

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4201203号  
(P4201203)

(45) 発行日 平成20年12月24日(2008.12.24)

(24) 登録日 平成20年10月17日(2008.10.17)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/25</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/25
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/68</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 11 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2004-541172 (P2004-541172)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成14年9月30日 (2002. 9. 30)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2006-500943 (P2006-500943A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成18年1月12日 (2006. 1. 12)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/JP2002/010167		T
(87) 国際公開番号	W02004/031408		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成16年4月15日 (2004. 4. 15)		グレンツァーヘルストラツセ124
審査請求日	平成17年9月29日 (2005. 9. 29)	(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一
		(72) 発明者	安野 秀之
			神奈川県横浜市港北区太尾町1999
		(72) 発明者	森 一茂
			神奈川県藤沢市大庭5203-20
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 チミジル酸シンターゼ遺伝子の遺伝子型判別のためのオリゴヌクレオチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1に示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド。

【請求項2】

チミジル酸シンターゼ遺伝子のプロモーター領域内のタンデムリピートの数を特定するインビトロの方法であって、以下を含む方法：

(a) チミジル酸シンターゼ遺伝子の少なくともプロモーター領域内のタンデムリピートを含むゲノムDNAを増幅する段階、

(b) 請求項1記載のオリゴヌクレオチドを、段階(a)の増幅されたゲノムDNAに、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせる段階、

(c) 該オリゴヌクレオチドと該ゲノムDNAとのハイブリダイゼーションを検出する段階、および

(d) ハイブリダイゼーションが検出されない場合にはタンデムリピートの数を「2」として特定し、ハイブリダイゼーションが検出された場合にはタンデムリピートの数を「3」として特定する段階。

【請求項3】

以下をさらに含む、請求項2記載の方法：

(e) 請求項1記載のオリゴヌクレオチドを、段階(a)の増幅されたゲノムDNAに、(b)よりもストリンジェンシーの低いハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズさせる段階

(f)該オリゴヌクレオチドと該ゲノムDNAとのハイブリダイゼーションを検出する段階、  
(g)ハイブリダイゼーションが(c)では検出されないが(f)では検出された場合、タンデムリピートの数を「2」として特定する段階、

(h)ハイブリダイゼーションが(c)では検出されたが(f)では検出されない場合、タンデムリピートの数を「3」として特定する段階、および

(i)ハイブリダイゼーションが(c)で検出されかつ(f)で検出された場合、タンデムリピートの数を「2」および「3」として特定する段階。

【請求項4】

ハイブリダイゼーションが融解曲線分析によって検出される、請求項2または3記載の方法。

10

【請求項5】

(i)5'末端が蛍光色素によって標識されている請求項1記載のオリゴヌクレオチド、および(ii)蛍光共鳴エネルギーを(i)のオリゴヌクレオチドの5'末端にある蛍光色素に転移させる異なる蛍光色素によって3'末端が標識されている、(i)のオリゴヌクレオチドの5'側に隣接した領域にハイブリダイズする第二のオリゴヌクレオチドを用いて、蛍光共鳴エネルギー転移を検出する段階を含む、請求項4記載の方法。

【請求項6】

(i)のオリゴヌクレオチドを標識する蛍光色素がRED640またはRED705であり、かつ(ii)のオリゴヌクレオチドを標識する蛍光色素がFITCである、請求項5記載の方法。

【請求項7】

20

対象のチミジル酸シターゼ遺伝子の遺伝子型判別を行うインビトロの方法であって、以下を含む方法：

(a)請求項3記載の方法によって、チミジル酸シターゼ遺伝子のプロモーター領域内のタンデムリピートの数を特定する段階、および

(b)タンデムリピートの数が2のみと特定された場合には対象のチミジル酸シターゼの遺伝子型が「ホモ接合型2R / 2R」、タンデムリピートの数が3のみと特定された場合には「ホモ接合型3R / 3R」、またはタンデムリピートの数が「2」と「3」の両方であると特定された場合には「ヘテロ結合型2R / 3R」であると決定する段階。

【請求項8】

チミジル酸シターゼを標的とする抗腫瘍剤に対する対象の応答性を予測するインビトロの方法であって、以下を含む方法：

30

(a)請求項7記載の方法によって、対象のチミジル酸シターゼの遺伝子型を決定する段階、および

(b)チミジル酸シターゼの遺伝子型を、チミジル酸シターゼを標的とする抗腫瘍剤に対する対象の応答性と関連付ける段階。

【請求項9】

癌患者を治療するために、チミジル酸シターゼを標的とする抗腫瘍剤の投与量および/または種類を決定するインビトロの方法であって、以下を含む方法：

(a)請求項7記載の方法によって、患者のチミジル酸シターゼの遺伝子型を決定する段階、および

40

(b)「ホモ接合型2R / 2R」患者に対しては(i)通常用いられる投与量よりも少ない投与量で抗腫瘍剤を投与するか、または(ii)異なる標的を有する抗腫瘍剤を用いるかということ判定する段階。

【請求項10】

チミジル酸シターゼ遺伝子のプロモーター領域内のタンデムリピートの数を特定するためのキットであって、以下を含むキット：

(i)請求項1記載のオリゴヌクレオチド、および

(ii)(i)のオリゴヌクレオチドの5'側に隣接した領域にハイブリダイズする第二のオリゴヌクレオチド。

【請求項11】

50

(i)のオリゴヌクレオチドの5'末端が蛍光色素RED640またはRED705で標識されていて、かつ(ii)のオリゴヌクレオチドの3'末端が蛍光色素FITCで標識されている、請求項10記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本発明は、チミジル酸シンターゼ遺伝子の遺伝子型判別 (genotyping) に関する。本発明はまた、チミジル酸シンターゼの遺伝子型に基づく、抗腫瘍剤に対する対象 (subject) の応答性の予測にも関する。

10

【背景技術】

【0002】

背景技術

5-フルオロウラシル (5-FU) は、長期にわたって抗腫瘍剤として利用されてきた化合物である (Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danenberg PV, Mooren Dら (1957) Fluorinated pyrimidines: a new class of tumor inhibitory compounds. Nature 179: 663.666)。種々の腫瘍に対する5-FUの抗腫瘍効果が報告されている。

【0003】

5-FUの細胞毒性効果は細胞におけるDNA合成の阻害に基づく。5-FUは腫瘍組織においてのみならず、非腫瘍組織においてもDNA合成を阻害する。しかし、腫瘍組織では非腫瘍組織と比べてはるかに活発なDNA合成が通常起こっているため、5-FUを介した抑制作用の明らかな影響は腫瘍組織の方が比較的大きいと考えられる。5-FUが腫瘍組織に対して抑制作用を発揮するのはこの機序による。

20

【0004】

一方、細胞毒性薬である5-FUの投与には、無視できない有害作用がしばしば伴う。5-FUの細胞毒性効果は腫瘍組織だけでなく非腫瘍組織の働きも失わせる。5-FUを投与された患者における5-FU感受性は、この薬剤の有害作用の規模と密接に関連すると考えられる。

【0005】

5-FUはチミジル酸シンターゼを標的とするDNA合成阻害剤である。チミジル酸シンターゼは、デオキシウリジル酸のデオキシチミジル酸への細胞内における変換を触媒する。デオキシチミジル酸は、DNA合成のための必須前駆物質であるチミジル酸の唯一のデノボ供給源である (Danenberg PV (1997) Thymidylate synthase, a target enzyme in cancer. Biochim Biophys Acta 473: 73.92)。

30

【0006】

チミジル酸シンターゼ遺伝子のプロモーターは多型であることが示されている (Nobuyuki H, Masahiko C, Ryushi N, Keiichi T (1993) Characterization of the regulatory sequences and nuclear factors that function in cooperation with the promoter of the human thymidylate synthase gene. Biochim Biophys Acta 1216: 409.416)。さらに、チミジル酸シンターゼ遺伝子プロモーターの多型が、5-FUに対する対象の応答と関連付けられることが示されている。ヒトチミジル酸シンターゼ遺伝子はその調節領域に28bp配列のタンDEMリピートを2つまたは3つ含む多型を有する。3つのタンDEMリピートのホモ接合型であるチミジル酸シンターゼ遺伝子の発現レベルは、2つのタンDEMリピートのホモ接合型であるチミジル酸シンターゼ遺伝子の発現レベルの3.6倍である。その結果、3つのタンDEMリピートを有する対象の方が有害作用が有意に少ない (Pullarkat, ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong Yら (2001) Thymidylate synthase gene polymorphism determines clinical outcome of patients with colorectal cancer treated with fluoropyrimidine chemotherapy. Pharmacogenomics J 1: 65.70)。

40

【0007】

チミジル酸シンターゼは、5-FUだけでなく他の抗腫瘍剤の重要な標的でもある。例えば、5-FUの経口プロドラッグとして開発されたカペシタピンもチミジル酸シンターゼを標的

50

とする。このことから、ヒトチミジル酸シターゼ遺伝子の調節領域における多型は、抗腫瘍剤に対する対象の応答性を決定するための有用なマーカーとなることが示唆された。

【発明の開示】

【0008】

発明の開示

本発明の1つの目的は、チミジル酸シターゼ遺伝子の遺伝子型判別を行う方法を提供することである。特に、チミジル酸シターゼ遺伝子の遺伝子型判別に適したオリゴヌクレオチドを提供する。本発明のもう1つの目的は、チミジル酸シターゼの遺伝子型に基づいて、チミジル酸シターゼを標的とする抗腫瘍剤に対する対象の応答性を予測する方法を提供することである。

10

【0009】

チミジル酸シターゼ遺伝子のプロモーター領域におけるタンデムリピートの多型は、チミジル酸シターゼを標的とする抗腫瘍剤に対する対象の応答性と関係していることが知られている。したがって、この多型を分析することにより、抗腫瘍剤の有効性または有害作用の度合いを予測することができる。多型は一般に、ゲノムDNAを増幅して、アンプリコンのサイズを分析することによって決定される。PCRによって増幅されたアンプリコンのサイズはゲル電気泳動によって分析される。しかし、ゲル電気泳動は手間も時間もかかる分析技法である。チミジル酸シターゼを標的とする抗腫瘍剤は癌の化学療法において重要な薬剤である。このため、チミジル酸シターゼを標的とする抗腫瘍剤に対する対象の応答性に関する情報がより簡便に得られる方法が求められている。

20

【0010】

チミジル酸シターゼ遺伝子のプロモーター領域内のタンデムリピートの数を特定する方法に関して、広範囲にわたる研究が本発明者らによって実施された。その結果、本発明者らは、特定のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドをプローブとして用い、その中のミスマッチを検出することによって、ゲノムDNA中のタンデムリピートの数を特定しうることを見いだした。さらに、本発明者らは、以上のようにして明らかになったタンデムリピートの数に基づいて対象の遺伝子型を決定しうること確かめた。さらに、本発明者らは、本発明によって決定されたチミジル酸シターゼの遺伝子型を、チミジル酸シターゼを標的とする抗腫瘍剤に対する対象の応答性と関連付けることにより、患者における癌を治療するための戦略を計画することが可能であることを見いだした。

30

【0011】

すなわち、本発明は、

(a)(i)チミジル酸シターゼ遺伝子のプロモーター領域内のタンデムリピートを構成する3つのリピートユニットのうち中央のリピートユニット、および

(ii)前記中央のリピートユニットの下流に位置するリピートユニット、  
からなる領域に対して相補的なヌクレオチド配列を含む、ならびに

(b)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で(a)の領域とハイブリダイズする、

単離されたオリゴヌクレオチドを提供する。

【0012】

前述の通り、チミジル酸シターゼ遺伝子のプロモーター領域内のタンデムリピートは多型である。すなわち、2つのリピートユニットからなるタンデムリピートと3つのリピートユニットからなるタンデムリピートの2種類のタンデムリピートの存在が明らかにされている。本明細書で言及する「タンデムリピート(tandem repeat)」とは、類似のヌクレオチド配列が2以上繰り返して連続的している領域のことを指す。反復性の類似のヌクレオチド配列はリピートユニットと呼ばれる。一般に、繰り返しの数は2以上である。本発明において、特定すべき繰り返しの数は2および3である。本明細書では以下、3つのリピートユニットがタンデムリピートを構成する多型形態を3Rと記載する。さらに、2つのリピートユニットがタンデムリピートを構成する多型形態を2Rと記載する。これらの多型形態のヌクレオチド配列はDNAデータベース中で見つけることができる(3R: GenBankアク

40

50

セッション番号AF279906、2R：GenBankアクセッション番号AF279907)。本発明のオリゴヌクレオチドは、これらの多型形態のうち3Rの中央のリピートユニットと中央のリピートユニットの下流に位置するリピートユニットの2つのユニットを含む領域を構成するヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列を有する。より詳細には、GenBankアクセッション番号AF279906に開示されたヌクレオチド配列の132～193が、上記の(a)で示した領域である。本発明において、相補的ヌクレオチド配列とは、具体的には以下の2種類のヌクレオチド配列を含む：

(1)あるヌクレオチド配列に対してワトソン-クリックの法則に従って相補的であることが決定されたヌクレオチド配列、または

(2)(1)のヌクレオチド配列に対して80%またはそれ以上の相同性を有するヌクレオチド配列。

【0013】

(2)は、好ましくは(1)のヌクレオチド配列に対して90%以上、より好ましくは95%以上、さらにより好ましくは97%以上の相同性を有するヌクレオチド配列を含む。ヌクレオチド配列の相同性を決定するためのアルゴリズムは公知である。例えば、ヌクレオチド配列の相同性をBLASTを用いて計算するためのアルゴリズムが実用化されている。これらのプログラムはインターネットを介して利用することができる。

【0014】

本発明者らは、このようなヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドを同一条件下でゲノムDNAとハイブリダイズさせたときにこの2種類の多型形態を識別しうることを見だし、本発明を完成させた。すなわち、このオリゴヌクレオチドは、同一条件下で3Rタンデムリピートとは結合するが2Rとはハイブリダイズしない。

【0015】

さらに、本発明のオリゴヌクレオチドは、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でこの領域とハイブリダイズする。本発明において、「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」は、以下の(1)および(2)の条件を同時に満たすことによつて達成される。なお、「実質的にハイブリダイズしない」とは、下記の(1)と同じ条件下でハイブリダイゼーションが検出されないことを意味する：

(1)あるオリゴヌクレオチドが(a)の領域にハイブリダイズし、かつ

(2)そのオリゴヌクレオチドは、その遺伝子のもう1つの多型形態である、2つのリピートユニットからなるタンデムリピートとは実質的にハイブリダイズしない。

【0016】

本発明において、好ましいオリゴヌクレオチドは、チミジル酸シターゼ遺伝子のプロモーター領域内のタンデムリピートを構成する2つのリピートユニットの3'末端リピートユニットに、(b)よりもストリンジェントな低いハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。このオリゴヌクレオチドは本発明の融解曲線分析のために有用である。

【0017】

上記の条件を満たすオリゴヌクレオチドは本発明において変異プローブと記載することがある。チミジル酸シターゼ遺伝子のプロモーターを構成する複数のリピートユニットは完全に同一ではない。チミジル酸シターゼ遺伝子のプロモーター領域におけるタンデムリピートを構成する3つのリピートユニットのそれぞれのヌクレオチド配列を以下に示す。

```
5' -ccgcgccacttggcctgcctccgtcccg
    ccgcgccacttgcctgcctccgtcccg
    ccgcgccacttgcctgcctccgtccccgcccg-3'
```

【0018】

したがって、特定のリピートユニットにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドが他のリピートユニットにハイブリダイズしない場合もありうる。本発明のオリゴヌクレオチドはこのような現象を利用してデザインされた。好ましい本発明のオリゴヌクレオチドは、配列番号：1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドである。関心対象のヌクレオ

10

20

30

40

50

チド配列を有するオリゴヌクレオチドを合成する方法は当業者に周知である。

【0019】

本発明のオリゴヌクレオチドは、チミジル酸シンターゼ遺伝子のプロモーター領域内のタンデムリピートの数を特定するために用いることができる。すなわち、本発明は、チミジル酸シンターゼ遺伝子のプロモーター領域内のタンデムリピートの数を特定する方法であって、以下の段階を含む方法に関する：

(a)チミジル酸シンターゼ遺伝子の少なくともプロモーター領域内のタンデムリピートを含むゲノムDNAを増幅する段階、

(b)本発明のオリゴヌクレオチドを、段階(a)の増幅されたゲノムDNAに、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせる段階、

(c)前記オリゴヌクレオチドと前記ゲノムDNAとのハイブリダイゼーションを検出する段階、および

(d)ハイブリダイゼーションが検出されない場合にはタンデムリピートの数を「2」として特定し、ハイブリダイゼーションが検出された場合にはタンデムリピートの数を「3」として特定する段階。

【0020】

好ましくは、本発明の方法はさらに以下を含む：

(e)本発明のオリゴヌクレオチドの、段階(a)の増幅されたゲノムDNAへの、(b)よりもストリンジェンシーの低いハイブリダイゼーション条件下でのハイブリダイゼーション、

(f)前記オリゴヌクレオチドと前記ゲノムDNAとのハイブリダイゼーションを検出する段階、および

(g)ハイブリダイゼーションが(c)では検出されないが(f)では検出された場合に、タンデムリピートの数を「2」として特定する段階。

【0021】

本発明において、ゲノムDNAは、チミジル酸シンターゼ遺伝子のプロモーター領域内のタンデムリピートの数を特定しようとする対象由来の生物試料から入手することができる。例えば、対象から採取した血液細胞からゲノムDNAを得るための方法は公知である。DNAをヌクレオチド配列特異的な様式で増幅することができる任意の方法を、ゲノムDNAの増幅に用いることができる。一般に、ゲノムDNAの増幅にはPCR法が用いられる。DNAの増幅においては、チミジル酸シンターゼ遺伝子の少なくともプロモーター領域内のタンデムリピートを含む任意の領域が増幅されればよい。より詳細には、タンデムリピートを含む少なくとも90bpのゲノムDNAを増幅すべき領域として選択することができる。例えば、後に述べるLightCyclerを用いて融解曲線分析によってハイブリダイゼーションを検出する場合、増幅すべきDNAの長さは、通常700bp以下である。

【0022】

チミジル酸シンターゼ遺伝子のプロモーター領域内のタンデムリピートの数を特定するための本発明の方法は、変異プローブを増幅されたゲノムDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせる段階を含む。変異プローブは、チミジル酸シンターゼ遺伝子のプロモーター領域における多型形態のうち3Rには結合するが2Rには結合しない。したがって、変異プローブのハイブリダイゼーションを指標として用いることで、タンデムリピートの数を決定することができる。変異プローブのハイブリダイゼーションを検出するためには、DNAのハイブリダイゼーションを検出するための任意の方法を利用することができる。

【0023】

本発明においては、融解曲線分析が、DNAのハイブリダイゼーションを利用してヌクレオチド配列の違いを検出するための好ましい方法である。あるオリゴヌクレオチドが、相補配列を有するポリヌクレオチドに結合する。DNAハイブリダイゼーションは配列特異的であるが、極めて類似性の高いヌクレオチド配列に対するハイブリダイゼーションを完全に除外することは困難である。融解曲線分析は、ハイブリダイゼーションの変化を融解温度(T<sub>m</sub>)の変化に基づいて検出する方法である。互いに相補的なヌクレオチド配列のハイ

10

20

30

40

50

ブリダイゼーションによって形成された二本鎖DNA ( dsDNA ) は、温度が上昇すると徐々に解離して一本鎖DNA ( ss DNA ) となる。ds DNAからss DNAへの変化と温度変化との関係をグラフ上にプロットすると、ss DNAへの変化は直線的ではなく、特定の温度で急激に起こる。ss DNAへのこの急激な変化が起こる温度が $T_m$ である。 $T_m$ は、ヌクレオチド配列およびそのDNAが存在する溶液の組成といった種々の要因に応じて変化する。しかし、特定の条件下では、ヌクレオチド配列に違いがある場合、 $T_m$ はヌクレオチド配列に依存して明らかに変化する。このため、あるオリゴヌクレオチドの標的配列に対する $T_m$ の違いは、標的配列の違いがたとえわずかであっても容易に検出することができる。融解曲線分析は、以上のようにして検出される $T_m$ の違いに基づいて、ヌクレオチド配列のわずかな違いの高感度検出を容易にする方法である。

10

## 【 0 0 2 4 】

融解曲線分析に基づいて本発明の方法を実施するために、3Rおよび2Rに対する変異プローブの $T_m$ の違いを検出してもよい。融解曲線分析では、標的配列に対する変異プローブのハイブリダイゼーションを観察する必要がある。ハイブリダイゼーションを観察するための方法に制限はない。本発明において、ハイブリダイゼーションを観察するための好ましい方法には、蛍光共鳴エネルギー転移 ( FRET ) 法の適用が含まれる。FRETは、標的配列上で隣接した領域にハイブリダイズする2つのオリゴヌクレオチドがハイブリダイゼーションによって互いに近接するという事実を利用してハイブリダイゼーションを検出するための方法である。2つの隣接したオリゴヌクレオチドの末端は、ドナーまたはアクセプターとして機能する異なるフルオロフォア ( fluorophore ) によって標識されている。この2つ

20

## 【 0 0 2 5 】

FRETを本発明の方法に対して適用するためには、変異プローブのハイブリダイゼーションを検出するために変異プローブに隣接した領域にハイブリダイズする、第2のオリゴヌクレオチドが必要である。本発明者らは、前記の特性(a)および(b)を有するオリゴヌクレオチドを変異プローブとして用いる場合、その5'側にハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチドが第2のオリゴヌクレオチドとして有用であることを見いだした。より詳細には、本発明は

(a)(i)チミジル酸シンターゼ遺伝子のプロモーター領域内のタンデムリピートを構成する3つのリピートユニットのうち中央のリピートユニット、および

30

(ii)前記中央のリピートユニットの下流に位置するリピートユニット、  
からなる領域に対して相補的なヌクレオチド配列を含む、ならびに

(b)(a)の領域とハイブリダイズする、  
というオリゴヌクレオチドの5'側に隣接した領域にハイブリダイズする、単離されたオリゴヌクレオチドに関する。

## 【 0 0 2 6 】

本発明において、「オリゴヌクレオチドの5'側に隣接した領域」とは、標的ヌクレオチド上においてオリゴヌクレオチドがハイブリダイズする領域の5'側の領域のことを指す。「に隣接した」とは、オリゴヌクレオチドの末端と第2のオリゴヌクレオチドが、0~10塩基、好ましくは0~5塩基離れて隣接している場合を含む。本発明において、FRETのための第2のオリゴヌクレオチドを用いる場合、アンカープローブと呼ぶことがある。アンカープローブの $T_m$ は3Rタンデムリピートに対する変異プローブの $T_m$ と同等、またはそれ以上であることが好ましい。ゲノムDNAと各プローブとの関係を図1に示した。

40

## 【 0 0 2 7 】

変異プローブのハイブリダイゼーションは、PCRを行いながらFRETによって観察することができる。すなわち、ゲノムDNAを増幅しながら変異プローブのハイブリダイゼーションを検出することができる。PCRの最中に変異プローブのハイブリダイゼーションを検出するためには、変異プローブおよびアンカープローブの $T_m$ をアンプリコンに対するハイブリダイゼーションがPCRのアニーリング段階で起こるようにデザインすることが好ましい

50

。T<sub>m</sub>を適切な範囲に調整するために、変異プローブおよびアンカープローブのヌクレオチド配列にミスマッチ塩基を導入することができる。さらに、DNAポリメラーゼによるプローブの伸長を防止するために、各プローブの3'末端を修飾することが好ましい。例えば、5'末端がフルオロフォアで標識されているオリゴヌクレオチドを、リン酸化によってその3'末端を修飾してもよい。

【0028】

PCR中の変異プローブのハイブリダイゼーションを検出するためにFRETを用いる装置が市販されている。例えば、LightCycler（商標）には、FRETによってPCRアンプリコンを分析するために必要なメカニズムおよびソフトウェアが備わっている。このような装置を用いて本発明を実施することができる。以下に、本発明の方法を、変異プローブおよびアンカープローブを用いてLightCycler（商標）によって本発明の方法を実施するための具体的なプロトコルを述べる。

10

【0029】

チミジル酸シンターゼ遺伝子の少なくともプロモーター領域内のタンDEMリピートを含むゲノムDNAを、特異的プライマーを用いてヒトゲノムDNAから増幅する。変異プローブおよびアンカープローブをハイブリダイゼーションプローブの特異的な対として用いてこのアンプリコンを蛍光によって検出する。ハイブリダイゼーションプローブは、PCRサイクルのアニリング段階の際に増幅断片の内部配列にハイブリダイズする異なる2つの短いオリゴヌクレオチドからなる。一方のプローブ（変異プローブ）は5'末端がLightCycler-Red 640で標識されており、その3'末端は伸長を防止するためにリン酸化によって修飾される。第2のプローブ（アンカープローブ）は3'末端をフルオレセインで標識されている。この2つのプローブはテンプレートDNAに対するハイブリダイゼーションによって初めて近接し、その結果、2つのフルオロフォアの間で蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）が起こる。FRETの過程では、ドナーフルオロフォアであるフルオレセインがLightCycler装置の光源によって励起され、励起エネルギーの一部がアクセプターフルオロフォアであるLightCycler-Red 640へと転移する。続いて、発せられたLightCycler-Red 640の蛍光をLightCycler装置によって測定する。

20

【0030】

本発明のオリゴヌクレオチドは、増幅サイクルが完了してアンプリコンが形成された後に融解曲線分析を行うことによって遺伝子型を決定するためにも用いられる。

30

【0031】

フルオレセイン標識された本発明のオリゴヌクレオチドは、変異していない標的配列の部分にハイブリダイズし、アンカープローブとして機能する。

【0032】

LightCycler-Red640で標識されたもう一方のオリゴヌクレオチドはリピートユニットにかかる（span）（変異プローブ）。この後者のプローブはアンカープローブよりも融解温度（T<sub>m</sub>）が低く、そのために融解曲線分析の際に生じた蛍光シグナルを変異プローブのみによって確実に決定することができる。T<sub>m</sub>は、変異プローブおよびテンプレートDNAの長さおよびG+C含有量だけでなく、変異プローブとテンプレートDNAとの相同性の程度にも依存する。2R型タンDEMリピートが存在する場合には、変異プローブと標的とのミスマッチによってそのハイブリッドが不安定化する。3R型タンDEMリピートの場合にはミスマッチが起こらず、ハイブリッドのT<sub>m</sub>はより高くなる。温度を緩徐に上昇させ、変異プローブが融解解離すると、2つの蛍光色素は近接状態ではなくなり、蛍光が減少する。変異した遺伝子型の場合には、これが野生型の遺伝子型よりも低い温度で起こると考えられる。

40

【0033】

チミジル酸シンターゼの5R型タンDEMリピートが最近報告されている（Luo HR, Lu XM, Yao YG, Horie N, Takeishi K, Jorde LB, Zhang YP. (2002) Length polymorphism of thymidylate synthase regulatory region in hinese populations and evolution of the novel alleles. Biochem Genet 40(1-2): 41-51）。本発明の変異プローブは3R型のものに加えて5R型タンDEMリピートともハイブリダイズすると考えられる。しかし、このプ

50

ローブが3R型と5R型を識別できるか否かは重大な違いを生まない。本発明における遺伝子型判別および応答性の予測は、このプローブが応答性の高い2R型を他の多型タイプと識別しうる限り実施することができる。

【0034】

上記の通りに、本発明により決定されたタンデムリピートの数に基づいてチミジル酸シタターゼ遺伝子の遺伝子型を明らかにする。より詳細には、本発明は、対象のチミジル酸シタターゼ遺伝子の遺伝子型判別を行う方法であって、以下を含む方法を提供する：

(a)本発明の方法によって、チミジル酸シタターゼ遺伝子のプロモーター領域内のタンデムリピートの数を特定する段階、および

(b)タンデムリピートの数が2のみと特定された場合には対象のチミジル酸シタターゼの遺伝子型が「ホモ接合型2R/2R」、タンデムリピートの数が3のみと特定された場合には「ホモ接合型3R/3R」、またはタンデムリピートの数が「2」と「3」の両方であると特定された場合には「ヘテロ結合型2R/3R」であると決定する段階。

【0035】

LightCyclerを他の遺伝子の遺伝子型判別のために用いた報告がある (Nicolas Von Ahsenら、Clinical Chemistry 46: 12, 1939-1945 (2000)、DNA base bulge vs unmatched end formation in probe-based diagnostic insertion/deletion genotyping: Genotyping the UGT1A1 (TA)<sub>n</sub> polymorphism by real-time fluorescence PCR)。しかし、本発明より以前に、LightCyclerはチミジル酸シタターゼ遺伝子の遺伝子型判別のために用いられていない。

【0036】

明らかにされたチミジル酸シタターゼの遺伝子型に基づいて、チミジル酸シタターゼを標的とする抗腫瘍剤に対する対象の応答性を予測することができる。より詳細には、本発明は、チミジル酸シタターゼを標的とする抗腫瘍剤に対する対象の応答性を予測する方法であって、以下を含む方法を提供する：

(a)本発明の方法によって、対象のチミジル酸シタターゼの遺伝子型を決定する段階、および

(b)チミジル酸シタターゼの遺伝子型を、チミジル酸シタターゼを標的とする抗腫瘍剤に対する対象の応答性と関連付ける段階。

【0037】

本発明において、「チミジル酸シタターゼを標的とする抗腫瘍剤に対する対象の応答性を予測する」とは、ある特定の患者および/または患者から採取された腫瘍組織に対する、チミジル酸シタターゼを標的とする抗腫瘍剤の細胞毒性活性の程度の予測を指す。前述の通り、チミジル酸シタターゼの遺伝子型は、チミジル酸シタターゼの発現レベルを決定する大きな要因の一つである。さらに、チミジル酸シタターゼの発現レベルは、チミジル酸シタターゼを標的とする抗腫瘍剤に対する対象の応答性と関連付けられている。すなわち、チミジル酸シタターゼの発現レベルはこの応答性と逆相関する。したがって、遺伝子型と応答性を相関付けることができる。具体的には、本発明によれば、チミジル酸シタターゼの遺伝子型がホモ接合型2R/2Rであると決定された対象は応答性が高いと予想される。すなわち、この対象では、チミジル酸シタターゼを標的とする抗腫瘍剤の細胞毒性活性が高いことが予想される。一方、その遺伝子型が2R/3Rヘテロ接合型または3R/3Rホモ接合型であると決定された対象は、応答性が正常であると予想される。すなわち、この対象では、チミジル酸シタターゼを標的とする抗腫瘍剤の細胞毒性活性が正常であることが予想される。「正常な細胞毒性活性」とは、薬剤を通常の投与プロトコールに従って投与した場合に重篤な薬物有害作用の可能性が高くない状態のことを指す。または、これは、投与量が通常の投与プロトコールに準じた投与量でなければ、薬剤の腫瘍組織に対する抑制作用が期待できない状態のことを指す。

【0038】

本発明において、チミジル酸シタターゼを標的とする抗腫瘍剤には、チミジル酸シタターゼの活性を直接的または間接的に調節する作用を有する抗腫瘍剤が含まれる。5-FU系抗

腫瘍剤の作用機序の一つは、その代謝産物であるFdUMPによってチミジル酸シンターゼの活性を阻害することである。チミジル酸シンターゼは5-FU系抗腫瘍剤の直接的な標的酵素である。一方、白血病などの処置のために用いられるメトトレキサートに対する応答性もチミジル酸シンターゼの遺伝子型と関連があると考えられている (The Lancet Vol.359, 1033-1034, March 23, 2002)。メトトレキサートはジヒドロ葉酸レダクターゼの阻害剤である。これに対して、チミジル酸シンターゼによって触媒される反応はジヒドロ葉酸の還元を要求する。すなわち、メトトレキサートは、チミジル酸シンターゼを間接的に阻害する抗腫瘍剤である。本発明の方法は、チミジル酸シンターゼに対して間接的な阻害作用を有するこのような抗腫瘍剤に対する応答性を予測することができる。本発明の方法によって応答性を予測しうる抗腫瘍剤の例として、5-FU、カルモフル、テガフル、UFT、S-1、ドキシフルリジン、カペシタピン、フルダラピン、メトトレキサート、ロイコボリンおよびレボホリナートがある。

10

## 【0039】

このようにして決定された応答性に基づいて、癌に対する癌化学療法をデザインすることができる。より詳細には、本発明は、癌患者を処置するために、チミジル酸シンターゼを標的とする抗腫瘍剤の投与量および/または種類を決定する方法であって、以下を含む方法を提供する：

(a)本発明の方法によって、患者のチミジル酸シンターゼの遺伝子型を決定する段階、および

(b)「ホモ接合型2R/2R」患者に対しては(i)通常用いられる投与量よりも少ない投与量で抗腫瘍剤を投与するか、または(ii)異なる標的を有する抗腫瘍剤を用いるかということ

20

## 【0040】

チミジル酸シンターゼを標的とする抗腫瘍剤に対する応答性が高いことが予測された患者に対しては、抗腫瘍剤の投与量を減したり、または異なる標的を有する抗腫瘍剤を選択することが推奨される。その結果として、患者を薬物有害作用に曝す危険性を減らすことができる。

## 【0041】

さらに、本発明は、チミジル酸シンターゼ遺伝子のプロモーター領域内のタンデムリピートの数を特定するためのキットであって、以下を含むキットも提供する：

30

(a)配列番号：1のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド、および

(b)配列番号：2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド。

## 【0042】

前述の通り、本発明のキットを構成するオリゴヌクレオチドは、FRETのためのフルオロフォアで標識することができる。さらに、付加的な要素を本発明のキットと組み合わせることもできる。付加的な要素の例としては以下のものがある：

ハイブリダイゼーションバッファー、

2Rおよび/または3Rの結果が得られる対照試料、ならびに

PCR用のDNAポリメラーゼおよび物質。

## 【0043】

本明細書中に引用した特許、特許出願および刊行物はいずれも参照として組み入れられる。

40

## 【0044】

発明を実施するための最良の態様

## 1) DNAの抽出

ゲノムDNAをヒト全血100  $\mu$ lから精製した。精製のためにはGFX (商標) Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いた。

## 【0045】

2) PCRプライマー-FW、PCRプライマー-REV、ハイブリダイゼーションプローブ(アンカー)およびハイブリダイゼーションプローブ(変異)の配列：

50

PCRフォワードプライマーの配列 5'-GTG GCT CCT GCG TTT CCC C-3'

PCRリバースプライマーの配列 5'-TCC GAG CCG GCC ACA GGC AT-3'

ハイブリダイゼーションプローブ(アンカー)の配列 5'-CGC GGA AGG GGT CCT GCC ACC GCG CCA CTT GGC CTG CCT CGG TCC CGC CG-FITC-3'

ハイブリダイゼーションプローブ(変異)の配列 5'-LCRed640-CTT GGC CTG CCT CCG TCC CGC CGC GCC-リン酸化-3'

【0046】

プライマーは株式会社サワディー・テクノロジーにより合成され、プローブは株式会社日本遺伝子研究所により合成された。

【0047】

10

### 3) PCR混合物の調製

LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics) を用いた。PCR混合物は以下の組成物から調製した。

<b>PCR</b> グレード蒸留水(キットに添付)	<b>5.4 <math>\mu</math>l</b>	
<b>10 <math>\mu</math>M</b> フォワードプライマー	<b>1 <math>\mu</math>l</b> (最終濃度 <b>0.5 <math>\mu</math>M</b> )	
<b>10 <math>\mu</math>M</b> リバースプライマー	<b>1 <math>\mu</math>l</b> (最終濃度 <b>0.5 <math>\mu</math>M</b> )	
<b>4 pmol/<math>\mu</math>l</b> ハイブリダイゼーションプローブ(アンカー)	<b>1 <math>\mu</math>l</b>	
<b>4 pmol/<math>\mu</math>l</b> ハイブリダイゼーションプローブ(変異)	<b>1 <math>\mu</math>l</b>	
<b>25 mM MgCl<sub>2</sub></b> (キットに添付)	<b>2.4 <math>\mu</math>l</b> (最終濃度 <b>4 mM</b> )	
<b>DMSO</b>	<b>1.2 <math>\mu</math>l</b>	
ハイブリダイゼーションマスターミックス(キットに添付)	<b>2 <math>\mu</math>l</b>	
ヒト血液ゲノム <b>DNA</b> 溶液	<b>5 <math>\mu</math>l</b>	総容量 <b>20 <math>\mu</math>l</b>

20

【0048】

### 4) LightCyclerを用いたPCR

LightCyclerを用いるPCRのための実験プロトコール  
実験プロトコール

30

プログラム セグメント 番号	変性 標的 温度 (°C)	保持 時間 (秒)	タイプ 勾配 (°C/秒)	なし 2°標的 温度 (°C)	ステップ サイズ (°C)	サイクル数 ステップ ディレイ (サイクル)	1 取り込み モード なし
1	95	300	20	0	0	0	なし
プログラム セグメント 番号	PCR 標的 温度 (°C)	保持 時間 (秒)	タイプ 勾配 (°C/秒)	定量 2°標的 温度 (°C)	ステップ サイズ (°C)	サイクル数 ステップ ディレイ (サイクル)	33 取り込み モード なし 一回 なし
1	95	15	20	0	0	0	なし
2	58	5	20	0	0	0	一回
3	72	12	20	0	0	0	なし
プログラム セグメント 番号	融解 標的 温度 (°C)	保持 時間 (秒)	タイプ 勾配 (°C/秒)	融解曲線 2°標的 温度 (°C)	ステップ サイズ (°C)	サイクル数 ステップ ディレイ (サイクル)	1 取り込み モード なし なし なし なし 連続
1	95	3	20	0	0	0	なし
2	77	30	0.5	0	0	0	なし
3	70	30	0.2	0	0	0	なし
4	56	30	0.2	0	0	0	なし
5	95	0	0.1	0	0	0	連続
プログラム セグメント 番号	冷却 標的 温度 (°C)	保持 時間 (秒)	タイプ 勾配 (°C/秒)	なし 2°標的 温度 (°C)	ステップ サイズ (°C)	サイクル数 ステップ ディレイ (サイクル)	1 取り込み モード なし
1	40	30	20	0	0	0	なし

10

20

## 【 0 0 4 9 】

## 5) LightCyclerを用いた融解曲線分析

分析はLightCyclerの融解曲線プログラムを用いることによって実施した。蛍光はF2/F1に設定した。「ステップ1：融解ピーク」の「計算方法」は「バックグラウンド補正付きの直線」に設定した。ベースラインの調整のために、低温側にあるカーソル（緑色）を62前後に設定し、高温側にあるカーソルを83前後に設定した。融解ピーク面積の計算のために「ステップ2：ピーク面積」を選択し、各試料に関してTm値、ピーク面積および標準偏差を得るためにピークの数を選択した。

30

## 【 0 0 5 0 】

## 6) 決定

ピークTm値が68～70のみであった配列を2R/2Rホモ接合型と決定し、ピークTm値が76～79のみであった配列を3R/3Rホモ接合型と決定した。両方のTm値が得られた配列は2R/3Rヘテロ接合型と決定した。

## 【 0 0 5 1 】

産業上の利用可能性

チミジル酸シンターゼ遺伝子の遺伝子型判別を行うためのオリゴヌクレオチドを提供する。チミジル酸シンターゼ遺伝子のプロモーター領域内のタンデムリピートの数は、オリゴヌクレオチドのゲノムDNAへのハイブリダイゼーションに基づいて特定することができる。ハイブリダイゼーションに基づく特定はゲル電気泳動に比べて簡単で、かつ迅速である。本発明のオリゴヌクレオチドを用いると、ミスマッチを指標として容易にタンデムリピートの数を特定しうる。

40

## 【 0 0 5 2 】

したがって、チミジル酸シンターゼ遺伝子の遺伝子型をタンデムリピートの数に基づいて決定することができる。この遺伝子型は、チミジル酸シンターゼを標的とする抗腫瘍剤に対する対象の応答性と関連がある。このため、本発明に基づき、チミジル酸シンターゼを標的とする抗腫瘍剤に対する応答性を予測することが可能である。さらに、本発明に従って予測された応答性に基づいて、癌に対する化学療法をデザインすることができる。より詳細には、チミジル酸シンターゼを標的とする抗腫瘍剤に対する応答性が高いことが予

50

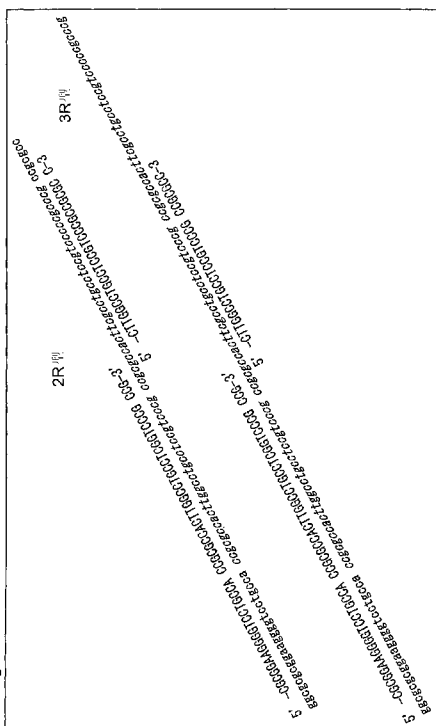
測された患者に対しては、抗腫瘍剤の投与量を減らすこと、または異なる標的を有する抗腫瘍剤を選択することが推奨される。その結果として、患者を薬物有害作用に曝す危険性を減らすことができる。

【図面の簡単な説明】

【0053】

【図1】2Rおよび3Rのタンデムリピートと、そのタンデムリピートとハイブリダイズする2つのプローブとの関係を示している。図中のヌクレオチド配列は、アンカープローブ（上）、ゲノムDNAのタンデムリピート（中）および変異プローブ（下）を示している。リピートユニットの配列はイタリック体になっている。各リピートユニットはスペースで区切られている。配列の検証が容易となるように、すべての配列はセンス鎖の配列として示している。実際には、ゲノムDNAおよび各プローブのいずれか一方はアンチセンス配列である。

【図1】



【配列表】

0004201203000001.app

---

フロントページの続き

審査官 引地 進

(56)参考文献 特開2002-191384(JP,A)

国際公開第01/036686(WO,A1)

Luo, H.-R. et al., Length Polymorphism in thymidylate synthase regulatory region: Allele Frequency in Chinese Populations and evolution of the Novel Allele, Database GenBank [online], 2001年 2月14日, Accession No.AF279906, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?12802218:OLD14:572027>>

Luo, H.-R. et al., Length Polymorphism in thymidylate synthase regulatory region: Allele Frequency in Chinese Populations and evolution of the Novel Allele, Database GenBank [online], 2001年 2月14日, Accession No.AF279907, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?12802219:OLD14:572027>>

The Pharmacogenomics Journal, 2001年, Vol.1, pp.65-70

Genomics, 1999年, Vol.58, pp.310-312

Cell Structure and Function, 1995年, Vol.20, pp.191-197

Anticancer Research, 1999年, Vol.19, pp.3249-3252

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00- 3/00

C12N 15/00-15/90

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAPLUS(STN)

CA/REGISTRY(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq