

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-518639

(P2008-518639A)

(43) 公表日 平成20年6月5日(2008.6.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 60 頁)

(21) 出願番号	特願2007-540479 (P2007-540479)	(71) 出願人	304043888
(86) (22) 出願日	平成18年3月17日 (2006.3.17)		ザ チャイニーズ ユニバーシティー オブ ホンコン
(85) 翻訳文提出日	平成19年5月9日 (2007.5.9)		THE CHINESE UNIVERS
(86) 国際出願番号	PCT/CN2006/000412		ITY OF HONGKONG
(87) 国際公開番号	W02006/097049		中華人民共和国 香港 エヌティー シャティン
(87) 国際公開日	平成18年9月21日 (2006.9.21)		Shatin, NT Hong Kon
(31) 優先権主張番号	60/663, 173		g China
(32) 優先日	平成17年3月18日 (2005.3.18)	(71) 出願人	507151308
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ボストン ユニバーシティー
			アメリカ合衆国 02215 マサチュー
			セッツ州 ボストン シャーバーン ストリート ワン
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 染色体異数性の検出方法

(57) 【要約】

胎児染色対異数性の非侵襲性検出を実証する。胎児RNAを含有する生物学的サンプル(例えば、母体血)中に存在する胎児RNA-SNPの対立遺伝子を、検出および定量し、該対立遺伝子の比率を測定する。この比率を、正倍数性胎児からなる標準コントロールと比較する。対立遺伝子比率の逸脱は、染色体異数性の存在を示す。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

妊婦の胎児における染色体異常の存在を検出するための方法であって、以下：

(a) 該妊婦由来の R N A 含有生物学的サンプル中の、問題の少なくとも 1 つの染色体由来の少なくとも 1 つの遺伝子座から転写された R N A 由来の対立遺伝子を識別する工程 [ここで、該 R N A 含有生物学的サンプルは胎児 R N A を含有する] ；

(b) 該 R N A 転写物の該対立遺伝子の比率を測定する工程；および

(c) 工程 (b) からの比率と、染色体が正常である胎児を各々妊娠している妊婦から得られた比較可能な生物学的サンプル由来の対立遺伝子の比率を示す標準コントロールとを比較する工程 [ここで、該標準コントロールからの該比率の増加または減少は、染色体異常を有する胎児を有する増加した危険性を示す] を含む、方法。

10

【請求項 2】

前記染色体異常が、21トリソミー、18トリソミーおよび13トリソミーからなる群から選択されるメンバーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記染色体異常が 21トリソミーである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記染色体異常が X 染色体または Y 染色体上にある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

工程 (a) における生物学的サンプルが、母体血、母体血漿または血清、羊水、絨毛膜絨毛サンプル、着床前胚由来の生検材料、母体血から単離された胎児有核細胞または胎児細胞レムナント、母体尿、母体唾液、女性生殖管の洗浄物、およびセロセンテシス (celocentesis) によって得られるサンプルからなる群から選択されるメンバーである、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6】

工程 (a) における生物学的サンプルが母体血である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

工程 (a) における生物学的サンプルが、母体血中の細胞エレメントまたは細胞レムナントを含有する、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 8】

工程 (a) における胎児 R N A が胎盤に由来する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

工程 (a) が逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) を使用して行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

工程 (a) および / または工程 (b) が、プライマー伸長反応、質量分析、少なくとも 1 つのプロープを使用するハイブリダイゼーション、少なくとも 1 つの蛍光標識プロープを使用するハイブリダイゼーション、直接配列決定、クローニングおよび配列決定、ならびに電気泳動からなる群から選択されるメンバーを使用して行われる、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 11】

工程 (a) 、 (b) および (c) における対立遺伝子が、配列変異によって区別される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記配列変異が一塩基多型 (S N P) である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記配列変異が挿入 / 欠失多型である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

前記配列変異がシンプルタンデムリピート多型 (simple tandem repeat polymorphism

50

)である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 R N A が、第 2 1 染色体、第 1 8 染色体、第 1 3 染色体、X 染色体、および Y 染色体からなる群から選択されるメンバーから転写される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記 R N A が第 2 1 染色体から転写される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記 R N A が m R N A である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記 R N A が、コラーゲン V I アルファ 1 (collagen VI alpha 1) (C O L 6 A 1)、スーパーオキシドジスムターゼ 1 (superoxide dismutase 1) (S O D 1)、コラーゲン V I アルファ 2 (collagen VI alpha 2) (C O L 6 A 2)、ミトコンドリア A T P シンターゼ O サブユニット (mitochondrial ATP synthase O subunit) (A T P 5 O)、B T G ファミリー、メンバー 3 (BTG family, member 3) (B T G 3)、ディスインテグリン - ライク・アンド・メタロプロテアーゼ (レプロリシタイプ)・ウィズ・トロンボスポンジンタイプ 1 モチーフ, 1 (a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1) (A D A M T S 1)、ベータ位 A P P 切断酵素 2 (beta-site APP-cleaving enzyme 2) (B A C E 2)、インターセクチン 1 (intersectin 1) (I T S N 1)、アミロイドベータ (A 4) 前駆体蛋白質 (amyloid beta (A4) precursor protein) (A P P)、A T P シンターゼ, H + 輸送, ミトコンドリア F 0 複合体, サブユニット F 6 (ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F6) (A T P 5 J)、ダウン症候群重要領域遺伝子 5 (Down syndrome critical region gene 5) (D S C R 5)、胎盤特異的 4 (placenta-specific 4) (P L A C 4)、仮想蛋白質 B C 0 0 5 1 0 7 (hypothetical protein BC005107) (L O C 9 0 6 2 5)、リボソーム蛋白質 L 1 7 (ribosomal protein L17) (R P L 1 7)、セルピンペプチダーゼインヒビタークレード B (オボアルブミン) メンバー 2 (serpin peptidase inhibitor clade B (ovalbumin) member 2) (S E R P I N B 2) およびコラーゲン I V 型アルファ 2 (collagen type IV alpha 2) (C O L 4 A 2) からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子座から転写される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記 R N A が、前記遺伝子座の少なくとも 1 つの一塩基多型を含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記 R N A が、コラーゲン V I アルファ 1 (C O L 6 A 1) およびコラーゲン V I アルファ 2 (C O L 6 A 2) からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子座から転写される、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

C O L 6 A 1 の遺伝子座から転写される R N A における S N P が、^A r g 8 5 0 _{H i s} または ^S e r 9 3 2 _{S e r} である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

C O L 6 A 2 の遺伝子座から転写される R N A における S N P が、^V a 1 7 2 8 _{v a 1} である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記 R N A が、胎盤特異的 4 (P L A C 4) についての遺伝子座から転写される、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記 R N A が、A F 2 6 9 2 8 7、A K 0 2 7 8 6 8、A K 0 9 2 4 3 1、B C 0 9 3 6 8 5、B C 1 0 1 6 1 5、B C 1 0 1 6 1 7、L 1 3 1 9 7、N M __ 1 8 2 8 3 2 および L O C 1 9 1 5 8 5 等の、P L A C 4 遺伝子座から転写される任意の変異体である、請求項 2 3 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 25】

前記 P L A C 4 遺伝子の遺伝子座から転写される R N A が、 r s 3 8 0 4 0 2 6、 r s 4 8 1 8 2 1 9、 r s 7 8 4 4、 r s 9 0 1 5、 r s 1 3 6 4 3、 r s 9 3 0 5 7 2 9、 r s 9 3 0 5 7 3 0、 r s 5 0 1 9 1 9 5、 r s 5 0 1 9 1 9 4、 r s 5 8 4 4 0 6 9、 r s 1 0 4 9 9 0 4、 r s 1 6 9 9 8 0 8 9、 r s 1 2 4 8 2 1 1 6、 r s 1 1 9 0 9 4 3 9、 r s 7 2 7 8 6 5 9、 r s 1 2 1 0 6 4 0 9、 r s 1 2 1 0 6 3 9 5、 r s 1 2 1 0 6 4 0 1、 r s 1 2 1 0 6 4 3 4、 r s 2 1 8 3 5 8 4、 r s 3 9 4 9 7 2 5、 r s 8 1 3 0 8 3 3、 r s 1 0 2 2 2 1 4 5、 r s 9 9 8 1 4 7 8、 r s 8 1 3 0 8 3 3、 r s 9 9 7 7 0 0 3、 P L A C 4 - 4 1 4 7 1 1 4 5 および P L A C 4 - 4 1 4 7 6 2 3 6 からなる群から選択される一塩基多型または挿入 - 欠失多型を含む、請求項 23 に記載の方法。

10

【請求項 26】

前記妊婦が妊娠第 1 期の間にある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 27】

前記妊婦が妊娠第 2 期の間にある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 28】

工程 (b) における比率が前記標準コントロールから 1 標準偏差より高いかまたはより低い場合、工程 (c) における比較が、染色体異常を有する胎児の増加した危険性を示す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

工程 (b) における比率が前記標準コントロールから 2 標準偏差より高いかまたはより低い場合、工程 (c) における比較が、染色体異常を有する胎児の増加した危険性を示す、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 30】

工程 (b) における比率が前記標準コントロールから 3 標準偏差より高いかまたはより低い場合、工程 (c) における比較が、染色体異常を有する胎児の増加した危険性を示す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 31】

妊婦における染色体異常を有する胎児の存在を検出するためのキットであって、該キットが、以下：

30

(a) 問題の領域を増幅するためのプライマー；および

(b) 染色体が正常である胎児を各々妊娠している妊婦から得られた比較可能な生物学的サンプル由来の対立遺伝子の比率を示す標準コントロールを備える、キット。

【請求項 32】

さらに、以下：

(c) 各 R N A 種の異なる対立遺伝子間を識別するためのハイブリダイゼーションプロ

ーブを備える、請求項 31 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

40

【背景技術】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2005年3月18日に提出された米国仮出願第 60 / 663 , 173 号に対して優先権を主張する。

【0002】

適用されず (NOT APPLICABLE)

発明の背景

染色体異常性は、出生前および出生後生活の間の死亡率の重要な原因である。染色体異常性の評価は、伝統的に、胎児の生存能力および出生前診断の研究と関連してきた。染色

50

体異数性の検出およびキャラクタライゼーションのための方法としては、分裂中期染色体の核型分析、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (FISH) (Homer, J. et al., Prenat Diagn 23:566-571 (2003))、定量蛍光ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) (Mann, K. Methods Mol Med 92:141-156 (2004))、遺伝子量 PCR (Zimmermann, B. et al., Clin Chem 48:362-363 (2002))、およびアレイによる比較ゲノムハイブリダイゼーション (array-based comparative genomic hybridization) (CGH) (Hu, D.G. et al., Mol Hum Reprod (2004)) が挙げられる。

【 0 0 0 3 】

胎児染色体異数性は、胎児消失に有意に寄与すると知られており、そして第 1 期自然流産の 50% を占める (Chitty, L. Br Med Bull 54:839-856 (1998))。生存可能な胎児は、特に、特定のタイプの染色体異数性に関連している。21トリソミー、即ちダウン症候群は、800 の出生のうち 1 の発生を伴って出生後の生存と適合性である最も一般的な常染色体異数性である (Hook, E. B. Lancet 2:169-172 (1981))。21トリソミーは、カップルが出生前診断を選択する最も一般的な理由である。現在、21トリソミー胎児および他の染色体異数性の確定的な診断は、羊水穿刺および絨毛膜絨毛サンプリング (CVS) のような侵襲的手技によって得られる胎児遺伝物質の遺伝子分析に依存する。それらの侵襲的性質によって、これらの手技は、自然流産の有限の危険と関連する。したがって、他の非侵襲的アプローチが、21トリソミー胎児を妊娠している危険性に従って妊娠を層別化するために開発されてきた。胎児消失の手技関連危険性よりも大きな危険性として定義される、本質的な危険性を有する妊娠だけが、侵襲的手技を受けるよう推奨される。現在使用されている危険性層別化戦略は、母体年齢、母体血清生化学マーカーおよび胎児超音波特徴の評価を含む (Nicolaidis, K. H. et al., Prenat Diagn 22:308-315 (2002))。

10

20

【 0 0 0 4 】

より良い感度および特異性に得るために、マーカーおよびアプローチの種々の組合せが、評価されてきており (Wald, N. J. et al., Prenat Diagn 17:821-829 (1997))、三重テスト (triple test)、四重テスト (quadruple test) (Wald, N. J. et al., Lancet 361:835-836 (2003))、統合テスト (integrated test) (Wald, N. J. et al., N Engl J Med 341:461-467 (1999)) および第 1 期スクリーニング (Wapner, R. et al., N Engl J Med 349:1405-1413 (2003)) を含む。使用される血清生化学マーカーとしては、アルファフェトプロテイン、複合体化していないエストリオール、トータルまたはフリーのベータ-ヒト絨毛性ゴナドトロピン、インヒピン-A および妊娠と関連する血漿蛋白質-A (PAPP-A) が挙げられる。それらのスクリーニング様式により危険性が高いと示される妊娠は、結局、羊水穿刺または CVS に委ねられる。

30

【 0 0 0 5 】

最近、母体血漿中の循環無細胞胎児核酸の発見により、非侵襲的にサンプル化され得る胎児遺伝物質の代替供給源が提供された (Lo, Y. M. D. et al., Lancet 350:485-487 (1997); Poon, L. L. M. et al., Clin Chem 46:1832-1834 (2000))。更に、21トリソミー胎児を妊娠している女性の血漿中の循環胎児 DNA 濃度は、正倍数性の胎児を妊娠している女性中のそれより有意に高いことが示された (Lo, Y. M. D. et al., Clin Chem 45:1747-1751 (1999); Zhong, X. Y. et al., Prenat Diagn 20:795-798 (2000))。最近、循環胎児 RNA も、母体血漿中の性別に無関係の胎児核酸マーカーのクラスとして見込みがあると示された (Ng, E. K. O. et al., Clin Chem 49:727-731 (2003); Ng, E. K. O. et al., Proc Natl Acad Sci USA 100:4748-4753 (2003))。したがって、循環胎児核酸定量は、妊娠の危険性層別化のためのさらなる出生前スクリーニングマーカーとして有用である。

40

【 0 0 0 6 】

胎盤発現される mRNA 転写物、例えば、ヒト胎盤性ラクトゲン (human placental lactogen) (hPL)、ヒト絨毛性ゴナドトロピンベータサブユニット (human chorionic gonadotropin beta subunit) (hCG) (Ng, E. K. O. et al., Clin Chem 49:727-7

50

31 (2003))、コルチコトロピン放出ホルモン (corticotropin releasing hormone) (CRH) (Ng, E. K. O. et al, Proc Natl Acad Sci U S A 100:4748-4753 (2003b))、組織因子経路インヒビター2 (tissue factor pathway inhibitor 2) (TFPI2)、KiSS-1 転移-サプレッサ (KiSS-1 metastasis-suppressor) (KiSS1) および胎盤特異的1 (placenta-specific 1) (PLAC1) (Tsui, N. B. Y. et al., J Med Genet 41:461-7 (2004)) をコードするものが、母体血漿中で検出可能であると示された。これらの胎盤由来の mRNA 種は、妊娠特異的であることが知られている (Ng, E. K. O. et al., Proc Natl Acad Sci USA 100:4748-4753 (2003); Tsui, N. B. Y. et al., J Med Genet 41:461-7 (2004))。特に、母体血漿中の CRH mRNA 濃度の異常な上昇が、妊娠中毒症妊娠において報告されている (Ng, E. K. O. et al., Clin Chem 49:727-731 (2003))。これらの胎盤発現されるマーカーは妊娠特異的であるが、性別および多型性に無関係であるので、それらは全ての妊娠の非侵襲的出生前評価において有用である。

10

【0007】

染色体異数性は、異数性染色体上に局在する遺伝子の量を変化させる。変化された遺伝子量は、遺伝子の歪められた対立遺伝子比率によって反映され得る。歪められた対立遺伝子比率は、次に、異数性染色体上の遺伝子座の RNA 転写物上に存在する多型の対立遺伝子の歪められた比率によって反映される。このような多型の1例は、一塩基多型 (SNP) であり、ここで、SNP 対立遺伝子の比率は、関連する染色体の異数性の存在において歪められ得る。したがって、RNA-SNP 比率についての参照範囲は、正常な妊娠について確立され、そして胎児 21トリソミーは、該参照比率からの偏差 (deviation) が観察される場合に決定され得る。分析の従来 of 細胞遺伝学的方法と比較して、提案される技術は、胎児細胞の事前培養を必要とせず、したがって分析時間を短縮する。さらに、母体血サンプルは、非侵襲的に得ることができ、したがって、胎児および母体の両方に対する潜在的な害を最小限にする。

20

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の簡単な要旨

1つの実施形態において、本発明は、染色体が正常である胎児を妊娠している妊婦において見られる比率と比較して、妊婦の胎児由来の RNA 転写物分子の対立遺伝子の比率を使用する、妊婦の胎児における染色体異常の存在を検出するための改善された方法を提供する。この様式での該比率の使用は、特に、存在する特定の RNA 転写物の総濃度または特定の対立遺伝子の量を単に定量することと比較して、胎児の染色体異常を検出することにおいて優れた感度を提供する。

30

【0009】

前記方法の第1工程は、妊婦の胎児における RNA 転写物の対立遺伝子の比率を測定することを含む。これは、妊婦から RNA 含有生物学的サンプルを得ることによって達成され、ここで、該 RNA 含有生物学的サンプルは胎児 RNA を含有する。次いで、問題の少なくとも1つの染色体由来の少なくとも1つの遺伝子座から転写された RNA から対立遺伝子が識別され、続いて、該 RNA 転写物の対立遺伝子の比率が測定される。第2工程は、前記妊婦由来の前記比率と、染色体が正常である胎児を各々妊娠している妊婦から得られた比較可能な生物学的サンプル由来の対立遺伝子の平均比率を示す標準コントロールとを比較することを包含し、ここで、標準コントロールからの該比率の増加または減少は、染色体異常を有する胎児を有する増加した危険性を示す。

40

【0010】

ある実施形態において、本発明は、染色体異常が、21トリソミー、18トリソミーおよび13トリソミーからなる群から選択されるメンバーである方法を提供する。他の実施形態において、染色体異常は21トリソミーである。別の実施形態において、染色体異常は13トリソミーである。さらなる実施形態において、染色体異常は18トリソミーである。なお別の実施形態において、染色体異常はX染色体またはY染色体に関連する。

50

【 0 0 1 1 】

別の実施形態において、本発明は、RNA含有生物学的サンプルを得る工程由来の前記生物学的サンプルが、母体血、母体血漿または血清、羊水、絨毛膜絨毛サンプル (chorionic villus sample)、着床前胚由来の生検材料、母体血から単離された胎児有核細胞または胎児細胞レムナント (fetal nucleated cells or fetal cellular remnants)、母体尿、母体唾液、女性生殖管の洗浄物、およびセロセンテシス (celocentesis) によって得られるサンプルからなる群から選択されるメンバーである方法を提供する。なお別の実施形態において、生物学的サンプルは、母体血である。なお別の実施形態において、生物学的サンプルは、絨毛膜絨毛サンプルである。さらなる実施形態において、生物学的サンプルは、母体血中の細胞エレメントまたは細胞レムナント (cellular remnants) を含有する。

10

【 0 0 1 2 】

他の実施形態において、本発明は、RNA含有生物学的サンプルを得る工程由来の前記胎児RNAが、胎盤に由来する方法を提供する。

【 0 0 1 3 】

別の実施形態において、本発明は、RNAの対立遺伝子を識別する前記工程が、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を含む方法を提供する。

【 0 0 1 4 】

さらなる実施形態において、本発明は、RNAの対立遺伝子を識別する前記工程および/または異なる対立遺伝子の比率を測定する前記工程が、プライマー伸長反応、質量分析、少なくとも1つのプローブを使用するハイブリダイゼーション、少なくとも1つの蛍光標識プローブを使用するハイブリダイゼーション、直接配列決定 (direct sequencing)、クローニングおよび配列決定、ならびに電気泳動からなる群から選択されるメンバーを使用して行われる方法を提供する。

20

【 0 0 1 5 】

ある実施形態において、本発明は、RNAの対立遺伝子を識別すること、異なる対立遺伝子の比率を測定すること、および前の工程からの比率を標準コントロールと比較することを含む前記工程の対立遺伝子が、配列変異 (sequence variation) によって区別される方法を提供する。別の実施形態において、前記配列変異は一塩基多型 (SNP) である。さらなる実施形態において、前記配列変異は、挿入/欠失多型である。なお別の実施形態において、前記配列変異は、シンプルタンデムリピート多型 (simple tandem repeat polymorphism) である。

30

【 0 0 1 6 】

他の実施形態において、本発明は、前記RNAが、第21染色体、第18染色体、第13染色体、X染色体およびY染色体からなる群から選択されるメンバーから転写される方法を提供する。別の実施形態において、前記RNAは、第21染色体から転写される。さらなる実施形態において、前記RNAは、第18染色体から転写される。なお別の実施形態において、前記RNAは、第13染色体から転写される。

【 0 0 1 7 】

別の実施形態において、本発明は、母体血のレベルの2倍またはそれを超えるレベルで、前記RNAが胎盤において発現される方法を提供する。ある実施形態において、前記RNAは、母体血のレベルの5倍またはそれを超えるレベルで胎盤において発現される。他の実施形態において、前記RNAは、母体血のレベルの10倍またはそれを超えるレベルで胎盤において発現される。

40

【 0 0 1 8 】

さらなる実施形態において、本発明は、前記RNAがmRNAである方法を提供する。別の実施形態において、前記RNAは、コラーゲンVIアルファ1 (collagen VI alpha 1) (COL6A1)、スーパーオキシドジスムターゼ1 (superoxide dismutase 1) (SOD1)、コラーゲンVIアルファ2 (collagen VI alpha 2) (COL6A2)、ミトコンドリアATPシンターゼOサブユニット (mitochondrial ATP synthase O subunit

50

) (A T P 5 O)、 B T Gファミリー、メンバー3 (BTG family, member 3) (B T G 3)、ディスインテグリン - ライク・アンド・メタロプロテアーゼ (レプロリシタイプ) ・ウィズ・トロンボスポンジンタイプ1モチーフ, 1 (a disintegrin-like and metallo protease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1) (A D A M T S 1)、ベータ位 A P P 切断酵素 2 (beta-site APP-cleaving enzyme 2) (B A C E 2)、インターセクチン 1 (intersectin 1) (I T S N 1)、アミロイドベータ (A 4) 前駆体蛋白質 (amyloid beta (A4) precursor protein) (A P P)、A T P シンターゼ, H + 輸送, ミトコンドリア F 0 複合体, サブユニット F 6 (ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F6) (A T P 5 J)、ダウン症候群重要領域遺伝子 5 (Down syndrome critical region gene 5) (D S C R 5)、胎盤特異的 4 (placenta-specific 4) (P L A C 4)、仮想蛋白質 B C 0 0 5 1 0 7 (hypothetical protein BC005107) (L O C 9 0 6 2 5)、リボソーム蛋白質 L 1 7 (ribosomal protein L17) (R P L 1 7)、セルピンペプチダーゼインヒビタークレード B (オボアルブミン) メンバー 2 (serpin peptidase inhibitor clade B (ovalbumin) member 2) (S E R P I N B 2) およびコラーゲン I V 型アルファ 2 (collagen type IV alpha 2) (C O L 4 A 2) からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子座から転写される。なお別の実施形態において、前記 R N A は、一塩基多型を含む遺伝子座から転写される。他の実施形態において、前記 R N A は、コラーゲン V I アルファ 1 (C O L 6 A 1) およびコラーゲン V I アルファ 2 (C O L 6 A 2) からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子座から転写される。なお他の実施形態において、遺伝子座 C O L 6 A 1 SNP から転写される前記 R N A は、^Ar^g850_Hi_s または ^Se^r932_se_r である。なお別の実施形態において、遺伝子座 C O L 6 A 2 SNP から転写される前記 R N A は、^Va^l728_va_l である。

10

20

30

40

50

【0019】

別の実施形態において、本発明は、前記 R N A が胎盤特異的 4 (P L A C 4) についての遺伝子座から転写される方法を提供する。なお別の実施形態において、前記 R N A は、A F 2 6 9 2 8 7、A K 0 2 7 8 6 8、A K 0 9 2 4 3 1、B C 0 9 3 6 8 5、B C 1 0 1 6 1 5、B C 1 0 1 6 1 7、L 1 3 1 9 7、N M _ 1 8 2 8 3 2 および L O C 1 9 1 5 8 5 等の、P L A C 4 遺伝子の任意の変異体から転写される。なおさらに別の実施形態において、P L A C 4 遺伝子の遺伝子座から転写される R N A は、以下からなる群から選択される一塩基多型または挿入 - 欠失多型 (insertion-deletion polymorphism) を含む：r s 3 8 0 4 0 2 6、r s 4 8 1 8 2 1 9、r s 9 9 7 7 0 0 3、r s 7 8 4 4、r s 9 0 1 5、r s 1 3 6 4 3、r s 9 3 0 5 7 2 9、r s 9 3 0 5 7 3 0、r s 5 0 1 9 1 9 5、r s 5 0 1 9 1 9 4、r s 5 8 4 4 0 6 9、r s 1 0 4 9 9 0 4、r s 1 6 9 9 8 0 8 9、r s 1 2 4 8 2 1 1 6、r s 1 1 9 0 9 4 3 9、r s 7 2 7 8 6 5 9、r s 1 2 1 0 6 4 0 9、r s 1 2 1 0 6 3 9 5、r s 1 2 1 0 6 4 0 1、r s 1 2 1 0 6 4 3 4、r s 2 1 8 3 5 8 4、r s 3 9 4 9 7 2 5、r s 8 1 3 0 8 3 3、r s 1 0 2 2 2 1 4 5 および r s 9 9 8 1 4 7 8、あるいは P L A C 4 - 4 1 4 7 1 1 4 5 および P L A C 4 - 4 1 4 7 6 2 3 6 等の P L A C 4 遺伝子座内に局在する他の多型。

【0020】

ある実施形態において、本発明は、前記妊婦が妊娠第 1 期の間にある方法を提供する。他の実施形態において、前記妊婦は、妊娠の第 2 期または第 3 期の間にある。

【0021】

さらなる実施形態において、本発明は、妊婦の胎児における R N A 転写物の対立遺伝子の前記比率が前記標準コントロールから 1 標準偏差より高いかまたはより低い場合、前記比較工程が、染色体異常を有する胎児の増加した危険性を示す方法を提供する。別の実施形態において、前記比較工程は、妊婦の胎児における R N A 転写物の対立遺伝子の前記比率が前記標準コントロールから 2 標準偏差より高いかまたはより低い場合、染色体異常を有する胎児の増加した危険性を示す。ある他の実施形態において、前記比較工程は、妊婦の胎児における R N A 転写物の対立遺伝子の前記比率が前記標準コントロールから 3 標準

偏差より高いかまたはより低い場合、染色体異常を有する胎児の増加した危険性を示す。

【0022】

別の実施形態において、本発明は、妊婦における染色体異常を有する胎児の存在を検出するためのキットを提供する。該キットの1コンポーネントは、問題の領域を増幅するためのプライマーである。該キットの別のコンポーネントは、染色体が正常である胎児を各々妊娠している妊婦から得られた比較可能な生物学的サンプル由来の対立遺伝子の平均比率を示す標準コントロールである。なお別の実施形態において、該キットの第3コンポーネントは、各RNA種の異なる対立遺伝子間を識別するためのハイブリダイゼーションプロープを含む。

【0023】

発明の詳細な説明

I. 定義

本明細書中で使用される場合、用語「染色体異常 (chromosomal disorder)」は、通常、染色体の数が、通常のアブロイド数の正確な倍数でない染色体異常 (chromosomal abnormality) の状態を指し：しばしば、追加の染色体が存在するか、または1つの染色体が失われている。ある場合には、「染色体異常」はまた、1以上の染色体の比率が、例えば染色体転座により、通常のアブロイド数の正確な倍数でない、染色体異常の状態を指し得る。一般的な染色体異常は、異数性である。染色体異数性の一般的な形態は、1つのさらなる染色体が存在するトリソミーである。例えば、18トリソミーは、第3の第18染色体が細胞中に見られる染色体異常であり、一方、21トリソミーに苦しむ患者の細胞中には、第3の第21染色体が存在する。染色体転座 (例えば、第14染色体の一部が余分な第21染色体によって置換される、第21染色体および第14染色体の間の転座) は、部分的な21トリソミーを引き起こし得る。

【0024】

本明細書中で使用される場合、用語「RNA含有生物学的サンプル」は、リボ核酸 (RNA) を含有する生物学的サンプル (例えば、以下に議論するもの) をいう。RNAは、ヒトゲノムにおける予め選択された位置の少なくとも一部に対応する配列を有するリボヌクレオチドのポリマーをいう。本明細書中で使用されるRNAとしては、mRNA、リボソームRNAおよびマイクロRNAが挙げられるが、これらに限定されない。RNAは、mRNA等の、蛋白質コード配列、あるいはリボソームRNA、マイクロRNAまたは十分に規定された機能を有さない他の転写された配列等の、非コード配列であり得る。mRNAは、遺伝子のDNAから転写されたRNA分子であり、そしてそれから蛋白質がリボソームの作用により翻訳される。リボソームRNA (rRNA) は、蛋白質に翻訳されない非コードRNAである。マイクロRNA (miRNA) は、それらの機能によってではなく、それらの起源によって識別される「低分子RNA」のサブタイプである。マイクロRNAは、長さが30ヌクレオチド未満であり、そしてDNAから転写されるが蛋白質へ翻訳されない。当業者は、他のタイプのRNAも本発明において有用であることを理解する。

【0025】

本明細書中で使用される場合、用語「胎児の」、「胎盤由来」および「胎盤発現された」は、妊婦由来の生物学的サンプル (例えば、血液) 中において検出可能である特定のRNA種の起源を指す。例えば、胎児RNA種は、胎児DNA配列から転写されたものである。胎盤由来または胎盤発現されたRNAは、胎児RNAの一種である。当業者は、他の胎児RNAも本発明において有用であることを理解する。胎盤由来または胎盤発現されたRNA種は、胎盤において転写されるものである。

【0026】

本明細書中で使用される場合、用語「問題の少なくとも1つの染色体由来の少なくとも1つの遺伝子座から転写されたRNA由来の対立遺伝子を識別する」は、染色体上の特定の遺伝子座から転写された特定のRNA対立遺伝子の検出および定量を指す。対立遺伝子の検出および定量は、ハイブリダイゼーションプロープおよび定量リアルタイムポリメラ

10

20

30

40

50

ーゼ連鎖反応 (QRT-PCR) の使用を含む、種々の方法によって行われ得る。他の方法としては、質量分析 (MS)、電気泳動、パイロシーケンシング (pyrosequencing)、プライマーエクステンションマイクロアレイ、チップおよびシーケンシングの使用が挙げられる。

【0027】

本明細書中で使用される場合、用語「対立遺伝子の比率」は、生物学的サンプル中の一方の対立遺伝子の集団と他方の対立遺伝子の集団の比率を指す。ある場合には、トリソミーにおいて、胎児が特定の座について3対立遺伝子性 (tri-allelic) であり得ることが可能である。このような場合において、用語「対立遺伝子の比率」は、他方の対立遺伝子うちの1つに対するいずれか一方の対立遺伝子、あるいは他方の2つの対立遺伝子に対するいずれか一方の対立遺伝子の集団の比率を指す。

10

【0028】

本明細書中で使用される場合、用語「標準コントロール」は、特定の遺伝子座、例えば、COL6A1、SOD1、COL6A2、ATP5O、BTG3、ADAMTS1、BACE2、ITSN1、APP、ATP5J、DSCR5、PLAC4、LOC90625、RPL17、SERPINB2またはCOL4A2から転写されるRNA-SNP対立遺伝子の比率を測定するための、本発明の方法の使用に好適なサンプルをいう。このようなサンプルは、染色体が正常である胎児を各々妊娠している妊婦におけるこのようなRNA-SNP対立遺伝子の平均比率を厳密に反映する、特定の遺伝子座から転写される既知の比率のRNA-SNP対立遺伝子を含む。標準コントロールはまた、平均値比率 (mean ratio)、中央値比率 (median ratio)、あるいは当業者に公知の別の有用な比率を示し得る。標準コントロールの測定は、以下により詳細に記載される。

20

【0029】

本明細書中で使用される場合、用語「妊婦」は、染色体が正常である胎児を各々妊娠している妊婦のグループを指し、そして、染色体が正常である胎児を妊娠している女性の無作為に選択されるグループの代表である、特定の特徴 (例えば、問題の遺伝子座から転写されたRNA対立遺伝子の比率) を指す。この選択されるグループは、十分な数の女性を含むべきであり、その結果、これらの女性の中で問題の遺伝子座から転写されるRNA対立遺伝子のアベレージ (average)、平均 (mean)、中央 (median) または他の数学的関係比率が、論理的な正確さで、健康な胎児を妊娠している健康な妊婦の一般的な集団におけるRNA対立遺伝子の比率を反映するようになる。母親は、妊娠第1期、妊娠の最初の約13週の間、胎児染色体異数性の危険性についてスクリーニングされ得る。母親は、妊娠の第2期または第3期の間にもスクリーニングされ得る。妊娠第2期は、妊娠の約14~約27週である。妊娠第3期は、約28週から妊娠の終了、約40週までである。さらに、テストのための好ましい妊娠期間はまた、テストにおいて使用されるRNAマーカーに依存し得る。

30

【0030】

本明細書中で使用される場合、用語「染色体が正常である」は、染色体の数が、ハプロイド数の正確な倍数であり (例えば、ハプロイドにおいて見られる染色体数の2倍)、かつ各々の染色体が同数で存在する (例えば男性の場合における性染色体を除く; ここで、2つの異なる性染色体、XおよびYが、各々1つのコピーで存在する) 状態をいう。

40

【0031】

本明細書中で使用される場合、用語「標準コントロールからの比率の増加または減少」は、標準コントロールと比較した場合の該比率の正または負の変化を指す。増加は、好ましくは少なくとも10%、より好ましくは少なくとも50%、そして最も好ましくは少なくとも100%である。同様に、減少は、好ましくは少なくとも10%、より好ましくは少なくとも50%、そして最も好ましくは少なくとも90%である。さらに、前記比率の増加または減少は、標準コントロールから少なくとも1標準偏差であり得る。前記増加または減少はまた、標準コントロールから少なくとも2標準偏差であり得る。前記増加または減少はまた、標準コントロールから少なくとも3標準偏差であり得る。

50

【0032】

本明細書中で使用される場合、用語「一塩基多型」(SNP)は、単一ヌクレオチドの変更を含む核酸配列変異(nucleic acid sequence variation)を指す。本発明において有用なSNPとしては、以下を含むがこれらに限定されない問題の遺伝子座から転写される対応のRNA転写物上に存在するものが挙げられる：コラーゲンVIアルファ1(collagen VI alpha 1)(COL6A1)、スーパーオキシドジスムターゼ1(superoxide dismutase 1)(SOD1)、コラーゲンVIアルファ2(collagen VI alpha 2)(COL6A2)、ミトコンドリアATPシンターゼOサブユニット(mitochondrial ATP synthase O subunit)(ATP5O)、BTGFファミリー、メンバー3(BTG family, member 3)(BTG3)、ディスインテグリン-ライク・アンド・メタロプロテアーゼ(レプロリシタイプ)・ウィズ・トロンボスポンジンタイプ1モチーフ, 1(a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1)(ADAMTS1)、ベータ位APP切断酵素2(beta-site APP-cleaving enzyme 2)(BACE2)、インターセクチン1(intersectin 1)(ITSN1)、アミロイドベータ(A4)前駆体蛋白質(amyloid beta (A4) precursor protein)(APP)、ATPシンターゼ, H⁺輸送, ミトコンドリアF₀複合体, サブユニットF₆(ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F₀ complex, subunit F₆)(ATP5J)、ダウン症候群重要領域遺伝子5(Down syndrome critical region gene 5)(DSCR5)、胎盤特異的4(placenta-specific 4)(PLAC4)、仮想蛋白質BC005107(hypothetical protein BC005107)(LOC90625)、リボソーム蛋白質L17(ribosomal protein L17)(RPL17)、セルピンペプチダーゼインヒビタークレードB(オボアルブミン)メンバー2(serpin peptidase inhibitor clade B (ovalbumin) member 2)(SERPINB2)およびコラーゲンIV型アルファ2(collagen type IV alpha 2)(COL4A2)。このようなSNPは、RNA上の単一ヌクレオチドの変更を含むので、RNA-SNPと呼ばれる。次いで、RNA-SNPの対立遺伝子を、本発明において使用し、妊婦から得られる生物学的サンプル中のRNA-SNP対立遺伝子の比率を測定し、そして該比率を、正常な胎児を各々妊娠している妊婦のグループから得られる生物学的サンプルから得られる比率と比較する。当業者は、他のマーカーならびに挿入/欠失多型もまた本発明において有用であることを理解する。

10

20

30

【0033】

本明細書中で使用される場合、用語「母体血」は、可能性のある妊娠について検査される女性または妊婦由来の血液サンプルまたは調製物をいう。該用語は、全血または血液のいずれの分画をも含む。「母体血」の例としては、血漿および血清が挙げられる。細胞を本質的に含有しない母体血サンプルはまた、「無細胞性(acellular)」と呼ばれ、ここで一般的に血小板は存在しない。

【0034】

本明細書中で使用される場合、用語「細胞エレメントまたは細胞レムナント(cellular elements or cellular remnants)」は、生物学的サンプル中に残る細胞の部分を行い、これらとしては、血小板、アポトーシス小体および合胞体層微粒子(syncytiotrophoblast microparticles)が挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0035】

II. 本発明の方法

本発明は、胎児発現される転写物の妊娠特異性を使用して、胎児の染色体異数性の遺伝的決定およびしたがってその診断の確立を非侵襲的に可能にする方法を開発する。1つの実施形態において、胎児発現される転写物は、胎盤において発現されるものである。具体的には、本発明は、異数性染色体上の遺伝子によってコードされる組織特異的発現パターンを有するRNA転写物由来の一塩基多型(SNP)を検出する。挿入/欠失多型およびシンプルタンデムリピート多型(simple tandem repeat polymorphism)等の他の多型もまた、本発明の方法によって検出可能である。遺伝子座の状態は、問題の遺伝子座から転写されたRNAの上の情報提供的な(informative)SNPの間の比率の評価によって測

50

定される。手短に言えば、本発明は、異数性胎児から正倍数性胎児まで、座 - および組織 - 特異的 RNA 転写物上の多型部位の対立遺伝子間の比率を比較する。

【0036】

したがって、本発明は、21トリソミーの出生前診断に適用され得、これは、第21染色体上の遺伝子座に由来する胎盤組織発現を有するRNA転写物上の情報提供的なSNPの分析を含む。次いで、母体血中の胎盤発現されたRNA転写物の検出による情報提供的なSNP間の前記比率を比較することによって、胎児21トリソミーが決定される。母体血中のマーカーの胎児特異性は、それらの胎盤組織発現によって与えられ、一方、異数性状態は、RNA転写物上の情報提供的なSNP間の異常な比率によって決定される。

【0037】

本発明の方法は、第21染色体上の遺伝子座によってコードされる胎盤発現されるRNA-SNPの分析に基づく、胎児21トリソミーの遺伝的決定およびその出生前診断を可能にする。RNA-SNP対立遺伝子は、例えば、リアルタイムQRT-PCRアッセイによって識別され得、そして該遺伝子座の遺伝子量を示すそれらの間の比率が測定される。別の実施形態において、RNA-SNP対立遺伝子は、プライマー伸長そして続いての質量分析によって識別され得る。

【0038】

A. 本発明の方法を使用して検出可能な染色体異常

本発明は、21トリソミー等の染色体異数性の検出方法を提供する。本発明はまた、第18染色体、第13染色体、X染色体およびY染色体上に存在するものまたはこれらに関連するもの等の他の胎児異数性の検出も可能にする。該方法はまた、母体血を分析する場合、胎児染色体異数性の非侵襲的検出を可能にする。RNA-SNP検出の有用性は、染色体異常の検出を超えて、胎児の他の遺伝的変異 (genetic variations) (例えば、父性遺伝性多型および変異) の検出へ広がる。

【0039】

B. 胎児染色体異常を検出するために本発明において有用な生物学的サンプル

本発明を実施する第1工程は、本発明の方法を使用する検査に適切な妊娠期間にある妊婦から、あるいは可能性のある妊娠に関して検査されている女性から、生物学的サンプルを得ることである。適切な妊娠期間は、上述されるように、検査される異常 (disorder) および場合によっては使用されるRNAマーカーに依存して変化し得る。

【0040】

生物学的サンプルは、母体血漿または血清を含む母体血であり得る。ある状況においては、生物学的サンプルは、無細胞性 (acellular) である。他の状況においては、生物学的サンプルは、母体血中の細胞エレメントまたは細胞レムナント (cellular remnants) を含有する。他の生物学的サンプルとしては、羊水、絨毛膜絨毛サンプル、着床前胚由来の生検材料、母体尿、母体唾液、セロセンテシス (celocentesis) サンプル、胎児有核細胞または胎児細胞レムナント、あるいは女性生殖管の洗浄物から得られるサンプルが挙げられる。

【0041】

生物学的サンプルが血液である場合、女性からの血液の回収は、病院または診療所が一般的に従う標準プロトコルに従って行われる。例えば3~20mlの好適な量の末梢血が回収され、そして次の調製より前に標準手順に従って貯蔵され得る。

【0042】

本発明において有用な生物学的サンプルは、胎児RNAを含有する。胎児RNAは、第21、第18、第13、XおよびY染色体から転写され得る。さらに、RNAが胎盤中で発現されるレベルは、母体血またはその種々の分画中で発現されるそのレベルの2倍、5倍または10倍あるいはそれ以上であり得る。

【0043】

胎児RNAは、胎盤を含むがこれに限定されない胎児起源の任意の組織に典型的に由来し、そしてmRNAであり得る。RNAは、種々の方法によって生物学的サンプルから抽

10

20

30

40

50

出され得る。RNA調製の一般的な方法（例えば、SambrookおよびRussell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3d ed., 2001によって記載される）が続けられ得；種々の市販の試薬またはキット、例えば、Trizol試薬（Invitrogen, カールズバッド, CA）、Oligotex Direct mRNAキット（Qiagen, バレンシア, CA）、RNeasyミニキット（Qiagen, ヒルデン, ドイツ）、およびPolyAtract（登録商標）シリーズ9600TM（Promega, マディソン, WI）もまた、女性からの血液サンプルからRNAを得るために使用され得る。これらの方法の2以上の組合せもまた使用され得る。サンプルの注意深い取り扱い、DNAアーゼでの完全な処理、および増幅と定量の工程における適切な陰性コントロールが、RNA調製物からDNAを除去するために使用されるべきである。

10

【0044】

C. RNA転写物の対立遺伝子を識別するための方法

RNA転写物の対立遺伝子を識別することは、PCR、質量分析（MS）、ゲル電気泳動、パイロシーケンシング（pyrosequencing）、プライマーエクステンションアッセイ、チップ、シーケンシングおよび1以上の蛍光プローブとのハイブリダイゼーションを含む種々の方法によって達成され得る。

【0045】

1. RNA-SNP対立遺伝子のPCRに基づく識別

いったんRNAが生物学的サンプルから抽出されると、例えば以下の問題のRNAの各々の特定のSNP対立遺伝子の量が評価され得る：COL6A1、SOD1、COL6A2、ATP5O、BTG3、ADAMTS1、BACE2、ITSN1、APP、ATP5J、DSCR5、PLAC4、LOC90625、RPL17、SERPINB2またはCOL4A2。

20

【0046】

選択される遺伝子の変異体もまた本発明において有用である。例えば、PLAC4遺伝子の有用な変異体としては、GenBankアクセッション番号によって同定される変異体が挙げられる：AF269287、AK027868、AK092431、BC093685、BC101615、BC101617、L13197、NM_182832およびLOC191585。PLAC4遺伝子の遺伝子座から転写されるRNAは、1以上の一塩基多型、または挿入-欠失多型を含む。PLAC4遺伝子から転写される例示的な多型としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：SNPのデータベース（[dbSNP](http://dbSNP.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/)）www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/）アクセッション番号によって同定される多型（UCSCゲノムブラウザ（genome.ucsc.edu/）のHuman May 2004（hg17）アセンブリに基づくPLAC4座標を有する）：rs3804026（PLAC4-41469163）、rs4818219（PLAC4-41469764）、rs9977003（PLAC4-41470591）、rs7844（PLAC4-41470699）、rs9015（PLAC4-41470877）、rs13643（PLAC4-41471296）、rs9305729（PLAC4-41472272）、rs9305730（PLAC4-41472277）、rs5019195（PLAC4-41473295）、rs5019194（PLAC4-41473302）、rs5844069（PLAC4-41473306）、rs1049904（PLAC4-41473392）、rs16998089（PLAC4-41473496）、rs12482116（PLAC4-41475590）、rs11909439（PLAC4-41475912）、rs7278659（PLAC4-41476875）、rs12106409（PLAC4-41477273）、rs12106395（PLAC4-41477340）、rs12106401（PLAC4-41477425）、rs12106434（PLAC4-41477486）、rs2183584（PLAC4-41477956）、rs3949725（PLAC4-41478283）、rs8130833（PLAC4-41478755）、rs10222145（PLAC4-41480512）およびrs9981478（P

30

40

50

L A C 4 - 4 1 4 8 0 5 6 4)、あるいは P L A C 4 - 4 1 4 7 1 1 4 5 および P L A C 4 - 4 1 4 7 6 2 3 6 等の P L A C 4 遺伝子座内に局在する他の多型 (これらは、U C S C ゲノムブラウザ (genome . u c s c . e d u /) の Human May 2004 (hg 17) アセンブリに基づく第 21 染色体上のそれぞれ 4 1 4 7 1 1 4 5 および 4 1 4 7 6 2 3 6 のヌクレオチド座標に局在する)。当業者は、P L A C 4 における他の多型もまた本発明において有用であることを理解する。

【 0 0 4 7 】

d b S N P アクセション番号は、S N P が局在するゲノム配列の S N P 部分のみに言及する。S N P について提供される配列の長さ (extent) は、転写されるゲノム配列の上流部分および下流部分の両方について選択され得る。

10

【 0 0 4 8 】

本発明において有用な他の R N A - S N P としては、U C S C ゲノムブラウザ (genome . u c s c . e d u /) の Human May 2004 (hg 17) アセンブリに基づく第 21 染色体上における、C O L 6 A 1 の ^A r ^g 8 5 0 _{H i s} (C O L 6 A 1 - 4 6 2 4 7 8 1 7)、C O L 6 A 1 の ^S e ^r 9 3 2 _{S e r} (C O L 6 A 1 - 4 6 2 4 8 0 6 4) および C O L 6 A 2 の ^V a ^l 7 2 8 _{v a l} (C O L 6 A 2 - 4 6 3 7 0 3 4 1) が挙げられる。

【 0 0 4 9 】

大抵の場合において、当該分野において周知であるいくつかの核酸増幅手順のいずれかを使用して (上記に列挙され、そして以下により詳細に説明される)、標的配列を増幅することが望ましい。具体的には、核酸増幅は、増幅される核酸配列に相補的である配列を含む核酸アンプリコン (コピー) の酵素合成である。サンプル中に存在する標的配列の量が非常に少ない場合、核酸増幅は特に有益である。標的配列の増幅および合成されたアンプリコンの検出によって、アッセイの感度は大いに改善され、何故ならば、問題の生物またはウイルスに属するサンプル中の核酸の検出をより十分に確実とするために、より少ない標的配列がアッセイの初めに必要とされるためである。

20

【 0 0 5 0 】

ポリヌクレオチドの増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R)、ライゲーション増幅 (ligation amplification) (あるいはリガーゼ連鎖反応 (L C R)) および Q ベータレプリカーゼの使用に基づく増幅方法等の方法を利用する。ストランド置換増幅 (strand displacement amplification) (S D A)、好熱性 S D A、核酸配列に基づく増幅 (nucleic acid sequence based amplification) (3 S R または N A S B A) および転写関連増幅 (transcription-associated amplification) (T A A) もまた有用である。これらの方法は、当該分野において周知でありそして広く実施されている。P C R を行うための試薬およびハードウェアは、市販されている。

30

【 0 0 5 1 】

増幅工程の前に、問題の R N A 転写物の D N A コピー (c D N A) を合成することが典型的に必要である。これは、逆転写 (これは、別個の工程として行われ得る) によって、あるいは均一な (homogeneous) 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R)、R N A を増幅するためのポリメラーゼ連鎖反応の変形において達成される。リボ核酸の P C R 増幅に好適な方法は、Romero および Rotbart により Diagnostic Molecular Biology: Principles and Applications pp.401-406 において ; Persing et al., eds., Mayo Foundation, Rochester, MN, 1993 ; Egger et al., J. Clin. Microbiol. 33:1442-1447, 1995 ; および米国特許第 5,075,212 号において記載されている。

40

【 0 0 5 2 】

P C R の一般的な方法は、当該分野において周知であり、従って本明細書において詳細には記載しない。P C R 法、プロトコル、およびプライマーを設計することにおける原理のレビューについては、例えば、Innis, et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N. Y., 1990 を参照のこと。P C R 試薬およびプロトコルはまた、R o c h e M o l e c u l a r S y s t e m s のような業者から

50

入手可能である。

【0053】

PCRは、通常、熱安定性酵素を用いての自動プロセスとして実行される。このプロセスにおいて、反応混合物の温度は、自動的に、変性領域、プライマーアニーリング領域、および伸長反応領域を経由して循環される。この目的のために特別に適応された機器が市販されている。

【0054】

RNA転写物配列を増幅するために有用なプライマーは、好ましくは、その中の標的領域を flank する (flank) 配列に相補的であり、かつこれに特異的にハイブリダイズする。増幅によって作製されたポリヌクレオチド配列は、直接、配列決定され得る。あるいは、増幅された配列は、配列分析の前にクローン化され得る。第3の可能性としては、プライマーは、対立遺伝子特異的PCRの実行のためのSNP部位と重複するように設計され得る。正しくハイブリダイズされたプライマーだけが増幅されるので、対立遺伝子特異的PCRは、RNA-SNP対立遺伝子の識別を可能にする。PCRプライマーは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)において使用され得るオリゴヌクレオチドを指し、COL6A1、SOD1、COL6A2、ATP5O、BTG3、ADAMTS1、BACE2、ITSN1、APP、ATP5J、DSCR5、PLAC4、LOC90625、RPL17、SERPINB2またはCOL4A2等の、問題の遺伝子座から転写されたRNA種に由来するヌクレオチド配列を増幅する。上記の転写物をコードするヌクレオチド配列の増幅のためのPCRプライマーの少なくとも1つは、前記遺伝子座について配列特異的であるべきである。

10

20

【0055】

標的RNA-SNP対立遺伝子のPCR増幅が、本発明を実施する際に典型的に使用されるが、当業者は、母体血サンプル中のRNA種の増幅は公知の方法[例えば、リガーゼ連鎖反応(LCR)、転写媒介増幅(transcription-mediated amplification)、および自己配列複製(self-sustained sequence replication)または核酸配列ベース増幅(nucleic acid sequence-based amplification)(NASBA)、これらの各々は十分な増幅を提供する]によって達成され得ることを認識する。より最近開発された分岐DNA技術(branched-DNA technology)もまた、母体血中のRNAマーカーのシグナルを増幅するために使用され得る。臨床サンプル中の核酸配列の直接定量のための分岐DNA(bDNA)シグナル増幅のレビューについては、Nolte, Adv. Clin. Chem. 33:201-235, 1998を参照のこと。

30

【0056】

2. RNA-SNP対立遺伝子の識別のための他の方法

問題のRNA-SNP対立遺伝子はまた、当業者に周知の他の標準技術を使用して検出され得る。典型的に増幅工程が検出工程に先行するが、増幅は本発明の方法において必須とされない。例えば、RNA転写物は、増幅工程が先行する(proceed)かどうかに関わらず、サイズ分画(size fractionation)(例えば、ゲル電気泳動)によって同定され得る。周知の技術(Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3d ed., 2001を参照のこと)に従ってアガロースまたはポリアクリルアミドゲルにおいてサンプルを泳動しそして臭化エチジウムで標識した後、標準コントロールと同一サイズのバンドの存在は、標的RNA配列の存在の指標であり、次いで、その量が、バンドの強度に基づいてコントロールと比較され得る。あるいは、例えば、COL6A1、SOD1、COL6A2、ATP5O、BTG3、ADAMTS1、BACE2、ITSN1、APP、ATP5J、DSCR5、PLAC4、LOC90625、RPL17、SERPINB2またはCOL4A2をコードするRNAに特異的なオリゴヌクレオチドプローブが使用され得、このようなRNA種の存在を検出し、そして該プローブによって与えられるシグナルの強度に基づいて、標準コントロールと比較してのRNA分子の量を示す。

40

【0057】

配列特異的プローブハイブリダイゼーションは、他の核酸種を含む特定の核酸を検出す

50

る周知の方法である。十分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、プローブは、実質的に相補的な配列にのみ特異的にハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーは、種々の量の配列ミスマッチを許容するために緩和され得る。

【 0 0 5 8 】

当該分野において周知の多数のハイブリダイゼーションフォーマットとしては、液相、固相、または混合相 (mixed phase) ハイブリダイゼーションアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。以下の文献は、種々のハイブリダイゼーションアッセイフォーマットの概説を提供する: Singer et al., *Biotechniques* 4:230, 1986; Haase et al., *Methods in Virology*, pp. 189-226, 1984; Wilkinson, *In situ Hybridization*, Wilkinson ed., IRL Press, Oxford University Press, Oxford; および Hames and Higgins eds., *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, IRL Press, 1987.

10

【 0 0 5 9 】

ハイブリダイゼーション複合体は、周知の技術に従って検出され、そして該検出は、本発明の重要な局面ではない。標的核酸 (即ち、mRNA または増幅された DNA) へ特異的にハイブリダイズし得る核酸プローブは、ハイブリダイズされた核酸の存在を検出するために典型的に使用されるいくつかの方法のいずれによっても標識され得る。検出の1つの一般的な方法は、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³²P等で標識されたプローブを使用するオートラジオグラフィーの使用である。放射性同位体の選択は、選択される同位体の合成の容易さ、安定性、および半減期に起因する研究の好みに依存する。他の標識としては、フルオロフォア (fluorophores)、化学発光剤、および酵素で標識されたアンチリガンド (antiligands) または抗体へ結合する、化合物 (例えば、ビオチンおよびジゴキシゲニン) が挙げられる。あるいは、プローブは、フルオロフォア、化学発光剤または酵素等の標識と直接結合され得る。標識の選択は、要求される感度、プローブとの結合の容易さ、安定性要件、および利用可能な器機類に依存する。

20

【 0 0 6 0 】

本発明を実施するに必要なプローブおよびプライマーは、周知の技術を使用して合成および標識され得る。プローブおよびプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、Needham-VanDevanter et al., *Nucleic Acids Res.* 12:6159-6168, 1984に記載されるような自動合成器を使用して、Beaucage and Caruthers, *Tetrahedron Letts.*, 22:1859-1862, 1981によって最初に記載された固相ホスホルアミダイトリエステル法に従って化学合成され得る。オリゴヌクレオチドの精製は、ネイティブ (native) アクリルアミドゲル電気泳動または Pearson and Regnier, *J. Chrom.*, 255:137-149, 1983に記載されるようなアニオン交換高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のいずれかによる。

30

【 0 0 6 1 】

RNA 転写物の対立遺伝子を識別するための他の有用な方法としては、パイロシーケンシング (pyrosequencing) 等の直接配列決定が挙げられる。パイロシーケンシングのプロセスは、プライマー-テンプレート複合体を含み、ここで、4個のデオキシヌクレオチド三リン酸の各々が1つずつ添加される。デオキシヌクレオチド三リン酸がDNAポリメラーゼによって組み込まれると、光が放射される。発生される光の量は、加えられる塩基の数に比例する。したがって、下流の配列が推測され得る。

40

【 0 0 6 2 】

プライマー伸長反応もまた、本発明において有用である。プライマー伸長反応は、SNP 部位に隣接する領域へハイブリダイズするプライマー伸長プライマーへのデオキシヌクレオチドおよび/またはジデオキシヌクレオチドの組み込みによりSNP 対立遺伝子を識別することによって機能する。プライマーはポリメラーゼで伸長される。プライマー伸長されたSNPは、質量分析によってまたはビオチン等のタグ部位によって物理的に検出され得る。特異的な標識によってタグされるかまたは特異的な質量を有するプライマー伸長産物を作製する相補的なデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドによってのみSNP 部位は伸長されるので、SNP 対立遺伝子は識別され得る。

50

【0063】

質量分析法は、ポリヌクレオチド、例えば、PCRアンプリコンまたはプライマー伸長産物の検出を可能にする。ポリヌクレオチド配列の存在は、問題のポリヌクレオチドの予想される質量と検出されるシグナルの質量とを比較することによって立証される。特定のポリヌクレオチド配列についての相対シグナル強度は、特定の対立遺伝子の相対的集団を示し、したがって、直接データから対立遺伝子比率の計算を可能にする。質量分析による遺伝子型決定法のレビューについては、Pusch et al., Pharmacogenomics 3:537-548, 2002を参照のこと。

【0064】

D. RNA - SNPの対立遺伝子の比率の測定

一般的に、RNA - SNPの対立遺伝子の比率の測定は、サンプル中に存在する各RNA - SNPの対立遺伝子の相対的集団 (relative population) を計算すること、および一方のRNA - SNP対立遺伝子について測定された値を他方のRNA - SNP対立遺伝子についての値で割ることを含む。PCRベース検出システムを使用することは、対立遺伝子の一方から作製されるPCR、プライマー伸長またはハイブリダイゼーション反応産物と関連する標識強度を、RNA転写物の他方の対立遺伝子のそれで割ることを伴う。RNA - SNPの対立遺伝子の比率を測定するための他の方法としては、該対立遺伝子の各々についてのクローン化された配列の数またはシーケンシング産物 (sequencing products) の量を比較することを含む。RNA - SNP比率はまた、質量分析によって対立遺伝子の質量シグナル強度を比較することによって測定され得る。

【0065】

あるいは、RNA - SNP比率は、反応の間に各対立遺伝子について集積される蛍光強度の差 (R_n) から、あるいは各対立遺伝子の反応が閾値蛍光強度 (C_t) を集積するために必要とされるPCRサイクルの数から測定され得る。 C_t および R_n は、RNA - SNP対立遺伝子比率を反映し、何故ならば、これらの値は、RNA対立遺伝子の量の対数に比例するためである。結果として、各対立遺伝子についての集積蛍光強度 (accumulated fluorescent intensities) の差 (R_n) または閾値サイクル値 (threshold cycle values) の差 (C_t) は、RNA転写物についてのSNP比率を反映する。例えば、対立遺伝子Aは、FAM (6 - カルボキシフルオレセイン) 標識化プローブで検出され得、そして対立遺伝子Bは、VIC (Applied Biosystems製) 等の蛍光プローブで検出され得る。 C_t および R_n 値は、対立遺伝子Aおよび対立遺伝子Bの各々から算出される。2つの C_t 値の差は、閾値サイクル値を使用して測定され、そして C_t 値を与える。2つの R_n 値の差は、集積蛍光強度を使用して測定され、そして R_n 値を与える。 C_t および R_n 値はPCR産物の存在量に対数的に関連するので、各RNA - SNPについての C_t および R_n 値の差が算出され、そしてその差 (C_t および R_n 値) は、これら2つのRNA対立遺伝子間のRNA - SNP比率を反映する。

【0066】

E. 標準コントロールとのRNA - SNP比率の比較

いったん対立遺伝子の比率が被験者において一旦測定されると、該比率は、胎児異数性の存在を測定するために標準コントロールと比較される。コントロールサンプル中で測定された既知の値と比較した場合に高いかまたは低いRNA - SNP比率は、胎児異数性の存在を示す。例えば、コントロールサンプル中で測定された既知の値と比較した場合により高いかまたはより低いSNP対立遺伝子間の C_t 値、 R_n 値または標識もしくは質量強度比は、胎児異数性の存在を示す。

【0067】

標準コントロールを確立するために、健康な胎児を妊娠している健康な妊婦のグループを先ず選択する。これらの女性は、必ずではないが、好ましくは、本発明の方法を使用して染色体異数性等のコンディションのスクリーニングについて好適な妊娠期間内にある、同様の妊娠期間のものである。同様に、標準コントロールは、健康な非妊娠 (nonpregnant)

10

20

30

40

50

t) 女性のグループからのサンプルを使用して確立される。選択された妊婦および彼女らが妊娠している胎児の健康状態は、生物学的サンプルを得るための上述の方法を使用して胎児遺伝子分析を行うことあるいは細胞遺伝分析 (cytogenetic analysis) を含むがこれらに限定されない、十分に確立された慣用的に使用される方法によって確認される。標準コントロールは、胎児異数性の存在について検査する前に測定され得る。

【0068】

さらに、健康な胎児を妊娠している健康な妊婦の選択されるグループは、合理的な規模のものでなければならず、その結果、該グループから算出されるCOL6A1、SOD1、COL6A2、ATP5O、BTG3、ADAMTS1、BACE2、ITSN1、APP、ATP5J、DSCR5、PLAC4、LOC90625、RPL17、SERP
INB2またはCOL4A2をコードするRNA-SNP対立遺伝子のアベレージ (average)、平均 (mean) または中央値 (median) 比率が、健康な胎児を妊娠している健康な女性の一般的な集団の中の通常またはアベレージ、平均または中央値の量を代表すると合理的にみなされ得る。場合によって、前記グループは少なくとも10人の女性を含む。

10

【0069】

選択されたグループの各女性において見られた個々の値に基づくRNA-SNP対立遺伝子の比率について、いったん平均値が確立されると、この値は、該RNA種の標準と考えられる。したがって、類似比率の同一種のRNAを含有する任意の血液サンプルは、標準コントロールとして使用され得る。同一種の確立されたアベレージの比率で、COL6
A1、SOD1、COL6A2、ATP5O、BTG3、ADAMTS1、BACE2、
ITSN1、APP、ATP5J、DSCR5、PLAC4、LOC90625、RPL
17、SERP
INB2またはCOL4A2をコードするRNAを含有する溶液もまた、人工的に作製され得、そして標準コントロールとして役立ち得る。

20

【0070】

コントロールサンプルにおける平均値と比較した場合に少なくとも10%より高いRNA-SNP比率の増加は、染色体異常を有する胎児を有する増加した危険性を示す。ある場合には、RNA-SNP比率の増加は少なくとも50%より高い。他の場合においては、RNA-SNP比率の増加は少なくとも100%より高い。なお別の場合においては、コントロールサンプルにおける平均値と比較した場合に少なくとも10%より低いRNA-SNP比率は、染色体異常を有する胎児を有する増加した危険性を示す。他の場合にお
いて、減少は少なくとも50%、または少なくとも90%である。

30

【0071】

コントロールサンプルにおける平均値よりも少なくとも1標準偏差より高いまたはより低いRNA-SNP比率は、染色体異常を有する胎児を妊娠している増加した危険性を示す。コントロールサンプルにおける平均値よりも少なくとも2標準偏差より高いまたはより低いRNA-SNP比率は、染色体異常を有する胎児を妊娠している増加した危険性を示す。コントロールサンプルにおける平均値よりも少なくとも3標準偏差より高いまたはより低いRNA-SNP比率は、染色体異常を有する胎児を妊娠している増加した危険性を示す。場合によっては、コントロールサンプルにおける平均値よりも1標準偏差未満より高いまたはより低いRNA-SNP比率もまた、染色体異常を有する胎児を妊娠してい
る増加した危険性を示す。

40

【0072】

F. 妊婦の胎児における染色体異常を検出するためのキット

本発明はまた、染色体異常を有する胎児の存在を検出するためのキットを提供する。本発明のキットは、問題の領域を増幅するためのプライマーを含む。本発明のキットにおいて有用なプライマーは、対立遺伝子の識別について上述される。プライマーは、マーカーについて特異的であり得、または非特異的様式で作用し得る。

【0073】

本発明のキットの別のコンポーネントは、染色体が正常である胎児を妊娠している平均的な妊婦におけるRNA対立遺伝子比率を示す標準コントロールである。標準コントロー

50

ルは、妊婦の胎児における染色体異常を検出する方法について上述されたものと同一様式で測定される。

【0074】

本発明のキットはまた、各RNA種の異なる対立遺伝子を識別するためのハイブリダイゼーションプローブを含み得る。各RNA種の対立遺伝子は、一塩基多型、挿入/欠失多型またはシンプルタンデムリピート多型 (simple tandem repeat polymorphisms) であり得る。本発明のキットにおいて有用なハイブリダイゼーションプローブは、妊婦の胎児における染色体異常を検出する方法に使用されるのと同じのハイブリダイゼーションプローブである。ハイブリダイゼーションプローブは、放射性、蛍光性、化学発光性または酵素的であり得る。プローブとして使用されるオリゴヌクレオチドは、公知の技術に従って作製され得る (Needham-VanDevanter et al., Nucleic Acids Res. 12:6159-6168, 1984に記載されるような、自動合成器を使用する、Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Lett s., 22:1859-1862, 1981)。本発明のプローブは特異的または非特異的であり得る。当業者は、上述の方法等の各RNA種の対立遺伝子を識別する他の方法が本発明のキットにおいて有用であることを認識する。

10

【0075】

本発明のキットは、当業者が本発明のキットにおいて有用であると認識する追加のエレメントを含み得る。

【0076】

以下の実施例は、例示のためのみに提供され、限定のためではない。当業者は、変化または修飾され本質的に同様の結果を生じ得る種々の重要でないパラメータを容易に認識する。

20

【実施例】

【0077】

III. 実施例

本発明の方法は、特定の遺伝子座についてヘテロ接合である個体における染色体異常を検出するために有用であり、該個体がその特定の遺伝子座に異常な数 (例えば、正常な2の代わりに異常な3) の染色体を有しているかどうかを検出する。妊娠の場合において、生物学的サンプルは妊婦から直接採取される一方、染色体異数性について検査される個体は、妊婦が妊娠している胎児である。出生前診断についてのこのアプローチの適用の1実施形態において、遺伝子の余分なコピーが、胎盤組織において、正常な遺伝子対と共に発現される。胎盤におけるRNA対立遺伝子の比率は、遺伝子の余分なコピーの結果として、正常な胎盤のそれから逸脱する。次いで、RNA転写物は母体血中へ放出され、そしてそれらの相対存在量 (relative abundance) は、胎盤遺伝子発現プロフィールを反映する。したがって、染色体異常を有する胎児を妊娠している妊婦の血液またはそのフラクション (例えば、血漿) 中のRNA対立遺伝子の比率は、正倍数性胎児を妊娠している妊婦のそれから逸脱する (図1)。

30

【0078】

RNA対立遺伝子を使用する染色体異常の検出は、胎児に特異的でありかつ母体血中に検出可能な発現レベルで存在するマーカーの同定; 高胎盤発現、母体血中の該転写物を検出する能力、を有するそのマーカー上の転写される領域の同定; 該転写物が妊娠特異的であるという測定; ならびに染色体異常の存在または非存在を評価するための該転写物の対立遺伝子比率の測定を必要とする。

40

【0079】

以下の実施例は、有用なマーカーおよび転写物を同定すること、該転写物を検出しかつ該転写物が妊娠特異的であることを保証するための方法、ならびに該転写物を定量しかつ該RNA対立遺伝子比率を測定して染色体異常を検出する方法の具体例を実証する。当業者は、他の方法および技術も本発明を実施することにおいて有用であることを認識する。

【0080】

実施例1: 胎児における21トリソミーを検出するために有用なSNPの同定

50

胎児 21 トリソミーの検出に有用な SNP の同定は、胎児細胞によって発現され、かつ分析される生物学的サンプル中に検出可能な濃度で存在する RNA 種の同定を必要とする。

【 0 0 8 1 】

高胎盤発現レベルを有する胎児特異的転写物の同定

5 つの第 1 期絨毛膜絨毛サンプル (chorionic villus sample) (CVS) サンプルの遺伝子発現プロフィールを、各個体の組織サンプルのマイクロアレイ分析によって得た。母体血漿中の循環 RNA 分子のうち胎盤発現転写物を同定するための試みにおいて、母体全血 (特に、母体造血細胞) の遺伝子発現プロフィールを得、そして対応の胎盤組織のそれと比較した。妊娠初期の胎盤発現転写物を、全ての 5 つの比較において対応の全血サンプルと比較した場合に CVS 組織においてその発現レベルが増加された転写物を選択することによって同定した。

10

【 0 0 8 2 】

サンプル処理および RNA 抽出。5 つの第 1 期胎盤組織サンプルを、治療終了 (therapeutic terminations) の前に CVS により妊婦から得た。引き続いて、全てのケースの胎児核型は正常であると確認された。胎盤組織サンプルを、回収直後に RNAlaterTM (Ambion (登録商標), Austin, TX) において保存し、そして RNA 抽出まで -80 で維持した。6 ml の母体末梢血を、組織回収時と同時に回収し、そして PAXgeneTM 血液 RNA チューブ (PreAnalytiX, Hombrechtikon, スイス) において保存した。胎盤組織からのトータル RNA を、製造業者のプロトコルに従って、Trizol 試薬 (Invitrogen, カールズバッド, CA) で抽出しそして RNeasy ミニキット (Qiagen, ヒルデン, ドイツ) で精製した。末梢血からのトータル RNA を、DNアーゼ処理 (RNアーゼフリー DNアーゼセット, Qiagen, ヒルデン, ドイツ) を含むことを伴って、製造業者の指示書に従って PAXgeneTM 血液 RNA キット (PreAnalytiX, Hombrechtikon, スイス) によって抽出した。

20

【 0 0 8 3 】

高密度オリゴヌクレオチドアレイによる遺伝子発現分析。各サンプルについて、10 μg の抽出された RNA を標識し、そして製造業者の指示書に従って GeneChip (登録商標) ヒトゲノム U133A および U133B アレイ (Affymetrix, サンタクララ, CA) へハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、各アレイを洗浄しそして GeneChip (登録商標) Fluidics Station 400 (Affymetrix) において染色した。前記チップを Gene Array スキャナー (Affymetrix) でスキャンし、そして GeneChip (登録商標) マイクロアレイ Suite 5.0 (Affymetrix) を使用して分析した。母体末梢血の代わりに胎盤組織において主に発現されかつ第 21 染色体に由来する転写物を、選択した。CVS サンプル中で発現された 7226 遺伝子転写物のうち、1245 転写物が、母体末梢血サンプルよりも CVS においてより高い発現を有すると同定された。この転写物パネルの中で、第 21 染色体上に局在する 13 個の胎盤発現遺伝子を同定した (表 1)。

30

【 0 0 8 4 】

40

【表 1】

表 1. 第 2 1 染色体上に局在する胎盤発現遺伝子のマイクロアレイ検出。各マイクロアレイシグナルの中央値に従って降順で転写物を分類する。

プローブ セット ID	由来する 配列	転写物	シンボル	位置	*シグナル (中央値)
213428_s_at	AA292373	Collagen, type VI, alpha 1	COL6A1	21q22.3	8419.2
200642_at	NM_000454.1	superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult))	SOD1	21q22.11	7084.7
209156_s_at	AY029208.1	Collagen, type VI, alpha 2	COL6A2	21q22.3	7076.9
200818_at	NM_001697.1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit (oligomycin sensitivity conferring protein)	ATP5O	21q22.11	3247.8
213134_x_at	A1765445	BTG family, member 3	BTG3	21q21.1	2564.9
214953_s_at	X06989.1	amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease)	APP	21q21.3	2376.1
202325_s_at	NM_001685.1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F6	ATP5J	21q21.1	2303.1
214750_at	L13197	placenta-specific 4	PLAC4	21q22.3	2209.9
222162_s_at	AK023795.1	a disintegrin-like and metalloprotease (repolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	ADAMTS1	21q21.2	1780.8
217867_x_at	NM_012105.1	beta-site APP-cleaving enzyme 2	BACE2	21q22.3	1093.4
221689_s_at	AB035745.1	Down syndrome critical region gene 5	DSCR5	21q22.2	900.7
209298_s_at	AF114488.1	intersectin 1 (SH3 domain protein)	ITSN1	21q22.1- q22.2	199.9
#232191_at	BC005107.1	hypothetical protein BC005107	LOC90625	21q22.3	6910.2

* 5 個の第 1 期胎盤組織由来のマイクロアレイシグナルの中央値
ヒトゲノム U133B アレイ (Affymetrix) によって検出された転写物。指定のない転写物はヒトゲノム U133A アレイ (Affymetrix) によって検出された。

10

20

【 0 0 8 5 】

適用可能な S N P の同定および対立遺伝子頻度の測定

優勢な胎盤組織発現を有する選択された第 2 1 染色体遺伝子座の転写領域における S N P を、公共データベースから同定した。次いで、各 S N P の対立遺伝子頻度 (allele frequencies) を、中国人集団および白人集団の両方において測定した。高ヘテロ接合性率を有する S N P を標的化した。

30

【 0 0 8 6 】

優勢な胎盤発現を有する 1 3 個の第 2 1 染色体遺伝子 (表 1) の中で、最も高い胎盤発現レベルを有する 4 個の遺伝子、即ち、コラーゲン V I アルファ 1 (C O L 6 A 1)、スーパーオキシドジスムターゼ 1 (S O D 1)、コラーゲン V I アルファ 2 (C O L 6 A 2) およびミトコンドリア A T P シンターゼ O サブユニット (A T P 5 O) を、続いての評価のために選択した。これらの遺伝子のエキソン内に局在する S N P を、m R N A 多型の研究を可能にするために選択した。これらのコーディング多型 (coding polymorphism) の各々の対立遺伝子頻度を、対応の S N P にフランキングする (flanking) P C R プライマー (表 2) を使用する直接配列決定によって、10 中国人および 10 白人パフィーコート DNA サンプルにおいて測定した。BigDye Terminator Cycle Sequencing v 1.1 (Applied Biosystems, フォスターシティー, C A) および Model 3100 DNA Analyzer (Applied Biosystems) を使用して、配列決定を行った。

40

【 0 0 8 7 】

【表 2】

表 2. 4 個の第 2 1 染色体遺伝子の直接配列決定のための PCR プライマー

転写物	配列 (5' から 3')	
	フォワードプライマー	リバースプライマー
COL6A1	GGCTGACATCACCATCCTG	AGAGCAGCAGCCTCTTCTTG
	TTGGAAGCCAGGACACAAC	TGAGGATTGGTGGGAAAAC
SOD1	TTTTCCACTCCAAGTCTGG	CGACAGAGCAAGACCCTTTC
	TTGCAACACCAAGAAAAGC	TCTGGCAAAATACAGGTCATTG
COL6A2	TCATCAACGTGGTCAACAGG	TCACTCTCGTGCTTCTCGTG
	GTGGACATCGTCTTCCTGCT	GTGGATGGCAGTGAGGTTGT
	AACGACAGTCTGCACGAGTC	CAGGTAGGTCAGGAGCCTTG
ATP50	GGCCTGAGATTCTTCACTGC	AAAATTAGCGGGACATGGTG

10

【 0 0 8 8 】

転写された SNP の対立遺伝子頻度を表 3 に示す。前記 2 集団のうち 1 集団の少なくとも 30% においてヘテロ接合性であった SNP を、情報提供的と考え、そしてさらなるアッセイ開発のための標的として選択した。

【 0 0 8 9 】

20

【表3】

表3. COL6A1、SOD1、COL6A2およびATP5Oについて10人の中国人および10人の白人の無関係な個人におけるコーディングSNPの遺伝子型決定

<i>COL6A1</i>		dbSNP	1053312	1053315	13879	1053320	1053331	9254
		対立遺伝子	A/G	A/G	T/C	T/C	A/G	A/G
中国人	f (少数対立遺伝子)		0.20	0.20	0	0.20	0	0.10
	ヘテロ接合性		0.32	0.32	0	0.320	0	0.18
白人	f (少数対立遺伝子)		0.40	0.40	0.05	0.40	0.15	0.15
	ヘテロ接合性		0.48	0.48	0.10	0.48	0.26	0.26
<i>SOD1</i>		dbSNP	1804450	1804449	4804447	15012	1804448	
		対立遺伝子	T/C	T/C	T/C	G/A	G/T	
中国人	f (少数対立遺伝子)		0	0	0	0.20	0	
	ヘテロ接合性		0	0	0	0.32	0	
白人	f (少数対立遺伝子)		0	0	0	0.25	0	
	ヘテロ接合性		0	0	0	0.38	0	
<i>COL6A2</i>		dbSNP	1042917	2839114	3182348	1042930	6652	1043801
		対立遺伝子	A/G	A/G	T/C	A/G	T/C	A/G
中国人	f (少数対立遺伝子)		0.50	0.50	0	0	0	0
	ヘテロ接合性		0.50	0.50	0	0	0	0
白人	f (少数対立遺伝子)		0.45	0.50	0	0	0.15	0.15
	ヘテロ接合性		0.50	0.50	0	0	0.26	0.26
		dbSNP	3087667	1043962	1043985			
		対立遺伝子	C/T	G/A	T/C			
中国人	f (少数対立遺伝子)		0	0	0			
	ヘテロ接合性		0	0	0			
白人	f (少数対立遺伝子)		0	0	0			
	ヘテロ接合性		0	0	0			
<i>ATP5O</i>		dbSNP	4842	4591				
		対立遺伝子	A/G	C/T				
中国人	f (少数対立遺伝子)		0.15	0				
	ヘテロ接合性		0.26	0				
白人	f (少数対立遺伝子)		0.40	0				
	ヘテロ接合性		0.48	0				

各SNP遺伝子座についてのdbSNPアクセッション番号が列挙される。各SNPについて、少数対立遺伝子が最初に列挙される。「f (少数対立遺伝子)」は、少数対立遺伝子の頻度を意味する。

【0090】

選択された転写物の検出能および妊娠特異性の測定

胎盤発現を伴う前記4個の第21染色体転写物は、該4転写物の非多型領域を増幅するために開発されたリアルタイムQRT-PCRアッセイを使用して母体血漿において検出され得る。これらの転写物は、非妊娠女性と比較した場合に有意により高い濃度で妊婦の血漿に存在する。さらに、母体血漿中の該転写物の濃度は、子の誕生後に急激に低下する。したがって、胎盤は、母体血漿中のこれらのmRNA転写物の主要な供給源である。

【0091】

サンプル回収および処理。6人の非妊娠女性および10人の第1期妊婦からの全血サンプルを回収した。分娩前および分娩後24時間の5人の第3期妊婦からの末梢血サンプル

もまた採用した。12 mlの血液サンプルをEDTAチューブに回収し、そして4℃で10分間1600×gで遠心分離した。次いで、血漿をプレーン(plain)ポリプロピレンチューブへ注意深く移した。血漿サンプルを、4℃で10分間16000×gで再遠心分離した。上澄みを新しいポリプロピレンチューブへ回収した。母体血漿からのRNA抽出を、3.2 mlの血漿と4 mlのTrizol LS試薬(Invitrogen, カールズバッド, CA)および0.8 mlのクロロホルムとを混合することによって行った(Ng, E. K. O. et al., Clin Chem 48:1212- 1217 (2002))。混合物を4℃で15分間12000×gで遠心分離し、そして水層を新しいチューブへ移した。1体積の70%エタノールを、1体積の前記水層へ添加した。次いで、混合物を、RNeasyミニカラム(Qiagen, ヒルデン, ドイツ)へ適用し、そして製造業者の推薦に従って処理した。トータルRNAを、60 µlのRNAアーゼを含まない水で溶出し、そして-80℃で保存した。DNアーゼ処理(RNアーゼフリー-DNアーゼセット, Qiagen, ヒルデン, ドイツ)を行い、あらゆる混入DNAを除去した。

10

【0092】

リアルタイムQRT-PCRアッセイの開発。QRT-PCRアッセイを、コラーゲンVIアルファ1(COL6A1)、スーパーオキシドジスムターゼ1(SOD1)、コラーゲンVIアルファ2(COL6A2)およびミトコンドリアATPシンターゼOサブユニット(ATP5O)mRNAの検出のために開発した。プライマーおよびTaqManマイナーグループ結合(minor-groove-binding)(MGB)蛍光プローブ(Appplied Biosystems, フォスターシティ, CA, USA)の配列を表4に示す。1×10⁶コピーから10コピーまでの範囲に及ぶ濃度での、それぞれのアンプリコンに特異的な高性能液体クロマトグラフィー精製一本鎖合成DNAオリゴヌクレオチド(Bustin, 2000)(Proligo, Singapore)の連続希釈によって、検量線を作製した。COL6A1、SOD1、COL6A2およびATP5Oについての合成DNAオリゴヌクレオチドの配列を、表4に記載する。全ての転写物の絶対濃度を、コピー/血漿mlで表した。

20

【0093】

【表 4】

表 4. 第 21 染色体においてコードされる胎盤発現転写物のリアルタイム QRT-PCR 検出のためのプライマーおよびプローブの配列

転写物		配列 (5' から 3') [†]
COL6A1	F プライマー	GACAAAGTCAAGTCCTTCACCAA
	R プライマー	GCGTCCACACCAGGTTT
	プローブ	(FAM) CGCTTCATCGACAACC (MGBNFQ)
	標準曲線	TGGACAAAGTCAAGTCCTTCACCAAGCGCTTCATCGACAACCTGAGGGACAGGTACTACCG CTGTGACCGAAACCTGGTGTGGAACGCAG
SOD1	F プライマー	CAGGGCATCATCAATTTTCG
	R プライマー	TGCTTCCCCACACCTTCA
	プローブ	(FAM) CAGAAGGAAAGTAATGGACCA (MGBNFQ)
	標準曲線	TGCAGGGCATCATCAATTTTCGAGCAGAAGGAAAGTAATGGACCAGTGAAGGTGTGGGGAAG CATT
COL6A2	F プライマー	GATCAACCAGGACACCATCAA
	R プライマー	CCGTAGGCTTCGTGTTTCA
	プローブ	(FAM) CGCATCATCAAGGTC (MGBNFQ)
	標準曲線	GAGATCAACCAGGACACCATCAACCGCATCATCAAGGTCATGAAACACGAAGCCTACGGAG
ATP5O	F プライマー	CCCTCACTACCAACCTGATCA
	R プライマー	CCTTGGGTATTGCTTAATCGA
	プローブ	(FAM) TGCTTGCTGAAAATG (MGBNFQ)
	標準曲線	TCCCCTCACTACCAACCTGATCAATTTGCTTGCTGAAAATGGTCGATTAAGCAATACC CAAGGAG

[†]FAM: 蛍光標識; MGBNFQ: マイナーグループ結合非蛍光性クエンチャー

【0094】

QRT-PCR 反応を、25 μ l の反応体積において製造業者の指示書 (EZ rTth RNA PCR 試薬セット, Applied Biosystems) に従って設定した。QRT-PCR アッセイを、組み合わせられたサーマルサイクラーおよび蛍光検出器 (ABI Prism 7700, Applied Biosystems) において行った。前記 4 種の転写物の全てについて、PCR プライマー (Proligo) および蛍光プローブ (Applied Biosystems) を、それぞれ、300 nM および 100 nM の濃度で使用した。5 μ l の抽出した血漿 RNA を増幅のために使用した。複数のネガティブウォーターブランクを、各分析に含めた。

【0095】

COL6A1、SOD1、COL6A2 および ATP5O 分析のために使用したサーマルプロファイルは、以下の通りであった: 反応を 50 で 2 分間開始させ、含まれたウラシル N-グルコシラーゼを作用させ、続いて 60 で 30 分間逆転写させた。95 で 5 分間変性させた後、92 で 15 秒間の変性ならびに COL6A1 および ATP5O については 57、COL6A2 については 56、および SOD1 については 59 で 1 分間のアニーリング/伸長を使用して、40 サイクルの PCR を行った。

【0096】

胎盤発現された第 21 染色体転写物は、母体血漿中で検出され得、そして妊娠特異的である。非妊娠女性、妊娠第 1 期および第 3 期における中央値 (median) 血漿 mRNA 濃度は、それぞれ、COL6A1 については 0 コピー/ml、0 コピー/ml および 72.6 コピー/ml (図 2A); SOD1 については 25.3 コピー/ml、53.0 コピー/ml および 155.6 コピー/ml (図 2B); COL6A2 については 0.8 コピー/ml、2.1 コピー/ml および 8.8 コピー/ml (図 2C); ならびに ATP5O については 6.2 コピー/ml、88.2 コピー/ml および 126.4 コピー/ml (図 2D) であった。前記 4 転写物の全てについて、妊娠第 3 期におけるそれらの血漿濃度は

10

20

30

40

50

、非妊娠グループにおけるそれよりも有意に高かった (Mann-Whitney Rank Sum テスト、COL6A1、SOD1、COL6A2 および ATP5O mRNA について $P < 0.05$)。さらに、分娩前の血漿サンプルにおいて、中央値 COL6A1、SOD1、COL6A2 および ATP5O mRNA 濃度は、それぞれ、72.6 コピー/ml、155.6 コピー/ml、8.8 コピー/ml および 126.4 コピー/ml であった (COL6A1 mRNA について図3A、SOD1 mRNA について図3B、COL6A2 mRNA について図3C および ATP5O mRNA について図3D)。一方、分娩後の血漿サンプルにおいて、COL6A1、SOD1、COL6A2 および ATP5O の中央値 mRNA 濃度は、それぞれ、0 コピー/ml、56.2 コピー/ml、0.8 コピー/ml および 56.2 コピー/ml であった。

10

【0097】

実施例2：リアルタイム定量RT-PCRによる妊婦の胎児における21トリソミーの検出

最も高い多型率 (polymorphic rate) を有する2つのSNPを、対立遺伝子特異的QRT-PCR開発のための標的として選択した。識別ハイブリダイゼーションプローブを、各SNPの異なる対立遺伝子の識別を可能にするように設計した。同一遺伝子型決定 (Identical genotyping) 結果を、リアルタイムPCRおよび直接配列決定 (これは、プローブの対立遺伝子特異性を確認した) の両方によって得た。次いで、プローブをQRT-PCRアッセイへ組み込み、ここで、胎盤組織における各SNPの異なる対立遺伝子の相対的発現レベルを先ず測定した。正常CVSおよび正常満期胎盤 (term placentas)、なら

20

【0098】

サンプル回収および処理。13個の妊娠第1期および20個の妊娠第3期からの胎盤組織サンプルを、それぞれ、治療終了 (therapeutic terminations) の前または選択的帝王切開分娩 (elective cesarean delivery) の直後に、絨毛膜絨毛サンプル (CVS) により妊婦から得た。7個の21トリソミー妊娠からの胎盤組織もまた採用した。全ての組織を上述のように処理した。

30

【0099】

対立遺伝子特異的リアルタイムQRT-PCRの開発。最も高い多型率 (polymorphic rate) を有する2つの情報提供的 (informative) コーディングSNP、それぞれ、COL6A1 および COL6A2 遺伝子の rs1053312 (dbSNPアクセッション番号) および rs2839114 を選択した。対立遺伝子特異的リアルタイム定量RT-PCRアッセイを、各SNPの2つの対立遺伝子の相対濃度を測定するために確立した。対立遺伝子識別を可能にするために、各々1つの対立遺伝子に特異的な、2つの蛍光発生MGBプローブを、各QRT-PCRアッセイに含ませる。前記2つのプローブを、FAM (6-カルボキシフルオレセイン) およびVIC蛍光リポーター色素のいずれかで標識する。対立遺伝子特異的QRT-PCRシステムのプライマーおよびプローブの配列を、表

40

【0100】

【表5】

表5. 標的RNA-SNPの対立遺伝子特異的リアルタイムQRT-PCR検出のためのプライマーおよびプローブの配列

転写物	dbSNP		配列 (5' から 3') ¹
COL6A1	1053312	Fプライマー	GGCAGCCACAACCTTTGACAC
		Rプライマー	CTCGGCCAGGCGCTT
		プローブ (対立遺伝子G) (VIC)	ACCAAGCGCTTCGC (MGBNFQ)
		プローブ (対立遺伝子A) (FAM)	ACCAAGCACTTCGC (MGBNFQ)
COL6A2	2839114	Fプライマー	GGCGCCAGAAGACACGT
		Rプライマー	GTCGTGGCGCCCGT
		プローブ (対立遺伝子G) (VIC)	TGATGACCACCGCAAA (MGBNFQ)
		プローブ (対立遺伝子A) (FAM)	TGATGACTACCGCAAA (MGBNFQ)

¹ VICおよびFAM: 蛍光標識; MGBNFQ: マイナーグループ結合非蛍光性クエンチャー

10

【0101】

対立遺伝子識別および相対的定量 (relative quantification) のための QRT-PCR 反応を、それぞれ 450 nM および 100 nM の濃度で PCR プライマー (Proligo) および MGB プローブ (Applied Biosystems)、ならびに増幅のための 17 ng の胎盤 RNA サンプルを使用して、上述の手順に従って設定した。各 QRT-PCR を、Applied Biosystems 7700 Sequence Detector において二重で行った。使用したサーマルプロファイルは、アニーリング/伸長工程について 59 °C の温度を使用する上述のものであった。ヘテロ接合性サンプルのみを分析に含ませた。

20

【0102】

統計解析。統計解析を Sigma Stat 2.03 ソフトウェア (SPSS) を使用して行った。

【0103】

第 21 染色体がコードした RNA-SNP の相対的定量。2 つの対立遺伝子の相対量は、以下の等式によって算出されるような、それらの閾値サイクル値 (threshold cycle values) の差 (Ct) またはそれらの集積蛍光強度 (accumulated fluorescent intensities) の差 (Rn) のいずれかによって決定される:

$$Ct = Ct_{FAM} - Ct_{VIC}$$

$$Rn = Rn_{FAM} - Rn_{VIC}$$

式中、Ct_{FAM} および Ct_{VIC} は、対立遺伝子 A (FAM 標識プローブによって検出される) および対立遺伝子 B (VIC 標識プローブによって検出される) の閾値サイクル値である。Rn_{FAM} および Rn_{VIC} は、SDS v1.9 ソフトウェア (Applied Biosystems) によって算出される、対立遺伝子 A および対立遺伝子 B の集積蛍光強度である。Ct および Rn 値は、PCR 産物の存在量に対数的に関連し、したがって、各 RNA-SNP についての Ct および Rn 値の差 (Ct 値および Rn 値) は、2 つの RNA 対立遺伝子間の RNA-SNP 比率を反映する。

40

【0104】

SNP rs1053312 (COL6A1) について、対立遺伝子特異的 QRT-PCR によって測定されたように、1 つの CVS、正常な妊娠由来の 6 つの満期胎盤 (term placentas)、および 3 つの 21 トリソミー胎盤サンプルが、多型部位についてヘテロ接合性であった。図 4 において、3 つの 21 トリソミー胎盤についての Ct 値は、正常な妊娠から得られた CVS および満期胎盤組織の Ct 値から逸脱した。

【0105】

50

SNP rs2839114 (COL6A2) について、正常な妊娠由来の8つのCVSおよび13の満期胎盤、ならびに3つの21トリソミー胎盤が、対立遺伝子特異的QRT-PCRアッセイによって遺伝子型決定されたように、SNP座についてヘテロ接合性であった。図5Aに示されるように、3つの21トリソミー胎盤のCt値は、正常な妊娠のそれから逸脱し、2つの21トリソミーケースはより大きなCt値を示しそして残りのケースは減少された値を示した。21トリソミー胎盤のCt値の逸脱(deviations)は、どの対立遺伝子が過剰発現されるかに依存して、正常な妊娠範囲を上回るかまたは下回るかのいずれかになり得る。類似の結果が、Rn値を使用して得られた(図5B)。

【0106】

実施例3：プライマー伸長および質量分析検出による妊婦の胎児における21トリソミーの検出

最も高い多型率を有する2つのSNP(COL6A1上のrs1053320およびCOL6A2上のrs2839114)を、さらなるアッセイ開発のために標的化した。プライマー伸長反応アッセイは、胎盤組織サンプルのSNP遺伝子型の決定を可能にした。サンプルを、質量分析を使用して処理し、異なるRNA-SNP対立遺伝子を識別し、そしてRNA-SNP対立遺伝子の相対発現レベルを測定し、対立遺伝子の比率を算出した。21トリソミーを有しているおよび有していない妊娠についての各SNPの対立遺伝子の比率の差は、十分に大きく、胎児における21トリソミーの検出が母体血漿を使用して可能である。

【0107】

胎盤組織回収および処理。第2期胎盤組織サンプルを、治療終了(therapeutic terminations)前に、21トリソミー胎児を妊娠している妊婦から得た。第3期胎盤組織サンプルを、分娩直後に、核型が正常である胎児から回収した。胎盤組織サンプルを2つの部分に分割し、これらの一方を、回収直後にRNAlater™(Ambion(登録商標), オースティン, TX)に保存しそしてRNA抽出まで-80で維持し、他方の部分を、DNA抽出まで-80で直ぐに維持した。DNAを、製造業者の指示書に従う組織プロトコル(Qiagen, ヒルデン, ドイツ)を使用するQIAampミニキットを使用して、胎盤組織から抽出した。胎盤組織由来のトータルRNAを、Trizol試薬(Ivitrigen, カールズバッド, CA)で抽出し、そして製造業者のプロトコルに従ってRNeasyミニ-キット(Qiagen, ヒルデン, ドイツ)で精製した。

【0108】

胎盤DNAおよびRNA増幅。RNA増幅について、総計で450ngの胎盤RNAを、製造業者の指示書に従ってランダムヘキサマー(random hexamers)(ThermoScript, Invitrogen)で逆転写した。50ngのトータルRNAに対応する25ngのDNAまたはcDNAを、各PCR反応のために使用した(AmpliTaq Gold, Applied Biosystems)。COL6A1およびCOL6A2上のSNP座の各々の増幅のためのプライマー配列を、表6に示す。PCRプライマーは、25μlのPCR体積について200nM最終濃度で使用した。PCR条件は以下であった：95で10分間、続いて94で20秒間変性、56で30秒間アニーリング、および72で1分間伸長(45サイクルについて)、ならびに最終的に72で3分間インキュベート。

【0109】

10

20

30

40

【表 6】

表 6. COL6A1 および COL6A2 上の SNP 遺伝子座の増幅のためのプライマー配列

転写物	SNP		配列 (5' から 3')
COL6A1	rs1053320	F プライマー	ACGTTGGATGCTATGTGACCCGCTTCTACC
		R プライマー	ACGTTGGATGGAGTTGCCATCTGAGAAGAG
COL6A2	rs2839114	F プライマー	ACGTTGGATGACCGCCTCATCAAGGAGAGC
		R プライマー	ACGTTGGATGAAGTTGAGGTCATCGTCCC

【0110】

プライマー伸長反応による SNP 検出。プライマー伸長反応アッセイ (primer extension reaction assays) を、胎盤組織サンプルの SNP 遺伝子型を測定するために設計した。胎盤 RNA - SNP 遺伝子型を、胎盤 DNA について得られたものと比較した。胎盤 DNA および RNA PCR 産物を、37 で 40 分間続いて 85 で 5 分間、エピアルカリホスファターゼ (Sequenom, サンディエゴ, USA) で処理し、過剰な dNTP を除去した。プライマー伸長プライマーと、2', 3'-ジデオキシヌクレオシド三リン酸 (ddNTPs) および dNTPs の混合物とを、前記処理した PCR 産物へ添加した。COL6A1 および COL6A2 上の選択された SNP をインテロゲート (interrogate) するように設計されたプライマー伸長プライマーについての配列を、表 7 に示す。

thermoSequenase (Sequenom) を、Sequenom からの標準 MassARRAY™ Homogeneous MassEXTEND™ (hME) アッセイプロトコルを使用する塩基伸長反応のために使用した。塩基伸長条件は以下であった: 94 で 2 分間、続いて 94 で 5 秒間、52 で 5 秒間、および 72 で 5 秒間 (75 サイクルについて)。各 SNP 対立遺伝子についてのプライマー伸長産物の配列を表 7 に示す。最終伸長産物を、SpectroCLEAN (Sequenom) 樹脂で処理し、反応緩衝液中の塩を除去した。約 10 nL の反応溶液を、SpectroPoint (Sequenom) ナノディスペンサーを使用して 384 フォーマット SpectroCHIP (Sequenom) 上に分配した。コンパクトMALDI-TOF 質量分析器 (Bruker) をデータ獲得のために使用した。全ての関連するピークの予想される分子量を、分析前に算出し (表 7)、そして質量スペクトルから同定する。SNP 遺伝子型は、特定の SNP 対立遺伝子に対応する質量シグナル (mass signals) の存在または非存在をスコアリングすることによって決定される。

【0111】

【表 7】

表 7. プライマー伸長プライマーの配列ならびに COL6A1 上の rs1053320 および COL6A2 上の rs2839114 についての各 SNP 対立遺伝子についての伸長産物の予想配列および分子量

転写物	SNP		伸長配列 ¹	質量 (Da)
COL6A1	rs1053320	未伸長	CTCTTCTTGGCAGCGCC	5113.3
		対立遺伝子 T	CTCTTCTTGGCAGCGCCA	5410.5
		対立遺伝子 C	CTCTTCTTGGCAGCGCCGGA	6068.9
COL6A2	rs2839114	未伸長	AAGACACGTGTGTTTGCGGT	6188.0
		対立遺伝子 A	AAGACACGTGTGTTTGCGGTA	6485.2
		対立遺伝子 G	AAGACACGTGTGTTTGCGGTGT	7134.6

¹ 太字フォントは、伸長された dNTP および ddNTP を示す。

【0112】

SNP 比率の測定。質量分析データを、自動分析のために SpectroTYPER (Sequenom) データベースへ自動的にインポートした。インテロゲートされた SNP についてヘテロ接合性の胎児における 2 つの SNP 対立遺伝子についての質量シグナル

のピーク頻度 (peak frequency) の比率を測定した。核型が正常である胎児および 21 トリソミー胎児について得られた SNP 比率を比較した。21 トリソミー胎児の胎盤 DNA SNP 比率は、COL6A1 (図 6 A) および COL6A2 (図 7 A) の両方上の SNP について正常な胎児について得たものから逸脱した。21 トリソミー胎児についての SNP 比率は、トリソミック第 21 染色体の SNP 遺伝子型に依存して、正常な胎児のそれと比較して減少または増加される。21 トリソミー胎児についての COL6A1 (図 6 B) および COL6A2 (図 7 B) RNA 転写物上のインテロゲートされた SNP の胎盤組織 SNP 比率もまた、正常組織について得られたものから逸脱することが示された。

【0113】

実施例 4 : プライマー伸長および質量分析による母体血漿中の循環胎児 RNA を使用しての 21 トリソミー胎児の非侵襲的出生前検出

さらなる SNP もまた妊婦の胎児における染色体異常の検出のために有用であることを実証するために、胎盤特異的 4 (PLAC4) (表 19) を研究した。プライマー伸長反応アッセイによって、胎盤組織および母体血漿サンプルの RNA - SNP 遺伝子型を測定できた。プライマー伸長産物を、質量分析を使用して分析し、RNA - SNP 対立遺伝子比率を定量した。21 トリソミーを有するおよび有さない妊娠についての PLAC4 SNP の対立遺伝子の比率の差は、十分に大きく、胎児の 21 トリソミーの検出が母体血漿を使用して可能である。

【0114】

胎盤特異的 4 (PLAC4) 遺伝子における適用可能なコーディング SNP の同定および対立遺伝子頻度の測定

SNP 同定。胎盤特異的 4 (PLAC4) 遺伝子は、胎盤で高度に発現されるが、パフイーコート細胞において低レベルで発現される。PLAC4 遺伝子は、第 21 染色体のダウン症候群重要領域に局在する。PLAC4 遺伝子配列は表 19 に列挙され、そして UCSC ゲノムブラウザ (genome.ucsc.edu/) での Human May 2004 (hg17) アセンブリに基づいて、第 21 染色体上のヌクレオチド座標 41469028 - 41480585 に及ぶ。表 19 に列挙される PLAC4 遺伝子配列は、以下の GenBank アクセション番号によって同定される、全ての公知のかつ予想される PLAC4 RNA スプライシング変異体からなる: AF269287、AK027868、AK092431、BC093685、BC101615、BC101617、L13197、NM_182832 および LOC191585。多型 SNP を、PLAC4 遺伝子のエキソン/転写領域を配列決定することによって同定した。直接配列決定を、10 人の無関係の中国人妊婦からの胎盤 DNA サンプルについて行った。12 ng のゲノム DNA を、先ず PCR によって増幅した。BigDye Terminator Cycle Sequencing v1.1 (Applied Biosystems, フォスターシティ, CA) および Model 3100 DNA Analyzer (Applied Biosystems) を使用して、配列決定を行った。

【0115】

対立遺伝子頻度測定。PLAC4 の転写領域における 4 つのコーディング SNP が、中国人集団において多型であると判った (表 8)。これらの 4 つの SNP は、UCSC ゲノムブラウザ (genome.ucsc.edu/) の Human May 2004 (hg17) アセンブリの第 21 染色体配列の、それぞれ、第 21 染色体ヌクレオチド位置 41470591、41471145、41476236 および 41478755 に局在する。第 21 染色体ヌクレオチド位置 41470591 および 41478755 で見られる SNP についての dbSNP アクセション番号は、それぞれ、rs9977003 および rs8130833 である。残り 2 つの SNP は、新規のものであり、これらを、UCSC ゲノムブラウザ (genome.ucsc.edu/) の Human May 2004 (hg17) アセンブリにおける第 21 染色体上のそれらのヌクレオチド座標に従って、PLAC4 - 41471145 および PLAC4 - 41476236 とここで命名する。それらの対立遺伝子頻度を表 9 に示す。rs8130833 は、前記 4 つの SNP の

10

20

30

40

50

中で最も多型性であるSNPであり、そしてさらなるアッセイ開発のために選択した。

【0116】

【表8】

表8. PLAC4のコード領域に局在する4個の多型SNP

SNP	配列
PLAC4 - 41478755 ¹ (rs8130833) ²	5' - TTTTACAAAATAAGCCTAATCGTAAATATCACTATAGTATATAGAACCATGTTTAGGCC AGATATATTCGTC [A/G] TCTAACTTGTATTTAACCCAAATGGTGTGCAATACAAAATGAGTT TCTTTTTCTTTAAGCCAAATTTGAATTTGCTCCAATAGCTTAAAAGACACCCTAGCGGCG -3'
PLAC4 - 41471145 ¹	5' - CTCACATCTCTAAAGGCCACTCAGGTGGGACACCATCAAGACATTGAAAATCGACAGAAG GAAGGCAGGAAGGGGAGAGGATC [A/G] AACCTGTCAAAATAGATATTCAGAAAATCTGTGCTC TAAAATAAGGCAGCCCTTCCCTCACAGCACACTTATTCCTAATTTCAACAGGACTCCTAG -3'
PLAC4 - 41470591 ¹ (rs9977003) ²	5' - TCATTCTGAGGCGGTGCTGCTGAAAATCTTGGTGTGAAACGTGTGTTTTGAGATTTCCA GTCTATCAC [A/G] GGGCCACAAGGTGTAATATCAAGAAAAATGAATTACTAGAAAGGCAAAG TGAAAAGACATACAAAATACAAGTGCATTCTTTTTATTCTTAGTTTGGACAGATAGTC -3'
PLAC4 - 41476236 ¹	5' - TAATTGATTCTTGGGGTATCCCTGTCTTTACCCTGTCTTTAAGGTTTTAGCAAGACTAAG TCTCCTGGTTGAAC [C/T] GGGGAGCTATTTTTTCCCTTGTGGGGAAGGACAGTATTTATTTT TATATTGGAGGGCCTTTTGAACCTGTCTTAAATTCATAAGGGGAGGGGGAAGGTTTCATA -3'

表に示される配列の逆方向にPLAC4 mRNAは転写された。

¹ 数字は、UCSCゲノムブラウザ (genome.ucsc.edu/) の Human
May 2004 (hg17) アセンブリに基づくSNPの位置をマークする。

² dbSNPアクセッション番号

【0117】

【表9】

表9. 10人の無関係の中国人妊婦の胎盤DNAサンプル中の
4個のPLAC4コーディングSNPの対立遺伝子頻度

SNP	rs8130833	PLAC4 - 41471145	rs9977003	PLAC4 - 41476236
対立遺伝子	G/A	A/G	A/G	T/C
f (少数対立遺伝子)	0.25	0.10	0.10	0.10
ヘテロ接合性	0.38	0.18	0.18	0.18

各SNPについて、少数対立遺伝子が最初に列挙される。「f (少数対立遺伝子)」
は、少数対立遺伝子の頻度を意味する。

【0118】

SNPマーカーを使用しての母体血漿中のPLAC4 RNAの対立遺伝子比率の測定
サンプル回収および処理。第1期および第2期胎盤組織サンプルを、21トリソミー胎
児を妊娠している7人の妊婦から得た。核型が正常である胎児を妊娠している26人の妊
婦からの胎盤組織もまた、絨毛膜絨毛サンプリング(CVS)によって回収した。胎盤サ
ンプルを、回収直後にRNA laterTM (Ambion (登録商標), オースティン
, TX) において保存し、そしてRNA抽出まで-80 で維持した。末梢血サンプルを
、妊娠第1期の間、1人の正倍数性胎児を妊娠している43人の妊婦および1人の21ト
リソミー胎児を妊娠している5人の妊婦から回収した。血漿サンプルを実施例1に記載さ
れるように収穫した。

【0119】

胎盤組織からのトータルRNAを、製造業者のプロトコルに従ってTrizol (Qi
agen, ヒルデン, ドイツ) で抽出した。RNAを、1.6~3.2mlの母体血漿サ
ンプルから抽出した。血漿1mlにつき、3mlのTrizol LS試薬および0.8
mlのクロロホルムを添加した。混合物を、4 で15分間12,000 x gで遠心分離
した。遠心分離後、水層を回収した。1mlの水層当たり、538 μlの無水エタノール

を添加した。混合物をRNeasyミニカラム(Qiagen, ヒルデン, ドイツ)へ適用し、そして製造業者の推奨に従って処理した。トータルRNAを、各カラムについて、48 µlのRNアーゼを含有しない水で溶出した。2つのカラムからの最終の溶出されたRNAを一緒にプールした。次いで、DNアーゼ処理を行い、混入するDNAを除去した(Invitrogen, カールズバッド, CA, USA)。

【0120】

逆転写およびPCR増幅。1.25 µgの胎盤RNAまたは48 µLの血漿RNAを、遺伝子特異的プライマー(配列は表10に示す)を使用して、製造業者の指示書(ThermoScript, Invitrogen, カールズバッド, CA, USA)に従って、それぞれ、40 µlまたは100 µlの反応体積において逆転写した。

10

【0121】

各PCR増幅反応について、40 µlの胎盤cDNAまたは100 µlの母体血漿cDNAを、それぞれ、総体積80 µlまたは200 µlで使用した。各反応は以下を含有した: 0.6X HotStar Taq PCR緩衝液(0.9 mM MgCl₂含有)(Qiagen)、各々25 µMのdATP、dGTPおよびdCTP、50 µMのdUTP(Applied Biosystems)、各々200 nMのフォワードおよびリバースプライマー(Integrated DNA Technologies)ならびに0.02 U/µlのHotStar Taqポリメラーゼ(Qiagen)。PCRプライマー配列を表10に示す。PCR反応を95 7分間で開始させ、続いて95 で40秒間の変性、56 で1分間のアニーリング、72 で1分間の伸長(55サイクルについて)、ならびに72 で3分間の最終インキュベーション。

20

【0122】

【表10】

表10. SNP rs8130833を含む配列の逆転写およびPCR増幅のためのプライマー配列

プライマー	配列(5' から3')
逆転写のための遺伝子特異的プライマー	GTATATAGAACCATGTTTAGGCCAG
フォワードPCRプライマー	ACGTTGGATGGTATTGCAACACCATTGGG
リバースPCRプライマー	ACGTTGGATGTAGAACCATGTTTAGGCCAG

30

【0123】

プライマー伸長反応によるSNP検出および対立遺伝子比率定量。プライマー伸長反応を実施例3に記載のように行った。PCR産物を、先ず、エピアルカリホスファターゼ(Sequenom, サンディエゴ, USA)で処理した。771 nMの伸長プライマー(Integrated DNA Technologies)、1.15 UのThermoSequenase(Sequenom)ならびに各々64 µMのddATP、ddCTP、ddTTPおよびdGTP(Sequenom, サンディエゴ, USA)を含有する、4 µlの塩基伸長カクテルを、5 µlの水および5 µlのPCR産物と混合した。サーマルプロファイルは、94 で2分間、続いて94 で5秒間、52 で5秒間、および72 で5秒間(100サイクルについて)であった。各SNP対立遺伝子についての伸長プライマーおよび伸長産物の配列および分子量を表11に示す。最終伸長産物の分子量を、実施例3に記載されるように、MALDI-TOF質量分析器によって測定した。SNPについてヘテロ接合性である胎児における2つのSNP対立遺伝子を示すプライマー伸長産物についてのピーク領域の比率を測定した。

40

【0124】

【表 1 1】

表 1 1. SNP rs8130833についての伸長プライマーおよび予想される伸長産物の配列および分子量

	配列	分子量 (Da)
未伸長プライマー	AGGCCAGATATATTCGTC	5498.6
対立遺伝子Aについての伸長産物	AGGCCAGATATATTCGTCA	5795.8
対立遺伝子Gについての伸長産物	AGGCCAGATATATTCGTCGT	6116.0

10

太字フォントの文字は、伸長プライマーに加えられたdNTPおよびddNTP残基を示す。

【0 1 2 5】

リアルタイムQRT-PCRアッセイの開発

PLAC4 mRNAについてのQRT-PCRアッセイを開発し、母体血漿PLAC4 mRNA濃度の量的差が21トリソミー妊娠と正常妊娠との間で存在するかどうかを評価した。プライマー(Integrated DNA Technologies, コーラルビル, IA)、TaqManマイナーグループ結合(minor groove binding)(MGB)蛍光プローブ(Applied Biosystems, フォスターシティー, CA, USA)および較正物質(calibrator)(Proligo, Singapore)の配列を、表12に示す。

20

【0 1 2 6】

【表 1 2】

表 1 2. PLAC4 mRNAのリアルタイムQRT-PCR検出のためのPCRプライマー、プローブおよび較正物質(calibrator)の配列

プライマー	配列 (5' から3')
Fプライマー	CCTTCCCCCTTATCCAAC
Rプライマー	GTA CTGGTTGGGCTCATTTCT
プローブ	(FAM) CCCTAGCCTATACCC (MGBNFQ)
較正物質	CACCTTCCCCCTTATCCAAC TAGCCCTAGCCTATACCCTCTGCTGCCCA AGAAAATGAGCCCAACCAGTACAC

30

MGBNFQ: マイナーグループ結合非蛍光性クエンチャー

【0 1 2 7】

QRT-PCR反応を、25 μ lの反応体積において製造業者の指示書(EZ rTth RNA PCR試薬セット, Applied Biosystems)に従って設定した。QRT-PCRアッセイを、ABI PRISM(登録商標)7900HT(Applied Biosystems, フォスターシティー, CA, USA)において行った。PCRプライマーおよび蛍光プローブを、それぞれ、400 nMおよび100 nMの濃度で使用した。5 μ lの抽出されたRNAを増幅のために使用した。サーマルサイクリングプロファイルは以下であった: 反応を50 $^{\circ}$ Cで2分間で開始させ、続いて60 $^{\circ}$ Cで30分間逆転写。95 $^{\circ}$ Cで5分変性後、45サイクルのPCRを、95 $^{\circ}$ Cで15秒間の変性および60 $^{\circ}$ Cで1分間を使用して行った。

40

【0 1 2 8】

21トリソミー胎児および正常胎児を妊娠している妊婦からの胎盤サンプルおよび母体血漿サンプルにおけるPLAC4 RNA対立遺伝子比率の差異の検出

核型が正常である妊娠および21トリソミー妊娠の胎盤におけるRNA転写物対立遺伝子比率を、SNP rs8130833を使用して比較した。対立遺伝子Aの相対量(よ

50

り低い質量の対立遺伝子、即ち、伸長産物が質量スペクトルにおいてより低い質量を実証する対立遺伝子)に対して対立遺伝子Gの相対量(より高い質量の対立遺伝子、即ち、伸長産物が質量スペクトルにおいてより高い質量を実証する対立遺伝子)を割ることによって、前記比率を算出した。図8に示されるように、全ての21トリソミーサンプルは、正常サンプルと十分に識別可能な対立遺伝子比率を示した。21トリソミーサンプルの対立遺伝子比率は、2つのグループに分離した。余分なG対立遺伝子を有するトリソミーサンプルは、通常の範囲よりも高い対立遺伝子比率を示し、一方、余分なA対立遺伝子を有するサンプルは、正常な範囲よりも低い対立遺伝子比率を示した。

【0129】

SNP rs8130833を使用して、核型が正常である胎児および21トリソミー胎児を妊娠している女性からの母体血漿においても、PLAC4 mRNA対立遺伝子比率を比較した。1つだけ除いて全部のトリソミーサンプルが、正常サンプルから逸脱した対立遺伝子比率を実証した(図9)。多型性マーカー(例えば、SNP)を使用することによって母体血漿中の循環胎児特異的転写物の対立遺伝子比率を分析することにより、胎児異数性が非侵襲的に検出され得ることを、データは示す。

10

【0130】

母体血漿中の循環PLAC4 RNAと胎盤PLAC4 RNAとの間のSNP rs8130833対立遺伝子比率について、ポジティブな相関関係(positive correlation)が見られた(図10)(ピアソン相関関係, $P < 0.05$)。この知見は、胎盤が、PLAC4 mRNAを母体血漿へ放出する主要な供給源であるという追加の証拠を提供する。

20

【0131】

正倍数性妊娠および21トリソミー妊娠における循環PLAC4 mRNAの比較

循環PLAC4 mRNA濃度を、核型が正常である妊娠と21トリソミー妊娠との間で比較した。妊娠の第1期および第2期の間、正倍数性胎児を妊娠している29人の妊婦および21トリソミー胎児を妊娠している5人の妊婦から、血漿サンプルを回収した。血漿サンプルのPLAC4 mRNA濃度を、上述のリアルタイムワンステップRT-PCRによって測定した。図11に示されるように、PLAC4 mRNAが、トリソミー血漿サンプルの全てにおいて検出された。21トリソミー妊娠および正常妊娠についての中央値は、それぞれ、5581コピー/mlおよび4836コピー/mlである。統計的に有意な差は、正常な妊娠と21トリソミー妊娠との間で血漿PLAC4 mRNA濃度について確立されなかった。これは、母体血漿中のPLAC4 mRNAの単なる定量は、胎児21トリソミーの存在の信頼性のある評価を提供しないことを実証している。

30

【0132】

実施例5：プライマー伸長および質量分析による胎盤中における胎児発現されたRNAを使用しての18トリソミー胎児の検出

さらなる染色体異常が他の遺伝子を使用して検出され得ることを実証するために、セルピンペプチダーゼインヒビタークレードB(オボアルブミン)メンバー2(serpin peptidase inhibitor clade B (ovalbumin) member 2)(SERPINB2)(GenBankアクセッション番号:NM_002575)を、18トリソミーを検出する能力について研究した。プライマー伸長反応アッセイは、胎盤組織サンプルのSNP遺伝子型の測定を可能にした。質量分析を使用してサンプルを処理し、異なるRNA-SNP対立遺伝子を識別し、そしてRNA-SNP対立遺伝子の相対発現レベルを測定し、対立遺伝子の比率を算出した。18トリソミーを有するおよび有さない妊娠についてのSERPINB2 SNPの対立遺伝子の比率の差は十分に高く、胎児における18トリソミーの検出が、胎盤RNAサンプルを使用して可能である。

40

【0133】

胎盤中のセルピンペプチダーゼインヒビタークレードB(オボアルブミン)メンバー2 mRNAの対立遺伝子比率の測定

胎盤発現セルピンペプチダーゼインヒビタークレードB(オボアルブミン)メンバー2

50

(SERPINB2)を選択した。SERPINB2遺伝子は第18染色体上に局在する。SERPINB2遺伝子のコード領域内に局在する多型SNP(表13)を、公共データベースから同定し、そしてアッセイ開発のために選択した。

【0134】

【表13】

表13. SERPINB2遺伝子のコード領域内の多型性SNP

SNP	配列
SERPINB2 (rs6098) ¹	5'- GTTCTGTGTTATATATAAAGAATTCCTTCTTTCTTTTCAAGGCACAAGCTGCAGATAAAAT CCATTCATCCTTCCGCTCTCTCAGCTCTGCAATCAATGCATCCACAGG [A/G] ATTATTTACTG GAAAGTGTCAATAAGCTGTTTGGTGAGAAGTCTGCGAGCTTCCGGGAAGTAAGTGAAACCTG-3'

10

¹ dbSNPアクセッション番号

【0135】

サンプル回収および処理。第1期および第2期胎盤組織サンプルを、18トリソミー胎児を妊娠している4人の妊婦から得た。核型が正常な胎児を妊娠している8人の第1期妊婦からの胎盤サンプルもまた、絨毛膜絨毛サンプリング(CVS)によって回収した。サンプルを回収直後にRNA LaterTM(Ambion(登録商標), オースティン, TX)において保存し、そしてRNA抽出まで-80℃で維持した。トータルRNAを、製造業者のプロトコルに従ってTrizol(Qiagen, ヒルデン, ドイツ)を使用して抽出した。抽出されたRNAサンプルをDNアーゼ(Invitrogen, カールズバッド, CA, USA)で処理し、あらゆる混入DNAを除去した。

20

【0136】

逆転写およびPCR増幅。0.625μgの胎盤RNAを、製造業者の指示書(ThermoScript, Invitrogen, カールズバッド, CA, USA)に従って20μlの反応体積において逆転写した。表14に示される配列を有するリバーズPCRプライマーを使用して、逆転写を行った。

【0137】

PCR増幅について、20μlの胎盤cDNAを、40μlの総反応体積において使用した。各反応は以下を含有した: 0.6X HotStar Taq PCR緩衝液(0.9mM MgCl₂含有)(Qiagen)、各々25μMのdATP、dGTPおよびdCTP、50μMのdUTP(Applied Biosystems)、各々200nMのフォワードおよびリバーズプライマー(Integrated DNA Technologies)ならびに0.02U/μlのHotStar Taqポリメラーゼ(Qiagen)。PCRプライマー配列を表14に示す。PCR反応を95℃7分間で開始させ、続いて95℃で40秒間の変性、56℃で1分間のアニーリング、72℃で1分間の伸長(50サイクルについて)、ならびに72℃で3分間の最終インキュベーション。

30

【0138】

【表14】

表14. SERPINB2遺伝子の逆転写およびPCR増幅のためのプライマー配列

40

プライマー	配列(5'から3')
フォワードPCRプライマー	ACGTTGGATGTGATGCGATTTTGCAGGCAC
リバーズPCRプライマー	ACGTTGGATGCAGACTTCTCACCAAACAGC

【0139】

プライマー伸長反応によるSNP検出。プライマー伸長反応を実施例3に記載されるように行った。PCR産物を、先ず、エピアルカリホスファターゼ(Sequenom, サンディエゴ, USA)で処理した。771nMの伸長プライマー(Integrated DNA Technologies)、1.15UのThermosequencase

50

(Sequenom)ならびに各々64 μMのddATP、ddCTP、ddTTPおよびdGTP (Sequenom, サンディエゴ, USA)を含有する、4 μlの塩基伸長カクテルを、5 μlの水および5 μlのPCR産物と混合した。サーマルプロファイルは、94 で2分間、続いて94 で5秒間、52 で5秒間、および72 で5秒間(85サイクルについて)であった。各SNP対立遺伝子についてのプライマー伸長産物の配列を表15に示す。最終伸長産物の分子量を、実施例3に記載されるように、MALDI-TOF質量分析器によって検出した。SNPについてヘテロ接合性である胎児における2つのSNP対立遺伝子についてのピーク頻度(peak frequencies)の比率を測定した。

【0140】

【表15】

表15. SERPINB2遺伝子のコーディングSNPについての伸長プライマーおよび予想される伸長産物の配列および質量

	配列	質量 (Da)
未伸長プライマー	TCAATGCATCCACAGGG	5179.4
対立遺伝子Aについての伸長産物	TCAATGCATCCACAGGGA	5476.6
対立遺伝子Gについての伸長産物	TCAATGCATCCACAGGGGA	5805.8

太字フォントの文字は、伸長プライマーに加えられたdNTPおよびddNTP残基を示す。

【0141】

正常な胎盤からの18トリソミー胎盤におけるSERPINB2転写物の対立遺伝子比率の逸脱

核型が正常である妊娠および18トリソミー妊娠の胎盤中のSERPINB2 mRNAのSNP比率を比較した。対立遺伝子Aの相対量(より低い質量の対立遺伝子)に対して対立遺伝子Gの相対量(より高い質量の対立遺伝子)を割ることによって、前記比率を算出した。図12に示されるように、全ての18トリソミーサンプルは、重複することなく正常なサンプルから逸脱した対立遺伝子比率を示した。18トリソミーサンプルの対立遺伝子比率は、2つのグループに分離した。余分なG対立遺伝子を有する18トリソミーサンプルは、通常の範囲よりも高い対立遺伝子比率を示し、一方、余分なA対立遺伝子を有するサンプルは、正常な範囲よりも低い対立遺伝子比率を示した。

【0142】

実施例6: プライマー伸長および質量分析による胎盤中における胎児発現されたRNAを使用する13トリソミー胎児の検出

さらなる染色体異常が他の遺伝子を使用して検出され得ることを実証するために、コラーゲンIV型アルファ2(collagen type IV alpha 2)(COL4A2)(GenBankアクセッション番号: X05610)を、13トリソミーを検出する能力について研究した。プライマー伸長反応アッセイは、胎盤組織サンプルのSNP遺伝子型の測定を可能にした。質量分析を使用してサンプルを処理し、異なるRNA-SNP対立遺伝子を識別し、そしてRNA-SNP対立遺伝子の相対発現レベルを測定し、対立遺伝子の比率を算出した。13トリソミーを有するおよび有さない妊娠についてのCOL4A2 SNPの対立遺伝子の比率の差は十分に高く、胎児における13トリソミーの検出が、胎盤RNAサンプルを使用して可能である。

【0143】

胎盤におけるコラーゲンIV型アルファ2 mRNAのSNP比率の測定

胎盤発現されるコラーゲンIV型アルファ2(COL4A2)mRNAを選択した。COL4A2遺伝子は第13染色体上に局在する。COL4A2遺伝子のコード領域内に局在する多型SNP(表16)を、公共データベースから同定し、そしてアッセイ開発のた

10

20

30

40

50

めに標的化した。

【0144】

【表16】

表16. COL4A2遺伝子のコード領域内の多型性SNP

SNP	配列
COL4A2 (rs7990383) ¹	5'- GACGAAGCTATCAAAGGTCTTCCGGGACTGCCAGGACCCAAGGGCTTCGCAGGCATCAACG GGGAGCCGGGAGGAAAGGGGACA [G/A] AGGAGACCCCGGCCAACACGGCCTCCCTGGGTTCCC AGGGCTCAAGGTGAGGAGCAATTTCATCATGAAGCTGGCAAGACACTCTGAGGCCTCCCCA -3'

¹ dbSNPアクセッション番号

10

【0145】

サンプル回収および処理。第1期および第2期胎盤組織サンプルを、13トリソミー胎児を妊娠している3人の妊婦から得た。核型が正常な胎児を妊娠している7人の第1期妊婦からの胎盤サンプルもまた、絨毛膜絨毛サンプリング(CVS)によって回収した。胎盤サンプルを回収直後にRNA laterTM (Ambion (登録商標), オースティン, TX) において保存し、そしてRNA抽出まで-80℃で維持した。トータルRNAを、製造業者のプロトコルに従ってTrizol (Qiagen, ヒルデン, ドイツ) で抽出した。抽出されたRNAをDNアーゼ (Invitrogen, カールズバッド, CA, USA) で処理し、あらゆる混入DNAを除去した。

【0146】

逆転写およびPCR増幅。1.25 μgの胎盤RNAを、製造業者の指示書 (ThermoScript, Invitrogen, カールズバッド, CA, USA) に従って40 μlの反応体積において逆転写した。表17に示される配列を有するリバーズPCRプライマーを使用して、逆転写を行った。

20

【0147】

PCR増幅について、40 μlの胎盤cDNAを、80 μlの総体積において使用した。各反応は以下を含有した: 0.6X HotStar Taq PCR緩衝液 (0.9 mM MgCl₂ 含有) (Qiagen)、各々25 μMのdATP、dGTPおよびdCTP、50 μMのdUTP (Applied Biosystems)、各々200 nMのフォワードおよびリバーズプライマー (Integrated DNA Technologies) ならびに0.02 U/μlのHotStar Taqポリメラーゼ (Qiagen)。PCRプライマー配列を表17に示す。PCR反応を95℃で7分間で開始させ、続いて95℃で40秒間の変性、56℃で1分間のアニーリング、72℃で1分間の伸長 (50サイクルについて)、ならびに72℃で3分間の最終インキュベーション。

30

【0148】

【表17】

表17. COL4A2遺伝子の逆転写およびPCR増幅のためのプライマー配列

プライマー	配列 (5' から3')
フォワードPCRプライマー	ACGTTGGATGAAGGGCTTCGCAGGCATCAA
リバーズPCRプライマー	ACGTTGGATGACCAATGTTGCCAGGCACTC

40

【0149】

プライマー伸長反応によるSNP検出および対立遺伝子比率定量。プライマー伸長反応を実施例3に記載されるように行った。PCR産物を、先ず、エピアルカリホスファターゼ (Sequenom, サンディエゴ, USA) で処理した。771 nMの伸長プライマー (Integrated DNA Technologies)、1.15 UのThermosequenase (Sequenom) ならびに各々64 μMのddATP、ddCTP、ddGTPおよびdTTP (Sequenom, サンディエゴ, USA) を含有する、4 μlの塩基伸長カクテルを、5 μlの水および5 μlのPCR産物と混合した

50

。サーマルプロファイルは、94 で2分間、続いて94 で5秒間、52 で5秒間、および72 で5秒間（100サイクルについて）であった。各SNP対立遺伝子についてのプライマー伸長産物の配列を表18に示す。最終伸長産物の分子量を、実施例3に記載されるように、MALDI-TOF質量分析器によって検出した。SNPについてヘテロ接合性である胎児における2つのSNP対立遺伝子についてのピーク頻度比率を測定した。

【0150】

【表18】

表18. COL4A2遺伝子のコーディングSNPについての伸長プライマーおよび予想される伸長産物の配列および分子量

	配列	質量 (Da)
未伸長プライマー 対立遺伝子Gに ついての伸長産物	GTTGGCCGGGGTCTCCT	5209.4
対立遺伝子Aに ついての伸長産物	GTTGGCCGGGGTCTCCTC	5482.6
	GTTGGCCGGGGTCTCCTTG	6131.0

伸長プライマーは、該配列のリバース鎖 (reverse strand) にアニールする。
太字フォントの文字は、伸長プライマーに加えられたdNTPおよびddNTP残基を示す。

10

【0151】

正常な胎盤からの13トリソミー胎盤におけるCOL4A2転写物の対立遺伝子比率の逸脱

核型が正常である妊娠および13トリソミー妊娠の胎盤中のCOL4A2 mRNAの対立遺伝子比率を比較した。対立遺伝子Gの相対量（より低い質量の対立遺伝子）に対して対立遺伝子Aの相対量（より高い質量の対立遺伝子）を割ることによって、前記比率を算出した。図13に示されるように、全ての13トリソミー胎盤は、重複することなく正常なサンプルから逸脱した対立遺伝子比率を示した。13トリソミーサンプルの対立遺伝子比率は、2つのグループに分離した。余分なA対立遺伝子を有するトリソミーサンプルは、通常の範囲よりも高い対立遺伝子比率を示し、一方、余分なG対立遺伝子を有するサンプルは、正常な範囲よりも低い対立遺伝子比率を示した。

20

30

【0152】

理解の明確のために例示および実施例によっていくぶん詳細に前述の発明を記載したが、当業者は、特定の変更および修飾が添付の特許請求の範囲内で行われ得ることを理解する。さらに、本明細書中で提供した各参照文献は、各参照文献が個々に参照により組み込まれるのと同程度に、その全体が参照により組み込まれる。

【0153】

【表 19 - 1】

表 19. P L A C 4 遺伝子座のゲノム配列

この P L A C 4 遺伝子座は、U C S C ゲノムブラウザ (genome.ucsc.edu/) での Human May 2004 (hg17) アセンブリに基づいて、第 2 1 染色体上のヌクレオチド座標 4 1 4 6 9 0 2 8 - 4 1 4 8 0 5 8 5 に及ぶ。

chr21: 41469028-41480585

塩基位置 ¹

41469028 TGGGATGTTTTTCAGATTTTTATTATATATGGCAATCATATACCTGCACCTAGAAATATACAA
41469088 CCTCGGCGCTGCCATTGCAGGAAGACAAAGAGACTGTCTAGAGAGTAACGTGGCGATGCC
41469148 CTGGGCAGCTCCATCATTCAGGGTACCATAAAGGGAGTGGGAATGCACACTCCATCTG
41469208 TTTTCACGCTAGGCTGAAAAGTGGCAGGGGGGAGAAATTTACACCTGGCCTGCAAAAGGCAGCC
41469268 TTGTGTTCCCACTTCAGAGCCCCAACTTCTCCAAAGCCAGTGTCTGGGAAATGGCCTTGT
41469328 TGGCAGCAGGCAGGAGACTGGTGCAGTGTGCCAGCTGTGCAAACCCACCAGACTGGTG
41469388 CAGTGTGCCAGCTGTGCAAACCCACCAGCAGCACCCACCAGCAGCCAAAGAAAACA
41469448 ATTTCTAAAGCAGCCCCCAGGATTTTCATGCCACGGGGGTGGTGGGGGTAGGAGGAGGTG
41469508 GAAAGCATTGAATCAGAAAAGTCTTCCAGGTACCAGCAATGCCAGGGTTAATATGGTCTGG
41469568 CTTGCTTTTCAGGTGAGCACCTGTAGCTGGCAGGAAAGTGGCTTCTTGGTGGAGGTGGGC
41469628 ATGAATTCAGAAGCCTTGGAGAGACATCCAGAGCCCTTCCACTACATCGTGTCTGCCTC
41469688 CTGGGAAATTCCTAAGCTTTTTTTGAATCAGAAAAGCCACTGACAAGCAGACAGAATTG
41469748 TGTGGCTTGCAGTGTGATGGAGAGCTAGGTGCTTTGGGTACTAGTCCCAGAGCTGCTAC
41469808 TTGTGCAATGTTGGGTATTTGGAGAGAAGTCATTTGAGCTGTCTGAGCCTCTGTTTCCTCA
41469868 TCTGTAAATCAGGGAATTTGAACAAGTGACCTCAGATTCCTTCTAGAAGCTCTAACAGTC
41469928 AATGATATCATCTATTTTCATTTGAGAGAATCTCCATAGCTCTAATTTTTTTGCCCCAGAC
41469988 CAATCTGCTTCAGCTTTTGTGTTGGGTGCAACACCTGGGGTCTGTTAAAATGCAGAATCGG
41470048 ATTCAGTGACCGAGAGCAGAGCTGAGGGTGGCTGCTGCCAGCTCACAGGTCACACTTGGG
41470108 GTCGTTGCTTCTTTCCCAAACAGCTGCGGATGGTTCTTGGAAAGAGCAGGAATACCTT
41470168 GCAGAAGGGCCTAGAAATAGAGATTTCCATATGCAGTCCAGACTTATTGGGTGAGCCTGT
41470228 CTGCACTAGGACCTGAGAAATCTGCATTTTATTATATCCCTTGAGTCCCCTTTAAAGCAGCC
41470288 ACCTGGCCCCAGCCATTTGGACTCTATTTGGAGGCCACTGCAGAGGCCAGATGCCCTCT
41470348 GCTCGGCGGTTTCTGTGCAGAAAGGCTGTGTTCTTTCTTCTTAAATACTCTTCTTA
41470408 GGTAAAGTGTTCCTTCTCTTTGCCCATCTAGAAAATCTCCACCTCAAGCAGGTCGTGTT
41470468 CCAAAAATCCTCGTGTGGGCAAGTGGAAAACACGCAGTTTTTTCTAGGGTCTCATTC
41470528 TGAGGCGGTGCTGCTGAAAATCTTGGTGCTGAACGTGTGTTTTTTGAGATTTCCAGTCTAT
41470588 CACAGGGCCACAAGGTGTAATATCAAGAAAATGAATTAAGTAAAGGCAAAGTAAAA
41470648 AGACATACAAAATACAAGTGTCAATCTTTTTTATTCTTAGTTTGGACAGATAGTCCATTCT
41470708 TCTACACTGGTCCCACGGTTCTGAAAGCTTCTGTAAATGATCAGTGGTTACCTTGTGTC
41470768 CAAGTAACTGCAAAATCCCTCCTCTACAAAAGTGTGCTTGCTCCAAGGCAGTGCAACTAGA
41470828 AGTTGTTACAAATGGTTCAGTAACAAATTTGTTTGGCGGCTTTTCCCATGAATGAGAC
41470888 AGTGGTTATTTTTGCTAAAGCAGAAAGGAAATGTGATACTATTGGGCTGTGTTTTGCCCT
41470948 CTGGAGTAATCCTGCTTGGGGAAAATGGAGGCTTGTTCAGAAATGCAGAAATCCCTGTTA
41471008 AATTAGGCAGTCTTGGGCTGGAGGACGTGTGCCTGCCTCCCCAGTGCCTCACAACTCACA
41471068 TCTCTAAAGGCCACTCAGGTGGGACACCATCAAGACATTTGAAAATCGACAGAAGGAAGGC
41471128 AGGAAGGGGAGAGGATCGAACCTGTCAAATAGATATTCAGAAAATCTGTGCTCTAAAAT
41471188 AAGGCAGCCCTTCCCTCACAGCACACTTATTCTTAATTTCAACAGGACTCCTAGTCTTGC
41471248 CCCACAGCGTCACAGCCTACAGCAAATTAGAAAATGGGGTGGGGGGCGGATATTTATCCAA
41471308 CCAGTAATACCTTGGGACGGGGCACACAAGATGTTTGCCCTCTTACCTCTCTGTACCT
41471368 TCCCAAGAAAGGGTCAAGATGAAACAGTGTGCGTTTATGGTATTGCGAGAGTTAAGTGAG
41471428 CTGCGGTGTATTAGAACCTTAGCCTCGCGCAGCGTCAGCCGTGTGGTAAGTGTCCATAA
41471488 ATCTTCGTTTAGAAAAGTGGCAAATTCAGGCTGCTAGTAAACAAAGGAGGGAAGACAG

10

20

30

40

【表 19 - 2】

41471548 ACAAAACGGAACAGCAACAACAGAAAACCCAAGAAGCTAGATGCCCAACAATCTGGGTCTG
41471608 TATCTTGAAGGAATGTGCATCCTGTCTCTGACTGCAAACCCAGGCCTTCTGTGGCCCCA
41471668 CGATGCTGCCCTCCTAGCCCTCCTAAGGTGGGAATGGAGCTTTACCCCTTGGTGGCAAACA
41471728 GACCTGGCTCCATGGATCTCAACCTGGGGTGATTGTGTCCCCACCCAGGGGACATCTGG
41471788 CATCCTCTGGGGACATTTTGTAGTTCTCACAACTTAGAGGGTGCTACTGGCGTCTGTGGG
41471848 TGGAGACTGGAAGTGCTGCTCGGCATTCTTTGCCGTACAGGGCAGCCCCACAACAAAGA
41471908 ACGATCTGGTCCAAAATGGCAACCATGCCAAGATTGAGAAATCCTGGTTACTCGACACAG
41471968 CAGGTCCGCTGGCCTAGGAGTTGCTGCCCAGAGAGGCAAAGGGAGAATGTCCAGTGGAAA
41472028 CAGCTGCCCTGAGCATAACAGGGCAGCGTGACACCTGCTGATTCCCCCATCCTTAAGGTCC
41472088 TGTATTGTTCTTAACACCACGTGGATCTTCTTGCCAGATGCATTAAAGTGTGAGAAGAGT
41472148 TAAAAATCACTTATAACTGGAGTGACTGGGGGTAAAGAGGAGAAAAAATTTGAACCTGA
41472208 CTCAAAGGATGAGCATGTTTTTCTTTCTTTCTTCGGCACATTGGCTGGGTGTGGCGGCTC
41472268 CATGCCATTATCCAGCACTTTGGAAAGGCCGAGGTGGGAGGATTGCTTGAGGTTAGGAG
41472328 TTCAAGATCAGCCTAGGCAACATAGCAAGTCCCTATCTATATAATTTTTTTTTTAAATTA
41472388 GCCAAGCTTGGTGGTGCATGCCTGTAGTCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGGAT
41472448 CACTTGAGCTCAGGAGTTCAAGGCTGCAATGAATTACGATTGTGCCACTGCACTCCAGCA
41472508 TGTGCAACAGAGCAAGACCTTGCCCTCAAACATATTAAGCACCTACTGCATGTCAGGGCC
41472568 TTGGTCTAAGCCCTGGTATGCAACAGTCAACTAGACAGAGAGAGTCTTGGCTTTTACAGA
41472628 ACCTCCCCTTATAAGGAAGACAGATTGTCAAGGAAGTAAACAGACTTTTAGAGGAGTGCT
41472688 GTGAGACAGTGCCATGTGGGAAGGGTATTGGTGAAGAATCCTGCTTTATAAGGGCGGT
41472748 TATGGAAGACCTCTCTGAGGAGGTGCAATTTGAGATGAGATTGGCTTGAGGAGGACTGAG
41472808 CCTTCAGAAAGTTAGGGAAAGCGTGTCCAGGCCTGCAGCCAGGGAGGTGAAGACTTGAGGG
41472868 TGTCAGGGTGAGGAGTGAGGGTGTGAGGGTGACTGAGGGTGCCAGGGTGAGGAGTGAGGG
41472928 TGTCAGGGTGAGGAGTGAGGGTGTCCAGGGTGAGGAGTGAGGGTGTGAGGGTGAGGAGTG
41472988 AGGGTGTCCAGGTTGAGTGAGGGTGTCCAGGATGAGGAGTGAGGGTGTCCAGGGTGAGGA
41473048 GTGAGGGAGTCCAGGGTGAGGAGTGAGGGAGTCCAGGGTGAGGATTGAGGGTGTGAGGGT
41473108 GAGTGAGAGTGTCCAGGGTGAGGAGTGAGGGTATCCAGGGTGAGTGAGGGTGTCCAGGGT
41473168 GAGGAGTGAGGGTATCCAGGGTGAGTGAGGGTGTCCAGGGTGAGTGAGGGTGTGAGGGTG
41473228 AGTGAACGTGTCCAGGGTGAGTGAGGGTGTCCAGGGTGAGGAGTGAGGGTGTCCAGGGTGA
41473288 GGAGTGACGGTGTCTGGGGTGAGTGAGGGTGTCCAGGGTGAGGAGTGAGGGTGTGAGGGT
41473348 GAGTGAGGGTGTCCAGGGTGAGTGACATGTGTGGTGAGGAGGTGTTTGCAGTGCTTCAG
41473408 GCGCAGCAACTCTTTCATCTAGTTTAAATTTGTGCTCTGAGGTTAGATTTTAGTAGAACA
41473468 AAGGCCTTACAAAGAAATGTGAAAACATTTGTGCTTCCCTGCTTACAGGCAATTAAGGGA
41473528 GAATCAAGCTGAGGGTGCCTGGTGTGGGGTGGGGTGGAGAAGACCACAGAGACTATTGTG
41473588 TGTTTTATTCAACAGTGTCTTGGGCTGCTTCTCCAGAAATGTCCCTGACACATGGATGT
41473648 AAGTGTGGCTAGTTTACTGGGAGATGATCCAGTGATGCAGGACAGGCGAGCCCTAAGAT
41473708 TGAAGCATAGCCCGGAGGGTCTTAGCTTTGCCAGGAAGGAACTCAAGGGCAAGCCAG
41473768 TGGTGTAGCAACTTTTATTGAAGCGGCCGGCTGTGCACAGCAGCAGAGGGCGCTGCT
41473828 CCTTGCAAAGCAGGGCTGCCCTACAGGCCTGTGCGCCACAGTAGCAGCTCAGAGGCAGTT
41473888 CTGCAGTGGTATTTGTATCCACTTTTAATTATATGCAAATGAAGGGGCAGTTTATGCAGA
41473948 CATTTCCAGGGTGAGGGTGGTAACCTTCTGGGTGCTGCCAGAGCCATGGTGAAGTACTTG
41474008 ACACAGGTCGGTGTGCTTATGGAACCTAGCATCTGCCCTGGACCTATTTTAGCTAGTGC
41474068 TCAGTTTGGTCTGAGTGCCCTGAGCCCCACTTCCAGAGTTGAGTCCCACCTCCTACCTCAT
41474128 TCCCCCTTCAGAGATTAGATACTCCTCCTTAATCTTAAGGGGGCTGCAGAAGGGCGGAGA
41474188 TCTGTTTTCCGTAACTACTTCTGCTGAGTTTATGGACGTAGGCCCTGCCTGGCACTGGA
41474248 GGAGTAAAAATCTCTGGATACCTGATCTAAGGAGCCAGAGGCAGGACGATTTTATTCTC
41474308 CGTGTGAGTGACAGGATGGGCTGGAAGCCTTGTGCCAGCATTGTCTCTGGAAGTGTGGT
41474368 AATCTAGAATACACAACTTTACTAAGAGGTTAAAGAAGCAAGGACCAAACATTTGTAAC
41474428 AAGACAGTTGTCAAAGTCCTAGAAGAGGTGAAAAACAGGTGAGACTTGGGAAGGCATTT
41474488 TTGATGGTTGACCAGATATAGTTGGGGCAGTGCCCTGGTTATATCTATGTAAGTACTAGGTA
41474548 GCTTGCTCATAGATCTTTTGAATGTTAACCTCAACCTGTCCAGAGTTAATATATGTGCAG

10

20

30

40

【表 1 9 - 3】

41474608 CAGGTTTTATTAATAACTGCACAAGACCCACCTTGTTTCAGCTAGTAAATAATCCAATGC
41474668 TAGTCTGTTATCAACAACACTACATTTTCCAGAGTCTGGGGAACTCTTGAATTCCTTTAAT
41474728 GCCTGATCTCCGTTGGTGGCTAAGGATTCAGGATTTGAGCCAAGTTCCTTAGCGTTAAC
41474788 TCATGGTAGGCAAAGCCACCCAGGGTGTCTAGTCCCTATTGCCACCCGATTCCTGCC
41474848 AGAATTAGTTTTATTGCTTACTTATTTCTGATATTCCTGGGTCCTAGGCGTTATAGATTG
41474908 TGACCCCTGGAGGGGTAAGAGTGGCCAACGTTTCATTCATGTCAGTTCCTCAAGTTTTTTAGA
41474968 TACAAGGGAAAGCTATTCCCTTAAAGAAGAGGTGACTCCTTAGGGAGTTGGAGTGGTTACA
41475028 GGGTGTGACTTCTTCCCATTTCATAGTCACAAACAAAAATGAACCCAACTAGGGCACCAG
41475088 AGAAGCCCTGCGGGGTGCGATGTTTATACTTCATTGCCAGGTTGGGTCTATAGAGATAAT
41475148 TTCCACCTGTTCTCATGGTGGTGGTTGAACAATCTTTGTTTTCTAGAAAGGTAGTACT
41475208 GTCACCTTCCCAGATCAGGCAGTGTGTTTTCTTTGTATGTTCCCATCCGGGAGAAGGTA
41475268 CCATATATGGTCTTTTCACTCACAAATGGAATCTCATTACCTCCCCGTGGTCTTGGAAA
41475328 CTTGGCAACTAGAGTTGGACCAGAGCATCGCAGGGAAAGCTTCCACTTTTTGTGTCATTAAT
41475388 GCAAGAGTGGATGCAAAATGTTAGAGTTATGAGTGCACCTGGAGATATAGATGCCAACCTC
41475448 CCAGATTCCGATAATAGTGGTTCAGGGCAGGGGGACAGCAGGGTCCAGGGGGGATCCACTA
41475508 AGTGGGGAAGAGTTCACCTTCACAATAGGGGTTGGGTATTTGGGGTGCATGGTTAGT
41475568 TAGGAGGTCTGGGGACATGGTCTGAGATTTTCCAGATAGGTCCGGAAGATGAAACTGTCT
41475628 ATCCTGGGGGTGTTGATGACAAATCTGGCAGCCATAAAGATGATTCTATGATGCTATAAT
41475688 TTTTGAATATTTACTGTAGAATTTGTCCACCCCTCCCTGTCCACATACACACTAGCTTA
41475748 GGTTAATTAGAAGAGCAAACAGAATTAACAGTGGCATCATGGTATCTGGTTGGGTCTTAG
41475808 AGTAGCTTCTATACCCAAACAAGCCACAGGAGATGTTTCCAGGAGGAGGTGGCTGGTTA
41475868 AAGCCATAGAAAGGAAGTACTACAGTCAAGAAAGAGCAAGATCAATGCTCCTATTCCC
41475928 ATCTACAGCATTACATTACCTCTTCTGGCTGAGTGTGATTATTTAAATAGGTAGCAGA
41475988 GGTCTTCCAAGCTTTACTGATATTGGTGTGGTGTAGTGCCCTCCCTTTGTGCCCTGTG
41476048 ACTCATAAGAAACAGGTTTAGTCTGGATCTGTGTGCCCAAGTAGGTGTTCCCTGAAGTT
41476108 TAACAGCAGTGGGGTACTTAAACAATACCTGATAAGGCCCTTCCATTTTCATTGTAATTG
41476168 ATTCCTGGGGTATCCCTGTCTTTACCCCTGTCTTTAAGGTTTTAGCAAGACTAAGTCTCCT
41476228 GGTTGAACCGGGGAGCTATTTTTTCTTTGTGGGAAGGACAGTATTTTATTTTTATATT
41476288 GGAGGGCCTTTTGAACCTGTCTAAATTTAAAGGGGAGGGGGGAAGGTTTCATATAGGTA
41476348 ATTACTACAAGCCAAGACCACAGCAGCTCAACACATAAAAATCCATAGACAAATCAGTTTT
41476408 ACAACCCCATTTCTGGCTTCTAGTCTTTGGCTTCCATACTGCTCAAAGGAGTTCAAGG
41476468 GCCAATGAGTGCCCGCCACCTCCACACTCATGCACTGTGCAGATGACTTACACAGACCA
41476528 TCTACAACATAGCTGAATTTCTGACATGTTCTATACTACCTCTTTCTTAAAGTTATTTT
41476588 ACTCTAGGATAGGGAATTTACTATACAGGATTCCTCCACATATAAAAATTAATCTTTCTTT
41476648 ATATCCTTCTTTGCAAAAACAAAACAAAATAACATTTTCTATTTCATAATATTCTTTACATC
41476708 TCTCTTTTCTACTCACTGGTTCACTCATGTTTTGAACCTCCCATTTAGTAACTTCCGGAT
41476768 TAGACAAAAATTTTTCTCAATAAAGAATACATTTCTTTAGCACATTTTATGGAAACCT
41476828 AGGAAGGAAGAAGTCATGAACTTCACTAGACATTTGTCATTCTATAACTGAGAACCATT
41476888 CTACCATTTTATGATTTTAAACCACACATTAAGCATATCCCATTTACGTGTATTTAATTA
41476948 TTTCACTTTTAACTTTATCTAGATCACCGAGAACCAAGGTACCATGCAAAGCTGGTCACC
41477008 ATTTAAAGCCATTTTAAACATTTTAAAGCCTATGAACATCAGTGACTTACCAGGTAATA
41477068 ATCCTAAAGTTAAATTTTAGAAGATAAAGATTTCTTTCAAACATAAAGCTTTTCTAGTAG
41477128 TCTTATTTGTTGAATGTATGAGTGTCTTTTATCTATAAGCCAGTTTGACAGCACGCTAG
41477188 ATGTAACACACATCACAATACATGTACATATACCCAAAAACATATTAATAAATGACCT
41477248 ATACAAGACAACACTGGATTCAAGTTATTTACAGAACTGGGACCCATCTACCTGGCCAAAT
41477308 TTGTTTGCCTGATAGGTATGGAAAACAGGAAAAGGCAGGACAGGGAATCCCATAGCATC
41477368 AACTAAAAGGGGAGGAAGCAAACACTGCATTGCTCAAAGGAGATTCTGGAGTCCCCACGC
41477428 CACTGGAGAGCACACTCAGTGGTGGAAATACCAAAGAAAATGTTTCAGGCGGCTGCTTAT
41477488 CTGCCACTGTGGAAAGCTGTCTCTGGGACAGTAACTTACTTGAGCTAAGCAGCTCAC
41477548 GGGGCTAGTAGGAGAAGGTTAGCTCTAGTATTGATGGAAGCTTTTTGTTGTTATTGTTCT
41477608 CTCTCACCAGAGCAGTTAGGACATTTGCATTGCCAGGGGCCCTTTTGCCTATAGTAGGCC

10

20

30

40

【表 19 - 4】

41477668 CAGTGATTCTGGCCCAGGGGTGAGCAAGTCAGGCATCAAGTCTTGTCTAGGCATCCCAGA
41477728 TGCTAATTTTGTAAACATTTTCTCAAGATGAGTAATCCTGAGGGGCAAGGAGGCTTAAAGT
41477788 CACTGTAAACAATTGTACTTTTTGGCTATTTCTTTTTACTCCCCTCTTTTGCCCTGTCCC
41477848 TGTTGTTGTAAACTTTAAAGGCTATGTTAAAGCGTCGTTTCATAGGACTTGAAGTCCCA
41477908 TTGCTGCTTTTTGTAGATTCCTCCTAATGTCAGGAGAAGATTGAATGAGAAAATGTATAC
41477968 CCAGGAGAGCTTGCCCTTCTGGGGTGTCTGGGCCTGCATTAGTATATTTTCTGAGTGCTT
41478028 CAACTAAAAGACCCTGAAACAGAGCGGGATTTTCATCTTTTCCCCGAGTTACTTCCTTAA
41478088 CCTTGTCTATAATTGACTGGCTTAACACACACTTTTTCTCTACTTTTTTTTTCCCACAG
41478148 CACAGCAAGCGGATGACAATATTTGTAAATCGTGGCAATTTGAAGAACATAGTCAACGTA
41478208 ACAAACTCTTGATAAGCTTTTTCTGGTTTATCTGAAAACCTGGCCAATTCCTTCCTTTAT
41478268 AAGGTCTAATTAGACATGGAAGTGGCATATGTAATCTTTGAGTGTTCCCTCATTTCCAT
41478328 CAACTACTTTCCACAGTGGACACAGGCTTGACCTTAGGGGCTGATATGGAGCCCCACTCC
41478388 TGGTGTACTGGTTGGGCTCATTTTCTTGGGCAGCAGAGGGTATAGGCTAGGGCTAGTTGG
41478448 ATAAGGGGGAAAGGTGCCTGATGATATTTGGGGTGAATCTCATTAGGGAATTGGCGAGAA
41478508 CCCCACTCAGGACTGGGGACTGAAGAGACTCTGGGGAGGCTTATGAACCTTCTATGGG
41478568 GAGCAGCTAGGTGGGGATCCCTTATGTCATGGCATTCTAATGCCTGGAAGTAACGTGATCC
41478628 AGTATAGAGCCATAAAAGCCTGTACATAAGGGATCTCTTCCCATTTTCTTCTCTTTTAC
41478688 AAAATAAGCCTAATCGTAAATATCACTATAGTATATAGAACCATGTTTAGGCCAGATAT
41478748 ATTCGTCTCTAACTTGTATTTAACCCAAATGGTGTGCAATACAAATGAGTTTCTTTT
41478808 TCTTTAAGCCAAATTTGAATTTGCTCCAATAGCTTAAAAGACACCCTAGCGGGGAGTCCC
41478868 TTGGGATACTCCTTGTGTCCCATGCCTATATTAAGGATCTCTCTACAGAGGGTTTTAT
41478928 TAGCCCAAGTTTAGCAAAAGCCTAGTACTCTTCCCTCTTAAATTCCCGTGTCTTTAA
41478988 GGTGTAAATATAGATAGCAAGGTGTTATAAAAATGGATTATGAGCTACGAATGGGCAGTC
41479048 GAATGTGGAGCCTAAATTCATAGAGATCTAGAGTTGGGTGGAGAGGGGGCTAAACAAAT
41479108 GGAGGAAGGGAAAGGGGTAAACAGCGTTCGCCAAGGGGAGACCTCAGAGGCTCTGACTTG
41479168 CTGAAGAACCTACCCAGTAGTGGAGATACTGAAAAAATATTGGGCTGGCCACTTGTCTA
41479228 CCACTGTAGGTGGCTGACTGCCAGGCCAGGAGCCTGGGAGCTCCCAATTCCTTTGACCAA
41479288 GAGCAGCTTAGGCAAGGGAGTTATAAGACAGTACACAGGAAGGAGCTTGCAATTGGCTAT
41479348 TAGGAAAATAATACTCCTAACTTCAGGGTGGAAAAAGACAAGACCAATATTCGCCTAGCG
41479408 AAAGGGGTATAACCCACAATCCTAGAGGAAATGTCAGTGCTAAAAACCCAGAGCATCTG
41479468 GAGGGTGGCCTATAATACCGATGCTGAGAACCCAAAATGCCTGCGTTTTAGCCAAACAAGG
41479528 ATGCCCTCGCCAAAGCAGCTGTGCACAGCAGTGCCAAAAACCCCTGGGGTACCCAGTGGGC
41479588 GGCCAACCCCGTGAACCCAAGACCAGTTACAGAACATAGAACAACGTGACAACGTGACT
41479648 CTGGTATCCCAGAGTCAACACAACAGGGGACCTCTCACAACCAAGTGTCTGCTTAAAC
41479708 AATTGCCCAAATACAATTAACAGAAAGTCGAAAGCAAACATAAGACTCCAACAAGACAT
41479768 ACATGTTAGGACTGAAAATGAAACCAAAGTGGAGCAATAAAATGGAGTCAGAGGAGAAAG
41479828 AACCAGGTGAAGGGGTGGCAAGATGTGCTTCAAGGCACCTAAACCGTGGGGAAC TGACC
41479888 GCTTAGCCAAAGGCTTTTTATTTCTAGCTTACCTGATATTACTGGGGGAGGGTGCAAAGG
41479948 GGACTCTCACCCATCCACAGAAGACAAAATGGCACCAGCCAGTCTTCCACGTGGGACCCG
41480008 GGTGCAGGTCTCTCTAGGTTCCCCAGCTTGGGGGTGCTCAGCTTCTGTGTCGGGGGCTGG
41480068 CTCGTTAGAGCAGTGGGTCCCACAGGAGCAGCTGTACTATGGACACTTGGCTGTCCACT
41480128 CAGTTTCACCACCTGCCAGGAAAAGATGATGGCTGTGAAAAGAGGCACTGGTTAGGGTTA
41480188 GAGCTCGGTAGTGTTAGCAGCTCTTTATTGGTACTTCTCAGTGTTACAGATCTTACATC
41480248 CTCAATCACAGACTGCTTACCCTCTCTTGGCTGTCTTGCCAACTGCTGTCTCTTGTCTCT
41480308 CACCAATTGCTGCCTCTCTGTCTCTGCTGTCTTGCCTCTCTGCCAATTGCCACCATCTCC
41480368 GCTGTCTTGTCCCTTGTGCTGTTGCCAGATGATGCAGGACAGGCAAGCCCCAAGACTGG
41480428 GGCTTAGCCTGGGAGAGTCTTGGATTTGCCCAAAGATTCAAGGGTGGAGCTGGTGGTGT
41480488 AGGCAGCAGCTTTCATGGAAGCAGCTGTGCACAGCAGGCCAGAGATGCCGCTCCTTGCA
41480548 GATCAGGGCTGCTCCATAGGCTGTGTGCCCTGAGTAGC

10

20

30

40

太字フォント：PLAC4遺伝子の転写領域であることが知られているかまたは予想される配列。
下線フォント：NCBIデータベースからのPLAC4 mRNAに対応する参照配列 (NM_182832)。
¹ U C S Cゲノムブラウザ (genome.ucsc.edu/) でのHuman May 2004 (hg17) アセンブリに基づく
第 2 1 染色体上のヌクレオチド座標。

配列表

配列番号	配列
1	GGCTGACATCACCATCCTG
2	TTGGAAAGCCAGGACACAAC
3	AGAGCAGCAGCCTCTTCTTG
4	TGAGGATTGGTGGGAAAAC
5	TTTTCCAATCCCAAGTCTGG
6	TTGCAACACCAAGAAAAGC
7	CGACAGAGCAAGACCCTTTC
8	TCTGGCAAAATACAGGTCATTG
9	TCATCAACGTGGTCAACAGG
10	GTGGACATCGTCTTCCTGCT
11	AACGACAGTCTGCACGAGTC
12	TCACTCTCGTGCTTCTCGTG
13	GTGGATGGCAGTGAGTTGT
14	CAGGTAGGTCAGGAGCCTTG
15	GGCCTGAGATTCTTCACTGC
16	AAAATTAGCGGGACATGGTG
17	GACAAAGTCAAGTCTTCACCAA
18	GCGTTCCACACCAGGTTT
19	(FAM)CGCTTCATCGACAACC(MGBNFQ)
20	TGGACAAAGTCAAGTCTTCACCAAGCGCTTCATCGACAACCTGAGGGACAGGTACTACCG CTGTGACCGAAACCTGGTGTGGAACGCAG
21	CAGGGCATCATCAATTTTCG
22	TGCTTCCCCACACCTTCA
23	(FAM)CAGAAGGAAAGTAATGGACCA(MGBNFQ)
24	TGCAGGGCATCATCAATTTTCGAGCAGAAGGAAAGTAATGGACCAGTGAAGGTGTGGGGAAG CATT
25	GATCAACCAGGACACCATCAA
26	CCGTAGGCTTCGTGTTTCA
27	(FAM)CGCATCATCAAGGTC(MGBNFQ)
28	GAGATCAACCAGGACACCATCAACCGCATCATCAAGGTCATGAAACACGAAGCCTACGGAG
29	CCCTCACTACCAACCTGATCA
30	CCTTGGGTATTGCTTAATCGA
31	(FAM)TGCTTGCTGAAAATG(MGBNFQ)
32	TCCCCTCACTACCAACCTGATCAATTTGCTTGCTGAAAATGGTTCGATTAAGCAATACC CAAGGAG
33	GGCAGCCACAACCTTTGACAC
34	CTCGGCCAGGCGCTT
35	(VIC)ACCAAGCGCTTCGC(MGBNFQ)
36	(FAM)ACCAAGCACTTCGC(MGBNFQ)
37	GGCGCCAGAAGACACGT
38	GTCGTGGCGCCCGT
39	(VIC)TGATGACCACCGCAAA(MGBNFQ)
40	(FAM)TGATGACTACCGCAAA(MGBNFQ)
41	ACGTTGGATGCTATGTGACCCGCTTCTACC
42	ACGTTGGATGGAGTTGCCATCTGAGAAGAG

10

20

30

40

配列番号	配列
43	ACGTTGGATGACCGCCTCATCAAGGAGAGC
44	ACGTTGGATGAAGTTGAGGTCATCGTCCCG
45	CTCTTCTTGGCAGCGCC
46	CTCTTCTTGGCAGCGCCA
47	CTCTTCTTGGCAGCGCCGGA
48	AAGACACGTGTGTTTGCGGT
49	AAGACACGTGTGTTTGCGGTA
50	AAGACACGTGTGTTTGCGGTGGT
51	TTTACAAAATAAGCCTAATCGTAAATATCACTATAGTATATAGAACCATGTTTAGGCC AGATATATTCGTC[A/G]TCTAACTTGATTTAACCCAAATGGTGTTGCAATACAAAATGAGTT TCTTTTCTTTAAGCCAAATTTGAATTTGCTCCAATAGCTTAAAGACACCCTAGCGGCG
52	CTCACATCTCTAAAGGCCACTCAGGTGGGACCCATCAAGACATTGAAAATCGACAGAAG GAAGGCAGGAAGGGGAGAGGATC[A/G]AACCTGTCAAATAGATATTCAGAAAATCTGTGCTC TAAAATAAGGCAGCCCTCCCTCACAGCACACTTATTCTTAATTTCAACAGGACTCCTAG
53	TCATTCTGAGGCGGTGCTGCTGAAAATCTTGGTGCTGAACGTGTGTTTTGAGATTTCCA GTCTATCAC[A/G]GGGCCACAAGGTGTAATATCAAGAAAAATGAATTACTAGAAAAGGCAAAG TGAAAAGACATACAAAATACAAGTGTCAATCTTTTTATTCTTAGTTTGGACAGATAGTC
54	TAATTGATTCTTGGGGTATCCCTGTCTTTACCCTGTCTTTAAGGTTTTAGCAAGACTAAG TCTCCTGGTTGAAC[C/T]GGGGAGCTATTTTTCTTTGTGGGAAGGACAGTATTTATTTT TATATTGAGGGCCTTTTGAACCTGTCTAAATCTAAAGGGGAGGGGGGAAGGTTTCATA
55	GTATATAGAACCATGTTTAGGCCAG
56	ACGTTGGATGGTATTGCAACACCATTGGG
57	ACGTTGGATGTAGAACCATGTTTAGGCCAG
58	AGGCCAGATATATTCGTC
59	AGGCCAGATATATTCGTCA
60	AGGCCAGATATATTCGTCTGT
61	CCTTTCCCCTTATCCAACCT
62	GTACTGGTTGGGCTCATTTTCT
63	(FAM) CCCTAGCCTATACCC (MGBNFQ)
64	CACCTTTCCCCTTATCCAACCTAGCCCTAGCCTATACCCCTCTGCTGCCCA AGAAAATGAGCCCAACCAGTACAC
65	GTTCTGTGTTATATATAAAGAATTCCTTCTTTCTTTTCAAGGCACAAGCTGCAGATAAAAT CCATTCATCCTTCCGCTCTCTCAGCTCTGCAATCAATGCATCCACAGGG[A/G]ATTATTTACTG GAAAGTGTCAATAAGCTGTTTGGTGAGAAGTCTGCCAGCTTCCGGGAAGTAAGTGAACCTG
66	ACGTTGGATGTGATGCGATTTTGCAGGCAC
67	ACGTTGGATGCAGACTTCTACCAAACAGC
68	TCAATGCATCCACAGGG
69	TCAATGCATCCACAGGGA
70	TCAATGCATCCACAGGGGA
71	GACGAAGCTATCAAAGGTCTTCCGGGACTGCCAGGACCCAAGGGCTTCGCAGGCATCAACG GGGAGCCGGGGAGGAAAGGGGACA[G/A]AGGAGACCCCGGCCAACACGGCCTCCCTGGGTTCCC AGGGCTCAAGGTGAGGAGCAATTTTCATCATGAAGCTGGCAAGACACTCTGAGGCCTCCCA
72	ACGTTGGATGAAGGGCTTCGCAGGCATCAA
73	ACGTTGGATGACCAATGTTGCCAGGCACTC
74	GTTGGCCGGGGTCTCCT
75	GTTGGCCGGGGTCTCCTC
76	GTTGGCCGGGGTCTCCTTG

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0157】

【図1】第21染色体上に局在する胎盤発現転写物の対立遺伝子の相対的定量による、母体血液、血清または血漿分析による胎児21トリソミーの非侵襲的測定のために使用される戦略の1実施形態の概略図。(A)第21染色体上の転写されるSNP座でヘテロ接合

性の正常胎児および21トリソミー胎児。21トリソミーを有する胎児は、遺伝子の余分なコピーを有する。「A」および「G」は、転写されるSNPの各対立遺伝子を意味する。(B)遺伝子は、胎盤組織において発現され、そして得られる転写物は、コーディングSNPを示すことにより対立遺伝子性(allelic)となる。21トリソミー胎盤における2つのRNA対立遺伝子の比率は、遺伝子の余分なコピーの発現に起因して、正常胎盤のそれから逸脱すると予想される。(C)RNA転写物は母体血中へ放出され、そしてそれらの相対存在量は、胎盤遺伝子発現プロフィールを反映する。したがって、21トリソミー妊娠における2つのRNA対立遺伝子の母体血、血清または血漿比率は、正常妊娠のそれから逸脱すると予測される。

【図2】それぞれ、非妊娠女性、ならびに妊娠の第1期および第3期にある女性の、母体血漿中の胎盤由来mRNA転写物の濃度のボックスプロット。(A)COL6A1 mRNA、(B)SOD1 mRNA、(C)COL6A2 mRNAおよび(D)ATP5O mRNA。コントロール、非妊娠女性；第1期、妊娠第1期にある女性；第3期、妊娠第3期にある女性。ボックス内の線は中央値を意味する。ボックスは、第25百分位数と第75百分位数との間の間隔をマークする。エラーバーは、第10百分位数と第90百分位数との間の間隔を意味する。黒丸は、第10百分位数および第90百分位数より外側のデータポイントをマークする。

【図3】分娩後の母体血漿からの胎盤由来mRNA転写物のクリアランス。分娩前および分娩後24時間での母体血漿中の(A)COL6A1、(B)SOD1、(C)COL6A2および(D)ATP5O mRNA濃度。各線は、1被験者から得られた対の血漿サンプルを示す。

【図4】胎盤組織におけるCOL6A1遺伝子のSNP rs1053312についての2つの転写物対立遺伝子間の比率。RNA対立遺伝子間の相対量を、対立遺伝子特異的リアルタイム定量RT-PCRによって測定した。正常なCVS(CVS)、正常な満期胎盤(PLN)および21トリソミー胎盤(T21)由来のRNAをアッセイした。閾値サイクル値の差(Ct)によって、前記比率を算出した。

【図5】対立遺伝子特異的リアルタイム定量RT-PCRによって測定した、胎盤組織におけるCOL6A2遺伝子のSNP rs2839114についての2つの転写物対立遺伝子間の比率。正常なCVS(CVS)、正常な満期胎盤(PLN)および21トリソミー胎盤(T21)由来のRNAをアッセイした。(A)閾値サイクル値の差(Ct)または(B)最終PCRサイクルにおいて得られるそれらの蛍光強度の差(Rn)のいずれかによって、前記比率を算出した。

【図6】プライマー伸長続いてマススペクトル分析によって測定した、ヘテロ接合性の正常胎児および21トリソミー胎児の胎盤におけるSNP rs1053320(COL6A1)の対立遺伝子頻度の比率。(A)胎盤DNA。(B)胎盤RNA。

【図7】プライマー伸長続いて質量スペクトル分析によって測定した、ヘテロ接合性の正常胎児および21トリソミー胎児の胎盤におけるSNP rs2839114(COL6A2)の対立遺伝子頻度の比率。(A)胎盤DNA。(B)胎盤RNA。

【図8】正常胎児および21トリソミー胎児を妊娠している妊婦の胎盤におけるPLAC4転写物対立遺伝子比率。対立遺伝子比率は、SNP rs8130833を使用して、プライマー伸長続いて質量スペクトル分析により測定した。

【図9】正常胎児および21トリソミー胎児を妊娠している妊婦の血漿サンプル中のPLAC4転写物対立遺伝子比率。

【図10】胎盤サンプルおよび母体血漿サンプル由来のPLAC4転写物の対立遺伝子比率の相関関係。

【図11】21トリソミー妊娠およびコントロール妊娠における母体血漿PLAC4 mRNA濃度の比較。ボックスは、第25百分位数と第75百分位数との間の間隔をマークする。ヒゲ(whiskers)は、第10百分位数と第90百分位数との間の間隔を意味する。黒丸は、第10百分位数および第90百分位数より外側のデータポイントをマークする。

【図12】正常胎児および18トリソミー胎児を妊娠している妊婦の胎盤におけるSER

10

20

30

40

50

P I N B 2 転写物対立遺伝子比率。対立遺伝子比率は、SNP rs6098を使用して、プライマー伸長続いて質量スペクトル分析により測定した。

【図13】正常胎児および13トリソミー胎児を妊娠している妊婦の胎盤におけるCOL4A2転写物対立遺伝子比率。対立遺伝子比率は、SNP rs7990383を使用して、プライマー伸長続いて質量スペクトル分析により測定した。

【図1】

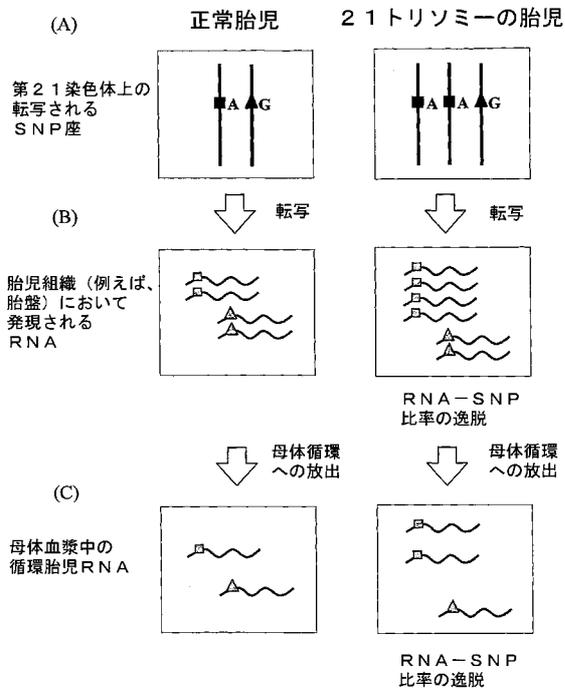


Figure 1

【図2 - 1】

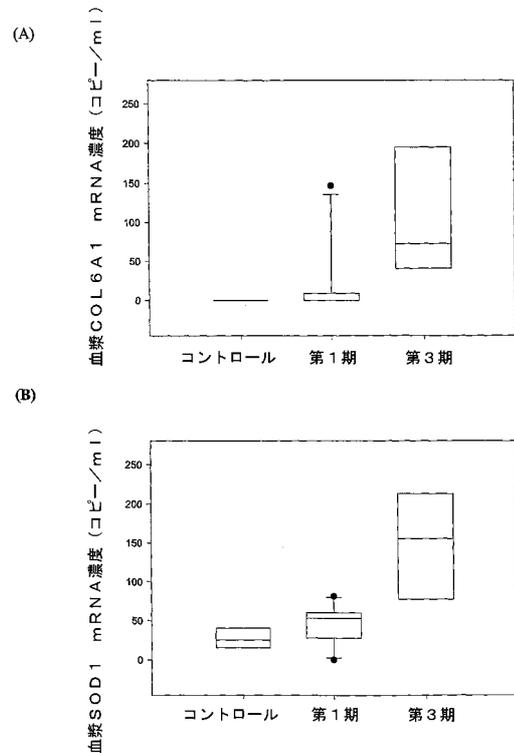


Figure 2 1/2

【 図 2 - 2 】

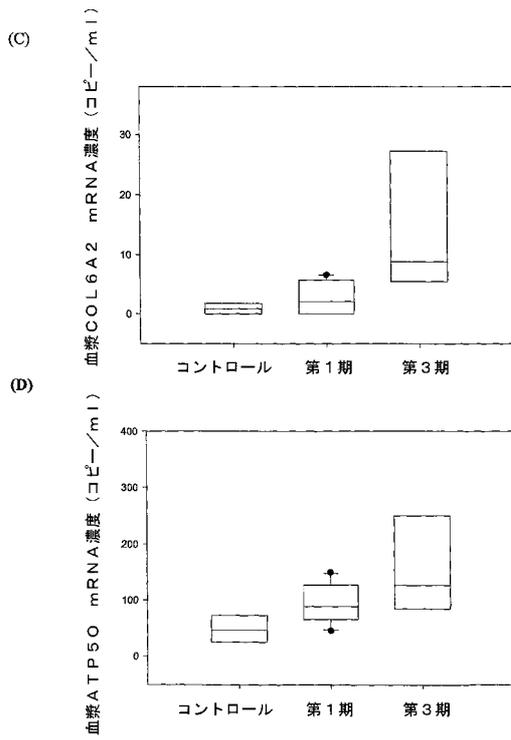


Figure 2 2/2

【 図 3 - 1 】

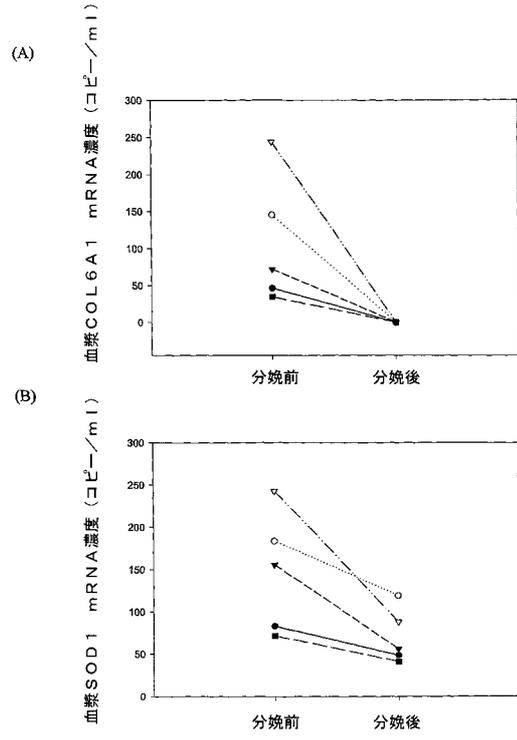


Figure 3 1/2

【 図 3 - 2 】

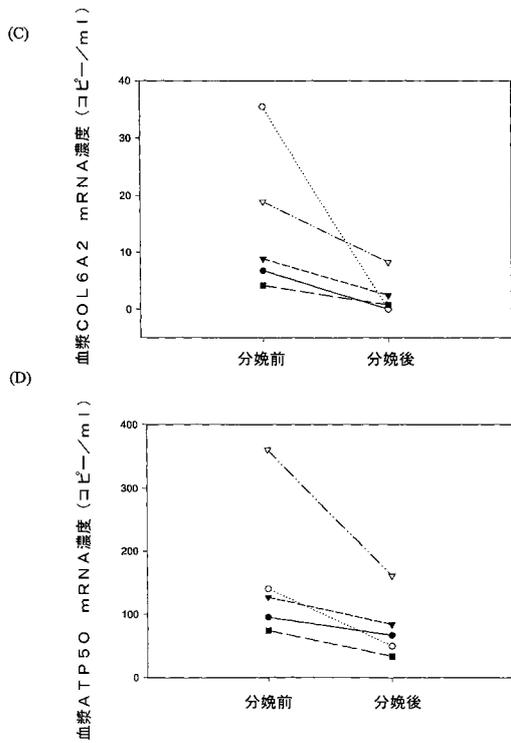


Figure 3 2/2

【 図 4 】

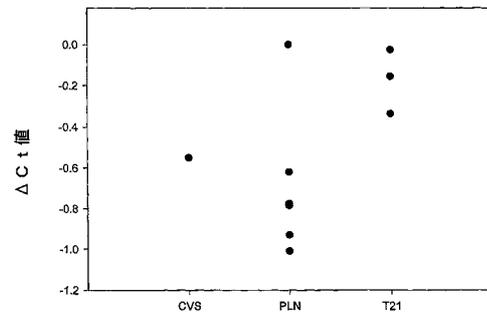


Figure 4

【 図 5 】

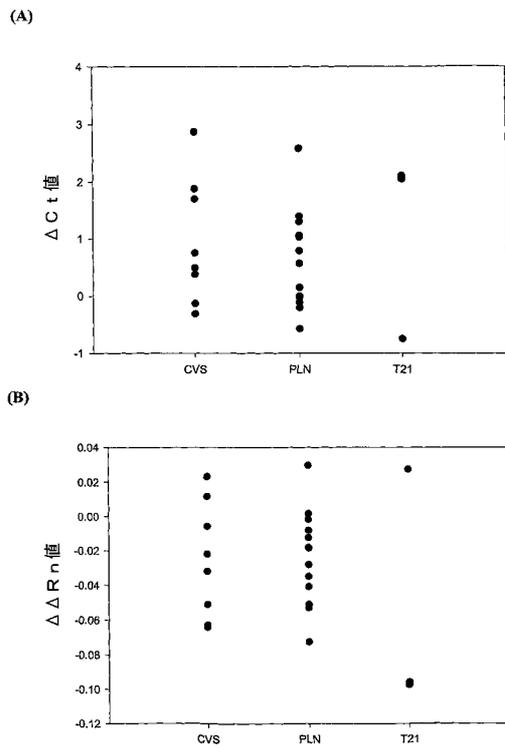


Figure 5

【 図 6 】

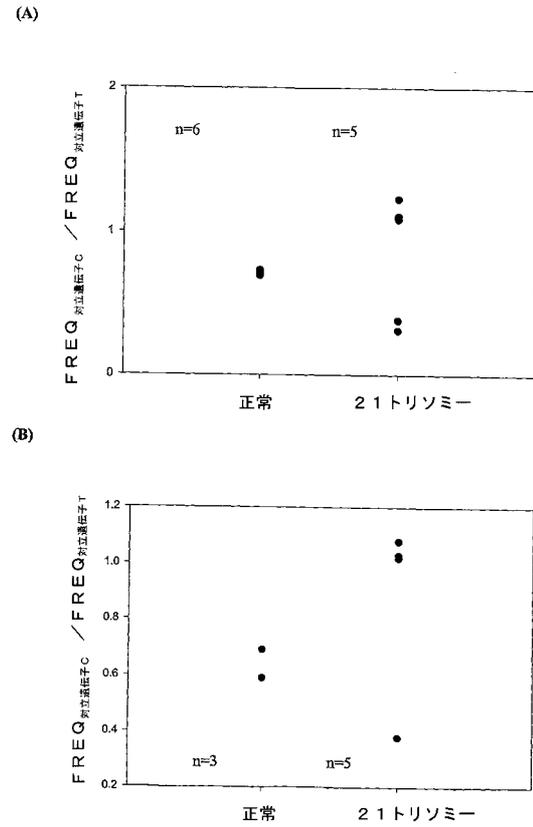


Figure 6

【 図 7 】

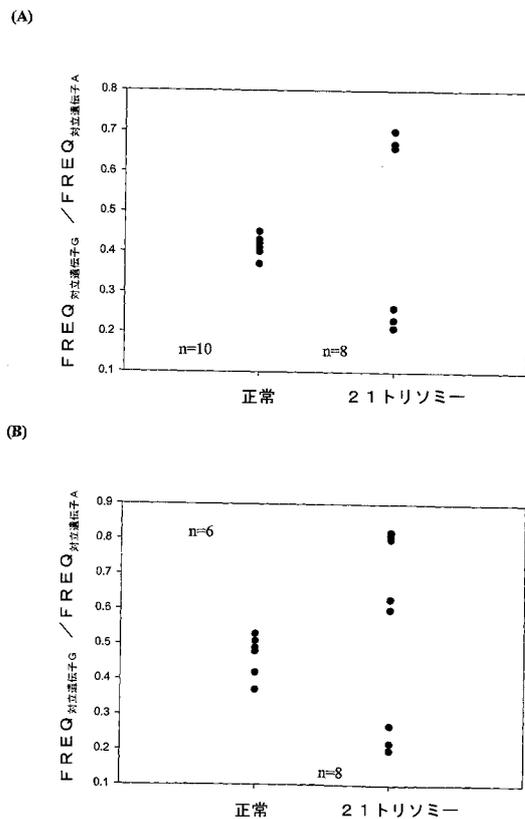


Figure 7

【 図 8 】

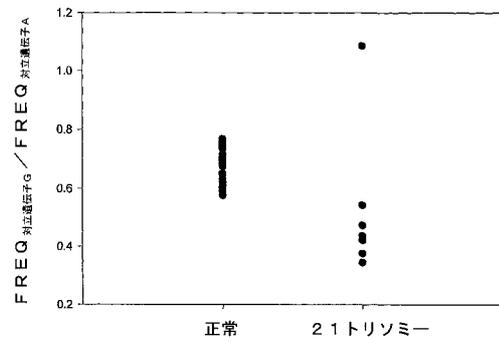


Figure 8

【 図 9 】

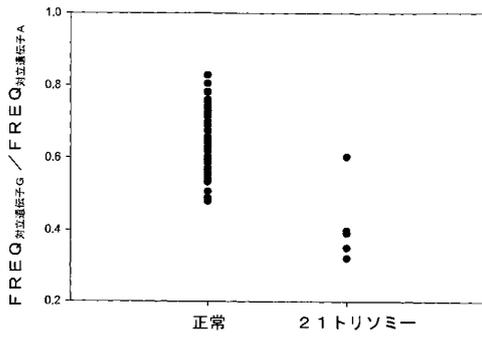


Figure 9

【 図 10 】

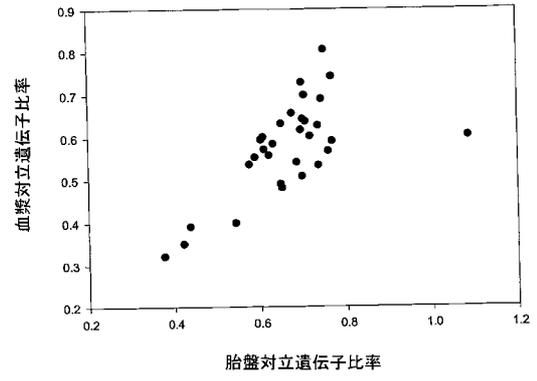


Figure 10

【 図 11 】

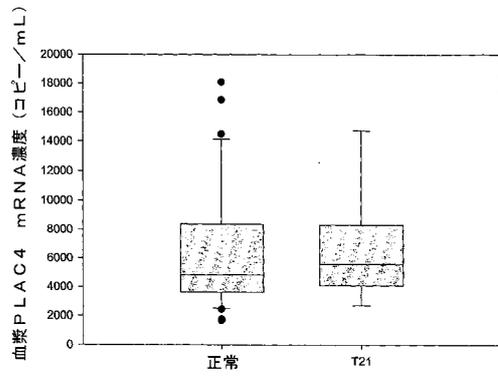


Figure 11

【 図 12 】

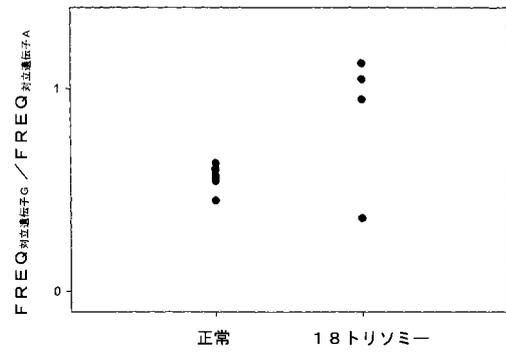


Figure 12

【 図 1 3 】

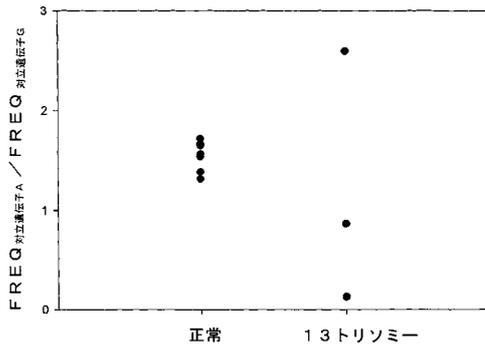


Figure 13

【 配列表 】

2008518639000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成19年5月9日 (2007.5.9)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

妊婦の胎児における染色体異常の存在を検出するための方法であって、以下：

(a) 該妊婦由来の R N A 含有生物学的サンプル中の、問題の少なくとも1つの染色体由来の少なくとも1つの遺伝子座から転写された R N A 由来の対立遺伝子を識別する工程 [ここで、該 R N A 含有生物学的サンプルは胎児 R N A を含有する] ；

(b) 該 R N A 転写物の該対立遺伝子の比率を測定する工程；および

(c) 工程 (b) からの比率と、染色体が正常である胎児を各々妊娠している妊婦から得られた比較可能な生物学的サンプル由来の対立遺伝子の比率を示す標準コントロールとを比較する工程 [ここで、該標準コントロールからの該比率の増加または減少は、染色体異常を有する胎児を有する増加した危険性を示す]

を含む、方法。

【 請求項 2 】

前記染色体異常が、21トリソミー、18トリソミーおよび13トリソミーからなる群から選択されるメンバーである、請求項1に記載の方法。

【 請求項 3 】

前記染色体異常が21トリソミーである、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記染色体異常がX染色体またはY染色体上にある、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

工程(a)における生物学的サンプルが、母体血、母体血漿または血清、羊水、絨毛膜絨毛サンプル、着床前胚由来の生検材料、母体血から単離された胎児有核細胞または胎児細胞レムナント、母体尿、母体唾液、女性生殖管の洗浄物、およびセロセンテシス(celocentesis)によって得られるサンプルからなる群から選択されるメンバーである、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

工程(a)における生物学的サンプルが母体血である、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

工程(a)における生物学的サンプルが、母体血中の細胞エレメントまたは細胞レムナントを含有する、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

工程(a)における胎児RNAが胎盤に由来する、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

工程(a)が逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を使用して行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

工程(a)および/または工程(b)が、プライマー伸長反応、質量分析、少なくとも1つのプローブを使用するハイブリダイゼーション、少なくとも1つの蛍光標識プローブを使用するハイブリダイゼーション、直接配列決定、クローニングおよび配列決定、ならびに電気泳動からなる群から選択されるメンバーを使用して行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

工程(a)、(b)および(c)における対立遺伝子が、配列変異によって区別される、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

前記配列変異が一塩基多型(SNP)、挿入/欠失多型またはシンプルトンデムリピート多型(simple tandem repeat polymorphism)である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記RNAが、第21染色体、第18染色体、第13染色体、X染色体、およびY染色体からなる群から選択されるメンバーから転写される、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

前記RNAが第21染色体から転写される、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記RNAがmRNAである、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

前記RNAが、コラーゲンVIアルファ1(collagen VI alpha 1)(COL6A1)、スーパーオキシドジスムターゼ1(superoxide dismutase 1)(SOD1)、コラーゲンVIアルファ2(collagen VI alpha 2)(COL6A2)、ミトコンドリアATPシンターゼOサブユニット(mitochondrial ATP synthase O subunit)(ATP5O)、BTGFファミリー、メンバー3(BTG family, member 3)(BTG3)、ディスインテグリン-ライク・アンド・メタロプロテアーゼ(レプロリシントタイプ)・ウィズ・トロンボスポンジントタイプ1モチーフ, 1(a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1)(ADAMTS1)、ベータ位APP切断酵素2(beta-site APP-cleaving enzyme 2)(BACE2)、インターセクチン1(intersectin 1)(ITSN1)、アミロイドベータ(A4)前駆体蛋白質(amyloid beta (A4) precursor protein)(APP)、ATPシンターゼ、H⁺輸送、ミトコンドリア

F0複合体, サブユニットF6 (ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F6) (A T P 5 J)、ダウン症候群重要領域遺伝子5 (Down syndrome critical region gene 5) (D S C R 5)、胎盤特異的4 (placenta-specific 4) (P L A C 4)、仮想蛋白質BC005107 (hypothetical protein BC005107) (L O C 9 0 6 2 5)、リボソーム蛋白質L17 (ribosomal protein L17) (R P L 1 7)、セルピンペプチダーゼインヒビタークレードB (オボアルブミン)メンバー2 (serpin peptidase inhibitor clade B (ovalbumin) member 2) (S E R P I N B 2)およびコラーゲンIV型アルファ2 (collagen type IV alpha 2) (C O L 4 A 2)からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子座から転写される、請求項1に記載の方法。

【請求項17】

前記RNAが、前記遺伝子座の少なくとも1つの一塩基多型を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記RNAが、コラーゲンVIアルファ1 (COL6A1)およびコラーゲンVIアルファ2 (COL6A2)からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子座から転写される、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

COL6A1の遺伝子座から転写されるRNAにおけるSNPが、^Ar g 8 5 0 ^Hi s または^Se r 9 3 2 ^Se rである、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

COL6A2の遺伝子座から転写されるRNAにおけるSNPが、^Va l 7 2 8 ^Va lである、請求項18に記載の方法。

【請求項21】

前記RNAが、胎盤特異的4 (PLAC4)についての遺伝子座から転写される、請求項16に記載の方法。

【請求項22】

前記RNAが、AF269287、AK027868、AK092431、BC093685、BC101615、BC101617、L13197、NM__182832およびLOC191585等の、PLAC4遺伝子の任意の変異体から転写される、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記PLAC4遺伝子の遺伝子座から転写されるRNAが、rs3804026、rs4818219、rs7844、rs9015、rs13643、rs9305729、rs9305730、rs5019195、rs5019194、rs5844069、rs1049904、rs16998089、rs12482116、rs11909439、rs7278659、rs12106409、rs12106395、rs12106401、rs12106434、rs2183584、rs3949725、rs8130833、rs10222145、rs9981478、rs8130833、rs9977003、PLAC4-41471145およびPLAC4-41476236からなる群から選択される一塩基多型または挿入-欠失多型を含む、請求項21に記載の方法。

【請求項24】

前記妊婦が妊娠の第1期、第2期または第3期の間にある、請求項1に記載の方法。

【請求項25】

工程(b)における比率が前記標準コントロールから1、2または3標準偏差より高いかまたはより低い場合、工程(c)における比較が、染色体異常を有する胎児の増加した危険性を示す、請求項1に記載の方法。

【請求項26】

妊婦における染色体異常を有する胎児の存在を検出するためのキットであって、該キットが、以下:

(a) 問題の領域を増幅するためのプライマー ; および

(b) 染色体が正常である胎児を各々妊娠している妊婦から得られた比較可能な生物学的サンプル由来の対立遺伝子の比率を示す標準コントロールを備える、キット。

【請求項 27】

さらに、以下 :

(c) 各 RNA 種の異なる対立遺伝子を識別するためのハイブリダイゼーションプロンプを備える、請求項 26 に記載のキット。

【 国際調査報告 】

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 06PCT0110	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/CN2006/000412	International filing date (<i>day/month/year</i>) 17. Mar 2006(17.03.2006)	(Earliest)Priority date (<i>day/month/year</i>) 18. Mar 2005(18.03.2005)
Applicant THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

the international application in the language in which it was filed

a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. With regard to any **nucleotide and /or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. Certain claims were found unsearchable (see Box No. II)

3. Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

the text is approved as submitted by the applicant

the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

the text is approved as submitted by the applicant

the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

a. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

as suggested by the applicant

as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/000412

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- on paper
 - in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- contained in the international application as filed
 - filed together with the international application in electronic form
 - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2006/000412

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See extra sheet		
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)		
IPC8:C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Chinese Patents, Chinese Scientific and Technical Journals		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI EPODOC PAJ MEDLINE BA aneuploidy trisomy trisomic Down syndrome allele COL SOD ATP BTG ADAMTS BACE IITSN APP DSCR PLAC RPL SERPINB		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US2004203037 A1(UYCH-N) 14. Oct. 2004(14.10.2004) see whole document	1-32
A	KROISEL P ET AL.: Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies by quantitative fluorescent PCR on fetal samples from mother at high risk for chromosomal disorders. European Journal of Human Genetics, Vol.8, No.suppl, Jun.2000(2000-06), pp 98 See whole document	1-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"B" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"I" 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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&"document member of the same patent family</p>	
Date of the actual completion of the international search 15. Jun 2006(15.06.2006)		Date of mailing of the international search report 29 JUN 2006 (29 06 2006)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimeu Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer WU, Xizhe Telephone No. 86-10-62085094

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2006/000412

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FINDLAY I ET AL: Rapid trisomy diagnosis(21,18 and 13) using flourescent PCR and short tandem repeats:applications for prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, Vol.15, No.5, May 1998(1998-05), pp266-75 See whole document	1-32
A	TOTH T ET AL: Flourescent polymerase chain reaction for rapid detection of common aneuploidies Clinical Chemistry, Jun.1998(1998-06),page A34 See whole document	1-32
A	AU 2004202841 A1(PARK-N) 13. Jan. 2005(13.01.2005) see whole document	1-32
A	US2004197930 A1(GRAV-I) 07.Oct. 2004(07.10.2004) see whole document	1-32
A	US 2002137088 A1(CHIL-N) 26. Sep 2002(26.09.2002) see whole document	1-32
A	EP 1364062 A2(CYTO N ET AL) 26. Nov. 2003(26.11.2003) see whole document	1-32
A	US 5994057(PEKB ET AL) 30. Nov.1999(30.11.1999) see whole document	1-32
		1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2006/000412

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US2004203037 A	2004-10-14	WO 2004065629 A1	2004-08-05
		US 2004203037 A1	2004-10-14
US2004197930 A	2004-10-07	WO 2004088324 A2	2004-10-14
		US 2004197930 A1	2004-10-07
EP 1364062 A2	2003-11-26	JP 2004528027 T	2004-09-16
		WO 02068685 A2	2002-09-06
		AU 2002237389 A1	2002-09-12
US 5994057 A	1999-11-30	WO 9403638 A1	1994-02-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/000412

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01)i

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100065215

弁理士 三枝 英二

(74)代理人 100076510

弁理士 掛樋 悠路

(74)代理人 100099988

弁理士 斎藤 健治

(72)発明者 ロ ユク - ミン デニス

中華人民共和国 香港 カオルーン ホマンティン キング タック ストリート 7 フォース
フロア

(72)発明者 チウ ロッサ ウェイ クウン

中華人民共和国 香港 タイ ポ ハング ラム ドライブ 1 コンステレーション コウブ
ブロック 1 フラット 1エー

(72)発明者 ツァイ ポ イン

中華人民共和国 香港 カオルーン ローワー ヌガウ タウ コック エステート ブロック
10 ルーム 1501

(72)発明者 ディング チュンミン

中華人民共和国 香港 シャティン ザ チャイニーズ ユニバーシティー オブ ホンコン ユ
ニバーシティー レジデンス ナンバー11 フラット 6ビー

(72)発明者 カンター チャールズ

アメリカ合衆国 92014 カリフォルニア デル マール ストラトフォード コート 52
6

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 CA12 HA12

4B063 QA17 QA19 QQ08 QQ12 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR55 QR62

QS25 QS32

专利名称(译)	检测染色体非整倍性的方法		
公开(公告)号	JP2008518639A	公开(公告)日	2008-06-05
申请号	JP2007540479	申请日	2006-03-17
[标]申请(专利权)人(译)	香港中文大学		
申请(专利权)人(译)	香港大学中国 波士顿大学		
[标]发明人	ロユクミンデニス チウロツサウエイクウン ツアイポイン ディングチュンミン カンターチャールズ		
发明人	ロユク-ミン デニス チウ ロツサ ウエイ クウン ツアイ ポ イン ディング チュンミン カンター チャールズ		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6881 C12Q1/6851 C12Q1/6883 C12Q2600/156 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA12 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ12 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32		
代理人(译)	斋藤健治		
优先权	60/663173 2005-03-18 US		
其他公开文献	JP5219516B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

证明胎儿染色与非整倍性的非侵入性检测。检测和定量存在于含有胎儿RNA的生物样品(例如,母体血液)中的胎儿RNA-SNP的等位基因,并测量等位基因的比例。将该比率与由整倍体倍性胎儿组成的标准对照进行比较。等位基因比率的偏差表明存在染色体非整倍性。

以下提供用于检测染色体非整倍性的引物序列列表的示例。

転写物	配列 (5' から3')	
	フォワードプライマー	リバースプライマー
COL6A1	GGCTGACATCACCCTCTG TTGGAAAAGCCAGGACACAAC	AGAGCAGCAGCCTCTTCTTG TGAGGATTGGTGGGAAAAAC
SOD1	TTTCCACTCCCAAGTCTGG TTGCAACACCAAGAAAAAGC	CGACAGAGCAAGACCCTTTC TCTGGCAAAATACAGGTCATTG
COL6A2	TCATCAAGTGGTCAACAGG GTGGACATCGTCTTCTGCT	TCACTCTCGTCTTCTCGTG GTGGATGGCAGTGAGGTTGT
ATP50	AACGACAGTCTGCACGAGTC	CAGGTAGGTCAGGACCTTG
	GGCCTGAGATTCTTCACTGC	AAAATTAGCGGGACATGGTG