

(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2005-522224

(P2005-522224A)

(43) 公表日 平成17年7月28日(2005.7.28)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00 A	4 B O 2 9
C 1 2 M 1/34	C 1 2 M 1/34 Z	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 82 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-584671 (P2003-584671)	(71) 出願人	504378847
(86) (22) 出願日	平成15年4月14日 (2003. 4. 14)		キュアレイターズ オブ ザ ユニバーシ
(85) 翻訳文提出日	平成16年12月8日 (2004. 12. 8)		ティー オブ ミズーリ
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/011598		アメリカ合衆国, ミズーリ 6 5 2 1 1 -
(87) 国際公開番号	W02003/087774		1 4 0 0, コロンビア, ローカスト スト
(87) 国際公開日	平成15年10月23日 (2003.10.23)		リート ビルディング 6 1 5, サード
(31) 優先権主張番号	60/372, 140		フロア, ユニバーシティ オブ ミズー
(32) 優先日	平成14年4月12日 (2002. 4. 12)		リーコロンビア, オフィス オブ テクノ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ロジー アンド スペシャル プロジェク
			ツ
		(74) 代理人	100099759
			弁理士 青木 篤
		(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNAの高メチル化と遺伝子サイレンシングの両方をスクリーニングするためのECISTマイクロアレイと、そのECISTマイクロアレイを利用して遺伝子の発現、DNAのメチル化、ヒ

(57) 【要約】

アレイ状の発現CpG島タグ (ECIST) を利用し、がん細胞におけるDNAのメチル化と遺伝子の発現の2つ、ならびにDNAのメチル化、遺伝子の発現、遺伝子に関連したヒストンのアセチル化の3つを分析する新規な高スループット法が提供されている。ECISTは、遺伝子のGCリッチなセグメントと、プロモータ部分および/またはエキソン部分 (例えば第1エキソン) とを含むゲノムDNA断片に対応する。GCリッチなセグメントは、がん細胞内の高メチル化したCpG部位をスクリーニングするのに有用であり、対応するプロモータ部分とエキソン含有部分は、対応する転写レベルを明らかにし、ヒストンのアセチル化を評価するのに役立つ。ECISTアレイ・パネルを用いて高メチル化した遺伝子座を同定し、細胞に脱メチル化剤を曝露した後にその遺伝子座の発現レベルを測定することにより、メチル化に依存した遺伝子サイレンシングの確認を行なう高スループット法、または治療に効果のある脱メチル化剤の同定を行なう高スループット法も提供されている。明らかにエピジェネティックなカスケードにおいて、直接的 (一次的) な脱メチル化に依存した遺伝子の上方調節と、間接的 (二次的) な脱メチル化に依存した遺伝子の上方調節とを区別する高スループット法もさらに提供されている。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

組織サンプルのゲノムCpGのメチル化とゲノム配列の発現を評価するための高スループット法であって、発現可能な遺伝子のエキソン配列またはその一部をそれぞれが含むCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片が表面に固着されている単一のマイクロアレイまたはその複製を使用し、その断片群に、組織サンプルのCpGリッチなゲノムDNAに由来する標的配列と、その組織サンプルのmRNAに由来する標的配列とを、検出可能に標識してからハイブリダイズさせる操作を含んでおり、上記発現可能な各遺伝子プローブと上記標的がハイブリダイズした程度が、組織サンプル中のメチル化されたゲノムCpG配列の存在と遺伝子の発現をそれぞれ反映しているため、マイクロアレイまたはその複製の表面にある発現可能な特定の遺伝子のゲノムCpGのメチル化と遺伝子の発現の両方が少なくとも部分評価されることを特徴とする方法。

10

【請求項2】

単一のマイクロアレイまたはその複製に第2の組織サンプルのCpGリッチなゲノムDNAに由来する標的配列と、その第2の組織サンプルのmRNAに由来する標的配列をハイブリダイズさせる操作をさらに含み、そのとき第1の組織サンプルと第2の組織サンプルのDNAに由来する標的配列を識別可能に標識して単一のマイクロアレイまたはその複製に同時にハイブリダイズさせ、第1の組織サンプルと第2の組織サンプルのmRNAに由来する標的配列を識別可能に標識して単一のマイクロアレイまたはその複製に同時にハイブリダイズさせることにより、マイクロアレイまたはその複製の表面にある発現可能な特定の遺伝子のゲノムCpGのメチル化とゲノムの発現の両方に関して組織サンプル間の差を少なくとも部分的に評価する、請求項1に記載の方法。

20

【請求項3】

第1の組織サンプルと第2の組織サンプルが異なっており、テスト組織サンプルと対照組織サンプルに対応する、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

上記テスト組織サンプルががん組織に対応し、上記対照組織サンプルが正常組織に対応する、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片のそれぞれが、1つの遺伝子のプロモータと第1エキソンの一部を含む、請求項2に記載の方法。

30

【請求項6】

固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片のそれぞれが、CpG島配列またはその一部を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項7】

固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片のそれぞれが、発現CpG島配列タグ(ECIST)を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項8】

固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片が、CpGジヌクレオチド・リッチなゲノム・ライブラリに由来する、請求項2に記載の方法。

40

【請求項9】

CpGリッチなゲノムDNAに由来するハイブリダイズ可能な上記標的配列を、メチル化された1個以上のCpG配列を有するゲノムDNAに対応するCpGリッチなDNA断片を増幅する操作を含む方法によって調製する、請求項2に記載の方法。

【請求項10】

CpGリッチなゲノムDNAに由来するハイブリダイズ可能な上記標的配列を、メチル化感受性制限酵素の利用を含む方法によって調製する、請求項2に記載の方法。

【請求項11】

CpGリッチなゲノムDNAに由来する上記標的配列の調製と、その標的配列のマイクロアレイまたはその複製へのハイブリダイゼーションを、メチル化されたCpG島遺伝子座に対応

50

する標的アンプリコンの生成を含むディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション (DMH) 法によって実施する、請求項2に記載の方法。

【請求項12】

mRNAに由来する上記標的配列の調製に、RNAリガーゼ媒介cDNA合成 (RLCS) 法とRT-PCR法のうちの少なくとも一方が含まれる、請求項2に記載の方法。

【請求項13】

CpGリッチなゲノムDNAに由来する上記標的配列とmRNAに由来する上記標的配列をマイクロアレイにハイブリダイズさせる操作を、単一のマイクロアレイまたはその複製を用いて順番に行なう、請求項2に記載の方法。

【請求項14】

CpGリッチなゲノムDNAに由来する上記標的配列とmRNAに由来する上記標的配列をマイクロアレイにハイブリダイズさせる操作を、複数の複製マイクロアレイを用いて並列に行なう、請求項2に記載の方法。

【請求項15】

組織サンプルのゲノムCpGのメチル化とゲノム配列の発現を評価するための高スループット法であって、

a) 組織サンプルからゲノムDNAを取得し、そこから、ハイブリダイズ可能で検出可能な標識を有する、CpGリッチなゲノムDNAに由来する標的配列を調製するステップと；

b) 組織サンプルからmRNAを取得し、そこから、ハイブリダイズ可能で検出可能な標識を有する、mRNAに由来する標的配列を調製するステップと；

c) DNAに由来する標識した上記標的配列とmRNAに由来する標識した上記標的配列の両方を、発現可能な1つの遺伝子のエキソン配列またはその一部をそれぞれが含むCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片が表面に固着されている単一のマイクロアレイまたはその複製にハイブリダイズさせ、そのとき上記標的配列が発現可能な各遺伝子のプローブとハイブリダイズした程度が、組織サンプル中のメチル化されたゲノムCpG配列の存在と遺伝子の発現を反映しているステップと；

d) マイクロアレイまたはその複製の表面にある発現可能な特定の遺伝子のゲノムCpGのメチル化とゲノムの発現を、少なくとも部分的にこのハイブリダイゼーションに基づいて評価するステップを含む方法。

【請求項16】

第2の組織サンプルから、CpGリッチなゲノムDNAに由来する標的配列と、mRNAに由来する標的配列の両方を調製する操作をさらに含み、そのとき第1の組織サンプルと第2の組織サンプルのDNAに由来する標的配列を識別可能式に標識して単一のマイクロアレイまたはその複製に同時にハイブリダイズさせ、第1の組織サンプルと第2の組織サンプルのmRNAに由来する標的配列を識別可能式に標識して単一のマイクロアレイまたはその複製に同時にハイブリダイズさせることにより、マイクロアレイまたはその複製の表面にある発現可能な特定の遺伝子のゲノムCpGのメチル化とゲノムの発現の両方に関して組織サンプル間の差を少なくとも部分的に評価する、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

第1の組織サンプルと第2の組織サンプルが異なり、テスト組織サンプルと対照組織サンプルに対応する、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

上記テスト組織サンプルががん組織に対応し、上記対照組織サンプルが正常組織に対応する、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片のそれぞれが、1つの遺伝子のプロモータと第1エキソンの一部を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項20】

固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片のそれぞれが、CpG島配列またはその一部を含む、請求項16に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片のそれぞれが、発現CpG島配列タグ (ECIST) を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項 2 2】

固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片が、CpGジヌクレオチド・リッチなゲノム・ライブラリに由来する、請求項16に記載の方法。

【請求項 2 3】

CpGリッチなゲノムDNAに由来するハイブリダイズ可能な上記標的配列の調製に、メチル化された1個以上のCpG配列を有するゲノムDNAに対応するCpGリッチなDNA断片を増幅する操作が含まれる、請求項16に記載の方法。

10

【請求項 2 4】

CpGリッチなゲノムDNAに由来するハイブリダイズ可能な上記標的配列の調製に、メチル化感受性制限酵素を利用する操作が含まれる、請求項16に記載の方法。

【請求項 2 5】

CpGリッチなゲノムDNAに由来する上記標的配列を調製し、その標的配列のマイクロアレイまたはその複製にハイブリダイズさせるとき、メチル化されたCpG島遺伝子座に対応する標的アンプリコンの生成を含むディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション (DMH) 法を利用する操作が含まれる、請求項16に記載の方法。

【請求項 2 6】

mRNAに由来する上記標的配列の調製に、RNAリガーゼ媒介cDNA合成 (RLCS) 法とRT-PCR法のうちの少なくとも一方を実施する操作が含まれる、請求項16に記載の方法。

20

【請求項 2 7】

CpGリッチなゲノムDNAに由来する上記標的配列とmRNAに由来する上記標的配列をマイクロアレイにハイブリダイズさせる操作を順番に行なう、請求項16に記載の方法。

【請求項 2 8】

第1の組織サンプルと第2の組織サンプルが同じであり、組織サンプルの1つを脱メチル化剤で処理した後、処理した組織サンプルからゲノムDNAに由来するCpGリッチな標的配列とmRNAに由来する標的配列を調製する操作をさらに含み、そのことによって、脱メチル化剤が、マイクロアレイまたはその複製の表面にある発現可能な特定の遺伝子のゲノムCpGのメチル化とゲノムの発現の少なくとも一方に対して及ぼす効果を少なくとも部分的に評価し、そのことによって遺伝子サイレンシングの評価を行なう、請求項2~16のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 2 9】

上記脱メチル化剤に5-アザ-2'-デオキシシチジンが含まれる、請求項28に記載の方法。

【請求項 3 0】

ゲノムDNAに由来するCpGリッチな上記標的配列とmRNAに由来する上記標的配列のハイブリダイゼーションを複数の複製マイクロアレイを用いて並列に行なう、請求項16に記載の方法。

【請求項 3 1】

標的組織のアセチル化したヒストン結合DNAに由来する標的配列を単一のマイクロアレイまたはその複製にハイブリダイズさせる操作をさらに含み、ヒストンに結合したこの標的配列が発現可能な各遺伝子のプローブとハイブリダイズしている程度が、遺伝子に結合したアセチル化したヒストンの存在を反映しており、そのことによってマイクロアレイまたはその複製の表面にある発現可能な特定の遺伝子のゲノムCpGのメチル化、ゲノムの発現、遺伝子に結合したアセチル化したヒストンのうちの少なくとも1つが少なくとも部分的に評価される、請求項1~15のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項 3 2】

単一のマイクロアレイまたはその複製に第2の組織サンプルのCpGリッチなゲノムDNAに由来する標的配列と、その第2の組織サンプルのmRNAに由来する標的配列と、その第2の組織サンプルのアセチル化したヒストン結合DNAに由来する標的配列とをハイブリダイズさ

50

せる操作をさらに含み、そのとき第1の組織サンプルと第2の組織サンプルの各標的配列を識別可能式に標識し、それぞれの場合に単一のマイクロアレイまたはその複製に同時にハイブリダイズさせることにより、マイクロアレイまたはその複製の表面にある発現可能な特定の遺伝子のゲノムCpGのメチル化、ゲノムの発現、遺伝子に結合したヒストンのアセチル化のいずれかに関して組織サンプル間の差を少なくとも部分的に評価する、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

第1の組織サンプルと第2の組織サンプルが同じであり、組織サンプルの1つを脱メチル化剤とヒストンデアセチラーゼ阻害剤の少なくとも一方で処理した後、処理した組織サンプルからmRNAに由来する標的配列とアセチル化したヒストン結合DNAに由来する標的配列を調製する操作をさらに含み、そのことによって、脱メチル化剤とヒストンデアセチラーゼ阻害剤が、単独で、あるいは組み合わせとして、マイクロアレイまたはその複製の表面にある発現可能な特定の遺伝子のゲノムCpGのメチル化、ゲノムの発現、遺伝子に結合したヒストンのアセチル化のうち少なくとも1つに対して及ぼす効果を少なくとも部分的に評価し、そのことによってエピジェネティックなイベント（後成現象）と遺伝子発現の関係を評価する、請求項32に記載の方法。

10

【請求項34】

上記脱メチル化剤が5-アザ-2'-デオキシシチジンであり、上記ヒストンデアセチラーゼ阻害剤がトリコスタチンAである、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

第1の組織サンプルと第2の組織サンプルが異なっており、テスト組織サンプルと対照組織サンプルに対応する、請求項32に記載の方法。

20

【請求項36】

上記テスト組織サンプルががん組織に対応し、上記対照組織サンプルが正常組織に対応する、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片のそれぞれが、1つの遺伝子のプロモータと第1エキソンの一部を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項38】

固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片のそれぞれが、CpG島配列またはその一部を含む、請求項31に記載の方法。

30

【請求項39】

固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片のそれぞれが、発現CpG島配列タグ（ECIST）を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項40】

固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片が、CpGジヌクレオチド・リッチなゲノム・ライブラリに由来する、請求項31に記載の方法。

【請求項41】

CpGリッチなゲノムDNAに由来するハイブリダイズ可能な上記標的配列を、メチル化された1個以上のCpG配列を有するゲノムDNAに対応するCpGリッチなDNA断片を増幅する操作を含む方法によって調製する、請求項31に記載の方法。

40

【請求項42】

CpGリッチなゲノムDNAに由来するハイブリダイズ可能な上記標的配列を、メチル化感受性制限酵素の利用を含む方法によって調製する、請求項31に記載の方法。

【請求項43】

CpGリッチなゲノムDNAに由来する上記標的配列の調製と、その標的配列のマイクロアレイまたはその複製へのハイブリダイゼーションを、メチル化されたCpG島遺伝子座に対応する標的アンプリコンの生成を含むディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション（DMH）法によって実施する、請求項31に記載の方法。

【請求項44】

50

mRNAに由来する上記標的配列の調製に、RNAリガーゼ媒介cDNA合成 (RLCS) 法とRT-PCR法のうちの少なくとも一方が含まれる、請求項31に記載の方法。

【請求項45】

CpGリッチなゲノムDNAに由来する上記標的配列とmRNAに由来する上記標的配列をマイクロアレイにハイブリダイズさせる操作を、単一のマイクロアレイまたはその複製を用いて順番に行なう、請求項31に記載の方法。

【請求項46】

CpGリッチなゲノムDNAに由来する上記標的配列とmRNAに由来する上記標的配列をマイクロアレイにハイブリダイズさせる操作を、複数の複製マイクロアレイを用いて並列に行なう、請求項31に記載の方法。

10

【請求項47】

標的組織のアセチル化したヒストン結合DNAに由来するハイブリダイズ可能な標的配列の調製に、抗ヒストン抗体を用いた免疫沈降操作が含まれる、請求項31に記載の方法。

【請求項48】

発現可能な遺伝子のエキソン配列またはその一部をそれぞれが含む複数のゲノム・プローブ断片が表面に固着されたマイクロアレイ。

【請求項49】

固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片のそれぞれが、1つの遺伝子のプロモータと第1エキソンの一部を含む、請求項48に記載のマイクロアレイ。

【請求項50】

固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片のそれぞれが、CpG島配列またはその一部を含む、請求項48に記載のマイクロアレイ。

20

【請求項51】

固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片のそれぞれが、発現CpG島配列タグ (ECIST) を含む、請求項48に記載のマイクロアレイ。

【請求項52】

固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片が、CpGジヌクレオチド・リッチなゲノム・ライブラリに由来する、請求項48に記載のマイクロアレイ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

関連する出願の相互参照

【0002】

この特許出願は、2002年4月12日に「DNAの高メチル化と遺伝子サイレンシングの両方をスクリーニングするためのECISTマイクロアレイ」という名称で出願されたアメリカ合衆国仮特許出願シリアル番号第60/372,140号の優先権の恩恵を主張する。

【0003】

資金援助を受けた研究に関する報告

【0004】

この研究の一部は、国立がん研究所 (National Cancer Institute) からの国立がん研究所助成金番号CA-69065とCA-84701、ならびに陸軍医学研究指令からの助成金DAMD17-98-1-8214による援助を受けた。この研究の一部はさらに、国立がん研究所からの国立がん研究所助成金番号CA-85289とエビジェノミクス社による援助を受けた。アメリカ合衆国政府は、この発明に関して所定の権利を有する。

40

【0005】

配列リスト

【0006】

C.F.R.第37条の1.52(e)(5)に従う配列リストが、40629-5.txtという名称でサイズが1.703MBのファイルとして2003年4月14日に用意され、コンパクト・ディスク (全1枚) で提供されている。この配列リストは、参考としてその全体がこの明細書に組み込まれているも

50

のとする。

【0007】

本発明は、発現CpG島配列タグを用いてDNAのメチル化と遺伝子サイレンシングの両方を分析するための新規な高スループット法に関する。本発明は、メチル化によって沈黙していたのが脱メチル化されたときに再活性化する新規な遺伝子の同定法と、がん細胞における脱メチル化作用の効率とメカニズムを明らかにする方法にも関する。さらに本発明により、遺伝子の発現、DNAのメチル化、ヒストンのアセチル化を並行して評価するための新規な統合式三重分析マイクロアレイ・システムも提供される。さらに別の実施態様として、新規なECISTマイクロアレイが提供される。

【0008】

背景技術

GCリッチなDNA配列は、ヒトゲノムに含まれる全遺伝子の約半数のプロモータと第1エクソンに見いだされる (AntequeraとBird、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第90巻、11995～11999ページ、1993年)。このような配列は、従来からCpG島として知られている。CpG島は、変化したクロマチン構造や転写抑制と関係するエピジェネティックな現象であるDNAメチル化の標的になる可能性がある (Rountree, M.R.他、Oncogene、第20巻、3156～3165ページ、2001年)。哺乳動物の細胞は、DNA上でCpGジヌクレオチド (CpG) 内のグアニンの5'末端近傍にあるシトシン残基をメチル化するメチラーゼを持っている。メチル化が起こるのは、一般にパリンδροーム様のCpGジヌクレオチドという状況 (ただし、必ずしもこの状況とは限らない) でメチル基をS-アデノシルメチオニンからピリミジン環の5'位置に移す機能を有するDNAメチルトランスフェラーゼ (“Dnmts”) を触媒とするプロセスにおいてシトシンがDNAに組み込まれた後である (Ramsahoye他、2000年)。5-メチルシトシンはゲノム中に非対称に分布しており、CpGが少ない領域で非常によく見いだされる。というのも、体細胞にあるたいていのCpG島は、刷り込み遺伝子と不活性なX染色体上の遺伝子のプロモータ (Bird他、1985年) 以外はメチル化されない状態になっており、その場所の5'調節領域がメチル化すると転写抑制が起こる可能性があるからである。

【0009】

したがって正常な細胞では、CpG島のメチル化は、増殖に関して重要かつ組織特異的なやり方で遺伝子の発現を制御する上で大きな役割を担っている (JonesとTakai、Science、第293巻、1068～1070ページ、2001年)。しかしがん細胞では、CpG島の異常なメチル化 (一般には高メチル化) が、多くのがん抑制遺伝子とゲノムの安定性にとって重要な遺伝子の調節領域の5'末端において見いだされている (Esteller, M.他、Cancer Res.、第61巻、3225～3229ページ、2001年; Baylin, S.B.他、Hum. Mol. Genet.、第10巻、687～692ページ、2001年; JonesとLaird、Nat. Genet.、第21巻、163～167ページ、1999年)。現在のデータは、hisタイプのエピジェネティックな制御と腫瘍増殖の間に因果関係があることを示している (JonesとLaird、1999年)。したがって極めて重要ながん抑制遺伝子と安定化遺伝子を沈黙させると、腫瘍細胞がクローン式に増殖する (例えば上記文献)。

【0010】

したがって遺伝子サイレンシングに関係する可能性のある高メチル化したCpG島は、エピジェネティックな制御を受ける新規な遺伝子を探すための潜在的マーカーとなるため、診断と予後予測にとって潜在的に重要である。しかしこのような場合にメチル化と遺伝子サイレンシングが直接的または一次的 (因果的に) 結び付いていることを効果的に同定するのは難しい。というのも、細胞周期の制御、増殖因子/受容体シグナル伝達、レトロエレメント動員に関与する多数の遺伝子は、一般に脱メチル化された細胞状態において上方調節されるように見え (Jackson-Grusby, L.他、Nat. Genet.、第27巻、31～39ページ、2001年)、このような調節は下流のエピジェネティックな発現カスケードの一部としてCpG島のメチル化に二次的または間接的に関係しているらしいからである。

【0011】

したがって従来のメチル化アッセイは、単独でも、従来の遺伝子発現アッセイ法と組み合わせても、メチル化と遺伝子サイレンシングの間の新たな直接的関係を同定するための

10

20

30

40

50

効果的で正確な方法にはならない。その理由は、多彩な試薬セット（例えばメチル化プローブ、cDNAプローブ）が独立したアッセイの手続き（例えばメチル化アッセイ、ノーザンプロット法、cDNAアレイ・スクリーン）に必要とされ、可能な場合にはそれに続けて注意深いデータ関連作業が必要とされることにある。

【0012】

例えば、特定のCpG配列を含む配列領域が同定されていて特異的なプライマーおよび/またはプローブを構成できる場合には、その特定のCpG配列におけるメチル化状態を調べるためのさまざまなアッセイが従来技術で知られている。そのようなアッセイとしては、DNAシーケンシング法；サザン・プロッティング法；メチライト（登録商標）（蛍光に基づいたリアルタイムPCR法であり、Eads他、Cancer Res.、第59巻、2302～2306ページ、1999年；アメリカ合衆国特許第6,331,393号に記載されている）；MS-SNuPE（メチル化感受性単一ヌクレオチド・プライマー伸長アッセイのことであり、GonzalvoとJones、Nucleic Acids Res.、第25巻、2529～2531ページ、1997年；アメリカ合衆国特許第6,251,594号に記載されている）；MSP（メチル化特異的PCRアッセイのことであり、Herman他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第93巻、9821～9826ページ、1996年；アメリカ合衆国特許第5,786,146号に記載されている）；COBRA（亜硫酸水素塩と制限酵素を組み合わせる分析を行なうメチル化アッセイのことであり、XiongとLaird、Nucleic Acids Res.、第25巻、2532～2534ページ、1997年に記載されている）などがある。

10

【0013】

同様に、メチル化状態が異なる新規なCpG配列を発見するためのアッセイとしては、数はより少ないが、以下のような方法がある：制限ランドマーク・ゲノム走査（“RLGS”；Eng他、Nature Genetics、第25巻、101～102ページ、2000年；Costello他、Nature Genetics、第25巻、132～138ページ、2000年；Zhu他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第96巻、8058～8063ページ、1999年）；仮想的なゲノム走査と組み合わせたRLGS（“VGS”；Rouillard他、Genome Research、第11巻、1453～1459ページ、2001年）；メチル化されたCpG島の増幅（“MCA”；Toyota他、Cancer Res.、第59巻、2307～2312、第59巻、1999年；WO 00/26401A1）；アービトラリー・プライムド・ポリメラーゼ連鎖反応（“AP-PCR”；Liang他、Genomics、第53巻、260～268ページ、1998年）；ディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション（“DMH”；Yan他、Clin. Canc. Res.、第6巻、1432～1438ページ、2000年）。

20

30

【0014】

制限ランドマーク・ゲノム走査。制限ランドマーク・ゲノム走査（“RLGS”）法は、メチル化が異なる配列および領域を同定するのに用いられてきており、同定された領域をクローニングして配列を明らかにする。RLGS法は、特別な制限酵素（例えばNotI）によるDNAの特異的開裂がメチル化に対する感受性を持つという事実を利用する。さらに、NotIはCpGリッチなオクタヌクレオチド認識モチーフを持っているため、CpGリッチな“島”において開裂が優先的に起こる。そのため、NotIを用いてゲノムDNAを消化させ、NotIの互いにずれた末端部を標識した後、制限酵素（例えば5塩基および/または6塩基認識配列酵素）を用いてさらに消化させる操作に二次元電気泳動を組み合わせることにより、標識した少なくとも1つのNotI末端を有するCpG島関連断片を識別できるパターンを生成させている。このようなパターンを用いるとさまざまなゲノムDNAサンプルのメチル化状態を比較することができ、正常なゲノムDNAとは異なってテストするゲノムDNAサンプルの特定のNotI部位がメチル化されている場合には、末端を標識した対応する断片が、試験サンプルのRLGSパターンには見られないであろう（「スポットの消失」または不在に対応する）。（例えばNotI-EcoRV断片の）境界ライブラリを用いると、そのような領域に対応するクローニングされたDNAを得ることができる。

40

【0015】

しかし重要なことだが、CpGのメチル化を検出するためのこのような従来法のRLGS法には制約がある。それは、特に以下のような事実による：（i）特別なメチル化感受性制限酵素だけを用いることで、CpG島領域内のCpG配列だけが効果的に分析されること；（ii）（

50

検出が) NotI末端標識(またはそれと同等なもの)に依存すること; (iii) 正常な(テスト用) DNAの二次元パターンに存在する対応するパターンと比較して、テストするDNAスポット(すなわち、テスト用DNAサンプル中の特定のNotI部位がメチル化されるため、NotIによる消化で開裂しない位置)が消失する(より正確には、不在である)ことに依存していること。さらに、RLGS法では遺伝子の発現について何も明らかにならないため、メチル化に依存した遺伝子サイレンシングについても何も明らかにならない。

【0016】

仮想的なゲノム走査。仮想的なゲノム走査(VGS)は、RLGS法と組み合わせて利用することにより、RLGS走査において表示される興味の対象である断片を同定する方法になる。情報処理ツールを公知のヒトゲノム配列情報と組み合わせて利用し、例えば(第1のサイズのRLGS制限酵素として) NotIとEcoRVを用い、例えば(第2のサイズのRLGS制限酵素として) HinfIまたはDpnIIを用いて仮想的な走査を行なう。(介在するEcoRV部位が存在しない場合には) 特定のNotI部位に最も近いHinfI部位またはDpnII部位に基づき、予想されるNotI-EcoRV断片とNotI-NotI断片のサイズに加え、第2のサイズの断片のサイズが計算される(Rouillard他、Genome Research、第11巻、1453~1459ページ、2001年)。したがってRLGS配列の同定は、境界ライブラリを使用せずに行なうことができる。

10

【0017】

しかしこの方法は、RLGS法を利用して2つのサンプルの差を測定することにやはり依存しているため、上記の制約のほとんどが当てはまる。さらに、RLGS法と同様、VGS法により、遺伝子の発現に関しても、メチル化に依存した遺伝子サイレンシングに関しても、何も明らかにならない。

20

【0018】

メチル化されたCpG島の増幅。メチル化されたCpG島の増幅("MCA")は、CGリッチな高メチル化領域を迅速に増やすための、PRCに基づいた方法であり、ペアとなる特別なメチル化感受性酵素(すなわちSmaI)とメチル化不感受性酵素(すなわちXmaI)で順番に消化させた後、互いにずれたXmaI末端に連結するアダプターと特異的にハイブリダイズするプライマーに基づいてPCR増幅を行なう。さらに、制限部位は互いに近接した(1kb未満の)位置になければならない。

【0019】

したがって、従来のRLGS法におけるのと同様、この方法は、主に、CpGリッチなゲノム領域内の特定のCpG配列に限定される(Toyota他、Cancer Res.、第59巻、2307~2312、第59巻、1999年)。さらに、この方法は、メチル化感受性制限酵素SmaIを用いた不完全な消化に関するアーチファクトに敏感である。より複雑なマルチステップ法において、この方法を差し引きハイブリダイゼーション(RDA; 具体的差分分析)法と組み合わせると、高メチル化配列が豊富なクローニングされた断片を得ることができる(上記文献)。それにもかかわらず、RLGS法およびVGS法と同様、MCA法によっては、遺伝子の発現に関しても、メチル化依存遺伝子サイレンシングに関しても、何も明らかにならない。

30

【0020】

メチル化感受性アービトラリー・プライムドPCR。上の場合と同様、メチル化感受性アービトラリー・プライムド・ポリメラーゼ連鎖反応("AP-PCR")は、CGリッチな高メチル化領域を迅速に増やすための、PCRに基づいた方法であり、一般にDNA断片のサイズを小さくするメチル化不感受性酵素(例えばRsaI)に加え、別の反応で、イソ制限酵素のペアとしてメチル化感受性酵素とメチル化不感受性酵素(例えば、RsaI+HpaII、RsaI+MspI)を用いてDNAを同時に消化させた後、1つ以上の特異的オリゴヌクレオチド・プライマーを用いてPCR増幅する操作を含んでいる。この場合には、2つのプライマー部位に挟まれた領域にメチル化されていないHpaII(CCGG)配列が含まれているとPCR産物は産生されない。RsaIだけを用いたDNAの消化物と、RsaI+MspIを用いたDNAの消化物とを対照として用い、RsaI+HpaIIで消化させたDNAのバンドをAP-PCRで観察した場合にそのバンドが実際に増幅領域内のCCGG配列の異なったメチル化によるものであるかどうかを明らかにする(Gonz algo他、Cancer Res.、第57巻、594~599ページ、1997年)。

40

50

【0021】

したがって、メチル化感受性AP-PCR法は、プライマーの選択と同じ制約があり、上記のRLGS法およびMCA法と同様、特にCpGリッチなプライマー配列を広く用いる場合には主にCpG島領域に対する偏りがある(Liang他、Genomics、第53巻、260~268ページ、1998年)。一般に、メチル化感受性AP-PCR法は、MCA法の有効性を妨げるのと同じ多くのアーチファクト(例えば、制限酵素による不完全な消化、プライマー部位相互間の距離)の影響を受ける。さらに、RLGS法、VGS法、MCA法と同様、AP-PCR法によっては、遺伝子の発現に関しても、メチル化に依存した遺伝子サイレンシングに関しても、何も明らかにならない。

【0022】

ディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション。ディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション(“DMH”)は、アレイに基づいた方法であり、アレイ状に配置した(例えばCpG島ゲノム・ライブラリーからの)CpGリッチなタグを基準サンプルまたは腫瘍DNAサンプルからのアンプリコンを用いて調べて比較する操作を含んでいる(Huang, T.H.-M.他、Hum. Mol. Genet.、第8巻、459~470ページ、1999年; 2000年2月4日出願され、2003年3月7日に承認通知を受領した出願人のアメリカ合衆国特許出願シリアル番号第09/497,855も参照のこと。なおこれらの文献は、参考としてその全体がこの明細書に組み込まれているものとする)。テストしたCpG島アレイ上での腫瘍サンプルと基準サンプルにおけるシグナル強度の違いは、腫瘍DNA内の対応するメチル化の変化を反映している(Yan他、Clin. Canc. Res.、第6巻、1432~1438ページ、2000年)。固体支持体上にアレイ状に配置したCpG島タグのパネルを用い、DMHにより、乳がんおよび卵巣がんにおいて高メチル化遺伝子が同定されている(Yan, P.S.他、Clin. Canc. Res.、第6巻、1432~1438ページ、2000年; Ahluwalia, A.他、Gynecol. Oncol.、第82巻、261~268ページ、2001年)。

【0023】

DMHアンプリコンを産生させるには、DNAを消化し(例えば、TTAAを認識するMseIを用いた消化)、CpG島が保存された小さな(例えば約200bpの)DNA断片にする。断片の末端部にリンカーを連結させ、その断片をメチル化感受性酵素(例えばBstU I(既知のCpG島の77%がBstU I部位を含んでいる))を用いて消化させた後、突起しているリンカー末端部に付着させ、リンカー・プライマーを用いてPCR増幅を行なう。メチル化感受性酵素によって開裂した断片は、リンカー・プライマーによって増幅不能になるため、増幅された断片の集団は、メチル化されたアンプリコンが豊富になっている。

【0024】

したがってDMFIは、CpGリッチなゲノムDNA領域を分析するための高スループット法として、従来から知られている他の方法とはいい意味で区別される。しかし現在のところ、DMHには限界がある。それは、利用可能なアレイ式パネルに全ゲノムCpG島領域のわずか2%しか表示されないからである(上記文献)。さらに、従来から知られている上記のどの方法(例えばRLGS、VGS、MCA、AP-PCR)でも、DMHプロトコル単独では、遺伝子の発現とメチル化に依存した遺伝子サイレンシングについて何も明らかにならない。

【0025】

脱メチル化剤と遺伝子発現アッセイ。DNAのメチル化は、コードを変えることなくDNAの塩基配列を変化させるメカニズムであるという点と、遺伝可能な可逆的エピジェネティックな変化であるという点でユニークである。したがって現在は、がんの治療に脱メチル化剤を投与することが新たに脚光を浴びている(Santini, V.他、Ann. Intl. Med.、第134巻、573~586ページ、2001年)。しかし効果的に脱メチル化処理するには、がん細胞において特定の遺伝子が特定の脱メチル化剤に対してどのように反応するかを理解する必要がある。特に、メチル化アッセイと遺伝子サイレンシングに関連してすでに説明したように、遺伝子の発現を遺伝子のメチル化状態と効果的に関連づける方法に加え、発現アッセイが必要とされる。

【0026】

従来の発現アッセイ法としては、ノーザン・ブロットイング法、RT-PCRに基づいた方法、cDNAに基づいたスクリーニング法などが挙げられる。しかし従来の発現アッセイでは、

対象となる遺伝子のメチル化状態に関してまったく何も明らかにならず、直接的なエピジェネティック効果と間接的なエピジェネティック効果を区別することもほとんどできない。例えばcDNAマイクロアレイを応用して脱メチル化された細胞における遺伝子発現の全体的プロファイルが明らかにされている (Karpf, A.R.他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第96巻、14007~14012ページ、1999年; Jackson-Grusby, L.他、Nat. Genet.、第27巻、31~39ページ、2001年)。しかしこのようなアッセイでは対象とする遺伝子のメチル化状態に関して何も明らかにならず、上に述べたように、細胞周期の制御、増殖因子/受容体シグナル伝達、レトロエレメント動員に関係する多数の遺伝子は、下流のエピジェネティックなカスケードの一部として二次的に調節されるように見える。あるいはこのような遺伝子は、疾患状態の細胞においてメチル化とは独立に調節される可能性がある。

10

【0027】

したがって従来のDNA発現法だけを用いたのでは、脱メチル化に直接応答する(一次応答)遺伝子と、間接的に調節される(二次応答)遺伝子または独立に調節される遺伝子とを区別することができない。

【0028】

同様に、DMHアッセイや、従来技術における他のメチル化アッセイは、メチル化状態が異なるCpG配列を同定する大きな可能性を持っている一方で、単独では、このようにして同定された特定の配列が、同定された異なったメチル化によって転写調節される配列であるかどうかを明らかにする効果的な方法にならない。

【0029】

そのため、新形成やそれ以外の疾患において高メチル化されたプロモータを用いて遺伝子を同定または確認するだけでなく、遺伝子の発現も同時に測定して腫瘍発生その他の異常な細胞機能に関係する遺伝子を効果的に同定することのできる新規な高スループット法が、従来技術において必要とされている。がんの治療に使用されるさまざまなタイプの脱メチル化剤の効果と最適用量を効率的に研究するのに利用できる新規な方法が、従来技術において必要とされている。

20

【0030】

抑制されたクロマチンと遺伝子サイレンシング。機能的DNA-タンパク質相互作用を研究するのに利用されるマイクロアレイ法(例えばRen他、Science(ワシントンD.C.)、第290巻、2306~2309ページ、2000年; Weinmann他、Genes Dev.、第16巻、235~244ページ、2002年; Suzuki他、Nature Genet.、第31巻、141~149ページ、2002年)により、多数の転写調節因子がクロマチンのリモデリングに関係していることが明らかにされた(Suzuki他、Nature Genet.、第31巻、141~149ページ、2002年; Cameron他、Nature Genet.、第21巻、103~107ページ、1999年)。そのためこのタイプのエピジェネティックな変化が遺伝子調節の中心となっている。さらに詳しく述べると、抑制されたクロマチンと遺伝子サイレンシングは、DNAのメチル化およびヒストンのアセチル化における変化と関係しており(JonesとBaylin、Nature Rev. Genet.、第3巻、415~428ページ、2002年)、このようなエピジェネティックな修飾は、ヒトの腫瘍発生に寄与する因子として広く認識されている。遺伝子の5'末端調節領域がメチル化されたDNAは、ヒストンデアセチラーゼおよびそれ以外の転写コリプレッサーと複合体を形成することが知られているMBD(メチル-CpG結合ドメイン)タンパク質をリクルートする(BallestarとEsteller、Carcinogenesis、第23巻、1102~1109ページ、2002年)。ヒストン3およびヒストン4のリシン基の脱アセチル化は、HDAC(ヒストンデアセチラーゼ)を通じて起こり、負に帯電したDNAと正に帯電したリシンをより強く相互作用させ、閉じた抑制性クロマチン構造ができる(JonesとBaylin、Nature Rev. Genet.、第3巻、415~428ページ、2002年; BallestarとEsteller、Carcinogenesis、第23巻、1102~1109ページ、2002年)。抑制性クロマチン構造がDNAにいかにして組み込まれるかは明確になっていないが、遺伝子プロモータのCpG島のメチル化状態の変化がおそらく中心的な役割を担っている(JonesとBaylin、上記文献)。

30

40

【0031】

上記のDMH(ディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション)法は、CpGのメチ

50

ル化をスクリーニングし、さまざまながんにおけるエピジェネティックな修飾を受けやすい遺伝子座を同定するのに役立つ。遺伝子サイレンシングにおけるDNAのメチル化とヒストンのアセチル化が機能的に互いにどのように関係しているかを明らかにするには追加情報が必要とされる。

【0032】

ゲノム・マイクロアレイ・システムを利用して、遺伝子の発現、DNAのメチル化、ヒストンのアセチル化における変化を効果的に検出し、二次効果から一次効果を区別することが従来技術において強く必要とされている。これらパラメータの3つ全部（遺伝子の発現、DNAのメチル化、ヒストンのアセチル化）は単一のマイクロアレイまたは複数の同じアレイを用いることによって並列に評価できるため、効果的なゲノム・マイクロアレイ・システムが従来技術において必要とされている。

10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0033】

本発明の具体的な実施態様により、アレイ状に配置した発現CpG島配列タグ（“ECIST”）を利用してがん細胞におけるCpGの高メチル化と遺伝子の発現（例えば遺伝子サイレンシング）の両方を分析するための新規な高スループット法が提供される。この実施態様によれば、CpGリッチなECISTの断片は、がん細胞内の異常にメチル化されたCpG部位をスクリーニングするのに役立つ一方で、その断片のエキソン含有部分は、遺伝子の発現レベルを測定するのに用いられる。したがってECISTアレイ・パネルを用いて高メチル化した遺伝子座の同定とその発現レベルの測定を同時に行ない、乳がん細胞系におけるメチル化関連遺伝子サイレンシングを確認する。この結果は、ECISTが、CpG島が高メチル化することによって発現が沈黙する新規な遺伝子を同定するためのマーカーとして有効であることを示している。

20

【0034】

別の実施態様では、がんの治療における脱メチル化剤の効果、最適用量、タイプを研究するのにECISTマイクロアレイが有効である。さらに別の実施態様では、ECISTマイクロアレイが、脱メチル化処理後のイベントの配列を明らかにし、腫瘍ゲノムにおけるDNAの異常なメチル化のメカニズムを解明するためのツールとしても役に立つ。本発明の新規なマイクロアレイは、がんにおけるDNAメチル化と遺伝子発現の複雑な関係を分析するのに役立つ。本発明のECISTマイクロアレイは、正常な成長の間にメチル化によって制御される遺伝子と、ある種の遺伝病にとって重要な新規な刷り込み遺伝子を発見するのに役立つ。

30

【0035】

さらに別の実施態様では、ECISTマイクロアレイは、遺伝子の発現と、DNAのメチル化と、ヒストンのアセチル化を並行して調べるとともに、がんにおけるエピジェネティックな変化の複雑なヒエラルキーを一次応答と二次応答に関して分析するための新規な統合式「三重分析」システムにおいて役に立つ。

【0036】

好ましい一実施態様では、遺伝子の（第1エクソンを含む）5'末端領域に1,507個の短いCpG島タグ（ECIST）を有する統合式マイクロアレイ・パネルを利用し、細胞（例えばヒト上皮卵巣がん細胞系）に対するエピジェネティックな処理の効果を調べる。ECISTマイクロアレイは、メチル化阻害剤（DAC）または脱アセチル化阻害剤（TSA）のいずれかによる処理に応答した特定の遺伝子の発現（例えば上方調節）を分析するのに役立つ。またECISTマイクロアレイは、DACとTSAを組み合わせる場合に、いずれか一方だけによる処理に応答したよりも多くの遺伝子が相乗的に再活性化するかどうかを調べるのに役立つ。ECISTマイクロアレイは、処理に対する一次応答または二次応答の存在を調べることにより、遺伝子がメチル化に依存しているか、メチル化とは独立であるかを明らかにするのに役立つ。本発明によれば、メチル化に依存した遺伝子をDACとTSAで相乗的に再活性化させることにより、メチル化されたプロモータと脱アセチル化したヒストンの間の機能的

40

50

相互作用が存在するようになる。メチル化に依存したいくつかの遺伝子の発現増大は、ヒストンのアセチル化増大と関係しているのに対し、同定されたたいていの遺伝子の上方調節（本発明の三重分析システムで明らかになる）は、エピジェネティックなカスケードの下流でのイベントによる。本発明の三重マイクロアレイ・システムは、がんゲノムにおける転写因子とプロモータ標的の間のダイナミックな関係を分析するのに役立つ。

【0037】

本発明により、組織サンプルのゲノムCpGのメチル化とゲノム配列の発現を評価するための高スループット法であって、発現可能な遺伝子のエキソン配列またはその一部をそれぞれが含むCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片が表面に固着されている単一のマイクロアレイまたはその複製を使用し、その断片群に、組織サンプルのCpGリッチなゲノムDNAに由来する標的配列と、その組織サンプルのmRNAに由来する標的配列とを、検出可能に標識してからハイブリダイズさせる操作を含んでおり、発現可能な各遺伝子を表わすプローブと上記標的がハイブリダイズした程度が、組織サンプル中のメチル化されたゲノムCpG配列の存在と遺伝子の発現をそれぞれ反映しているため、マイクロアレイまたはその複製の表面にある発現可能な特定の遺伝子のゲノムCpGのメチル化と遺伝子の発現の両方が少なくとも部分的に評価されることを特徴とする方法が提供される。

10

【0038】

この方法がさらに、単一のマイクロアレイまたはその複製に第2の組織サンプルのCpGリッチなゲノムDNAに由来する標的配列と、その第2の組織サンプルのmRNAに由来する標的配列をハイブリダイズさせる操作を含み、そのとき第1の組織サンプルと第2の組織サンプルのDNAに由来する標的配列を識別可能に標識して単一のマイクロアレイまたはその複製に同時にハイブリダイズさせ、第1の組織サンプルと第2の組織サンプルのmRNAに由来する標的配列を識別可能に標識して単一のマイクロアレイまたはその複製に同時にハイブリダイズさせることにより、マイクロアレイまたはその複製の表面にある発現可能な特定の遺伝子のゲノムCpGのメチル化とゲノムの発現の両方に関して組織サンプル間の差を少なくとも部分的に評価することが好ましい。

20

【0039】

好ましい実施態様では、第1の組織サンプルと第2の組織サンプルが異なっており、テスト組織サンプルと対照組織サンプルに対応する。テスト組織サンプルががん組織に対応し、対照組織サンプルが正常組織に対応することが好ましく、両方のサンプルは同じタイプの組織に対応している。

30

【0040】

別の実施態様では、第1の組織サンプルと第2の組織サンプルが同じであり、組織サンプルの1つを脱メチル化剤で処理した後、処理した組織サンプルからゲノムDNAに由来するCpGリッチな標的配列とmRNAに由来する標的配列を調製する操作をさらに含み、そのことによって、脱メチル化剤が、マイクロアレイまたはその複製の表面にある発現可能な特定の遺伝子のゲノムCpGのメチル化とゲノムの発現の少なくとも一方に対して及ぼす効果を少なくとも部分的に評価し、そのことによって遺伝子サイレンシングの評価を行なう。脱メチル化剤には5-アザ-2'-デオキシシチジンが含まれることが好ましい。

【0041】

固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片のそれぞれは、1つの遺伝子のプロモータと第1エキソンの一部を含むことが好ましい。固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片のそれぞれは、CpG島配列またはその一部を含むことが好ましい。固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片のそれぞれは、発現CpG島配列タグ（ECIST）を含むことが好ましい。固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片は、CpGジヌクレオチド・リッチなゲノム・ライブラリに由来することが好ましい。

40

【0042】

CpGリッチなゲノムDNAに由来するハイブリダイズ可能な標的配列は、メチル化された1個以上のCpG配列を有するゲノムDNAに対応するCpGリッチなDNA断片を増幅する操作を含む方法によって調製することが好ましい。CpGリッチなゲノムDNAに由来するハイブリダイズ

50

可能な標的配列は、メチル化感受性制限酵素の利用を含む方法によって調製することが好ましい。好ましい実施態様では、CpGリッチなゲノムDNAに由来する上記標的配列の調製と、その標的配列のマイクロアレイまたはその複製へのハイブリダイゼーションを、メチル化されたCpG島遺伝子座に対応する標的アンプリコンの生成を含むディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション (DMH) 法によって実施する。

【0043】

mRNAに由来する標的配列の調製に、RNAリガーゼ媒介cDNA合成 (RLCS) 法とRT-PCR法のうちの少なくとも一方が含まれることが好ましい。CpGリッチなゲノムDNAに由来する標的配列とmRNAに由来する標的配列をマイクロアレイにハイブリダイズさせる操作を、単一のマイクロアレイまたはその複製を用いて順番に行なうことが好ましい。別の方法では、CpGリッチなゲノムDNAに由来する上記標的配列とmRNAに由来する上記標的配列をマイクロアレイにハイブリダイズさせる操作を、複数の複製マイクロアレイを用いて並列に行なう。

【0044】

別の実施態様では、本発明により、組織サンプルのゲノムCpGのメチル化とゲノム配列の発現を評価するための高スループット法であって、組織サンプルからゲノムDNAを取得し、そこから、ハイブリダイズ可能で検出可能な標識を有する、CpGリッチなゲノムDNAに由来する標的配列を調製するステップと；組織サンプルからゲノムDNAを取得し、そこから、ハイブリダイズ可能で検出可能な標識を有する、mRNAに由来する標的配列を調製するステップと；DNAに由来する標識した上記標的配列とmRNAに由来する標識した上記標的配列の両方を、発現可能な1つの遺伝子のエクソン配列またはその一部をそれぞれが含むCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片が表面に固着されている単一のマイクロアレイまたはその複製にハイブリダイズさせ、そのとき上記標的が発現可能な各遺伝子のプローブとハイブリダイズした程度が、組織サンプル中のメチル化されたゲノムCpG配列の存在と遺伝子の発現を反映しているステップと；マイクロアレイまたはその複製の表面にある発現可能な特定の遺伝子のゲノムCpGのメチル化とゲノムの発現を、少なくとも一部はこのハイブリダイゼーションに基づいて評価するステップを含む方法が提供される。

【0045】

さらに別の実施態様では、本発明により、上記の方法が、標的組織のアセチル化したヒストン関連DNAに由来する標的配列を単一のマイクロアレイまたはその複製にハイブリダイズさせる操作をさらに含み、ヒストンに関係するこの標的配列が発現可能な各遺伝子のプローブとハイブリダイズしている程度が、遺伝子に関係したアセチル化したヒストンの存在を反映しており、そのことによってマイクロアレイまたはその複製の表面にある発現可能な特定の遺伝子のゲノムCpGのメチル化、ゲノムの発現、遺伝子に関係したアセチル化したヒストンのうちの少なくとも1つが少なくとも部分的に評価されることを特徴とする方法が提供される。

【0046】

上記の方法が、単一のマイクロアレイまたはその複製に第2の組織サンプルのCpGリッチなゲノムDNAに由来する標的配列と、その第2の組織サンプルのmRNAに由来する標的配列と、その第2の組織サンプルのアセチル化したヒストン結合DNAに由来する標的配列とをハイブリダイズさせる操作をさらに含み、そのとき第1の組織サンプルと第2の組織サンプルの各標的配列を識別可能に標識し、それぞれの場合に単一のマイクロアレイまたはその複製に同時にハイブリダイズさせることにより、マイクロアレイまたはその複製の表面にある発現可能な特定の遺伝子のゲノムCpGのメチル化、ゲノムの発現、遺伝子に結合したヒストンのアセチル化のいずれかに関して組織サンプル間の差を少なくとも部分的に評価できることが好ましい。

【0047】

特に好ましい実施態様では、第1の組織サンプルと第2の組織サンプルが同じであり、組織サンプルの1つを脱メチル化剤とヒストンデアセチラーゼ阻害剤の少なくとも一方で処理した後、処理した組織サンプルからmRNAに由来する標的配列とアセチル化したヒストン結合DNAに由来する標的配列を調製する操作をさらに含み、そのことによって、脱メチル

化剤とヒストンデアセチラーゼ阻害剤が、単独で、あるいは組み合わせとして、マイクロアレイまたはその複製の表面にある発現可能な特定の遺伝子のゲノムCpGのメチル化、ゲノムの発現、遺伝子に結合したヒストンのアセチル化のうちの少なくとも1つに対して及ぼす効果を少なくとも部分的に評価し、そのことによってエピジェネティックなイベント相互の関係を評価する。

【0048】

脱メチル化剤が5-アザ-2'-デオキシシチジンであり、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤がトリコスタチンAであることが好ましい。

【0049】

本発明により、発現可能な遺伝子のエキソン配列またはその一部をそれぞれが含む複数のゲノム・プローブ断片が表面に固着されたマイクロアレイが提供される。固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片は、1つの遺伝子のプロモータと第1エキソンの一部を含むことが好ましい。固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片は、CpG島配列またはその一部を含むことが好ましい。固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片は、発現CpG島配列タグ (ECIST) を含むことが好ましい。固着したCpGリッチな複数のゲノム・プローブ断片は、CpGジヌクレオチド・リッチなゲノム・ライブラリに由来することが好ましい。

【0050】

発明の詳細な説明

【0051】

略語と定義

【0052】

“DMH”は、高スループット・ディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション法の略号である (Huang, T.H.-M.他、Hum. Mol. Genet.、第8巻、459~470ページ、1999年；出願人が2000年2月4日出願され、2003年3月7日に承認通知を受領したアメリカ合衆国特許出願シリアル番号第09/497,855号も参照のこと、なおこの出願は、参考としてその全体がこの明細書に組み込まれているものとする)。

【0053】

“ECIST”は、発現CpG島配列タグの略号である。

【0054】

“DAC”すなわち“デオキシC”は、5-アザ-2'-デオキシシチジンの略号である。

【0055】

“aa-dUTP”は、アミノ-アリルdUTPの略号である。

【0056】

“SAM”は、マイクロアレイの有意分析、あるいは特別な文脈ではS-アデノシルメチオニンを意味する略号である。

【0057】

“RACE”は、従来のcDNA末端高速増幅法を意味する略号である。

【0058】

“MBD”という用語は、メチル-CpG結合ドメインを意味する。

【0059】

“HDAC”という用語は、ヒストンデアセチラーゼを意味する。

【0060】

“TSA”という用語は、トリコスタチンAを意味する。

【0061】

“RLCS”という用語は、RNAリガーゼ媒介cDNA合成法を意味する。

【0062】

“ChIP”という用語は、クロマチン免疫沈降法を意味する。

【0063】

“COBRA”という用語は、亜硫酸水素塩と制限酵素を組み合わせた分析法を意味する (X 50

iongとLaird、Nucleic Acids Res.、第25巻、2532～2534ページ、1997年）。

【0064】

“DNMT1”という用語は、DNAメチルトランスフェラーゼを意味する。

【0065】

“アンプリコン”は、細胞または組織に対応する増幅された核酸配列のことであり、この明細書に記載したようなマイクロアレイのハイブリダイゼーション標的（例えば固定化したECISTプローブ）として使用される。

【0066】

“CpGリッチなゲノム・プローブ”または“CpGリッチなゲノム・プローブ断片”という表現は、“GC含量”が0.5以上（すなわちグアニン+シトシンが50%以上）のゲノムDNA配列に対応する核酸配列を意味する。このようなプローブとしては、固体支持体（特に、この明細書に記載したマイクロアレイの実施例）に固着されたプローブが挙げられる。このようなプローブには、以下に定義する“CpG島”も含まれる。

【0067】

“CpGリッチなゲノムDNA”という表現は、“GC含量”が0.5以上（すなわちグアニン+シトシンが50%以上）のゲノムDNA配列を意味する。

【0068】

“CpGリッチなゲノムDNAに由来する標的配列”という表現は、“CpGリッチなゲノムDNA”に対応するハイブリダイゼーション標的配列を意味する。そのような標的配列としては、例えば、ゲノムDNAまたはゲノムDNA断片を増幅することによって調製した標的配列が挙げられる。

【0069】

“mRNAに由来する標的配列”という表現は、発現ゲノム配列（すなわちmRNA）に対応するハイブリダイゼーション標的配列を意味する。そのような標的配列としては、例えば、従来のRNAリガーゼ媒介cDNA合成（RLCS）法で調製した標的配列が挙げられる。mRNAに由来する標的配列を調製するのに用いる方法では、第1エキソンを含むmRNAの5'末端配列が維持されていることが好ましい。

【0070】

“標的組織のアセチル化されたヒストンに結合したDNAに由来する標的配列”という表現は、アセチル化されたヒストンに関係する（アセチル化されたヒストンと複合体を形成する）ゲノム配列に対応するハイブリダイゼーション標的配列を意味する。この結合または複合体化は、アセチル化されたヒストンH3またはヒストンH4との間になされることが好ましい。このアセチル化されたヒストンは、1つの遺伝子のCpGリッチなプロモータ領域と、あるいは1つの遺伝子の1つのエキソンと、あるいはその両方と関係していること、あるいは複合体を形成することが好ましい。このアセチル化されたヒストンは、CpG島と、あるいはその一部で1つの遺伝子のプロモータ領域に対応する部分と結合していること、あるいは複合体を形成することが好ましい。このような標的配列は、例えばWeinmanらの方法（Genes Dev.、第16巻、235～244ページ、2002年）を利用して調製する。ただし、抗E2F1抗体を用いる代わりに、アセチル化されたヒストンとDNAの複合体を免疫沈降させるために抗アセチル化ヒストン抗体を使用する。本発明の特に好ましい実施態様では、このような標的配列は、テストする組織サンプルを脱メチル化剤とヒストンデアセチラーゼ阻害剤の少なくとも一方で処理した前と後の両方に調製し、本発明のECISTマイクロアレイを用いて競合ハイブリダイゼーションさせるのに用いる。

【0071】

“観測値/予測値の比”（“O/E比”）とは、特定のDNA配列に含まれるCpGジヌクレオチドの頻度を意味し、 $[\text{CpG部位の数} / (\text{C塩基の数} \times \text{G塩基の数})] \times \text{各断片のバンド長}$ に対応する。

【0072】

“CpG島”とは、（1）CpGジヌクレオチドの頻度が“観測値/予測値の比” >0.6 に対応することと、（2）“GC含量” >0.5 であることの両方の条件を満たすゲノムDNAの連続領域

10

20

30

40

50

を意味する。CpG島は、一般に、長さが約0.2～約1kb、約0.2～約2kb、約0.2～約3kbのいずれかであるが、必ずしもそうなっているとは限らない。

【0073】

“メチル化状態”とは、DNA配列内の1つまたは複数のCpGジヌクレオチドに5-メチルシトシン(“5-mCyt”)が存在しているか不在であることを意味する。あるDNA配列内の1つ以上の特定のパリンδροームCpGメチル化部位(それぞれが2つのCpG CpGジヌクレオチド配列を有する)におけるメチル化状態としては、“非メチル化”、“完全メチル化”、“半メチル化”がある。

【0074】

“半メチル化”という用語は、パリンδροームCpGメチル化部位のメチル化状態のうち、パリンδροームCpGメチル化部位の2つあるCpGジヌクレオチド配列の一方における1つのシトシンだけがメチル化されている状態を意味する(例えば5'-CC^mGG-3'(上方の鎖):3'-GGCC-5'(下方の鎖))。 10

【0075】

“高メチル化”という用語は、テストするDNAサンプルのDNA配列に含まれる1つまたは複数のCpGジヌクレオチドに存在する5-mCytの量が、正常な対照用DNAサンプル中の対応するCpGジヌクレオチドに見られる5-mCytの量と比べて増加していることに対応するメチル化状態を意味する。

【0076】

“低メチル化”という用語は、テストするDNAサンプルのDNA配列に含まれる1つまたは複数のCpGジヌクレオチドに存在する5-mCytの量が、正常な対照用DNAサンプル中の対応するCpGジヌクレオチドに見られる5-mCytの量と比べて減少していることに対応するメチル化状態を意味する。 20

【0077】

“新規メチル化”という用語は、(パリンδροームCpGメチル化部位内の)合成後にメチル化されていないCpGジヌクレオチド配列が完全にメチル化されたCpG配列に変換されることを意味する。

【0078】

“維持メチル化”という用語は、(パリンδροームCpGメチル化部位内の)合成後に半メチル化されているCpGジヌクレオチド配列が完全にメチル化されたCpG配列に変換されることを意味する。 30

【0079】

“マイクロアレイ”という用語は、従来技術で知られているように、広く「DNAマイクロアレイ」と「DNAチップ」の両方を意味する。この用語には、従来技術で知られているあらゆる固体支持体と、核酸分子をその固体支持体に固着させるあらゆる方法、核酸分子をその固体支持体上で合成するあらゆる方法が含まれる。

【0080】

分子レベルでの核酸の操作を含むこの明細書に開示した手続きは、当業者には公知である。一般的な文献として、Fredrick M. Ausbel他、1995年、『分子生物学における簡単なプロトコル』(ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社)と、Joseph Sambrook他、1989年、『分子クローニング、実験室マニュアル』、第2版(コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス社)を参照のこと。なおこれら文献の内容は、参考としてこの明細書に組み込まれているものとする。 40

【0081】

DNAの高メチル化と遺伝子サイレンシングの二重スクリーニングを行なうためのECISTマイクロアレイ;スクリーニング・アレイ

【0082】

本発明のスクリーニング・アレイは、固体支持体に固着されたCpGジヌクレオチド配列リッチな多数の断片を備えている。スクリーニング・アレイの固体支持体に固着されたCpGジヌクレオチド配列リッチな断片を利用して、特に細胞(ゲノムDNA)内にメチル化部位 50

が存在しているかどうかを明らかにする。さらに、CpGジヌクレオチドの断片としては、CpGジヌクレオチドが核酸配列を少なくとも50%含んでいて、長さが約0.2~約1kbである任意の核酸断片が可能である。

【0083】

好ましい実施態様では、固着されたCpGジヌクレオチド配列リッチな断片は、以下に説明するように、発現CpG島配列タグ (ECIST) を含んでいる。固着されたCpGジヌクレオチド配列リッチな断片は、本発明によると、ゲノムDNAのメチル化と遺伝子発現の両方を高スループットで分析するのに用いられる。

【0084】

好ましい実施態様では、スクリーニング・アレイの固体支持体に固着させるCpGジヌクレオチド断片の選択は、配列ID番号1、配列ID番号2、配列ID番号3、配列ID番号4、配列ID番号5、配列ID番号6、配列ID番号7、配列ID番号8、配列ID番号9、配列ID番号10、配列ID番号11、配列ID番号12、配列ID番号13、配列ID番号14、配列ID番号15、配列ID番号16、配列ID番号17、配列ID番号18、配列ID番号19、配列ID番号20、配列ID番号21、配列ID番号22、配列ID番号23、配列ID番号24、配列ID番号25、配列ID番号26、配列ID番号27、配列ID番号28、配列ID番号29、配列ID番号30、配列ID番号31、配列ID番号32、配列ID番号33、配列ID番号34、配列ID番号35、配列ID番号36、配列ID番号37、配列ID番号38、配列ID番号39、配列ID番号40、配列ID番号41、配列ID番号42、配列ID番号43、配列ID番号44、配列ID番号45、配列ID番号46の中から行なう。

10

【0085】

CpGジヌクレオチドの断片は、ゲノム・ライブラリ (より好ましいのは、CpGジヌクレオチドの濃度を大きくしたゲノム・ライブラリ) から選択したDNAクローンに由来することが好ましい。そのようにCpGジヌクレオチドが多いゲノム・ライブラリの具体例は、CGIライブラリ、鳥類のCGIライブラリ、マウスのCGIライブラリであり、どれもイギリス・ヒトゲノム・センターから入手できる。好ましい実施態様では、核酸断片はCGIライブラリのDNAクローンに由来し、それ自体がCpG島またはその一部になっている。好ましい実施態様では、そのCpG島を含む断片がECISTである。

20

【0086】

核酸の断片があらかじめ存在しているライブラリ (例えばCGIライブラリ) のDNAクローンに由来する場合には、そのライブラリを酵素であらかじめスクリーニングして反復配列を除去することが好ましい。反復配列は、ゲノム全体に散らばっている未知機能の何千もの短いDNAであり、ハイブリダイゼーション・プロセスを潜在的に阻害する可能性がある。好ましい方法では、AluIファミリーやKpnIファミリーなどの反復配列とハイブリダイズするCot-1法を利用する。次に、Cot-1ハイブリダイゼーション・シグナルがマイナスまたは弱いプラスであるDNAクローンを選択して増幅する (すなわちCot-1 DNAに対してプラスのクローンは選択されない)。

30

【0087】

選択したCpGジヌクレオチド核酸の断片は、従来技術で知られている増幅法で増幅する。出発材料となる核酸の鋳型として、標的DNA配列 (例えばCpG島またはその一部) を含む特別な核酸配列、あるいは標的DNA配列に対応する特別な核酸配列を含む任意の核酸サンプルが用いられる。したがって増幅法ではDNAまたはRNAを利用することができる。このDNAまたはRNAは、二本鎖でも一本鎖でもよい。RNAを鋳型として用いる場合には、従来技術で知られている酵素、および/または鋳型をDNAに逆転写するための最適条件を利用する。

40

【0088】

適切なインビトロ増幅法としては、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法、転写に基づいた増幅系 (TAS)、自己維持配列複製系 (3SR)、連結増幅反応 (LAR) 法、QB RNA複製系、ラン・オフ転写法などが挙げられるが、これですべてというわけではない。好ましい増幅法は、少ない反応ステップ数で指数関数的な量の標的遺伝子座 (例えばCpG島またはその一部) が生み出される酵素連鎖反応を含むPCR法である。PCR増幅法や、PCRを変形した

50

他の多くの方法は公知であり、多くの文献に記載されている（例えばSaiki他、Science、第239巻、487～491ページ、1988年；アメリカ合衆国特許第4,682,195号、第4,683,202号、第4,800,159号を参照のこと。なおこれらの文献は、参考としてこの明細書に組み込まれているものとする）。

【0089】

一般に、選択したDNAクローンを変性させて一本鎖を形成し、それを鋳型として用いる。1つのオリゴヌクレオチド・プライマーは、マイナス(-)鎖と実質的に相補的であり、別のプライマーは、プラス(+)鎖と実質的に相補的である。DNAプライマーは、プライマー伸長産物の合成を開始させることのできるDNA配列である。標的核酸配列のそれぞれの鎖と“実質的に相補的な”プライマーは、当業者に知られている好ましい条件下（例えばpH、塩、カチオン、温度に関する公知の条件）でそれぞれの核酸鎖とハイブリダイズすることになる。従来技術で知られているように、そのような条件は、例えばプライマー配列のサイズとGC含量を反映している。好ましい実施態様では、増幅ステップで使用するプライマーは、HGMP3558：5'-CGG CGG CCT GCA GGT CTG ACC TTA A（配列ID番号47）とHGMP3559：5'-AAC GCG TTG GGA GCT CTC CCT TAA（配列ID番号48）である。

10

【0090】

プライマーをアニールして変性したDNA鋳型にした後、酵素を用いて伸長させると、CpG島が含まれた標的DNA配列を含む新たに合成された+鎖と-鎖が得られる。このアニール・プロセスは、緩衝水溶液の中でプライマーをDNA配列の鋳型の相補的ヌクレオチドとハイブリダイズさせることからなる。次に、DNA鋳型とプライマーを含むこの緩衝混合物を、DNAの相補的な2本の鎖を分離させるのに十分な温度まで加熱する。好ましい実施態様では、DNA鋳型とプライマーを含むこの混合物を約1～10分間（より好ましくは1～4分間）にわたって約90～100℃に加熱してDNA鋳型を変性させ、一本鎖を形成する。次に、この混合物を、興味の対象である遺伝子または配列に隣接する配列にプライマーが特異的にアニールできる温度まで冷却する。この混合物は、約1～5分間にわたって50～60℃に冷却することが好ましい。DNA鋳型に効果的にアニールさせる上で、プライマーのヌクレオチド配列がDNA鋳型の対応部分と完全に相補的である必要はないことが理解されよう。

20

【0091】

次に、プライマーを伸長させる酵素を添加してプライマー伸長反応を開始させ、新たに合成されたDNA鎖を産生させる。プライマーを伸長させる酵素としては、熱に対して安定で、各変性サイクルの後に酵素を添加する必要のない酵素（例えば（超好熱性古細菌パイロコッカス・ウォエセイからの）pwoDNAポリメラーゼ、テルムス・アクアティクスDNAポリメラーゼ、テルモコッカス・リトラリスDNAポリメラーゼ）を使用することが好ましい。使用可能な好ましい他の増幅用酵素としては、大腸菌DNAポリメラーゼI、大腸菌DNAポリメラーゼIのクレノウ断片、T4 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、テルムス・アクアティクス（Taq）DNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼ、T7 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼ、T4ポリヌクレオチドキナーゼ、トリ骨髄芽球腫ウイルスの逆転写酵素、モロニーマウス白血病ウイルスの逆転写酵素、T4 DNAリガーゼ、大腸菌DNAリガーゼ、Qβレプリカーゼなどが挙げられるが、これですべてというわけではない。次に、反応混合物の温度を、DNAポリメラーゼがDNAを伸長させるのに最適な値に設定する。

30

40

【0092】

新たに合成された鎖を鋳型として用いて増幅サイクルを繰り返す。したがってPCRは、DNAを溶融させ、アニールし、伸長させるというサイクルを多数回繰り返して標的CpG島を含む標的DNA配列を指数関数的に作り出すことからなる。

【0093】

増幅後、メチル化感受性制限酵素を用いた消化によって増幅産物のメチル化感受性部位を同定することが好ましい。そのようなメチル化感受性酵素としては、メチル化されていないCpGジヌクレオチド領域を消化するBstU I、SmaI、SacII、EagI、MspI、HpaII、HhaI、BssHIIなどがある。好ましい実施態様では、BstU Iを使用する。メチル化感受性部位を含むプラスのCpGジヌクレオチド核酸断片を利用してディファレンシャル・メチル化ハ

50

イブリダイゼーション (DMH) を行ない、DNAのメチル化を高スループットで分析する。

【0094】

従来法を利用し、増幅したCpGジヌクレオチド・リッチな断片を変性させ、固体支持体に移し、その表面に固定化する。CpGジヌクレオチド・リッチな断片を固体支持体に架橋させるのに使用できる方法としては、UV光、ポリ-L-リシン処理、熱などが挙げられるが、これですべてというわけではない。好ましい一実施態様では、増幅したCpGジヌクレオチド・リッチな断片をUV光を利用して変性させ、固体支持体に移し、その表面に固定化すると、CpGジヌクレオチド・リッチな断片が固体支持体に架橋する。どのアッセイにするかによって異なるが、増幅したCpGジヌクレオチド・リッチな断片を少なくとも約20個固体支持体に移してその表面に固定化する。この個数は、少なくとも約100個であることが好ましく、少なくとも約500個であることがより好ましく、少なくとも約1,000個であることが最も好ましい。

10

【0095】

本発明の好ましい一実施態様では、スクリーニング・アレイの固体支持体に固着したCpGジヌクレオチド・リッチな断片は、発現配列を含むCpG島である。この明細書では、今後、発現配列を含むCpG島の断片を発現CpG島配列タグ (ECIST) と呼ぶ。好ましい一実施態様では、ECIST断片は、1つの遺伝子のプロモータと第1エキソンの一部を含んでいる。一般に、各ECIST断片の長さは少なくとも約0.3kbである。この長さは約0.4~0.5kbであることが好ましく、約0.4kbであることが最も好ましい。好ましい一実施態様では、スクリーニング・アレイの固体支持体に固着させるECIST断片はCpG島の断片であり、その選択は、配列ID番号1、配列ID番号2、配列ID番号3、配列ID番号4、配列ID番号5、配列ID番号6、配列ID番号7、配列ID番号8、配列ID番号9、配列ID番号10、配列ID番号11、配列ID番号12、配列ID番号13、配列ID番号14、配列ID番号15、配列ID番号16、配列ID番号17、配列ID番号18、配列ID番号19、配列ID番号20、配列ID番号21、配列ID番号22、配列ID番号23、配列ID番号24、配列ID番号25、配列ID番号26、配列ID番号27、配列ID番号28、配列ID番号29、配列ID番号30、配列ID番号31、配列ID番号32、配列ID番号33、配列ID番号34、配列ID番号35、配列ID番号36、配列ID番号37、配列ID番号38、配列ID番号39、配列ID番号40、配列ID番号41、配列ID番号42、配列ID番号43、配列ID番号44、配列ID番号45、配列ID番号46の中から行なう。

20

【0096】

ECIST断片は、DNAクローンをゲノム・ライブラリから選択して上記のようにして増幅した後に同定するとよい。ECIST断片は、増幅したCpGジヌクレオチド・リッチな断片を膜に移し、核酸プローブを用いてそのCpGジヌクレオチド・リッチな断片をスクリーニングすることにより、調べるサンプルの中で発現している配列を含むCpGジヌクレオチド・リッチな断片を検出する。ECIST断片を検出するのに用いる核酸プローブは、任意の供給源 (例えば乳房組織、大腸組織、卵巣組織、肺組織、前立腺組織) からのものが可能であり、従来技術で知られている多彩な方法で抽出することができる。さらに、核酸プローブとしては、遺伝子のDNA、cDNA、RNA; 上記標的配列のうちの少なくとも1つを含む遺伝子断片; そのようなcDNA断片に対応するRNA断片が可能である。好ましい一実施態様では、ECIST断片をスクリーニングするのに用いる核酸プローブは、cDNAプローブである。増幅したCpGジヌクレオチド・リッチな断片に対する核酸プローブのハイブリダイゼーション・シグナルがプラスであるということは、ECIST断片が存在していることを意味する。

30

40

【0097】

ECIST断片を同定するためのスクリーニングを行なった後、メチル化感受性制限酵素を用いた消化によって増幅産物のメチル化感受性部位を同定することが好ましい。そのようなメチル化感受性酵素としては、メチル化されていないCpGジヌクレオチド領域を消化するBstU I、SmaI、SacII、EagI、MspI、HpaII、HhaI、BssHIIなどがある。好ましい一実施態様では、BstU Iを使用する。メチル化感受性部位を含むプラスのCpGジヌクレオチド核酸断片が、DMH分析に使用するECIST断片である。CpGジヌクレオチド断片がECIST断片である場合には、消化されない核酸断片は、発現した遺伝子のプロモータと第1エキソンの一

50

部を含んでいる。

【0098】

従来法を利用し、ECIST断片を変性させ、固体支持体に移し、その表面に固定化する。ECIST断片を固体支持体に架橋させるのに使用できる方法としては、UV光、ポリ-L-リシン処理、熱などが挙げられるが、これですべてというわけではない。好ましい一実施態様では、ECIST断片を変性させ、固体支持体に移し、その表面に固定化し、UV光を利用してECIST断片を固体支持体に架橋させる。どのアッセイにするかによって異なるが、ECIST断片を少なくとも約20個固体支持体に移してその表面に固定化する。この個数は、少なくとも約100個であることが好ましく、少なくとも約500個であることがより好ましく、少なくとも約1,000個であることが最も好ましい。

10

【0099】

固体支持体に固着したECIST断片は、この明細書に記載してある固着したCpGジヌクレオチド・リッチな他の断片と同様、細胞サンプル(ゲノムDNAサンプル)中にメチル化されたCpGジヌクレオチド部位が存在しているかどうかを明らかにするのに使用する。さらに、本発明によれば、ECIST配列のエキソン含有部分を用いると、テストしている細胞サンプル中の対応する遺伝子の発現レベルを測定することができる。

【0100】

別の方法として、当業者であればわかるように、ECIST断片と非ECIST断片の両方を含む一般的なアレイを上記のようにしてあらかじめスクリーニングしてECISTを同定した後、その混合アレイを用いてメチル化と発現の両方を分析する。

20

【0101】

したがって本発明は、発現した遺伝子配列を含むスクリーニング・アレイを作る方法であって、核酸配列を、その核酸配列を消化してCpG島が保存された断片群にする酵素と接触させ；その断片群を増幅して複数のCpG島断片群を形成し；核酸プローブを用いてその複数のCpG島断片群をスクリーニングすることにより、発現配列を含むCpG島断片群を同定し；発現配列を含むCpG島断片群をスクリーニング・アレイの固体支持体に固着させる操作を含む方法を対象とする。

【0102】

CpGジヌクレオチド断片に加え、公知の他のDNA配列も固体支持体の表面に配置することにより、オリエンテーション用マークにするとともに、ハイブリダイゼーション・シグナルの強度の基準にすることができる。例えばER、WT1、Rb、p16に関するCpGジヌクレオチド断片を使用することができる。

30

【0103】

本発明では、CpGジヌクレオチド・リッチな断片を付着させることのできる任意の固体支持体を用いることができる。適切な固体支持体材料の具体例としては、ケイ酸塩(例えばガラス、シリカゲル)、セルロース紙、ニトロセルロース紙、ナイロン膜などが挙げられるが、これですべてというわけではない。固体支持体材料はさまざまな形態で使用することができる。例えばスライドや膜にするが、これですべてというわけではない。スライドには機能的な利点がいくつかあるため、固体支持体の好ましい形態の1つである。スライドガラスを用いると、平坦であるためにプローブやハイブリダイゼーション試薬を最少にすることができる。スライドだと、試薬を標的に付着させることが可能であり、一定の温度に維持することが容易であり、洗浄が容易であり、固体支持体に固定化したRNAおよび/またはDNAを直接見ることが容易である。

40

【0104】

CpGジヌクレオチド・リッチな断片を含む汎用DNAアレイまたは一般的なDNAアレイを開発すると、さまざまなタイプのがんのメチル化をスクリーニングするためのハイブリダイゼーション用鑄型として用いることができる。がんとしては、乳がん、前立腺がん、大腸がん、肺がん、肝臓がん、卵巣がんなどが挙げられるが、これですべてというわけではない。しかし当業者であれば、特定のタイプのがんに対して特異的なCpGジヌクレオチド・リッチな断片を含むスクリーニング・アレイを開発することができよう。

50

【0105】

アンプリコンの調製

【0106】

アンプリコンは細胞または組織に対応する増幅された核酸配列であり、この明細書に記載したマイクロアレイ用のハイブリダイゼーション標的（例えばECISTプローブ）として使用される。

【0107】

本発明のアンプリコンは、細胞サンプルに由来する増幅された核酸配列の断片であり、スクリーニング・アレイのCpGジヌクレオチド・リッチな断片を調べるのに使用される。一般にアンプリコンは、標的核酸配列のコピーを含む一本鎖または二本鎖の増幅産物である。

10

【0108】

ディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション（DMH）分析の準備。ディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション（DMH）を目的として、アンプリコンを調製する。アンプリコンは、サンプルからヌクレオチド配列（好ましくはDNA）を単離して精製した後、配列を断片群に切断するがCpGジヌクレオチド・リッチな領域は残す（例えばCpG島は完全なまま残る）制限エンドヌクレアーゼを用いてこの単離・精製したヌクレオチド配列を消化させることによって調製する。

【0109】

ゲノムDNAサンプルは、正常な（対照）細胞から、あるいは個人の原発性腫瘍から、あるいは腫瘍細胞を含む臨床サンプルから得ることができる。アンプリコンの調製に使用できるがん細胞のタイプとしては、乳がん、卵巣がん、大腸がん、白血病、腎臓細胞がん、肝細胞がん、肺がんなどが挙げられるが、これですべてというわけではない。ゲノムDNAサンプルは、任意の哺乳動物の体液、分泌物、細胞、組織のいずれかからと、培養した任意の細胞または組織から得ることができる。好ましい一実施態様では、メチル化されたCpGジヌクレオチド配列を含むアンプリコンを2セット調製する。1つのセットは、基準として使用する非腫瘍（対照）細胞に由来するDNAから調製し、2番目のセットは、腫瘍細胞から調製する。

20

【0110】

使用する制限酵素は、核酸配列のCpGジヌクレオチド・リッチな領域以外の領域に認識部位を有する酵素であることが好ましい。好ましい一実施態様では、ヌクレオチド配列のうちでCpGジヌクレオチドを含まない部分を制限酵素で消化させて長さが約200塩基未満の断片にした後、そのような断片を廃棄する。適切な制限酵素の具体例としては、MseI、Tsp509I、NlaIII、BfaIなどが挙げられるが、これですべてというわけではない。より好ましい一実施態様では、制限酵素MseIを用いて核酸配列を消化させるが、この制限酵素のTTAAという認識配列はCpGジヌクレオチド部位にほとんど現われない。エンドヌクレアーゼで切断した完全なCpG島は、CpGジヌクレオチドが核酸を少なくとも50%含んでいて長さが一般に約200～約2,000bpの核酸断片である。

30

【0111】

エンドヌクレアーゼで切断した完全なCpG島の開裂した端部にリンカー・プライマーを連結させて増幅する。エンドヌクレアーゼで切断したCpG島は、上に大まかに説明した手続きに従って増幅することが好ましい。好ましい一実施態様では、リン酸化されていないリンカー・プライマー（例えばH24：5'-AGG CAA CTG TGC TAT CCG AGG GAT（配列ID番号49）とH12：5'-TAA TCC CTC GGA（配列ID番号50））を用いてPCR増幅の伸長ステップを実施する。

40

【0112】

増幅したCpG島に含まれる反復DNA配列は、あとでハイブリダイゼーション・プロセスを阻害する可能性があるため、このような配列は、差し引きハイブリダイゼーション法を利用して連結したDNAから必要に応じて除去するとよい。反復配列の具体例はAlu IファミリーとKpn Iファミリーである。さまざまな差し引きハイブリダイゼーション法が公知にな

50

っており、多くの文献に記載されている（例えばAkopyants他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第95巻、13108～13113ページ、1998年；Lee J.H.とWelch D.R.、Int. J. Cancer、第71巻、1035～1044ページ、1997年；アメリカ合衆国特許第5,591,575号と第5,589,339号を参照のこと）。好ましい一実施態様では、Cot-1を用いて差し引きハイブリダイゼーション法を実施する。この方法では、反復配列を豊富に含むヒトCot-1 DNAをニックトランスレーションし、ピオチンで標識し、処理したゲノムDNAに添加することが好ましい（Craig他、Hum. Genet.、第100巻、472～476ページ、1997年を参照のこと。なおその内容は、参考としてこの明細書に組み込まれているものとする）。次に、得られたDNA混合物を精製し、変性させ、ピオチンで標識した反復配列を、ゲノムDNAの相補的反復配列とハイブリダイズさせる。ピオチンはアビジンに対する親和性が大きいため、ストレプトアビジン磁性粒子をDNA混合物に添加した場合には、ピオチン-ストレプトアビジン相互作用を通じて反復配列のハイブリッドが磁性粒子に付着する。反復配列のハイブリッドは、磁性粒子分離装置を用いてCpG島から分離する。CpG島を含む上清を取り出し、公知の方法で精製する。

10

【0113】

その結果としてメチル化されたCpG島とメチル化されていないCpG島を含むアンプリコンが得られるのでそのアンプリコンを精製し、適切なメチル化感受性制限酵素を用いて消化させる。メチル化感受性制限酵素は、その酵素のDNA認識部位がメチル化されていないときにその部位を切断するが、メチル化されている場合には対応するDNA部位を切断しない。したがってメチル化されていないCpG島は分解され、対応するメチル化されたCpG島がエンドヌクLEASE処理を生き延びる。このようなメチル化感受性制限酵素の具体例としては、BstU I、SmaI、SacII、EagI、MspI、HpaII、HhaI、BssHIIなどがある。好ましい一実施態様ではBstU Iを使用するが、CpG島内にCGCGというこのBstU Iの認識配列が頻出する。このメチル化感受性制限酵素は、スクリーニング・アレイに固定化されたCpGジヌクレオチド断片が、CGIゲノム・ライブラリから選択したDNAクローンに由来する場合に特に好ましい。というのも、約800個のCGI挿入体がBstU I部位を含んでいるからである（Cross他、Nature Genet.、第6巻、236～244ページ、1994年）。

20

【0114】

好ましい一実施態様では、メチル化感受性制限酵素を利用し、メチル化されたCpG島とメチル化されていないCpG島の一部だけを消化させる。残りの部分は、メチル化感受性酵素で消化させない。その結果、CpGジヌクレオチド・リッチなスクリーニング・アレイを調べるためのアンプリコンが2セット生成する。1つのセットは、メチル化されたアンプリコンとメチル化されていないアンプリコン（例えばMse Iで処理したがBstU Iでは処理していないアンプリコン）を含んでおり、第2のセットは、メチル化されたアンプリコン（例えばMse IとBstU Iで処理したアンプリコン）を含んでいる。メチル化されたCpG島とメチル化されていないCpG島を含むアンプリコンのセットは、ハイブリダイゼーションにおいて、スクリーニング・アレイのCpGジヌクレオチド・リッチな核酸断片が全CpGジヌクレオチド断片の中の代表的なものであるかどうかを明らかにするための対照として使用する。アンプリコンの第2のセットは、メチル化されたCpG島を含んでいるため、細胞サンプル中のメチル化されたCpG島配列をDMHによって同定するのに用いる。

30

40

【0115】

次に、エンドヌクLEASEによって制限されたアンプリコンを、好ましくはPCRを利用して増幅する。PCRに関しては、CpGジヌクレオチド・リッチな断片の調製との関連ですでに一般的な説明を行なった。増幅サイクルの数を比較的少なくすることにより、PCRによって生成した残留反復配列が過剰になるのを避けることが好ましい。特に好ましい一実施態様では、アンプリコンに対し、少なくとも15回かつ約30回以下の増幅サイクルを実施する。さらに好ましい一実施態様では、アンプリコンに対して約15回の増幅サイクルを実施する。

【0116】

次に、アンプリコンを精製して標識することが好ましい。この明細書では、“標識する

50

”という用語は、アンプリコンにハイブリダイズしたCpGジヌクレオチド断片を可視化する何らかの方法が存在していることを意味する。当業者に公知の多くの異なる標識と標識法が存在している。例えば、放射性標識、蛍光標識、リン光標識、酵素標識、質量分析器で検出可能な質量標識、ならびにこれらの組み合わせがあるが、これですべてというわけではない。さらに、調製したDNAアレイにハイブリダイズした目的とする核酸配列を可視化するのに利用できる多彩な直接的な手段および/または間接的手段が存在している。適切な可視化手段としては、放射性同位体標識や非放射性同位体標識（例えば、蛍光に基づいた検出技術）が挙げられる。利用可能な放射性同位体標識の具体例としては、 ^{32}P や ^{33}P -dCTPなどが挙げられ、利用可能な非放射性同位体標識の具体例としては、Cy3-dUTPやCy5-dUTPなどが挙げられる。さらに、当業者に公知のどの標識技術も、本発明において目的とする核酸配列を標識するのに役立つであろう。いくつかの因子が標識手段の選択に關与する可能性がある。そのような因子としては、例えば、メチル化されたアンプリコンがCpGジヌクレオチド・リッチなスクリーニング・アレイにハイブリダイズして結合する速度に標識が及ぼす効果、標識によって発生するシグナルの性質と強度、標識を付着させる費用と容易さなどが挙げられる。

10

20

30

50

【0117】

特に、本発明により、細胞サンプルからメチル化パターンを同定するためのアンプリコンのセットを単離する方法であって、核酸配列を、その核酸配列を消化してCpG島が保存された断片群にする酵素と接触させ；その断片群の開裂した末端部をリンカー・プライマーに付着させてリンカー・プライマー産物を形成し；そのリンカー・プライマー産物を、メチル化されていないCpGジヌクレオチド配列を有するがメチル化されたCpGジヌクレオチド配列は持たないリンカー・プライマー産物を消化するメチル化感受性酵素と接触させることにより、メチル化されたCpG島遺伝子座を含む消化産物を形成し；その消化産物を増幅してアンプリコンを形成する操作を含む方法が提供される。

【0118】

当業者にとって、これまでに開示した実施態様に対するさまざまな変更が本発明を実施する上で有効であることと、そのような変更も本発明に含まれることは明らかであろう。例えばより大きなECISTパネルを用いる。例えばCpG島ライブラリCGIに由来するCGリッチなDNA断片をスクリーニングすることにより、さらに多くのECISTを同定する（Cross, S.H. 他, Nat. Genet., 第6巻、236～244ページ、1994年）。

【0119】

最後に、重要なメチル化関連遺伝子のDNAセグメントのすべてがCGIライブラリに存在しているわけではない。このようなECISTは、これら遺伝子のプロモータと第1エキソンに隣接するように設計したプライマーを用いてPCRを行なうことによりここに調製する。したがって本発明のプロトコルを変更することにより、DNAメチル化と遺伝子発現をゲノム全体でスクリーニングするための、固体支持体（例えばナイロン膜またはスライドガラス）上に高密度のECISTがアレイ状になった新しいタイプのDNAチップが生まれる。

【0120】

発現分析のためのアンプリコンの調製。発現分析のためのアンプリコンは、cDNAを生成させて増幅するための従来法を利用して作られる。完全長cDNAを生成させて増幅することが好ましい。この方法は、キャップのないリボソームRNA、tRNA、断片化RNAからではなく、元々キャップの付いたRNAからcDNAを生成させる方向にバイアスがかかっていることが好ましい。この方法は、例えば仔ウシ腸ホスファターゼの後にキアジェン社のRNEASY（登録商標）カラムを用いた精製を組み合わせることで用いることにより、キャップのないRNAまたは断片化RNAからキャップの付いたRNAを分離する操作を含んでいることが好ましい。cDNAの製造法は、（例えばタバコ酸性ピロホスファターゼで処理することにより）RNAのキャップ構造を除去し、キャップを取り除いたmRNAの集団の5'ーリン酸末端部にT4 RNAリガーゼの存在下でアダプターを連結する操作を含んでいることが好ましい。完全長cDNAは、そのように連結したmRNAからポリTプライマーを用いた逆転写によって生成させることが好ましい。ロングPCR反応（TAQPLUS（登録商標）ロングPCRシステム（ストラタジーン社）

は、5'-アダプター・プライマーと3'-アダプター・プライマーを使用し、PCRの線形性を保持するために増幅サイクルを少なくして（例えば約18サイクル）実施することが好ましい。

【0121】

標識するために増幅産物（またはアンプリコン）を精製することが好ましい。標識は蛍光標識であることが好ましく、例えばアミノ-アリルdUTP（aa-dUTP）をアンプリコンに組み込み、蛍光染料（例えばCy5とCy3）を、aa-dUTPで標識したテスト用アンプリコンと基準アンプリコンにそれぞれ結合させる操作を含んでいる。

【0122】

標識したアンプリコン群をCpG島マイクロアレイ・パネルに同時にハイブリダイズさせ、適切な公知のソフトウェア（例えばGenePix Pro3.0）を用いてハイブリダイゼーションの結果を分析することが好ましい。

10

【0123】

特に本発明により、細胞サンプルからアンプリコンのセットを単離して1個以上の遺伝子の発現または発現パターンを明らかにする方法であって、単離したmRNAからキャップの付いたmRNAを取得し；キャップの付いたそのmRNAからキャップをはずし；キャップをはずしたそのmRNAから完全長cDNAを作り；その完全長cDNAを増幅してアンプリコンを作り；そのアンプリコンを標識することにより、その標識したアンプリコンをアレイ状のECISTにハイブリダイズさせる操作を含む方法が提供される。

【0124】

当業者にとって、アンプリコンの調製に関して開示した実施態様に対するさまざまな変更が本発明を実施する上で有効であることと、そのような変更も本発明に含まれることは明らかであろう。例えば熱に対して安定な逆転写酵素を用いてより高温で完全長cDNAの鋳型を合成する。このようにすると、非常にGCリッチな領域の逆転写が特にいくつかのmRNA種の5'末端において開始されることによって標的の調製が促進される。

20

【0125】

このプロトコルを利用して調製した完全長cDNAはすべて5'-RACEと3'-RACEを行なう用意ができており、興味の対象である新規な遺伝子をクローニングするのに適している。

【0126】

さらに、キャップを取り除いたmRNAの5'末端に連結した元のRNAアダプターにT7配列を付着させることにより、ほとんどのECISTに第1エクソンが含まれるようにする。したがって二本鎖の完全長cDNAを合成してそれを鋳型として用いると、T7 RNAポリメラーゼによる1回だけの指示で5'末端cDNAが合成される。次にそのcDNAを標的として使用し、例えばCGIゲノム・ライブラリからECISTをスクリーニングする。この方法は、PCRなしでテスト・サンプルから5'末端cDNAを調製するのに一般的に使用されている。したがって標的の集団の線形性が保持されるため、マイクロアレイの出力を定量的に測定することができる。

30

【0127】

スクリーニング

【0128】

標識したアンプリコンを用い、上記の方法を利用して作ったスクリーニング・アレイのCpGジヌクレオチド断片をスクリーニングする。スクリーニング・アレイの固体支持体に固着されているCpGジヌクレオチド断片と相補的な配列を持つ標識したアンプリコンは、プラスのハイブリダイゼーション・シグナルを発生させることになる。スクリーニング・アレイに固着させるCpGジヌクレオチド断片はECIST断片であることが好ましい。アンプリコンを用いてECIST断片を調べる場合には、プラスのハイブリダイゼーション・シグナルは、細胞サンプルで発現しているDNA配列が存在していることも示している。

40

【0129】

好ましい一実施態様では、メチル化されたアンプリコン（例えばMesI/BstU Iで前処理したアンプリコン）を用いてスクリーニング・アレイのCpGジヌクレオチド・リッチな断片をスクリーニングする。プラスのハイブリダイゼーション・シグナルは、細胞サンプル

50

の中にメチル化されたDNAが存在していることを示している。

【0130】

特に本発明は、ゲノム中の核酸配列のCpGジヌクレオチド・リッチな領域にメチル化が存在しているかどうかを明らかにする方法であって、核酸配列を、その核酸配列を消化してCpG島が保存された断片群にする酵素と接触させ；その断片群をリンカー・プライマーに付着させてリンカー・プライマー産物を形成し；そのリンカー・プライマー産物を、メチル化されていないCpGジヌクレオチド配列を有するがメチル化されたCpGジヌクレオチド配列は持たないリンカー・プライマー産物を消化するメチル化感受性酵素と接触させることにより、メチル化されたCpG島遺伝子座を含む消化産物を形成し；その消化産物を増幅してアンプリコンを形成し；そのアンプリコンを標識し；その標識したアンプリコンを、
10 固体支持体に固着した複数の核酸断片を含むスクリーニング・アレイと接触させ；標識したアンプリコンがそのスクリーニング・アレイの複数の核酸断片に結合したかどうかを明らかにする操作を含む方法に関する。

【0131】

好ましい一実施態様では、エンドヌクレアーゼで処理したアンプリコンを2セット用いてスクリーニング・アレイのCpGジヌクレオチド断片をスクリーニングする。1つのセットはメチル化されたCpG島とメチル化されていないCpG島を含んでおり（例えばMseIで処理したが、BstU Iでは処理していないアンプリコン）、第2のセットはメチル化されたCpG島を含んでいる（例えばMseIとBstU Iで処理したアンプリコン）。メチル化されたCpG島とメチル化されていないCpG島を含むアンプリコンの第1のセットは、ハイブリダイゼーション
20 において対照として使用し、増幅産物が、すべてのCGリッチな断片を代表しているかどうかを明らかにすることが好ましい。メチル化されたCpG島とメチル化されていないCpG島を含むアンプリコンのこの第1のセットは、MseIで処理したアンプリコンであることが好ましい。アンプリコンのこの第1のセットを完全に除去した後、メチル化されたCpG島を含むアンプリコンの第2のセットを用いてスクリーニング・アレイを再びハイブリダイズさせる。別の方法として、メチル化されたCpG島を含むアンプリコンの第2のセットを用い、アンプリコンの第1のセットで調べたスクリーニング・アレイのCpGジヌクレオチド断片と一致するCpGジヌクレオチド断片を含む第2のスクリーニング・アレイをスクリーニングする。好ましい一実施態様では、アンプリコンのこの第2のセットは、MseI/BstU Iで前処理したアンプリコンを含んでいる。メチル化されたCpG島を含むアンプリコンを用いた第2のハイブリダイゼーションからプラスのハイブリダイゼーション・シグナルが得られるという
30 ののは、テストしている細胞サンプル中にメチル化されたCpG島配列が存在していることを示している。さらに、アンプリコンの両方のセットを用いてプラスのハイブリダイゼーション・シグナルが得られるというのは、細胞サンプル中にメチル化された異常なDNAが存在していることを示している。

【0132】

そこで本発明により、細胞サンプル中にメチル化された異常なDNAが存在しているかどうかを明らかにする方法であって、

- a) (i) 核酸配列を、その核酸配列を消化してCpG島が保存された断片群にする酵素と接触させ、メチル化されたCpG島遺伝子座とメチル化されていないCpG島遺伝子座を含む消化産物を形成し；(ii) その消化産物をリンカー・プライマーに付着させてリンカー・プライマー産物を形成し；(iii) そのリンカー・プライマー産物を増幅してアンプリコンを形成し；(iv) そのアンプリコンを標識する操作を含む方法でアンプリコンの第1のセットを調製し；
40
- b) 核酸配列を、その核酸配列を消化してCpG島が保存された断片群にする酵素と接触させ、メチル化されたCpG島遺伝子座とメチル化されていないCpG島遺伝子座を含む消化産物を形成し；(ii) その消化産物をリンカー・プライマーに付着させてリンカー・プライマー産物を形成し；(iii) そのリンカー・プライマー産物を、メチル化されていないCpGジヌクレオチド配列を有するがメチル化されたCpGジヌクレオチド配列は持たないリンカー・プライマー産物を消化するメチル化感受性酵素と接触させて、メチル化されたCpG島遺伝
50

子座を含む第2の消化産物を形成し；(iv) その第2の消化産物を増幅してアンプリコンを形成し；(v) そのアンプリコンを標識する操作を含む方法でアンプリコンの第2のセットを調製し；

c) アンプリコンの第1のセットを、固体支持体に固着した複数の核酸断片を含む第1のスクリーニング・アレイと接触させて、標識したアンプリコンがこの第1のスクリーニング・アレイの複数の核酸断片に結合したかどうかを調べ；

d) アンプリコンの第2のセットを、第1のスクリーニング・アレイの複数の核酸断片と同じ複数の核酸断片が固着した第2のスクリーニング・アレイと接触させて、標識したアンプリコンがこの第2のスクリーニング・アレイの複数の核酸断片に結合したかどうかを調べ；

e) 第1のスクリーニング・アレイの核酸断片に結合したアンプリコンの第1のセットの存在または不在の状態が、第2のスクリーニング・アレイの核酸断片に結合したアンプリコンの第2のセットと同じであるかどうかを観察する操作を含む方法が提供される。

10

【0133】

別の好ましい実施態様では、メチル化されたアンプリコンの2つのセットを用いてスクリーニング・アレイを調べる。メチル化されたアンプリコンの第1のセットは、がんでない(対照)細胞から調製して基準として使用し、メチル化されたアンプリコンの第2のセットは、がん細胞から調製する。スクリーニング・アレイのCpGジヌクレオチド断片は、まず最初に、がんでない細胞から調製したメチル化CpG島含有アンプリコンを用いてスクリーニングする。この第1回目のハイブリダイゼーションでは、がんでない細胞からのアンプリコンを *MesI*/*BstU I* で処理したものを使用することが好ましい。メチル化されたアンプリコンの第1のセットを完全に除去した後、がん細胞から調製したメチル化CpG島含有アンプリコンの第2のセットを用いてスクリーニング・アレイに再びハイブリダイズさせる。この第2回目のスクリーニングでは、がん細胞からのアンプリコンを *MesI*/*BstU I* で処理したものを使用することが好ましい。別の方法では、がんでない細胞から調製したメチル化アンプリコンの第1のセットを用いてスクリーニングしたスクリーニング・アレイのCpGジヌクレオチド断片と同じCpGジヌクレオチド断片を含む第2のスクリーニング・アレイを、アンプリコンの第2のセットを用いてスクリーニングする。がん細胞から調製したメチル化アンプリコンの第2のセットを用いた場合のハイブリダイゼーション・シグナルの強度と、がんでない(対照)細胞から調製したメチル化アンプリコンの第1のセットを用いて得られたハイブリダイゼーション・シグナルの強度の差は、がん細胞のDNAにおける対応する配列の異常なメチル化パターンを反映している。

20

30

【0134】

特に本発明は、がん細胞からのDNAにおけるメチル化パターンを同定する方法であって、

a) (i) がん細胞に由来する核酸配列を、その核酸配列を消化してCpG島が保存された断片群にする酵素と接触させ；(ii) その断片群をリンカー・プライマーに付着させてリンカー・プライマー産物を形成し；(iii) その断片群を、メチル化されていないCpGジヌクレオチド配列を有するがメチル化されたCpGジヌクレオチド配列は持たない断片群にするメチル化感受性酵素と接触させることにより、メチル化されたCpG島遺伝子座を含む消化産物を形成し；(iv) その消化産物を増幅してアンプリコンを形成し；(v) そのアンプリコンを標識する操作を含む方法でアンプリコンの第1のセットを単離し；

40

b) ステップa)の(i) (ただし(i)の核酸配列をがんでない細胞に由来する核酸配列に変える) ~ (v) を繰り返す操作を含む方法でアンプリコンの第2のセットを単離し；

c) アンプリコンの第1のセットを、固体支持体に固着した複数の核酸断片を含む第1のスクリーニング・アレイと接触させ、標識したアンプリコンが、スクリーニング・アレイの複数の核酸断片に結合しているかどうかを調べ；

d) アンプリコンの第2のセットを、第1のスクリーニング・アレイの複数の核酸断片と同じ複数の核酸断片が固着した第2のスクリーニング・アレイと接触させ、標識したアンプリコンが、第2のスクリーニング・アレイの複数の核酸断片に結合している

50

かどうかを調べ；

e) 第1のスクリーニング・アレイの複数の核酸断片に結合したアンプリコンの第1のセットの存在または不在が、第2のスクリーニング・アレイの複数の核酸断片に結合したアンプリコンの第2のセットの存在または不在と同じであるかどうかを観察する操作を含む方法に関する。

【0135】

特に好ましい実施態様では、DNAにおけるメチル化パターンを同定するのに用いるスクリーニング・アレイはECISTを含むアレイであるため、例えば本発明による基準サンプルとがんサンプルに対応する(上記の)cDNA由来のアンプリコンを用いて同じECISTスクリーニング・アレイを再スクリーニングすることにより、対応するゲノム遺伝子座のDNAメチル化と関係する遺伝子サイレンシングを明らかにすることができる。

10

【0136】

標識の強度は、そのようなアレイ中のハイブリダイズした各スポットについて得られる。好ましい実施態様では、すでに説明したように、Cy3とCy5(例えばそれぞれが基準サンプルとテスト・サンプルに対応)の蛍光強度が各スポットについて得られるため、公知のソフトウェアを用いてその強度を分析する。バックグラウンド・シグナルに近い蛍光シグナルを有するアレイ上のスポットは、PCRまたは印刷の失敗を反映しているため、分析するデータから除外する。標識の効率(例えばCy5とCy3の標識効率)はサンプルごとに異なっている可能性があるため、各画像からの比Cy5/Cy3を、全体での比Cy5/Cy3と(規格化されていて比が1であることが想定される)内部対照をもとにして規格化することが好ましい。内部対照パネルでは、対照遺伝子のいろいろな断片群(例えば -アクチンのいろいろなcDNA断片群(エキソン1と3)と、GAPDHの2つの異なるcDNA断片(エキソン1と8)が、各パネル上にいくつかの濃度でスポットになっていることが好ましい。次に、調節した比Cy5/Cy3を各ECIST遺伝子座について計算し、データをスプレッドシート形式に移して分析する。好ましい実施態様では、テスト用アンプリコン(Cy3)と基準用アンプリコン(Cy5)で染料の結合を逆にして、マイクロアレイでの追加対照実験を行なう。次に、マイクロアレイで得られたデータを、この追加実験からのデータと比較する。品質制御のための自己ハイブリダイゼーション実験を行なうことが好ましい。この実験では、同量の2つのテスト用DNAサンプルのそれぞれにCy5とCy3を標識し、マイクロアレイ・スライドに同時にハイブリダイズさせる。

20

30

【0137】

遺伝子発現データの統計的分析は、公知の画像解析ソフトウェアを用いて行なうことが好ましい(例えばSAM; Tusher, V.G.他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第98巻、5116~5121ページ、2001年)。3つのハイブリダイゼーション実験(例えば2回繰り返した実験と自己ハイブリダイゼーション実験)を、分析のための入力として用いることが好ましい。得られた発現データを立方根に変換し、分析を行なう前の正常な分布を得ることが好ましい。

【0138】

本発明のDMH/発現二重法を利用した実験の結果は、ゲノムのメチル化と発現のパターンが、がんが成長していく際の腫瘍の増殖に関係していることを示している。さらに詳細には、本発明の二重法を利用することにより、高メチル化されたCpG島が、患者ががんであるかどうかを明らかにするための有効なマーカーであることがわかった。これらマーカーの部位は、乳がん患者からの腫瘍細胞を用いて同定した。CpGジヌクレオチドのメチル化パターンの変化は、腫瘍の成長においてカギとなるイベント、共通のイベントであるように見える。DNAメチラーゼがメチル化に及ぼす効果は別にすると、この実験は、CpGジヌクレオチドがすでにメチル化しているなどの付加的因子によってがん細胞系の新規なメチル化を説明できる可能性があることを示唆している。

40

【0139】

どの理論にもないことだが、腫瘍が増殖する間にメチル化されたCpG島が徐々に蓄積していく。したがって、CpG島遺伝子座にすでに存在しているメチル化が、がん細胞内の新

50

規なメチル化を促進する可能性がある。CpG島が高メチル化する結果、非常に重要な抑制遺伝子が沈黙し、ある種の細胞が増殖しやすくなる。以下の実施例で議論する実験結果から、裏に隠れているメカニズムに関する説明として、形質転換した細胞においてDNAメチラーゼの新規な活性がランダムな性質を持つという以前に提案されているメカニズムとは正反対の別の説明が提供される。

【0140】

さらに、さまざまな臨床サンプルにおけるメチル化と発現パターンの違いは、がんのステージとタイプが異なることと関係している。したがって腫瘍細胞におけるメチル化および/または遺伝子発現のパターンを明らかにすると、がんの遺伝子マーカーを同定することができる。したがって本発明のDMH/遺伝子発現測定法には広い用途があり、ゲノム中でメチル化状態が異なっているCpG島部位を同定すること；疾患の進展に関係する高メチル化DNA部位をマッピングすること；メチル化と関係した遺伝子サイレンシングを明らかにし、正常な細胞のゲノムDNAの刷り込み、分化、成長におけるDNAメチル化の役割を理解すること；腫瘍発生におけるDNAメチル化の役割を理解すること；疾患の予後を診断し、モニターすることに利用される。

10

【0141】

以下の実施例は本発明を説明するものであり、本発明がそのように説明したさまざまな側面に限定されると考えてはならない。

【実施例1】

【0142】

(実施例2~6の材料と方法)

20

【0143】

細胞の培養と組織サンプルの調製。T47D、ZR-75-1、Hs578t、MDA-MB-468という乳がん細胞系をアメリカ基準培養物コレクション(ロックビル、メリーランド州)から取得した。MDA-MB-231細胞系とMCF-7細胞系は、ミズーリ大学獣医学部(コロンビア、ミズーリ州)のWade V. Wekshons博士から入手した。T47DとZR-75-1は、10%ウシ胎仔血清を添加したRPMI1640培地の中に維持したが、残りの細胞系は10%ウシ胎仔血清を添加したイーグル改変培地の中に維持した。乳がん、それに隣接する非腫瘍細胞(正常な対照として利用)を、エリス・フィッセルがんセンター(コロンビア、ミズーリ州)で乳房切除術を実施した患者から取得した。サンプルからの全RNAと全ゲノムDNAは、RNeasyトータルRNAキット(登録商標)(キアジェン社)とQIAamp組織キット(登録商標)をそれぞれ用いて単離した。

30

【0144】

ノーザン・ハイブリダイゼーション。乳がん細胞系と対照となる正常な線維芽細胞サンプルからの全RNA20mgを、2.2mMのホルムアルデヒドの存在下にて1.4%アガロース・ゲル上で電気泳動させ、ナイロン膜に移した。DNMT1とp21^{WAF1}を発現することが知られている細胞から逆転写PCRによってcDNAプローブを調製した。DNMT1では、プライマーとして5'-ATC TAG CTG CCA AAC GGA G(配列ID番号51)(センス鎖)と5'-CAC TGA ATG CAC TTG GGA GG(配列ID番号52)(アンチセンス鎖)を用いると192塩基対の産物が生成した。p21では、プライマーとして5'-AAC TAG GCG GTT GAA TGA GAG GTT(配列ID番号53)(センス鎖)と5'-GTG ACA GCG ATG GGA AGG AG(配列ID番号54)(アンチセンス鎖)を用いると206塩基対の産物が生成した。得られたPCR産物を単離し、マルチプライムDNA標識システム(アマーシャム社)を用いて³²Pで標識した。放射性標識をしたDNMT1とp21^{WAF1}のcDNAプローブをそれぞれノーザン膜にハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは、8mlのハイブリソルI(オンコア社)の中で42℃にて一晩にわたって実施した。洗浄は、65℃にて、0.1% SDS+0.5×SSC(1×SSCは、0.15MのNaClと0.015Mのクエン酸ナトリウム、pH7.0)の中で20分間にわたって1回実施し、0.1% SDS+0.2×SSCの中で20分間にわたって2回実施した。同じ膜に³²Pで標識したβ-アクチンのcDNA(1.1kb)プローブもハイブリダイズさせ、ロードしたRNAの量を測定した。ハイブリダイズしたこの膜をモレキュラー・ダイナミクス社のホスファイメージャーを用いてリン画像分析し、ImageQuant(モレキュラ

40

50

ー・ダイナミクス社)というソフトウェアを用いてバンドの強度を定量化した。それぞれのサンプルのレーンにある β -アクチンのmRNAのレベルを用いてDNMT1とp21^{WAF1}のmRNAのレベルを規格化した。

【0145】

アンプリコンの生成。乳がん細胞系または乳房の正常な組織からのゲノムDNA約2mgを、DNA1mgにつき10単位のMseIを供給者(ニュー・イングランド・バイオラズ社)の勧める条件に従って用いて完全に切断した。消化物を精製し、DNAリパーゼ緩衝溶液(ニュー・イングランド・バイオラズ社)の中で0.5ミリモルのリン酸化されていないリンカーH-24およびリンカーH-12と混合した。そのオリゴヌクレオチド配列は以下の通りであった：H-24：5'-AGG CAA CTG TGC TAT CCG AGG GAT(配列ID番号49)とH-12：5'-TAA TCC CTC GG A(配列ID番号50)。この混合物を50 から25 まで徐々に冷却することによってアニールしたオリゴヌクレオチドを、16 にて400単位のT4 DNAリガーゼ(ニュー・イングランド・バイオラズ社)とともにインキュベートすることによってDNA断片の開裂した末端部に連結させた。Craigらが記載している差し引きハイブリダイゼーションのプロトコルを利用し、連結したDNAから反復DNA配列を除去した。簡単に説明すると、ニックトランスレーション・キット(ギブコ/BRL社)を用い、反復配列が豊富に含まれるヒトCot-1 DNA(20mg;ギブコ/BRL社)にビオチン標識し、処理したゲノムDNAに添加した。このDNA混合物を精製し、真空下で乾燥させた。乾燥させたこの混合物を10mlの6×SSCと0.1%SDSに再び溶かし、10分間にわたって沸騰させることにより変性させ、65 にて一晩にわたってハイブリダイズさせた。このハイブリダイゼーション混合物にストレプトアビジン磁性粒子を100ml(1mg)添加し、室温にて10分間にわたってインキュベートした。ストレプトアビジン磁性粒子は、製造者(ベーリンガー・マンハイム社)の指示に従って調製した。磁性粒子分離装置(ベーリンガー・マンハイム社)に試験管を当てて上清を吸引した。この上清を新たに調製したストレプトアビジン磁性粒子溶液とともに室温にて30分間にわたって再びインキュベートした。インキュベーション後、第2の上清を取り出し、QIAクイック・キット(キアジェン社)を用いてDNAを精製した。得られたDNAの半分を、メチル化感受性エンドヌクレアーゼBstU I(ニュー・イングランド・バイオラズ社)を用いて供給者の勧める条件に従って消化させた。0.4mMのT-24プライマー、2単位のディープ・ベント(エキソ-)DNAポリメラーゼ(ニュー・イングランド・バイオラズ社)、5%(v/v)のジメチルスルホキシド、200mMのdNTPを含む供給者からの緩衝溶液100mlの中で、前処理したDNA(MseIまたはMseI/BstU I)(500ng)を用いてPCR反応を行なわせた。試験管を72 にて3分間にわたってインキュベートし、連結したリンカーの突起した5'末端を塞ぎ、PTC-100サーモサイクラー(MJリサーチ社)の中で増幅サイクルを15回行なった。増幅サイクルの構成は、95 で変性を1分間、72 でアニーリングと伸長をそれぞれ3分間である。最後の伸長時間は10分間に延長した。PCRによって生成した反復配列が過剰に残るのを防ぐには、増幅回数を少なくすることが肝要である。増幅産物(“MseIで前処理したアンプリコン”または“MseI/BstU Iで前処理したアンプリコン”と呼ぶ)をQIAクイック・キットを用いて精製し、上記のランダム・プライマー標識システムを用いてDNA50ngを³²Pで標識する。

【0146】

ディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション。³²Pで標識したCot-1 DNAを用い、CGIゲノム・ライブラリに由来する約3,000個のクローンをあらかじめスクリーニングした。Cot-1のハイブリダイゼーション・シグナルがマイナス、あるいは弱いプラスであるクローンを取り出し、96ウエルのPCRマイクロプレートに入れた。後で使用するため、各コロニーの一部を別の96ウエル培養チェンバーのウエルに移した。試験管1本につき全容積20mlの中で、各クローンからの挿入体をすでに説明した条件に従って増幅した。94 で変性を1分間、55 でアニーリングを1分間、72 で伸長を3分間という増幅サイクルを30回実施した。増幅のために使用したプライマーは、HGMP 3558：5'-CGG CCG CCT GCA GGT CTG ACC TTA A(配列ID番号47)とHGMP 3559：5'-AAC GCG TTG GGA GCT CTC CCT TAA(配列ID番号48)であった。PCRを実施した後、メチル化感受性BstU Iを用いて増幅産物1ml

を消化させ、その消化産物を1%アガロース・ゲル上でサイズごとに分類した。テストしたCGIクローンの挿入体(0.2~1.5kb)の中から(消化パターンに基づいた)多数のBstU I部位を含むものを選択してさらに分析した。残ったDNAを95℃で5分間にわたって変性させ、追跡用染料(プロモフェノール・ブルー)2mlを各試験管に添加し、96ピンのマルチ・プリント(登録商標)レプリケータ(V&Pサイエンティフィック社)を用いてDNAをナイロン膜に移した。各PCRサンプルを2つずつスポットにし、アレイ内の各スポットの位置を追跡用染料によってマークした。各ピンにより、約0.4mlの液滴(約40ngのDNA)が膜に移される。アラインメント装置(ライブラリ・コピヤー(登録商標); V&Pサイエンティフィック社)をレプリケータとともに用い、複製のある3つの96ウエルPCRサンプルを10×12cmのナイロン膜上に276個のドットを持つ1つの容器に移した。さらに、アレイの四隅(第1列と最終列の上と下の3行)のそれぞれに3種類の正の対照をドットにし、オリエンテーション用のマークとして用いるとともに、ドットになったゲノム断片のハイブリダイゼーション・シグナルの強度を規格化するのに用いた。膜に対し、まず最初に、MseIで前処理し³²Pで標識したアンプリコンを10nlの高効率ハイブリダイゼーション溶液(モレキュラー・リサーチ社)の中で65℃にて一晩にわたってハイブリダイズさせた。洗浄を、65~75℃にて0.1% SDS +0.5× SSC(1× SSCは、0.15MのNaClと0.015Mのクエン酸ナトリウム、pH7.0)の中で20分間にわたって1回実施し、0.1% SDS+0.2× SSCの中で20分間にわたって2回実施した。すでに説明したモレキュラー・ダイナミックス社のホスファーマイメジャーとImageQuantソフトウェアを用いてオートラジオグラフィと分析を行なった。プローブを完全に剥がし、同じ膜にMseI/BstU Iで前処理して³²Pで標識したアンプリコンを再度ハイブリダイズさせた。複製した2枚の膜を使用し、それぞれのハイブリダイゼーション実験を独立に2回実施した。

【0147】

DNAのシーケンシング。プラスミドDNAをプラスのCGIクローンから調製し、ダイデオキシ・ターミネータ・サイクル・シーケンシング・キットと自動化したABI PRISM 377シーケンサを用いてシーケンシングを行なった。ヌクレオチド配列のデータは、BLASTプログラムを用いてGenBankのデータと比較した。

【0148】

サザン・ハイブリダイゼーションによるメチル化の分析。乳がん細胞系または乳房サンプルからのゲノムDNA(10μg)を、MseIまたはMseI/BstU Iを用いて完全に消化させた。得られた制限産物を1.0%アガロース・ゲル上で分離させ、ナイロン膜に移した。CGIクローン挿入体の一部をサザン・ハイブリダイゼーション用のプローブとしてPCRで増幅した。長さが約200~300bpでBstU I部位が含まれないように増幅産物を設計した。8~10mlの高効率ハイブリダイゼーション溶液の中で65~70℃にて一晩にわたってハイブリダイゼーションを行なわせた。すでに説明したようにしてハイブリダイゼーション後の洗浄を実施した。サザン・プロットに対してリン画像分析を行ない、ImageQuantソフトウェアを用いてバンド強度を定量化した。

【実施例2】

【0149】

(乳がん細胞におけるDNMT1とp21^{WAF1}の発現)

【0150】

ヒトのがん細胞では、腫瘍が増殖している間に、CpG島の高メチル化を促進することが知られているDNAメチラーゼ活性が大きくなっている。Vertino他、Mol. Cell Biol.、第16巻、4555~4565ページ、1996年; Wu他、Cancer Res.、第56巻、616~622ページ、1996年; Belinsky他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第93巻、4045~4050ページ、1996年を参照のこと。DNMT1はDNAメチラーゼの合成において中心的な役割を果たしているため、そのmRNAのレベルを乳がん細胞系であるT47D、ZR-75-1、Hs578t、MDA-MB-231、MDA-MB-468、MCF-7において測定した。

【0151】

実施例1に示した「方法と材料」を用いて乳がん細胞系T47D、ZR-75-1、Hs578t、MDA-MB

-231、MDA-MB-468、MCF-7からRNAを単離し、ノーザン分析用に調製した。実施例1に示した方法と材料を用いてDNMT1とp21^{WAF1}に対するcDNAプローブも調製した。ノーザン分析により、これらの細胞系では正常な対照サンプルと比べて5.4kbのDNMT1のmRNAのレベルが3~12倍になっていることがわかった(図1、上のパネル)。この結果は、同じ細胞系において、DNMT1のmRNAのレベル上昇と、その結果としてのDNAメチラーゼ酵素の活性増大の両方が見られるという以前の研究と整合性がある。

【0152】

最近、p21タンパク質が、DNAメチラーゼが複製関連タンパク質PCNAに向かうのを妨げる方向に調節していることも明らかになった。p21が存在していると、DNAメチラーゼが複製中のDNAに近づけないために正常な細胞中でのメチル化が邪魔される一方で、腫瘍細胞中ではp21の発現が消失または低下するために異常なメチル化が容易になる可能性があるという考え方が提案されている。そのことを裏付けるように、上記の乳がん細胞の中でp21をコードしている遺伝子である2.1kbのp21^{WAF1}の発現が、これらの細胞系では正常な対照サンプルの1/2~1/8であることが検出された(図1、中央のパネル)。この結果をDNMT1での知見と合わせて考えると、上記の乳がん細胞系では対応するゲノムを異常にメチル化する能力が増大していることが示唆される。

【実施例3】

【0153】

(ディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション(DMH)によるヒト乳がん細胞におけるCpG島のメチル化プロファイルの測定)

【0154】

DMH法を利用し、実施例2に示した6つのがん細胞系において新たにメチル化しているCpG島配列の程度を測定した(図2)。乳がん細胞(T47D、ZR-75-1、Hs578t、MDA-MB-468)からのゲノムDNAを用い、実施例1の材料と方法で説明したようにしてアンプリコンを調製した。正常な乳房組織からのDNAを同様にして消化させ、対照として使用した。CpGジヌクレオチド・リッチな断片の開裂した末端部をリンカーに連結させ、Cot-1差し引きハイブリダイゼーション法(材料と方法を参照のこと)を利用して反復配列(Alu IファミリーやKpn Iファミリー)を消化産物から除去した。

【0155】

差し引きしたDNAの半分をメチル化感受性エンドヌクレアーゼBstU Iでさらに処理し、BstU Iで消化させた対照DNAとBstU Iで消化されない対照DNAの両方を鋳型として用いてリンカーPCRを行なった(材料と方法を参照のこと)。処理したサンプルではメチル化されていないBstU I部位を含むゲノム断片は切断されないために増幅することができなかったが、BstU Iで消化されなかった対照サンプルでは同じ断片が増幅された。細胞中にメチル化されたBstU I部位を含むいくつかの断片は消化されず、リンカーPCRによって増幅された。“MseIで前処理したアンプリコン”または“MseI/BstU Iで前処理したアンプリコン”と名づけたPCR産物を高メチル化配列をスクリーニングするプローブとして使用した。多数のBstU I部位を含むCpGクローンをCGIライブラリからあらかじめ選択し(図3)、それを増幅した挿入体DNA(0.2~1.5kb)を実施例1の材料と方法で説明したようにして高密度アレイ上に格子状に配置した。

【0156】

DMH分析の結果。図4に、DMHで分析した276個のCpG島遺伝子座の代表的な結果が示してある。観察されたハイブリダイゼーション・シグナルの強度はさまざまであったが、それは、増幅産物のサイズが異なることに帰することができよう。MseIで前処理したアンプリコンは、膜上のMseIで切断したCpG島配列のうちで一致するものとハイブリダイズすることが予想された。しかしハイブリダイゼーション・シグナルは、それらCpG島遺伝子座の約86%であることが検出された(パネルA、B、C)。ハイブリダイズしなかった遺伝子座は、Y染色体に由来したものである可能性がある。それは、このCGIライブラリが元々は男性のDNAを用いて構成されたのに対し、アンプリコンは女性の細胞から調製されたという事実による。ハイブリダイズしなかった遺伝子座(パネルA)とCot-1に対してプラスであ

10

20

30

40

50

った14個の遺伝子座（パネルD）を除くと、MseI/BstU Iで前処理した正常な乳房組織サンプル由来のアンプリコンでは、テストしたCpG島配列の9.7%（遺伝子座237個のうちの23個）でプラスのハイブリダイゼーション・シグナルが検出された（パネルA'）。プラスのシグナルは、これらCpG島遺伝子座にメチル化されたBstU I部位が存在していることを示す。そのシグナルのいくつかは、転写不活性なX染色体、すなわち“刷り込まれた遺伝子”に由来する可能性がある。割合が少なかったことは、CpG島の大部分が正常な細胞ではメチル化されていないという考え方と一致する。MseIで前処理したアンプリコンとハイブリダイズしたフィルタで、大きなハイブリダイゼーション・シグナルがいくつか観察された（パネルA）。しかしこれらシグナルの強度は、MseI/BstU Iで前処理したアンプリコンとハイブリダイズしたフィルタ上では低下した（パネルA'）。これは、正常なゲノムにおいてメチル化していることが知られている配列（例えばリボソームDNAまたはCot-1関連配列）がいくつか存在していることが原因である可能性がある。

10

【0157】

6つの乳がん細胞系に由来するMseI/BstU IアンプリコンとハイブリダイズしたCpG島アレイにおいて、ハイブリダイゼーション・シグナルの数が増加した。代表的な結果を細胞系ZR-75-1とHs578tについて示した（パネルB、B'、C、C'）。Hs578tではテストした遺伝子座の15.0%でメチル化されたBstU I部位が観察され、その数値は、T47Dでは15.6%、MDA-MB-468では18.0%、ZR-75-1では19.4%、MDA-MB-231では22.7%、MCF-7では23.6%であった。正常な乳房サンプルと比べて高メチル化が広範囲に見られたが、全体のレベルは細胞系ごとに異なっていた。メチル化パターンを分析することにより、正常な対照と比較してこれら細胞系に高メチル化したCpG島遺伝子座が多く存在していることが明らかになった。遺伝子座の中には6つの細胞系すべてでメチル化しているように見えるものや、いくつかの細胞系だけでメチル化しているものもあった（図5）。

20

【0158】

高メチル化したCpG島遺伝子座のヌクレオチドのシークエンシング。276個のCpG島アレイからと他のDMHスクリーニングから選択したプラスの34個のCpG島遺伝子座のヌクレオチドをシークエンシングすることにより、その特性をさらにはっきりとさせた。これらCGIクローンの挿入体をシークエンシングし、内部BstU I部位を確認した。配列データを用い、GenBankデータベースで既知の配列と一致するか調べた。これら遺伝子座のうちの30個を表IIに示してある。（このリストにない他の4個の遺伝子座は、間違っただけでプラスになったものであり、サザン分析を行っても乳がん細胞系における高メチル化状態が確認できなかった）。30個のクローンのうちの9個は、HPK1、DCIS1、カリウムチャンネルタンパク質、PAX2、PAX7、GALNR2、EST03867、ESTAA827755、EST88248という既知の配列と一致する配列を含んでいた。6つのクローンは、既存のCpG島配列タグと一致した。

30

【0159】

【表 1】

ディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーションによって単離されたプラスのCpG島クローンのリスト

CpG島クローン	挿入体のサイズ (kb)	GenBankとの一致	ATCC登録番号	配列ID番号
HBC-3	0.25			1
HBC-4	0.90			2
HBC-5	0.40	DCISI	L27636	3
HBC-6	0.80	CGIクローン28f11	Z60565	4
HBC-7	0.60	CGIクローン178c6	Z59859	5
HBC-8	0.38	CGIクローン200b9	Z55140	6
HBC-9	0.44	HPK1	U66464	7
HBC-10	0.75	K ⁺ チャンネルタンパク質	Z93016	8
HBC-11	0.70			9
HBC-12	0.50	CGIクローン86e9	Z63556	10
HBC-13	1.00	CGIクローン31g5	Z60696	11
HBC-14	0.70			12
HBC-15	1.50	CGIクローン7c5	Z66179	13
HBC-16	1.00	EST AA827755	ESTAA827	14
HBC-17	0.75			15
HBC-18	1.30	PAX2	M89470	16
HBC-19	0.90	PAX7	AL021528	17

10

20

【表 2】

CpG島クローン	挿入体のサイズ (kb)	GenBankとの一致	ATCC登録番号	配列ID番号
HBC-20	0.45	CGIクローン67g9	Z62363	18
HBC-21	0.90			19
HBC-22	0.45			20
HBC-23	0.90			21
HBC-24	1.10	IMAGE : 2518953 5' mRNA	A1928953	22
HBC-25	0.70			23
HBC-26	0.70	GALNR2	AF058762	24
HBC-27	0.70			25
HBC-28	0.60			26
HBC-29	0.70			27
HBC-30	0.80			28
HBC-31	0.50	EST 03867	T05978	29
HBC-32	0.60	EST88248	T35610	30
HBC-34	0.95	IMAGE : 1113203 3' mRNA	AA604922	31
HBC-37	1.00	PAC 163M9	AL021920	32
HBC-38	0.50	CGI 40c10	Z58446	33
HBC-39	0.60	EST185442	AA313564	34
HBC-41	0.60	CGI 29h6	Z58110	35
HBC-42	0.50	CGI 13f7	Z56764	36
HBC-43	0.80	ゲノム・クローンNH0444B04	AC007392	37
HBC-45	0.50	PAC 29K1	Z98745	38
HBC-46	0.65	IMAGE : 2177671 3' mRNA	A1500696	39
HBC-48	1.50	BACクローンRG300E22	AC004774	40
HBC-49	0.50	CGI 40c10	Z58447	41
HBC-51	0.70	COL9A1 (altエキソン1)	M32133	42
HBC-52	0.60	IMAGE : 2092259 3' mRNA	A1381934	43
HBC-53	0.80	ゲノム・クローンNH0444B04	AC007392	44
HBC-55	0.80	カベオリン-1 (エキソン2)	AF095592	45
HBC-57	0.90	GATA-3 (エキソン1)	X55122	46

【実施例 4】

【0160】

(サザン・ハイブリダイゼーションによる乳がん細胞系におけるCpG島遺伝子座のメチル化パターンのプロファイルの測定)

【0161】

がん細胞系で検出されたCpG島遺伝子座のメチル化状態をサザン分析によって独立に確認した(図6)。クローニングした挿入体からPCRによってハイブリダイゼーション・プローブを生成させた。長さが約200~300bpでBstU I部位が含まれないように増幅産物を設計した。例えばHBC(“乳がんにおける高メチル化”) -17(配列ID番号15)用のプローブを

10

20

30

40

50

用いると、MseIで消化させた対照DNAのレーンで750bpの断片が検出された（上左のパネル、レーン1）。同じサイズまたは似たサイズの断片が、MseI/BstU Iで二重に消化させたDNAサンプル（ZR-75-1、Hs578t、MDA-MB-231、MDA-MB-468、MCF-7）で検出された（レーン4～8）。この断片が存在しているのは、HBC-17（配列ID番号15）内のすべてのBstU I部位が、制限に対して感受性を持たないためにこれら細胞の中でメチル化していることの結果である。300bpの断片がT47 DNA 20というサンプルの中に存在していた（レーン3）。このバンドは、消化された正常な対照DNAに見られる（レーン2）。これは、細胞中で調べたすべての部位がメチル化しておらず、BstU Iによって消化されて300bpの断片を生成させたことを示唆している。メチル化されていない断片も、MDA-MB-468細胞とMCF-7細胞に存在していた（レーン7と8）。Hs578t細胞またはMDA-MB-231細胞では、一部がメチル化された断片（400bpと600bp）が同定された。これは、調べたBstU I部位の一部がHBC-17（配列ID番号15）においてメチル化していることに帰することができる。

10

【0162】

このサザン分析では調べた各部位におけるメチル化の程度を測定することはできないため、これらのサンプルに対する半定量的方法を開発した。まず最初に、各レーンからのすべての断片を合わせた強度に対する750bpの断片のデンストメータによる強度を完全なメチル化の割合とした。不完全なメチル化（すなわち400bpと600bpの断片）の割合とメチル化されない（すなわち300bpの断片の）割合も同様に計算した。各断片に対してさらに1つの数値を割り当てた。完全なメチル化には1、不完全なメチル化には0.5、メチル化されていない場合には0である。各サンプルのメチル化スコアは、完全なメチル化の割合に1を掛け、不完全なメチル化の割合に0.5を掛けて足し合わせた和になった。この方法で得られるスコアは、各サンプルのレーンについてバンドの強度を目で比較した結果と一致していた。この方法は、残りのCpG島遺伝子座にも適用した。図6に、サザン・ハイブリダイゼーションの別の例と、得られたメチル化スコアを示してある。細胞系のDNAサンプルのメチル化感受性制限が完全になされるようにするため、上記細胞系のDNAと正常ないくつかの乳房DNAサンプルでは対応するBstU I部位がメチル化されていないことが知られている負の対照プロンプ7-120を膜に再びハイブリダイズさせた。

20

【0163】

乳がん細胞系と1つの正常な対照サンプルで分析した30個のCpG島遺伝子座のメチル化スコアを図7にまとめてある。これら細胞系は、左から右に向かってメチル化能力（すなわち高メチル化した遺伝子座の%）が大きくなるように並べてあり、CpG島遺伝子座は、上から下に向かってこれら細胞系からのメチル化スコアが小さくなるように並べてある。メチル化パターンの分析から、これらの乳がん細胞系では高メチル化に対するCpG島の感受性が異なっている可能性のあることが示唆された。遺伝子座HBC-3～HBC-15（配列ID番号1～13）では、正常な対照サンプルにおいて、調べたBstU I部位でさまざまな程度のメチル化が見られた。調べた別の正常な乳房サンプルでもこのすでに存在しているメチル化条件が観察された（データは示さない）。これら遺伝子座の高メチル化は、調べた6つの細胞系すべてに広く存在しているように見えた。逆に、他の遺伝子座HBC-16～HBC-32（配列ID番号14～30）では正常な対照にすでに存在しているメチル化が検出されず、これら細胞系では高メチル化の程度がより少ないように見えた。いくつかのケース（例えばHBC-23～HBC-32（配列ID番号21～30））では、いくつかの細胞系だけで高メチル化が観察された。この観察結果から、すでに条件が整っているCpG島遺伝子座では、がん細胞で新たにメチル化する傾向があることが示唆される。パターン分析からも、全体的なメチル化の頻度が細胞系ごとに異なることが明らかになった。メチル化（メチル化スコアが0.1よりも大きいもの）は、Hs578tではこれら30個の遺伝子座の57%において観察された。この割合は、T47Dでは67%、ZR-75-1では77%、MDA-MB-468では80%、MDA-MB-231細胞では90%、MCF-7では93%であった。このような違いは、あらかじめ存在する条件が検出されない遺伝子座HBC-16～HBC-32（配列ID番号14～30）でメチル化パターンを比較することによってさらにはっきりとした。2つの極端な場合を例示すると、Hs578t細胞においてはこれら17個の遺伝子座のうちの4個だけでメチル化が検出可能であったのに対し、MCF-7細胞ではこれら遺伝

30

40

50

子座のうちの15個が広くメチル化していた。この結果は、CpG島配列をメチル化する能力がこれら細胞系では元々異なっていることを示唆している。

【実施例5】

【0164】

(サザン・ハイブリダイゼーションによる原発性乳がんのメチル化分析)

【0165】

本質的に重要でない遺伝子に付随するCpG島は、長年にわたって培養している不死化細胞の中で時間経過とともにメチル化する可能性のあることが明らかになった。Antequera他、Cell、第62巻、503~514ページ、1990年を参照のこと。試験管内での知見が原発性乳がんにおける本当に新規なメチル化を代表しうるかどうかがという疑問を調べた。原発性乳がんにおける9つのCpG島遺伝子座(HBC-6(配列ID番号4); HBC-8(配列ID番号6); HBC-9(配列ID番号7); HBC-12(配列ID番号10); HBC-15(配列ID番号13); HBC-18(配列ID番号16); HBC-20(配列ID番号18); HBC-22(配列ID番号20); HBC-23(配列ID番号21))のメチル化状態をサザン・ハイブリダイゼーションによって調べた。図8の上を示したパネルからわかるように、HBC-18(配列ID番号16)は、患者47、135、119、129、15、31、65の腫瘍DNAサンプルにおいて、対となる正常な乳房組織と比べて高メチル化していた。HBC-18(配列ID番号16)遺伝子座の不完全なメチル化が、患者11と137の腫瘍において検出された。図8の下を示したパネルでは、以前の観察結果と同様、HBC-9(配列ID番号7)のすでに存在しているメチル化が、これらの患者の正常な乳房組織で観察された(図7)。HBC-9(配列ID番号7)の高メチル化が、患者47、139、145、65の腫瘍レーンで観察された。これは、440bpの断片の強度が正常なレーンにおける同じバンドの強度と比べて大きくなっていることを示している。予備的な観察では、2つの遺伝子座HBC-16(配列ID番号14)とHBC-26(配列ID番号24)の新規なメチル化は、2つの原発性乳がん中存在していなかった。

10

20

【0166】

これらの細胞系と正常な対照でメチル化パターンを比較した。新たにメチル化する傾向が上記の30個のCpG島遺伝子座で異なっていることがわかる。この先天的条件は、局所的ゲノム配列にすでに存在しているメチル化条件によって少なくとも部分的な影響を受ける可能性がある。実施例4で説明したように、遺伝子座HBC-3~HBC-15(配列ID番号1~13)は、他の遺伝子座と比べて新たにメチル化しやすいようであった(図7)。正常な乳房サンプルでは、このCpG島群におけるメチル化を検出することができ、これら遺伝子座のメチル化は、調べたがん細胞系において広く見られた。他方、このすでに存在している条件がない他の遺伝子座は、乳がん細胞において新たにメチル化しにくかった。この観察結果は、CpG島遺伝子座にすでに存在しているメチル化によってがん細胞内で新たなメチル化が促進される可能性のあることを示唆している。

30

【0167】

この観察結果は、DNAメチラーゼの活性が部分的な予備メチル化条件によってプラスの影響を受ける可能性があるという試験管内での以前のいくつかの知見によっても支持される(Christman他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第92巻、7347~7351ページ、1995年; Carotti他、Biochem. J.、第37巻、1101~1108ページ、1998年を参照のこと)。これらの研究から、一本鎖または二本鎖の合成ポリマーは真核生物のDNAメチラーゼの貧弱な基質であるが、原核生物のメチラーゼによって少数の5-メチルシトシンが導入された後にはDNAメチラーゼによって効果的にメチル化がなされることがわかった。Carottiらは、天然のものであれ合成のものであれ二本鎖DNAの基質に5-メチルシトシンが存在していると、DNAメチラーゼによって近傍のCpGジヌクレオチドのメチル化が試験管内で促進されることを示した(Carotti他、上記文献)。促進の程度は、5-メチルシトシン残基の数と分布の両方に依存していた。効果が現われるためには、5-メチルシトシンが互いに近づきすぎてはいけなかった。この現象は、DNAメチラーゼのcDNAをトランスフェクトしたヒト線維芽細胞でも観察された(Vertino他、Mol. Cell Biol.、第16巻、4555~4565ページ、1996年を参照のこと)。DNAメチラーゼを過剰発現しているトランスフェクトされた細胞にお

40

50

いて新たにメチル化されたCpG島遺伝子座は、親細胞系におけるメチル化レベルは低かったが検出可能であった。逆に、トランスフェクトされたクローンにおいてメチル化に抵抗したCpG島遺伝子座は、親細胞系ではメチル化が見られなかった。

【0168】

メチル化が広がるこの現象は、すでに存在している条件を伴ったCpG島遺伝子座において広く見られるメチル化を説明することができる。腫瘍生成の間、すでに存在しているメチル化された反復エレメントが新たなメチル化の中心として機能し、そこから隣のCpG島配列へとメチル化が広がっていくことができる。これら実験の結果は、メチル化が腫瘍細胞のCpG島配列の中から実際に広がっていきうことを示している。配列内に存在している5-メチルシトシン残基は、DNAメチラーゼの新たなメチル化を促進することができる。DNAメチラーゼは正常な細胞内で活性を維持するために半メチル化された基質を好むとはいえ、この酵素はCpG島配列内に存在する5-メチルシトシンを“感知する”第2の調節ドメインを持っていて、新たなメチル化を可能にする。この“感知”機能は、腫瘍細胞においてはDNAメチラーゼのレベルが異常に高いためにより活性化する可能性がある。するとメチル化されたCpGジヌクレオチドをすでに含んでいる配列の近くに位置するシトシンが新たにメチル化されることになる。新たにメチル化された部位は、DNAメチラーゼを通じて隣接する配列が次にメチル化するのを促進する能力を獲得することができる。メチル化のこの“ドミノ”効果は時間経過とともに増大して全CpG島領域をカバーし、それに伴って転写のサイレンシングに至る可能性がある。

【0169】

乳がん細胞系におけるメチル化能力の違い。われわれの発見の第2の特徴は、上記乳がん細胞系のメチル化能力に差を見いだしたことである。Hs578t細胞とMCF-7細胞という極端な2つの例を挙げると、Hs578t細胞は、上記のあらかじめ存在している条件なしではCpG島HBC-16~HBC-32(配列ID番号14~30)をメチル化する能力を欠いていたのに対し、MCF-7細胞は、CpG島遺伝子座をメチル化することに長けていた。これは、これら細胞系で観察された差が、単にDNAメチラーゼの異常な作用によるものではありえないことを示唆している。メチル化の程度は、これら細胞におけるDNMT1の発現レベルの増大またはp21^{WAF1}の発現レベルの低下とは関係ないようであった(図1と図7)。

【0170】

したがってこれらの結果は、別の細胞因子がCpG島の高メチル化を支配している可能性のあることを示している。1つの可能性は、新規なメチラーゼをコードしているまだ同定されていない遺伝子、または特性が明らかになっていない遺伝子である。別の可能性は、上記のがん細胞で観察されたさまざまな程度の新たなメチル化が、より大きな増殖能力を持つ高メチル化表現型が固定したことの結果である可能性があるというものである。最後に、異なるメチル化能力は、これら細胞系においてDNA修復の欠如と関係している可能性がある。

【実施例6】

【0171】

(乳がんをスクリーニングし分析するのにDMH法を利用した)

【0172】

乳がん細胞系でメチル化を支配している可能性のありそうなメカニズムをパターン分析によって明らかにした。次にDMH法を適用し、特定のエピジェネティックな変化のパターンが分析した患者の病理学的パラメータと相関しているかどうかを調べた。

【0173】

乳がんDNAからのアンプリコンの単離。エリス・フィッセルがんセンター(コロンビア、ミズーリ州)で1992年~1998年に乳房切除術を受けた28人の女性患者から採取した乳がんサンプルを、DMH法を利用して分析した。同じ患者から、正常な対照として用いるため隣接する正常な実質組織を採取した。この研究で用いたどの腫瘍もすべて、浸潤している腺管がんとして分類され、ブルームとリチャードソンをノッティンガムが改変した基準に基づいてグレードを評価した(Bloom, H.J.G.とRichardson, W.W., Br. J. Cancer, 第

10

20

30

40

50

9巻、359～377ページ、1957年を参照のこと)。この腫瘍グレード法は、チューブの形成、核の多形現象、有糸分裂活性の組織学的特徴に基づいており、それぞれのカテゴリーに従って点数を割り当てた。腫瘍の全体的グレードは点数の合計であり、3～9点になった。ほとんど分化していない表現型の腫瘍(8～9点)は、チューブ構造がないか少なく、核が不規則で大きく、有糸分裂の数が多かった。中程度に分化した表現型の腫瘍(6～7点)またはよく分化した表現型の腫瘍(3～5点)は、明確なチューブ構造を持ち、上皮細胞の形成が適度な輪郭を持ち、核クロマチンが均一であり、有糸分裂指数が小さい。QIAamp(登録商標)組織キットJ(キアジェン社)を用いてこれらのサンプルから高分子量のDNAを単離した。

【0174】

実施例1の「材料と方法」に記載したようにしてDMH法を実施した。乳がんサンプルまたは正常なサンプルからのゲノムDNA(0.5～1μg)を用いて実施例1に記載したようにしてアンプリコンを調製した。増幅産物を正常アンプリコンまたは腫瘍アンプリコンに分けて精製し、³²Pで標識し、アレイにハイブリダイゼーションさせた。CGIゲノム・ライブラリから、BstU Iに対してプラスのCpG島クローン、Cot-1に対してマイナスのCpG島クローン、Cot-1に対してわずかにプラスのCpG島クローンを調製し、実施例1に記載したようにして96ウェル形式のPCRを行なった。まず最初に、正常なアンプリコンを膜にハイブリダイズさせ、モレキュラー・ダイナミクス社のホスファイメージャーを用いてオートラジオグラフィを行なった。プローブを剥がし、同じ膜または複製した膜に腫瘍アンプリコンをハイブリダイズさせてホスファイメージャーで走査した。

【0175】

データ分析。プラスのCpG島タグのドット強度をImageQuant(登録商標)ソフトウェア(モレキュラー・ダイナミクス社)の体積レビュー・プロトコルを用いて測定した。腫瘍サンプルと正常サンプルからの生の体積データを規格化してから比較した。これは、内部対照タグの比を明らかにすることによって実現した。簡単に述べるならば、体積比に近い2つの内部対照タグを選択し、対にしたアンプリコン間のハイブリダイゼーションの差を評価した。各アンプリコンのこれら2つの対照タグの一方を用いて規格化因子をさらに計算した。

規格化因子 = 正常な内部対照タグの体積 / 腫瘍の内部対照タグの体積

【0176】

この因子を適用して腫瘍タグの体積を規格化した。正常組織内にあってメチル化がすでに存在しているタグについては、規格化した腫瘍の体積から正常なタグの体積を差し引いた。正常なタグ内にあってメチル化が存在していないタグについては、規格化した腫瘍の体積をそのまま用いた。シグマスタット・ソフトウェア(バージョン2.0)を用いて統計的分析を行なった。データに対して正規性検定を行なうてうまくいかなかった場合には、腫瘍のグレードが異なるグループでの高メチル化の差を、対応のないt-検定とマン-ホイットニー順位和検定によって明らかにした。P値が0.05未満のときに、差は有意であると見なせる。

【0177】

結果と考察。まず最初に、1,000を超えるCpG島タグを含むアレイ・パネルを利用し、乳がんサンプルと正常なサンプルのペア28組に対してDMH法を行なった。図9Aには、103人の患者から採取した正常なサンプルと腫瘍サンプルのペアにおけるDMHスクリーニングの代表的な結果を示してある。目視により、乳がんが高メチル化した配列を同定することができた。これは、腫瘍アンプリコンを用いてCpG島タグにハイブリダイゼーション・シグナルを検出できるが、正常なアンプリコンを用いると同じタグにハイブリダイゼーション・シグナルを検出できないことを示している(矢印で示した例を参照のこと)。このようになるのは、腫瘍DNA内のメチル化されたBstU I部位がCpG島配列内では切断から保護されていて、リンカーPCRによって増幅されて対応するタグにハイブリダイズしたからである。しかしその同じ部位は、正常なDNAの内部ではメチル化されていないか一部しかメチル化されておらず、BstU Iによって切断された。したがって、アレイでハイブリダイゼーション

10

20

30

40

50

ン・シグナルは検出されなかった。高メチル化したこれら CpG 島 タグのいくつかは、次の 2 回目のスクリーニングで確認した (図 9B)。

【 0 1 7 8 】

いくつかの CpG 島 タグが正常なアンプリコン (すなわちすでにメチル化が存在しているアンプリコン) によって検出されたが、腫瘍アンプリコン (例えば図 9A の下右隅の CpG 島) で調べたときのほうがシグナル強度が大きかった。これらの配列は、一般に、すべてのタグのうちで非常に大きなハイブリダイゼーション・シグナルを示した。これは、細胞系での研究に関してすでに説明したように CpG ジヌクレオチド・リッチなリボソーム DNA のコピーが大量にあることを表わしているようである。リボソーム DNA のメチル化は正常な細胞において以前から観察されているが、乳がんにおいてより増大することが示された。別の可能性は、異数性のために腫瘍において正常にメチル化された CpG 島 遺伝子座のコピー数が増大するというものである。すでに存在しているこの条件を除くと、メチル化されていない CpG 島 における高メチル化の程度は、このグループの患者一人ごとに大きく異なっていた。調べたいいくつかの乳がんサンプルでは調べた BstU I 部位の約 9% が完全にメチル化していたのに対し、他のサンプルでは調べた部位に検出可能な変化はほとんど、あるいはまったく存在していなかった。

10

【 0 1 7 9 】

CpG 島 タグの配列の特性調査。一次スクリーニングで高メチル化に関してプラスであった 30 個の CpG 島 タグを選択してさらに特性を調べた。DNA シークエンシングの結果から、これらタグのうちの 9 個が既知の cDNA と一致する配列を含んでいることがわかった。それは、表 1 に示した PAX7 (5' 末端)、カベオリン -1 (エキソン 2)、GATA-3 (エキソン 1)、COL9A1 (エキソン 1) と、5 つの EST (A1928953、AA604922、AA313564、A1500696、A1381934) である。

20

【 0 1 8 0 】

この知見は、乳がん細胞系のカベオリン -1 遺伝子で CpG 島のメチル化を観察した Lisanti らの結果と一致している。実施例 5 で説明したように、乳がん細胞系で高メチル化していることが見いだされた 5 つの CpG 島 タグ (HBC-17 (配列 ID 番号 15) ; HBC-19 (配列 ID 番号 17) ; HBC-24 (配列 ID 番号 22) ; HBC-25 (配列 ID 番号 23) ; HBC-27 (配列 ID 番号 25)) も、この研究で同定した。残りの 25 個のタグには HBC-33 ~ HBC-57 (配列 ID 番号 31 ~ 46) という記号を割り当てた。

30

【 0 1 8 1 】

乳がんにおける 2 回目の DMH スクリーニング。図 9B にすでに示したように、30 個の CpG 島 タグを再びアレイにして患者グループで 2 回目の DMH スクリーニングを行ない、高メチル化状態を確認した (図 10 の代表的な結果を参照のこと)。1 回目のスクリーニングで調べたいいくつかの乳がんにおいてハイブリダイゼーションの強度に差がなかった別の 5 つのタグ (x 軸と y 軸の座標は 3C、3F、3G、4G、5G) を内部対照として選択した。ここでも、正常な対照のほとんどにおいては調べた遺伝子座でハイブリダイゼーション・シグナルがわずかに検出された、あるいはまったく検出されなかったのに対し、対応する乳がんではハイブリダイゼーションの強度がさまざまであった。これは、CpG 島の高メチル化の差を反映している。

40

【 0 1 8 2 】

メチル化の差を半定量化するため、各 CpG 島 タグについて、ハイブリダイゼーション・シグナルの強度を「材料と方法」に記載したようにして ImageQuant (登録商標) ソフトウェアの体積レビュー・プロトコルを用いて測定した。図 10 から、内部対照のドットの強度が患者ごとに異なること、あるいは一人の患者の腫瘍サンプルと正常なサンプルのペアにおいて異なることが明らかである。これは、組織の異質性、あるいは腫瘍の異数性が原因であろう。したがって内部対照の体積比を調べ、体積比に近い 2 つを選択して規格化した。この患者群では、臨床上的相関関係を調べるために調節した腫瘍の体積を用いた。

【 0 1 8 3 】

CpG 島の高メチル化と腫瘍のグレード。統計的分析により、CpG 島の高メチル化が乳がん

50

の組織学的グレードと関係していることが明らかになった (P - 0.041)。グレードの異なる腫瘍間でのCpG島の高メチル化の違いを目に見えるようにするため、グレイ・スケールを考案し、図11に示したように腫瘍のメチル化体積を百分位数に分類した。PD (ほとんど分化しない) 群は、調べた遺伝子座において対応するMD/WD (よく分化した / 中程度に分化した) 群よりも高メチル化の頻度と程度が大きかった。14個のPD型腫瘍の半分が多数の遺伝子座 (10個超) で広範に高メチル化していたのに対し、14個のMD/WD型腫瘍では2つだけが同じ遺伝子座で高メチル化していた。さらに、PD型腫瘍では頻繁に高メチル化していたがMD/WD型腫瘍ではそうでなかった遺伝子座HBC-42 (配列ID番号36)、HBC-45 (配列ID番号38)、HBC-47において、最も大きな違いが見られた。この結果は、疾患がより進んだ状態の患者のほうがメチル化が変化しやすいことを示唆している。何人かの患者では、調べた遺伝子座でメチル化がほとんど、またはまったく変化していなかったことに注意されたい。これは、ある種の腫瘍の進行がこのエピジェネティックなイベントとは独立である可能性があること、あるいはそのような患者では変化が腫瘍増殖のより後のステージで起こる可能性があることを示している。この研究では、高メチル化と他の臨床パラメータの関係は見いだせなかった。

10

【0184】

これらの実験の結果から、さまざまな臨床サンプルで観察されたメチル化パターンの違いががんのステージまたはタイプの違いを反映している可能性のあることがわかる。ここに示したケースでは、グレードの異なる腫瘍の間で最も共通して観察されたCpG島遺伝子座のメチル化 (例えばHBC-33、HBC-34 (配列ID番号31)、HBC-35、HBC-36) は腫瘍増殖の初期に起こっているらしいのに対し、PD群で優先的に観察されたがMD/WD群では観察されなかったメチル化 (例えばHBC-42 (配列ID番号36)、HBC-45 (配列ID番号38)、HBC-47) は後期のステージで起こっている。

20

【0185】

上記のことを考慮すると、本発明のいくつかの目的が達成されることがわかるであろう。本発明の他の特徴、目的、利点は、当業者には明らかであろう。ここに提案した説明および図面は、他の当業者に本発明、その原理、その実際的な用途を知らせることを目的としている。当業者であれば、個々の用途における条件に最も合うように本発明をいろいろな形態に改変して適用することができよう。したがってここに提示した本発明の具体的な実施態様は本発明のすべてではなく、本発明がその実施態様に限定されることもない。

30

【実施例7】

【0186】

(実施例7~12のための材料と方法)

【0187】

サンプルの調製。乳がん細胞系MDA-MB-231を以前に報告されているようにして維持し (Laux, D.E.他、Breast Cancer Res. Treat.、第56巻、35~43ページ、1999年)、初期密度 2×10^4 細胞/cm² にして0.75 μ Mの5-アザ-2'-デオキシシチジン ("デオキシC") で4日間にわたって処理した後、回収した。対照培養物をデオキシCの不在下で維持した。乳がんサンプルと腫瘍のないサンプルを、エリス・フィッセルがんセンター (コロンビア、ミズーリ州) で乳房切除術またはバイオプシーを受けている患者から採取した (組織内検討委員会の承認#7935)。ゲノムDNAと全RNAをそれぞれQIAamp (登録商標) 組織キットとRNeasy (登録商標) キットを用いて単離した。

40

【0188】

CpG島マイクロアレイの調製。CpG島クローンを7,776個含むマイクロアレイ・パネルのPCR産物 (平均で500bp) を以前に報告されているようにして調製した (Yan, P.S.他、Cancer Res.、第61巻、8375~8380ページ、2001年)。簡単に述べるならば、マイクロアレイ・パネルを調製するための原材料はCpG島ライブラリCGIに由来するものであった (Cross, S.H.他、Nat. Genet.、第6巻、236~244ページ、1994年)。CGIは、MseI (DNAを切断して小さな断片群にするが、CpG島断片はほぼ完全に保持することが知られている4塩基カッター) で切断した男性のゲノムDNAを用いて以前に調製した (前掲文献)。メチル結合MeC

50

P2タンパク質を含むアフィニティ・カラムでGCリッチなMseI断片を単離してベクターの中にクローニングし、ライブラリを構成した。合計で7,776個のCGIクローンをマスター・プレートとしての96ウエルの培養チェンバーの中で個別に構成した。この中には、テストするメチル化感受性部位を欠いていることが知られているためプラスの対照として機能するあらかじめ選択した10個のMseIタグが含まれていた。各クローンの一部(約1 μ l)を、マルチ・プリント(登録商標)レプリケータ(V&Pサイエンティフィック社)を用いて別の96ウエルのPCRチューブのウエルに移した。これらクローンからのCpG島挿入体(0.2~2kb)を、文献に記載されているようにしてPCRで増幅した(Huang, T.H.-M.他、Hum. Mol. Genet.、第8巻、459~470ページ、1999年)。挿入体に直に隣接するプライマーは、HGMP 3558: 5'-CGGCCGCCTGCAGGTCTGACCATAA(配列ID番号47)とHGMP 3559: 5'-AACGCGTTGGGAGCTCTCCCATAA(配列ID番号48)である(CGI)(Cross, S.H.他、1994年、前掲文献)。各PCRの再現性を確実にし、マイクロプレート内の細菌クローン間の相互汚染を防止するため、96ウエル形式のゲル電気泳動システム(カソード・バイオロジスティック社)を用いて増幅された挿入体を個々に確認した。アレイ形成装置をアフィメトリックス/GMS 417アレイヤーにして未精製のPCR産物のドットを形成できることが好ましい。というのも、この装置のリングとピンのシステムは、糸巻きタイプのペンやインクジェット・タイプの印刷ベッドよりもはるかに詰まりにくいからである。DeRisiらのウェブサイト(www.microarrays.org)に記載されているようにして、未精製のPCR産物(ドット1つにつき約0.02 μ l、0.1 μ g/ μ l)を、20% DMSOの存在下で、ポリ-L-リシンでコーティングした顕微鏡スライドの上にマイクロドット(直径150 μ mで間隔を300 μ mにする)として印刷した。ドット状のDNAは、使用前に変性させた。

【0189】

発現分析のためのアンプリコンの調製。全RNA100 μ gをコウシ腸ホスファターゼ(ニュー・イングランド・バイオラズ社)で処理した後、キアジェン社のRNeasy(登録商標)カラムで精製した。この処理によってキャップのないリボソームRNA、tRNA、断片化したmRNAから5'遊離リン酸と汚染ゲノムDNAが除去されたが、キャップの付いたmRNAの完全な5'末端はそのまま残った。次にタバコ酸性ピロホスファターゼで処理することによりmRNAのキャップ構造を除去したが、5'-リン酸はmRNAに付着したまま残った(MaruyamaとSugano, S.、Gene、第138巻、171~174ページ、1994年)。合成RNAアダプター(0.5ナノモル、5'-ACCGGAGCGGCACGGGAAUAGAGCAACAGGAAA(配列ID番号55))をT4 RNAリガーゼ(エピセクター社)の存在下でmRNA集団の5'末端に連結させた。しかしこのアダプターは、連結に必要な5'-リン酸を欠いている脱リン酸化したリボソームRNA、tRNA、断片化mRNAには連結させることができなかった。45'にて17-ntのポリT(5'-GGCCGACTCACTGCGCGTCTTCTGTCCCGCCT₁₇(配列ID番号56))を含むプライマーを用いて逆転写(スーパースクリプトII(登録商標)逆転写酵素、ライフ・テクノロジーズ社)させることにより、連結したmRNAから完全長cDNAを生成させた。5'アダプター・プライマーと3'アダプター・プライマー: 5NES T: 5'-GCACGGGAAATAGAGCAACAG(配列ID番号57)と3RT: 5'-GGCCGACTCACTGCGCGTCTTCTG(配列ID番号58)を用いてロングPCR反応(タックプラス(登録商標)ロングPCRシステム、ストラタジーン社)を実施した。PCRの線形性を保持するため、増幅サイクルの数を少なくした(18サイクル)。増幅産物(またはアンプリコン)を精製して蛍光標識した。BIOPRIME(登録商標)DNA標識システム(ライフ・テクノロジーズ社)を用いてアミノ-アリル dUTP(aa-dUTP)をアンプリコン(5 μ g)に組み込んだ。蛍光染料Cy5とCy3をaa-dUTPで標識したテスト・アンプリコンと基準アンプリコンにそれぞれ結合させ、CpG島マイクロアレイ・パネルに同時にハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションとハイブリダイゼーション後の洗浄のプロトコルに関しては、DeRisiら(<http://www.microarrays.org>)に従った。ハイブリダイズしたスライドをGenePix 4000Aスキャナー(アクソン社)で走査し、取得した画像をGenePix Pro3.0というソフトウェアを用いて分析した。

【0190】

メチル化を分析するためのアンプリコンの調製。メチル化を分析するためのアンプリコンの調製は、以前の報告(Huang, T.H.-M.他、Hum. Mol. Genet.、第8巻、459~470ページ)

ジ、1999年)に従って行なった。簡単に説明するならば、バルクのDNAを小さな断片群(約200bp未満)に切断するがGCリッチなCpG島は保持する4塩基TTAAエンドヌクレアーゼであるMseIを用いて2 μ gのゲノムDNAを切断した。消化産物の付着性のある末端部を、0.5ナノモルのPCRリンカーH-24/H12(H-24:5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAT(配列ID番号49)およびH12:5'-TAATCCCTCGGA(配列ID番号50))と連結させた。次に差し引きハイブリダイゼーション法(Craig, J.M.他、Hum. Genet., 第100巻、472~476ページ、1997年)を利用して連結産物から反復DNAを除去した。差し引かれたDNAをメチル化感受性エンドヌクレアーゼHhaIを用いてさらに消化させた。さらに、差し引きステップなしでDNAを2つのメチル化感受性エンドヌクレアーゼHpaIIとBstUIで直接消化させた。消化物を鋳型として用い、以前の報告(Huang, T.H.-M.他、1999年、前掲文献)に従ってリンカーPCRを実施した。1つのメチル化感受性エンドヌクレアーゼで処理した増幅産物と2つのメチル化感受性エンドヌクレアーゼで処理した増幅産物の両方を精製し、aa-dUTPを組み込むのに使用した。蛍光標識ステップ、マイクロアレイへのハイブリダイゼーション・ステップ、ハイブリダイゼーション後の洗浄ステップ、スライドを走査するステップは、すでに説明した通りである。

10

20

30

40

50

【0191】

マイクロアレイのデータ分析。ハイブリダイズした各スポットについてCy3とCy5の蛍光強度を取得した。蛍光シグナルがバックグラウンドのシグナルに近いアレイ上のスポットはPCRまたは印刷の失敗を反映しているため、データ分析しなかった。Cy5とCy3の標識効率はサンプルごとに異なるため、各画像からの比Cy5/Cy3を全体の比Cy5/Cy3と14個の内部対照の比の平均値を用いて規格化した。その結果、規格化した比は1になっていることが想定される。この内部対照パネルでは、 α -アクチンのcDNAの異なる2つの断片(エキソン1と3)と、GAPDMのcDNAの2つの異なる断片(エキソン1と8)を、各アレイ上に濃度を変えてスポットにした。次に、調節した比Cy5/Cy3を各ECIST遺伝子座について計算し、データをスプレッドシート形式に移して分析した。結合させる染料をテストアンプリコン(Cy3)と基準アンプリコン(Cy5)というふうに逆にした第2のマイクロアレイ実験も行なった。次に、得られたマイクロアレイのデータを第1の実験で得られたデータと比較した。品質を制御するための自己ハイブリダイゼーション実験も行なった。この実験では、テストする同量の2つのDNAサンプルをCy5とCy3でそれぞれ標識し、マイクロアレイ・スライドに同時にハイブリダイズさせた。遺伝子発現データを統計的に分析するため、SAM(マイクロアレイの有意分析)と呼ばれるソフトウェア・パッケージを使用した(Tusher, V.G.他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第98巻、5116~5121ページ、2001年)。3つのハイブリダイゼーション実験(2回の繰り返し実験と、1回の自己ハイブリダイゼーション実験)を分析のための入力として用いた。得られた発現データを立方根に変換して正規分布を得た後、分析を行なった。

【0192】

ヌクレオチドのシーケンシング。ECISTクローンからプラスミドDNAを調製し、ダイデオキシ・ターミネータ・サイクル・シーケンシング・キット(アプライド・バイオシステムズ社)と自動化されたABI PRISM377シーケンサを用いてシーケンシングを行なった。次に、得られたヌクレオチド配列をBLASTプログラム(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)を用いてGenBankの配列と比較した。

【0193】

ノーザン・ハイブリダイゼーション。ヒトの12の異なる組織からのポリA⁺RNAをレーンごとに1 μ g含むあらかじめ作ったノーザン・プロット(クロンテック社)を用い、ECIST遺伝子座に転写産物が存在しているかどうかを調べた。PCR産物(約200塩基)をECIST断片内の仮想発現配列から生成させ、マルチプライムDNA標識システム(アマシャム社)を用いて³²Pで標識した。この放射性標識したプローブをノーザン・ハイブリダイゼーションで使用した。ハイブリダイゼーション後の洗浄は、すでに説明したようにして実施した(Huang, T.H.-M.他、1999年、前掲文献)。次に、ハイブリダイズしたプロットをホスファイメージャー(登録商標)(モレキュラー・ダイナミクス社)の中に入れ、ImageQ

uant (登録商標) ソフトウェア (モレキュラー・ダイナミクス社) を用いて結果を分析した。

【0194】

5'-RACE。このPCR法を利用して転写産物の5'末端を増幅した。既に説明したRNAリガーゼ媒介cDNA合成法を利用し、鋳型となる完全長cDNAを調製した。遺伝子座特異的プライマー(3'末端)とすでに説明した5'-アダプター・プライマー5NESTを用いてPCRを実施した。5'-RACEで使用した5つの遺伝子座特異的プライマーは以下の通りである。GAPDH: 5'-CGC TCC TGG AAG ATG GTG A (配列ID番号59); β -アクチン: 5'-CGC AGC TCA TTG TAG AAG GTG TGG (配列ID番号60); CpG6B6: 5'-TGT TGC TGG GGT ACA TGT TG (配列ID番号61); PY2F1: 5'-GGA TTG GAC ACC ATT GCA GCC G (配列ID番号62); SC13D6: 5'-AAC CAT TTG CCA ATA CTT TCA TTT (配列ID番号63)。1%アガロース・ゲルを用いてPCR産物の電気泳動を行なった。

【0195】

サザン・ハイブリダイゼーション。マイクロアレイの実験で明らかにされたECISTのメチル化状態を確認するため、MDA-MB-231細胞または患者のサンプルからのゲノムDNA10 μ gをMseIだけで完全に消化させ、場合によってはその後にメチル化感受性エンドヌクレアーゼBstU I、HhaI、HpaII (ニュー・イングランド・バイオラブズ社) のいずれかで消化させた。消化は、供給者のプロトコルに従って実施した。制限産物を1%アガロース・ゲル上で電気泳動し、ナイロン膜に移した。PCRによってCpG島クローンから調製したプローブ(200~300bp)を膜にハイブリダイズさせた。プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、洗浄を以前の報告(Huang, T.H.-M.他、1999年、前掲文献)に従って行なった。膜をホスファイメージャー(登録商標)(モレキュラー・ダイナミクス社)の中に入れ、ImageQuant(登録商標)ソフトウェア(モレキュラー・ダイナミクス社)を用いて結果を分析した。

【0196】

RT-PCR。各サンプルについて、スーパースクリプトII(登録商標)システム(ライフ・テクノロジーズ社)を用いて合計で1~4 μ gのRNAを逆転写した。フェイルセーフPCR酵素ミックス・キット(エピセンター社)を用いて最適なRT-PCR条件に調節した。増幅サイクルを18~25回実施して反応させた。これは、アッセイの線形性が保持される範囲であると考えられる。プライマーとしては以下のものを使用した。すなわち、CpG5B6: 5'-TCT GCT TGC TTG GCC CTT CTG (配列ID番号64) (センス鎖)と5'-TCC CTT CTG CCA CAT GGT TCA (配列ID番号65) (アンチセンス鎖); SC21G11: 5'-GCA CCG GTA AG GAA AAC AAA A (配列ID番号66) (センス鎖)と5'-GAG CCA GTT GAT CAC CTC CTG (配列ID番号67) (アンチセンス鎖); SC77F6: 5'-CAG AAC CAC CGC TAC AAA ATG (配列ID番号68) (センス鎖)と5'-GAC ATG GTG CCG TAG TCC GAG (配列ID番号69) (アンチセンス鎖); PY2F1: 5'-CCC CCA TCC CAG AAG ACA AAG (配列ID番号70) (センス鎖)と5'-CTC GCT TTC GGA CAT GG T TC T (配列ID番号71) (アンチセンス鎖); SC13D6: 5'-TTG GAG TAA GAC TCC TGC ATC G CG (配列ID番号72) (センス鎖)と5'-CTC GCT TTC GGA CAT GGTTCT (配列ID番号73) (アンチセンス鎖); SC70E4: 5'-ACA CCC AGC CCC CAT TAC CTA (配列ID番号74) (センス鎖)と5'-TCA CCC CTT GGT TGT CGA TGG (配列ID番号75) (アンチセンス鎖); SC62A4: 5'-TCC CCT CAC TCC CTT GCT GGT (配列ID番号76) (センス鎖)と5'-TGG CCA TAT GGA T GC TCC TTG (配列ID番号77) (アンチセンス鎖); CpG12F10: 5'-GAT GTG AGG AGT GTG G GA AGG (配列ID番号78) (センス鎖)と5'-TGT GGA CTC TGC GAT GAG AAT (配列ID番号79) (アンチセンス鎖); MP3D7: 5'-TGG AAC AGT TTG GAG GGC TCA (配列ID番号80) (センス鎖)と5'-CAC GGC TGC ACT AGG CGA GTA (配列ID番号81) (アンチセンス鎖); MP2A3: 5'-CTT GCA GTG GCT GGA GAT GAA (配列ID番号82) (センス鎖)と5'-CAA GAC ACG TC A GCC TGG CAT (配列ID番号83) (アンチセンス鎖); β -アクチン: 5'-GGA TTC CTA TGT GGG CGA CGA G (配列ID番号84) (センス鎖)と5'-CGC AGC TCA TTG TAG AAG GTG TGG (配列ID番号85) (アンチセンス鎖)である。増幅したcDNAのレベルを以前に報告(Laux, D.E.他、Breast Cancer Res. Treat., 第56巻、35~43ページ、1999年)されているよう

にして -アクチンのcDNAのレベルと比較した。

【実施例8】

【0197】

(CpG島マイクロアレイ・パネルにおいてECISTを同定した)

【0198】

この実施例では、完全長cDNA分子を構成し、それを利用して7,776個のCpGタグを含むハイブリダイゼーション用マイクロアレイ・パネルをスクリーニングすることにより、1,162個のECIST(発現CpG島配列タグ)遺伝子座を同定する。

【0199】

RNAリガーゼ媒介cDNA合成法(Suzuki, Y.他、Gene、第200巻、149~156ページ、1997年)を利用して乳房上皮のRNAまたはストラタジーン社のヒト普遍的基準RNAから完全長cDNAを生成させた。キャップの付いた完全長mRNAのcDNAだけがロングPCRによって増幅された(図12A)。したがってcDNAの5'末端の完全性が維持された(例えば図12Bの -アクチンとGAPDHのcDNA)。マイクロアレイの画像を半定量化するため、増幅の線形性が保持される範囲でPCRのサイクル数をさらに最適化した(図12C)。

【0200】

増幅産物をCy3(シアニン3)蛍光染料で標識し、マイクロアレイ・パネルにハイブリダイズさせた。反復エレメント(例えばAlu、ミトコンドリアのRNA遺伝子、リボソームRNA遺伝子)を除外すると、最初にスクリーニングした7,776個のCpG島タグのうち合計で1,162個の遺伝子座がECISTの基準に合致した。プラスであったこれら遺伝子座は、ハイブリダイゼーションの強度がバックグラウンドの2倍を超えるものとして定義した(マイクロアレイの一部を示してある図13A)。

【0201】

1,162個のECISTのうちの合計で155個についてヌクレオチドのシーケンシングを行なってその性質をさらに調べた。これら遺伝子座のうちの132個(85.2%)が、既知の転写産物または発現配列タグと一致する配列を含んでいる。残る23個の遺伝子座(14.8%)は、まだ性質がわかっていない発現配列を含んでいるらしいゲノム領域と一致していた。配列情報に基づくと、遺伝子のコピーを多数含む冗長度は、ECISTパネルでは約10%である。例えば核内低分子RNA遺伝子(U1、U2、U3)とヒストン遺伝子(H2AとH2B)は、配列を決定したECISTクローンにおいて2~4倍になっていた。

【0202】

配列が既知の遺伝子と一致しなかった9つのECIST遺伝子座に新規なmRNAが存在しているかどうかを確認するため、ノーザン・プロット分析を行なった(図14A)。多数の組織のプロットからわかるように、MP2A3プローブとSC11E2プローブでは単一の転写産物が同定されたのに対し、遺伝子座CpG5H12とCpG16A3は、多数のスプライス変異体を有する転写産物を含んでいた。残る5個のECISTでは、ノーザン・ハイブリダイゼーションによっては転写産物が観察されなかった。しかしそのうちの3つの遺伝子座(CpG6B6、PY2F1、SC13D6)は、より感度の高い5'-RACEアッセイによると稀な転写産物をコードしているように見える(図14B)。

【実施例9】

【0203】

(高メチル化したECIST遺伝子座を同定した)

【0204】

実施例8の1,162個のECISTが固着したパネルをマイクロアレイ・ハイブリダイゼーション・スクリーンで使用し、ディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション(DMH)法を利用して、CpG島が高メチル化することによって沈黙した新規な遺伝子座を同定した。より詳細には、正常な対照細胞と比べてMDA-MB-231乳がん細胞でメチル化状態が異なっているDNAのいろいろな集合を代表するアンプリコンを、DMHスクリーニング・アッセイと固着した実施例8の1,162個のECIST遺伝子座を利用したマイクロアレイ・ハイブリダイゼーションの標的として使用した。

10

20

30

40

50

【0205】

リンカーが連結したゲノムDNAサンプルをメチル化感受性エンドヌクレアーゼを用いて消化させた後、PCRを行なった。MDA-MB-231細胞に由来し、高メチル化した部位を含むゲノムDNAの断片は保護されていてエンドヌクレアーゼによって消化されなかったため、リンカーPCRによって増幅させることができた。他方、対応するメチル化されていないエンドヌクレアーゼ部位を含む対応する正常な細胞に由来する断片は切断されたため、増幅不能になった。

【0206】

乳がん細胞でさまざまなメチル化状態になっているDNAの集合を代表するアンプリコンを、マイクロアレイ・ハイブリダイゼーションの標的として使用した。マイクロアレイ・ハイブリダイゼーションの後、高メチル化したECIST遺伝子座は“赤い”スポットになった。というのも、Cy5(赤)テスト・アンプリコンからは大きな強度のシグナルが得られたが、Cy3(緑)対照アンプリコンからはシグナルが得られなかったからである(図13B)。ハイブリダイゼーション実験を繰り返し、再現可能なスポットだけを選択して分析した。プラスである遺伝子座の“カットオフ”値を規格化した比Cy5/Cy3が1.5よりも大きいという条件に設定すると、合計で219個の遺伝子座が同定された(図16)。このカットオフ値は、乳がんでさまざまな高メチル化状態になっているCpG島を同定するのに有効であることが、出願人によって以前に確認されている(Yan, P.S.他、Cancer Res., 第61巻、8375~8380ページ、2001年)。

【0207】

MDA-MB-231と正常なゲノムでメチル化状態に差がない遺伝子座に対応するECISTは、アンプリコンがハイブリダイズしたECISTアレイ上に“黄色い”スポット(Cy5/Cy3=1)となって現われた。ハイブリダイゼーション・シグナルが現われなかったECISTは、MDA-MB-231細胞内のメチル化されていない遺伝子座を表わす。そのような遺伝子座に対応する単離したゲノム断片をメチル化感受性エンドヌクレアーゼで処理することにより除去した後、リンカーPCRを行なった。場合によっては、低メチル化を示す“緑色”のスポット(Cy5/Cy3<0.5)がMDA-MB-231細胞で見られた。

【実施例10】

【0208】

(メチル化によって沈黙していて脱メチル化に応答するECIST遺伝子座を同定した)

【0209】

この実施例では、実施例9のDMHアンプリコン/マイクロアレイ・スクリーニング・アッセイで高メチル化していることが明らかにされた特定のECIST遺伝子座が、メチル化によって沈黙した遺伝子に対応する遺伝子座を含んでいることと、特別な場合にはそのような沈黙状態が、脱メチル化剤で処理することによって再活性化したことを示す。

【0210】

脱メチル化剤デオキシCで処理したMDA-MB-231細胞と、脱メチル化剤デオキシCで処理しないMDA-MB-231細胞から完全長cDNAアンプリコン標的を別々に調製した。蛍光標識した標的をECISTパネルに同時にハイブリダイズさせ(図13C)、2回繰り返した実験と自己ハイブリダイゼーション実験からの出力データを、マイクロアレイ有意分析(SAM)ソフトウェアを用いて分析した(図15)。遺伝子特異的な一群のt-検定を実施することにより、発現に統計的に有意な変化があったECIST遺伝子座をSAMを用いて同定した。各ECISTには、その遺伝子座に関して繰り返して測定を行なった標準偏差と比較した遺伝子発現の変化に基づき、スコアを割り当てた。閾値よりも大きなスコアのECISTを潜在的に有意であるとした。逆に、偶然に同定された遺伝子座は間違っただけのプラスになったものとして扱った。間違っただけのプラスになる割合は、マイクロアレイ実験での遺伝子発現測定の組み合わせを分析することによって計算した(Tusher, V.G.他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第98巻、5116~5121ページ、2001年)。間違っただけのプラスになる割合が1%となるように閾値を選択する。分析した1,162個のECISTのうち、上方調節された126個の遺伝子座を統計的に有意であると見なすことができた。下方調節された遺伝子座は、SAM分析では同定されなかった

10

20

30

40

50

。

【0211】

メチル化のデータと発現マイクロアレイのデータを組み合わせて相関を考えることにより、対応する転写産物がDNAの高メチル化を通じて下方調節されているが0.75 μ MのデオキシシCによって再活性化させることのできるECIST遺伝子座を30個同定した(図16)。さらに、そのようなECISTのうちで配列がGenBankの既知の遺伝子と一致している19個中の17個が、対応する遺伝子の第1エクソンに局在していることが確認された(表II)。

【0212】

さらに、MDA-MB-231細胞において高メチル化していたがデオキシシCで処理しても対応する転写産物を再活性化(あるいは上方調節)させることができなかったECIST遺伝子座が189個同定された。興味深いことに、脱メチル化に応答して転写産物が上方調節されることを見いだされたがCpG島の高メチル化とは関係がないように見える遺伝子座が96個同定された。残りの遺伝子座では、DNAのメチル化または遺伝子発現の変化をマイクロアレイ法で検出することはできなかった。

10

【0213】

【表 3】

発現CpG島配列タグ

乳がん細胞系MDA-MB-231においてメチル化によって沈黙した30個の遺伝子のリスト

クローン のID	遺伝子	登録番号	プロモータ(第1エキソン)CpG島	⁴ Cy5/Cy3		配列についての説明
				発現	メチル化	
CpG5B6*	CYP27B1	AF027152; (NM 000785はcDNA)	² +	2.7	2.0	25-ヒドロキシビタミンD-1- α -ヒドロキシラーゼ(配列ID番号86)
CpG6B6	dJ631M13.5	AL117333	+	2.6	1.6	新規なタンパク質(配列ID番号87)
CpG15E2	ND	NT 010351	ND	3.3	4.3	MAP2K5遺伝子上流に近い
CpG21G11	ND	AC002424	ND	2.9	1.6	染色体7q31.3上のコスミド(配列ID番号88)
CpG32H12	ND	Z60712	ND	2.6	3.6	CpG島DNAゲノムMseI断片(配列ID番号89)
CpG65A1	TNS	AF225896	+	4.3	2.3	テンシン(配列ID番号90)
CpG65C10	TBX4	AC005901	³ -	4.7	2.9	T-ボックス転写因子(配列ID番号91)
DL2F9	ERCC-1	X06581	+	3.8	1.8	DNA除去修復タンパク質(配列ID番号92)
MP1F6	LOC84661	XM 029512	+	2.1	1.8	Dpy-30様タンパク質
MP2F1	H4FJ	Z80787	+	3.2	11.4	ヒストンH4ファミリーのメンバーJ(配列ID番号93)
MP2F10	ND	Z82254	ND	3.2	1.8	X染色体上のコスミド(配列ID番号94)
PY1H8	PSMB4	XM 047881	+	2.1	2.0	プロテアソームのサブユニット β タイプ4
PY2F1	FLJ10466	AK001328	+	3.2	1.9	完全長cDNA FLJ10466(配列ID番号95)
PY3D3	EST	A1023535	ND	2.4	1.9	cDNAの5'末端(配列ID番号96)
PY3D6	EST	B1518683	ND	2.0	2.9	cDNAの5'末端(配列ID番号97)
PY3F2	HSRN04	V00587.1	+	2.0	1.9	おそらくU1 RNAをコードしているヒト遺伝子(配列ID番号98)
SC2C3	EST	BE502068	ND	4.9	3.2	IMAGE:3197059(配列ID番号99)

10

20

30

40

【表 4】

クローンのID	遺伝子	登録番号	プロモータ(第1エキソン) CpG島	⁴ Cy5/Cy3		配列についての説明
				発現	メチル化	
SC8F2*	RPS16	XM 046112	+	2.0	1.6	リボソームのタンパク質S16
SC12A2	SAAS	NM 013271	+	2.2	2.0	グラニン様神経内分泌ペプチド前駆体(配列ID番号100)
SC13D6*	EST183864	AA313068	ND	2.1	5.9	膵臓がんから抽出されたcDNAの5'末端(配列ID番号101)
SC15E7	ND	AL359219	ND	4.0	1.9	BACクローンC-2315A10(配列ID番号102)
SC15H6*	H2BFR	XM 011505	+	2.6	3.4	ヒストン2BファミリーのメンバーR
SC19F1*	EST	BE838797	ND	2.7	2.6	cDNAの5'末端(配列ID番号103)
SC20G3	HOXD3	Y09980	+	2.3	1.9	ホメオボックスD3、DNA結合タンパク質(配列ID番号104)
SC21A8	U3B2	AF020535	+	3.2	1.7	U3核内小分子RNAのプロモータ領域(配列ID番号105)
SC21G11	HSPA2	L26336	-	5.4	8.5	熱ショックタンパク質70.2(配列ID番号106)
SC40C8	H2BFG	NM 003522	+	2.7	3.8	ヒストン2BファミリーのメンバーG(配列ID番号107)
SC77F6*	TTF-1	AF027332	+	3.8	2.8	甲状腺特異的転写因子1(配列ID番号108)
SC87E7	EST	AA365852	ND	2.4	4.5	松果体IIのcDNAの5'末端(配列ID番号109)
SC89F2	HAGE	NM 018665	+	14.6	1.8	DEADボックス・タンパク質(配列ID番号110)

¹ ND: 測定せず、あるいは未知

² +: 第1エキソンとプラスの一致

³ -: 第1エキソンとマイナスの一致

⁴ Cy5/Cy3: マイクロアレイ分析で得られた各ECISTの比を規格化した値の平均(詳しい説明は本文を参照のこと)

*原発性乳がんでは高メチル化も検出された。

【実施例 1 1】

【0 2 1 4】

(脱メチル化に反応するECISTを独立に確認した)

【0 2 1 5】

メチル化によって沈黙した30個の遺伝子座の中からマイクロアレイにより独立に3個の既知の遺伝子(CYP27B1(配列ID番号86); HSPA2(配列ID番号106); TTF-1(配列ID番号108))を確認し、サザン分析とRT-PCR分析により、2個の新規な発現配列(FLJ10466(配列ID番号95); EST183864(配列ID番号101))を確認した。図17Aからわかるように、そのCpG島断片は、MDA-MB-231細胞においてメチル化感受性制限に抵抗しているように見え

10

20

30

40

50

た（図17Aの左のパネル）。CpG島の高メチル化は、これら遺伝子の転写が沈黙することと関係しているが、その発現は、RT-PCR分析で示したようにMDA-MB-231細胞をデオキシCで処理することによって再活性化させることができた（図17Aの右のパネル）。別の2つの遺伝子座（SC70E4（JM4）とSC62A4（HSPC139））は、これらのアッセイで確認することができなかった。したがってマイクロアレイ分析によって間違っただけでプラスになった可能性がある。

【0216】

サザン分析とRT-PCR分析を利用し、対応する転写産物が脱メチル化処理によって間接的に上方調節されることがマイクロアレイによって見いだされた3つのECIST遺伝子座も確認した（図17B）。すなわち、MDA-MB-231細胞においては、これら遺伝子座でCpG島が高メチル化している証拠はサザン・ハイブリダイゼーションによっては観察されなかったが、RT-PCRで評価したその発現レベルは、無処理の細胞と比べてデオキシCで処理した細胞において増大しているように見えた。

10

【実施例12】

【0217】

（原発性乳がんにおいてCYP27B1のプロモータのCpG島が高メチル化していた）

【0218】

MDA-MB-231細胞において高メチル化していることが明らかにされた219個のECISTのうち、37個の遺伝子座（16.9%）だけが、原発性乳がんが高メチル化していることが以前に見いだされた遺伝子座に対応していた（表IIの具体例を参照のこと）（Yan, P.S.他、Cancer Res., 第61巻、8375~8380ページ、2001年）。この知見は、いくつかの遺伝子座では高メチル化の原因が培養細胞の持つ固有の性質にあり、必ずしも生体内の悪性プロセスによるものではないという考え方と一致している（Smiraglia, D.J.他、Hum. Mol. Genet., 第13巻、1413~1419ページ、2002年）。CYP27B1は前立腺がんの増殖抑制に関与していることが最近明らかにされたため（Hsu, J.Y.他、Cancer Res., 第61巻、2852~2856ページ、2001年）、この遺伝子に関する試験管内での高メチル化についての知見を広げることが目的として17個の原発性乳がんについて生体内でのサザン分析を行なった。

20

【0219】

この分析により、CYP27B1プロモータ（配列ID番号86）の高メチル化が、分析した乳がんの41%で検出された（図18）。試験管内（細胞系）での知見を外挿することにより、このエピジェネティックなイベントが生体内でのCYP27B1遺伝子の転写不活性化につながる可能性があることが推定される。CYP27B1遺伝子はビタミンDの代謝にとって重要な酵素1-ヒドロキシラーゼをコードしており（Takeyama, K.他、Science (ワシントンD.C.), 第277巻、1827~1830ページ、1997年）、その酵素活性を破壊すると乳がんにおいてビタミンDの正常な抗増殖効果が低下するようである。

30

【0220】

実施例7~12のまとめ

【0221】

この明細書には、アレイを利用してゲノム・レベルで発現の変化とメチル化の変化を同時に分析することを可能にする新規な高スループット法が記載されている。この新世代のマイクロアレイは、がんにおけるDNAメチル化と遺伝子発現の間の複雑な関係を分析するのに有効である。このECISTマイクロアレイは、正常な成長の間にメチル化によって制御される遺伝子と、ある種の遺伝子疾患にとって重要な新規な刷り込み遺伝子を発見するのにも役立つ。

40

【0222】

脱メチル化された細胞における遺伝子発現の全体的プロファイルを明らかにするのにさまざまなcDNAマイクロアレイが利用されてきた（Karpf, A.R.他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第96巻、14007~14012ページ、1999年；Jackson-Grusby, L.他、Nat. Genet., 第27巻、31~39ページ、2001年）。細胞周期の制御、増殖因子受容体のシグナル伝達、レトロエレメントの動員に関与する多数の遺伝子は、脱メチル化された状態で上方調節される

50

ように見える (Karpf, A.R.他、1999年、前掲文献) (興味深いことに、ここに示した実施例からさらに確認されるように、下方調節された遺伝子は以前の研究では稀にしか観察されなかった (Jackson-Grusby, L.他、2001年、前掲文献))。さらに、cDNAマイクロアレイは、患者の診断と予後予測に係る腫瘍特異的な発現プロファイルを互いに区別するのに有効であることがわかっている (Golub, T.R.他、Science (ワシントンD.C.)、第286巻、531~537ページ、1999年; Alizadeh, A.A.他、Nature (ロンドン)、第403巻、503~511ページ、2000年; Perou, C.M.他、Nature (ロンドン)、第406巻、747~752ページ、2000年; Bittner, M.他、Nature (ロンドン)、第406巻、536~540ページ、2000年)。

【0223】

しかしこのタイプのマイクロアレイ分析では、エピジェネティックなカスケードにおける下流でのイベントとしての直接的な(一次的)エピジェネティックな遺伝子調節を間接的な(二次的)遺伝子調節から区別することができない。さらに、このようなマイクロアレイ法は、特に残留している正常なストロマで汚染された原発性腫瘍では、下方調節された遺伝子を検出する能力しか持たない。それに加え、cDNAマイクロアレイ法は、RNAに由来する標的を必要とするが、RNAは実質的に不安定であり、小さな臨床サンプルから直接得ることは難しい。

【0224】

したがってECISTマイクロアレイを本発明で利用することは、原発性腫瘍の分子プロファイリングを行なう上でcDNAマイクロアレイと比べて実質的な改善になっている。ECISTマイクロアレイではメチル化を分析するため、患者の腫瘍DNAに由来する、容易に取得できて比較的安定な標的を利用する。したがって本発明のECIST DMH / 発現二重アッセイにより、メチル化を媒介とした遺伝子サイレンシングに関するイベントの信頼すべき証拠が提供される。というのも、関連ECIST発現分析によって高メチル化と遺伝子サイレンシングが直接結びつくからである。

【0225】

本発明によれば、発現CpG島タグ(ECIST)は、がん細胞においてメチル化によって沈黙した遺伝子を高スループットで同定するための有効なマーカーである。さらに、この新規な方法は、脱メチル化戦略とがんの治療薬を調べるのにも役立つ。

【0226】

重要なことだが、本発明のECISTマイクロアレイを利用すると、エピジェネティックな(メチル化/脱メチル化)イベントの一次的な原因と二次的な原因を高スループットで区別することができる。本発明によれば、MDA-MB-231細胞においてデオキシCによる処理に一次応答する遺伝子が少なくとも30個の同定された。この明細書に示した実施例は、これら遺伝子の再活性化が、(第1エキソンを含む)プロモータ領域におけるメチル化を消したことの直接的な結果であることを示している。

【0227】

したがって本発明によれば、高メチル化していなかったが、デオキシCで処理したMDA-MB-231細胞内で上方調節されていた96個の遺伝子が同定された。理論にはないことだが、メチル化/脱メチル化によって直接的(一次的)に調節される1個以上の遺伝子座によってスタートする1つ以上のエピジェネティックなカスケードにおいて、これら遺伝子の誘導は間接的(二次的)であるように見える。

【0228】

さらに、高メチル化していたが、脱メチル化剤で処理した細胞において上方調節を検出することはできなかった遺伝子がかなり多数同定された。1つの説明は、実験で用いた低用量(0.75 μ M)のデオキシCでは、MDA-MB-231細胞において高メチル化したこれら遺伝子の再発現を引き起こすには不十分であった可能性があるというものである。これらECIST遺伝子座のいくつか(例えばECISTクローンMP3B12、カベオリン-1のエキソン2; CpG79H10、ID12のエキソン2; PY3E1、推定遺伝子LOC159615のエキソン14)は遺伝子の調節領域の5'末端に位置していないため、高メチル化がこれら遺伝子の発現状態に影響を与えないという可能性もある。

【0229】

それでも本発明によれば、ECISTマイクロアレイはがんの治療における脱メチル化剤の効果、最適用量、タイプを研究するのに役立つ。ECISTマイクロアレイは、脱メチル化処理後にイベントの配列を明らかにし、腫瘍ゲノムにおけるDNAの異常なメチル化のメカニズムを解明するためのツールとなる。

【実施例13】

【0230】

(ゲノムの発現とDNAのメチル化とヒストンのアセチル化を並行して検出するための新規なマイクロアレイ・システムを開発するのにECISTマイクロアレイを用いた)

【0231】

プロモータの高メチル化状態を薬理的に逆転させると遺伝子の発現が全体的に変化したり特異的に変化したりすることが明らかにされた(Suzuki他、Nature Genet.、第31巻、141~149ページ、2002年; JonesとBaylin、Nature Rev. Genet.、第3巻、415~428ページ、2002年)。さらに、DNAのメチル化を抑制すると、遺伝子の発現に一次的(直接的)な効果と二次的(間接的)な効果の両方が及ぶことも明らかにされた(Suzuki他、Nature Genet.、第31巻、141~149ページ、2002年; Liang他、Cancer Res.、第62巻、961~966ページ、2002年; Karpf, A.R.他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第96巻、14007~14012ページ、1999年)。

【0232】

しかし現在のところ、遺伝子サイレンシングにおいてDNAのメチル化とヒストンのアセチル化の機能的関係を明らかにするのに役立つ効果的な方法はない。そこでこの明細書に記載したようなECISTマイクロアレイを以下に説明するように新規なゲノム・マイクロアレイ・システムでさらに使用し、遺伝子の発現、DNAのメチル化、ヒストンのアセチル化における変化を効果的に検出した。

【0233】

さらに詳しく説明すると、統合式“三重”マイクロアレイ・システムを開発してがん細胞における遺伝子発現のエピジェネティックな調節のヒエラルキーを調べた。好ましい一実施態様では、マイクロアレイ・パネルは、遺伝子の5'末端調節領域に位置する短いゲノム断片(0.2~2kb)であるECISTを1,507個含んでいた(Shi他、Cancer Res.、第62巻、3214~3220ページ、2002年; 参考としてその全体がこの明細書に組み込まれているものとする)。ECISTのGCリッチな成分を利用し、メチル化されたCpG部位と、対応する転写産物のレベルを測定するためのエキソン含有部分(すなわち第1エキソン)と、アセチル化したヒストンに対する抗体で免疫沈降するクロマチンを同定するための、ECIST内のプロモータ配列とをスクリーニングした。

【0234】

本発明の新規なマイクロアレイ・システムにより、エピジェネティックな処理によってプロモータの高メチル化が逆転する結果として起こる発現の変化を特定の遺伝子座において分離するための効果的な手段が提供される。

【0235】

材料と方法

【0236】

細胞培養。ヒト上皮卵巣細胞系CP70(Robert Brown博士(グラスゴー、イギリス)からの提供)をビヒクル(PBS)またはDAC(5-アザ-2'-デオキシシチジン)(0.5 μ M; 24時間ごとに培地を交換)の存在下で培養した。4日後、細胞をそのまま回収するか、あるいはTSA(トリコスタチンA)(0.5 μ M)で12時間にわたって処理した後に回収した。いくつかの細胞もTSAのみで12時間にわたって処理した後に回収した。QIAamp(登録商標)組織キットとRNeasy(登録商標)キット(キアジェン社)を用いてDNAとRNAをそれぞれ単離した。

【0237】

マイクロアレイを用いたECISTのスクリーニング。(第1エキソンを含む)ECISTを同定

10

20

30

40

50

するため、RLCS (RNAリガーゼ媒介cDNA合成法) (Suzuki, Y.他、Gene、第200巻、149~156ページ、1997年) を利用し、ゲノム・ライブラリCGI (Cross他、Nature Genet.、第6巻、236~244ページ、1994年) に由来するCpG島クローンをスクリーニングするための標的を調製した。簡単に説明するならば、T4 RNAリガーゼの存在下で、RNAアダプター (0.5ナノモル、5'-ACC GGA GCG GCA CGG GAA AUA GAG CAA CAG GAA A; 配列ID番号111) を、ストラタジーン社のヒト普遍的基準RNAに由来するキャップのないmRNAの5'末端に連結させた。逆転写の後、隣接する5'アダプター (5'-GCA CGG GAA ATA GAG CAA CAG (配列ID番号112)) と3'アダプター (5'-GGC CGA CTC ACT GCG CGT CTT CTG (配列ID番号113)) を用いて完全長cDNAをロングRT-PCR (タックプラス・ロングPCRシステム、ストラタジーン社) によって増幅した。増幅の線形性を保持するため、PCRサイクルの数を少なくした (18~25サイクル)。増幅産物を以前に報告 (Shi他、Cancer Res.、第62巻、3214~3220ページ、2002年) されているようにしてCy3蛍光染料で標識し、CGIマイクロアレイ・パネルにハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションとハイブリダイゼーション後の手続きは、DeRisiら (<http://www.microarrays.org>) に従って実施した。ハイブリダイズしたスライドをGenePix (登録商標) 4000A (アクソン社) を用いて走査した。取得した画像とデータをエクセルのスプレッドシートに移し、GenePix Pro3.0というソフトウェアを用いてさらに分析した。

10

【0238】

マイクロアレイによるメチル化の分析。メチル化アンプリコンをほぼ記載されているようにして調製した (Yan他、Cancer Res.、第61巻、8375~8380ページ、2001年)。簡単に説明すると、CP70のDNA (約1 μ g) をMseIを用いて消化させた後、PCR-リンカーに連結させた。連結したDNAをメチル化感受性エンドヌクレアーゼBstU IとHpaIIを用いて消化させ、リンカー・プライマーを用いてPCRによって増幅した。正常な卵巣組織から採取したDNAも同様にして調製した。メチル化された部位を含むゲノム断片が酵素によって切断されないよう保護したため、増幅することができた。しかしメチル化されていない部位を含む断片は消化されたため、増幅したサンプル中に存在していなかった。CP70アンプリコンはCy5 (赤) で標識し、対照アンプリコンはCy3 (緑) で標識した。両方のサンプルをECISTマイクロアレイ・スライドに同時にハイブリダイズさせ、文献に記載されているようにして処理した (上記文献)。

20

【0239】

マイクロアレイを用いた発現分析。全RNA (100 μ g) を対照 (ビヒクルで処理した) CP70細胞またはTSAおよび/またはDACとともに培養した細胞から調製した。RLCS法を利用して完全長cDNAを生成させた。品質制御のため、RACE (cDNA末端部の高速増幅) 法を利用していくつかのcDNA配列の5'末端の完全性を明らかにした (Shi他、Cancer Res.、第62巻、3214~3220ページ、2002年を参照のこと)。処理した細胞からのCy5で標識したcDNAと無処理の細胞からのCy3で標識したcDNAをECISTパネルに同時にハイブリダイズさせ、得られたマイクロアレイ画像を処理した。

30

【0240】

マイクロアレイによるChIPの分析。免疫沈降したE2F1標的を同定するのに用いたプロトコル (Weinmann他、Genes Dev.、第16巻、235~244ページ、2002年) をこの実験で採用した。DNA-タンパク質生体ポリマーのネットワークを得るため、処理済みのCP70細胞または無処理のCP70細胞 (アッセイごとに細胞を 2×10^7 個) を1%ホルムアルデヒドを用いて架橋させた。マイクロ遠心分離によって細胞の核を回収し、架橋したクロマチン繊維を単離し、超音波処理によって約600bpに断片化した。5 μ gの抗アセチル化ヒストンH3ウサギ・ポリクローナル抗体または抗アセチル化ヒストンH4ウサギ・ポリクローナル抗体 (アップステート社) を用いて、あるいは抗体なしで (負の対照)、免疫沈降を実施した。免疫複合体をプロテイナーゼを用いて消化させることにより、DNAをさらに放出させた。精製したクロマチンのDNA (合計で約1 μ g) を10~15個の調製物から回収し、蛍光標識した。マイクロアレイへのハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション後の洗浄、スライドの走査は、以前に報告されている通りである (上記文献)。

40

50

【0241】

マイクロアレイのデータ分析。ハイブリダイズしたECISTスポットにおけるCy3とCy5の蛍光強度をそれぞれの実験で取得した。Cy5とCy3の標識効率はサンプルごとに異なるため、各スポットの比Cy5/Cy3を各マイクロアレイ画像における全体の比に基づいて規格化した。以前に報告されているように (Yan他、Cancer Res.、第61巻、8375~8380ページ、2001年; Wei他、Clin. Cancer Res.、第8巻、2246~2252ページ、2002年; Shi他、Cancer Res.、第62巻、3214~3220ページ、2002年)、得られた規格化因子を、調節した比が1であることが想定される14個の内部対照に基づいてさらに確認した。マイクロアレイ実験を2回繰り返した。品質制御のため、同量の2つのテスト・サンプルを用いた自己ハイブリダイゼーション実験を行なった。自己ハイブリダイズするスポットは、調節した比Cy5: Cy3が一般に1に近かった。 10

【0242】

ヌクレオチドのシーケンシング。プラスミドDNAをECISTから調製し、ダイデオキシ・ターミネータ反応 (アプライド・バイオシステムズ社) とABI PRISM (登録商標) 377シーケンサを用いてシーケンシングした。シーケンシングの結果をGenBankと比較し、既知の配列と一致しているかどうかを調べた。

【0243】

COBRA (亜硫酸水素塩と制限酵素を組み合わせた分析法)。CpGゲノム修飾キット (インタージェン社) を利用してゲノムDNAを亜硫酸水素ナトリウムで修飾することにより、メチル化されたシトシンはそのままにし、メチル化されていないシトシンをウラシルに変換した。COBRAは、文献に記載されているようにして実施した (XiongとLaird、Nucleic Acids Res.、第25巻、2532~2534ページ、1997年)。簡単に説明すると、約200ngの処理済みDNAを鋳型として利用し、所定の遺伝子座に対して特異的な亜硫酸水素塩プライマー (以下の表III) を用いてPCRを行なった。³²Pで標識したPCR産物をBstU Iで消化させ、8%ポリアクリルアミド・ゲル上で分離し、ホスファージャー (アマーシャム・ファルマシア社) を用いてオートラジオグラフィを行なった。 20

【0244】

半定量的RT-PCRとChIP (クロマチン免疫沈降) -PCR。cDNAとクロマチンDNAを上記のようにして調製した。アンプリタック (登録商標) ゴールド・ポリメラーゼ (パーキン-エルマー社) を用いてディプレックスPCRを (テスト標的と対照標的の両方に対して) 行なった。RT-PCRを行なうため、プライマーのペアを用いて標的遺伝子の3'末端からの領域 (平均で200bp) を増幅した。他方、ChIP-PCRでは、プライマーは、テスト遺伝子のプロモータ領域と第1エキソン領域内の断片 (平均で200bp) を増幅するように設計した (プライマーの情報に関しては表IIIを参照のこと)。増幅サイクルを20~25回行なった後、放射性標識したPCR産物を5~8%ポリアクリルアミド・ゲル上を走らせた。ホスファージャーを用いて乾燥したゲルを分析し、観察されたバンドの密度測定分析をImageQuant (登録商標) (モレキュラー・ダイナミクス社) を用いて実施した。遺伝子の発現またはヒストンのアセチル化の相対レベルは、同じレーンにある対照のレベルを用いて規格化した。 30

【0245】

結果

【0246】

ECISTマイクロアレイ。約9,000個のCGIからなるライブラリ (Cross他、Nature Genet.、第6巻、236~244ページ、1994年) をRLCS (RNAリガーゼ媒介cDNA合成法) を用いてスクリーニングし、ECISTにプラスの反応をした1,507個の遺伝子座を回収した。これら遺伝子座のうちの250個についてヌクレオチドのシーケンシングを行ない、これらECISTが遺伝子の5'末端に位置していることを確認した。シーケンシングのデータからわかったのは次のことである。(i) 79% (198/250) が、既知の遺伝子のプロモータまたは第1エキソンに位置する配列を含んでいた; (ii) 16% (40/250) が一致する配列を持っているが、まだ特性がわかっていない発現配列を含んでいる可能性がある; (iii) 5% (12/250) が 40

、エキソン1でない発現配列を含んでいた。これらの結果は、がん細胞におけるエピジェネティックな変化を評価するのにこの明細書で同定したようなECIST遺伝子座を用いるとよいことを支持している。

【0247】

三重マイクロアレイ・スクリーニング。遺伝子の発現、DNAのメチル化、ヒストンのアセチル化を並行して調べるため、CP70細胞を脱メチル化剤DAC(5-アザ-2'-デオキシシチジン)および/またはヒストン・デアセチラーゼTSA(トリコスタチンA)で処理した後、本発明の三重マイクロアレイを用いた操作を行なった(図19A)。マイクロアレイ内の代表的な個々の遺伝子座を図19Bに矢印で示してある。無処理のCP70細胞内の高メチル化遺伝子座(図19B、上のパネル)では、DAC+TSAで処理することにより、この遺伝子の発現増大(規格化したCy5/Cy3=5.5)とヒストンの高アセチル化(対照の3.4倍)が起こった。DACとTSAを組み合わせた処理により、無処理のCP70細胞内の高メチル化していない遺伝子座において、発現の増大とヒストンの高アセチル化も起こった(図19B、下のパネル)。

10

【0248】

エピジェネティックな処理によって4倍以上に上方調節されたECISTの合計数が明らかになった。DACまたはTSAの一方だけで処理すると、それぞれ29個の遺伝子座(1,507個の遺伝子座のうちの1.9%)または17個の遺伝子座(1.1%)で上方調節が見られた。しかし組み合わせた処理によってより多数の遺伝子(150個、すなわち10.0%;いずれかだけの処理と比較して $P < 0.001$)が上方調節された(図20A、図20B、図20C)。このエピジェネティックな処理により、いくつかのECIST遺伝子座が下方調節(0.25倍以下)される現象も見られた。組み合わせた処理を行なった場合のヒストンの高アセチル化を測定し、処理した細胞において遺伝子座の規格化した比Cy5/Cy3が無処理の細胞の2倍よりも大きい場合にスコアを与えた(Weinmann他、Genes Dev.、第16巻、235~244ページ、2002年)。このカットオフ値を使用すると、調べたECISTのうちの3.6%(55/1,507)で高アセチル化した遺伝子座(図20Cの赤丸)が検出された。

20

【0249】

高メチル化したECISTを同定するため、規格化した比Cy5/Cy3が対照の1.5倍以上という条件を採用した。このカットオフ値は、さまざまながんにおける高メチル化したCpG島を信頼性よく同定するために出願人が以前に使用したものである(Yan他、Cancer Res.、第61巻、8375~8380ページ、2001年;Wei他、Clin. Cancer Res.、第8巻、2246~2252ページ、2002年;Yan他、Methods、第27巻、162~169ページ、2002年)。DACとTSAを組み合わせた処理によって上方調節された遺伝子をさらに2つのグループに分けた(図20D)。すなわち、高メチル化グループ(グループ1、黄色いスポット;表IVを参照のこと)とメチル化が検出できなかったグループ(グループ2、青いスポット;表Vを参照のこと)である。図20Cからわかるように、グループ1(高メチル化)の遺伝子座の上方調節のほうが、グループ2(高メチル化されていない)の遺伝子座の上方調節よりもヒストンの高アセチル化と密接な関係がある(64%(遺伝子座34個中22個)に対して28%(遺伝子座116個中33個))。

30

【0250】

【表 5】

三重分析で用いたプライマーの配列

クローン のID	遺伝子	鎖	COBRAのプライマー (5' →)	ChIP-PCRのプライ マー (5' →)	RT-PCRのプライ マー (5' →)	配列ID番 号(左から 右に)
SC21G11	HSPA. 2	順	TGTTGATGATGGGTTG TAAATT	TTCGATGGTGGGTCCC CGGAG	GCACCGGTAAGGAAA ACAAAA	114、116、 118
		逆	ACAAAATCACCATCACC AATAAC	GGGCAAGATTAGCGAG CAGGA	GAGCCAGTTGATCAC CTCCTG	115、117、 119
CpG5B6	CYP27B1	順	AGGGGTTGAGATATGAT GTTTAGG	TCTGGCCGAACTTTTC TGCAA	TCTGCTTGCTTGCC CTTCTG	120、122、 124
		逆	ACCATTTTCCCAACAC TGTATC	CCTCAACTCGCCTTTT CCTTA	TCCCTTCTGCCACAT GGTTCA	121、123、 125
SC87F10	EIF1A	順	TTTATTTTTATTTTTGG GTATGG	GCCGTCCATTTCCCAA CATTTTG	ATGCTAAAATCAATG AAACTG	126、128、 130
		逆	CCATAAAACCACCAC ACA	TGTCGCCCTCAGAGC AGCAG	TCTTCTACCCATAAG CTCCAT	127、129、 131
SC10H6	K1AA0560	順	GTATAGAGGAGGTTAAA GTTTTTGG	TGGGCTGTTGTACGGG TTCC	CCTGCATGAACTTCC GGCTAC	132、134、 136
		逆	CCATAACAACACTCTTC CCTCC	GGTCACGAACTCCGCA TTGAT	GGTCACGAACTCCGC ATTGAT	133、135、 137
DL3D6	FLJ31663	順	TTTTATTAATGGTGGTG TAGAAG	TCTTCTCCATTGCGT GTC	CCTGGCAGCCTAACC CTC	138、140、 142
		逆	CCAACCTCCTCTTCTC TTCTC	CCTTACACTTCCGGT TCACT	CACCTTCTAGTGTCC GGTTGA	139、141、 143
SC28C11	TAF2K	順	GGTTGGTTTTAGTTGG TTATATTA	CCCCGAACTCTGTCCG CTGAATTCAC	TGGAGGAGGTGCAGA AGGTGG	144、146、 148
		逆	CTACTAACTTACCCTCC TATAATCC	AGCCGGCAGGACGCTG TGAGT	TCCTTGGGTCCCTTC GAATCA	145、147、 149
SC12E1	IER-3	順	GTGATTTTTYGTATTTT TTAAGAAGAA	CTGGCGACCGAACGAG ACTGC	GCCCTAACGCCGCA TCCCTG	150、152、 154
		逆	AACCTAACCCCACTAA ACTATACC	TTGGGCGGGTCTTCT AACTC	TCTCTGTGCCCTCG GTCCCG	151、153、 155
SC13E11	TIGA1	順	TTTGGGTTTTTTGGGAT G	CAGGGCCTGGAGCATA GTAAG	GCATTGTGGGACGGA AGC	156、158、 160
		逆	TATCTAAAAAACTCCCT AACATAATC	CAGTGAGGGACCGAGG G	AACTCCCTGGCATAG TCGATG	157、159、 161
SC13C2	予想遺伝子	順	GATTTTTGTAATTAGGT TTGTATGTGT	GCCTGATCCACGCCGA TTG	GTTTTCGGGTCGTCA TGGCTG	162、164、 166
		逆	AATTTCCACTCYCCTAT CATACATAC	GGCTGCCGAGAAGGT AGGAG	TTTCATCTGGTGGCC CTAGCG	163、165、 167
SC10B6	MDS1	順	ATTTTTTGGTGTTTTT GATG	ACAAGCTTGTGGCGA TTCTA	ATCCAGACCTTGAAA GTCGCT	168、170、 172
		逆	CCTACCATAAAAATAAA ATCACCA	AGTTTGGACACCTTCG CAC	CAAGTAATCTGGGGA ACCGAT	169、171、 173
SC69A9	UNG2	順	TTGTAAGTTGTTTAGTT GGTTGAT	TCCAGTTTCCATTGCG TTTCT	TCCAGTTTCCATTGC GTTTCT	174、176、 178

10

20

30

40

【表 6】

クローン のID	遺伝子	鎖	COBRAのプライマー (5' →)	ChIP-PCRのプライ マー (5' →)	RT-PCRのプライ マー (5' →)	配列ID番 号(左から 右に)
		逆	ATAAATTCTAAAACCC AACACTA	CAGGCACAGCGACTCG AA	CAGGCACAGCGACTC GAA	175、177、 179
対照	GTF2H4	順	TCAATCTCCAGGAGCCA ATG	TTTGTAGTCAGACGCG CTTCA	ATTAAGCGACGGCCC GAGAC	180、182、 184
		逆	CTATCTCTTAACCCACT TCTACTA	CATTGGCTCCTGGAGA TTGA	CCAGAAAGAGCATCC GCATCA	181、183、 185
対照	FLJ31996	順	GTATTGAGTAGTTTTAT TAYGGAGT	CTCAGGCCGCTCTAGT CAAAT	TTGCGGCTCCGTGGT G	186、188、 190
		逆	AAAACAACCTATCACTAA ACCCCT	GGAGCCGCAAGTAACG ACA	GGTTTCGGCCAGTGT TGACAT	187、189、 191
対照	β -アクチン	順	-	-	GGATTCCTATGTGGG CGACGAG	192
		逆			CGCAGCTCATTGTAG AAGGTGTGG	193

10

20

(R=AとGが混合 ; Y=GとTが混合)

【 0 2 5 1 】

【表 7】

エピジェネティックな処理によって上方調節されたメチル化依存性遺伝子のリスト

クローン	染色体	GenBank	遺伝子名	説明	位置
CpG17E7 ^a	11p15	NM 013250	ZNF215	刷り込まれた新規なジンクフィンガータンパク質215	プロモータと第1エクソン
CpG18A11 ^a	11q24	NM 001274	CHEK1	CHK1チェックポイントのホモログ (S. ポンベ)	プロモータと第1エクソン
CpG18G8 ^a	19p12	NM 138330	TIZ	TRAF6結合ジンクフィンガータンパク質	プロモータと第1エクソン
CpG21B1 ^a	1q32	NM 015434	DKFZP434B168	DKFZP434B168タンパク質	プロモータと第1エクソン
CpG27E8 ^a	19q13	AK023102	FLJ13040	推定タンパク質FLJ13040	第1エクソン
CpG42E10	18p11	ND ^b	予想遺伝子	Twinscanによる遺伝子予測	第1エクソン
CpG5B6 ^a	12q13	NM 000785	CYP27B1	シトクロムP450、サブファミリーXXVII B	プロモータと第1エクソン
CpG6B6 ^a	20p12	AL137678	vyto	SEL1Lホモログ	プロモータと第1エクソン
CpG79F12 ^a	15q25	AL110434	EST	機能未知	ND ^b
MP2D2 ^a	2p14	ND ^b	ND ^b	Genscanによる遺伝子予測	ND ^b
MP3F2	19p13	X06581	ERCC-1	DNA除去修復タンパク質	プロモータ
SC11E2 ^a	19p13	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
SC11H10	1q22	NM 032323	MGC13102	推定タンパク質MGC13102	エクソン3
SC15E7 ^a	14q23	ND ^b	予想遺伝子	Genscanによる遺伝子予測	プロモータと第1エクソン
SC15H6 ^a	6p21	NM 021058	H2BFR	H2Bヒストン・ファミリー、メンバー	第1エクソン
SC18E9	19p13	X06581	ERCC-1	DNA除去修復タンパク質	プロモータ
SC18F11 ^a	12p13	ND ^b	予想遺伝子	Genscanによる遺伝子予測	ND ^b

10

20

30

【表 8】

クローン	染色体	GenBank	遺伝子名	説明	位置
SC18C9	3q21	BI833804	Seefor	β -1,4マンノシルトランスフェラーゼのホモログ	エキソン5
SC19F1 ^a	1q23	AB029012	KIAA1089	推定タンパク質KIAA1089	プロモータと第1エキソン
SC21G11 ^a	14q23	NM 021979	HSPA2	熱ショック70kDタンパク質2	第1エキソン
SC23B1	11q13	BI085096	Reemay	β -1,4マンノシルトランスフェラーゼのホモログ	エキソン3
SC26B7 ^a	8p23	R18473	EST	機能未知	ND ^b
SC2A2	Xq13	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
SC33C8 ^a	2p23	NM 024322	MGC11266	推定タンパク質MGC11266	プロモータと第1エキソン
SC40C8 ^a	6p22	NM 003522	H2BFG	H2Bヒストン・ファミリー、メンバーG	プロモータと第1エキソン
SC4H4 ^a	6p21	NM 002121	HLA-DPB1	主要組織適合複合体、クラスII、DP	プロモータと第1エキソン
SC5A4 ^a	8q21	ND ^b	Sneyly	Acemblyによる遺伝子予測	第1エキソン
SC5D3	15q22	NM 032857	MRPL56	β -ラクタマーゼ	プロモータと第1エキソン
SC74D2	10q24	BG208726	Kloymy	Acemblyによる遺伝子予測	プロモータと第1エキソン
SC7B11 ^a	19q13	BE646494	Sposee	Acemblyによる遺伝子予測	プロモータと第1エキソン
SC87F10 ^a	1p36	NM 001412	EIF1A	真核生物の転写開始因子4C	プロモータと第1エキソン
SC89F2	6q13	NM 018665	HAGE	DEADボックスタンパク質	プロモータと第1エキソン
SC89G2	6q13	NM 018665	HAGE	DEADボックスタンパク質	プロモータと第1エキソン
SC8A10	19q13	X06581	ERCC-1	DNA除去修復タンパク質	プロモータ

aマイクロアレイ分析に基づいて検出された高メチル化ヒストン（詳細については本文を参照のこと）；b検出されず

【 0 2 5 2 】

10

20

30

40

【表 9】

エピジェネティックな処理によって上方調節された、メチル化とは独立な遺伝子のリスト

クローン	染色体	GenBank	遺伝子名	説明	位置
CpG10D4	4q34	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
CpG11D4	14q31	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
CpG11G12	19q13	B1194899	ND ^b	EST配列	ND ^b
CpG11H5 ^a	11q12	NM 022830	FLJ22347	推定タンパク質FLJ22347	プロモータと第1エクソン
CpG12E10 ^a	20p13	X17567	snRPN B	snRNP Bタンパク質	プロモータ

【表 1 0】

クローン	染色体	GenBank	遺伝子名	説明	位置
CpG12F10 ^a	19q13	NM 013362	ZNF225	ジンクフィンガータンパク質225	プロモータと第1エクソン
CpG13E10	16q24	AK056131.1	MGC13198	推定タンパク質MGC13198	プロモータと第1エクソン
CpG13F10	16q22	NM 014062	ART-4	ART-4タンパク質	プロモータと第1エクソン
CpG14B4	6p22.2	NM 003543	H4FH	H4ヒストン・ファミリー、メンバーH	第1エクソン
CpG14F10	8q11	X74794	MCM4	メンテナンス不全4ホモログ・タンパク質	プロモータと第1エクソン
CpG15A3	18p11	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
CpG15B4	6p22	NM 003543	H4FH	H4ヒストン・ファミリー、メンバーH	第1エクソン
CpG15F10 ^a	ND ^b	ND ^b	ND ^b	配列未決定	ND ^b
CpG18G1	10q11	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
CpG27E3 ^a	19q13	ND ^b	ND ^b	FGENESHIによる遺伝子予測 (C19001774)	プロモータと第1エクソン
CpG28H8	ND ^b	ND ^b	ND ^b	一致する配列なし	ND ^b
CpG32G1	1q21	NM 003528	H2BFQ	H2Bヒストン・ファミリー、メンバーQ	プロモータと第1エクソン
CpG32H5	22q12	ND ^b	ND ^b	FGENESHIによる遺伝子予測 (C22000342)	プロモータと第1エクソン
CpG42B6	ND ^b	ND ^b	ND ^b	配列未決定	ND ^b
CpG42B7	7q33	NM 033139	CALD1	カルデソン1転写産物変異体4	プロモータと第1エクソン
CpG64A4	19q13	NM 002287	LAIR1	白血球関連IG様受容体1、アイソフォーム	第2イントロン
CpG64F10	21q21	AF142099.1	ADAMTS5	ディスインテグリン様メタロプロテアーゼ	プロモータと第1エクソン
CpG66A4	6p22	NM 003543	H4FH	H4ヒストン・ファミリー、メンバーH	第1エクソン
CpG67D1	10q25	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
CpG6E6	17p11	BC020774	GNG2	グアニン・ヌクレオチド結合タンパク質 (Gタンパク質)	プロモータと第1エクソン
CpG71A6	3q25	NM 022736	FLJ14153	推定タンパク質FLJ14153	ND ^b
CpG79B10 ^a	7p22	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
CpG79H5	5q13	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
CpG7A11	2q13	NM 019014	Rpol-2	DNA指示RNAポリメラーゼIIに似ている	プロモータと第1エクソン
CpG7B6 ^a	2q37	ND ^b	予想遺伝子	Genscanによる遺伝子予測	ND ^b
DL2C8	4q34	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
DL3D1 ^a	11q12	AK001301.1	FLJ10439	推定タンパク質FLJ10439	プロモータ
DL3D6	7q33	AK056225	FLJ31663	cDNA FLJ31663、ミオトロフィンに類似	プロモータと第1エクソン

10

20

30

40

【表 1 1】

クローン	染色体	GenBank	遺伝子名	説明	位置
DL3G3 ^a	19p13	NM 021235	EPS15R	上皮増殖因子受容体の基質	プロモータと第1エクソン
MP1A9 ^a	11q23	NM 000615	NCAM1	神経細胞接着分子1	プロモータと第1エクソン
MP1G1 ^a	2q31	AB046824	K1AA1604	推定タンパク質K1AA1604	第1エクソン
MP2A6 ^a	ND ^b	ND ^b	ND ^b	未決定配列	ND ^b
MP2B9	6p21	NM 021064	H2AFP	H2Aヒストン・ファミリー、メンバーP	プロモータと第1エクソン
MP2G7 ^a	20q13	NM 007019	UBE2C	ユビキチン輸送タンパク質E2-C	プロモータと第1エクソン
MP2G9	7q36	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
MP2H11 ^a	2p14	ND ^b	予想遺伝子	Twinscanによる遺伝子予測	ND ^b
MP3B9	7p22	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
MP3E5 ^a	3q23	AB002330	K1AA0332	K1AA0332遺伝子のためのヒトmRNA	プロモータと第1エクソン
PY1B11 ^a	15q15	BQ417318	Reepor	Acemblyによる遺伝子予測	第1エクソン
PY1E1 ^a	1q21	NM 003548	H4F2	ヒストンH4ファミリー2	プロモータと第1エクソン
PY1F6	20p12	AK055700.1	G20orf30	第20染色体のオープンリーディングフレーム30	プロモータと第1エクソン
SC10B6 ^a	3q26	NM 004991	MDS1	脊髄形成異常症候群タンパク質1	エクソン2
SC10H3 ^a	ND ^b	ND ^b	ND ^b	未決定配列	ND ^b
SC10H6	15q14	AB011132	K1AA0560	K1AA0560タンパク質	プロモータと第1エクソン
SC10H9	4q34	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
SC11D12	ND ^b	ND ^b	ND ^b	未決定配列	ND ^b
SC12B7	7p15	NM 006547	KOC1	IGF-11 mRNA結合タンパク質3	プロモータと第1エクソン
SC12E1	6p21	NM 003897	IER3	即時早期応答3、アイソフォーム	プロモータと第1エクソン
SC13C2 ^a	2p23	BC015430	予想遺伝子	転写因子AKNA1に類似	プロモータと第1エクソン
SC13E11	5q22	NM 053000	TIGA1	TIGA1	プロモータと第1エクソン
SC14F1	ND ^b	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
SC15A10 ^a	10q22	ND ^b	予想遺伝子	Twinscanによる遺伝子予測	ND ^b
SC15A8 ^a	7p14	AA478133	Beyku	Acemblyによる遺伝子予測	プロモータと第1エクソン
SC15E3	Xq26	NM 006649	SDCCAG16	血清学的に決定された大腸がん抗原16	プロモータと第1エクソン
SC17A9	4q31	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
SC17C6	14q23	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b

10

20

30

40

【表 1 2】

クローン	染色体	GenBank	遺伝子名	説明	位置
SC18B4	ND ^b	ND ^b	ND ^b	未決定配列	ND ^b
SC18E10	10p15	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
SC18E11	17p12	ND ^b	予想遺伝子	Genscanによる遺伝子予測	ND ^b
SC18E12	ND ^b	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
SC18H8	20q11	AF287265	HCA90	肝細胞がん関連抗原90	プロモータと第1エクソン
SC19D7	6q23	AA360824.1	K1AA1798	推定タンパク質K1AA1798	プロモータと第1エクソン
SC19F4	ND ^b	ND ^b	ND ^b	未決定配列	ND ^b
SC22B8	1p31	A1435457.1	FOXD3.e	フォークヘッド・ボックスD3転写産物 ^e	プロモータと第1エクソン
SC22C6	19p13	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
SC28C11	1p13	NM 005645	TAF2K	TATAボックス結合タンパク質 (TBP) 関連	プロモータと第1エクソン
SC29B12	1q21	NM 003557	PIP5K1A	ホスファチジルイノシトール-4-リン酸5-キナーゼ	プロモータと第1エクソン
SC29G3	1q32	AL526221.1	TatD-DNアーゼ	Acemblyによる遺伝子予測	プロモータと第1エクソン
SC2F9 ^a	4q34	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
SC37C8	ND ^b	ND ^b	ND ^b	未決定配列	ND ^b
SC37H3 ^a	19q13	AB028987.2	C19orf7	第19染色体オープンリーディングフレーム7	第1イントロン
SC40H2	5q11	NM 021147	UNG2	ウラシル-DNAグリコシラーゼ2	プロモータと第1エクソン
SC41C2	1q21	NM 003557	PIP5K1A	ホスファチジルイノシトール-4-リン酸5-キナーゼ	第1エクソン
SC41D5	7p15	A1347402	EST	未知機能	ND ^b
SC4A11	19q13	NM 015953	NOSIP	eNOS相互作用タンパク質	プロモータと第1エクソン
SC4B5	ND ^b	ND ^b	ND ^b	未決定配列	ND ^b
SC4G5 ^a	7q33	NM 145808	LOC136319	顆粒細胞分化タンパク質	プロモータと第1エクソン
SC4H11 ^a	11q24	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
SC5C5	7q11	BE258578.	Glojoy	Acemblyによる遺伝子予測	プロモータと第1エクソン
SC62F2 ^a	5q14	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
SC66A7	6p22	NM 003537	H3FL	H3ヒストン・ファミリー、メンバーL	プロモータと第1エクソン
SC69A9 ^a	5q11	NM 021147	UNG2	ウラシル-DNAグリコシラーゼ2	プロモータと第1エクソン
SC71B6 ^a	20q11	AK027550.1	ZNF341e	ジンクフィンガータンパク質341転写産物2	第1イントロン
SC71E3	1q25	NM 032678	MGC3413	推定タンパク質MGC3413	第1エクソン
SC71G10	19q13	AK024429	RhoGEF.16	Acemblyによる遺伝子予測	プロモータ

10

20

30

40

【表 1 3】

クローン	染色体	GenBank	遺伝子名	説明	位置
SC73E9	7p14	ND ^b	予想遺伝子	Genscanによる遺伝子予測	エキソン3
SC73G5 ^a	6p21	BC000893	H2BFA	H2Bヒストン・ファミリー、メンバーA	プロモータと第1エキソン
SC74C3	10p11	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
SC76D1	7p22	BI085096	spoyka	Acemblyによる遺伝子予測	プロモータと第1エキソン
SC76H9	19q13	A1571106.1	DDX34	DEAD/H(アスパラギン酸-グルタミン酸-アラニン-アスパラギン酸/ヒスチジン) ボックス・ポリペプチド	プロモータと第1エキソン
SC77F2	ND ^b	ND ^b	ND ^b	未決定配列	ND ^b
SC77F4 ^a	4q13	ND ^b	予想遺伝子	Genscanによる遺伝子予測	ND ^b
SC77H8	8p22	NM 006094	DLC1	肝臓がん1で欠失	第1エキソン
SC78C2	2q37	A1208033.1	Dudor	Acemblyによる遺伝子予測	エキソン1と2
SC78D5	1p35	NM 001703	BA12	脳特異的血管新生阻害剤2	プロモータ
SC7E12 ^a	17p11	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
SC7H5 ^a	3p14	BC003364.1	ARF4	ADP-リボシル化因子4	プロモータと第1エキソン
SC86B10	3p13	BI196363.1	Glorfy	Acemblyによる遺伝子予測	エキソン2
SC86B2	4q34	ND ^b	ND ^b	この領域には遺伝子が同定されていない	ND ^b
SC86B9	6q13	NM 133645	MT01	MT01タンパク質のアイソフォームIV	プロモータと第1エキソン
SC86G9	6q13	NM 012123	CGI-02	CGI-02タンパク質	プロモータと第1エキソン
SC87G12	11q13	NM 053056	CCND1	サイクリンD1	プロモータと第1エキソン
SC88C10	ND ^b	ND ^b	予想遺伝子	Genscanによる遺伝子予測	ND ^b
SC88C8	12p13	BG940697	EST	未知機能	ND ^b
SC88E12	12q13	NM 005371	METTL1	メチルトランスフェラーゼ様タンパク質1、アイソフォームa	プロモータと第1エキソン
SC89A10	17q21	AK056941	FLJ32379	ポリタンパク質ホモログ	プロモータと第1エキソン
SC89H7	12q23	AK001250.1	FLJ10388	推定タンパク質FLJ10388、RNAポリメラーゼ	第1イントロン
SC8D1	14q23	NM 002788	PSMA3	プロテアソーム(プロソーム、マクロパイン)サブユニットα	第1エキソン
SC90B1	12p13	NM 000719	CACNA1C	電位依存性カルシウム・チャンネル、L型	エキソン7
SC90B12	7p15	NM 006547	KOC1	IGF-II mRNA結合タンパク質3	プロモータと第1エキソン
SC90F10	9p23	ND ^b	予想遺伝子	Genscanによる遺伝子予測	ND ^b

【0 2 5 3】

メチル化によって沈黙した遺伝子がエピジェネティックな処理にตอบสนองしたことによる上方調節。グループ1の遺伝子では、DACのみで処理した後にはほんの数個の遺伝子座(n=11)だけで発現の増大が観察されたが、DACとTSAを組み合わせると、34個の遺伝子座で上方調節が起こった(図20D)。TSAだけで処理したCP70細胞ではグループ1の遺伝子の発現に有意な変化は見られなかった(図20D)。

【0 2 5 4】

グループ1の3つの遺伝子座(HSPA.2、CYP27B1、EIF1A)をさらに分析し、マイクロアレ

10

20

30

40

50

イで得られた結果を確認した。図21には、卵巣がん細胞系CP70のメチル化依存性ECIST遺伝子座におけるDNAのメチル化、遺伝子の発現、ヒストンのアセチル化を本発明に従って分析した結果が示してある（遺伝子名は左側に表示）。COBRA（亜硫酸水素塩と制限酵素を組み合わせた分析法）というメチル化分析法を利用してECIST遺伝子座のメチル化状態を調べた。簡単に説明すると、ゲノムDNA（2 μ g）を亜硫酸水素塩で処理し、各ECIST遺伝子座の調べているBstU I部位に隣接するプライマーを用いてPCRを行なった。³²Pで標識した産物をBstU Iで消化させ、8%ポリアクリルアミド・ゲル上で分離した。すでに説明したように、消化された断片はCpG島内のBstU Iのメチル化を反映している。対照DNAをSSIメチラーゼを用いて試験管内でメチル化した。記号“+”は、BstU Iによる消化を意味するのに対し、記号“-”は、BstU Iによる消化を含まないアッセイを意味する。発現を分析するため、全RNA（2 μ g）を処理済み（+）のCP70細胞または無処理（-）のCP70細胞から単離し、RT-PCR用のcDNAを生成させるのに用いた。“DAC”は5-アザ-2'-デオキシシチジンを意味し、“TSA”はトリコスタチンAを意味する。矢印は、増幅された断片の位置を示す。各ECISTの発現レベルを -アクチンの発現レベル（“C”で表示）と比較した。アセチル化を分析するため、クロマチンDNAを抗アセチル化ヒストン3（アンチAcH3）または抗アセチル化ヒストン4（アンチAcH4）を用いて免疫沈降させ、テスト遺伝子の5'末端に位置するプライマーを用いてPCRを行なった。矢印は、増幅された断片の位置を示す。ECIST遺伝子座のヒストンのアセチル化レベルを、対照遺伝子座（“C”）（GTF2H4またはFLJ31996）のレベルと比較した。

10

【0255】

20

図21からわかるように、CP70細胞に含まれるHSPA.2のCpG島の高メチル化をCOBRAを利用して確認したが（図21、列1、左のパネル）、無処理のCP70細胞ではRT-PCRを利用してHSPA.2の発現を検出することはできなかった（図21、列1、中央のパネル）。しかしHSPA.2の発現はDACで処理することによって増大し、TSAのみで処理した後には変化せず、DACとTSAの組み合わせで処理することによって顕著に増大した（図21、列1、中央のパネル）。さらに、CP70細胞をDACとTSAで処理した後には、HSPA.2のプロモータ領域内のヒストンH3とH4が高アセチル化していることが、ChIP-PCRを利用することによって明らかになった（図21、列1、右のパネル）。これらの結果は、DNAの脱メチル化とヒストンの高アセチル化が協調的に作用することにより、メチル化によって沈黙した遺伝子が相乗的に再発現するという以前の報告（Suzuki他、Nature Genet.、第31巻、141~149ページ、2002年；Cameron他、Nature Genet.、第21巻、103~107ページ、1999年）と整合している。

30

【0256】

無処理のCP70細胞では、CYP27B1のCpG島の部分的なメチル化が観察され、CYP27B1の発現は少なかった。しかしCP70細胞をDACとTSAで処理すると、ヒストンの高アセチル化が起こり、CYP27B1の発現が増大した（図21、列2）。逆に、EIF1A遺伝子座では強い高アセチル化が観察されたにもかかわらず、EIF1Aの発現はエピジェネティックな処理によってほとんど変化しなかった（図21、列3）。われわれがヒト第1染色体に位置することを突き止めたEIF1A遺伝子座（Dever他、J. Biol. Chem.、第269巻、3212~3218ページ、1994年）は、COBRAを利用してCP70細胞内で高メチル化していることが明らかにされた。EIF1Aの多数のコピーが染色体の異なる領域に存在していることが報告されている（例えばX染色体とY染色体（LahnとPage、Science（ワシントンD.C.）、第278巻、675~680ページ、1997年））。そのためこれら遺伝子座の1つ以上がメチル化されないままになっていて、RT-PCRによって検出されるEIF1Aの大きな発現ベースラインに寄与していることは十分にありうる（図21、列3）。

40

【0257】

メチル化とは独立な遺伝子がエピジェネティックな処理に応答したことによる上方調節。グループ2の遺伝子に関し、合計で116個の遺伝子座がエピジェネティックな処理によって上方調節された（4倍以上）（図20C、青いスポット；図20D）が、これら遺伝子座の発現はDNAのメチル化とは無関係のようであった。このグループから例えば8個の遺伝子座を選択し、COBRA、RT-PCR、ChIP-PCRでさらに分析した（図22Aと図22B）。

50

【0258】

図22Aと図22Bでは、COBRA（亜硫酸水素塩と制限酵素を組み合わせた分析法）というメチル化分析法を利用して卵巣がん細胞系CP70内のECIST遺伝子座（遺伝子名は左側に表示）のメチル化状態を明らかにした。ゲノムDNA（2μg）を亜硫酸水素塩で処理し、各ECIST遺伝子座内の調べているBstU I部位に隣接するプライマーを用いてPCRを行なった。³²Pで標識した産物をBstU Iで消化させ、ポリアクリルアミド・ゲル上で分離した。図からわかるように、消化された断片は、CpG島内のBstU Iメチル化を反映している。対照DNAをSSIメチラーゼを用いて試験管内でメチル化した。+：BstU Iによる消化；-：BstU Iによる消化なし。発現分析：処理済み（+）のCP70細胞または無処理（-）のCP70細胞から単離した全RNA（2μg）を用いてRT-PCR用のcDNAを生成させた。DAC：5-アザ-2'-デオキシシチジン；TSA：トリコスタチンA。矢印は、増幅された断片の位置を示す。各ECISTの発現レベルを-アクチンの発現レベル（“C”で表示）と比較した。アセチル化分析：CP70細胞をDACとTSAで処理（+）するか、あるいは処理しなかった（-）。次にクロマチンDNAを抗アセチル化ヒストン3（アンチAcH3）または抗アセチル化ヒストン4（アンチAcH4）を用いて（+）あるいは用いずに（-）免疫沈降させ、テスト遺伝子の5'末端に位置するプライマーを用いてPCRを行なった。矢印は、増幅された断片の位置を示す。ECIST遺伝子座でのヒストンのアセチル化レベルを、対照遺伝子座（“C”）（GTF2H4またはFLJ31996）でのレベルと比較した。

【0259】

図22Aと図22Bに関し、選択した8個の遺伝子座はCP70細胞内でメチル化しておらず、無処理のCP70細胞内でのこれら遺伝子座の発現は低いかゼロであった。これら遺伝子座のうちいくつかではDACまたはTSAのみで処理した後に発現の増大が観察された。両者を組み合わせて処理すると8個の遺伝子座すべてで発現が誘導されたが、ヒストンの高アセチル化は、MDS1、SC13C2、UNG2のプロモータ領域だけで見られた（図22A）。エピジェネティックな処理に対するこれら8個の遺伝子座の応答に基づき、メチル化とは独立な遺伝子座をさらに2つのサブグループに分類した。それは、メチル化とは独立でヒストンのアセチル化が増大している遺伝子であるサブグループ2a（n=33）と、メチル化とアセチル化の両方とは独立な遺伝子であるサブグループ2b（n=83）である。

【0260】

実施例13のまとめ

【0261】

遺伝子の発現、DNAのメチル化、DNA-タンパク質相互作用を並行して分析する統合式“三重”マイクロアレイ・システムを開発し、CpG島におけるエピジェネティックな修飾とエピジェネティックなイベントの程度を全体的なスケールで明らかにした。これは、エピジェネティックな機構によって協調しているいろいろな転写制御間の複雑なヒエラルキーを解明するための、ゲノム・レベルでの新規な方法である。この統合式マイクロアレイ・システムにより、個々の遺伝子を同定することと、エピジェネティックな機構、プロモータの標的、エピゲノムによって調節されている下流の応答の関係を系統的に分析することの両方が可能になる。

【0262】

この三重分析法を利用して、エピジェネティックな因子に対する一次的応答と二次的応答の両方を明らかにし、それをメチル化状態に基づいてさらに3つの遺伝子グループに分類した。すなわちグループ1（メチル化依存性）と、グループ2aと2b（メチル化とは独立）である。グループ1の遺伝子に関しては、転写サイレンシングはメチル化によって支配されている（図21）。CpGのメチル化によって沈黙した遺伝子の再活性化には、おそらく一連のステップが含まれるであろう（例えば脱メチル化されたDNAからのMDBタンパク質の除去および/またはMDBタンパク質によってリクルートされた転写リプレッサの除去）（JonesとBaylin、Nature Rev. Genet.、第3巻、415～428ページ、2002年）。エピジェネティックな複合体はクロマチン・リモデリング活性を有することがわかっており、転写活性を反映した構造を生み出す（前掲文献）。この複合体を破壊するとおそらくその活性が低

下し、転写活性のあるより開いたクロマチン構造になるであろう。メチル化されたDNAと脱アセチル化したヒストンの物理的関係が最近明らかになったが (Robertson他、Nucleic Acids Res.、第28巻、2108~2113ページ、2000年)、メチル化によって沈黙した遺伝子 (グループ1) の相乗的な再活性化が組み合わせ処理によってこの明細書で実現されるという事実は、エピジェネティックな修飾相互間の機能的相互作用を含むメカニズムが存在することを支持している。この機能的関係が分子標的間の直接的相互作用または間接的相互作用によるものであるかどうかは、解明すべき課題である。

【0263】

本発明の三重アレイ分析により、薬を用いた治療がメチル化とは独立な遺伝子の発現に及ぼす効果も明らかになった。グループ2aは、メチル化されていないプロモータを有する他とは異なる遺伝子のクラスであり、その遺伝子の発現増大は、TSAのみによる処理または組み合わせた処理によって生じ、DACのみによる処理では生じない。DACとTSAがメチル化されていないプロモータにいかんして物理的作用を及ぼすかははっきりしないが、DNAのメチル化がない場合には、DNAメチルトランスフェラーゼDNMT1 (DNAメチルトランスフェラーゼ1) がヒストンデアセチラーゼとの作用を通じて転写を直接抑制しうることが明らかにされている (Suzuki他、Nature Genet.、第31巻、141~149ページ、2002年; Robertson他、Nucleic Acids Res.、第28巻、2108~2113ページ、2000年)。MDS1のヒストンが高アセチル化するにはDACとTSAの両方が必要であるという本発明の観察結果は、卵巣がん細胞においてDNMT1のメチル化とは独立な効果がある役割を果たしていることを示している。さらにこの観察結果は、ヒストンデアセチラーゼの活性がグループ2aに属する遺伝子の発現をエピジェネティックに制御する際にある役割を果たしている可能性があることを示している。

10

20

【0264】

本発明の三重アレイ分析で同定された過半数の遺伝子は、グループ2bに属していた。これは、発現の増大が、DNAのメチル化とヒストンのアセチル化のどちらとも独立であることを示している。DACとTSAで処理することによってこれら遺伝子座が上方調節されるのは、エピジェネティックな修飾カスケードの下流でのイベントによる可能性が大きい。この二次的効果 (例えば転写後プロセッシング (RNAの安定性) の増大、上流にある転写因子の再活性化、誘導されたシグナル伝達経路における標的遺伝子による調節) を説明できるいくつかの可能なメカニズムがあるが、それらは互いに無関係ではない (KarpfとJones、Onco gene、第21巻、5496~5503ページ、2002年)。

30

【0265】

グループ2に属するいくつかの遺伝子の誘導は、薬剤の毒性またはストレスに対する細胞応答と関係あるらしい。そのことが、DACで処理したヒトがん細胞系でマイクロアレイを用いて遺伝子の発現プロファイルを調べることによって明らかにされた (Suzuki他、Nature Genet.、第31巻、141~149ページ、2002年; Liang他、Cancer Res.、第62巻、961~966ページ、2002年; Milutinovic他、J. Biol. Chem.、第278巻 (印刷版の前に電子出版)、2003年)。さらに、DACによって誘導されるストレス応答遺伝子の多くは、似たような早期の一時的な発現特性を示す (Milutinovic他、前掲文献)。例えばヒト肺がん細胞系をDACで処理した後はアポトーシス促進因子BIKが初期に誘導され、DACで処理した72時間後までにはBIKの発現が対照レベルまで戻ることが観察された (前掲文献)。興味深いことに、CpG島を含まないBIK遺伝子もTSAによってメチル化とは独立に誘導される (Suzuki他、前掲文献)。それとは逆に、DACで処理するとメチル化依存遺伝子とその下流に位置する標的の発現が徐々に誘導され (Liang他、前掲文献; Milutinovic他、前掲文献)、これら遺伝子の発現は脱メチル化が進行するときに維持される、あるいは増大することが明らかにされている (Liang他、前掲文献; Milutinovic他、前掲文献)。重要なことだが、本発明の三重マイクロアレイ・システムは、初期ストレス応答遺伝子を、エピジェネティックな処理によって時間経過とともに誘導される後期遺伝子から区別するのに非常に適している。

40

【0266】

50

本発明による統合式アプローチは、がんその他の疾患においてメチル化によって沈黙した遺伝子の発現を再活性化することに基づいており、新規な治療標的を同定すること、エピジェネティックな遺伝子サイレンシングの裏に隠れているメカニズムを明らかにすることと、エピジェネティックな治療法の特異性を明らかにすることに役立つ。

【図面の簡単な説明】

【0267】

【図1】乳がん細胞系におけるDNMT1とp21^{WAF1}という遺伝子の発現をノーザン・ハイブリダイゼーションで分析した結果である。正常な線維芽細胞（レーン1）と乳がん細胞系（T47D（レーン2）、ZR-75-1（レーン3）、Hs578t（レーン4）、MDA-MB-231（レーン5）、MDA-MB-468（レーン6）、MCF-7（レーン7））から単離した全RNA（20mg）に対してノーザン分析を行なった。膜をそれぞれDNMT1（上のパネル）、P21^{WAF1}（中央のパネル）、 α -アクチン（下のパネル）について調べた。関係する転写産物の予想サイズ（kb）は、RNA MW ラダー（ベーリンガー・マンハイム社）を基準として用いて計算した。バンドの強度は、ImageQuant（登録商標）ソフトウェア（モレキュラー・ダイナミクス社）を用いて定量化し、DNMT1とP21^{WAF1}のmRNAは、各サンプルのレーンにおける α -アクチンの発現レベルで規格化した。

10

【図2】ディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション法のフローチャートである。この図には、ハイブリダイゼーションのプロープとして使用するアンプリコンの調製と、高密度アレイ上に格子状に配置されたCpG島ゲノム・クローンの選択について説明されている。

20

【図3】CpG島クローンをBstU Iで分析した結果である。各クローンからの挿入体をコロンニーPCRで増幅し、BstU Iで消化させた。消化された挿入体DNAサンプル（+）と消化されない挿入体DNAサンプル（-）を1.5%アガロース・ゲル上で分離し、臭化エチジウムで染色した。消化された断片のサイズに基づいて2個以上のBstU I部位を含むクローンをさらに選択し、ディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション法で分析した。分子量マーカー（100bpラダー；プロメガ社）を左側に示してある。

【図4】ディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション法による代表的な結果である。CpG島クローンのPCR産物を膜上に重複してドットにし、まず最初に、MseIであらかじめ処理し³²Pで標識したアンプリコンとハイブリダイズさせた。ここでのアンプリコンは、正常な乳房サンプル（対照）と、乳がん細胞系のZR-75-1およびHs578tである（パネルA、B、C）。その後、同じ膜に、MseI/BstU Iであらかじめ処理し³²Pで標識したアンプリコンをハイブリダイズさせた（パネルA'、B'、C'）。パネルD：反復DNAプロープとしてヒトCot-1 DNA（ギブコ/BRL社）を膜にハイブリダイズさせた。正の対照となる3つのDNAサンプルをアレイの四隅にドットにし、オリエンテーション用マークとして、またハイブリダイゼーション・シグナルの強度の比較用として使用した。

30

【図5】ディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション法によって同定された高メチル化CpG島遺伝子座を示している。CpG島クローンのPCR産物を膜上に重複してドットにし、MseI/BstU Iであらかじめ処理したアンプリコンを用いて上記の正常な対照と乳がん細胞系を調べた。プロープは、本文中に記載したようにして調製した。乳がん細胞系から調製したプロープとハイブリダイズしたドットのハイブリダイゼーション・シグナルの強度が、正常な乳房サンプルのハイブリダイゼーション・シグナルの強度よりも大きいことから、高メチル化したBstU I部位を含む右側に示したクローン（>でも示してある）がオートラジオグラム上で同定された。

40

【図6】サザン・ハイブリダイゼーションによるメチル化分析の代表的な結果である。正常な乳房組織サンプル（レーン2）と乳がん細胞系（T47D（レーン3）、ZR-75-1（レーン4）、Hs578t（レーン5）、MDA-MB-231（レーン6）、MDA-MB-468（レーン7）、MCF-7（レーン8））からのゲノムDNA（10mg）をMseIで処理し、次いでメチル化感受性BstU Iで処理した後、サザン・ハイブリダイゼーションさせた。レーン1は、MseIだけで消化させた対照DNAを含んでいる。消化産物は、右側に示したCpG島クローンに由来するゲノム断片（200～300bp）とハイブリダイズさせた。分子量マーカー（100bpラダー；プロメガ社）を左側に

50

示してある。メチル化の割合は、すべてのバンドの強度を合計した強度に対するメチル化されたバンドの強度として計算した。不完全なメチル化の割合も同様にして計算した。各レーンの下に表示してあるメチル化スコアは、完全なメチル化の割合に0.5を掛けた値の合計である。

【図7】乳がん細胞系の30個のCpG島遺伝子座についてメチル化パターンを分析した結果である。右側に示したグレイ・スケールは、サザン分析によって分析した30個のCpG島遺伝子座のメチル化スコアを表わしている（図5の具体例を参照のこと）。ここに示した乳がん細胞系は、メチル化能力（すなわち高メチル化した遺伝子座の%）が大きいものほど右側に来るように並べてある。正常な対照は最も左側に示した。これら細胞系からの30個のCpG島遺伝子座（HBC-3～HBC-32（配列ID番号1～30）；Huang, T.H.-M.他, Hum. Mol. G 10
enet., 第8巻、459～470ページ、1999年；2000年2月4日に出版され、2003年3月7日に承認通知を受領した出願人のアメリカ合衆国特許出願シリアル番号第09/497,855も参照のこと。なおこれらの文献は、参考としてその全体がこの明細書に組み込まれているものとする）は、メチル化スコア（図の右側の欄に示してあるように、幅は0～0.10、0.11～0.20、0.21～0.30、0.31～0.40、0.41～0.50、0.51～0.60、0.61～0.70、0.71～0.80、0.81～0.90、0.91～1.00となっている）が大きくなるほうから順番に上から下に向かって並べられている。

【図8】HBC-18（配列ID番号16）とHBC-9（配列ID番号7）のメチル化をサザン・プロット・ハイブリダイゼーションによって分析した結果である。乳がんおよびそれに対応する正常な組織のゲノムDNA（10μg）をMseIで処理し、次いでメチル化感受性BstU Iで処理した 20
後、クローニングしたゲノム断片をプローブとして用いてサザン・ハイブリダイゼーションを実施した。CpG島クローンHBC-18（配列ID番号16）は、PAX2（対になったボックスを含む遺伝子2）の5'末端と一致する配列を含んでおり、CpG島クローンHBC-9（配列ID番号7）は、HPK1（造血前駆キナーゼ遺伝子1）のプロモーターおよびエキソン1と一致する配列を含んでいた。“C”はMseIだけで消化させた対照DNAを意味し、“T”は乳がんを意味し、“N”は正常な乳房組織を意味する。患者の番号をレーンの上方に記載してある。分子量マーカー（100bpラダー；プロメガ社）を右側に示してある。対応する記号は、何枚かの図面に共通で対応する部分を表わす。

【図9A・B】一人の乳がん患者に対してDMH（ディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション）法を行なった場合の代表的な結果である。図9Aは最初のスクリーニング 30
結果を示しているのに対し、図9Bは高メチル化したいくつかのクローンに関する対応するサブアレイを示している（最初のアレイ上にサブアレイのX座標とY座標で示してある）。CpG島タグのPCR産物を膜上にドットにし、まず最初に放射性標識した正常なアンプリコンをハイブリダイズさせた。その後、同じ膜または複製の膜に腫瘍アンプリコンをハイブリダイズさせた。各CpG島タグを2つの並列したドットとして表現し、一般にバラバラな単一のドットの集まりとなって出現する非特異的なバックグラウンドのシグナルから特異的ハイブリダイゼーション・シグナルを識別できるようにした。5～6セットの正の対照をアレイの四隅にドットにし、オリエンテーション用マークとして、またハイブリダイゼーション・シグナルの強度比較用として使用した。

【図10】高メチル化したCpG島遺伝子座をDMH法によって同定した結果である。このサブ 40
アレイ・パネルに示した30個のCpG島タグは、1,000個を超えるタグに対する最初のDMHスクリーニングで選択した。X軸とY軸の座標が3C、3F、3G、4G、5Gであるさらに別の5個のタグを内部対照として含めた。CpG島タグを膜上に重複してドットにし、上記の正常な組織と乳がんに対応する放射性標識したアンプリコンで調べた。28人の患者のうちの11人についてのDMHスクリーニングの結果を示してある。実験は、独立に少なくとも2回実施した。

【図11】28人の原発性乳がんの30個のCpG島遺伝子座についてメチル化パターンを分析した結果である。基準となるメチル化グレイ・スケール（0～100、10ずつ増加）が右側に 50
示してあり、テストしたこれら遺伝子座のハイブリダイゼーション・シグナルの強度をランク付けすることによって生じる体積百分位数を表わしている。原発性腫瘍からのデータ

は、腫瘍のグレードに従って表示した。すなわち、よく/中程度に分化(WD/MD)、ほとんど分化していない(PD)というグレードである。各グループ内でメチル化しやすさに従って患者を左から右に並べた。30個のCpG島遺伝子座(左側のパネルには、二次スクリーニングでの座標が括弧内に示してある)を原発性腫瘍から得られたメチル化スケールが小さくなる方向に上から下に向かって並べた。さらに、5個のCpG島遺伝子座(HBC-17(配列ID番号15); HBC-19(配列ID番号17); HBC-24(配列ID番号22); HBC-25(配列ID番号23); HBC-27(配列ID番号25))が乳がん細胞系で高メチル化していることが見いだされた。

【図12A】乳房上皮RNAまたは基準RNAからロングRT-PCR(RNAリガーゼ媒介cDNA合成法)によって生成させた完全長cDNAをアガロース・ゲル電気泳動で分析した結果である。キャップの付いた完全長mRNAだけがロングRT-PCRで増幅された。cDNA(30bp~1kb)を5'末端アダプター・プライマーと3'末端アダプター・プライマーを用いて増幅した。ゲルのレーンは以下の通りである: M、1kbの分子マーカー; レーン1、無処理のMDA-MB-231細胞; レーン2、0.75 μ Mの5-アザ-2'-デオキシシチジンで処理したMDA-MB-231細胞。 10

【図12B】アガロース・ゲル電気泳動による分析結果であり、図12Aのようにして生成させたcDNAの5'末端が完全であることの確認となっている。鋳型として完全長cDNAアンプリコンを用いてPCRを行なった。5'末端共通アダプター・プライマーと遺伝子特異的なプライマー(3'末端)を増幅反応で用いた。ゲルのレーンは以下の通りである: M、1kbの分子マーカー; レーン1、 α -アクチンのcDNAの5'末端断片; レーン2、GAPDHのcDNAの5'末端断片。 20

【図12C】アガロース・ゲル電気泳動による分析結果であり、PCRサイクルの数を最適化した結果、増幅産物の量が線形な増幅範囲になっていてマイクロアレイ画像の最適な半定量化を行なえることを示している。5'末端アダプター・プライマーと、 α -アクチンのcDNAに特異的な3'末端プライマーを用いてさまざまなサイクリング条件でPCRを実施した(レーン1~4)。この実験で用いた増幅サイクルの最適数は18回であった。この場合にも、細胞内のmRNA種の相対的割合は保存された。

【図13A】代表的なCpG島タグ・マイクロアレイの画像であり、同定されたECISTが含まれている。aa-dUTPで標識した完全長cDNAアンプリコンを、正常な乳房上皮のRNAまたはヒト普遍的基準RNA(ストラタジーン(登録商標))から調製し、Cy3(シアニン3; 緑)で標識し、7,776個のCpG島タグを含むマイクロアレイ・パネルにハイブリダイズさせた。プラスのECISTは、ハイブリダイゼーションの強度がバックグラウンドの2倍であった。ここにはアレイ画像全体のほんの一部だけを示してある。ハイブリダイゼーションの強度がバックグラウンドの2倍という定義に照らすと、スクリーニングした7,776個のCpG島タグのうち、1,162個のタグがECISTに関してプラスであった。 30

【図13B】図13AのECISTマイクロアレイ・パネルを用いてディファレンシャル・メチル化ハイブリダイゼーション("DMH")分析を行なうことにより、特に高メチル化した219個のECIST遺伝子座を同定した様子を示している。テスト(MDA-MB-231細胞)アンプリコンと対照DNAアンプリコンを調製し、それぞれCy5とCy3で標識した。正常な対照細胞と比べて乳がん細胞でDNAがメチル化している特別な場合を代表するアンプリコンをマイクロアレイ・ハイブリダイゼーションの標的として使用した(これについては本文中で説明した)。マイクロアレイのうちで図13Aに示したのと同じ部分をここに示してある。高メチル化したECIST遺伝子座は"赤い"スポットとして現われるのに対し、"黄色い"スポットは、テスト・サンプルと対照サンプルでメチル化に変化がなかったことを示している。規格化した信号比Cy5/Cy3が1.5よりも大きいという"カットオフ"条件を利用し、高メチル化したECIST遺伝子座を合計で219個同定した。黄色いスポットは、テスト・ゲノムと基準ゲノムの間でメチル化に違いがないことに対応している。ハイブリダイズしないECISTは、メチル化されていない遺伝子座を表わしている。 40

【図13C】図13Aと図13BのECISTマイクロアレイ・パネルを利用して脱メチル化発現分析を行ない、メチル化によって制御される遺伝子を同定した様子を示している。0.75 μ Mの5-アザ-2'-デオキシシチジンで処理したMDA-MB-231細胞と無処理のMDA-MB-231細胞から 50

の完全長cDNAアンプリコンをそれぞれCy5とCy3で標識した。マイクロアレイに対するハイブリダイゼーションを本文に記載したようにして実施した。マイクロアレイのうち、図13Aと図13Bに示したのと同じ部分を示してある。赤いスポットとして現われたECISTタグは、脱メチル化処理によって上方調節された遺伝子に対応する。

【図14A】配列が既知の遺伝子と一致しなかったECIST遺伝子座のRNAをノーザン・プロット・ハイブリダイゼーションによって分析した結果である。多数の組織のプロットからわかるように、MP2A3プローブとSC11E2プローブでは単一の転写産物が同定されたのに対し、CpG5H12遺伝子座とCpG16A3遺伝子座は、多数のスプライス変異体を含む転写産物を含んでいた。(パネルの上部に示してある) ECISTの推定発現配列に由来するプローブを³²Pで標識したものをクロンテック社の多重組織ノーザン・プロットとハイブリダイズさせた。レーン1、脳;レーン2、心臓;レーン3、骨格筋;レーン4、大腸;レーン5、胸腺;レーン6、脾臓;レーン7、腎臓;レーン8、肝臓;レーン9、小腸;レーン10、胎盤;レーン11、肺;レーン12、末梢血白血球。

【図14B】配列が既知の遺伝子と一致しなかった別のECIST遺伝子座のRNAを5'-cDNA末端高速増幅(RACE)によって分析した結果である。完全長cDNAアンプリコンを鋳型として用いてPCRを行なった。5'末端共通アダプター・プライマーと遺伝子特異的プライマー(3'末端)を増幅反応で用いた。M、100bpの分子量マーカ;レーン1、CpG6B6のcDNAの5'末端断片;レーン2、PY2F1のcDNAの5'末端断片;レーン3、SC13D6のcDNAの5'末端断片。相対的感受性5'-RACEアッセイによると、CpG6B6遺伝子座、PY2F1遺伝子座、SC13D6遺伝子座は稀な転写産物をコードしているように見える。

【図15A】図2のECISTマイクロアレイ・パネルを用いた発現データのプロットであり、内部対照としての自己(すなわち無処理細胞と無処理細胞の)ハイブリダイゼーションの結果を示している。MDA-MB-231細胞から調製した同量のcDNAをそれぞれCy5とCy3で標識し、図2のようにしてECISTマイクロアレイにハイブリダイズさせた。

【図15B】図2のECISTマイクロアレイ・パネルを用いた発現データのプロットであり、脱メチル化処理によって上方調節される遺伝子を同定するための比較(すなわち無処理細胞と処理済みの細胞の)ハイブリダイゼーションの結果を示している(Cy5/Cy3の“カットオフ”比が2よりも大きい場合に上方調節と定義する)。簡単に説明すると、5-アザ-2'-デオキシシチジン(デオキシC)で処理したMDA-MB-231細胞と無処理のMDA-MB-231細胞をそれぞれCy5とCy3で標識し、ECISTマイクロアレイにハイブリダイズさせた。赤い正方形は、さらに研究するために選択した、メチル化によって沈黙した30個の遺伝子の場所を表わしている(図5を参照のこと)。各ECIST遺伝子座についての規格化した比Cy5/Cy3が表示してあり、X軸とY軸のスケールは対数である。

【図16】DNAメチル化と遺伝子発現の関係を示している。この円グラフは、脱メチル化処理によってMDA-MB-231細胞において遺伝子が高メチル化したECISTの割合および/または遺伝子が上方調節されなかったECISTの割合を示している。例えば本発明によれば、発現データとメチル化のデータを合わせることにより、DNAの高メチル化によって発現が下方調節されるが脱メチル化(デオキシC)処理によって再活性化されるECIST遺伝子座が30個同定される。

【図17A】メチル化によって沈黙した遺伝子をサザン・プロットとRT-PCRによる分析で確認した様子を示している。乳がん細胞系MDA-MB-231と正常な乳房サンプルからのゲノムDNA(10μg)を、本文に記載したように、MseIと、メチル化感受性エンドヌクレアーゼ(BstU I、HpaII、HhaI)のうちの1つとで消化させ、サザン分析を行なった。対照DNAはMseIだけで消化させた。左側に示したECIST遺伝子座(CYP27B1、HSPA2、TTF-1、FLJ10466、EST183864、JM4、HSPC139)の断片を³²Pで標識し、ナイロン膜に別々にハイブリダイズさせた[注: GenBankに現われる遺伝子名または発現配列タグの番号を括弧内に示してある]。M:メチル化されたDNA断片;PM:部分的にメチル化されたDNA断片;UM:メチル化されていないDNA断片。0.75μMの5-アザ-2'-デオキシシチジンで処理したMDA-MB-231細胞と無処理のMDA-MB-231細胞から全RNAを単離してRT-PCRを行なった。矢印は、増幅されたcDNA断片の位置を示す。増幅されたcDNAのレベルを -アクチンのcDNAのレベルと比

較した。

【図17B】脱メチル化によって間接的に上方調節されたECIST遺伝子座を確認した図である。サザン・アッセイとRT-PCRアッセイは図5Aに示してある〔注：プローブは非特異的にハイブリダイズするため、多数のDNA断片（上方の2つのバンド）が、MseIで消化させたMP3D7の対照レーンに見られた〕。

【図18】CYP27B1プロモータのメチル化をサザン分析によって分析した図である。CYP27B1プロモータ内のMseI部位、メチル化感受性BstU I部位、プローブ、CpGの密度が示してある。乳がんと正常な対照からのゲノムDNA（10 μ g）をMseIとBstU Iで消化させ、ナイロン膜にプロットし、サザン分析を行なった。C：MseIだけで消化させた対照DNA；N：MseIとBstU Iで消化させた正常なDNA。

10

【図19A】本発明の“三重”分析法、すなわち、卵巣がん細胞系CP70において遺伝子の発現、DNAのメチル化、ヒストンのアセチル化を並列に評価する方法のフローチャートである。

【図19B】三重分析のための代表的なマイクロアレイ画像である。Cy5とCy3で標識した標的を実施例13で説明したようにして調製し、ECISTマイクロアレイ・パネルにハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション画像を取得し、ECISTのスポットのシグナル強度（矢印で示した例を参照のこと）を計算した。規格化した比Cy5/Cy3の値を各マイクロアレイ・パネル画像の下部に示してある。DACは5'-アザ-2'-デオキシシチジンを意味し、TSAはトリコスタチンAを意味する。

【図20A、B、C】ECISTマイクロアレイ・パネルを用いてCP70細胞で本発明の三重分析を行なった結果をプロットしたグラフである。実施例13で説明したようにしてマイクロアレイへのハイブリダイゼーションを実施した。比Cy5/Cy3の値が4以上（赤色の線）または0.25以下（緑色の線）という基準を用い、エピジェネティックな処理に応答して上方調節された遺伝子または下方調節された遺伝子をそれぞれ同定した。黄色いスポットと青いスポットは、それぞれCP70細胞における高メチル化した遺伝子座とメチル化されていない遺伝子座を表わす。赤丸は、マイクロアレイ分析によって同定された高メチル化ECIST遺伝子座を示している。

20

【図20D】さまざまなエピジェネティックな処理に応答して上方調節されたECIST遺伝子座の合計数を示している。

【図21】卵巣がん細胞系CP70のメチル化依存性ECIST遺伝子座においてDNAのメチル化、遺伝子の発現、ヒストンのアセチル化を“三重”分析した結果である（遺伝子名を左側に示してある）。DNAの脱メチル化とヒストンの高アセチル化が協調作用している結果として、メチル化によって沈黙した遺伝子が相乗的に再発現する。

30

【図22A、B】それぞれ、グループ2aのECIST遺伝子座（22A：メチル化とは独立で、ヒストンのアセチル化が増大）とグループ2bのECIST遺伝子座（22B：メチル化およびヒストンのアセチル化とは独立）の“三重分析”結果である（グループ2aとグループ2bの定義については、実施例13の「結果」の項を参照のこと）。図22Aと図22Bの8個の代表的な遺伝子座はCP70細胞においてメチル化しておらず、これら遺伝子座の発現は、無処理のCP70細胞において少ないかゼロであった。DACまたはTSAだけで処理した後、これら遺伝子座のうちのいくつかで発現の増大が観察された。組み合わせで処理すると、8個の遺伝子座すべてで発現が誘導されたが、ヒストンの高アセチル化は、MDS1、SC13C2、UNG2のプロモータ領域でだけ見られた（図22A）。

40

【 図 1 】

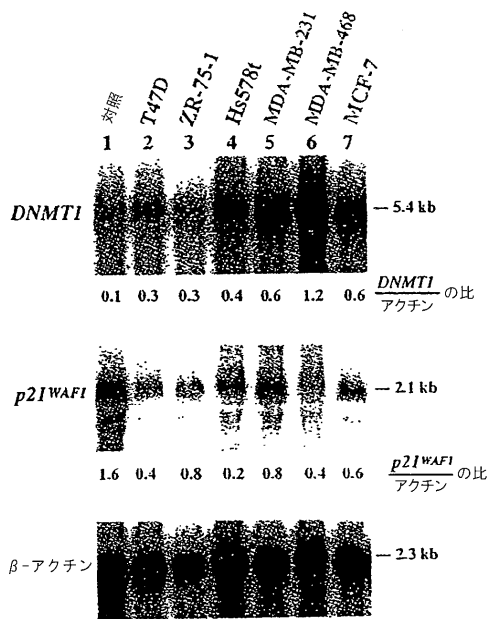


Fig. 1

【 図 3 】

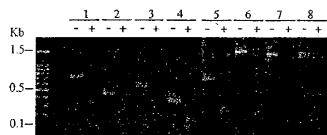


Fig. 3

【 図 2 】

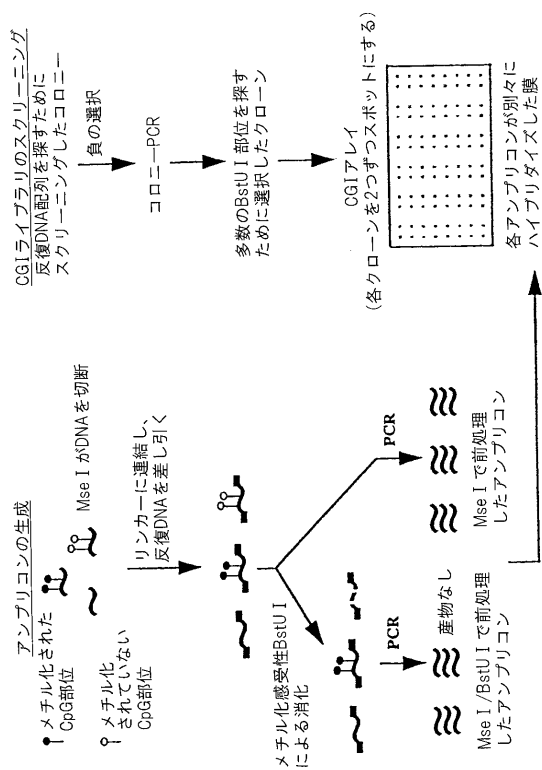


Fig. 2

【 図 4 】

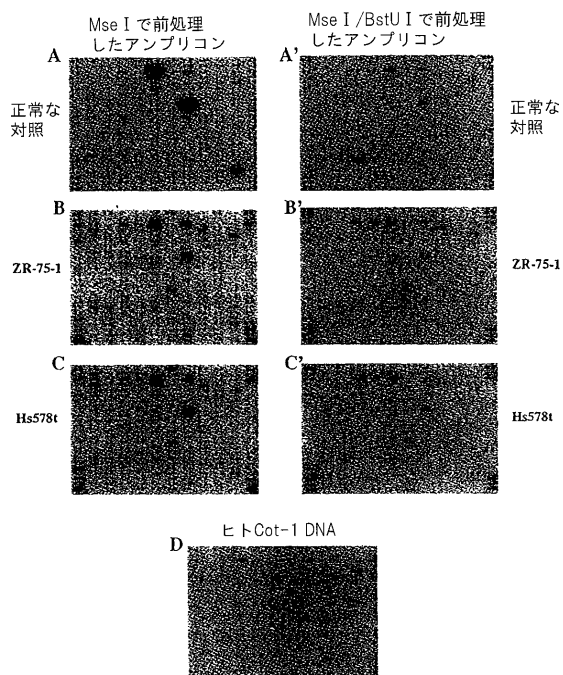


Fig. 4

【 図 5 】

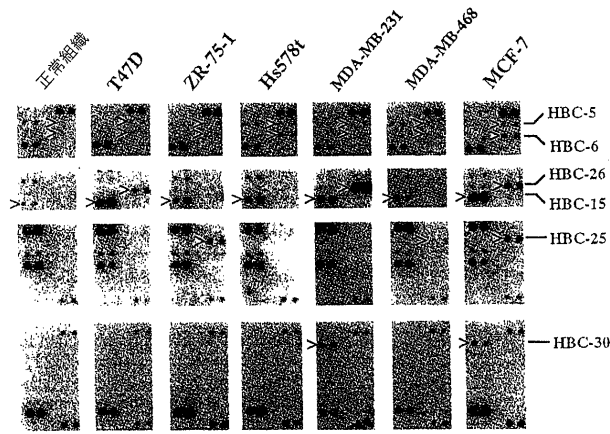


Fig. 5

【 図 6 】

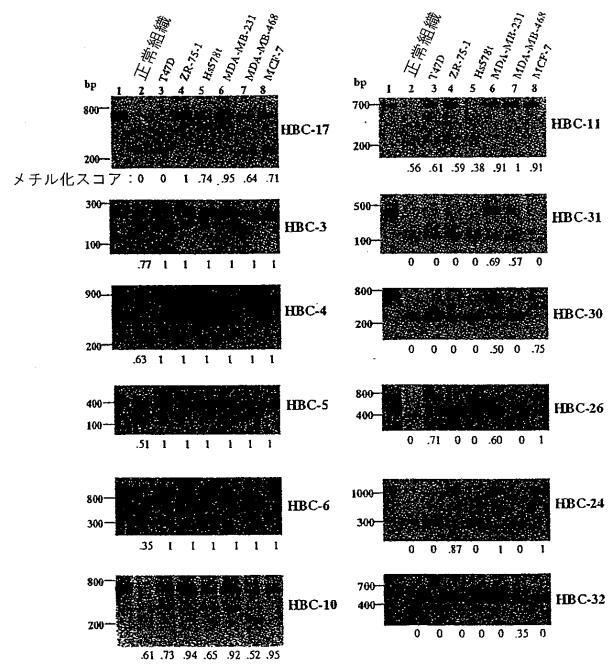


Fig. 6

【 図 7 】

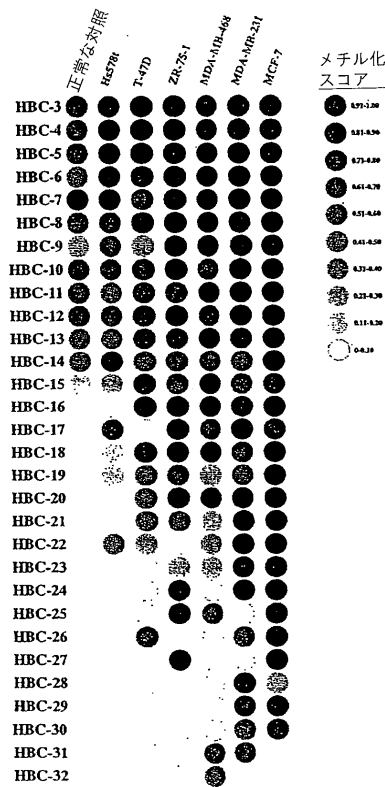


Fig. 7

【 図 8 】

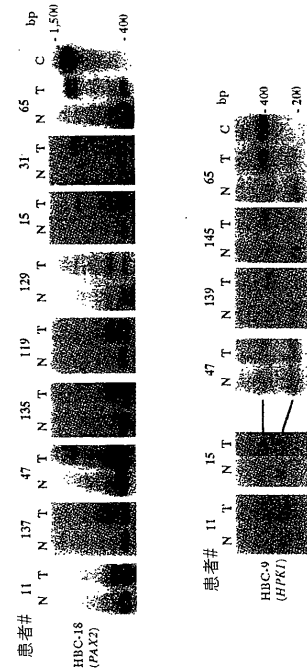
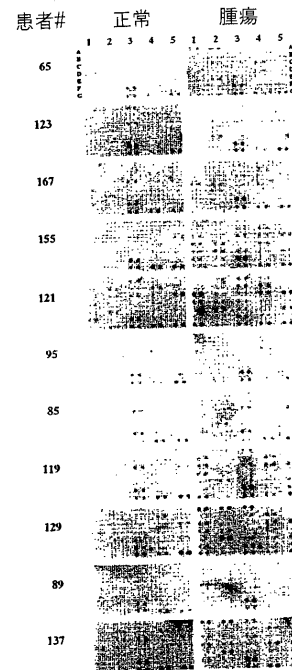


Fig. 8

【 図 9 A . B 】



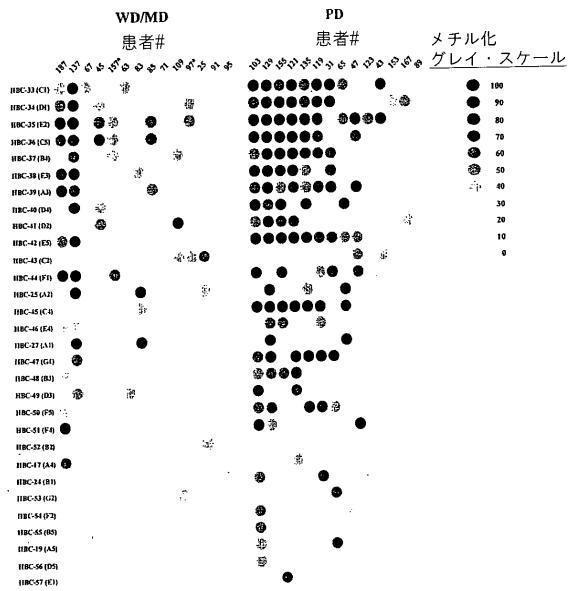
【 図 1 0 】



Figs. 9A and B

Fig. 10

【 図 1 1 】



*WD腫瘍

Fig. 11

【 図 1 2 A 】



Fig. 12A

【 図 1 2 B 】

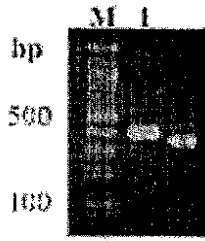


Fig. 12B

【 図 1 2 C 】

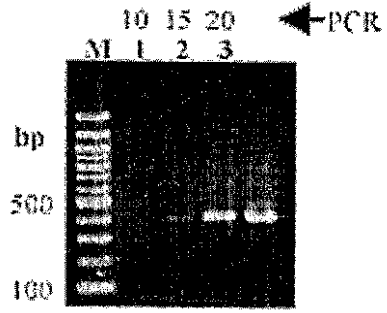


Fig. 12C

【 図 1 3 A 】

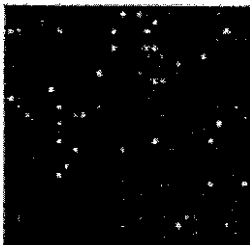


Fig. 13A

【 図 1 3 C 】

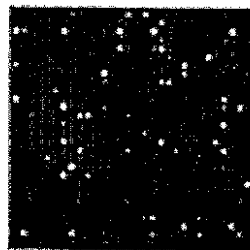


Fig. 13C

【 図 1 3 B 】

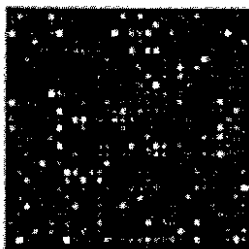


Fig. 13B

【 図 1 4 A 】

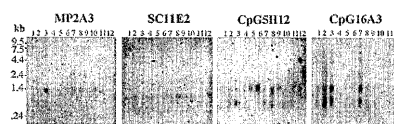


Fig. 14A

【 図 1 4 B 】

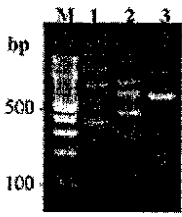


Fig. 14B

【 図 1 5 A . B 】

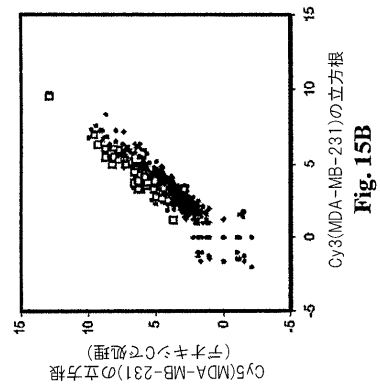


Fig. 15B

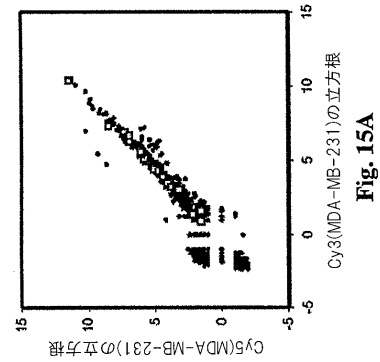


Fig. 15A

【 図 1 6 】

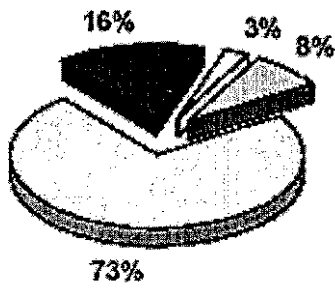


Fig. 16

【 図 1 7 A . B 】

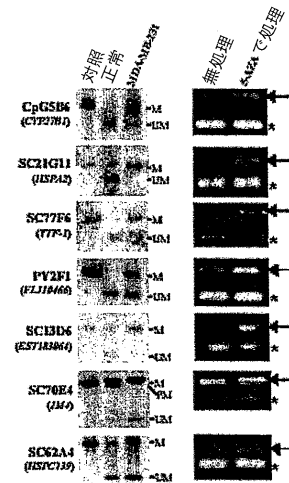


Fig. 17A

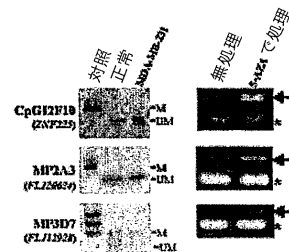


Fig. 17B

【 図 1 8 】

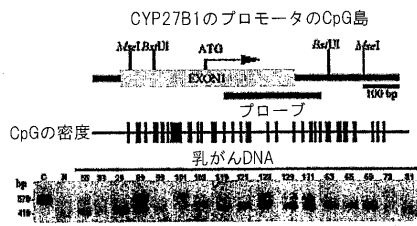
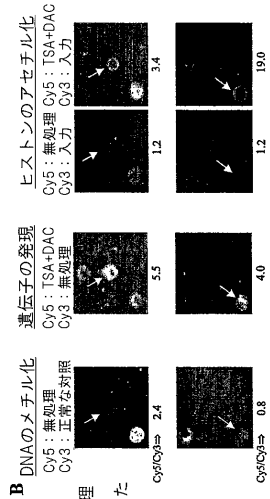
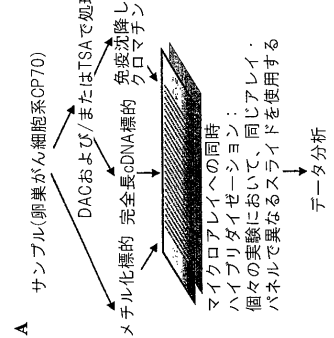


Fig. 18

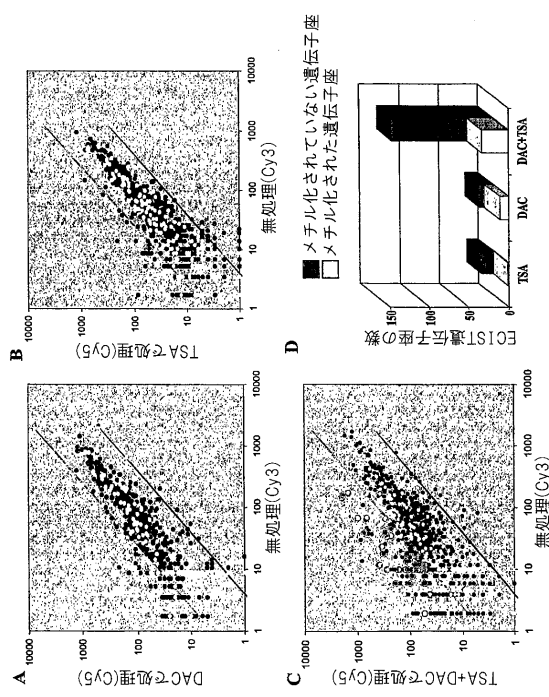
【 図 1 9 A . B 】



Figures 19A and B



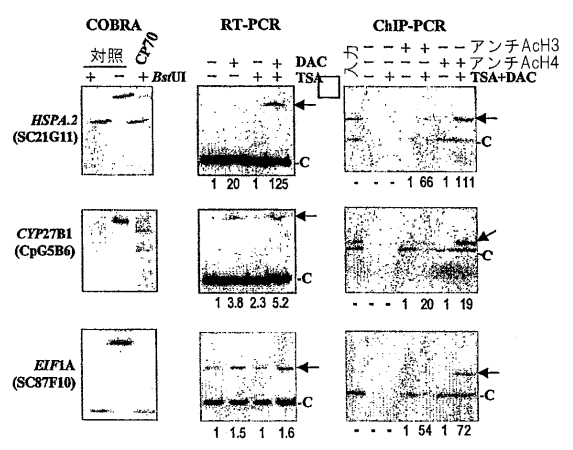
【 図 2 0 A . B . C . D 】



Figures 20A, B, C and D

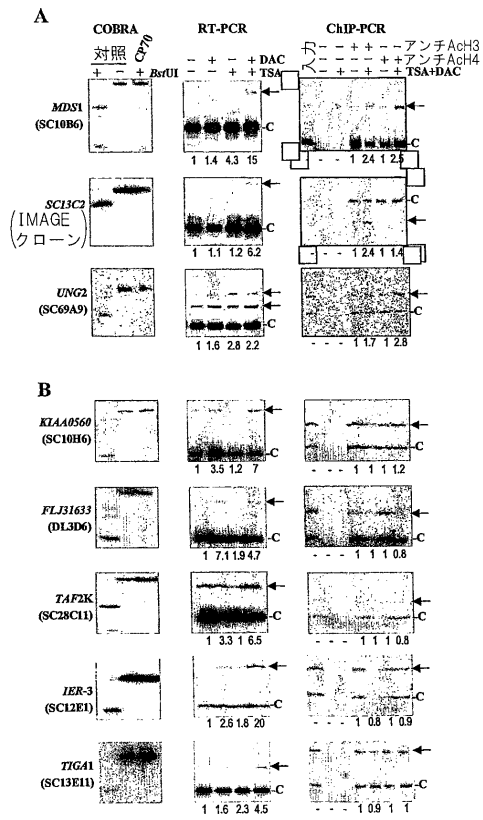
【 図 2 1 】

Figure 21



【 図 2 2 A . B 】

Figures 22A and 22B



【 配列表 】

200552222400001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/11598		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : C12Q 1/00, 1/68; C12P 19/34; C07H 21/02 21/04 US CL : 435/4, 6, 91.1; 536/23.1, 23.5, 24.1, 24.3, 24.33 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) U.S. : 435/4, 6, 91.1; 536/23.1, 23.5, 24.1, 24.3, 24.33				
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) Please See Continuation Sheet				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	HUANG et al. Methylation Profiling of CpG Islands in Human Breast Cancer Cells. Hum. Mol. Gen. 1999, Vol. 8, No. 3, pages 459-470, see whole document.	1-52		
Y	YAN et al. CpG Island Arrays: An Application Toward Deciphering Epigenetic Signatures of Breast Cancer. Clin. Canc. Res. April 2000, Vol. 6, pages 1432-1438, see whole document.	1-52		
Y	AHLUWALIA et al. DNA Methylation and Ovarian Cancer: I. Analysis of CpG Island Hypermethylation in Human Ovarian Cancer Using Differential Methylation Hybridization. Gynecologic Oncology. 2001, Vol. 82, No. 2, pages 261-268, see whole document.	1-52		
Y	YAN et al. Dissecting Complex Epigenetic Alterations in Breast Cancer Using CpG Island Microarrays. Cancer Res. 01 December 2001, Vol. 61, pages 8375-8380, see whole document.	1-52		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent 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 </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "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 </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent 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
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent 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 27 July 2003 (27.07.2003)		Date of mailing of the international search report 21 OCT 2003		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Alexander H. Spiegler</i> Alexander H. Spiegler Telephone No. (703) 308-0196		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/11598

Continuation of Item 4 of the first sheet:

The title is too long, PCT Rule 4.3, suggested new title follows: "ECIST MICROARRAYS FOR DUAL SCREENING OF DNA HYPERMETHYLATION AND GENE SILENCING".

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

Databases: USPAT, PG PUB, JPO, EPO, Derwent, Medline, Biosis, Embase, CaPlus, Biotechds

Search Terms: CpG, probe, array, microarray, chip, methylation, label, tissue, gene, CpG island

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	C 1 2 N 15/00	F

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IT,LU,MC,NL,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74) 代理人 100087413

弁理士 古賀 哲次

(74) 代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74) 代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72) 発明者 ファン, ティム ヒュイミン

アメリカ合衆国, ミズーリ 6 5 2 0 3, コロンビア, ロデオ ドライブ 3 0 0 7

(72) 発明者 シー, ヒュイドン

アメリカ合衆国, ミズーリ 6 5 2 0 3, コロンビア, ウェスト ブロードウェイ 2 4 0 2, ア
パートメント 2 1 9

F ターム(参考) 4B024 AA12 AA19 AA20 CA01 CA03 CA09 CA11 CA12 CA20 HA11

HA13 HA14 HA20

4B029 AA23 BB20 CC01 CC02 CC03 CC08 FA12 FA15

4B063 QA01 QA17 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ43 QQ52 QQ53 QQ79

QR56 QR84 QS34 QS36 QX02

(54) 【発明の名称】 DNAの高メチル化と遺伝子サイレンシングの両方をスクリーニングするためのE C I S Tマイクロアレイと、そのE C I S Tマイクロアレイを利用して遺伝子の発現、DNAのメチル化、ヒストンのアセチル化を評価するための統合システム

专利名称(译)	ECIST微阵列用于筛选DNA的超甲基化和基因沉默，以及使用ECIST微阵列评估基因表达，DNA甲基化，组蛋白乙酰化的综合系统		
公开(公告)号	JP2005522224A	公开(公告)日	2005-07-28
申请号	JP2003584671	申请日	2003-04-14
[标]申请(专利权)人(译)	雷治屠宰大学密苏里		
申请(专利权)人(译)	治愈密苏里大学的Ray屠杀		
[标]发明人	ファンティムヒユイミン シーヒユイドン		
发明人	ファン,ティム ヒユイミン シー,ヒユイドン		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12M1/34 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6809 C12Q1/6827 C12Q1/6837		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12M1/00.A C12M1/34.Z C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.F		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/AA19 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/CA03 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA20 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/CC02 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA12 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ43 4B063/QQ52 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR56 4B063/QR84 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 西山雅也		
优先权	60/372140 2002-04-12 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

利用表达CpG岛标签 (ECIST)，两个甲基和在肿瘤细胞中的基因的DNA的表达，以及DNA的甲基化，基因表达，与基因相关的组蛋白的乙酰化3的阵列提供了一种用于分析其中的新的高通量方法。ECIST具有该基因的富含GC的片段，对应于含有一个启动子部分和/或外显子的基因组DNA片段 (例如，第一外显子)。富含GC段是在癌细胞中来筛选有用的高甲基化的CpG位点，对应的启动子部分和含外显子的部分，并阐明了相应转录水平，评估组蛋白的乙酰化提供帮助。使用鉴定甲基化位点ECIST阵列面板，通过暴露去甲基化剂至细胞后测量所述基因座的表达水平，基因沉默的确认依赖于甲基化高通量方法，或用于执行去甲基化试剂是有效治疗还提供了进行鉴定高通量方法。显然，在后生级联，直接，上调依赖 (主) 去甲基化，间接 (二次) 上调并区分高的基因的基因取决于去甲基化可以通过方法已被进一步还提供。

ローンのリスト

CpG島クローン	挿入体のサイズ (kb)	GenBankとの一致	ATCC登録番号	配列ID番号
HBC-3	0.25			1
HBC-4	0.90			2
HBC-5	0.40	DCIS1	L27636	3
HBC-6	0.80	CG1クローン28f11	Z60565	4
HBC-7	0.60	CG1クローン178c6	Z59859	5
HBC-8	0.38	CG1クローン200b9	Z55140	6
HBC-9	0.44	HPK1	U66464	7
HBC-10	0.75	K'チャンネルタンパク質	Z93016	8
HBC-11	0.70			9
HBC-12	0.50	CG1クローン86e9	Z63556	10
HBC-13	1.00	CG1クローン31g5	Z60696	11
HBC-14	0.70			12
HBC-15	1.50	CG1クローン7c5	Z66179	13
HBC-16	1.00	EST AA827755	ESTA827	14
HBC-17	0.75			15
HBC-18	1.30	PAX2	M89470	16
HBC-19	0.90	PAX7	AL021528	17