００５０】

ＰＣＲ－ｄＨＰＬＣ法に供するのに好ましいＰＣＲ産物の長さは、好ましくは５０－７００塩基、より好ましくは１００－３００である。よって、ＰＣＲ用プライマー対の選択における工程４）は、「プライマー対によって増幅される核酸増幅産物の長さが５０－７０塩基、好ましくは１００－３００塩基であること」となる。

【００５１】

（３）ＰＣＲ－ＡＰＬＰ法

ＰＣＲ－ＡＰＬＰ法は、塩基変異に基づくＰＣＲ産物の鎖長の差異を検出する方法である。塩基の点突然変異ではなく、塩基変異により複数の塩基が欠失または付加されているような領域が存在する場合、塩基変異の有無が直接ＰＣＲ産物の鎖長の差異（ＡＰＬＰ（ａｍｐｌｉｃｏｎ ｌｅｎｇｔｈ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍ））として表われるので、アガロースゲル又はアクリルアミドゲルにおける電気泳動における移動度の差異として検出することが可能である。

【００５２】

ＰＣＲ－ＡＰＬＰ法に供するのに好ましいＰＣＲ産物の長さは、好ましくは５０－３０００塩基、より好ましくは１００－２０００である。よって、ＰＣＲ用プライマー対の選択における工程４）は、「プライマー対によって増幅される核酸増幅産物の長さが５０－３０００塩基、好ましくは１００－２０００塩基であること」となる。

【００５３】

（４）ＰＣＲ－ＲＦＬＰ法

ＰＣＲ増幅後、塩基変異部位を制限酵素により変異部位を認識・切断し、制限酵素断片長の多型（ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ ｆｒａｇｍｅｎｔ ｌｅｎｇｔｈ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍ；ＲＦＬＰ）またはＣＡＰＳ（ｃｌｅａｖｅｄ ａｍｐｌｉｆｉｅｄ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｃ ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ）をアガロースゲル又はアクリルアミドゲルにおける電気泳動における移動度の差異として検出する方法である。検出の簡便さ・明確さから優れているが、ＳＳＣＰ法と異なり既知の塩基変異しか検出できない。

【００５４】

ＰＣＲ－ＲＦＬＰ法に供するのに好ましいＰＣＲ産物の長さは、好ましくは５０－３０００塩基、より好ましくは１００－２０００である。よって、ＰＣＲ用プライマー対の選択における工程４）は、「プライマー対によって増幅される核酸増幅産物の長さが５０－３０００塩基、好ましくは１００－２０００塩基であること」となる。

【００５５】

さらに、核酸増幅産物中に制限酵素認識に差異を生じない塩基置換が存在する場合には、例えば、当該塩基置換部位を含み、そして、当該塩基置換部位を含む領域を核酸増幅産物では制限酵素認識に差異を生じるような塩基配列に変更するようなミスマッチ導入プライマー対を作成し、サブタイプ分けに利用することも可能である。これは、一般に、ＣＡＰＳ法の改良であるｄＣＡＰＳ（ｄｅｒｉｖｅｄ　ＣＡＰＳ）法と呼ばれている手法を利用するものである。

【００５６】

（５）ＤＮＡアレイ

特に１塩基の変異の検出を含む塩基変異の検出に、ＤＮＡアレイを利用してもよい。ＤＮＡアレイは、ガラス基板上に数千～数満のＤＮＡ分子を高密度に配列したデバイスであり、その利用によりｃＤＮＡやｃＲＮＡ，あるいはゲノムＤＮＡとのハイブリダイゼーションによって、遺伝子多型（疾患と関連する塩基変異を含む）をゲノムスケールでの解析が可能である。現在ではｃＤＮＡを固定化したＤＮＡマイクロアレイ（狭義の「ＤＮＡアレイ」と、オリゴヌクレオチドをチップ上で合成するオリゴ型のＤＮＡチップが知られている。例えば、後者では２５塩基ないし８０塩基の長さのｃＤＮＡを各スポットに固定化することが可能である。例えば、アフィメトリックス社のオリゴアレイのプローブは、一般に２５塩基である。

【００５７】

例えば、当業者に公知のリシークエンシングアレイ（ｒｅｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ａｒｒａｙ）（例えば、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ社）を利用することも可能である。基本的には４つの可能性のある塩基のオリゴを全ての塩基についてアレイ化し、これにｌｏｎｇ　ＰＣＲ増幅（約１０ｋｂ）後、断片化したゲノムＤＮＡをハイブリダイズさせて、ハイブリだぜーションの特異性をシグナル強度差で定量することによって塩基配列を決定する方法である。

【００５８】

本発明の方法において、ＤＮＡアレイを例えば以下のように利用した方法が考えられる。ヒトＮｏｔｃｈ２タンパク質のＰＥＳＴ周辺領域をコードする核酸領域は、塩基数１２９９（配列番号１の６３７１－７６６９）の長さである。これらの塩基を例えば、５０塩基ずつに分断すると、約２６個の断片となる。各ＤＮＡ断片をＤＮＡアレイに配列させる。生体試料中のゲノムＤＮＡ若しくはｃＤＮＡ中を上記ＤＮＡアレイにハイブリダイズさせると、塩基変異を有するサブタイプと塩基変異を有しないサブタイプでＤＮＡアレイに対するハイブリダイゼーション強度の差異により塩基変異を検出する。前述の計算では、ヒトＮｏｔｃｈ２タンパク質のＰＥＳＴ周辺領域をコードする核酸領域は２６個の断片となる。各断片の塩基配列が一部ずつ重複するように、例えば上記値の倍の５２個の断片を準備するとして、この個数であれば１枚のチップに全ての領域を配列させることが十分にできる。よって、ＰＥＳＴドメインをコードする核酸領域をコードする塩基変異を一度のハイブリダイゼーション操作で検出することも可能である。

【００５９】

びまん性大細胞性リンパ腫をサブタイプ分けする方法に使用するためのキット

本発明はまた、びまん性大細胞性リンパ腫をサブタイプ分けする方法に使用するためのキットを提供する。本発明のキットは、塩基変異の検出を例えばＰＣＲ－ＳＳＣＰ法、ＰＣＲ－ｄＨＰＬＣ法、ＰＣＲ－ＡＰＬＰ法、ＰＣＲ－ＲＦＬＰ法等を用いて行う場合に、ＰＣＲ反応に使用するためのプライマー対を含む。

【００６０】

プライマー対は使用する方法に適した長さのＰＣＲ産物が得られるように、ヒトＮｏｔ

ｃｈ２タンパク質のＰＥＳＴ周辺領域をコードする核酸領域の塩基配列に基づいて当業者が適宜選択可能である。具多的にはプライマー対は一般には下記の条件：

１）各プライマーの長さが１５－３０塩基であること；

２）各プライマーの塩基配列中のＧ＋Ｃの割合が３０－７０％であること；

３）各プライマーの塩基配列中のＡ、Ｔ、ＧおよびＣの分布が部分的に大きく偏らないこと；

４）プライマー対によって増幅される核酸増幅産物の長さが、ＰＣＲに続く各工程での検出に適した長さであること；そして

５）各プライマー自身の塩基配列中、又はプライマー同士の塩基配列間に相補的な配列部分が存在しないこと

満たすように、ＰＥＳＴ周辺領域の塩基配列と同じ塩基配列若しくは上記ドメインに相補的な塩基配列を有する一本鎖ＤＮＡを製造し、または、必要であればＰＥＳＴドメインの塩基配列に対する結合特異性を失わないように修飾した（例えば、１ないし３塩基の塩基変異（欠失、置換又は付加）を施した）上記一本鎖ＤＮＡを製造する

ことを含む方法により、プライマー対を作成できる。

【００６１】

特定の既知の塩基変異を検出する場合には、ＰＥＳＴ周辺領域をコードする核酸領域中特にその塩基を含む領域が増幅されるようにプライマー対を選択する。限定されるわけではないが、好ましくは、本発明のキットは配列番号１の塩基７１２０、７４５４及び／又は７６１４に相当する塩基を含む４０－２０００塩基の長さの核酸領域をＰＣＲ反応により増幅するためのプライマー対を含む。より好ましくは、本発明のプライマー対は、配列番号３と４の塩基配列からなるプライマー対、配列番号７と８の塩基配列からなるプライマー対、配列番号９と１０の塩基配列からなるプライマー対、並びに配列番号７と１０の塩基配列からなるプライマー対からなるプライマー対から成るグループから選択される。必要であればＰＥＳＴ周辺領域の塩基配列に対する結合特異性を失わないように修飾して、例えば、１ないし３塩基の塩基変異（欠失、置換又は付加）を施して、上記一本鎖ＤＮＡを製造する。

【００６２】

実施態様

限定されるわけではないが、本発明は下記の実施態様（１）－（９）を含む。

態様（１）

びまん性大細胞性リンパ腫をサブタイプ分けする方法であって、

びまん性大細胞性リンパ腫に罹患した患者由来の生体試料中のゲノムＤＮＡ若しくはｃＤＮＡ中の、Ｎｏｔｃｈ２タンパク質のＴＡＤ、ＰＥＳＴおよびそのＣ末端側をコードする核酸領域中において、１又は複数のアミノ酸配列の変異を生じさせるような、１又は複数の塩基の欠失、置換若しくは付加の塩基変異を有するタイプと、塩基変異を有しないタイプとを分類する

ことを含む、前記方法。

【００６３】

態様（２）

Ｎｏｔｃｈ２のＴＡＤ、ＰＥＳＴおよびそのＣ末端側をコードする核酸領域が、配列番号１の塩基６３７１－７６６９の塩基配列からなる、態様（１）に記載の方法。

【００６４】

態様（３）

Ｎｏｔｃｈ２のＴＡＤ、ＰＥＳＴおよびそのＣ末端側をコードする核酸領域のうち、配列番号１の塩基７１２０、７４５４及び／又は７６１４に相当する塩基を含む領域において、１又は複数の塩基の欠失、置換若しくは付加の塩基変異を有するタイプと、塩基変異を有しないタイプとを分類する、態様（１）又は（２）に記載の方法。

【００６５】

態様（４）

Ｎｏｔｃｈ２のＴＡＤ、ＰＥＳＴおよびそのＣ末端側をコードする核酸領域のうち、配列番号１の塩基７１２０、７４５４及び／又は７６１４に相当する塩基が、欠失又は置換されている塩基変異を有するタイプと、塩基変異を有しないタイプとを分類する、態様（３）に記載の方法。

【００６６】

態様（５）

Ｎｏｔｃｈ２タンパク質のＴＡＤ、ＰＥＳＴおよびそのＣ末端側をコードする核酸領域中の塩基変異によって、Ｎｏｔｃｈ２タンパク質の生物活性が亢進している、態様（１）ないし（４）のいずれか１項に記載の方法。

【００６７】

態様（６）

ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法、ｄＨＰＬＣ法、ＰＣＲ－ＡＰＬＰ法、ＰＣＲ－ＲＦＬＰ法、ＤＮＡアレイからなるグループから選択される手法を用いて塩基変異を検出する、態様（１）ないし（５）のいずれか１項に記載の方法。

【００６８】

態様（７）

配列番号３と４の塩基配列からなるプライマー対、配列番号７と８の塩基配列からなるプライマー対、配列番号９と１０の塩基配列からなるプライマー対、並びに配列番号７と１０の塩基配列からなるプライマー対、から成るグループから選択されるプライマー対を用いたＰＣＲ工程を含む手法を用いて塩基変異を検出する、態様（６）に記載の方法。

【００６９】

態様（８）

配列番号１の塩基７１２０、７４５４及び／又は７６１４に相当する塩基を含む４０－２０００塩基の長さの核酸領域をＰＣＲ反応により増幅するためのプライマー対を含む、びまん性大細胞性リンパ腫をサブタイプ分けする方法に使用するためのキット。

【００７０】

態様（９）

配列番号３と４の塩基配列からなるプライマー対、配列番号７と８の塩基配列からなるプライマー対、配列番号９と１０の塩基配列からなるプライマー対、並びに配列番号７と１０の塩基配列からなるプライマー対から成るグループから選択されるプライマー対を含む、態様（８）に記載のキット。

【実施例】

【００７１】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の技術的範囲を限定するためのものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

【００７２】

実施例１　Ｂ細胞リンパ腫におけるＮｏｔｃｈ２遺伝子の塩基変異

本実施例では、生体試料（腫瘍摘出試料）中の、塩基変異をＰｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａｉｎ ｒｅａｃｔｉｏｎ－Ｓｉｎｇｌｅ Ｓｔｒａｎｄ Ｃｏｎｆｏｒｍａｔｉｏｎａｌ Ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍ （ＰＣＲ－ＳＳＣＰ）を用いて検出した。

【００７３】

具体的には、インフォームドコンセントの後、種々のＢ細胞リンパ腫を伴う１０９名の患者が本研究に参加した。市販のキット（ＰＵＲＥＧＥＮＥＴＭ（商標），Ｇｅｎｔｒａ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）を用いて凍結乾燥された生体試料からゲノムＤＮＡを抽出した。Ｎｏｔｃｈ２遺伝子のエキソン２６、２７及び３４の全体又は一部を増幅するようにＰＣＲを行い、ＳＳＣＰ法により塩基変異を検出した。

【００７４】

エキソン２６は、Ｎｏｔｃｈ２タンパク質の細胞外サブユニットのＣ端に存在するＨＤドメイン（ＨＤ^{ＥＣ}ドメイン）をコードする。エキソン２６を以下のプライマーを用いて

増幅した。

【００７５】

ＮＯＴＣＨ２Ｅｘｏｎ２６ＦＷ：

ＧＴＴＣＴＣＴＧＣＴＴＣＣＣＣＴＴＡＣＣＴ　（配列番号１１）

ＮＯＴＣＨ２Ｅｘｏｎ２６ＲＶ：

ＧＣＣＴＴＧＡＡＧＴＴＣＡＧＡＡＡＣＣＡＡ　（配列番号１２）

エキソン２７は、膜貫通サブユニットのＮ端に存在するＨＤドメイン（ＨＤ^{TM}ドメイン）をコードする。エキソン２７を以下のプライマーを用いて増幅した。

ＮＯＴＣＨ２Ｅｘｏｎ２７ＦＷ：

ＴＡＣＣＣＣＣＡＴＣＴＣＴＣＣＴＣＣＴＣ　（配列番号１３）

ＮＯＴＣＨ２Ｅｘｏｎ２７ＲＶ：

ＡＡＴＴＧＴＴＣＣＣＣＣＡＡＴＴＧＡＣＡ．　（配列番号１４）

エキソン３４は、転写活性化ドメイン（ＴＡＤドメイン）およびＣ末端のＰＥＳＴドメインをコードする。ＴＡＤドメインとＰＥＳＴドメインを５つに分けて（ＴＡＤ領域１つ、ＰＥＳＴ領域４つ）アンプリコンを得た。

ＴＡＤドメインコード領域

ＮＯＴＣＨ２ＴＡＤＦＷ：

ＴＣＣＣＣＴＧＴＴＧＡＴＴＣＣＣＴＡＧＡ　（配列番号１５）

ＮＯＴＣＨ２ＴＡＤＲＶ：

ＣＡＣＡＡＴＧＴＧＧＴＧＧＴＧＧＧＡＴＡ　（配列番号１６）

ＰＥＳＴドメイン

ＮＯＴＣＨ２ＰＥＳＴ－１ＦＷ：

ＧＣＡＣＴＧＴＧＣＴＴＣＣＣＴＣＡＧＴ　（配列番号３）

ＮＯＴＣＨ２ＰＥＳＴ－１ＲＶ：

ＣＴＧＣＣＴＴＴＡＧＧＧＡＴＧＡＧＣＴＧ　（配列番号４）

ＮＯＴＣＨ２ＰＥＳＴ－２ＦＷ：

ＡＣＣＣＡＴＣＣＴＧＧＣＡＴＡＧＣＴＣ　（配列番号５）

ＮＯＴＣＨ２ＰＥＳＴ－２ＲＶ：

ＴＡＧＧＣＴＧＧＧＡＧＡＡＴＧＧＴＣＴＧ　（配列番号６）

ＮＯＴＣＨ２ＰＥＳＴ－３ＦＷ：

ＴＴＴＧＣＣＣＡＧＴＧＴＧＧＣＴＴＴ　（配列番号７）

ＮＯＴＣＨ２ＰＥＳＴ－３ＲＶ：

ＧＧＴＧＡＴＧＡＡＣＴＴＧＡＣＣＡＣＴＧ，　（配列番号８）

ＮＯＴＣＨ２ＰＥＳＴ－４ＦＷ：

ＡＣＡＣＣＣＡＧＴＣＡＣＡＧＴＧＧＴＣＡ　（配列番号９）

ＮＯＴＣＨ２ＰＥＳＴ－４ＲＶ：

ＴＧＴＣＴＣＴＡＣＡＣＴＧＧＡＧＧＴＧＧＡ　（配列番号１０）

【００７６】

異常な移動バンドを検出した検体に関して直接、あるいは異常な移動バンドが薄い場合（変異を持つ腫瘍細胞比率が低い場合）には異常移動バンドを切り出して、配列決定を行った。配列決定は、ＰＣＲ反応に使ったプライマーと同じプライマーを用い、ＡＢＩ３１００シークエンサーを製造業者の使用説明書に従って行った。

【００７７】

その結果を図１及び図２に示す。３名の患者（検体Ｌ８、Ｗ１２１６７２およびＷ１０９５３９）及び細胞株では、配列番号１の塩基７４５４において塩基ＣがＴに変異していた。これは配列番号７及び８のプライマー対によって増幅される核酸領域中に存在する。この塩基変異によりＮｏｔｃｈ２タンパク質の２４００番目のアミノ酸残基をコードするトリプレットコドンが終始コドンとなり、コードされるＮｏｔｃｈ２タンパク質は配列番号２のアミノ酸１－２３９９のアミノ酸配列からなる未成熟（短縮型）のものとなる。また、１名の患者（検体Ｌ２）では、配列番号１の塩基７２１０において塩基Ａが欠失して

いた。これは配列番号３及び４のプライマー対によって増幅される核酸領域中に存在する。この塩基変異によりフレームシフトが生じ、コードされるアミノ酸配列は２２８８番目のアミノ酸残基以後はＰＬＫＧＳＴとなり、終始コドンが続く。コードされるＮｏｔｃｈ２タンパク質は、配列番号２のアミノ酸１－２２８８のアミノ酸配列＋ＰＬＫＧＳＴ、からなる未成熟（短縮型）のものとなる。さらに、別の１名の患者（検体Ｗ１１７３３６）では、配列番号１の塩基７６１４において塩基ＧがＡに変異していた。これは配列番号９及び１０のプライマー対によって増幅される核酸領域中に存在する。この塩基変異によりＮｏｔｃｈ２タンパク質の２４５３番目のアミノ酸残基アルギニン（Ｒ）をコードするトリプレットコドンがグルタミン（Ｑ）をコードするトリプレットとなる。

【００７８】

図１は、原発性Ｂ細胞リンパ腫中のＮｏｔｃｈ２変異を示す。ＩＤ：検体番号、Ｄｉｓｅａｓｅ：疾患名、ＳｅｑＰＥＳＴｄｏｍａｉｎ：ＰＥＳＴドメイン延期配列中の変異、ＭｕｔＰＥＳＴｄｏｍａｉｎ：ＰＥＳＴドメインアミノ酸変異、疾患名中のＤＣＢＬＣは、びまん性大細胞性リンパ腫を示す。ＦＬは、濾胞性リンパ腫を示す。図１から明らかなように、検体６および６０６はＤＬＢＣＬを伴い、Ｎｏｔｃｈ２遺伝子、配列番号１の７５９７の塩基に１塩基変異（ＳＮＰ）が観測されたが、当該変異はＤＬＢＣＬと異なるＦＬを伴う検体（検体９２１、１８４６及び２２０８）にも観測される塩基変異であり、そしてコードされるアミノ酸は変化しない。また検体３０（ＤＬＢＣＬ）は、配列番号の７５１９の塩基に１塩基変異（ＳＮＰ）が観測されたが、これもコードされるアミノ酸は変化せずＤＬＢＣＬの病態とは直接関係のない塩基変異である。

【００７９】

ＤＬＢＣＬは種々の病態を含む大型異型細胞のびまん性湿潤が認められるＢ細胞性リンパ腫瘍の総称である。図２に示したように、ＤＬＢＣＬに罹患した６３の検体のうち５つ（７．９％）でＰＥＳＴドメイン中にアミノ酸変異を生じさせる塩基変異が観察される。当該塩基変異は種々の病態をサブタイプ分けするのに有用である。

【００８０】

実施例２　高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いたゲノムコピー数の分析

本実施例では実施例１において、配列番号１の塩基７４５４において塩基ＣがＴに変異していた検体を使用して、高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いたゲノムコピー数の決定を行った。

【００８１】

具体的には、非特許文献９に記載されたような公知の方法に基づいて、ゲノムコピー数検出分析を行った。簡単には、Affimetrix GeneChip Mapping 100 k 高密度オリゴヌクレオチドアレイ（Affimetrix, Inc., Santa Clara, CA）を使用し、データをＣＮＡＧアルゴリズムを用いて分析した。

【００８２】

結果を図３に示す。図３は、上から全コピー数、移動平均（ｍｏｖｉｎｇ　ａｖｅｒａｇｅ）、ヘテロＳＮＰ　ｃａｌｌ、アリルに基づくコピー数を示す。図３に示すように染色体１のＮｏｔｃｈ２遺伝子座（１ｐ１２）を含む領域において、染色体のゲノムコピー数が増幅していた。

【００８３】

実施例３　ＦＩＳＨ分析

本実施例では実施例１の実施例１において、配列番号１の塩基７４５４において塩基ＣがＴに変異していた検体（検体番号Ｗ１０９５３９）を使用して、ＦＩＳＨ（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　ｉｎ　ｓｉｔｕ　ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ）分析行った。

【００８４】

具体的には、Ｂａｃｔｅｒｉａｌ　Ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ　Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ（ＢＡＣ）クローンＲＰ１１－７２３ｄ１７（Ｎｏｔｃｈ２）及びＲＰ１１－８０ｄ６（１ｑ２３．３）を使用して、増幅を同定した。ＢＡＣは、ＢＡＣ／ＰＡＣ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅ　Ｃｅｎｔｅｒ（Ｃｈｉｌｄｒｅｎ’ｓ　Ｈｏｓｐｉｔａｌ，Ｏａｋｌａｎｄ，ＣＡ）か

ら得られた。先行技術文献１０に記載されたような公知の方法に基づいて、細胞分裂間期の核に対してＦＩＳＨ実験を行った。

【００８５】

結果を図４に示す。緑色のシグナルは、Ｎｏｔｃｈ２の配列に相当し、赤色のシグナルは１ｑ２３．３上の対照配列に相当する。

【００８６】

実施例４　Ｎｏｔｃｈ２の転写活性アッセイ

公知のルシフェラーゼ感受性アッセイを使用して、Ｎｏｔｃｈ２の転写活性を調べた。

具体的には、先ず、野生型Ｎｏｔｃｈ２（ｗｔＮ２）及び配列番号１の塩基７４５４において塩基ＣがＴに変異していたノンセンス突然変異を有するＮｏｔｃｈ２（ｎｓｍＮ２）を発現する1×10^{5}個のＣＨＯ（ｒ）細胞（ｗｔＮ２／ＣＨＯ（ｒ）及びｎｓｍＮ２／ＣＨＯ（ｒ））を６ウェル　ディッシュ中に調製した。次の日に、ｐＧａ９８１－６ルシフェラーゼレポータープラスミドをＳｕｐｅｒｆｅｃｔ^{TM}トランスフェクション試薬（ＱＩＡＧＥＮ，Ｈｉｌｄｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を用いてトランスフェクトした。

【００８７】

次いで、全長のヒトＤｅｌｔａ１　ｃＤＮＡを発現する1×10^{5}個のＣＨＯ（ｒ）細胞を、ｗｔＮ２／ＣＨＯ（ｒ）及びｎｓｍＮ２／ＣＨＯ（ｒ）上にオーバーレイした。細胞を２日間インキュベートし、ルシフェラーゼアッセイに使用した。

【００８８】

結果を図５に示す。図５に示すように塩基変異を有するサブタイプは塩基変異を有しないサブタイプと比較してルシフェラーゼ活性が、２７４３６４／３４８３０＝約７，９倍増加した。

【００８９】

実施例５　３５［Ｓ］標識パルスチェイス分析

本実施例では、実施例１の実施例１において、配列番号１の塩基７４５４において塩基ＣをＴに変異させたｃＤＮＡ（Ｍｕｔ．ａｈＮｏｔｃｈ２）を使用して、［Ｓ］標識パルスチェイス分析を行い、塩基変異によるＮｏｔｃｈ２タンパク質の半減期の変化を調べた。使用した３＊Ｆｌａｇ／Ｍｕｔ．ａｈＮｏｔｃｈ２ペプチドの構造、及び対照の３＊Ｆｌａｇ／Ｗｉｌｄ．ａｈＮｏｔｃｈ２ペプチドの構造を図６に示す。これらを用いて、公知の手法を用いてパルスチェイス分析を行った。

【００９０】

結果を図７に示す。図７に示すように塩基変異を有するサブタイプの半減期は９０分であるのに対し、塩基変異を有しないサブタイプの半減期は４０分であった。よって、本実施例では、塩基変異を有するサブタイプは有しないサブタイプと比較して半減期が２．２５倍長かった。

【図面の簡単な説明】

【００９１】

【図１】図１は、原発性Ｂ細胞リンパ腫中のＮｏｔｃｈ２変異を示す。

【図２】図２は、ＤＬＢＣＬ患者中の特定のサブタイプに観察されるＮｏｔｃｈ２変異を示す。

【図３】図３は、高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いてゲノムコピー数の決定を行った結果を示す。

【図４】図４はＦＩＳＨ分析の結果を示す。

【図５】図５は、Ｎｏｃｔｈ感受性ルシフェラーゼ分析を行った結果を示す。

【図６】図６は、３５［Ｓ］標識パルスチェイス分析に使用したペプチド断片の構造を示す。

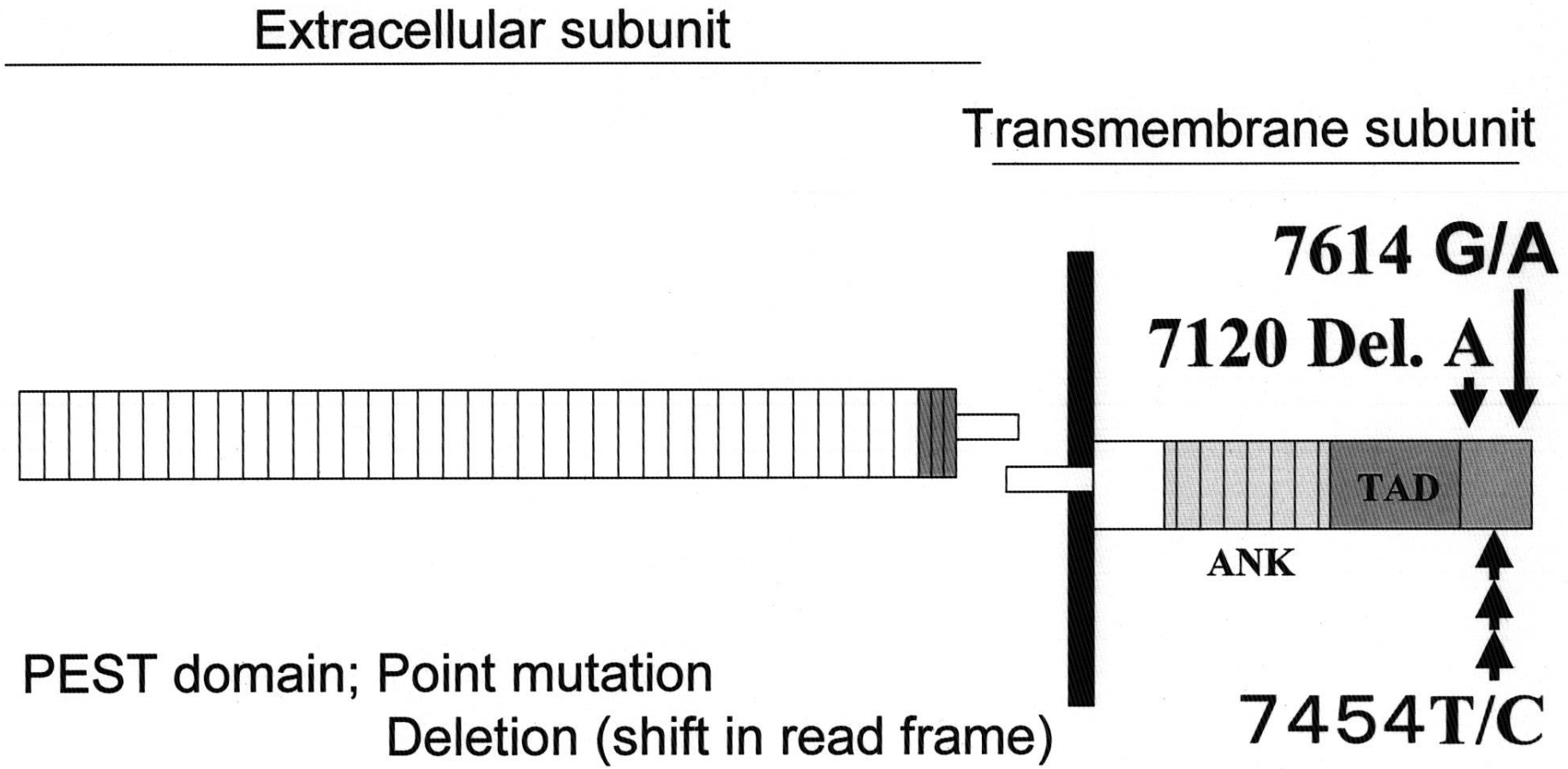
【図７】図７は、３５［Ｓ］標識パルスチェイス分析の結果を示す。

【図１】

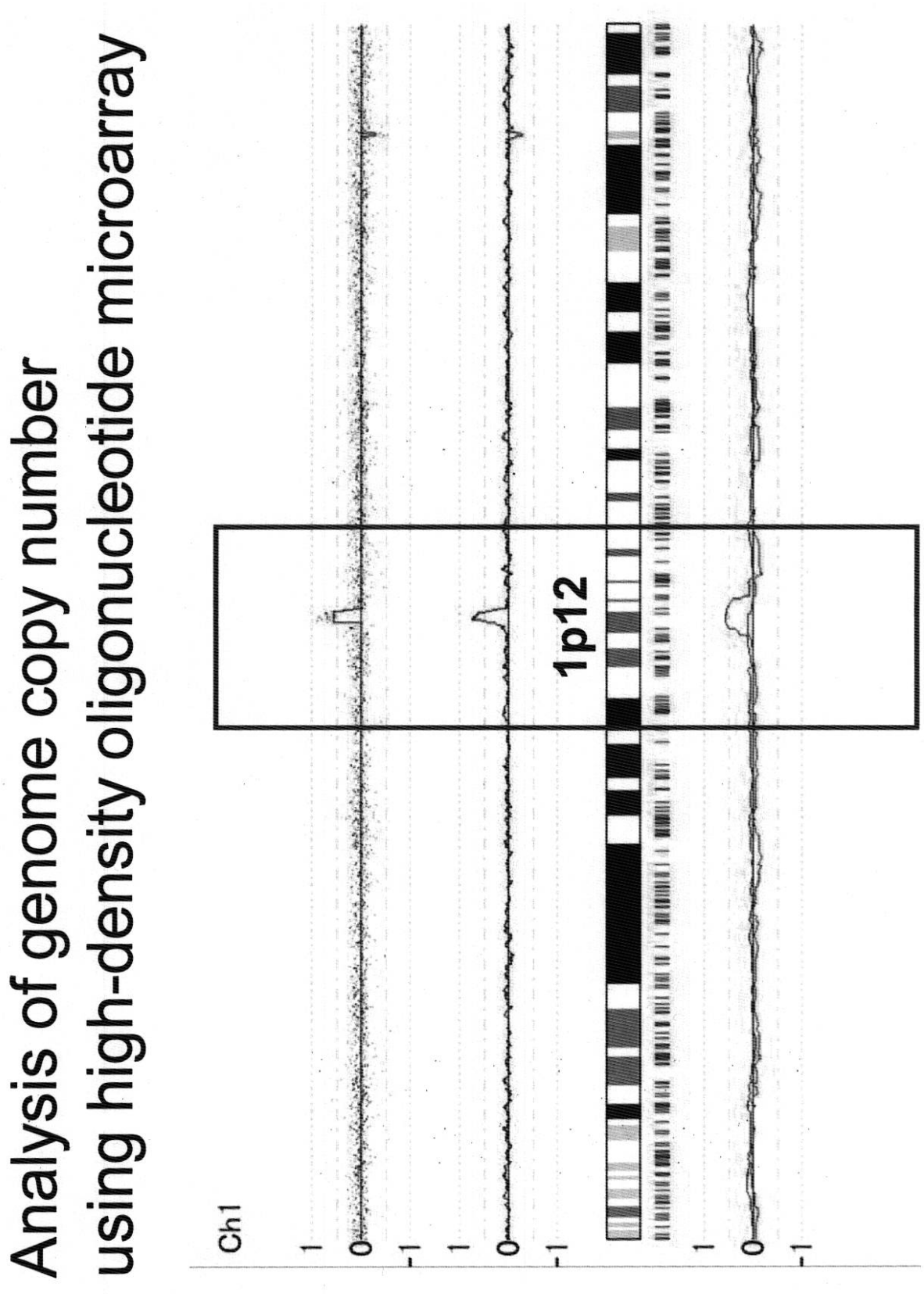
Notch2 mutations in primary B-cell lymphoma

ID	Disease	Seq PEST domain	Mut PEST domain
L2	DLBCL	7120 Del. A	2288PLKGSTStop
6	DLBCL	SNP 7597 T/A	
L8	DLBCL	7454 C/A	2400 Stop
30	DLBCL	SNP 7519 T/A	
W117336	DLBCL	7614 G/A	2453 R/Q
W121672	DLBCL	7454 C/A	2400 Stop
606	DLBCL	SNP 7597 T/A	
921	FL	SNP 7597 T/A	
1846	FL	SNP 7597 T/A	
W109539	DLBCL	7454 C/A	2400 Stop
2208	FL	SNP 7597 T/A	

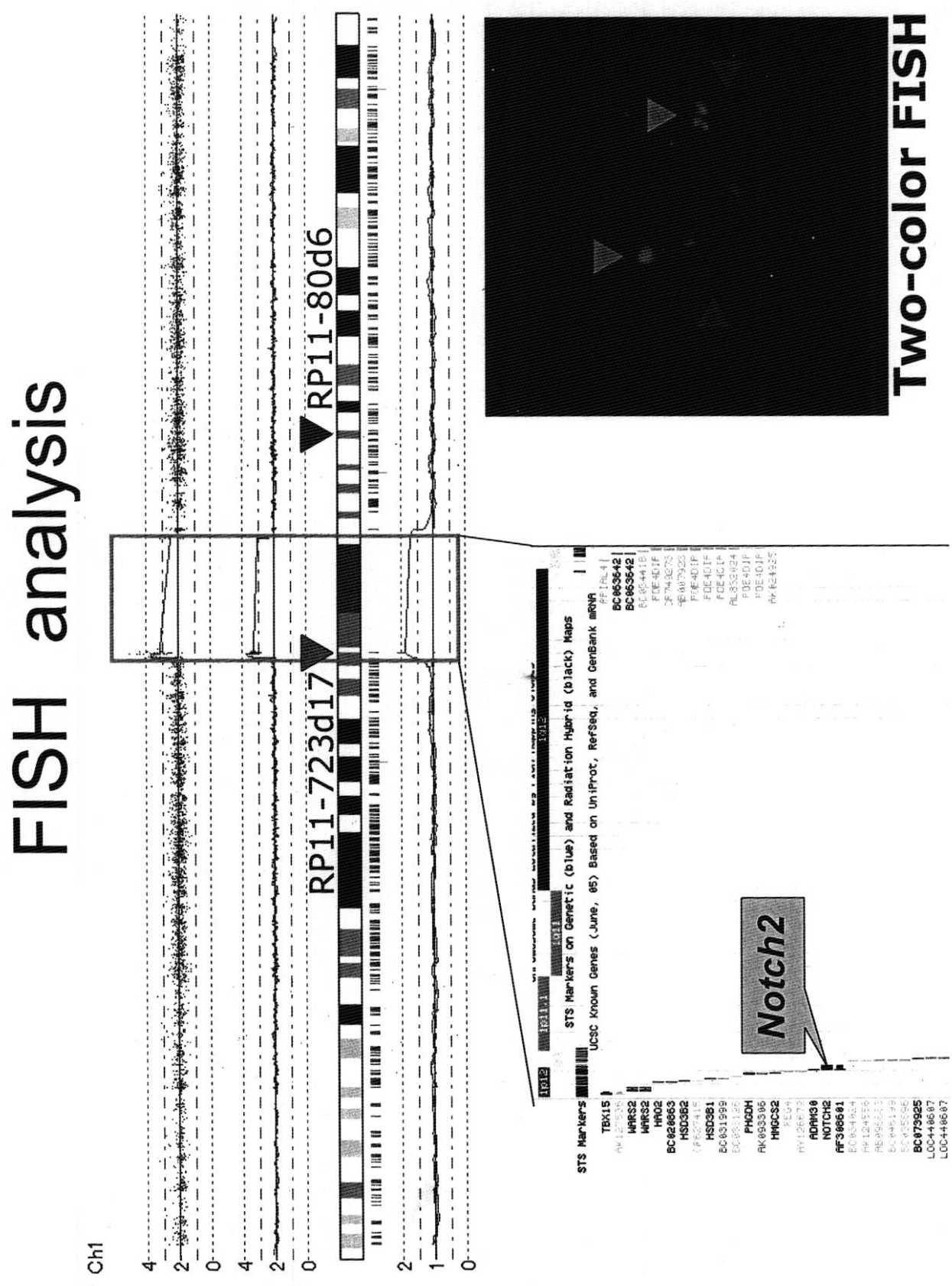
Notch2 mutation in DLBCL cases



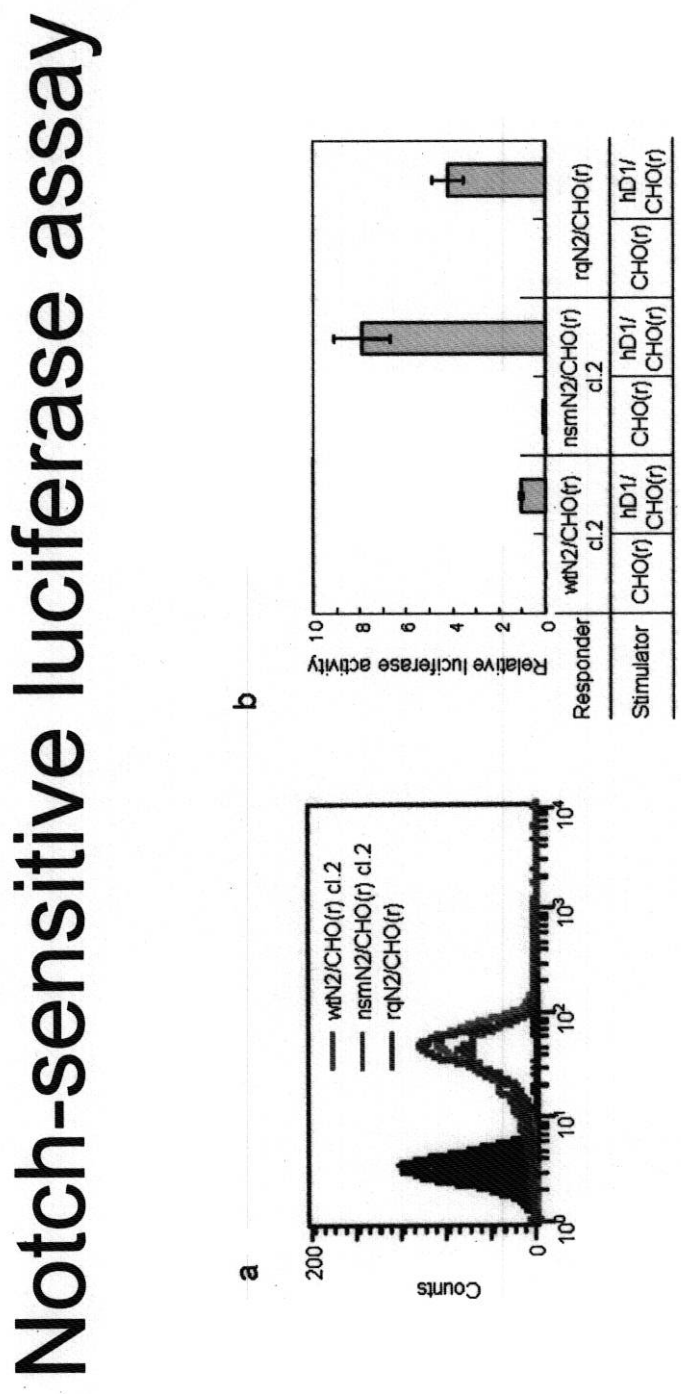
【図３】


Analysis of genome copy number
using high-density oligonucleotide microarray
Ch1
1
0
-1
1
0
-1
1p12
1
0
-1

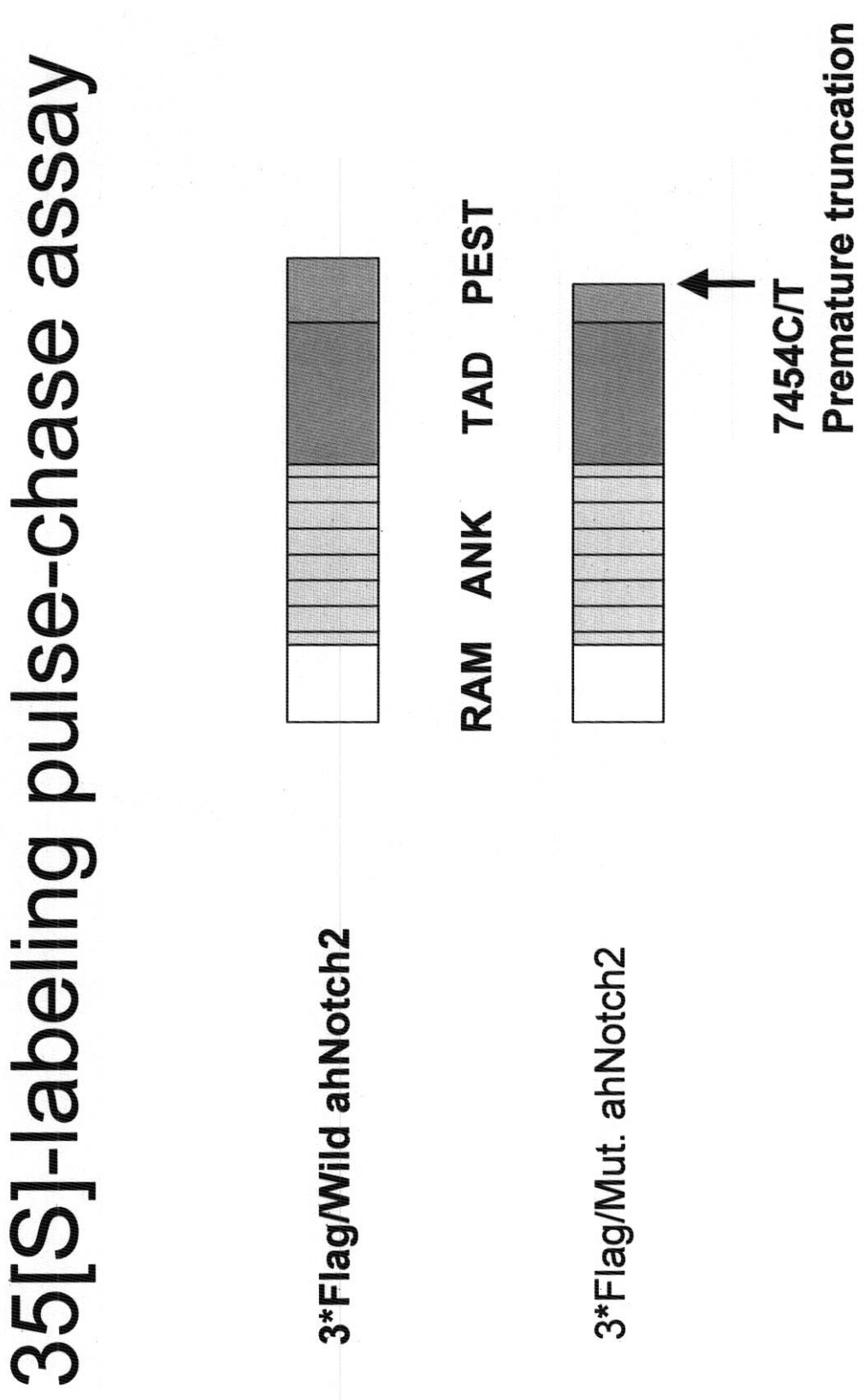
【図４】


FISH analysis
Ch1
RP11-723d17
RP11-80d6
Two-color FISH
Notch2

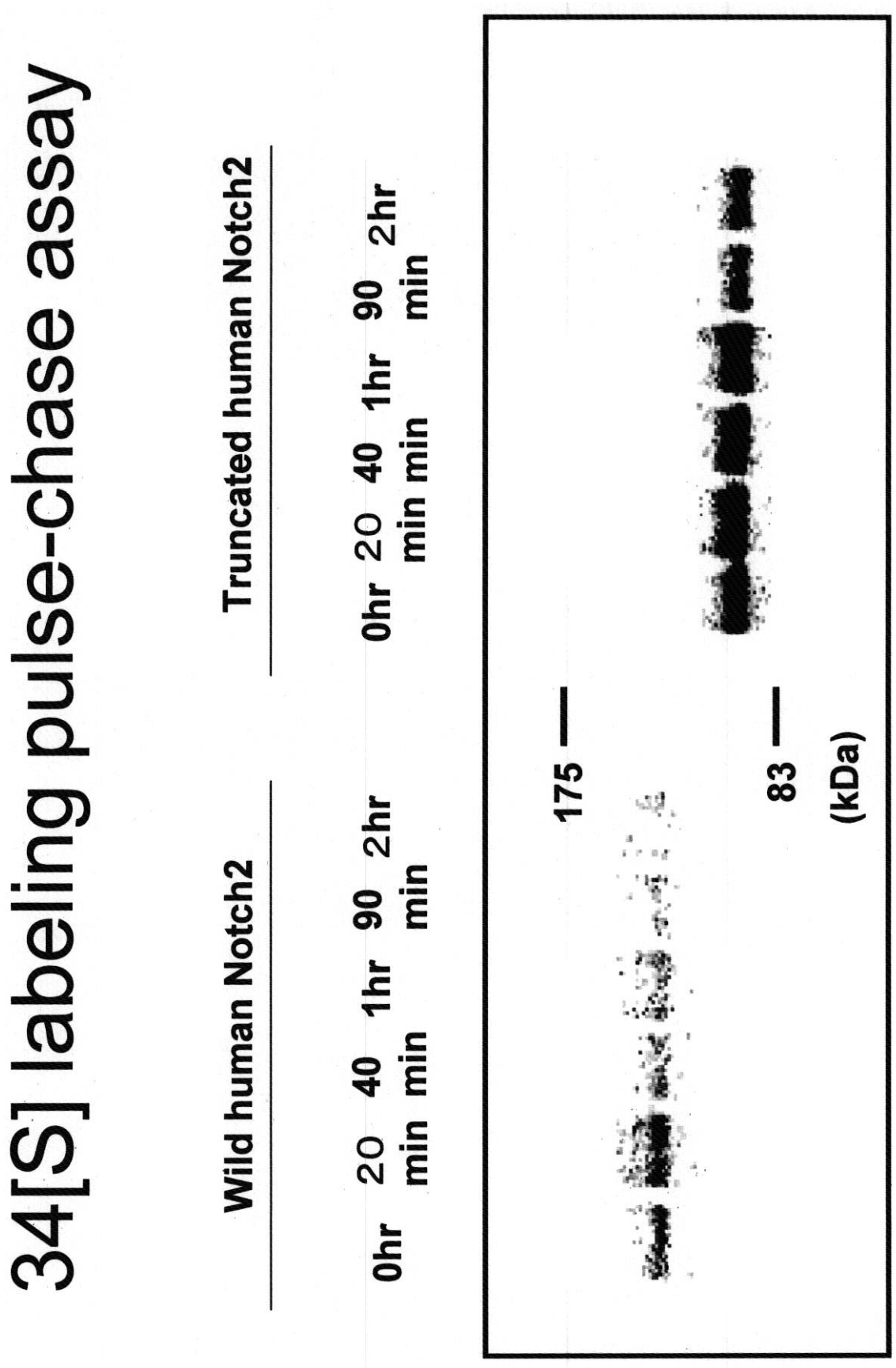
【図５】


Notch-sensitive luciferase assay
a
b
wtN2/CHO(r) cl.2
nsmN2/CHO(r) cl.2
rqN2/CHO(r)
Counts
200
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Relative luciferase activity
10
8
6
4
2
0
Responder
wtN2/CHO(r) cl.2
nsmN2/CHO(r) cl.2
rqN2/CHO(r)
Stimulator
CHO(r)
hD1/CHO(r)
CHO(r)
hD1/CHO(r)
CHO(r)
hD1/CHO(r)

【図６】


35[S]-labeling pulse-chase assay
3*Flag/Wild ahNotch2
RAM ANK TAD PEST
3*Flag/Mut. ahNotch2
7454C/T
Premature truncation

【図７】



【配列表】
2008228621000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　千葉　滋
東京都文京区本郷七丁目３番１号　国立大学法人東京大学内
(72)発明者　小川　誠司
東京都文京区本郷七丁目３番１号　国立大学法人東京大学内
(72)発明者　李　碩　瑛
東京都文京区本郷七丁目３番１号　国立大学法人東京大学内
(72)発明者　黒川　峰夫
東京都文京区本郷七丁目３番１号　国立大学法人東京大学内

Ｆターム(参考) 4B024 AA12 CA01 CA04 DA02 EA04 GA11 HA08 HA12
4B063 QA17 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QR08 QR32 QR36 QR42
QR50 QR55 QR62 QR66 QR73 QR77 QR80 QR82 QS03 QS25
QS28 QS34 QS36 QS39 QX02 QX07