

(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2015-528286

(P2015-528286A)

(43) 公表日 平成27年9月28日(2015.9.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 ZNAA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B063
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 M	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2015-528827 (P2015-528827)	(71) 出願人	515050312 日祥医事管理▲願▼▲問▼股▲ふん▼有限 公司 I S T A T B I O M E D I C A L C O . , L T D . 台湾新北市汐止区新台五路一段96号18 楼 18F. , No. 96, Sec. 1, Xi ntai 5th Rd. , Xizhi Dist. 22102 New Taip ei City, Taiwan
(86) (22) 出願日	平成24年8月28日 (2012. 8. 28)	(74) 代理人	100169904 弁理士 村井 康司
(85) 翻訳文提出日	平成27年3月23日 (2015. 3. 23)	(74) 代理人	100142882 弁理士 台路 裕介
(86) 国際出願番号	PCT/CN2012/080655		
(87) 国際公開番号	W02014/032227		
(87) 国際公開日	平成26年3月6日 (2014. 3. 6)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌スクリーニングの検証キット

(57) 【要約】

本発明は癌の生物分子マーカーとスクリーニングの検証キットに関し、検体の標的遺伝子のメチル化領域を利用・分析して、標的遺伝子に対する特異性を備える数区間のオリゴヌクレオチドプライマー又はプローブを設計し、当該オリゴヌクレオチドプローブを利用して標的遺伝子のメチル化の有無を測定し、更に癌発生の可能性を判断する。メチル化状態の鑑定方法は、メチル化特異的PCR法(methylation-specific PCR、MSP)、定量メチル化特異的PCR法(quantitative methylation-specific PCR、QMSP)、バイサルファイトシーケンシング法(bisulfite sequencing、BS)、マイクロアレイ(microarrays)、質量分析計分析(mass spectrometer)、

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

測定用検体にある遺伝子 C p G 配列のメチル化が存在することの測定に用いられ、まず検体によりその g D N A を抽出し、この g D N A が適切な前処理と化学反応とを経ることで、直ちに本検査キットが D N A メチル化の存在についてテストが行えることであり、

本検査キットが、

(1) それが少なくとも 1 つのフォワードプライマーと 1 つのリバースプライマーを含み、当該フォワードプライマー、リバースプライマーの配列が S E Q I D N o : 1 - 7 0 に示すヌクレオチド配列の少なくとも 8 0 % の配列に同一性がある又は少なくとも 1 0 個の連続したヌクレオチドが同じ配列の 1 種又は複数種から選ばれる、濃度範囲が 2 0 n M - 1 2 5 0 n M の標的遺伝子混合プライマー、

(2) それが少なくとも 1 つのフォワードプライマーと 1 つのリバースプライマーを含む、濃度範囲が 2 0 n M - 1 2 5 0 n M の内部抑制遺伝子核酸分子検出用混合液、

(3) その主たる成分が少なくともポリメラーゼ、d N T P s 及び硫酸マグネシウムを含む、ポリメラーゼ連鎖反応の主たる混合液を含むことを特徴とする 1 種の検査キット。

【請求項 2】

(1) 当該標的遺伝子混合プライマーが更にプローブを含み、そのプローブ配列が S E Q I D N o : 1 - 7 0 に示すヌクレオチド配列の少なくとも 8 0 % の配列に同一性がある又は少なくとも 1 0 個の連続したヌクレオチドが同じ配列の 1 種又は複数種又はその相補的配列から選ばれ、

(2) 当該内部抑制遺伝子核酸分子検出用混合液が更に、内部抑制遺伝子増幅産物が検出できるプローブを含む請求項 1 に記載の検査キット。

【請求項 3】

当該内部抑制遺伝子核酸分子検出用混合液が、そのうちフォワードプライマー、リバースプライマーが含む配列 S E Q I D N o : 7 1 - 8 0 に示すヌクレオチド配列の少なくとも 8 0 % の配列に同一性がある又は少なくとも 1 0 個の連続したヌクレオチドが同じ配列の 1 種又は複数種から選ばれる請求項 1 に記載の検査キット。

【請求項 4】

当該内部抑制遺伝子核酸分子検出用混合液が、更にプローブを含み、そのうち内部抑制遺伝子のフォワードプライマー、リバースプライマーが含む配列が S E Q I D N o : 7 1 - 8 0 に示すヌクレオチド配列の少なくとも 8 0 % の配列に同一性がある又は少なくとも 1 0 個の連続したヌクレオチドが同じ配列の 1 種の又は複数種から選ばれ、プローブ配列が S E Q I D N o : 7 1 - 8 0 に示すヌクレオチド配列の少なくとも 8 0 % の配列に同一性がある又は少なくとも 1 0 個の連続したヌクレオチドが同じ配列の 1 種又は複数種又は相補的配列から選ばれる請求項 2 に記載の検査キット。

【請求項 5】

標的遺伝子のフォワードプライマーとリバースプライマーの配列が S E Q I D N o : 1 - 7 0 に示すヌクレオチド配列の 1 種又は複数種から選ばれる請求項 1 に記載の検査キット。

【請求項 6】

フォワードプライマーとリバースプライマーの配列が S E Q I D N o : 1 - 7 0 に示すヌクレオチド配列の 1 種又は複数種から選ばれ、記載の標的遺伝子プローブ配列が S E Q I D N o : 7 1 - 8 0 に示すヌクレオチド配列の 1 種又は複数種又は相補的配列から選ばれる請求項 2 に記載の標的遺伝子。

【請求項 7】

フォワードプライマー、リバースプライマーが含む配列が S E Q I D N o : 7 1 - 8 0 に示すヌクレオチド配列の 1 種又は複数種から選ばれ、プローブ配列が S E Q I D N o : 7 1 - 8 0 に示すヌクレオチド配列の 1 種又は複数種又は相補的配列から選ばれる請求項 4 に記載の内部統制群遺伝子。

【請求項 8】

10

20

30

40

50

ポリメラーゼ連鎖反応の主たる混合液が、更に、連鎖反応産物が識別できる蛍光物質を含む又は / 及び DNA 二重作用と蛍光を生じ更に検出されることが出来る物質から選ばれる請求項 1 に記載の検査キット。

【請求項 9】

標的遺伝子と内部統制群遺伝子のプローブが蛍光色素標識を備え、この蛍光色素標識が次のいずれかの蛍光：FAM、HEX、TET、TAMRA、Cy3、Cy5、Cy5.5、VIC、Red610、Yellow555、TexasRed、YakimaYellow、BHQ-1、BHQ-2及びBHQ-3により構成される群から選ばれる請求項 2 に記載の検査キット。

【請求項 10】

更に正常でない細胞増殖現象の測定に用いられる請求項 1 に記載の検査キット。

10

【請求項 11】

正常でない細胞増殖の測定が前癌病変の測定、腫瘍の測定、腫瘍再発の測定又は腫瘍用薬予測又は予後効果の測定を含む請求項 10 に記載の検査キット。

【請求項 12】

下記の群のうちの 1 つ：子宮頸癌、口腔癌、頭頸部癌、食道癌、大腸癌、肝癌、卵巣癌、乳癌、舌癌、肺癌、肺腺癌及び皮膚癌である請求項 11 に記載の腫瘍。

【請求項 13】

更に不正常的な細胞増殖現象の測定に使用される請求項 2 に記載の検査キット。

【請求項 14】

正常でない細胞増殖の測定が前癌病変の測定、腫瘍の測定、腫瘍再発の測定又は腫瘍用薬予測又は予後効果の測定を含む請求項 13 に記載の検査キット。

20

【請求項 15】

下記の群のうちの 1 つ：子宮頸癌、口腔癌、頭頸部癌、食道癌、大腸癌、肝癌、卵巣癌、乳癌、舌癌、肺癌、肺腺癌及び皮膚癌である請求項 14 に記載の腫瘍。

【請求項 16】

標的遺伝子と内部抑制遺伝子のプライマーが混和してシングルチューブ核酸分子検出用混合液となり得る請求項 1 に記載の検査キット。

【請求項 17】

標的遺伝子及び内部抑制遺伝子のプライマーとプローブが混和してシングルチューブ核酸分子検出用混合液となり得る請求項 2 に記載の検査キット。

30

【請求項 18】

当該測定用検体にある標的遺伝子が次の少なくとも 1 種の又は 1 種以上の遺伝子：PAX1、ZNF582、SOX1及びNKX6-1により構成される群から選ばれる請求項 1 又は 2 に記載の検査キット。

【請求項 19】

当該測定用検体にある内部抑制遺伝子が次の少なくとも 1 種の又は 1 種以上の遺伝子：COL2A、 α -Globin、GAPDH及び β -actinにより構成される群から選ばれる請求項 1 又は 2 に記載の検査キット。

【請求項 20】

連鎖増幅産物の鑑定方法が蛍光光度法、シーケンシング (sequencing)、マイクロアレイ (microarrays)、質量分析計分析 (mass spectrometry)、変性高速液体クロマトグラフィー (denaturing high-performance liquid chromatography、DHPLC)、パイロシーケンス (pyrosequencing) 又は免疫学的検定 (immunoassay) である請求項 1 又は 2 に記載の検査キット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は癌の生物分子マーカーとスクリーニングの検証キットに関し、検体の標的遺伝子のメチル化領域を利用・分析して、標的遺伝子に対する特異性を備える数区間のオリゴヌクレオチドプライマー又はプローブを設計し、当該特異性を備えるオリゴヌクレオチドを利用して標的遺伝子のメチル化の有無を測定することで、癌発生の可能性を判断することに関する。

【背景技術】

【0002】

WHOが2008年に行った調査結果からは、癌は現在世界で十大死因のうちの1つであり、更にそのうち男性は肺癌、肝癌、胃癌、大腸癌、口腔癌での死亡率が比較的高く、女性は乳癌、肺癌、子宮頸癌、大腸癌での死亡率が比較的高いことが分かる。そのため、各国の研究者は初期の予防的な測定又は癌発病の予後測定ができる方法について常に積極的に研究を行っており、なおかつ大半の早期癌が早めにスクリーニングで発見できれば、全て治癒率が大幅に高まる。例えば、X線、スミア、腫瘍マーカー、超音波などの、癌の有無を調べる従来型の検査では、癌スクリーニングでの発見率は約0.2~0.3%である。これに消化器の内視鏡検査を加えれば、スクリーニングでの発見率は約0.5%高まる。しかし、上記のデータは、これらの一般的な検診で有効に癌の早期診断ができるとの説得力としては未だ不十分である。しかし、これらの検査と判読は往々にして時間と手間がかかり、利便性に欠け、なおかつスクリーニングでの発見率は今でも低迷している。

10

【0003】

現在、科学界では異常なエピジェネティクス(epigenetic)修飾が、遺伝子表現の変更と腫瘍の形成への誘導に極めて重要な作用(Ting et al., 2006)を発揮し、DNAメチル化修飾がそのうちの1種であると一般的に認識されている。表現型(phenotype)に影響を与える情報は、恐らく修飾済の塩基5-メチルシトシン(5-methylcytosine)に保存される。5-メチルシトシンは、哺乳類動物の細胞内のパリンδροーム配列5'-CpG-3'に存在することが発見されている。哺乳類動物の細胞内では、「CpGアイランド」(CpG islands, CGIs)と呼ばれるいくつかの領域を除き、大半のCpGジヌクレオチドがメチル化されている。CpGアイランドは大体1000個の塩基対(1Kb)の領域内に大量のGC-とCpG-を含有していることを指し、通常は遺伝子の付近に位置し、広範囲で表現する遺伝子のプロモーター付近にある。シトシンのメチル化はDNA合成後に発生し、メチル基供与体S-アデノシルメチオニン(S-adenosylmethionine, SAM)から、メチル基を酵素により5-メチルシトシンの位置まで転移させる。当該酵素反応はDNAメチルトランスフェラーゼ(DNA methyltransferase, DNMTs)により実行される。DNMT1は哺乳類動物の主たるメチルトランスフェラーゼであり、半メチル化位置を複製後修復(post-replicative restoration)して行う全メチル化を受けもち、維持メチル化(maintenance methylation)と呼ばれる。反対に、DNMT3AとDNMT3Bは主にメチル化の新しい位置に対して、1種のde novoメチル化(de novo methylation)と呼ばれる手順を受けもつと考えられる。

20

30

【0004】

CpGジヌクレオチドのメチル化の消失(loss of methylation)は、一般的な低メチル化を意味し、癌細胞内の最初のエピジェネティクス異常(epigenetic abnormality)である。しかし、最近数年間の研究では、特定位置(例えば:いくつかの癌抑制遺伝子)の高メチル化(site-specific hypermethylation)がその機能の喪失と関係があり、これが恐らく癌形成時に選択優位性(selective advantages)をもたらすことが示された。プロモーター領域でのCpGアイランドの高メチル化は、ヒストン修飾(histone modification)を通じてそれに続く遺伝子サイレンシング現象(gene silencing)を伴うことで、クロマチン再構成(chromatin remodeling)を引き起こす。染色体の欠失と遺伝子突然変異を除き、プロモ-

40

50

ターの高メチル化により癌抑制遺伝子のエピジェネティックサイレンシング現象 (epigenetic silencing) が生じ、これは人類の癌でもよく見られる (Estelle et al., 1999; Herman et al., 2003)。

【0005】

最近では疫学の研究により、血清葉酸 (serum folate) の濃度 (1種のメチル基の主たる供給源) がHPVの感染と除去に関連性があることが示されている。メチルサイクル (methyl cycle) の代謝作用では、酵素の遺伝的多型 (genetic polymorphisms) もかつては子宮頸上皮内の病変の進行と関係があると報道されていた。超遺伝子進化の概念と同様に、DNAメチル化の子宮頸癌との関連性の研究も盛んである。子宮頸癌のDNAメチル化の研究も一日一日と活況を呈し、これがメチル化を子宮頸癌スクリーニングとして使う可能性を示している。遺伝と環境による相互作用の特性があるため、癌抑制遺伝子のメチル化程度は遺伝子と群によって異なり、疾病の種類が違ってもメチル化表現型 (methylator phenotype) が異なってくる。しかし、子宮頸癌のメチル化表現型及びそれとHPV遺伝子型との関連性は未知のままであり、子宮頸癌のうちどの特定の遺伝子がメチル化されるのか、及び遺伝子がいくつあれば臨床応用の需要を満たせるのかという、これらの問題は依然として将来確認が必要となる課題となっている。

10

【0006】

国防医学院の頼鴻政博士がかつて台湾 (TW Pat. Pub. No. 200831900、TW Pat. Pub. No. 201038739)、中国 (CN Appl. No. 200810094659.2、CN Appl. No. 200910135501.X)、マレーシア (UI20085354) 及びアメリカ (US Pat. Pub. No. 20080311570、US Pat. Pub. No. 20110045465) のそれらの属する技術分野で、特許の出願 (以下、「先行技術文献」という) を含む、関連する発明とその異なる技術手段と方法を説明した。DNAメチル化測定は学問理論発展の歴史が浅くなく、また学術研究者にも幅広く使用されている。しかし医療検査などの臨床関連分野への応用を望むのであれば、テストが安定で再現性を備えることが非常に重要となる。メチル化遺伝子測定は現在医療検査での応用はまだ普及していない。その理由の一部が、大量の研究により標的遺伝子の臨床面での意義と関連する検証を補助する必要があるほか、安定したテスト方法をどのように行うかもかなりの技術的障害となっている。

20

30

【0007】

本発明の発明者は先行技術文献の不備と欠陥を深く理解し、改良と革新を行い、長年の苦心の中で研究に身を捧げ、最後に本発明の複数種の癌スクリーニングに適用可能な方法とその検証キットの研究開発を成し遂げた。それにより、例えば標的遺伝子に関連する配列と濃度範囲の定義づけのように、関連する標的遺伝子のメチル化測定が産業上の利用可能性を備え、加えて癌応用分野でも更に多くの情報を提供することで検証を支える力となっている。それにより標的遺伝子測定で繰り返し性のある結果が得られ、医療分野に応用できるようになった。本設計である癌スクリーニングキットは更に精密な検査が行え、試薬キットの形式で更に速く、便利でかつ効率的なレベルに達する設計を行い、検査面での完全な製品を提供する。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、検査キットを提供することにある。それは測定用検体にある標的遺伝子 CpG 配列のメチル化が存在することの測定に使うものである。つまり、まず検体からその gDNA を抽出し、この gDNA が適切な前処理と化学反応を経ることで、直ちにこの検査キットを使って標的遺伝子のメチル化が存在することのテストが行える。

【課題を解決するための手段】

50

【0009】

本検査キットは次のものを含む。

(1) 濃度範囲が20 nM - 1250 nMの標的遺伝子混合プライマー。それは少なくとも1つのフォワードプライマーと1つのリバースプライマーを含み、当該フォワードプライマー、リバースプライマーの配列はSEQ ID No: 1 - 70に示すヌクレオチド配列の少なくとも80%の配列に同一性がある又は少なくとも10個の連続したヌクレオチドが同じである配列の1種又は複数種から選ばれ、最適なものは配列が全く同じである。

(2) 濃度範囲が20 nM - 1250 nMの内部抑制遺伝子核酸分子検出用混合液。それは少なくとも1つのフォワードプライマーと1つのリバースプライマーを含む。

(3) ポリメラーゼ連鎖反応の主たる混合液。その主たる成分は少なくともポリメラーゼ、dNTPs及び硫酸マグネシウムを含む。

【0010】

上記発明の目的が達成できる検証キットについて、当該内部抑制遺伝子核酸分子検出用混合液は、そのうちフォワードプライマー、リバースプライマーが含む配列がSEQ ID No: 71 - 80に示すヌクレオチド配列の少なくとも80%の配列に同一性がある又は少なくとも10個の連続したヌクレオチドが同じである配列の1種の又は複数種からも選ばれ、最適なものは配列が全く同じである。そのうち標的遺伝子と内部抑制遺伝子のプライマーは混和してシングルチューブ核酸分子検出用混合液とすることができる。

【0011】

上記発明の目的が達成できる検証キットについて、当該標的遺伝子混合プライマーは、更に、プローブを含む。そのプローブ配列はSEQ ID No: 1 - 70に示すヌクレオチド配列の少なくとも80%の配列に同一性がある又は少なくとも10個の連続したヌクレオチドが同じである配列の1種又は複数種又はその相補的配列から選ばれ、最適なものは配列が全く同じである。

当該内部抑制遺伝子核酸分子検出用混合液は、更に、内部抑制遺伝子増幅産物が検出できるプローブを含む。本発明を通じて更に、そのうち内部抑制遺伝子のフォワードプライマー、リバースプライマーが含む配列は、SEQ ID No: 71 - 80に示すヌクレオチド配列の少なくとも80%の配列に同一性がある又は少なくとも10個の連続したヌクレオチドが同じである配列の1種又は複数種から選ばれ、最適なものは配列が全く同じであり、プローブ配列はSEQ ID No: 71 - 80に示すヌクレオチド配列の少なくとも80%の配列に同一性がある又は少なくとも10個の連続したヌクレオチドが同じである配列の1種又は複数種又は相補的配列から選ばれ、最適なものは配列が全く同じである。

そのうち標的遺伝子と内部抑制遺伝子のプライマーは混和してシングルチューブ核酸分子検出用混合液とすることができる。

【0012】

上記発明の目的が達成できる検証キットについて、そのポリメラーゼ連鎖反応の主たる混合液は、更に、連鎖反応産物が識別できる蛍光物質を含み又は/及びDNA二重作用と蛍光を生じ、更に検出されることができる物質から選ばれる。この物質はSYBER Green、Syber GoldなどのSYBR検出系物質を含む。

【0013】

上記発明の目的が達成できる検証キットについて、そのうち当該測定用検体にある内部抑制遺伝子は、次の少なくとも1種の又は1種以上の遺伝子: Col2A、 - Globin、GAPDH (glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase)、 - actinにより構成される群から選ばれる。

【0014】

上記発明の目的が達成できる検証キットについて、その標的遺伝子と内部統制群遺伝子のプローブが蛍光色素標識を備える。この蛍光色素標識は次のいずれかの蛍光: FAM、HEX、TET、TAMRA、Cy3、Cy5、Cy5.5、VIC、Red610、Y

10

20

30

40

50

ellow 555、Texas Red、Yakima Yellow、BHQ-1、BHQ-2及びBHQ-3により構成される群から選ばれる。

【0015】

上記発明の目的が達成できる検証キットについて、そのうち当該測定用検体にある遺伝子は、次の少なくとも1種の又は1種以上の遺伝子：PAX1、ZNF582、SOX1及びNKX6-1により構成される群から選ばれる。

【0016】

上記発明の目的が達成できる1種の検証キットについて、それは、更に正常でない細胞増殖現象の測定に使用することができる。そのうち正常でない細胞増殖は前癌病変の測定、腫瘍の測定、腫瘍再発の測定又は腫瘍用薬予測又は予後効果の測定を含む。そのうち当該悪性腫瘍は下記の群のうちの1つである：子宮頸癌、口腔癌、頭頸部癌、食道癌、大腸癌、肝癌、卵巣癌、乳癌、舌癌、肺腺癌及び皮膚癌。

10

【0017】

上記発明の目的が達成できる検証キットについて、そのうち連鎖増幅産物の鑑定方法は、蛍光光度法、シーケンシング(sequencing)、マイクロアレイ(microarrays)、質量分析計分析(mass spectrometer)、変性高速液体クロマトグラフィー(denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC)、パイロシーケンス(pyrosequencing)又は免疫学的検定(immunoassay)などが利用できる。

20

【0018】

「測定用検体」とは、in vitroの測定サンプルを指す。当該サンプルは子宮頸部スメア、腹水、血液、尿、糞便、痰、口腔粘膜細胞、胃液、胆汁、子宮頸上皮細胞又は手術後の癌組織などのin vitroの検体サンプルを含む。本発明の癌スクリーニング方法を、これらのin vitroサンプルにある標的遺伝子のメチル化状態の測定に用いることにより、各種癌のスクリーニング指標とする。本発明が提供する癌スクリーニング方法とそのスクリーニング指標は、測定研究従事者に実験室での測定用として供することができる。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明の目的は、検査キットを提供することにある。それは測定用検体にある標的遺伝子CpG配列のメチル化が存在することの測定に用いるものである。つまり、まず検体からそのgDNAを抽出し、このgDNAが適切な前処理と化学反応を経ることにより、直ちに本検査キットを使ってDNAメチル化が存在することのテストが行えることである。

30

【0020】

本検査キットは次のものを含む。

(1) 濃度範囲が20 nM - 1250 nMの標的遺伝子混合プライマー。それは少なくとも1つのフォワードプライマーと1つのリバースプライマーを含み、当該フォワードプライマー、リバースプライマーの配列はSEQ ID No: 1-70に示すヌクレオチド配列の少なくとも80%の配列に同一性がある又は少なくとも10個の連続したヌクレオチドが同じである配列の1種又は複数種から選ばれ、最適なものは配列が全く同じである。

40

【0021】

(2) 濃度範囲が20 nM - 1250 nMの内部抑制遺伝子核酸分子検出用混合液。それは少なくとも1つのフォワードプライマーと1つのリバースプライマーを含む。

(3) ポリメラーゼ連鎖反応の主たる混合液。その主たる成分は少なくともポリメラーゼ、dNTPs及び硫酸マグネシウムを含む。

【0022】

上記発明の目的が達成できる検証キットであり、当該内部抑制遺伝子核酸分子検出用混合液は、そのうちフォワードプライマー、リバースプライマーが含む配列がSEQ ID

50

No : 71 - 80 に示すヌクレオチド配列の少なくとも80%の配列に同一性がある又は少なくとも10個の連続したヌクレオチドが同じである配列の1種の又は複数種から選ばれ、最適なものは配列が全く同じである。そのうち標的遺伝子と内部抑制遺伝子のプライマーは混和してシングルチューブ核酸分子検出用混合液とすることができる。

【0023】

上記発明の目的が達成できる検証キットについて、当該標的遺伝子混合プライマーは、更に、プローブを含む。そのプローブ配列はSEQ ID No : 1 - 70 に示すヌクレオチド配列の少なくとも80%の配列に同一性がある又は少なくとも10個の連続したヌクレオチドが同じである配列の1種又は複数種又はその相補的配列から選ばれ、最適なものは配列が全く同じである。当該内部抑制遺伝子核酸分子検出混合液は、更に、内部抑制遺伝子増幅産物が検出できるプローブを含む。

10

本発明を通じて、更に、そのうち内部抑制遺伝子のフォワードプライマー、リバースプライマーが含む配列がSEQ ID No : 71 - 80 に示すヌクレオチド配列の少なくとも80%の配列に同一性がある又は少なくとも10個の連続したヌクレオチドが同じである配列の1種又は複数種から選ばれ、最適なものは配列が全く同じであり、プローブ配列はSEQ ID No : 71 - 80 に示すヌクレオチド配列の少なくとも80%の配列に同一性がある又は少なくとも10個の連続したヌクレオチドが同じである配列の1種又は複数種又は相補的配列から選ばれ、最適なものは配列が全く同じであることを含むことを提供する。そのうち標的遺伝子と内部抑制遺伝子のプライマーは混和してシングルチューブ核酸分子検出混合液とすることができる。

20

【0024】

上記発明の目的が達成できる検証キットについて、そのポリメラーゼ連鎖反応の主たる混合液は、更に、連鎖反応産物が識別できる蛍光物質を含み又は/及びDNA二重結合と蛍光を生じ更に検出されることができる物質から選ばれる。この物質はSYBER Green, Syber Gold などのSYBR検出系物質を含む。

【0025】

上記発明の目的が達成できる検証キットについて、そのうち当該測定用検体にある内部抑制遺伝子は、次の少なくとも1種の又は1種以上の遺伝子：Col2A、-Globin、GAPDH (glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase)、-actinにより構成される群から選ばれる。

30

【0026】

上記発明の目的が達成できる検証キットについて、その標的遺伝子と内部統制群遺伝子のプローブが蛍光色素標識を備える。この蛍光色素標識は次のいずれかの蛍光：FAM、HEX、TET、TAMRA、Cy3、Cy5、Cy5.5、VIC、Red610、Yellow 555、Texas Red、Yakima Yellow, BHQ - 1、BHQ - 2 及びBHQ - 3 により構成される群から選ばれる。

【0027】

上記発明の目的が達成できる検証キットについて、そのうち当該測定用検体にある遺伝子は、次の少なくとも1種の又は1種以上の遺伝子：PAX1、ZNF582、SOX1 及びNKX6 - 1 により構成される群から選ばれる。

40

【0028】

上記発明の目的が達成できる検証キットについて、それを更に正常でない細胞増殖現象の測定に用いることができる。そのうち正常でない細胞増殖は前癌病変の測定、腫瘍の測定、腫瘍再発の測定又は腫瘍用薬予測又は予後効果の測定を含む。そのうち当該悪性腫瘍は下記の群のうちの1つである：子宮頸癌、口腔癌、頭頸部癌、食道癌、大腸癌、肝癌、卵巣癌、乳癌、舌癌、肺腺癌及び皮膚癌。

【0029】

上記発明の目的が達成できる検証キットについて、そのうち連鎖増幅産物の鑑定方法は蛍光光度法、シーケンシング (sequencing)、マイクロアレイ (microarrays)、質量分析計分析 (mass spectrometer)、変性高速液

50

体クロマトグラフィー (denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC)、パイロシーケンス (pyrosequencing) 又は免疫学的検定 (immunoassay) を用いることができる。

【0030】

以下は、関連する具体的な実施例の詳細な説明であり、材料と測定方法などを含むことにより、更に本発明の技術的特徴と効果を詳述する。ただし、本発明の具体的な実施例又は方法により範囲の制限又は本発明の実施制限としての解釈又はこれらに記載の実施例又は方法のみへの限定を行ってはならないと理解すべきである。

【0031】

実施例 1

検体サンプルについて、まずその gDNA を抽出し、亜硫酸水素塩 (bisulfite) の変換を通じ、表 1 から表 4 までに掲げる内容により PAX 1、ZNF 582、SOX 1、NKX 6 - 1 及び内部統制群を含有するメチル化領域の増幅に使えるプライマー対とプローブセット (表 1 から 5 参照) により測定を行う。試薬キットの主たる組成は下表 6 の通りである。

【0032】

【表 1】

標的遺伝子 PAX1 のメチル化領域増幅用のプライマー対とプローブセット

ID No:	PAX1 プライマー対とプローブセット
SEQ ID No : 1	5' attcgcgcgttttcggcgtga 3'
SEQ ID No : 2	5' gttaaattgattttcgtacgtttag 3'
SEQ ID No : 3	5' tattttgggtttggggtcgc 3'
SEQ ID No : 4	5' ttattttgggtttggggtcgcg 3'
SEQ ID No : 5	5' gggcggtagcgcgtttcgtt 3'
SEQ ID No : 6	5' tagcggcggcggtaggttttga 3'
SEQ ID No : 7	5' gtagtgacgggaattaatgagt 3'
SEQ ID No : 8	5' aacatcccacgaccacgcg 3'
SEQ ID No : 9	5' acgaccacgccgaaaaccgt 3'
SEQ ID No : 10	5' acaaacacgaaaaatacgcg 3'
SEQ ID No : 11	5' acgacgaaaaaaaaacgacgacg 3'
SEQ ID No : 12	5' ttaaattgattttcgtacgtttag 3'
SEQ ID No : 13	5' gcgaccccaaacccaaaata 3'
SEQ ID No : 14	5' ctcccaaacactctccac 3'
SEQ ID No : 15	5' agtagcggcggcggtaggtt 3'
SEQ ID No : 16	5' aacgaaacgcgctaccgcc 3'
SEQ ID No : 17	5' cgcgaccccaaacccaaaata 3'
SEQ ID No : 18	5' aaaacactctccacgcccgca 3'
SEQ ID No : 19	5' attgattttcgtacgtt 3'
SEQ ID No : 20	5' aacctaccgcgcgctact 3'
SEQ ID No : 21	5' cctcccaaacactctccacg 3'
SEQ ID No : 22	5' cccgaaaaccgaaaaccg 3'
SEQ ID No : 23	5' acgcccgaaaaccgaaaaccg 3'
SEQ ID No : 24	5' atcgcgcgccttaccata 3'
SEQ ID No : 25	5' cctacctatcgcgcgcctta 3'

10

20

30

40

50

【 0 0 3 3 】

【 表 2 】

標的遺伝子 ZNF582 のメチル化領域増幅用プライマー対とプローブセット

ID No:	ZNF582 プライマー対とプローブセット
SEQ ID No : 26	5' acgatttacgaggagtagaag 3'
SEQ ID No : 27	5' tgacggTTTTTTGTTTattcggttattc 3'
SEQ ID No : 28	5' agtgacggTTTTTTGTTTattcggttattc 3'
SEQ ID No : 29	5' cggagggatattgcggcgtcggt 3'
SEQ ID No : 30	5' atgggaacgtaacggatga 3'
SEQ ID No : 31	5' atttaacgatttacgaggag 3'
SEQ ID No : 32	5' aaacgtacctacgcaatacgcga 3'
SEQ ID No : 33	5' cgaacgcaaacgtacctacgc 3'
SEQ ID No : 34	5' accgaacgcaaacgtacctacgca 3'
SEQ ID No : 35	5' acccaaacgcgcttcacca 3'
SEQ ID No : 36	5' cgaataaccgaataaac 3'
SEQ ID No : 37	5' tacgcgaaaaaatac 3'
SEQ ID No : 38	5' cgccgtacgcaaccga 3'
SEQ ID No : 39	5' atttcaaaataaaaccgaacgc 3'
SEQ ID No : 40	5' acccgaccttaaaccgaat 3'

10

20

30

【 0 0 3 4 】

【表 3】

標的遺伝子SOX1のメチル化領域増幅用プライマー対とプローブセット

ID No:	SOX1 プライマー対とプローブセット
SEQ ID No: 41	5' gcgtttttttttttttcgttattggc 3'
SEQ ID No: 42	5' tgcgtttttttttttttcgttattggcg 3'
SEQ ID No: 43	5' cgcggcgcgctcgttttgta 3'
SEQ ID No: 44	5' tggaggtcgttgaggatcg 3'
SEQ ID No: 45	5' cggcggtcggcgaggagata 3'
SEQ ID No: 46	5' gcgttttcgtttcgagcgta 3'
SEQ ID No: 47	5' aggatcgagcgtaggaggaa 3'
SEQ ID No: 48	5' cgcgctatctccttctcctacg 3'
SEQ ID No: 49	5' gccgctacgcgctatctcc 3'
SEQ ID No: 50	5' gcaacccaaacgccctcgac 3'
SEQ ID No: 51	5' cgatacgctaaacccgacccg 3'
SEQ ID No: 52	5' cgcggcgcgctcgttttgta 3'
SEQ ID No: 53	5' cgatcctcaacgacctcca 3'
SEQ ID No: 54	5' cgatacgctaaacccgacccg 3'
SEQ ID No: 55	5' gctcgatcctcaacgacctc 3'
SEQ ID No: 56	5' acgatcgaaatgccgtett 3'

10

20

30

【 0 0 3 5 】

【表 4】

標的遺伝子 NKX6-1 のメチル化領域増幅用プライマー対とプローブセット

ID No:	NKX6-1 ^o プライマー対と ^o プローブセット
SEQ ID No: 57	5' tgtcgttttttcgctggagg 3'
SEQ ID No: 58	5' cgtggctcgtgggatgtagc 3'
SEQ ID No: 59	5' tcggcgtggctcgtgggatgtagc 3'
SEQ ID No: 60	5' acggttttcggcgtggctcgt 3'
SEQ ID No: 61	5' ttcgggcgcgtcagtggtt 3'
SEQ ID No: 62	5' aacatcccacgaccacgccg 3'
SEQ ID No: 63	5' acgaccacgccgaaaaccgt 3'
SEQ ID No: 64	5' acaaacaacgaaaaatacgcg 3'
SEQ ID No: 65	5' gacaaacaacgaaaaatacgcga 3'
SEQ ID No: 66	5' acgacgaaaaaacgacgacg 3'
SEQ ID No: 67	5' cgctaccgaaaattactcg 3'
SEQ ID No: 68	5' cgaataccctccattacc 3'
SEQ ID No: 69	5' acaaacaacgaaaaatacgcg 3'
SEQ ID No: 70	5' aacactcgacgcgcccgaa 3'

10

20

30

【 0 0 3 6 】

【表 5】

内部統制群遺伝子のメチル化領域増幅用プライマー対とプローブセット

ID No:	内部統制群プライマー対とプローブセット
SEQ ID No : 71	5' agggttatTTTgaaaagggatat 3'
SEQ ID No : 72	5' tTTtaaggggaagatgggatagaag 3'
SEQ ID No : 73	5' agaggtggggataggtattgggt 3'
SEQ ID No : 74	5' cttctatcccatcttccc 3'
SEQ ID No : 75	5' ttcattctaaccaatacct 3'
SEQ ID No : 76	5' tgtagagtaaagtatagagt 3'
SEQ ID No : 77	5' aaccaatacctatccccacctc 3'
SEQ ID No : 78	5' aacaattataaactccaaccaccaaac 3'
SEQ ID No : 79	5' actccaaccaccaaacttcattct 3'
SEQ ID No : 80	5' accgaccccaactaatacccg 3'

10

20

【 0 0 3 7 】

【表 6】

試薬	内容物と機能
測定混合群	containing the mix of primers and probes of the target gene and internal control Gene 標的遺伝子と内部統制群遺伝子を含有するプライマー対（フォワードプライマーとリバースプライマー）とそのプローブ混和物
主たる混合液	Master mix for PCR or Q-PCR reagent (Tag polymerase, dNTP etc.)ポリメラーゼ連鎖反応の主たる混合液
フォワード対照群	Include the fragment of “Target gene” and the fragment of “Internal control gene” 標的遺伝子と内部統制群遺伝子

30

40

50

【0038】

PCR増幅反応は次の通りである。

(i) 95 のもとでポリメラーゼを10分間活性化させる。(ii) 95 のもとでDNAテンプレートを10秒変性させ、60 のもとでDNA鎖を40秒結合/伸長させる。(iii) 30から50回サイクルにわたり変性/結合/伸長させる。

【0039】

PCR増幅反応については、そのうち1組の混合物は標的遺伝子と内部統制群遺伝子のプライマー対とそのプローブ混合物を含む。プライマー対はフォワードプライマーとリバースプライマーを含む。異なるプローブは異なる波長でなおかつ互いにコヒーレンスが低い蛍光により標識を行う。本実施例では、標的遺伝子プローブにはFAM標識を、内部統制群プローブにはVIC標識を使う。蛍光色素のほかにも、全てのプローブはquencher基も加えるため、プローブ配列と増幅配列の相補的結合が行え、蛍光色素が蛍光を放出させ、更に検出される。標的遺伝子のメチル化遺伝子の程度はCp値(サイクル数)と信号強度により決定し、内部制御遺伝子を校正とデバッグに使える。本実施例にあるPAX1を例として、PAX1のCp値と内部制御遺伝子Cp値の差異が12を超えなければ、際立ってメチル化されているPAX1があることを示す。他の標的遺伝子はこれにより類推する。

【0040】

実施例2 異なる癌細胞株にある標的遺伝子のメチル化程度分析

本テストでは、表1から表4までに掲げるPAX1、ZNF582、SOX1及びNKX6-1を含有するメチル化領域の増幅に使えるプライマー対とプローブセットを応用することで、異なる癌細胞株を測定した。そのメチル化状態は分析表7に示す通りである。結果からは次のことが示される。子宮頸癌に関連する細胞株HeLaのうち、PAX1、ZNF582、SOX1及びNKX6-1は全てメチル化されたと検出され、子宮頸癌に関連する細胞株SiHaのうち、PAX1、ZNF582及びSOX1がメチル化されたと検出され、子宮頸癌に関連する細胞株CasKiのうち、PAX1、ZNF582、SOX1及びNKX6-1は全てメチル化されたと検出され、子宮頸癌に関連する細胞株C-33Aのうち、ZNF582、SOX1及びNKX6-1がメチル化されたと検出された。大腸癌に関連する細胞株COLO205のうち、PAX1、ZNF582、SOX1及びNKX6-1は全てメチル化されたと検出され、大腸癌に関連する細胞株Caco-2のうち、ZNF582、SOX1及びNKX6-1がメチル化されたと検出され、大腸癌に関連する細胞株HT-29のうち、PAX1、ZNF582、SOX1及びNKX6-1は全てメチル化されたと検出された。肝癌に関連する細胞株HuH-7のうち、SOX1とNKX6-1がメチル化されたと検出され、肝癌に関連する細胞株Mahlavuのうち、ZNF582とSOX1がメチル化されたと検出された。肺癌に関連する細胞株A549のうち、PAX1、ZNF582、SOX1及びNKX6-1はメチル化されたと検出されなかった。皮膚癌に関連する細胞株A-375のうち、PAX1、ZNF582、SOX1及びNKX6-1はメチル化されたと検出されなかった。卵巣癌に関連する細胞株A2780のうち、ZNF582及びSOX1がメチル化されたと検出された。乳癌に関連する細胞株T47Dのうち、PAX1及びNKX6-1がメチル化されたと検出され、乳癌に関連する細胞株BT474のうち、PAX1、ZNF582及びSOX1がメチル化されたと検出され、乳癌に関連する細胞株MDA-MB-231のうち、ZNF582、SOX1及びNKX6-1がメチル化されたと検出され、乳癌に関連する細胞株ZR-75-1のうち、ZNF582、SOX1及びNKX6-1がメチル化されたと検出され、乳癌に関連する細胞株HCC1954のうち、ZNF582とSOX1がメチル化されたと検出され、乳癌に関連する細胞株MCF-7のうち、PAX1、ZNF582、SOX1及びNKX6-1がメチル化されたと検出された。舌癌に関連する細胞株SASのうち、PAX1、ZNF582、SOX1及びNKX6-1は全てメチル化されたと検出された。口腔癌に関連する細胞株Ca9-22のうち、PAX1、ZNF582、SOX1及びNKX6-1は全てメチル化されたと検出された。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 1 】

ここから分かるのは、子宮頸癌、大腸癌、肝癌、卵巣癌、乳癌、舌癌、口腔癌、肺癌、肺腺癌及び皮膚癌に関連する細胞株では、当該4つの遺伝子のうち少なくとも1つにメチル化現象が検出されことである。そのためPAX1、ZNF582、SOX1及びNKX6-1のうち少なくとも1つがメチル化され、これが確実に癌の有無をスクリーニングするスクリーニング指標となり得る。

【 0 0 4 2 】

【表7】

異なる癌細胞株での標的遺伝子のメチル化有無の分析

	PAX1	ZNF582	SOX1	NKX6-1	注釈
HeLa(CCL-2.2)	+	+	+	+	子宮頸部腺癌 (adenocarcinoma; cervix) (HPV(18(+)))
SiHa	+	+	+	-	子宮頸部扁平上皮癌 (epidermoid carcinoma; cervix) (HPV-16(+))
CaSki	+	+	+	+	子宮頸部扁平上皮癌 (epidermoid carcinoma; cervix) (HPV-16(+))
C-33A	-	+	+	+	子宮頸癌 (carcinoma; cervix) (HPV(-))
COLO 205	+	+	+	+	結直腸腺癌 (colorectal adenocarcinoma, metastatic site: ascites)
Caco-2	-	+	+	+	大腸癌 (colorectal adenocarcinoma)
HT-29	+	+	+	+	結直腸腺癌 (colorectal adenocarcinoma)
HuH-7	-	-	+	+	肝癌 (hepat°Cellular carcinoma)
Mahlavu	-	+	+	-	肝癌 (Mahlavu hepat°Cellular carcinoma)
A549	-	-	-	-	肺癌 (lung carcinoma)
A-375	-	-	-	-	皮膚癌 (skin; malignant melanoma)
A2780	-	+	+	-	卵巣癌 (ovarian carcinoma)
T47D	+	-	-	+	乳管癌 (breast ductal carcinoma)
BT474	+	+	+	-	乳管癌 (breast ductal carcinoma)
MDA-MB-231	-	+	+	+	乳癌 (breast adenocarcinoma)
ZR-75-1	-	+	+	+	乳管癌 (breast ductal carcinoma)
HCC1954	-	+	+	-	乳管癌 (breast ductal carcinoma)
MCF-7	+	+	+	+	乳癌 (breast adenocarcinoma)
SAS	+	+	+	+	舌扁平上皮癌 (tongue, squamous carcinoma)
Ca9-22	+	+	+	+	口腔癌 (carcinoma; squamous cell carcinoma)

【 0 0 4 3 】

実施例3 子宮頸癌サンプル内での標的遺伝子のメチル化程度の分析

本テストでは、台湾で診断により正常と疾病状態にあると認識済みの279名の子宮頸部スメアサンプルを使った。表8に示すように、それぞれ正常239名(85.7%)、軽度(CIN1)22名(7.9%)、中度(CIN2)2名(0.7%)、重度(CIN3)/上皮内癌(CIS)12名(4.3%)、扁平上皮癌4名(1.4%)であり、それらのDNAを抽出し、亜硫酸水素塩(bisulfite)の変換を通じて表1から表4までに掲げる内容によりPAX1、ZNF582、SOX1、NKX6-1及び内部統

10

20

30

40

50

制群を含有するメチル化領域の増幅に使えるプライマー対とプローブセットにより測定を行った。

表9に示すように、正常な子宮頸部スメアサンプルに比べて、PAX1、ZNF582、SOX1及びNKX6-1を標的遺伝子とした場合には、重度以上の子宮頸部スメアサンプルにはそれぞれ85.45倍(95%信頼区間 = 33.95~215.11)、289.17倍(95%信頼区間 = 39.20~2133.14)、67.69倍(95%信頼区間 = 20.55~223.01)及び2.56倍(95%信頼区間 = 1.36~4.82)で重度子宮頸癌に罹患する危険性があることを検出した。表10に示すように、個別のメチル化された標的遺伝子と子宮頸部スメアを同時に一括して疾病を測定した場合には、いずれか1つのメチル化された標的遺伝子又は子宮頸部スメアの測定結果が陽性でありさえすれば、当該テストサンプルの子宮頸癌スクリーニング結果が陽性であると認めることを意味する。

正常な子宮頸部スメアサンプルに比べて、それぞれPAX1、ZNF582、SOX1及びNKX6-1を標的遺伝子として検出を行い、子宮頸部スメアをこれに加えた場合には、重度以上子宮頸部スメアサンプルにはそれぞれ475.64倍(95%信頼区間 = 63.94~3538.43)、543.31倍(95%信頼区間 = 33.11~8914.18)、95.08倍(95%信頼区間 = 20.55~223.01)及び14.25倍(95%信頼区間 = 6.12~33.18)で重度子宮頸癌に罹患する危険性があると測定された。なおかつ各項目の敏感度は子宮頸部スメアをこれに加えない測定結果と比較して全て上昇している(PAX1:75%が94%に上昇、ZNF582:87%が94%に上昇、SOX1:75%が100%に上昇、NKX6-1:50.00%が84.78%に上昇)。

10

20

【0044】

【表8】

正常な子宮頸サンプルと異なる時期の子宮頸癌サンプル(切片結果)

サンプル数	Normal 正常	CIN1 軽度	CIN2 中度	CIN3/CIS 重度/上皮内癌	SCC 扁平上皮癌
279	239(85.7%)	22(7.9%)	2(0.7%)	12(4.3%)	4(1.4%)

30

【0045】

【表9】

標的遺伝子	敏感度	特異度	P-値	オッズ比(95%信頼区間)*
PAX1	75%	95%	<0.0001 ^a	85.45(33.95-215.11)
ZNF582	87%	58%	<0.0001 ^a	289.17(39.20-2133.14)
SOX1	75%	98%	<0.0001 ^a	67.69(20.55-223.01)
NKX6-1	50.00%	73.05%	0.0015 ^a	2.56(1.36-4.82)

40

【0046】

【表10】

標的遺伝子	敏感度	特異度	P-値 ^a	オッズ比(95%信頼区間)*
PAX1 or Pap	94%	92%	<0.0001 ^a	475.64(63.94-3538.43)
ZNF582 or Pap	94%	95%	<0.0001 ^a	543.31(33.11-8914.18)
SOX1 or Pap	100%	56%	<0.0001 ^a	95.08(22.66-398.96)
NKX6-1 or Pap	84.78%	70.13%	<0.0001 ^a	14.25(6.12-33.18)

50

a カイ二乗検定による b フィッシャーの正確確率検定による

* C I N 3 以上のオッズ比 (o d d s r a t i o n s 、 O R) (C I N 1 と C I N 2 を含まない)

C I N : 子宮頸部上皮内腫瘍 (C e r v i c a l i n t r a e p i t h e l i a l n e o p l a s i a)

S C C : 扁平上皮癌 (s q u a m o u s c e l l c a r c i n o m a)

P a p : 子宮頸部スメア検査 (P a p a n i c o l a o u t e s t)

【 0 0 4 7 】

実施例 4

本テストでは診断により正常と疾病状態にあると認識済みの 8 名の口腔スメアサンプルを用い、それらの DNA を抽出し、亜硫酸水素塩 (b i s u l f i t e) の変換を通じて表 1 から表 4 までに掲げる内容により P A X 1 、 Z N F 5 8 2 、 S O X 1 、 N K X 6 - 1 及び内部統制群を含有するメチル化領域の増幅に使えるプライマー対とプローブセット (表 1 から 5 参照) により測定を行った。

それらのメチル化状態の分析結果は表 1 1 に示す通りである。口腔 1 のうち、 P A X 1 、 Z N F 5 8 2 、 S O X 1 及び N K X 6 - 1 は全てメチル化せず、口腔 2 のうち、 P A X 1 、 Z N F 5 8 2 、 S O X 1 及び N K X 6 - 1 は全てメチル化せず、口腔 3 のうち、 P A X 1 及び Z N F 5 8 2 がメチル化し、口腔 4 のうち、 P A X 1 、 Z N F 5 8 2 、 S O X 1 及び N K X 6 - 1 は全てメチル化し、口腔 5 のうち、 P A X 1 と Z N F 5 8 2 がメチル化し、口腔 6 のうち、 Z N F 5 8 2 がメチル化し、口腔 7 のうち、 Z N F 5 8 2 、 S O X 1 及び N K X 6 - 1 がメチル化し、口腔 8 のうち、 P A X 1 と Z N F 5 8 2 がメチル化した、との結果が示された。ここから分かるのは、口腔癌では異なる時期、異なる症状のもとで、当該 4 つの遺伝子のうち少なくとも 1 つが大幅にメチル化されたことである。そのため P A X 1 、 Z N F 5 8 2 、 S O X 1 及び N K X 6 - 1 のうち少なくとも 1 つのメチル化程度は、確実に口腔癌をスクリーニングするスクリーニング指標となり得る。

【 0 0 4 8 】

【 表 1 1 】

異なる症状の口腔癌サンプルでの、その標的遺伝子のメチル化程度の分析

名称	口腔癌の程度と特徴	PAX1	ZNF582	SOX1	NKX6-1
口腔 1	左側白斑、角化 (Leukoplakia)	-	-	-	-
口腔 2	左側白斑、角化 (Leukoplakia)	-	-	-	-
口腔 3	右側白斑、表面角化が深刻、疣贅性白板症 (Verruciform leukoplakia)	+++	+++	-	-
口腔 4	左側に突起、突起周囲が白化、カンジダ属菌による感染、突起部は切片検査では癌細胞なし (Erythroleukoplakia)	+++	+++	+++	+++
口腔 5	左側に赤色突起、白点増幅、口腔癌 (Erythroleukoplakia with Oral cancer history)	+++	+++	-	-
口腔 6	口腔全般に点状白斑あり (Leukoplakia)	-	+++	-	-
口腔 7	口腔に白斑あり (Leukoplakia)	-	+++	+++	+++
口腔 8	口腔右側に紅斑、カンジダ属菌に感染、上皮内癌 (Erythroleukoplakia with Oral cancer)	+++	+++	-	-

【 配 列 表 】

[201528286000001.app](#)

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2012/080655
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12Q 1/68 (2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNPAT, CNKI, DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CNABS, CNTXT, VEN, CJFD, ISI Web of Knowledge, NCBI: PAX1, ZNF582, SOX1, NKX6-1, methylation, PCR, sequence searching based on SEQ ID Nos: 1-80		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIN, C.J. et al., Testing for methylated PCDH10 or WT1 is superior to the HPV test in detection severe neoplasms (CIN3 or greater) in the triage of ASC-US smear results, AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS & GYNECOLOGY, January 2011, vol. 204, no. 21, e1-7	1-20
X	SU, H.Y. et al., An epigenetic marker panel for screening and prognostic prediction of ovarian cancer, INT. J. CANCER, 2009, no. 124, pages 387-393	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 22 May 2013 (22.05.2013)	Date of mailing of the international search report 06 June 2013 (06.06.2013)	
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer ZHANG, Yanxia Telephone No.: (86-10) 62411049	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/080655**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - on paper
 - in electronic form
 - b. (time)
 - in the international application as filed
 - together with the international application in electronic form
 - 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 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:

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2012/080655
A. 主题的分类		
C12Q1/68 (2006.01) i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C12Q		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNPAT, CNKI, DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CNABS, CNTXT, VEN, CJFD, ISI Web of Knowledge, NCBI: PAX1, ZNF582, SOX1, NKX6-1, 甲基化, methylation, PCR, 基于 SEQ ID No: 1-80 的序列检索		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	Lin CJ 等人, Testing for methylated <i>PCDH10</i> or <i>WT1</i> is superior to the HPV test in detection severe neoplasms (CIN3 or greater) in the triage of ASC-US smear results, American Journal of Obstetrics & Gynecology, 1月 2011, 第 204 卷, 第 21 期, e1-7.	1-20
X	Her-Young Su 等人, An epigenetic marker panel for screening and prognostic prediction of ovarian cancer, Int. J. Cancer, 2009, 第 124 期, 第 387-393 页。	1-20
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件
国际检索实际完成的日期 22.5 月 2013 (22.05.2013)		国际检索报告邮寄日期 06.6 月 2013 (06.06.2013)
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员 张艳霞 电话号码: (86-10) 62411049

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2012/080655

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1、关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是在下列基础上进行的:

a. 序列表的提交或提供

 纸件形式 电子形式

b. 提交或提供时间

 包含在申请提交时的国际申请中 以电子形式与国际申请一起提交 为检索之用随后提交本单位

2、 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见

フロントページの続き

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

(72)発明者 張 綺 芬
台湾新北市汐止区新台五路一段96号18楼

(72)発明者 王 惠利
台湾新北市汐止区新台五路一段96号18楼

(72)発明者 劉 禹利
台湾新北市汐止区新台五路一段96号18楼

Fターム(参考) 4B024 AA12 BA80 CA09 HA12
4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ42 QR08 QR32 QR42 QR50 QR55 QR62
QS03 QS11 QS25 QS34 QS36 QX02

专利名称(译)	用于癌症筛查的验证工具包		
公开(公告)号	JP2015528286A	公开(公告)日	2015-09-28
申请号	JP2015528827	申请日	2012-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	日祥生命科学股份有限公司		
[标]发明人	王惠利		
发明人	▲張▼▲綺▼芬 王 惠利 ▲劉▼禹利		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/112 C12Q2600/154 C12Q2600/166		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/BA80 4B024/CA09 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS03 4B063/QS11 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于癌症的生物分子标记物以及用于筛选，利用和分析样品的靶基因的甲基化区域以设计对靶基因具有特异性的几个部分的寡核苷酸引物或探针的验证试剂盒，使用寡核苷酸探针测量靶基因甲基化的存在与否，以进一步确定癌症发展的可能性。甲基化状态识别方法，甲基化特异性PCR方法（甲基化特异性PCR，MSP），定量甲基化特异性PCR方法（定量甲基化特异性PCR，QMSP），亚硫酸氢盐测序方法（亚硫酸氢盐测序，BS），微阵列，质谱仪分析，变性高效液相色谱（DHPLC），焦磷酸测序或酶联免疫吸附测定，（ELISA）。[选择图]无

(21) 出願番号	特願2015-528827 (P2015-528827)	(71) 出願人	515050312 日祥医事管理▲張▼▲綺▼股▲ふん▼有限公司 ISTAT BIOMEDICAL CO., LTD. 台湾新北市汐止区新台五路一段96号18楼 18F., No. 96, Sec. 1, Xintai 5th Rd., Xizhi Dist. 22102 New Taipei City, Taiwan
(86) (22) 出願日	平成24年8月28日 (2012. 8. 28)	(74) 代理人	100169904 弁理士 村井 康司
(83) 翻訳文提出日	平成27年3月23日 (2015. 3. 23)	(74) 代理人	100142882 弁理士 合路 裕介
(86) 国際出願番号	PCT/CN2012/080655		
(87) 国際公開番号	WO2014/032227		
(87) 国際公開日	平成26年3月6日 (2014. 3. 6)		

最終頁に続く