

(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
2020年3月19日(19.03.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/054782 A1

(51) 国際特許分類:

C12Q 1/6869 (2018.01) G01N 33/53 (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61K 45/00 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)

[JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地 5-1-1 Tokyo (JP). 合同会社みらか中央研究所(MIRACA RESEARCH INSTITUTE G.K.) [JP/JP]; 〒1920031 東京都八王子市小宮町 5-1 番地 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/035774

(22) 国際出願日: 2019年9月11日(11.09.2019)

(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 2018-171850 2018年9月13日(13.09.2018) JP

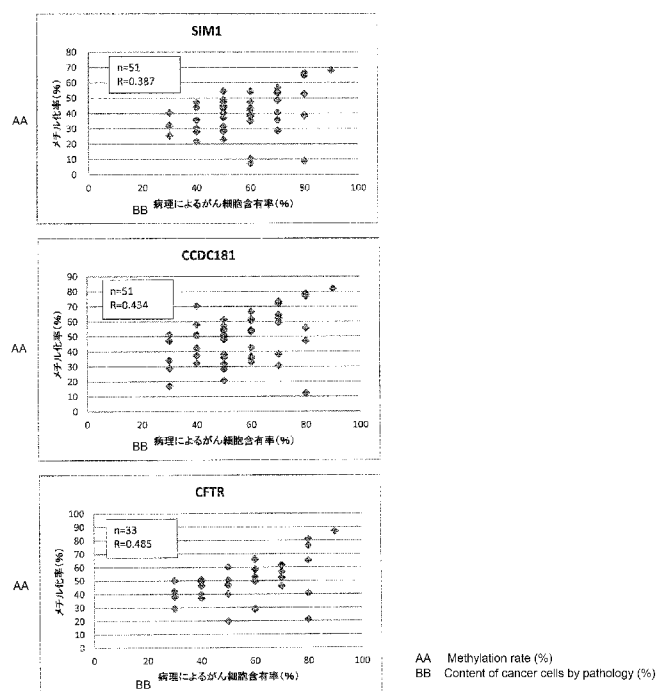
(71) 出願人: 国立研究開発法人国立がん研究センター(NATIONAL CANCER CENTER)

(72) 発明者: 石原 弘喜 (ISHIHARA, Hiroki); 〒1040045 東京都中央区築地 5-1-1 国立研究開発法人国立がん研究センター研究所内 Tokyo (JP). 牛島 俊和 (USHIJIMA, Toshikazu); 〒1040045 東京都中央区築地 5-1-1 国立研究開発法人国立がん研究センター研究所内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人酒井国際特許事務所 (SAKAI INTERNATIONAL PATENT

(54) Title: METHOD FOR ESTIMATING BREAST CANCER CELL ABUNDANCE

(54) 発明の名称: 乳癌細胞存在率の推定方法



(57) Abstract: The present invention provides improved accuracy of an index for estimating the efficacy of drug therapy for breast cancer. Specifically, provided is a method for estimating breast cancer cell abundance, the method comprising the following (1) and (2): (1) analyzing, in an human subject-derived sample, a methylation rate of: (a) a cytosine residue in a CG region comprising 1000th and 1001st nucleotides in a nucleotide sequence expressed by SEQ ID NO: 1; (b) a cytosine residue in a CG region comprising 1000th and 1001st nucleotides in a

OFFICE); 〒1000013 東京都千代田区霞が
関 3 丁目 8 番 1 号 虎の門三井ビル
ディング 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, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, 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：

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))
- 一 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))

nucleotide sequence expressed by SEQ ID NO: 2; (c) a cytosine residue in a CG region comprising 1001st and 1002nd
nucleotides in a nucleotide sequence expressed by SEQ ID NO: 3; or (d) a combination thereof; and (2) estimating, on the
basis of the analyzed methylation rate, the breast cancer abundance in the human subject-derived sample.

(57) 要約：本発明は、乳癌に対する薬物療法の効果予測をする指標の精度の向上を提供する。具体的
には、本発明は、以下(1)および(2)を含む、乳癌細胞存在率の推定方法などを提供する：(1) ヒト
被験体由来サンプルにおいて、以下：(a) 配列番号1のヌクレオチド配列における1000番目と1
001番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；(b) 配列番号2のヌクレオチド配列
における1000番目と1001番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；(c) 配列
番号3のヌクレオチド配列における1001番目と1002番目のヌクレオチドからなるCG部分中の
シトシン残基；または(d) これらの組合せのメチル化率を解析すること；および(2) (1)で解析
されたメチル化率に基づいて、ヒト被験体由来サンプル中の乳癌細胞存在率を推定すること。

明 細 書

発明の名称：乳癌細胞存在率の推定方法

技術分野

[0001] 本発明は、乳癌細胞存在率の推定方法などに関する。

背景技術

[0002] 癌組織サンプルにおける癌細胞画分の評価は、癌マーカーを用いた癌の診断（例、癌の発症リスクの判定、癌の罹患の有無判定、癌に対する薬物療法の効果の予測（例えば、非特許文献1）、および癌に対する薬物療法の予後の評価）における不要画分（正常細胞）の混在による判定精度の低下を排除するために重要である。

[0003] 癌細胞画分を評価する方法としては、例えば、（1）病理診断、および（2）所定の方法を用いて、生検で採取した癌組織サンプル（癌細胞および非癌性細胞を含む）から癌細胞を分離する方法などが存在する。しかし、（1）については、熟練した医師の従事が必要であり、また、（2）の方法については、煩雑であるなどの問題がある。

[0004] 上記問題を解決するため、癌細胞画分に特異的なマーカー（「画分マーカー」）を用いて癌組織サンプルを解析することにより、癌細胞画分を評価することが提案されている。このような画分マーカーとしては、例えば、食道癌におけるメチル化マーカーTFAP2B、ARHGEF4、およびRAPGEFL1（非特許文献2）、胃癌におけるメチル化マーカーOSR2、PPPIA3、VAV3（非特許文献3）が報告されている。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Fuji S, Yamashita S, Yamaguchi T, Takahashi M, Hozumi Y, Ushijima T et al. Pathological complete response of HER2-positive breast

cancer to trastuzumab and chemotherapy can be predicted by HSD17B4 methylation. *Oncotarget*. 2017;8(12):19039-48. doi:10.18632/oncotarget.15118.

非特許文献2: Takahashi T et al., *PLoS one*, 2013;8(12):e82302

非特許文献3: Zong L et al., *Gastric cancer*, 2016;19(2):361-9

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の目的は、乳癌組織に含まれる乳癌細胞含有率を判定する癌マーカーを提供することである。本発明の目的はまた、乳癌細胞含有率を判定することにより、乳癌に対する薬物療法の効果予測をする指標の精度を向上させることである。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、先ず、乳癌細胞画分を評価するため、乳癌細胞では高度にメチル化されているが、正常細胞（非乳癌細胞）では全くまたは低度にしかメチル化されていない乳癌細胞特異的なCpGサイトを探索すること、ならびにこの探索において、細胞間において高発生率のコピー数変化を有さず、かつ広範な患者を対象とすることができるCpGサイトを選択することを着想した。そこで、本発明者らは、常染色体および性染色体に存在する45万を超えるメチル化候補サイトについて包括的に鋭意検討した結果、このようなCpGサイトとして、SIM1遺伝子、CCDC181遺伝子、およびCFTR遺伝子中の特定のCpGサイトを見出した。本発明者らは、これらのCpGサイトのメチル化率を、乳癌細胞存在率の指標として利用することなどに成功し、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明は以下のとおりである。

〔１〕以下（１）および（２）を含む、乳癌細胞存在率の推定方法：

（１）ヒト被験体由来サンプルにおいて、以下：

（ａ）配列番号１のヌクレオチド配列における１０００番目と１００１番目のヌクレオチドからなるＣＧ部分中のシトシン残基；

（ｂ）配列番号２のヌクレオチド配列における１０００番目と１００１番目のヌクレオチドからなるＣＧ部分中のシトシン残基；

（ｃ）配列番号３のヌクレオチド配列における１００１番目と１００２番目のヌクレオチドからなるＣＧ部分中のシトシン残基；または

（ｄ）これらの組合せ

のメチル化率を解析すること；および

（２）（１）で解析されたメチル化率に基づいて、ヒト被験体由来サンプル中の乳癌細胞存在率を推定すること。

〔２〕解析が、亜硫酸水素塩、１以上のプライマー、１以上の核酸プローブ、制限酵素、抗メチル化シトシン抗体、およびナノポアからなる群より選ばれる１または２以上の手段を用いて行われる、〔１〕の方法。

〔３〕解析が、バイサルファイトシーケンシング法、バイサルファイト・パイロシーケンシング法、メチル化特異的ＰＣＲ法、制限酵素ランドマーク・ゲノム・スキャニング（ＲＬＧＳ）法、単一ヌクレオチド・プライマー伸長（ＳＮｕＰＥ）法、ＣｐＧアイランド・マイクロアレイ法、メチライト法、ＣＯＢＲＡ法、質量分析（マスアレイ）法、メチル化特異的制限酵素の使用、高解像度融解解析（ＨＲＭ）法、ナノポア解析法、ＩＣＯＮプローブ法、メチル化特異的ＭＬＰＡ法、またはイムノアッセイにより行われる、〔１〕または〔２〕の方法。

〔４〕以下（１）～（４）を含む、乳癌に対する薬物療法の効果の予測方法：

（１）ヒト被験体由来サンプルにおいて、乳癌マーカーの値を測定すること；

（２）ヒト被験体由来サンプルにおいて、以下：

(a) 配列番号1のヌクレオチド配列における1000番目と1001番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(b) 配列番号2のヌクレオチド配列における1000番目と1001番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(c) 配列番号3のヌクレオチド配列における1001番目と1002番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；または

(d) これらの組合せ

のメチル化率を解析すること；

(3) (1)で測定された乳癌マーカーの値を(2)で解析されたメチル化率で補正して、乳癌マーカーの補正値を計算すること；および

(4) (3)で補正された乳癌マーカーの補正値に基づいて、乳癌に対する薬物療法の効果を予測すること。

[5] 以下(1)および(2)を含む、乳癌の判定方法：

(1) ヒト被験体由来サンプルにおいて、以下：

(a) 配列番号1のヌクレオチド配列における1000番目と1001番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(b) 配列番号2のヌクレオチド配列における1000番目と1001番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(c) 配列番号3のヌクレオチド配列における1001番目と1002番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；または

(d) これらの組合せ

のメチル化率を解析すること；および

(2) (1)で解析されたメチル化率に基づいて、乳癌の罹患可能性を評価すること。

[6] 以下：

(a) 配列番号1のヌクレオチド配列における1000番目と1001番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(b) 配列番号2のヌクレオチド配列における1000番目と1001番

目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(c) 配列番号3のヌクレオチド配列における1001番目と1002番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；または

(d) これらの組合せ

のメチル化率の解析手段を含む、乳癌細胞存在率の推定用試薬。

〔7〕以下：

(a) 配列番号1のヌクレオチド配列における1000番目と1001番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(b) 配列番号2のヌクレオチド配列における1000番目と1001番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(c) 配列番号3のヌクレオチド配列における1001番目と1002番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；または

(d) これらの組合せ

のメチル化率の解析手段を含む、乳癌の判定用試薬。

〔8〕以下(1)および(2)を含むキット：

(1) 以下：

(a) 配列番号1のヌクレオチド配列における1000番目と1001番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(b) 配列番号2のヌクレオチド配列における1000番目と1001番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(c) 配列番号3のヌクレオチド配列における1001番目と1002番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；または

(d) これらの組合せ

のメチル化率解析手段；および

(2) 乳癌マーカーの測定手段。

発明の効果

[0009] 本発明の推定方法は、例えば、乳癌マーカーを用いた乳癌の判定（例、乳癌リスク判定、乳癌罹患の判定、薬物療法の効果の予測、予後評価）の精度

向上に有用である。

本発明の予測方法は、例えば、乳癌患者に対する外科的手術の要否および薬物療法の選択の判断における指標として有用である。

本発明の判定方法は、例えば、乳癌の診断に有用である。

本発明の試薬およびキットは、例えば、本発明の方法の簡便な実施に有用である。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、顕微鏡検査により評価された癌細胞含有率とS I M 1、C C D C 1 8 1、およびC F T R単独のメチル化レベルとの相関を示すグラフである。

[図2]図2は、顕微鏡検査により評価された癌細胞含有率とS I M 1、C C D C 1 8 1、およびC F T Rから選ばれる2つの遺伝子の組合せによるメチル化レベル（メチル化レベルが高いほうを選択）との相関を示すグラフである。

[図3]図3は、顕微鏡検査により評価された癌細胞含有率とS I M 1、C C D C 1 8 1、およびC F T Rの3つの遺伝子の組合せによるメチル化レベル（最も高いメチル化レベルを選択）との相関を示すグラフである。

[図4]図4は、病理学的完全奏効（p C R）、非完全奏功（N o n - p C R）のH E R 2陽性型乳癌組織サンプルのH S D 1 7 B 4遺伝子のメチル化率の測定値を、顕微鏡検査により評価された癌細胞含有率およびS I M 1とC C D C 1 8 1の組み合わせによるメチル化率で補正した値を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0011] （一般的な説明）

本発明において対象とされる癌は、乳癌である。乳癌は、H E R 2陽性型、ルミナルA型、ルミナルB型、およびトリプルネガティブ型のサブタイプに分類することができる。本発明において対象とされる癌は、いずれのサブタイプの乳癌であってもよいが、特定の局面ではH E R 2陽性型が好ましい

。

[0012] 本発明において、「乳癌細胞存在率」とは、サンプル中の全細胞の個数（すなわち、乳癌細胞の個数および非乳癌細胞の個数の合計）に対する乳癌細胞の個数の比率をいう。すなわち、乳癌細胞存在率は、下記式で表される。

$$\text{乳癌細胞存在率} = (\text{乳癌細胞の個数}) / [(\text{乳癌細胞の個数}) + (\text{非乳癌細胞の個数})]$$

[0013] 本明細書において、「画分マーカー」とは、被験体由来サンプル等の細胞集団を癌細胞画分と非癌性細胞（正常細胞）画分に分離した場合の癌細胞画分に特異的なマーカーをいう。画分マーカーは、遺伝子である場合に、「画分マーカー遺伝子」と呼ぶこともある。

[0014] 本発明において主に解析が意図される *SIM1* 遺伝子、*CCDC181* 遺伝子、および *CFTR* 遺伝子（乳癌画分マーカー遺伝子）の CpG サイトの情報は、以下の表 1 に示すとおりである（ゲノムの位置は、ヒトゲノムアセンブリ hg38 に基づく）。

[0015] [表1]

表 1. 乳癌画分マーカー遺伝子

番号	遺伝子	染色体	ヌクレオチド番号	プローブ ID
1	<i>SIM1</i>	6	100465064	cg27252696
2	<i>CCDC181</i>	1	169427630	cg24808280
3	<i>CFTR</i>	7	117479583	cg09626894

[0016] 本発明において解析される *SIM1* 遺伝子の CpG サイトは、配列番号 1 のヌクレオチド配列における 1000 番目と 1001 番目のヌクレオチド残基（*SIM1* 遺伝子のエクソン 1 上流に存在する標準ヌクレオチド配列 *ggccgact* 中の 4 および 5 番目のヌクレオチド）からなる CG 部分と定義することができる（5' 側の *ggc* 部分および 3' 側の *act* 部分が変異していない場合）。標準ヌクレオチド配列は、上記表 1 の CpG サイトに対応する CpG サイトを特定するために参照されることを意図するものである（本発明において解析される他の遺伝子の CpG サイトも同様）。当業者であれば、ゲノム DNA の変異が認められるヒト被験体について、ゲノム DNA

の変異を考慮して、上記位置に存在するC p Gサイトに相当するC p Gサイトを適宜決定することができる。以下、本明細書において単に「S I M 1 遺伝子のC p Gサイト」と称する場合は、特に記載がない限り、上記C p Gサイトを示す。

[0017] 本発明において解析されるC C D C 1 8 1 遺伝子のC p Gサイトは、配列番号2のヌクレオチド配列における1 0 0 0 番目と1 0 0 1 番目のヌクレオチド残基（C C D C 1 8 1 遺伝子のイントロン2中に存在する標準ヌクレオチド配列c a g c g g c a中の4および5番目のヌクレオチド）からなるC G部分と定義することもできる（5'側のc a g部分および3'側のg c a部分に変異していない場合）。当業者であれば、ゲノムDNAの変異が認められるヒト被験体について、ゲノムDNAの変異を考慮して、上記位置に存在するC p Gサイトに相当するC p Gサイトを適宜決定することができる。以下、本明細書において単に「C C D C 1 8 1 遺伝子のC p Gサイト」と称する場合は、特に記載がない限り、上記C p Gサイトを示す。

[0018] 本発明において解析されるC F T R 遺伝子のC p Gサイトは、配列番号3のヌクレオチド配列における1 0 0 1 番目と1 0 0 2 番目のヌクレオチド残基（C F T R 遺伝子のエクソン1上流に存在する標準ヌクレオチド配列c t c c g g g g中の4および5番目のヌクレオチド）からなるC G部分と定義することもできる（5'側のc t c部分および3'側のg g g部分に変異していない場合）。当業者であれば、ゲノムDNAの変異が認められるヒト被験体について、ゲノムDNAの変異を考慮して、上記位置に存在するC p Gサイトに相当するC p Gサイトを適宜決定することができる。以下、本明細書において単に「C F T R 遺伝子のC p Gサイト」と称する場合は、特に記載がない限り、上記C p Gサイトを示す。

[0019] （乳癌細胞存在率の推定方法）

本発明は、乳癌細胞存在率の推定方法を提供する。

[0020] 本発明の推定方法は、以下（1）および（2）を含む：

（1）ヒト被験体由来サンプルにおいて、以下：

- (a) S I M 1 遺伝子の C p G サイト中の シトシン 残基 ;
- (b) C C D C 1 8 1 遺伝子の C p G サイト中の シトシン 残基 ;
- (c) C F T R 遺伝子の C p G サイト中の シトシン 残基 ; または
- (d) これらの 組合せ

のメチル化率を解析すること ; および

(2) (1) で解析されたメチル化率に基づいて、ヒト被験体由来サンプル中の乳癌細胞存在率を推定すること。

[0021] 工程 (1) において、サンプルとしては、血液、体液、組織、および細胞からなる群より選択された 1 または 2 以上のサンプルを使用することができるが、上述した癌に対応する組織サンプルを好適に使用できる。本発明では、このような癌組織サンプルに含まれるゲノム DNA において、特定の C p G サイトが解析される。ゲノム DNA は、癌組織サンプルから、任意の方法により適宜抽出することができる。癌組織サンプルとしては、例えば、針生検等の生検により採取されたものを用いることができる。癌組織サンプルは、予備処理に付されてもよい。このような予備処理としては、例えば、抽出、細胞固定、組織固定、組織薄片化、細胞解離処理、加熱、凍結、冷蔵、液状化が挙げられる。癌組織サンプルは、通常、癌細胞と正常細胞（非癌性細胞）を含む細胞集団のサンプルである。

[0022] 本発明において解析されるメチル化は、シトシン残基の 5 位のメチル化である。

[0023] メチル化率の解析は、当該分野において公知である任意の方法により行うことができる。例えば、解析は、亜硫酸水素塩、プライマー、核酸プローブ、制限酵素、抗メチル化シトシン抗体、およびナノポアからなる群より選ばれる 1 または 2 以上の解析手段を用いて行うことができる。

[0024] 亜硫酸水素塩〔バイサルファイト (b i s u l f i t e)〕は、非メチル化シトシンをウラシルに変換する一方で、メチル化シトシンをウラシルに変換しない。よって、重亜硫酸水素塩は、このような性質のため、メチル化シトシンの解析では他の解析手段と組み合わせて汎用されている。

[0025] プライマーは、シーケンシング用プライマー、若しくは遺伝子増幅用プライマー（例、PCRプライマー）、またはその組み合わせである。プライマーは、目的のCpGサイトを解析できるように適宜設計することができる。例えば、プライマーは、目的のCpGサイトの下流領域（SIM1遺伝子については配列番号1のヌクレオチド配列における1002～2001番目のヌクレオチド残基からなる部分中の任意の領域、CCDC181遺伝子については配列番号2のヌクレオチド配列における1002～2001番目のヌクレオチド残基からなる部分中の任意の領域、CFTR遺伝子については配列番号3のヌクレオチド配列における1003～2001番目のヌクレオチド残基からなる部分中の任意の領域）にアニールするように、または目的のCpGサイトを含む遺伝子領域を増幅するため、目的のCpGサイトの上流領域（SIM1遺伝子については配列番号1のヌクレオチド配列における1～999番目のヌクレオチド残基からなる部分中の任意の領域、CCDC181遺伝子については配列番号2のヌクレオチド配列における1～999番目のヌクレオチド残基からなる部分中の任意の領域、CFTR遺伝子については配列番号1のヌクレオチド配列における1～1000番目のヌクレオチド残基からなる部分中の任意の領域）および下流領域（上記で下流領域として示した任意の領域）においてセンス鎖およびアンチセンス鎖がアニールするように設計することができる。

[0026] 核酸プローブは、目的のCpGサイトを含む領域（SIM1遺伝子については配列番号1のヌクレオチド配列における1000番目と1001番目のヌクレオチド残基からなるCG部分を含む部分、CCDC181遺伝子については配列番号2のヌクレオチド配列における1000番目と1001番目のヌクレオチド残基からなるCG部分を含む部分、CFTR遺伝子については配列番号3のヌクレオチド配列における1001番目と1002番目のヌクレオチド残基からなるCG部分を含む部分を含む部分）またはその上流領域（上記で上流領域として示した任意の領域）若しくは下流領域（上記で下流領域として示した任意の領域）にハイブリダイズするように設計すること

ができる。核酸プローブは、遊離の形態、または固相に固定された形態において用いることができる。固相としては、例えば、粒子（例、磁性粒子）；アレイ、メンブレン（例、ニトロセルロース膜、ろ紙）、カラム等の支持体；およびプレート（例、マルチウェルプレート）、チューブ等の容器が挙げられる。固相の材料としては、例えば、ガラス、プラスチック、および金属が挙げられる。核酸プローブはまた、抗メチル化シトシン抗体を用いるメチル化シトシンの解析において詳述したような核酸プローブであってもよい。

[0027] 制限酵素は、メチル化特異的または非特異的制限酵素であり、上述したような亜硫酸水素塩、プライマー、核酸プローブと適宜組み合わせて用いることができる。

[0028] 具体的には、上述したような解析手段を用いる解析方法としては、例えば、DNAメチル化シーケンス法、バイサルファイトシーケンシング法、バイサルファイト・パイロシーケンシング法、メチル化特異的PCR法、制限酵素ランドマーク・ゲノム・スキャンニング（RLGS）法、単一ヌクレオチド・プライマー伸長（SNuPE）法、CpGアイランド・マイクロアレイ法、メチライト法、COBRA法、質量分析（マスアレイ）法、メチル化特異的制限酵素の使用、高解像度融解解析（HRM）法、ナノポア解析法、ICONプローブ法、メチル化特異的MLPA法が挙げられる。これらの方法は、当該分野において周知である（例、特開2012-090555号公報、特開2014-036672号公報、特表2010-538638号公報、再表2009/136501号公報）。

[0029] 解析はまた、抗メチル化シトシン抗体を用いて行うことができる。抗メチル化シトシン抗体を用いるメチル化シトシンの解析は、当該分野において周知である（例、WO2015/025862；WO2015/025863；WO2015/025864；WO2016/052368；特開2012-230019号公報；DNA Research 13, 37-42（2006）；Anal. Chem. 2012, 84, 7533-7538）。抗メチル化シトシン抗体は、上述したような1または2以上の解析手段

と組み合わせられて用いられてもよい。具体的には、このような解析手段を用いる方法としては、例えば、抗メチル化シトシン抗体、および異種核酸プローブ（例、ノーマルRNAプローブ、修飾RNAプローブ）を組み合わせる方法（例、WO2015/025862）；抗メチル化シトシン抗体、並びに固相プローブおよび捕捉プローブを組み合わせる方法（例、WO2015/025863）；抗メチル化シトシン抗体、並びに吸収剤ポリヌクレオチドおよび捕捉プローブを組み合わせる方法（例、WO2015/025864）；抗メチル化シトシン抗体、および修飾核酸塩基対合性異種核酸プローブを組み合わせる方法（例、WO2016/052368）が挙げられる。抗メチル化シトシン抗体と組み合わせる用いられる核酸プローブは、本発明において解析される上記CpGサイトを含むDNA鎖ハイブリダイズして、当該DNA鎖と核酸プローブからなる二本鎖構造部分が形成されたときに、CpGサイト中のメチルシトシン残基が核酸プローブと不對部分を形成するように（換言すれば、相補的に結合しないように）、設計されてもよい（例、WO2015/025862）。したがって、核酸プローブは、不對部分に対応するヌクレオチド残基として、メチルシトシン残基と相補的に結合し得るグアニン残基以外のヌクレオチド残基（例、シトシン残基、チミン残基、アデニン残基、ウラシル残基）を有していてもよい。あるいは、核酸プローブは、このような不對部分が形成されないように設計されてもよい（例、WO2016/052368）。

[0030] 抗メチル化シトシン抗体を用いる方法は、当該分野において公知である任意の免疫学的方法により行うことができる。具体的には、このような方法としては、例えば、酵素免疫測定法（EIA）（例、CLEIA、ELISA）、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法、電気化学発光免疫測定法、凝集法、免疫染色、フローサイトメトリー法、バイオレイヤー干渉法、In Situ PL法、化学増幅型ルミネッセンス・プロキシミティ・ホモジニアス・アッセイ、ラインプロット法、ウエスタンプロット法が挙げられる。

[0031] 本発明において解析されるメチル化率は、癌細胞における上記CpG中の

シトシン残基のメチル化の割合である。メチル化率の測定は、当該分野において周知である（例、特開2012-090555号公報、特開2014-036672号公報、特表2010-538638号公報、再表2009/136501号公報）。

[0032] 本発明において解析されるメチル化率は、S I M 1 遺伝子、C C D C 1 8 1 遺伝子、およびC F T R 遺伝子のC p G サイト中のシトシン残基のメチル化率の組合せであってもよい。上記（d）で示されるようなメチル化率の組合せは、これらのメチル化率の2以上（すなわち、2または3）からなる組合せであり、具体的には、S I M 1 遺伝子とC C D C 1 8 1 遺伝子の組合せ、S I M 1 遺伝子およびC F T R 遺伝子の組合せ、C C D C 1 8 1 遺伝子およびC F T R 遺伝子の組合せ、ならびに、S I M 1 遺伝子、C C D C 1 8 1 遺伝子、およびC F T R 遺伝子の組合せにおけるC p G サイト中のシトシン残基のメチル化率である。組合せにおけるメチル化率は、例えば、組合せ中の最高メチル化率、最低メチル化率、および平均メチル化率のいずれを採用してもよいが、最高メチル化率を採用するのが好ましい。

[0033] 工程（2）において、解析されたメチル化率に基づいて、ヒト被験体由来サンプル中の乳癌細胞存在率を推定することができる。

[0034] （乳癌に対する薬物療法の効果の予測方法）

本発明はまた、乳癌に対する薬物療法の効果の予測方法を提供する。

[0035] 乳癌に対する薬物療法としては、例えば、抗癌剤による治療が挙げられる。抗癌剤としては、例えば、微小管阻害剤、抗がん抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、プラチナ製剤、アルキル化剤が挙げられる。抗癌剤はまた、分子標的薬であってもよい。このような分子標的薬としては、例えば、H E R 2 阻害剤、E G F R 阻害剤（例、ゲフィチニブ、ラパチニブ、エルロチニブ、セツキシマブ）、c - M E T 阻害剤（例、P H A - 6 6 5 7 5 2、S U 1 1 2 7 4、X L - 8 8 0）、A L K 阻害剤（例、W H I - P 1 5 4、T A E 6 8 4、P F - 2 3 4 1 0 6 6）、P D G F R 阻害剤（例、イマチニブ、デサチニブ、ヴァラチニブ）、c - K I T 阻害剤（例、スニチニブ、マシチニブ）。

ブ、モテサニブ)が挙げられる。

[0036] 乳癌に対する薬物療法は、乳癌のサブタイプに応じて適宜選択することができる。

[0037] H E R 2陽性型乳癌に対する薬物療法としては、例えば、H E R 2阻害剤による治療が挙げられる。H E R 2は、上皮成長因子 (E G F R) と同じファミリーに属する受容体型チロシンキナーゼである。H E R 2は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよびチロシンキナーゼ活性を有する細胞内ドメインが一本鎖で連結した構造を有する (例、C o u s s e n s ら、S c i e n c e , 1 9 8 5 , V o l . 2 3 0 , N o . 4 7 3 0 , p p . 1 1 3 2 - 1 1 3 9、およびGenebankアクセッション番号: NP_001005862. 1を参照)。H E R 2阻害剤としては、例えば、抗体 (例、トラストズマブ、ペルツツマブ)、低分子有機化合物 (例、ラパチニブ、ネラチニブ、アファチニブ等のH E R 2チロシンキナーゼ阻害剤)、薬物結合抗体 (例、T-DM1) が挙げられる。

[0038] ルミナルA型乳癌に対する薬物療法としては、例えば、ホルモン療法または化学療法による治療が挙げられる。ホルモン療法としては、例えば、L H - R Hアゴニスト製剤、抗エストロゲン薬、黄体ホルモン薬、アロマターゼ阻害薬を用いた療法が挙げられる。化学療法としては、例えば、トポイソメラーゼ阻害薬、微小管作用薬、アルキル化薬、代謝拮抗薬を用いた療法が挙げられる。

[0039] ルミナルB型乳癌に対する薬物療法としては、例えば、ホルモン療法または化学療法による治療が挙げられる。ホルモン療法としては、例えば、L H - R Hアゴニスト製剤、抗エストロゲン薬、黄体ホルモン薬、アロマターゼ阻害薬を用いた療法が挙げられる。化学療法としては、例えば、トポイソメラーゼ阻害薬、微小管作用薬、アルキル化薬、代謝拮抗薬を用いた療法が挙げられる。

[0040] トリプルネガティブ型乳癌に対する薬物療法としては、例えば、化学療法による治療が挙げられる。化学療法としては、例えば、トポイソメラーゼ阻

害薬、微小管作用薬、アルキル化薬、代謝拮抗薬を用いた療法が挙げられる。

[0041] 癌に対する薬物療法においては、複数の抗癌剤を併用することができる。併用される複数の抗癌剤としては、例えば、上述した2以上の抗癌剤の組み合わせ、および上述した1以上の抗癌剤と他の抗癌剤との組み合わせが挙げられる。他の抗癌剤としては、例えば、タキサン系抗癌剤（例、パクリタキセル）等の微小管阻害剤、アントラサイクリン系（例、アドリアシン）、アロマターゼ阻害剤（例、レトロゾール）が挙げられる。

[0042] 本発明の予測方法は、以下（1）～（4）を含む：

- （1）ヒト被験体由来サンプルにおいて、乳癌マーカーの値を測定すること；
- （2）ヒト被験体由来サンプルにおいて、以下：
 - （a）S I M 1 遺伝子のC p G サイト中のシトシン残基；
 - （b）C C D C 1 8 1 遺伝子のC p G サイト中のシトシン残基；
 - （c）C F T R 遺伝子のC p G サイト中のシトシン残基；または
 - （d）これらの組合せのメチル化率を解析すること；
- （3）（1）で測定された乳癌マーカーの値を（2）で解析されたメチル化率で補正して、乳癌マーカーの補正值を計算すること；および
- （4）（3）で補正された乳癌マーカーの補正值に基づいて、乳癌に対する薬物療法の効果を予測すること。

[0043] 工程（1）における乳癌マーカーは、乳癌の指標となるマーカーであり、例えば、DNAメチル化率（例、H S D 1 7 B 4 のc g 1 5 8 9 6 3 0 1：非特許文献3）が挙げられる。

[0044] 工程（2）における画分マーカー遺伝子（S I M 1 遺伝子、C C D C 1 8 1 遺伝子、またはC F T R 遺伝子）のC p G サイト、ならびにメチル化率の解析手段は、上述のとおりである。

[0045] 工程（3）における乳癌マーカーの値の補正とは、ヒト被験体由来サンプ

ル（乳癌細胞および非乳癌細胞を含むサンプル）において測定された乳癌マーカーの値に基づいて、より純粋に乳癌細胞に対応し得る乳癌マーカーの値を算出することをいう。したがって、乳癌マーカーの補正值は、例えば、下記式により求めることができる。

乳癌マーカーの補正值＝（ヒト被験体由来サンプルにおいて測定された乳癌マーカーの値）／（ヒト被験体由来サンプル中の乳癌細胞存在率）

[0046] 工程（４）は、乳癌マーカーの値に基づいて乳癌に対する薬物療法の効果を予測する手法において、乳癌マーカーの値の代わりに乳癌マーカーの補正值を用いることにより行うことができる。乳癌マーカーの補正值を用いることにより、薬物療法の効果の高精度な予測が期待される。

[0047] （乳癌の判定方法）

本発明はまた、乳癌の判定方法を提供する。

[0048] 乳癌の判定とは、ヒト被験体が乳癌に罹患している可能性が高いかまたは低いかを評価することをいう。

[0049] 本発明の判定方法は、以下（１）および（２）を含む：

（１）ヒト被験体由来サンプルにおいて、以下：

- （a）S I M 1 遺伝子のC p Gサイト中のシトシン残基；
- （b）C C D C 1 8 1 遺伝子のC p Gサイト中のシトシン残基；
- （c）C F T R 遺伝子のC p Gサイト中のシトシン残基；または
- （d）これらの組合せ

のメチル化率を解析すること；および

（２）（１）で解析されたメチル化率に基づいて、乳癌の罹患可能性を評価すること。

[0050] 工程（１）におけるヒト被験体由来サンプル、画分マーカー遺伝子（S I M 1 遺伝子、C C D C 1 8 1 遺伝子、またはC F T R 遺伝子）のC p Gサイト、ならびにメチル化率の解析手段は、上述のとおりである。

[0051] 工程（２）において、メチル化率が基準値以上のときにヒト被験体は乳癌に罹患している可能性があり、ならびに／あるいはメチル化率が基準値より

少ないときにヒト被験体は乳癌に罹患している可能性が低いと評価することができる。このような基準値としては、乳癌患者および健常人を鑑別し得るように適宜設定されたカットオフ値を利用することができる。メチル化率のカットオフ値としては、例えば、10～30%の範囲内にある任意の百分率の値を採用することができるが、15～25%の範囲内にある任意の百分率の値を採用することが好ましく、20%がより好ましい。

[0052] (試薬およびキット)

本発明はまた、乳癌細胞存在率の推定用試薬を提供する。

[0053] 本発明の推定用試薬は、以下：

- (a) SIM1 遺伝子の CpG サイト中のシトシン残基；
- (b) CCDC181 遺伝子の CpG サイト中のシトシン残基；
- (c) CFTR 遺伝子の CpG サイト中のシトシン残基；または
- (d) これらの組合せ

のメチル化率の解析手段を含む。

[0054] 本発明の推定用試薬における画分マーカー遺伝子 (SIM1 遺伝子、CCDC181 遺伝子、または CFTR 遺伝子) の CpG サイト、ならびにメチル化率の解析手段は、上述のとおりである。

[0055] 本発明の推定用試薬は、メチル化率の解析手段を用いてヒト被験体由来サンプルにおける画分マーカー遺伝子のメチル化率を解析し、解析されたメチル化率に基づいて、ヒト被験体由来サンプル中の乳癌細胞存在率を推定するために用いることができる。

[0056] 本発明はまた、乳癌の判定用試薬を提供する。

[0057] 本発明の判定用試薬は、以下：

- (a) SIM1 遺伝子の CpG サイト中のシトシン残基；
- (b) CCDC181 遺伝子の CpG サイト中のシトシン残基；
- (c) CFTR 遺伝子の CpG サイト中のシトシン残基；または
- (d) これらの組合せ

のメチル化率の解析手段を含む。

[0058] 本発明の判定用試薬における画分マーカー遺伝子（S I M 1 遺伝子、C C D C 1 8 1 遺伝子、またはC F T R 遺伝子）のC p G サイト、ならびにメチル化率の解析手段は、上述のとおりである。

[0059] 本発明の判定用試薬は、メチル化率の解析手段を用いてヒト被験体由来サンプルにおける画分マーカー遺伝子のメチル化率を解析し、解析されたメチル化率に基づいて、ヒト被験体の乳癌を判定するために用いることができる。

[0060] 本発明はまた、キットを提供する。

[0061] 本発明のキットは、以下（１）および（２）を含む：

（１）以下：

- （a）S I M 1 遺伝子のC p G サイト中のシトシン残基；
- （b）C C D C 1 8 1 遺伝子のC p G サイト中のシトシン残基；
- （c）C F T R 遺伝子のC p G サイト中のシトシン残基；または
- （d）これらの組合せ

のメチル化率解析手段；および

（２）乳癌マーカーの測定手段。

[0062] 本発明の乳癌の判定用試薬における画分マーカー遺伝子（S I M 1 遺伝子、C C D C 1 8 1 遺伝子、またはC F T R 遺伝子）のC p G サイト、メチル化率の解析手段、ならびに乳癌マーカーの測定手段は、上述のとおりである。

[0063] 本発明のキットは、種々の用途に用いることができるが、例えば、乳癌に対する薬物療法の効果の予測するために用いることができる。

実施例

[0064] 以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

[0065] １． サンプル

１－１． 生体由来サンプル

乳癌患者由来サンプルとして、１９５検体の乳癌組織サンプルを１９５人

の乳癌患者から取得した。各患者の乳癌組織サンプルは、乳癌と診断された患者から針生検により収集した。サンプルを、PAX遺伝子組織システム（Qiagen, ヒルデン, ドイツ）を用いて固定し、低融点パラフィン中に埋包した。10枚の10 μ m薄切切片を作成し、DNAを抽出した。同時に、サンプルの顕微鏡検査を実施し、癌細胞画分を決定した。上記の195検体のうち、HER2陽性型乳癌患者由来検体61検体については、トラスツズマブに対する治療応答を決定し、サンプル中に癌細胞が残存しない状態を、病理学的完全奏効（pCR）、それ以外を非完全奏効（Non-pCR）と定義した。さらに、61個のサンプルのうち10個のサンプルを、レーザー捕捉マイクロダイセクション（LCM）により癌細胞および非癌細胞に分離した。

[0066] 1-2. 培養細胞株サンプル

培養乳癌細胞株サンプルとして、全体で20個の乳癌細胞株（BT-474、SK-BR-3、MDA-MB-453、HCC38、MDA-MB-231、T-47D、Hs 578T、MCF7、UACC-3199、ZR-75-1、BT-20、MDA-MB-436、HCC1937、MDA-MB-468、HCC1428、BT-549、AU565、HCC1395、MDA-MB-157、およびHCC1954）を、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから購入した（ロックビル, MD）。

培養通常細胞株サンプルとして、ヒト乳房上皮細胞（HMECs）を、Cambrex（イーストラザフォード, NL）から購入した。

[0067] 2. 画分マーカーのDNAメチル化レベルの測定

2-1. DNAメチル化レベルの測定方法

ゲノム特異的DNAメチル化レベルは、バイサルファイト・パイロシーケンシングにより解析した。バイサルファイト・パイロシーケンシングは、具体的には、以下の手順により行った。ゲノムDNAをBamHIで消化し、1 μ gのBamHI消化ゲノムDNAを、既報（Yamashita S, Takahashi S, McDonnell N, Watanabe

N, Niwa T, Hosoya K et al. Methylation silencing of transforming growth factor- β receptor type II in rat prostate cancers. *Cancer research*. 2008; 68 (7) : 2112-21) のとおりバイサルファイト修飾に供した。バイサルファイト修飾DNAを40 μ lのTE緩衝液中に懸濁し、1 μ lのアリコート、既報 (Yoshida T, Yamashita S, Takamura-Enya T, Niwa T, Ando T, Enomoto S et al. Alu and SataIpha hypomethylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae. *International journal of cancer*. 2011; 128 (1) : 33-9) のとおりバイサルファイトシーケンシングに供した。標的ゲノム領域を、ビオチニル化プライマーにより増幅した。ビオチン標識PCR産物を、0.2 μ Mパイロシーケンシング・プライマーに対してアニールさせ、パイロシーケンシングを、PSQ 96パイロシーケンシング・システム (QIAGEN, バレンシア, CA, USA) を用いて行った。メチル化レベルは、PSQアッセイ・デザイン・ソフトウェア (QIAGEN) を用いて取得した。

[0068] 2-2. 画分マーカーのメチル化レベルの解析

2-2-1. 画分マーカーのスクリーニング

常染色体および性染色体中の477, 344のCpGサイトより、1-2で調製した培養通常細胞株(非癌細胞)でメチル化率が低く、培養乳癌細胞株でメチル化率の高いCpGサイトを探索し、3つのCpGサイトを画分マーカーとして見出した。各CpGサイトの詳細を表1に示す。

[0069] 2-2-2. 画分マーカーによる乳癌評価と病理による癌細胞含有率との関係

画分マーカーの乳癌評価の正確性を判定するために、HER2陽性型乳癌

サンプル51検体（CFTRについては33検体）について、各画分マーカー（SIM1、CCDC181、およびCFTR）、およびこれらの組み合わせにより評価される癌細胞画分と、顕微鏡検査により評価された癌細胞含有率との間の相関を判定した。画分マーカーを組み合わせる場合は、3つのマーカーの最高メチル化率を採用した。結果を図1～3に示す。画分マーカーにより評価された癌細胞画分および病理による癌細胞含有率の間で有意な相関を確認した（ $R=0.38\sim0.77$ ）。したがって、これらの画分マーカーは、乳癌細胞画分を評価することができるマーカーであると考えられた。

[0070] 3. 乳癌細胞画分によるHSD17B4メチル化レベルの補正

3-1. 乳癌マーカーの値の測定

上記1-1でpCRとNon-pCRを判定したHER2陽性型乳癌サンプル61検体について、HSD17B4遺伝子のメチル化レベルを測定した。HSD17B4メチル化レベルは、上記2-1にしたがってバイサルファイト・パイロシーケンシングにより測定した（非特許文献3参照）。

[0071] 3-2. 乳癌マーカーの値の補正

上記3-1で測定したHSD17B4のメチル化レベルを、画分マーカーにより、または顕微鏡検査により評価された乳癌細胞画分により、以下のとおり補正した：[補正HSD17B4メチル化レベル = $100 \times (\text{HSD17B4メチル化レベル}) / (\text{癌細胞画分})$]。

[0072] 3-3. 統計解析

相関解析は、ピアソンの積率相関係数を用いて行った。トラスツズマブ応答者（pCR）と非応答者（Non-pCR）との間のHSD17B4の補正メチル化レベルにおける差異を、マン・ホイットニーU検定により評価した。全ての解析は、PASW統計バージョン18.0（SPSS Japan Inc.，東京，日本）を用いて行い、両側p値 <0.05 を、統計学的に有意とみなした。

[0073] 3-4. HSD17B4メチル化レベルの補正に対する癌細胞画分マーカー

の応用

癌細胞画分を評価することにより癌細胞がHSD17B4メチル化レベルをどの程度補正できるか評価した。メチル化の生データに基づくと、pCRおよびNon-pCR試料間において、HSD17B4メチル化レベルにおいて如何なる有意な差異も認められなかった（ $p=0.245$ ）（図4）。対照的に、補正後では、メチル化レベルは、Non-pCR試料よりもpCR試料において有意により高かった（顕微鏡検査： $p=0.0001$ ；画分マーカー： $p=0.0004$ ）。pCRを予測する感度および特異性（表2）に関しては、補正前はそれぞれ13.6%および94.9%であった。DNAメチル化マーカーによる補正後の感度および特異性（59.1%および84.6%）は、顕微鏡検査により補正されたもの（59.1%および87.2%）と同等であった。表2において、HSD17B4メチル化レベルを既報（前述のFujii Set al.）に基づくカットオフ値（50%）を用いて高レベルおよび低レベルに分類した。pCRは、病理学的完全奏効を示す。

[0074] [表2]

表2. 補正前、顕微鏡検査による補正後、およびメチル化画分マーカーによる補正後のHSD17B4メチル化の予測性能

	HSD17B4 メチル化	pCR サンプル数	Non-pCR サンプル数	感度 (%)	特異性 (%)	陽性 的中率 (%)
補正前	高	3	2	13.6	94.9	60.0
	低	19	37			
顕微鏡検査による補正	高	13	5	59.1	87.2	72.2
	低	9	34			
メチル化画分マーカーによる補正	高	13	6	59.1	84.6	68.4
	低	9	33			

[0075] 4. 各サブタイプの乳癌への適用性の評価

1-1でpCR/Non-pCR判定を行った61検体を除く、134検体の乳癌サンプル（HER2陽性型、ルミナルA型、ルミナルB型、および

トリプルネガティブ型) について、非癌細胞も混入した状態で画分マーカー (S I M 1、C C D C 1 8 1、およびC F T R) メチル化率を測定した。メチル化率20%をカットオフとして、3つのマーカーのいずれかがカットオフ以上のメチル化率を示した検体を「陽性」と判定した。結果を表3に示す。表3中、H E R 2はH E R 2陽性型、T N B Cはトリプルネガティブ型を表す。

[0076]

[表3-1]

表3. 各サブタイプ乳癌サンプルにおけるSIM1、CCDC181、およびCFTRのメチル化率

サンプル 番号	画分マーカー			サブタイプ
	CFTR	CCDC181	SIM1	
1	42.07	37.94	29.58	HER2
2	33.06	31.54	6.88	HER2
3	19.19	34.19	14.68	HER2
4	18.66	15.78	9.37	HER2
5	68.70	67.19	45.41	HER2
6	51.59	55.62	48.43	HER2
7	3.91	13.63	1.30	HER2
8	55.12	63.72	42.88	HER2
9	40.44	50.37	21.37	HER2
10	28.99	59.85	28.19	HER2
11	57.59	62.77	52.91	HER2
12	45.95	47.05	36.35	HER2
13	69.39	40.21	51.05	HER2
14	24.48	19.51	11.81	HER2
15	58.43	57.76	8.10	HER2
16	23.97	25.65	10.92	HER2
17	26.98	35.26	10.21	ルミナル A
18	69.25	57.52	29.72	ルミナル A
19	61.31	48.92	11.68	ルミナル A
20	48.41	58.61	6.99	ルミナル A
21	6.19	56.46	22.51	ルミナル A
22	77.68	58.61	6.25	ルミナル A
23	4.82	19.86	15.69	ルミナル A
24	82.68	80.51	74.21	ルミナル A
25	51.97	63.21	37.92	ルミナル A
26	51.34	31.61	8.04	ルミナル A
27	52.10	64.00	55.91	ルミナル A
28	39.44	30.71	18.08	ルミナル A
29	49.89	45.83	25.38	ルミナル A
30	72.36	72.27	55.46	ルミナル A
31	15.27	52.53	11.16	ルミナル A
32	45.02	63.33	30.80	ルミナル A
33	33.63	34.80	27.24	ルミナル A
34	61.08	66.59	54.48	ルミナル A
35	3.96	61.97	41.23	ルミナル A
36	71.90	50.45	28.11	ルミナル A
37	34.39	12.50	19.67	ルミナル A
38	21.05	13.45	29.56	ルミナル A
39	3.48	10.76	7.37	ルミナル A
40	60.93	67.48	32.83	ルミナル A

[0077]

[表3-2]

表 3 続き

サンプル 番号	画 分 マーカ ー			サブタイプ
	CFTR	CCDC181	SIM1	
41	31.98	14.53	8.73	ルミナル A
42	30.03	41.18	33.43	ルミナル A
43	33.90	40.26	21.07	ルミナル A
44	42.82	63.38	28.16	ルミナル A
45	44.60	44.70	33.34	ルミナル A
46	18.53	31.90	11.72	ルミナル A
47	25.16	50.38	15.76	ルミナル A
48	39.96	50.47	11.26	ルミナル A
49	70.60	61.07	39.86	ルミナル A
50	13.30	48.98	2.52	ルミナル A
51	38.84	49.35	11.99	ルミナル A
52	48.58	55.38	11.72	ルミナル A
53	46.48	61.26	27.55	ルミナル A
54	19.18	24.87	9.03	ルミナル A
55	24.79	25.84	54.06	ルミナル A
56	74.21	75.66	11.53	ルミナル A
57	8.97	13.89	6.33	ルミナル A
58	32.10	44.26	15.72	ルミナル A
59	50.81	63.22	32.64	ルミナル A
60	24.53	41.47	14.48	ルミナル A
61	37.95	36.71	11.08	ルミナル A
62	73.98	62.83	45.52	ルミナル A
63	33.80	24.44	23.29	ルミナル A
64	14.66	18.98	14.20	ルミナル A
65	78.07	72.58	65.08	ルミナル A
66	4.24	85.28	73.66	ルミナル A
67	15.95	55.32	18.63	ルミナル A
68	6.89	14.51	1.85	ルミナル A
69	48.85	13.42	21.29	ルミナル B
70	35.46	54.00	35.37	ルミナル B
71	5.02	11.67	3.70	ルミナル B
72	46.05	70.31	46.25	ルミナル B
73	31.45	55.38	24.09	ルミナル B
74	46.48	48.81	4.51	ルミナル B
75	39.63	43.43	27.63	ルミナル B
76	57.40	13.48	39.74	ルミナル B
77	73.11	11.49	1.69	ルミナル B
78	48.86	38.63	38.94	ルミナル B
79	17.87	10.96	38.35	ルミナル B
80	23.83	22.61	5.51	ルミナル B

[0078]

[表3-3]

表 3 続き

サンプル 番号	画 分 マーカ ー			サブタイプ
	CFTR	CCDC181	SIM1	
81	29.43	43.67	17.69	ルミナル B
82	45.53	56.19	44.25	ルミナル B
83	59.17	49.79	38.90	ルミナル B
84	31.03	39.80	15.88	ルミナル B
85	22.18	21.40	35.22	ルミナル B
86	7.65	12.45	10.57	ルミナル B
87	47.71	24.02	6.55	ルミナル B
88	57.13	59.70	45.00	ルミナル B
89	30.09	27.03	17.36	ルミナル B
90	72.99	58.14	47.54	ルミナル B
91	50.89	55.05	35.10	ルミナル B
92	86.06	86.34	77.75	ルミナル B
93	53.60	54.20	23.13	ルミナル B
94	53.99	50.26	20.41	ルミナル B
95	3.76	24.18	10.20	ルミナル B
96	87.97	83.37	78.75	ルミナル B
97	57.53	52.67	33.35	ルミナル B
98	52.90	47.66	3.69	ルミナル B
99	21.99	5.90	1.04	ルミナル B
100	69.16	56.05	27.46	ルミナル B
101	71.49	62.97	43.73	ルミナル B
102	40.26	38.00	19.17	TNBC
103	21.98	56.71	29.25	TNBC
104	69.85	46.64	2.07	TNBC
105	64.01	44.33	2.38	TNBC
106	61.59	12.51	14.14	TNBC
107	25.23	29.12	16.86	TNBC
108	40.33	13.25	18.11	TNBC
109	66.49	35.87	2.27	TNBC
110	64.25	36.83	2.18	TNBC
111	26.04	28.60	4.63	TNBC
112	48.39	9.85	4.10	TNBC
113	13.12	44.79	2.76	TNBC
114	28.25	26.27	19.23	TNBC
115	10.07	12.75	8.84	TNBC
116	2.47	13.01	2.18	TNBC
117	77.03	69.01	8.36	TNBC
118	22.33	33.04	19.13	TNBC
119	53.88	18.13	4.84	TNBC
120	46.38	45.66	36.77	TNBC

[0079]

[表3-4]

表 3 続き

サンプル 番号	画分マーカー			サブタイプ
	CFTR	CCDC181	SIM1	
121	40.23	22.12	3.22	TNBC
122	2.95	19.35	2.33	TNBC
123	7.73	43.47	10.65	TNBC
124	73.12	9.90	2.15	TNBC
125	68.06	19.54	3.08	TNBC
126	40.05	40.93	26.96	TNBC
127	41.84	60.84	35.12	TNBC
128	26.82	35.24	19.12	TNBC
129	70.52	20.94	1.25	TNBC
130	61.04	59.95	27.82	TNBC
131	24.44	18.14	0.87	TNBC
132	30.22	44.65	25.85	TNBC
133	29.36	10.33	7.10	TNBC
134	42.37	34.06	22.24	TNBC

[0080] 上記の結果において、各乳癌サブタイプにおいて、SIM1、CCDC181、CFTR、およびこれらの組み合わせについてメチル化率（組み合わせの場合は最高メチル化率）が20%を超えるものを陽性と判定した場合、各画分マーカーおよび乳癌判定率（メチル化陽性の乳癌患者の割合）は下記表4に示すとおりとなった。

[0081] [表4]

表 4. 各画分マーカーによる乳癌判定率

画分マーカー	乳癌判定率（メチル化陽性の乳癌患者の割合）（%）
SIM1	47.0
CCDC181	78.4
CFTR	81.3
SIM1+CCDC181	81.3
SIM1+CFTR	84.3
CCDC181+CFTR	90.3
SIM1+CCDC181+CFTR	91.0

[0082] いずれの画分マーカー、いずれの組み合わせにおいても高い乳癌判定率（メチル化陽性の乳癌患者の割合）を示した。特に2種類以上の画分マーカーを組み合わせることで、高い確率で乳癌を判定し得ることが示唆された。

配列表フリーテキスト

[0083] 配列番号1は、SIM1遺伝子のメチル化レベル測定CpGサイト（10

00および1001番目のヌクレオチド残基) 前後1000bpのゲノム領域の塩基配列を示す。

配列番号2は、CCDC181遺伝子のメチル化レベル測定CpGサイト(1000および1001番目のヌクレオチド残基) 前後1000bpのゲノム領域の塩基配列を示す。

配列番号3は、CFTR遺伝子のメチル化レベル測定CpGサイト(1001および1002番目のヌクレオチド残基) 前後1000bpのゲノム領域の塩基配列を示す。

配列番号4～6はそれぞれ、SIM1遺伝子のCpGサイトのメチル化レベル測定用フォワードプライマー、リバープライマー、およびシーケンシングプライマーの塩基配列を示す。

配列番号7～9はそれぞれ、CCDC181遺伝子のCpGサイトのメチル化レベル測定用フォワードプライマー、リバープライマー、およびシーケンシングプライマーの塩基配列を示す。

配列番号10～12はそれぞれ、CFTR遺伝子のCpGサイトのメチル化レベル測定用フォワードプライマー、リバープライマー、およびシーケンシングプライマーの塩基配列を示す。

請求の範囲

- [請求項1] 以下（１）および（２）を含む、乳癌細胞存在率の推定方法：
- （１）ヒト被験体由来サンプルにおいて、以下：
- （ａ）配列番号１のヌクレオチド配列における１０００番目と１００１番目のヌクレオチドからなるＣＧ部分中のシトシン残基；
- （ｂ）配列番号２のヌクレオチド配列における１０００番目と１００１番目のヌクレオチドからなるＣＧ部分中のシトシン残基；
- （ｃ）配列番号３のヌクレオチド配列における１００１番目と１００２番目のヌクレオチドからなるＣＧ部分中のシトシン残基；または
- （ｄ）これらの組合せ
- のメチル化率を解析すること；および
- （２）（１）で解析されたメチル化率に基づいて、ヒト被験体由来サンプル中の乳癌細胞存在率を推定すること。
- [請求項2] 解析が、亜硫酸水素塩、１以上のプライマー、１以上の核酸プローブ、制限酵素、抗メチル化シトシン抗体、およびナノポアからなる群より選ばれる１または２以上の手段を用いて行われる、請求項１に記載の方法。
- [請求項3] 解析が、バイサルファイトシーケンシング法、バイサルファイト・パイロシーケンシング法、メチル化特異的PCR法、制限酵素ランドマーク・ゲノム・スキャニング（RLGS）法、単一ヌクレオチド・プライマー伸長（SNuPE）法、CpGアイランド・マイクロアレイ法、メチライト法、COBRA法、質量分析（マスアレイ）法、メチル化特異的制限酵素の使用、高解像度融解解析（HRM）法、ナノポア解析法、ICONプローブ法、メチル化特異的MLPA法、または免疫アッセイにより行われる、請求項１または２に記載の方法。
- [請求項4] 以下（１）～（４）を含む、乳癌に対する薬物療法の効果の予測方法：
- （１）ヒト被験体由来サンプルにおいて、乳癌マーカーの値を測定す

ること；

(2) ヒト被験体由来サンプルにおいて、以下：

(a) 配列番号1のヌクレオチド配列における1000番目と1001番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(b) 配列番号2のヌクレオチド配列における1000番目と1001番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(c) 配列番号3のヌクレオチド配列における1001番目と1002番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；または

(d) これらの組合せ

のメチル化率を解析すること；

(3) (1)で測定された乳癌マーカーの値を(2)で解析されたメチル化率で補正して、乳癌マーカーの補正値を計算すること；および

(4) (3)で補正された乳癌マーカーの補正値に基づいて、乳癌に対する薬物療法の効果を予測すること。

[請求項5] 以下(1)および(2)を含む、乳癌の判定方法：

(1) ヒト被験体由来サンプルにおいて、以下：

(a) 配列番号1のヌクレオチド配列における1000番目と1001番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(b) 配列番号2のヌクレオチド配列における1000番目と1001番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(c) 配列番号3のヌクレオチド配列における1001番目と1002番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；または

(d) これらの組合せ

のメチル化率を解析すること；および

(2) (1)で解析されたメチル化率に基づいて、乳癌の罹患可能性を評価すること。

[請求項6] 以下：

(a) 配列番号1のヌクレオチド配列における1000番目と1001番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

01番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(b) 配列番号2のヌクレオチド配列における1000番目と10

01番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(c) 配列番号3のヌクレオチド配列における1001番目と10

02番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；または

(d) これらの組合せ

のメチル化率の解析手段を含む、乳癌細胞存在率の推定用試薬。

[請求項7]

以下：

(a) 配列番号1のヌクレオチド配列における1000番目と10

01番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(b) 配列番号2のヌクレオチド配列における1000番目と10

01番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(c) 配列番号3のヌクレオチド配列における1001番目と10

02番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；または

(d) これらの組合せ

のメチル化率の解析手段を含む、乳癌の判定用試薬。

[請求項8]

以下(1)および(2)を含むキット：

(1) 以下：

(a) 配列番号1のヌクレオチド配列における1000番目と10

01番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(b) 配列番号2のヌクレオチド配列における1000番目と10

01番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；

(c) 配列番号3のヌクレオチド配列における1001番目と10

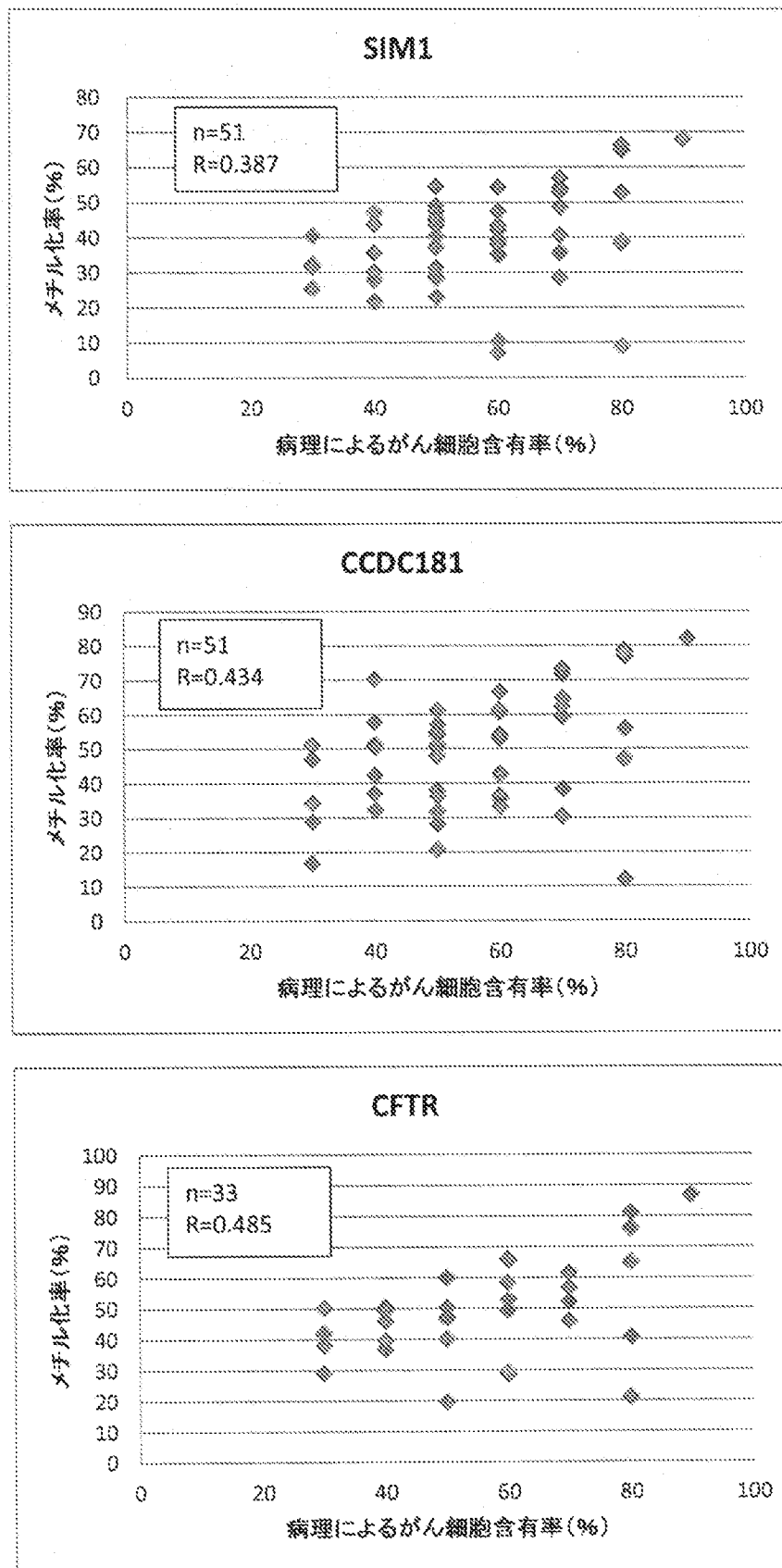
02番目のヌクレオチドからなるCG部分中のシトシン残基；または

(d) これらの組合せ

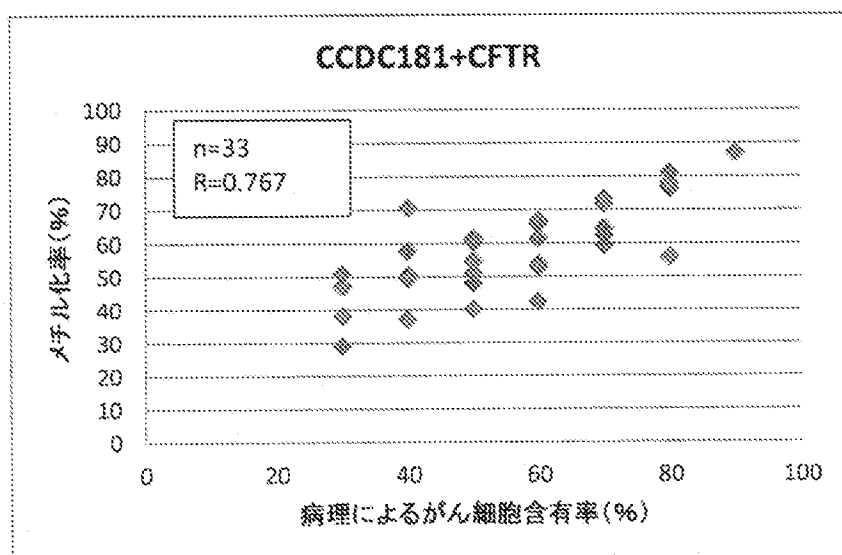
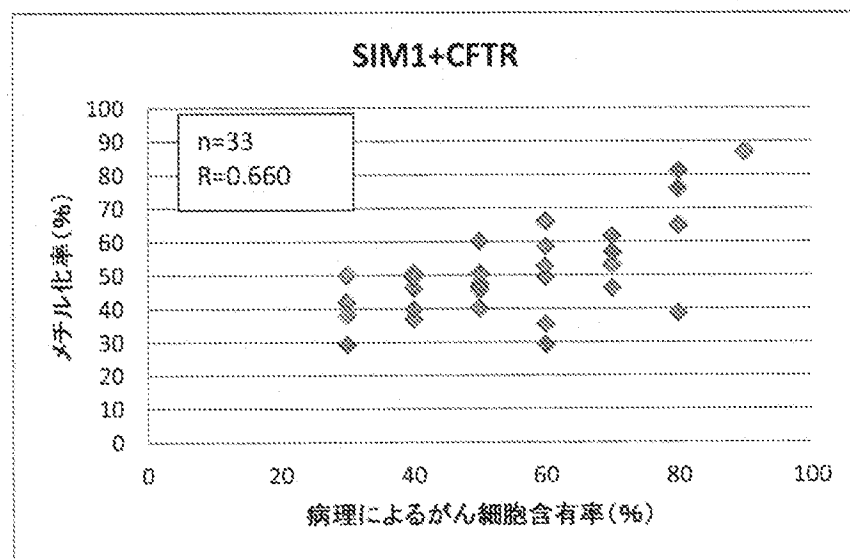
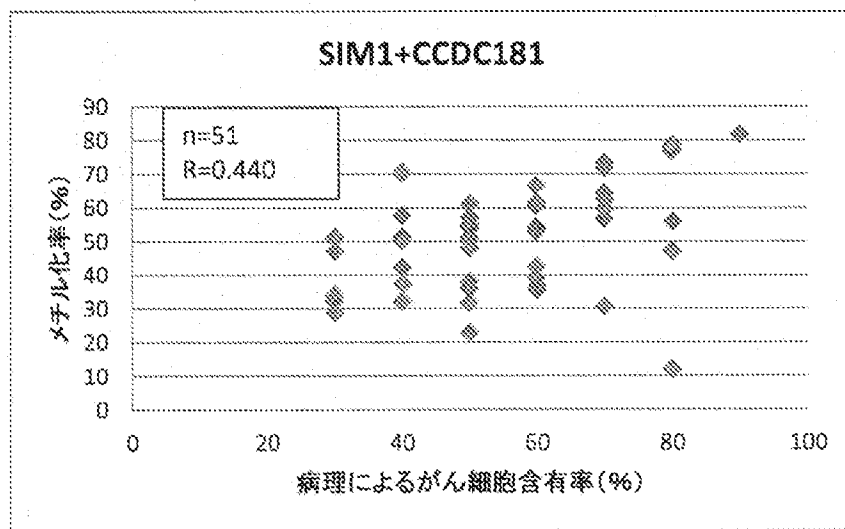
のメチル化率解析手段；および

(2) 乳癌マーカーの測定手段。

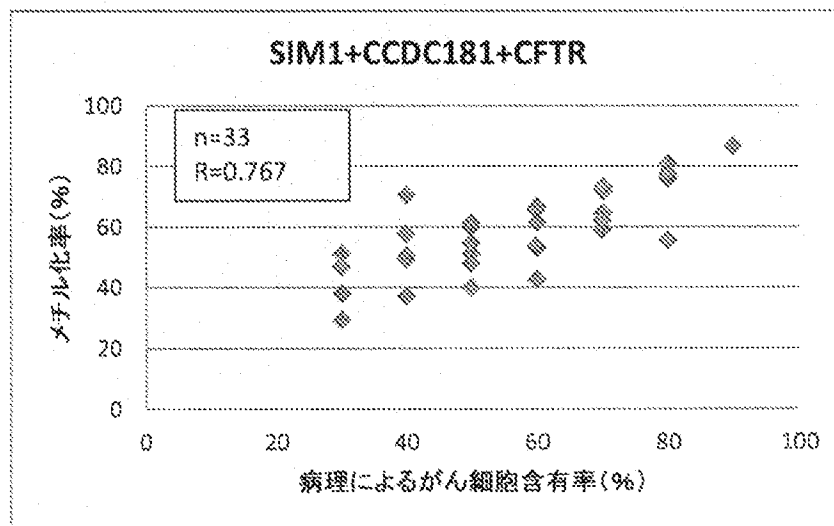
[図1]

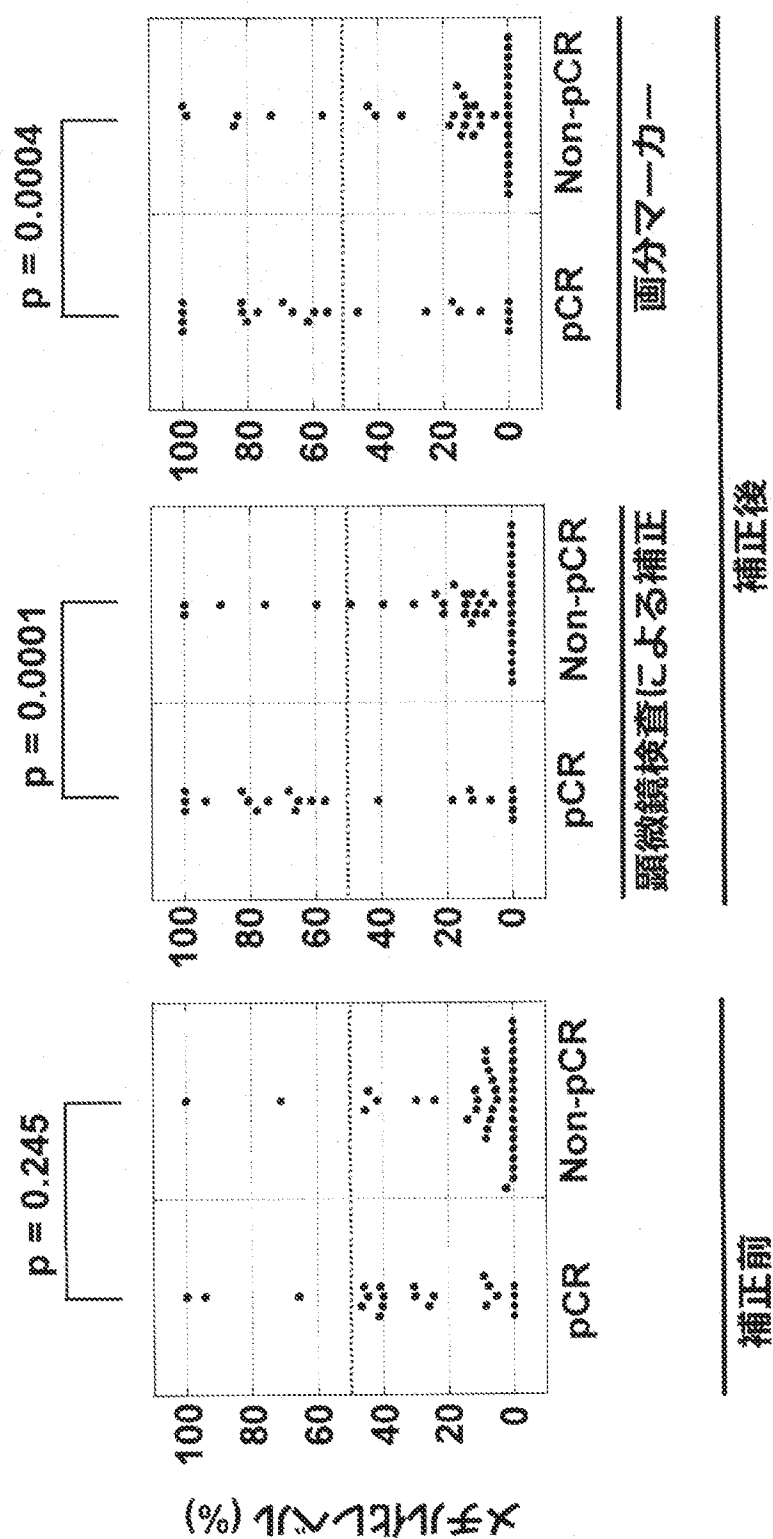


[図2]



[図3]





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/035774

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12Q1/6869(2018.01)i, A61P15/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)n, C12N15/12(2006.01)n

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)

Int.Cl. C12Q1/6869, A61P15/00, A61P35/00, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/574, A61K45/00, C12N15/12

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

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

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MIYAMOTO, Kazuaki et al., Identification of 20 genes aberrantly methylated in human breast cancers, Int. J. Cancer, 2005, vol. 116, pp. 407-414	1-8
A	DEDEURWAERDER, S., DNA methylation profiling reveals a predominant immune component in breast cancers, EMBO Mol. Med., 2011, vol. 3, pp. 726-741	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 27.09.2019	Date of mailing of the international search report 08.10.2019
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/JP2019/035774

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DING, S. et al., Methylation profile of the promoter CpG islands of 14 "drug-resistance" genes in hepatocellular carcinoma, World J Gastroenterol, 2004, vol. 10, no. 23, pp. 3433-3440	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/6869(2018.01)i, A61P15/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)n, C12N15/12(2006.01)n

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. C12Q1/6869, A61P15/00, A61P35/00, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/574, A61K45/00, C12N15/12

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	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019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)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

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
A	MIYAMOTO, Kazuaki et al., Identification of 20 genes aberrantly methylated in human breast cancers, Int. J. Cancer, 2005, vol.116, p.407-414	1-8
A	DEDEURWAERDER, Sarah, DNA methylation profiling reveals a predominant immune component in breast cancers, EMBO Mol. Med., 2011, vol.3, p.726-741	1-8

☑ 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

27.09.2019

国際調査報告の発送日

08.10.2019

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)

池上 京子

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

4667

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
A	DING, Sheng et al., Methylation profile of the promoter CpG islands of 14 "drug-resistance" genes in hepatocellular carcinoma, World J Gastroenterol, 2004, vol.10, no.23, p.3433-3440	1-8