

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-18099

(P2017-18099A)

(43) 公開日 平成29年1月26日(2017.1.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
C12M 1/00 (2006.01)	C12M 1/00 A	4 B O 2 9
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	4 B O 6 3
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	4 C O 8 4
A61P 35/02 (2006.01)	A61P 35/02	

審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-133808 (P2016-133808)
 (22) 出願日 平成28年7月6日 (2016.7.6)
 (62) 分割の表示 特願2013-519616 (P2013-519616) の分割
 原出願日 平成23年7月15日 (2011.7.15)
 (31) 優先権主張番号 11167973.4
 (32) 優先日 平成23年5月27日 (2011.5.27)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 11158912.3
 (32) 優先日 平成23年3月18日 (2011.3.18)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/364,831
 (32) 優先日 平成22年7月16日 (2010.7.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 516180058
 ステイヒティング フェーユーエムセー
 オランダ国 1081 ハーフェー アム
 ステルダム デー ポエラン 1117
 (74) 代理人 100107766
 弁理士 伊東 忠重
 (74) 代理人 100070150
 弁理士 伊東 忠彦
 (74) 代理人 100091214
 弁理士 大貫 進介
 (72) 発明者 ウルディンガー, トーマス
 オランダ国 1081 ハーフェー アム
 ステルダム, デー ポエラン 1085
 , カーマー エフ-545, フェーユーウ
 ントフェーユーエムセー内

最終頁に続く

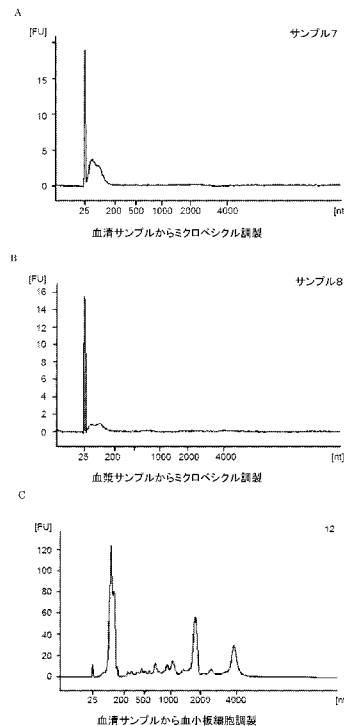
(54) 【発明の名称】 被験者の血液サンプル中の疾患マーカーの存在の分析方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 疾患マーカーの存在について被験者の血液サンプルを分析する方法の提供。

【解決手段】 (a) 無核血液細胞、好ましくは、血小板細胞から核酸を抽出し、前記血液サンプル中の、無核血液細胞抽出核酸画分を提供するステップ、及び (b) 前記無核血液細胞抽出核酸画分を疾患マーカーの存在について分析するステップを含み、疾患マーカーが、被験者の有核細胞の遺伝子の疾患特異的変異であるか、疾患マーカーが、被験者の有核細胞の遺伝子の疾患特異的発現プロフィールである。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

疾患マーカーの存在について被験者の血液サンプルを分析する方法であり、前記方法は次のステップ、

(a) 無核血液細胞、好ましくは、血小板細胞から核酸を抽出し、前記血液サンプル中の、無核血液細胞抽出核酸画分を提供するステップ、及び

(b) 前記無核血液細胞抽出核酸画分を疾患マーカーの存在について分析するステップを含み、

前記疾患マーカーが、前記被験者の有核細胞の遺伝子の疾患特異的変異であるか、前記疾患マーカーが、前記被験者の有核細胞の遺伝子の疾患特異的発現プロファイルである、方法。

10

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であり、前記無核血液細胞が血小板細胞又は血小板であり、好ましくは血小板細胞である、方法。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 のいずれか一項に記載の方法であり、前記疾患が、癌、自己免疫疾患、皮膚疾患、眼疾患、内分泌疾患、神経疾患及び心血管疾患からなる群から選択される、方法。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法であり、前記疾患が癌であり、好ましくは前記癌が、結腸、膵臓、脳、膀胱癌、乳癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、卵巣、子宮、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、甲状腺、神経組織、上皮組織、リンパ節、骨、筋肉及び皮膚から選択される固形腫瘍癌である、方法。

20

【請求項 5】

請求項 1 乃至 4 のいずれか一項に記載の方法であり、前記疾患特異的変異が染色体遺伝子であるか、前記疾患特異的発現プロファイルが染色体遺伝子のものである、方法。

【請求項 6】

請求項 1 乃至 5 のいずれか一項に記載の方法であり、前記核酸が、リボ核酸 (RNA)、好ましくは mRNA である、方法。

【請求項 7】

請求項 1 乃至 6 のいずれか一項に記載の方法であり、前記疾患マーカーの存在についての前記無核血液細胞抽出核酸画分の分析ステップ (b) は次の選択的増幅：

30

(i) 少なくとも 1 つの核酸変異特異的増幅プライマー又はプローブを用いる逆転写ポリメラーゼ連鎖反応による前記変異の増幅、又は

(ii) 前記 mRNA をコード化する染色体遺伝子の発現レベルを決定し、それにより前記遺伝子の発現プロファイルを提供し、かつ前記発現プロファイルを参照プロファイルと比較するために、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応による複数の mRNA の増幅、を含む、

方法。

【請求項 8】

請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載の方法であり、前記方法が、被験者の前記疾患の診断方法の一部であり、かつ前記無核血液細胞抽出核酸画分内の前記疾患マーカーの存在が、前記疾患を患う前記被験者を指示する、方法。

40

【請求項 9】

被験者の疾患の段階又は被験者への疾患治療の有効性を決定する方法であり、前記方法は：

- 第 1 の時点で請求項 1 乃至 8 のいずれか一項に記載の方法を用いて疾患マーカーの存在について被験者の血液サンプルを分析し、それにより前記被験者の前記疾患マーカーのレベルの第 1 の値を与えるステップ；

- 第 2 の時点で、請求項 1 乃至 8 のいずれか一項に記載の方法を用いて疾患マーカーの存在について被験者の血液サンプルを分析し、それにより前記被験者の前記疾患マーカーの

50

レベルの第 2 の値を与え、前記被験者が前記第 1 及び第 2 の時点の間に疾患治療の対象とされている、ステップ、及び

- 前記第 1 の値と第 2 の値を比較することで、前記被験者への前記治療の有効性を決定するステップ、
を含む方法。

【請求項 10】

被験者の疾患の段階を決定する方法であり、前記方法は、

- 請求項 1 乃至 8 のいずれか一項に記載の方法を用いて疾患マーカーの存在について被験者の血液サンプルにつき分析し、それにより前記被験者の疾患マーカーのレベルとして一つの試験値を提供するステップ、
- 疾患の特定の段階に関連付けられる前記疾患マーカーのレベルのための参照値を提供するステップ、及び
- 前記試験値及び参照値を比較して前記被験者の疾患の段階を決定するステップ、
を含む方法。

10

【請求項 11】

請求項 1 乃至 10 のいずれか一項に記載の方法を実施するために適合される部品のキットであり、前記キットは：

- 被験者の血液サンプルから分離された無核血液細胞を保持する容器；
- 前記無核血液細胞から核酸を抽出する試薬；
- 前記無核血液細胞から抽出された前記核酸から、前記疾患特異的マーカー、例えば被験者の有核細胞の遺伝子の疾患特異的変異を、逆転酵素ポリメラーゼ連鎖反応増幅により、選択的に増幅するための試薬、及び
- 請求項 1 乃至 10 のいずれか一項に記載の方法を実施するための印刷又は電子的指示書

20

のうちの少なくとも一つを含む包装物を含み、

前記キットがさらに：

- 前記疾患の参照値を含み、前記参照値は、前記無核血液細胞抽出核酸画分内の疾患マーカーの存在の指標である、キット。

【請求項 12】

請求項 11 に記載のキットであり、前記参照値は、健康なコントロール被験者、又は疾患を患うコントロール被験者の血小板細胞中の前記疾患特異的変異を含む核酸のレベルについての参照値であり、又は前記参照値は、健康なコントロール被験者の又は疾患を患うコントロール被験者からの無核血液細胞中の複数の mRNA の参照発現プロファイルである、キット。

30

【請求項 13】

請求項 11 又は 12 のいずれか一項に記載のキットであり、前記試薬が粒子又は蛍光マーカーラベル化抗無核血液細胞抗体であり、又は前記指示書が、ビーズ系無核血液細胞分離の指示書、無核血液細胞の FACS 選別の指示書、遠心分離により回収され又は非無核血液細胞成分の負選別により回収された無核血液細胞のための指示書から選択される、キット。

40

【請求項 14】

疾患診断のための装置であり、前記装置は、

支持体及び前記被験者の無核血液細胞サンプル内の少なくとも一つの核酸変異のレベル及び/又は活性を特異的に決定するための少なくとも一つの試薬を含み、前記試薬は前記支持体に結合され、及び請求項 1 乃至 10 のいずれか一項に記載の方法を実施するためのコンピュータ実行可能命令を持つコンピュータ読取可能な媒体を含む、装置。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の装置であり、少なくとも一つの試薬が、オリゴヌクレオチドプローブ又は配列分析プライマーである、装置。

【請求項 16】

50

請求項 14 又は 15 のいずれか一項に記載の装置であり、前記装置は、次の核酸ハイブリダイゼーション反応を実施するための、側方流動装置、ディップスティック又はカートリッジを含み：

- 無核血液細胞抽出核酸と少なくとも 1 つの核酸変異特異的増幅プライマー又はオリゴヌクレオチドプローブとの間のハイブリダイゼーションである、ここで前記核酸変異特異的増幅プライマー又はオリゴヌクレオチドプローブが疾患特異的変異に特異的であり、又は
- 無核血液細胞抽出核酸と、疾患特異的遺伝子発現プロファイルを与えるための複数の遺伝子特異的増幅プライマー又はオリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションである、装置。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の分野は、医学診断分野、特に疾患診断及びモニターの分野である。本発明は、疾患検出のためのマーカー、疾患検出方法、及び疾患治療の有効性を決定するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

実際の臨床において、疾患を初期段階で検出し、進行を予期し、かつ患者に合わせた治療を実施することができる強い要求がある。特に新生物疾患（癌）の初期段階での検出は、前記疾患の好ましい治療を保証する上で非常に重要である。医学研究の多くの進展にも拘わらず、癌は未だに世界規模で主な死因となっている。患者が治療を求める場合、一般的には、遠隔転移の症状が現れており、このことはあまりにもしばしば、前記癌の検出が手遅れであることを意味する。

20

【0003】

肺癌、前立腺癌、乳癌及び大腸癌は、最も多い腫瘍であり、外科摘出、放射線治療、化学的治療又はその他の知られる治療方法を施すために、癌の初期段階で診断するための迅速でかつ簡単な方法の必要性が存在する。癌の良い診断方法の利用可能性は、また治療に対する患者の反応を評価し、元の位置で又は転移で再生長による再発を評価するために重要である。

30

【0004】

いくつかのタイプの癌マーカー、例えば癌遺伝子産物、増殖因子や成長因子受容体、血管新生因子、プロテアーゼ、接着因子及び腫瘍抑制因子などの癌マーカーが現在知られているが、初期段階診断に重要であると考えられているだけでなく、悪性と良性異常を区別するためなどの不確実な臨床異常をもつ患者の識別診断のため；確立された悪性腫瘍を持つ特定の患者での治療の選択された治療方法に対する応答の可能性を予想するため；及びヒト又は動物被験者の悪性腫瘍のリスク、存在、状態又は将来の挙動に関する情報を提供するためにも重要であると考えられている。現在、腫瘍又は癌マーカーの検出による癌検出及び診断の可能性は、広く興味の対象となっており、その結果、患者試料内の新規な及びより有用な癌マーカーを同定する再現性のある信頼性の高い方法を求める要求が存在する。

40

【0005】

膠芽腫は、最も共通のかつ最も進行性のヒト原発性脳腫瘍である。前記疾患は、診断することが難しく、治療することがなほ難しいものであり、この理由のひとつは、血液脳関門のために、治療薬の輸送を阻害し、かつ潜在的に重要な診断用マーカーの検出を阻害するからである。膠芽腫の診断マーカーは利用可能ではあるが、前記腫瘍組織自体に特異的であり、腫瘍サンプルを必要とするものである。

【0006】

改良されたスクリーニング及び検出方法は、癌を初期段階で検出し、前記疾患の進行を

50

追跡するために必要とされる。癌の場合には、我々は、前記腫瘍を検出する必要がないが、治療が症状を緩和するのではなく完治できるノーリターンポイントに到達する前に検出する必要がある。リスクのある人だけでなく再発癌患者は、広範囲にモニターされるべきである。さらに、腫瘍が異なる治療により異なって応答するものであるから、患者の層分けは重要となる。

【0007】

腫瘍生検を用いた遺伝子解析は、多くの変異を同定することを可能にし、癌の診断のためだけでなく新たな患者の層分け戦略のためにも有用である。しかし、現在の腫瘍の遺伝子解析の欠点は、しばしば患者から切開することが不可能な腫瘍生検が必要であるということである。さらに、生検の使用は、静的であり、腫瘍進展又は時間経過に伴う再発を遺伝子モニターすることができない、ということである。さらに、多くの腫瘍は、不均一である、かかる腫瘍の生検について潜在的な偽陽性又は偽陰性遺伝子特徴付けがなされる結果となる。

10

【0008】

最近、腫瘍進展又は再発の診断及びモニターのための循環腫瘍細胞の使用は、血液を腫瘍誘導物質源、特に細胞の形状の組織断片としての使用を示した。しかし、循環細胞の使用はほとんどの癌には不十分である。

【0009】

一般には、疾患マーカーは、疾患患者からの生理的液体中で、通常健康な被験者と比較して、その濃度が変化し、好ましくは上昇する化合物として定義され、かつ従って疾患を示すマーカー化合物として使用され得る化合物として定義される。なお、癌などの疾患のマーカーとしての特定の化合物、例えばタンパク質の識別は、従って適切な技術の欠如により邪魔されてきた。

20

【0010】

癌以外の疾患の場合もまた、検出が難しいマーカーは利用可能である。これは疾患の初期段階での診断を邪魔するものである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明の課題は、必ずしも全ての疾患組織又は疾患タイプ（例えば腫瘍）が循環疾患細胞（例えば循環腫瘍細胞）ではないこれらの従来技術の問題を克服することである。本発明はまた、癌などの疾患を検出するためのタンパク質マーカーを検出することが難しいという問題を解決することを課題とする。さらには、本発明は、生検の必要がなく、患者のモニターの広く使用できる方法を提供することを課題とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明の第1の側面は、疾患マーカーの存在を、被験者の血液サンプルで分析する方法を提供するものであり、前記方法は次のステップ、

(a) 無核血液細胞画分を準備するための前記血液サンプル中の、無核血液細胞、好ましくは血小板から核酸を抽出するステップ、及び

40

(b) 疾患マーカーの存在について前記無核血液細胞抽出核酸を分析するステップを含み、前記疾患マーカーが、前記被験者の有核細胞の遺伝子に疾患に特有の変異であるか、又は前記疾患マーカーが、前記被験者の有核細胞の遺伝子の疾患特異的発現プロファイルである。

【0013】

ここで用語「無核血液細胞」とは核を欠失した細胞を意味する。前記用語は、赤血球及び血小板の両方を意味する。本発明のこの側面において無核血液細胞の好ましい実施態様は、血小板である。用語「無核血液細胞」は好ましくは、細胞分裂の失敗の結果として核を欠失した細胞は含まないことを意味する。

【0014】

50

ここで用語「有核細胞」とは、核を持つ細胞を意味する。前記用語は、体細胞、生殖細胞や幹細胞、結腸、膵臓、脳、膀胱癌、乳癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、卵巣、子宮、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、甲状腺、神経組織、結合組織、血液、上皮組織、リンパ節、骨、筋肉や皮膚組織を参照することを含む。前記有核細胞は好ましくは疾患組織からの細胞である。

【0015】

従って、本発明は、一般には、核酸の分析を目的とするものであり、前記核酸は核を持つ細胞から核を持たない細胞へ転移された核酸であり、前記核を持たない細胞が血流から容易に分離され、かつ前記有核細胞からの核酸を含む。

【0016】

用語「核」とは、染色体の形で構成される細胞の遺伝子物質として最も多く含まれる真核生物中で見られる、膜で囲まれた細胞小器官を意味する。この染色体遺伝子は、細胞の核遺伝子である。前記核の内部は、RNA含有核を含む多くの核内小体を含み、RNA含有核は主にRNA含有リボソーム構造体に含まれる。前記核内で産生された後、リボソームは細胞質へ運び出され、そこでmRNAを翻訳する。

【0017】

無核血液細胞抽出核酸画分は、好ましくは、染色体DNA、リボソームRNA、核RNA、及び/又はメッセンジャーRNAを含む画分を意味する。

【0018】

ここで用語「遺伝子」、及び特に句「有核細胞の遺伝子の変異」とは、有核(体細胞)細胞の染色体及び染色体外の両方の全ての核酸配列を意味し、好ましくは膜の核酸配列を意味し、転写配列及び非転写配列でもよく、同様にリボソームRNA配列でもよく、最も好ましくはRNAへ転写された染色体配列である。

【0019】

本発明の方法に好ましい実施態様では、疾患特異的変異は染色体遺伝子におけるものである。

【0020】

他の好ましい実施態様では、前記遺伝子は無核血液細胞からの遺伝子ではない。

【0021】

本発明の方法の好ましい実施態様では、疾患特異的発現プロファイルは、染色体遺伝子の発現プロファイルである。特に有核細胞からの染色体遺伝子であって、血小板に存在するmRNAである。

【0022】

本発明の方法のさらに好ましい実施態様では、前記核酸はリボ核酸(RNA)、より好ましくは、メッセンジャーリボ核酸(mRNA)である。

【0023】

本発明の方法の好ましい実施態様では、前記核酸はmtDNAではない。従って、ミトコンドリア核酸は好ましくは発明の側面ではない。

【0024】

本発明による血液サンプルの分析方法の好ましい実施態様では、疾患マーカーの存在についての前記無核血液細胞抽出核酸画分の分析ステップ(b)は次の選択的増幅を含み：
(i)少なくとも1つの核酸変異特異的増幅プライマー又はプローブを用いる逆転写ポリメラーゼ連鎖反応による前記変異の増幅、又は
(ii)前記mRNAをコード化する染色体遺伝子の発現レベルを決定し、それにより前記遺伝子の発現プロファイルを提供し、かつ前記発現プロファイルを参照プロファイルと比較するために、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応による複数のmRNAの増幅、である。

【0025】

前記血液サンプルは好ましくは体外由来である。

【0026】

本発明の方法の好ましい実施態様では、前記疾患は、癌、自己免疫疾患、皮膚疾患、眼

10

20

30

40

50

疾患、内分泌疾患、神経疾患、心血管疾患から選択される。

【0027】

本発明の方法の好ましい実施態様では、前記疾患は、自己免疫疾患、皮膚疾患、眼疾患、内分泌疾患、神経疾患、心血管疾患から選択される。

【0028】

本発明の方法の他の好ましい実施態様では、前記疾患は癌である。

【0029】

本発明の方法の他の好ましい実施態様では、前記癌は、好ましくは、結腸、膵臓、脳、膀胱癌、乳癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、卵巣、子宮、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、甲状腺、神経組織、上皮組織、リンパ節、骨、筋肉及び皮膚から選択される固形腫瘍癌である。

10

【0030】

本発明の好ましい実施態様では、自己免疫疾患は、無酸性自己免疫活動性慢性肝炎；急性散在性脳脊髄炎；急性出血性白質脳炎；アジソン病；無ガンマグロブリン血症；円形脱毛症；筋萎縮性側索硬化症；強直性脊椎炎；抗-GBM/TBM腎炎；抗リン脂質抗体症候群；抗シンセターゼ症候群；多関節リウマチ；アトピー性アレルギー；アトピー性皮膚炎；自己免疫性再生不良性貧血；自己免疫性心筋症；自己免疫性腸疾患；自己免疫性溶血性貧血；自己免疫性肝炎；自己免疫性内耳疾患；自己免疫性リンパ増殖症候群；自己免疫性末梢神経障害；自己免疫性膵炎；自己免疫多内分泌性症候群；自己免疫性プロゲステロン皮膚炎；自己免疫性血小板減少性紫斑病；自己免疫性ブドウ膜炎；バロ病/バロ同心円硬化症；ベーチェット症候群；パーガ病；ピッカーstaff脳炎；ブラウ症候群；水疱性類天疱瘡；キャッスルマン病；セリアック病；シャーガス病；免疫不全症候群慢性疲労；慢性炎症性脱髄性多発神経障害；慢性再発性多発性骨髄炎；慢性ライム病；慢性閉塞性肺疾患；チャグ・ストラウス症候群；癩痕性類天疱瘡；セリアック病；コーガン症候群；寒冷凝集素症；補完コンポーネント2欠損症；頭蓋動脈炎；CREST症候群；クローン病；クッシング症候群；皮膚白血球破碎性血管炎；デゴ病；有痛脂肪症；疱疹状皮膚炎；皮膚筋炎；糖尿病タイプ1；拡散性皮膚全身性硬化症；ドレスラー症候群；円板状エリテマトーデス；湿疹；子宮内膜症；腱附着部炎関連関節炎；好酸球性筋膜炎；好酸球性胃腸炎；後天性表皮水疱症；結節性紅斑；本態性混合型クリオグロブリン血症；エヴァン症候群；進行性骨化性線維形成異常症；線維筋痛症/線維筋炎；線維化肺胞炎；胃炎；胃腸類天疱瘡；巨細胞性動脈炎；糸球体腎炎；グッドパスチャー症候群；パセドウ病；ギラン・バレー症候群；橋本脳炎；橋本甲状腺炎；溶血性貧血；ヘノッホ・シェーンライン紫斑病；妊娠性疱疹；汗腺膿瘍；ヒューズ症候群；低ガンマグロブリン血症；特発性炎症性脱髄性疾患；特発性肺線維症；特発性血小板減少性紫斑病；IgA腎症；封入体筋炎；炎症性脱髄性多発症；間質性膀胱炎；過敏性腸症候群（IBS）；若年性特発性関節炎；若年性関節リウマチ；カワサキ病；ランパート-イトン筋無力症候群；白血球破碎性血管炎；扁平苔癬；萎縮性苔癬；リニアIgA疾患；ルー・ゲーリック病；ルポイド肝炎；エリテマトーデス；マジード症候群；メニエール病；顕微鏡的多発；ミラーフィッシャー症候群；混合性結合組織病；強皮症；ミュシャ-ハーバーマン病；マックル・ウェルズ症候群；多発性骨髄腫；多発性硬化症；重症筋無力症；筋炎；ナルコレプシー；視神経脊髄炎；過敏神経脊髄炎；眼球癩痕性類天疱瘡；オブソクローヌスミオクローヌス症候群；オールド甲状腺炎；回帰性リウマチ；PANDAS；傍腫瘍性小脳変性症；発作性夜間血色素尿症；パリーロンベルグ症候群；パルソナジターナー症候群；扁平部炎；天疱瘡；尋常性天疱瘡；悪性貧血；静脈周囲脳脊髄炎；POEMS症候群；結節性多発動脈炎；リウマチ性多発筋痛；多発性筋炎；原発性胆汁性肝硬変；原発性硬化性胆管炎；進行性炎症性神経障害；乾癬；乾癬性関節炎；壊疽性膿皮症；赤芽球癆；ラスムッセン脳炎；レイノー現象；再発性多発性軟骨炎；ライター症候群；むずむず脚症候群；後腹膜線維症；関節リウマチ；リウマチ熱；サルコイドーシス；統合失調症；シュミット症候群；シュニッツラー症候群；強膜炎；強皮症；シェーグレン症候群；脊椎関節症；スティッキー血症候群；スチル症候群；スティッフ人症候群；亜急性細菌性心内膜炎（SBE）；スザク症候群；スウィート症候群；シデナム舞蹈病；交感性眼炎；高安動脈炎；側頭動脈炎；トロサハント症候群

20

30

40

50

；横断性脊髄炎；潰瘍性大腸炎；未分化結合組織病；未分化脊椎関節症；血管炎；白斑；ウエゲナー肉芽腫症；ウィルソン症候群及びウイスコット・アルドリッチ症候群からなる群から選択される。

【0031】

本発明の好ましい実施態様では、前記皮膚疾患は、瘡様発疹；自己炎症症候群；慢性水疱；粘膜条件；皮膚付属器条件；先天異常；皮下脂肪条件；結合組織疾患（例えば、真皮線維と弾性組織の異常など）；皮膚および皮下増殖；皮膚炎（アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、湿疹、膿疱性皮膚炎、脂漏性皮膚炎を含む）；色素沈着の乱れ；蕁麻疹；内分泌関連皮膚疾患；好酸球；表皮母斑；腫瘍；嚢胞；紅斑；遺伝性皮膚症；感染症関連皮膚病；苔癬様発疹、リンパ関連皮膚病；色素細胞性母斑および腫瘍（悪性黒色腫を含む）；単球とマクロファージ関連皮膚疾患；ムチン沈着症；神経皮膚；非感染性免疫不全関連皮膚病；栄養関連皮膚疾患；丘疹鱗屑性角質増殖（掌魚鱗癬）；妊娠関連皮膚疾患；掻痒；乾癬；好反応；反抗的掌蹠発疹；代謝異常起因蕁麻疹や血管性浮腫；物理的要因（電離放射線誘発を含む）に起因する血管関連皮膚疾患からなる群から選択される。

10

【0032】

本発明の他の好ましい実施態様では、内分泌疾患は、副腎疾患；グルコース恒常性障害；甲状腺疾患；カルシウム恒常性障害および代謝性骨疾患；垂体疾患；及び性ホルモン障害からなる群から選択される。

【0033】

本発明の他の好ましい実施態様では、前記眼疾患は、眼瞼、涙器系と軌道のH00-H06障害；結膜のH10-H13障害；強膜、角膜、虹彩、毛様体のH15-H22障害；レンズのH25-H28障害；脈絡膜と網膜のH30-H36障害（H30網脈絡膜炎、脈絡膜のH31その他の障害、他に分類される疾患における脈絡膜疾患H32、H33網膜剥離や休憩、H34網膜血管閉塞、H35その他の網膜疾患、および他のグループに分類される疾患におけるH36網膜疾患を含む）；H40-H42緑内障；硝子体と地球のH43-H45障害；視神経や視覚経路のH46-H48障害；眼筋、両眼運動、宿泊施設や屈折のH49-H52障害；H53-H54、9視覚障害や失明、そして目や付属器のH55-H59その他の疾患からなる群から選択される。

20

【0034】

本発明の好ましい実施態様では、前記神経疾患は、圧覚喪失；後天的てんかん失語症；急性散在性脳脊髄炎；副腎白質ジストロフィー；脳梁欠損症；失認；アイカルディ症候群；アレキサンダー病；エイリアンハンド症候群；感覚体側逆転；アルパーズ病；片麻痺を交互；アルツハイマー病；筋萎縮性側索硬化症（運動ニューロン疾患を参照のこと）；無脳症；アンジェルマン症候群；血管腫症；無酸素症；失語症；失行；クモ膜嚢胞；くも膜炎；アーノルド・キアリ奇形；動静脈奇形；毛細血管拡張性運動失調症；注意欠陥多動性障害；聴覚処理障害；自律神経障害；背中の痛み；バッテン病；ベーチェット病；ベル麻痺；良性特発性眼瞼けいれん；良性頭蓋内圧亢進症；両側前頭多小脳回；ピンスワンガー病；眼瞼痙攣；プロッホサルズパーガー症候群；腕神経叢損傷；脳膿瘍；脳損傷；脳損傷；脳腫瘍；ブラウンセカール症候群；カナバン病；手根管症候群；カウザルギー；中枢性疼痛症候群；橋中心髄鞘崩壊；中心核ミオパシー；頭部の障害；脳動脈瘤；脳動脈硬化症；脳萎縮；脳性巨人症；脳性麻痺；脳血管炎；頸椎脊柱管狭窄症；シャルコー・マリー・トゥース病；キアリ奇形；舞蹈病；慢性疲労症候群；慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー（CIDP）；慢性疼痛；コフィンローリー症候群；昏睡；複合性局所疼痛症候群；圧迫性神経障害；先天性の顔面麻痺；大脳皮質基底核変性症；頭蓋動脈炎；頭蓋骨癒合症；クロイツフェルト・ヤコブ病；蓄積外傷疾患；クッシング症候群；巨細封入体病（CIBD）；サイトメガロウイルス感染症；ダンディ・ウォーカー症候群；ドーソン病；デモルシャ症候群；デジェリン・クルンプケ麻痺；デジェリン・ソッタス病；遅延睡眠相症候群；認知症；皮膚筋炎；発達統合運動障害；糖尿病性神経障害；びまん性硬化症；ドラベ症候群；自律神経障害；計算力障害；書字障害；ディスレクシア；ジストニア；エンブティセラ症候群；脳炎；脳ヘルニア；脳三叉神経領域血管腫症；遺糞；癲癇；エルブ麻痺；紅

30

40

50

;本態性振戦;ファブリー病;ファール症候群;失神;家族性痙性麻痺;熱性けいれん;
 フィッシャー症候群;フリードライヒ失調症;線維筋痛;ゴーシェ病;ゲルストマン症候
 群;巨細胞性動脈炎;巨細胞性封入体病;球様細胞白質萎縮症;異所性灰白質;ギラン・
 バレー症候群;HTLV-1関連脊髄症;ハレルフォルデン・スパッツ病;頭部外傷;頭
 痛;片側顔面けいれん;遺伝性痙性対麻痺;遺伝性多発神経炎性失調;耳帯状疱疹;帯状
 疱疹;平山症候群;全前脳症;ハンチントン病;水無脳症;水頭症;副腎皮質機能亢進症
 ;低酸素症;免疫介在性脳脊髄炎;封入体筋炎;色素失調症;乳児フィタン酸蓄積症;乳
 児レフサム病;乳児痙攣;炎症性筋疾患;頭蓋内嚢胞;頭蓋内圧亢進;ジュベール症候群
 ;カラク症候群;カーズ・セイヤー症候群;ケネディ病;キンスブルーン症候群;クリ
 ッペルフェイル症候群;クラッペ病;クーゲルバーグ・ウェランダー病;クーラー;ラフ
 オラ病;ランベルト・イトン筋無力症候群;ランダウクレフナ症候群;横延髄(ウォレ
 ンバーグ)症候群;学習障害;リー病;レノックス・ガストー症候群;レッシュ・ナイハ
 ン症候群;染色性白質ジストロフィー;レビー小体型認知症;滑脳症;ロックイン症候群;
 ルー・ゲーリック病(運動ニューロン疾患を参照);腰椎椎間板疾患;腰部脊柱管狭窄症
 ;ライム病-神経学的後遺症;マシャド・ジョセフ病(脊髄小脳失調症3型);大脳症;
 巨視;巨大脳髄症;メルカーソン・ローゼンタル症候群;メニエール病;髄膜炎;メン
 ケス病;異染色性白質ジストロフィー;小頭症;小視症;片頭痛;フィッシャー症候群;ミ
 ニ脳卒中(一過性脳虚血発作);ミトコンドリアミオパチー;メビウス症候群;単肢の筋
 萎縮症;運動ニューロン疾患;運動技能障害;もやもや病;ムコ多糖;多発梗塞性認知症
 ;多巣性運動ニューロパチー;多発性硬化症;多系統萎縮症;筋ジストロフィー;筋痛性
 脳脊髄炎;重症筋無力症;ミエリン碎屑性びまん性硬化症;乳児のミオクロニー脳症;ミ
 オクローヌス;ミオパシー;筋細管性ミオパチー;先天性筋強直症;ナルコレプシー;神
 経線維腫症;悪性症候群;エイズの神経症状;ループスの神経学的後遺症;神経性筋緊張
 病;神経セロイドリポフスチン症;神経移動障害;ニーマンピック病;非24時間睡眠・
 覚醒症候群;非言語的学習障害;オサリバン・マクラウド症候群;後頭神経痛;オカルト
 脊髄癒合不全配列;大田原症候群;オリブ橋小脳萎縮症;オブソクローヌスミオクロ
 ーヌス症候群;視神経炎;起立性低血圧;使い過ぎ症候群;反復視;感覚異常;パーキンソ
 ン病;先天性パラミオトニア;腫瘍随伴性疾患;発作性の攻撃;パリー・ロンベルグ症候
 群;ペリツェウス・メルツパッヒャー病;定期的なParalysis;末梢神経障害;
 遷延性植物状態;広汎性発達障害;光くしゃみ反射;フィタン酸蓄積症;ピック病;はさ
 まれた神経;下垂体腫瘍;PMG;ポリオ;多小脳回;多発性筋炎;孔脳症;ポストポリ
 オ症候群;帯状疱疹後神経痛(PHN);感染後脳脊髄炎;起立性低血圧;ブラダー・ウ
 ィリー症候群;原発性側索硬化症;プリオン病;プログレッシブ片側顔面萎縮症;進行性
 多巣性白質脳症;進行性核上性麻痺;偽脳腫瘍;狂犬病;ラムゼイ・ハント症候群(タイ
 プI、タイプII);ラスムッセン脳炎;反射神経血管ジストロフィー;レフサム病;反
 復運動障害;反復性のストレス障害;むずむず脚症候群;レトロウイルス関連脊髄症;レ
 ット症候群;ライ症候群;リズムカルな運動障害;ロンベルグ症候群;舞蹈病;サンドホ
 フ病;統合失調症;シルダー病;裂脳症;感覚統合機能不全;セプト光学異形成;揺さぶ
 られっ子症候群;帯状疱疹;シャイ・ドレーガー症候群;シェーグレン症候群;睡眠時無
 呼吸;睡眠病;スナチテーション;ソトス症候群;痙性;二分脊椎;脊髄損傷;脊髄腫瘍
 ;脊髄性筋萎縮症;脊髄小脳失調症;スティール・リチャードソン・オルシェフスキー症
 候群;スティッフパーソン症候群;ストローク;スタージ・ウェーバー症候群;亜急性硬
 化性全脳炎、皮質下動脈硬化性脳症;表面的な鉄沈着症;シデナム舞蹈病;失神;共感覚
 ;脊髄空洞症;足根管症候群;遅発性ジスキネジア;タルロフ嚢胞;テイ・サックス病;
 側頭動脈炎;破傷風;係留脊髄症候群;トムセン病;胸郭出口症候群;疼痛性チック;ト
 ッド麻痺;トゥレット症候群;中毒性脳症;一過性脳虚血発作;伝達性海綿状脳症;横断
 性脊髄炎;外傷性脳損傷;振戦;三叉神経痛;熱帯性痙性対麻痺;トリパノソーマ症;結
 節性硬化症;フォン・ヒッペル・リンドウ病;ビリウスキ脳脊髄炎;バレンベリー症候群
 ;ウェルドニヒ・ホフマン病;ウェスト症候群;むち打ち症;ウィリアムズ症候群;ウ
 イルソン病及びゼルウィガー症候群からなる群から選択される。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 5 】

本発明の側面の他の好ましい実施態様では、前記心血管疾患は、動脈瘤；心症；脈硬化；卒中（脳卒中）；血管疾患；うっ血性心不全；冠動脈疾患；心筋梗塞（心臓発作）；及び末梢血管疾患からなる群から選択される。

【 0 0 3 6 】

他の側面では、本発明は、本発明による血液サンプルを分析する方法を用いて被験者の疾患を診断する方法を提供する。従って、本発明の方法の好ましい実施態様では、本発明により血液サンプルの分析方法は被験者の疾患診断の方法の一部であり、かつ前記無核血液細胞抽出核酸画分の疾患マーカーの存在が前記疾患を患う前記被験者の指標となる。

【 0 0 3 7 】

他の側面では、本発明は、被験者の疾患治療の有効性を決定する方法を提供するものであり、前記方法は：

- 最初の時点で本発明の血液サンプル分析方法を用いて疾患マーカーの存在を被験者の血液サンプルを分析し、それにより前記被験者の前記疾患マーカーのレベルの第1の値を与え；
- 前記最初の時点よりも前後、好ましくは後の第2の時点で、本発明の血液サンプル分析方法を用いて疾患マーカーの存在を被験者の血液サンプルを分析し、それにより前記被験者の前記疾患マーカーのレベルの第2の値を与え、前記被験者が前記第1及び第2の時点の間に疾患治療の対象とされており、及び
- 前記第1の値と第2の値を比較することで、前記被験者への前記治療の有効性を決定する、ことを含む。

【 0 0 3 8 】

当業者は、前記第1の時点で先立つ治療及び続く第2の後の時点前記時点間に疾患治療が全く行われなかったことは、疾患治療の有効性を決定するための本発明の側面に含まれる、ということを理解するであろう。

【 0 0 3 9 】

他の側面では、本発明は疾患段階を決定する方法を提供する。疾患の段階を決定するために、本発明の方法で決定された疾患マーカー値を疾患段階と関連付けることは有用である。疾患マーカーの単一測定は、それにより1以上の参照値と比較され、疾患の段階の指標を得ることができる。

【 0 0 4 0 】

他の側面では、本発明は、被験者の疾患の段階を決定する方法を提供し、前記方法は次のステップ：

- 本発明による疾患マーカーの存在を被験者の血液サンプルを分析する方法を用いて疾患マーカーの存在を被験者の血液サンプルにつき分析し、それにより前記被験者の疾患マーカーのレベルとして一つの試験値を提供し、
- 疾患の特定の段階に関連付けされる前記疾患マーカーのレベルのための参照値を提供し、及び
- 前記試験値及び参照値を比較して前記被験者の疾患の段階を決定する、ことを含む。

【 0 0 4 1 】

他の側面では、本発明は前記記載の本発明の方法を実施するように適合される部品のキットを提供し、前記キットは少なくとも次の：

- 血液サンプルから分離された無核血液細胞、好ましくは血小板を保持する容器；
- 前記無核血液細胞から核酸を抽出する試薬；
- 前記無核血液細胞から抽出された前記核酸から、前記疾患特異的マーカー、例えば被験者の有核細胞の遺伝子の疾患特異的変異又は前記被験者の有核細胞からの疾患特異的発現プロファイルを、例えば逆転酵素ポリメラーゼ連鎖反応増幅により、選択的に増幅するための試薬、及び
- 前記記載の本発明の方法を実施するための印刷又は電子的指示書を含む包装物を含み、前記キットがさらに：

10

20

30

40

50

- 前記疾患の参照値を含み、前記参照値は、前記無核血液細胞抽出核酸画分内の疾患マーカーの存在の指標である。

【0042】

本発明のキットの好ましい実施態様では、前記参照値は、健康なコントロール被験者、又は疾患を患うコントロール被験者の無核血液細胞中の前記疾患特異的変異を含む核酸のレベルについての参照値であり、又は前記参照値は、例えば健康なコントロール被験者の又は疾患を患うコントロール被験者からの無核血液細胞中の複数のmRNAの参照発現プロフィールである。

【0043】

本発明のキットの他の好ましい実施態様では、前記試薬又は指示書は、粒子又は蛍光マーカーラベル化抗無核血液細胞抗体（好ましくは、蛍光マーカーラベル化抗血小板抗体）、ビーズ系無核血液細胞分離（好ましくは血小板）の指示書、無核血液細胞（好ましくは血小板）のFACS選別の指示書、遠心分離、又は非無核血液細胞成分（好ましくは非血小板成分）の負選別により回収された無核血液細胞（好ましくは血小板）のための指示書から選択される。

【0044】

なお他の側面で、本発明は、疾患治療の装置を提供し、前記装置は、支持体及び前記被験者の無核血液細胞サンプル内の少なくとも1つの核酸変異のレベル及び/又は活性を特異的に決定するための少なくとも1つの試薬を含み、前記試薬は前記支持体に結合され、及び前記本発明の方法を実施するためのコンピュータ実行可能命令を持つコンピュータ読取可能な媒体を含む。

【0045】

本発明による装置の好ましい実施態様では、前記少なくとも1つの試薬がオリゴヌクレオチドプローブ又は配列分析プライマーである。

【0046】

本発明による装置の好ましい実施態様では、前記装置は、無核血液細胞抽出核酸と少なくとも1つの核酸変異特異的増幅プライマー又はオリゴマープローブとの核酸ハイブリダイゼーション反応又は、疾患特異的遺伝子発現プロフィールを提供するため、無核血液細胞抽出核酸と複数の遺伝子特異的増幅プライマー又はオリゴマープローブとの核酸ハイブリダイゼーション反応を実施するための、側方流動装置、ディップスティック又はカートリッジを含む。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】図1は、Agilent Bioanalyzer Picochip (Agilent Technologies, Inc.) を用いて行った分析されたRNAプロフィールを表し、X軸はRNA長さ（ヌクレオチド数）、Y軸はRNA量（蛍光単位）を表す。ここで、血液血清画分内のマイクロベシクルから得られるRNA（A）、血液血漿画分内のマイクロベシクルから得られるRNA（B）又は血小板から得られるRNA（C）である。ここから、（1）RNAが、血清、血漿及び血小板中のマイクロベシクル中に存在すること、（2）血漿サンプルから分離されたマイクロベシクルよりも血清から分離されたマイクロベシクルの方が少ないこと、（3）血漿サンプルから分離された血小板が種々のサイズのRNAを含み、比較的長いRNA鎖（200ヌクレオチド（nt）を超え、及びさらに1000ヌクレオチドを超える）の重要な画分を含むこと、が分かる。

【図2】図2は、脳腫瘍を持つ患者からの血小板中で見出された腫瘍由来遺伝子物質の発見を表す。患者（P1 - P4）からの血液サンプル（全血液チューブ（血清（S））及び抗凝固剤EDTA血液（血漿（P））が採取された。血漿チューブから、血小板（T）が遠心分離手順で回収された。コントロールとして、血小板が健康者（C1 - 6）から採取された。ある患者は血清サンプルがなく、図2ではXで示されており、かつある患者は保存血清及び血漿でありこれらは図2でSPで示されている。RNA検出のためにネステッドPCRを用いて、前記変異EGFRvIII（V3）が、15人の内4人（27%）（

10

20

30

40

50

P 4、P 5、P 9、P 10) の膠芽細胞腫の患者の血小板中に検出できた。この結果は、変異 E G F R v I I I は高悪性度神経膠腫の 20% で見出されたという刊行文献値と一致する (L i u e t a l . 2 0 0 5) 。これらの実験は、血小板は、腫瘍由来の核酸の識別により癌の診断のためのバイオマーカー源として使用できることを証明する。

【図 3 A】図 3 A は、U 8 7 神経膠腫由来のマイクロベシクルが、P K H 6 7 緑色蛍光色素でラベル化され、分離された血小板とインキュベートされた結果を示す。マイクロベシクルの存在及び不存在下で 1 5 分及び 6 0 分インキュベートした後、血小板を洗浄し、P K H 6 7 蛍光の F A C S 分析を行った。加えて、前記血小板を染色して、共焦点顕微鏡で分析してマイクロベシクル取り込みを決定した。異なる条件下でマイクロベシクルとインキュベート後、R N アーゼ処理血小板から R N A を単離した。R T - P C R を実施して、E G F R v I I I R N A を検出した。M V / M V E G F R v I I I : U 8 7 / U 8 7 - E G F R v I I I 細胞から単離されたマイクロベシクル。

【図 3 B】図 3 B は、R N A を健康被験者又は神経膠腫患者から血小板を単離し、R T - P C R 分析した結果を示す。対応する神経膠腫組織生検がコントロールとされた。P C = U 8 7 - E G F R v I I I R N A ; N C = H 2 O ; n d = 検出されず ; 「 * 」はポジティブシグナルを示す。

【図 3 C】図 3 C は、図 3 B での R N A を遺伝子発現アレイ分析した結果を示す。上部 30 の神経膠腫バイオマーカーのヒートマップが左に示される。上部 10 の R N A についての個別の発現レベルが右に示される。

【図 4】図 4 は、健康被験者 (n = 8) 及び前立腺癌患者 (n = 1 2) からの血小板から単離された R N A の、P C A 3、P S A 及び G A P D H - P C R 分析を行った結果を示す。

【図 5】図 5 は、図 3 C で表された遺伝子の検出のために使用されたプローブ配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0048】

ここで使用される用語「癌」は、発癌形質転換細胞の増殖による疾患又は障害を意味する。「癌」は、広い範囲の悪性または良性腫瘍の全てを含み、例えばリンパ系や血液流を介して人又は動物の体又はその一部へ侵襲的成長し転移し得るものである。ここで使用される用語「腫瘍」は、悪性かつ良性の腫瘍又は固体成長物を含むが、本発明は特に悪性腫瘍及び固体成長物の診断又は検出に向けられる。癌はさらに、限定されるものではないが、例えば卵巣癌、大腸癌、乳癌、膵臓癌、肺癌、前立腺癌、尿路癌、子宮癌、肺の急性リンパ性白血病、ホジキン病、小細胞癌、悪性黒色腫、神経芽細胞腫、神経膠腫 (例えば神経膠芽腫) などの、癌腫、リンパ腫又は肉腫、及び軟部組織肉腫、リンパ腫、黒色腫、肉腫及び腺癌が含まれる。本発明の側面の好ましい実施態様では、血小板癌が除かれている。

【0049】

ここで使用される用語「癌由来」とは、癌又はがん細胞から由来することを意味する。

【0050】

用語「癌由来核酸」とは、被験者の癌を指示する全ての核酸を意味し、特に最も好ましい実施態様では、被験者の癌細胞に発現されるか存在する変異遺伝子の癌が存在することを示す、健康な被験者の正常遺伝子に対して核酸配列が変異している変異 D N A や R N A を意味する。用語「癌由来核酸」はまた、(i) 癌細胞で産生されるか、発現されるか又は存在するが、正常な健康 (非癌性) 細胞ではそうではない核酸、又はその産生又は発現が、正常細胞に比較して癌細胞により又は癌細胞中で変更 (増加又は現象) されている核酸 ; 又は (i i) 正常細胞で産生され、発現され存在するが、癌細胞ではそうではない核酸を含むものである。従って、前記核酸は、変異配列を持つ変異核酸である必要はないが、野生型 (非癌) 配列を持つ正常な核酸であるが、その発現プロファイル又はレベルが、正常細胞に比較して癌細胞で変更されている核酸でもよい。好ましい実施態様では、前記癌由来核酸は、癌に特異的な変異核酸 (D N A、c D N A 又は R N A) であり、好ましくは

10

20

30

40

50

R N A 転写物である。他の非常に好ましい実施態様では、前記癌由来核酸は、癌由来又は癌特異的であることを示す核酸発現プロフィールであり、ここで詳細に説明される。

【0051】

ここで使用される用語「癌マーカー」とは、特に癌マーカー遺伝子又は癌マーカー遺伝子発現プロフィールを意味する。ここで使用される用語「癌マーカー遺伝子」とは、その配列又は発現レベルが、それ自体又は他の遺伝子と組み合わせて、癌又は癌の予後に関連する遺伝子を意味する。前記関連は、前記血小板から得られ得る核酸画分の前記遺伝子の発現産物の発現の増加又は減少に影響される遺伝子の増加又は減少発現のいずれかに関連し得る。例えば、前記遺伝子発現は、癌の指標となり得るし、又は遺伝子の発現の欠如は癌患者の望ましくない予後と関連し得る。前立腺癌の場合には、A M A C R、P A C 3 及び P S A が適切な癌マーカーである。大腸癌の場合には、K R A S 変異が適切な癌マーカーである。肺癌の場合には、E G F R 変異が適切な癌マーカーである。黒色腫の場合には、B R A F 変異が適切な癌マーカーである。神経膠腫の場合には、E G F R v I I I 変異が適切な癌マーカーである。他の適切な癌マーカーは、表1及び表2から得られ、以下実施例又は図に与えられる。当業者は、多くの他の癌マーカーが本発明の側面及び実施例において適用され得ることを理解する。

10

【0052】

ここで使用される「癌の段階」とは、癌の進展のレベルを定性的又は定量的に評価することを意味する。癌の段階を決定するために使用される基準は、限定されるものではないが、腫瘍のサイズ、体の他の部分に広がっているかどうか、及び癌が拡がる位置（例えば、体の同じ器官内か、他の器官か）を含む。

20

【0053】

用語「癌由来」、「癌マーカー」、「癌マーカー遺伝子」及び/又は「癌の段階」で使用される「癌」は、癌の定義が一般的にここで示す全ての疾患に適用され得るとして、用語「疾患」として一般化され得る。

【0054】

ここで使用される用語「疾患由来」とは、疾患又は疾患細胞から由来することを意味する。

【0055】

用語「疾患由来核酸」とは、被験者の疾患を示す全ての核酸を意味し、特にかつ最も好ましい実施態様では、被験者の疾患細胞で発現又は存在する変異遺伝子の疾患の存在を示す変異D N A 又はR N A であり、その変異遺伝子の核酸配列が健康コントロール被験者の正常遺伝子に対して変異している。用語「疾患由来核酸」はまた、(i) 疾患細胞で産生されるか、発現されるか又は存在するが、正常な健康（非疾患性）細胞ではそうではない核酸、又はその産生又は発現が、正常細胞に比較して疾患細胞により又は疾患細胞中で変更（増加又は現象）されている核酸；又は(i i) 正常細胞で産生され、発現され存在するが、疾患細胞ではそうではない核酸を含むものである。従って、前記核酸は、変異配列を持つ変異核酸である必要はないが、野生型（非癌）配列を持つ正常な核酸であるが、その発現プロフィール又はレベルが、正常細胞に比較して疾患細胞で変更されている核酸でもよい。好ましい実施態様では、前記疾患由来核酸は、疾患に特異的な変異核酸（D N A、c D N A 又はR N A）であり、好ましくはR N A 転写物である。他の非常に好ましい実施態様では、前記疾患由来核酸は、疾患由来又は疾患特異的であることを示す核酸発現プロフィールであり、ここで詳細に説明される。

30

40

【0056】

ここで使用される用語「疾患マーカー」とは、特に疾患マーカー遺伝子又は疾患マーカー遺伝子発現プロフィールを意味する。ここで使用される用語「疾患マーカー遺伝子」とは、その配列又は発現レベルが、それ自体又は他の遺伝子と組み合わせて、疾患又は疾患の予後に関連する遺伝子を意味する。前記関連は、前記血小板から得られ得る核酸画分の前記遺伝子の発現産物の発現の増加又は減少に影響される遺伝子の増加又は減少発現のいずれかに関連し得る。例えば、前記遺伝子発現は、疾患の指標となり得るし、又は遺伝子の

50

発現の欠如は患者の望ましくない予後と関連し得る。

【 0 0 5 7 】

ここで使用される「疾患の段階」とは、疾患の進展のレベルを定性的又は定量的に評価することを意味する。疾患の段階を決定するために使用される基準は、限定されるものではないが、体の他の部分に広がっているかどうか、及び疾患が拡がる位置（例えば、体の同じ器官内か、他の器官か）を含む。

【 0 0 5 8 】

ここで使用される用語疾患は、癌、自己免疫疾患、皮膚疾患、眼疾患、内分泌疾患、神経疾患、及び心血管疾患を含む。

【 0 0 5 9 】

従って、癌に加えて、本発明の手段及び方法を用いて疾患、例えば以下の自己免疫疾患が検出され得る：無酸性自己免疫活動性慢性肝炎；急性散在性脳脊髄炎；急性出血性白質脳炎；アジソン病；無ガンマグロブリン血症；円形脱毛症；筋萎縮性側索硬化症；強直性脊椎炎；抗 - G B M / T B M 腎炎；抗リン脂質抗体症候群；抗シンセターゼ症候群；多関節リウマチ；アトピー性アレルギー；アトピー性皮膚炎；自己免疫性再生不良性貧血；自己免疫性心筋症；自己免疫性腸疾患；自己免疫性溶血性貧血；自己免疫性肝炎；自己免疫性内耳疾患；自己免疫性リンパ増殖症候群；自己免疫性末梢神経障害；自己免疫性膵炎；自己免疫多内分泌性症候群；自己免疫性プロゲステロン皮膚炎；自己免疫性血小板減少性紫斑病；自己免疫性ブドウ膜炎；パロ病 / パロ同心円硬化症；ベーチェット症候群；パーガ病；ピッカーstaff脳炎；ブラウ症候群；水疱性類天疱瘡；キャッスルマン病；セリアック病；シャーガス病；免疫不全症候群慢性疲労；慢性炎症性脱髄性多発神経障害；慢性再発性多発性骨髄炎；慢性ライム病；慢性閉塞性肺疾患；チャグ・ストラウス症候群；癩痕性類天疱瘡；セリアック病；コーガン症候群；寒冷凝集素症；補完コンポーネント 2 欠損症；頭蓋動脈炎；C R E S T 症候群；クローン病；クッシング症候群；皮膚白血球破碎性血管炎；デゴ病；有痛脂肪症；疱疹状皮膚炎；皮膚筋炎；糖尿病タイプ 1；拡散性皮膚全身性硬化症；ドレスラー症候群；円板状エリテマトーデス；湿疹；子宮内膜症；腱附着部炎関連関節炎；好酸球性筋膜炎；好酸球性胃腸炎；後天性表皮水疱症；結節性紅斑；本態性混合型クリオグロブリン血症；エヴァン症候群；進行性骨化性線維形成異常症；線維筋痛症 / 線維筋炎；線維化肺胞炎；胃炎；胃腸類天疱瘡；巨細胞性動脈炎；糸球体腎炎；グッドパスチャー症候群；パセドウ病；ギラン・バレー症候群；橋本脳炎；橋本甲状腺炎；溶血性貧血；ヘノッホ・シェーンライン紫斑病；妊娠性疱疹；汗腺膿瘍；ヒューズ症候群；低ガンマグロブリン血症；特発性炎症性脱髄性疾患；特発性肺線維症；特発性血小板減少性紫斑病；I g A 腎症；封入体筋炎；炎症性脱髄性多発症；間質性膀胱炎；過敏性腸症候群（I B S）；若年性特発性関節炎；若年性関節リウマチ；カワサキ病；ランバート - イートン筋無力症候群；白血球破碎性血管炎；扁平苔癬；萎縮性苔癬；リニア I g A 疾患；ルー・ゲーリック病；ルポイド肝炎；エリテマトーデス；マジード症候群；メニエール病；顕微鏡的多発；ミラーフィッシャー症候群；混合性結合組織病；強皮症；ミュシャ - ハーバerman病；マックル・ウェルズ症候群；多発性骨髄腫；多発性硬化症；重症筋無力症；筋炎；ナルコレプシー；視神経脊髄炎；過敏神経脊髄炎；眼球癩痕性類天疱瘡；オプソクローヌスミオクローヌス症候群；オールド甲状腺炎；回帰性リウマチ；P A N D A S；傍腫瘍性小脳変性症；発作性夜間血色素尿症；パリーロンベルグ症候群；パルソナジターナー症候群；扁平部炎；天疱瘡；尋常性天疱瘡；悪性貧血；静脈周囲脳脊髄炎；P O E M S 症候群；結節性多発動脈炎；リウマチ性多発筋痛；多発性筋炎；原発性胆汁性肝硬変；原発性硬化性胆管炎；進行性炎症性神経障害；乾癬；乾癬性関節炎；壊疽性膿皮症；赤芽球癬；ラスムッセン脳炎；レイノー現象；再発性多発性軟骨炎；ライター症候群；むずむず脚症候群；後腹膜線維症；関節リウマチ；リウマチ熱；サルコイドーシス；統合失調症；シュミット症候群；シュニッツラー症候群；強膜炎；強皮症；シェーグレン症候群；脊椎関節症；スティッキー血症候群；スチル症候群；スティッフ人症候群；亜急性細菌性心内膜炎（S B E）；スザク症候群；スウィート症候群；シデナム舞踏病；交感性眼炎；高安動脈炎；側頭動脈炎；トロサハント症候群；横断性脊髄炎；潰瘍性大腸炎；未分

10

20

30

40

50

化結合組織病；未分化脊椎関節症；血管炎；白斑；ウェゲナー肉芽腫症；ウィルソン症候群及びウスコット・アルドリッチ症候群が含まれる。

【0060】

前記疾患とは別に本発明の側面はまた、以下の皮膚疾患の予後及び診断に適用され得る：即ち、瘡様発疹；自己炎症症候群；慢性水疱；粘膜条件；皮膚付属器条件；先天異常；皮下脂肪条件；結合組織疾患（例えば、真皮線維と弾性組織の異常など）；皮膚および皮下増殖；皮膚炎（アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、湿疹、膿疱性皮膚炎、脂漏性皮膚炎を含む）；色素沈着の乱れ；薬疹；内分泌関連皮膚疾患；好酸球；表皮母斑；腫瘍；嚢胞；紅斑；遺伝性皮膚症；感染症関連皮膚病；苔癬様発疹、リンパ関連皮膚病；色素細胞性母斑および腫瘍（悪性黒色腫を含む）；単球とマクロファージ関連皮膚疾患；ムチン沈着症；神経皮膚；非感染性免疫不全関連皮膚病；栄養関連皮膚疾患；丘疹鱗屑性角質増殖（掌魚鱗癬）；妊娠関連皮膚疾患；掻痒；乾癬；好反応；反抗的掌蹠発疹；代謝異常起因蕁麻疹や血管性浮腫；物理的要因（電離放射線誘発を含む）に起因する血管関連皮膚疾患である。

10

【0061】

前記疾患とは別に、本発明の側面はまた、次の内分泌疾患の予後及び診断へ適用され得る：即ち、副腎疾患；グルコース恒常性障害；甲状腺疾患；カルシウム恒常性障害および代謝性骨疾患；垂体疾患；及び性ホルモン障害である。

【0062】

前記疾患とは別に、本発明の側面はまた、次の眼疾患の予後及び診断に適用される：即ち眼瞼、涙器系と軌道のH00 - H06障害；結膜のH10 - H13障害；強膜、角膜、虹彩、毛様体のH15 - H22障害；レンズのH25 - H28障害；脈絡膜と網膜のH30 - H36障害（H30網脈絡膜炎、脈絡膜のH31その他の障害、他に分類される疾患における脈絡膜疾患H32、H33網膜剥離や休憩、H34網膜血管閉塞、H35その他の網膜疾患、および他のグループに分類疾患におけるH36網膜疾患を含む）；H40 - H42緑内障；硝子体と地球のH43 - H45障害；視神経や視覚経路のH46 - H48障害；眼筋、両眼運動、宿泊施設や屈折のH49 - H52障害；H53 - H54、9視覚障害や失明、そして目や付属器のH55 - H59その他の疾患である。

20

【0063】

前記疾患とは別に、本発明の側面はまた、次の神経疾患の予後及び診断に適用される：即ち、圧覚喪失；後天的てんかん失語症；急性散在性脳脊髄炎；副腎白質ジストロフィー；脳梁欠損症；失認；アイカルディ症候群；アレキササンダー病；エイリアンハンド症候群；感覚体側逆転；アルパーズ病；片麻痺を交互；アルツハイマー病；筋萎縮性側索硬化症（運動ニューロン疾患を参照のこと）；無脳症；アンジェルマン症候群；血管腫症；無酸素症；失語症；失行；クモ膜嚢胞；くも膜炎；アーノルド・キアリ奇形；動静脈奇形；毛細血管拡張性運動失調症；注意欠陥多動性障害；聴覚処理障害；自律神経障害；背中の痛み；パッテン病；ペーチェット病；ベル麻痺；良性特発性眼瞼けいれん；良性頭蓋内圧亢進症；両側前頭多小脳回；ピンスワンガー病；眼瞼痙攣；プロッホサルズバーガー症候群；腕神経叢損傷；脳膿瘍；脳損傷；脳腫瘍；ブラウンセカール症候群；カナバン病；手根管症候群；カウザルギー；中枢性疼痛症候群；橋中心髄鞘崩壊；中心核ミオパシー；頭部の障害；脳動脈瘤；脳動脈硬化症；脳萎縮；脳性巨人症；脳性麻痺；脳血管炎；頸椎脊柱管狭窄症；シャルコー・マリー・トゥース病；キアリ奇形；舞蹈病；慢性疲労症候群；慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー（CIDP）；慢性疼痛；コフィンローリー症候群；昏睡；複合性局所疼痛症候群；圧迫性神経障害；先天性の顔面麻痺；大脳皮質基底核変性症；頭蓋動脈炎；頭蓋骨癒合症；クロイツフェルト・ヤコブ病；蓄積外傷疾患；クッシング症候群；巨細封入体病（CIBD）；サイトメガロウイルス感染症；ダンディ・ウォーカー症候群；ドーソン病；デモルシャ症候群；デジェリン・クルンプケ麻痺；デジェリン・ソッタス病；遅延睡眠相症候群；認知症；皮膚筋炎；発達統合運動障害；糖尿病性神経障害；びまん性硬化症；ドラベ症候群；自律神経障害；計算力障害；書字障害；ディスレクシア；ジストニア；エンブティセラ症候群；脳炎；脳ヘルニア；脳三叉神経領

30

40

50

域血管腫症；遺糞；癲癇；エルブ麻痺；紅；本態性振戦；ファブリー病；ファール症候群；失神；家族性痙性麻痺；熱性けいれん；フィッシャー症候群；フリードライヒ失調症；線維筋痛；ゴーシェ病；ゲルストマン症候群；巨細胞性動脈炎；巨細胞性封入体病；球様細胞白質萎縮症；異所性灰白質；ギラン・バレー症候群；H T L V - 1 関連脊髄症；ハレルフォルデン・スパッツ病；頭部外傷；頭痛；片側顔面けいれん；遺伝性痙性対麻痺；遺伝性多発神経炎性失調；耳帯状疱疹；帯状疱疹；平山症候群；全前脳症；ハンチントン病；水無脳症；水頭症；副腎皮質機能亢進症；低酸素症；免疫介在性脳脊髄炎；封入体筋炎；色素失調症；乳児フィタン酸蓄積症；乳児レフサム病；乳児痙攣；炎症性筋疾患；頭蓋内嚢胞；頭蓋内圧亢進；ジュベール症候群；カラク症候群；カーズ・セイヤー症候群；ケネディ病；キンスブルーン症候群；クリッペルフェイル症候群；クラッペ病；クーゲルパーグ・ウェランダー病；クーラー；ラフォラ病；ランベルト・イトン筋無力症候群；ランダウクレフナ症候群；横延髄（ウォレンバーグ）症候群；学習障害；リー病；レノックス・ガストー症候群；レッシュ・ナイハン症候群；染性白質ジストロフィー；レビー小体型認知症；滑脳症；ロックイン症候群；ルー・ゲーリック病（運動ニューロン疾患を参照）；腰椎椎間板疾患；腰部脊柱管狭窄症；ライム病 - 神経学的後遺症；マシャド・ジョセフ病（脊髄小脳失調症3型）；大脳症；巨視；巨大脳髄症；メルカーソン・ローゼンタール症候群；メニエール病；髄膜炎；メンケス病；異染性白質ジストロフィー；小頭症；小視症；片頭痛；フィッシャー症候群；ミニ脳卒中（一過性脳虚血発作）；ミトコンドリアミオパチー；メビウス症候群；単肢の筋萎縮症；運動ニューロン疾患；運動技能障害；もやもや病；ムコ多糖；多発梗塞性認知症；多巣性運動ニューロパチー；多発性硬化症；多系統萎縮症；筋ジストロフィー；筋痛性脳脊髄炎；重症筋無力症；ミエリン碎屑性びまん性硬化症；乳児のミオクロニー脳症；ミオクローヌス；ミオパシー；筋細管性ミオパチー；先天性筋強直症；ナルコレプシー；神経線維腫症；悪性症候群；エイズの神経症状；ループスの神経学的後遺症；神経性筋緊張病；神経セロイドリポフスチン症；神経移動障害；ニーマンピック病；非24時間睡眠・覚醒症候群；非言語的学習障害；オサリバン・マクラウド症候群；後頭神経痛；オカルト脊髄癒合不全配列；大田原症候群；オリブ橋小脳萎縮症；オプソクローヌスミオクローヌス症候群；視神経炎；起立性低血圧；使い過ぎ症候群；反復視；感覚異常；パーキンソン病；先天性パラミオトニア；腫瘍随伴性疾患；発作性の攻撃；パリー・ロンベルグ症候群；ペリツェウス・メルツバッチャー病；定期的なParalysis；末梢神経障害；遷延性植物状態；広汎性発達障害；光くしゃみ反射；フィタン酸蓄積症；ピック病；はさまれた神経；下垂体腫瘍；PMG；ポリオ；多小脳回；多発性筋炎；孔脳症；ポストポリオ症候群；帯状疱疹後神経痛（PHN）；感染後脳脊髄炎；起立性低血圧；プラダー・ウィリー症候群；原発性側索硬化症；プリオン病；プログレッシブ片側顔面萎縮症；進行性多巣性白質脳症；進行性核上性麻痺；偽脳腫瘍；狂犬病；ラムゼイ・ハント症候群（タイプI、タイプII）；ラスムッセン脳炎；反射神経血管ジストロフィー；レフサム病；反復運動障害；反復性のストレス障害；むずむず脚症候群；レトロウイルス関連脊髄症；レット症候群；ライ症候群；リズムカルな運動障害；ロンベルグ症候群；舞蹈病；サンドホフ病；統合失調症；シルダー病；裂脳症；感覚統合機能不全；セプト光学異形成；揺さぶられっ子症候群；帯状疱疹；シャイ・ドレーガー症候群；シェーグレン症候群；睡眠時無呼吸；睡眠病；スナチテーション；ソトス症候群；痙性；二分脊椎；脊髄損傷；脊髄腫瘍；脊髄性筋萎縮症；脊髄小脳失調症；ステイール・リチャードソン・オルシェフスキー症候群；スティッフパーソン症候群；ストローク；スタージ・ウェーバー症候群；亜急性硬化性全脳炎、皮質下動脈硬化性脳症；表面的な鉄沈着症；シデナム舞蹈病；失神；共感覚；脊髄空洞症；足根管症候群；遅発性ジスキネジア；タルロフ嚢胞；テイ・サックス病；側頭動脈炎；破傷風；係留脊髄症候群；トムセン病；胸郭出口症候群；疼痛性チック；トッド麻痺；トゥレット症候群；中毒性脳症；一過性脳虚血発作；伝達性海綿状脳症；横断性脊髄炎；外傷性脳損傷；振戦；三叉神経痛；熱帯性痙性対麻痺；トリパノソーマ症；結節性硬化症；フォン・ヒッペル・リンドウ病；ピリウスキ脳脊髄炎；パレンベリー症候群；ウェルドニヒ・ホフマン病；ウェスト症候群；むち打ち症；ウィリアムズ症候群；ウィルソン病及びゼルウィガー症候群である。

10

20

30

40

50

【0064】

前記疾患とは別に、本発明の側面はまた、次の心血管疾患の予後及び診断に適用される：即ち、動脈瘤；心症；脈硬化；卒中（脳卒中）；血管疾患；うっ血性心不全；冠動脈疾患；心筋梗塞（心臓発作）；及び末梢血管疾患である。

【0065】

ここで使用される「核酸」は、一本鎖又は二本鎖形状のいずれかのデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドポリマーを意味し、特に記載されない限り、天然ヌクレオチドと類似の方法で一本鎖核酸とハイブリダイズする天然ヌクレオチドの本質的性質を持つ知られた類似体（例えばタンパク質核酸）を含む。

【0066】

用語「RNA」は、リボ核酸を意味し、RNA分子はタンパク質生成物をコード化するか、タンパク質生成物をコードしない（例えばmiRNAであるが、その他のノンコードRNA）を除外しない。RNAはDNAテンプレートから転写される。

【0067】

ここで使用される「変異」とは、天然の野生型コード配列の変異の結果得られる核酸化合物、タンパク質、分子、ベクター又は細胞又はそのサブユニットである。

【0068】

ここで使用される用語「変異」とは、天然のコーディング配列を、置換、付加、ケッチス、挿入、クロスリンク又はその他の天然コーディング配列の1以上のヌクレオチドを破壊又は置換して変更させる全ての変化を意味し、天然に起こるスプライス変異体を含む。特に、前記変異は、前記細胞が癌細胞にする遺伝子を与える。かかる変異は、腫瘍抑制遺伝子及び/又は癌遺伝子の継承されたか獲得された変異を含む。

【0069】

「増幅」とは、テンプレートとして少なくとも1つの核酸配列を用いて核酸配列に相補的な複数の核酸開裂又はコピーを構成することを意味する。

増幅システムには、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）システム、リガーゼ連鎖反応（LCR）システム、核酸配列に基づく増幅（NASBA、Cangene、Mississauga、Ontario）、Qベータレプリカーゼシステム、転写に基づく増幅システム（TAS）及び鎖置換増幅システムが含まれる。例えば、「診断分子微生物 原理及び応用、D. H. Persing et al., Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1993)」を参照すること。増幅産物はアンプリコンとされる。

【0070】

用語「ハイブリッド」は、相補的核酸間で水素結合で形成された二本鎖核酸分子、又はデュプレックスを意味する。用語「ハイブリダイズ」又は「アニール」は、一本鎖核酸配列が、相補的核酸との間で水素結合により二本鎖螺旋部分を形成することを意味する。

【0071】

用語「オリゴヌクレオチド」とは、リン酸結合（例えばリン酸ジエステル、アルキル及びアリールリン酸エステル、チオリン酸エステル）したヌクレオチドの短い配列（通常は6から100ヌクレオチド）又は非リン酸結合（例えばペプチド、スルファミン酸塩など）を意味する。オリゴヌクレオチドは、変性塩基（例えば5-メチルシトシン）、及び変性糖基（例えば、2'-O-メチルリボシル、2'-O-メトキシメチルリノシル、2'-フルオロリボシル、2'-アミノリボシルなど）を含み得る。オリゴヌクレオチドは、天然由来又は合成分子であってよく、二本鎖及び一本鎖DNA及び二本鎖-及び一本鎖-RNAであってよく、さらに環状、分岐又は直鎖状の、及び場合により安定な二次構造を形成するドメイン（例えば、ステム-ループ及びループ-ステム-ループ構造）を含んでいてよい。

【0072】

ここで使用される用語「プライマー」とは、オリゴヌクレオチドを意味し、これは核酸鎖に相補的なプライマー伸長反応生成物が誘導される条件、即ち、ヌクレオチドとDNA

10

20

30

40

50

、ポリメラーゼなどのポリメラーゼ反応の試薬の存在及び適切な温度とpHの下で増幅ターゲットとアニーリングでき、DNAポリメラーゼがそれにより結合されてDNA合成に開始点として作用する。前記(増幅)プライマーは、好ましくは、増幅の最大効率のための好ましい単鎖である。好ましくは、前記プライマーは、オリゴデオキシリボヌクレオチドである。前記プライマーは、ポリメラーゼ反応のための試薬の存在下で伸長生成物の合成を起こす十分な長さであるべきである。前記プライマーの正確な長さは、多くの因子に依存し、例えば温度やプライマー源である。ここで使用される用語「1対の二方向プライマー」とは、PCR増幅などのDNA、増幅の技術分野で共通に使用されている前方及び後方プライマーを意味する。

【0073】

前記用語「プローブ」は、ターゲット核酸配列分析物又はそのcDNA誘導体の相補的配列を認識し水素結合を形成し得る一本鎖オリゴヌクレオチド配列を意味する。

【0074】

用語「ストリンジェント」又は「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、ハイブリッドの安定性に影響を与えるハイブリダイゼーション条件を意味し、例えば温度、塩濃度、pH、ホルムアミド濃度などである。これらの条件は、ターゲット核酸とプライマー又はプローブとの特異的結合を最大化し、非特異的結合を最小化するように経験的に最適化される。前記使用される用語は、プローブ又はプライマーが他の配列よりもより検出可能な程度にそのターゲット核酸とハイブリダイズする条件をも意味する。ストリンジェント条件は、配列に依存し、状況により異なる。より長い配列ほどより高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジェント条件は、既定のイオン強度及びpHで前記特定の配列の熱融解温度(T_m)よりも5℃低く選択される。前記 T_m は、50%の相補的ターゲット配列が完全にマッチしたプローブ又はプライマーとハイブリダイズする温度(所定にイオン強度及びpHで)である。通常は、ストリンジェント条件は、前記塩濃度は約1.0Mの Na^+ イオン未満、通常は約0.01から1.0Mの Na^+ イオン濃度(又は他の塩)、pHが7.0から8.3、温度が少なくとも1つの短いプローブ又はプライマー(例えば10から50ヌクレオチド)については30℃、長いプローブ又はプライマー(例えば50以上のヌクレオチド)については60℃である。ストリンジェント条件はまた、ホルムアミドなどの脱安定化剤の添加により達成され得る。例示的な弱ストリンジェント条件、又は「低減ストリンジェント条件」は、37℃で、30%ホルムアミド、1Mの $NaCl$ 、1%のSDS中でのハイブリダイゼーション及び40℃で2xSSC洗浄を含む。例示的高ストリンジェント条件は、37℃で50%のホルムアミド、1Mの $NaCl$ 、1%SDS中でハイブリダイゼーション、及び60℃で0.1xSSC洗浄を含む。ハイブリダイゼーション手順は、当該技術でよく知られており、例えばAusubelらの「Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons Inc.、1994」に記載されている。

【0075】

ここで使用される「被験者」とは、限定されるものではないが、例えば人を含む哺乳類、非人霊長類、マウス、豚、ウシ、ヤギ、ネコ、ウサギ、ラット、モルモット、ハムスター、デグー、ウマ、サル、ヒツジ又はその他の非人哺乳類；及び、例えばトリ(例えばニワトリ、アヒルなど)、魚及び無脊椎動物などの非哺乳無脊椎動物を含む非哺乳動物を含む。前記被験者は、定期的に十分検査を受けている健康な動物や人被験者であり得る。又は、前記被験者は、疾患を持つ危険があり得る(例えば遺伝的素因を有する被験者、癌の医学的及び/又は家族履歴を持つ被験者、発癌物質、職業的危険性、環境的危険性に暴露されたことのある被験者)、及び/又は疾患が疑われる臨床的兆候を表す被験者(例えば、排便での出血や血便、原因不明の痛み、発汗、原因不明の発熱、拒食症までの原因不明の体重損失、排便習慣の変化(便秘及び/又は下痢)、しぶり(具体的には直腸癌の不完全な排便感)、貧血及び/又は一般的衰弱)であり得る。他の実施態様によると、前記被験者は、疾患が診断され、治療の間に定期的検診を実施する患者であり得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 6 】

ここで使用される用語「血小板」は、血液血小板を意味し、即ち、小さな、不規則形状細胞断片はDNAを含む核を持たず、哺乳類の血液中を循環する。血小板は、直径が2 - 3 μmであり、巨核球前駆体の断片から誘導される。血小板の平均寿命は5から9日であり、血栓の形成につながる止血において重要な役割を果たしている。

【 0 0 7 7 】

ここで使用される用語「血液」は、全血液（血清及び血漿を含む）を含み、及び動脈、毛細血管及び静脈血を含む。ここで使用される用語「有核細胞」とは好ましくは、バルトリン腺細胞；唾液腺粘液細胞；唾液腺漿液細胞；・フォンエブナー腺細胞；乳腺細胞；涙腺細胞；セルミノウス腺細胞；エクリン汗腺細胞；アボクリン汗腺細胞；モル腺細胞；皮脂腺細胞；ポウマン腺細胞；ブルナー腺細胞；精嚢細胞；前立腺細胞；尿道球腺細胞；リトレ腺細胞；子宮内膜細胞；孤立杯細胞；胃の粘膜粘液細胞；胃腺酵素原細胞；胃腺酸分泌細胞；膵臓腺房細胞；パネート細胞；II型肺細胞；クララ細胞；下垂体前葉細胞；中間下垂体細胞；大細胞神経分泌細胞；甲状腺細胞；副甲状腺細胞；副腎細胞；ライディッヒ細胞；内莢膜細胞；黄体細胞；傍系球体細胞；緻密斑細胞；極周囲の細胞；メサングウム細胞；血管とリンパ管の有窓血管内皮細胞；血管やリンパ管、血管内皮細胞の連続；血管とリンパ管血管内皮脾細胞；漿膜細胞；扁平上皮癌；円柱細胞；ダーク細胞；前庭膜細胞；血管条基底細胞；血管条辺縁細胞；クラウディオウス細胞；ベッチャー細胞；脈絡叢細胞；ピアアラカノイド膜扁平上皮；着色毛様体上皮細胞；無色素毛様体上皮細胞；角膜内皮細胞；ペグ細胞；気道繊毛細胞；繊毛細胞を卵管；子宮内膜繊毛細胞；網は繊毛細胞を精巢；小管は繊毛細胞；上衣細胞繊毛；表皮角化細胞；表皮基底細胞；ケラチノサイト；髄質毛幹細胞；床基底細胞ネイル；皮質の毛幹細胞；クチクラ毛幹細胞；クチクラ毛根鞘細胞；外部毛根鞘細胞；毛母細胞；表面上皮細胞、基底細胞；尿上皮細胞；聴覚内有毛細胞；聴覚外有毛細胞；一次感覚ニューロン；メルケル細胞；嗅覚受容ニューロン；視細胞；頸動脈小体細胞（血液のpHセンサー）；有毛細胞；味蕾細胞；コリン作動性神経細胞；アドレナリン作動性神経細胞；ペプチド性神経細胞；内柱細胞；外柱細胞；内側支持細胞；外側支持細胞；ポルダー細胞；ヘンゼン細胞；前庭器支持細胞；味蕾支持細胞；嗅上皮支持細胞；シュワン細胞；衛星細胞；腸溶性グリア細胞；星状膠細胞；ニューロン細胞；オリゴデンドロサイト；スピンドルニューロン；前部水晶体上皮細胞；クリスタリン含有水晶体線維細胞；肝細胞；脂肪細胞；肝脂肪細胞；腎臓系球体の壁細胞；腎臓系球体足細胞；腎臓近位尿細管刷子縁細胞；ヘンレ薄セグメントループ細胞；腎臓遠位尿細管細胞；腎集合管細胞；肺細胞；膵管細胞；無筋ダクト細胞；ダクト細胞；腸刷子縁細胞；外分泌腺線条導管細胞；胆嚢上皮細胞；精巢輸出非線毛性細胞；精巢上体主細胞；精巢上体の基底細胞；エナメル芽細胞；上皮細胞；半月面上皮細胞；コルティ歯間上皮細胞の器官；疎性結合組織の線維芽細胞；角膜線維芽細胞；腱線維芽細胞；骨髓細網組織の線維芽細胞；その他の非上皮性線維芽細胞；周皮細胞；髄核細胞；セメント芽細胞／セメント芽細胞；象牙芽細胞／象牙細胞；軟骨硝子軟骨；軟骨細胞線維軟骨；弾性軟骨軟骨細胞；骨芽細胞／骨細胞；骨前駆細胞；硝子体細胞；星細胞；肝星細胞；膵臓ステラ細胞；骨格筋細胞；衛星細胞；心筋細胞；平滑筋細胞；筋上皮細胞；巨核球；単球；結合組織マクロファージ；表皮ランゲルハンス細胞；破骨細胞；樹状細胞；ミクログリア細胞；好中球顆粒球；好酸球顆粒球；好塩基性顆粒球；マスト細胞；ヘルパーT細胞；サブレッサーT細胞；細胞傷害性T細胞；ナチュラルキラーT細胞；B細胞；ナチュラルキラー細胞；網状赤血球；メラニン細胞；網膜色素上皮細胞；卵原細胞／卵母細胞；精子細胞；精母細胞；精原細胞；精子；卵胞細胞；セルトリ細胞；胸腺上皮細胞及び間質性腎細胞を含む。

【 0 0 7 8 】

目的とされる治療及び個別薬物は、疾患プロフィール及びそれに伴う診断に大きく依存する。疾患由来核酸の変異は目標とされる治療に応じて高い予兆となり得る。しかし、高品質の核酸への容易なアクセスを得ることは、重要な開発へのハードルとなっている。血液は一般的には、150000から350000個／マイクロリットルの血小板細胞（血小板）を持ち、研究及び臨床での使用に高い利用可能性を提供する。さらに、血小板分離は

10

20

30

40

50

比較的単純であり、血液バンク/血液学実験室での標準手順である。血小板は核を含まないので、そのRNA転写物-機能維持のために必要-が、血小板産生の際に骨髓巨核球から誘導される。血小板は、種々の転写機構を介して循環する際にRNA転写物を取り込み得ることが見出されている。腫瘍細胞は、遺伝子物質の豊富な収集物を放出し、これらは変異RNA転写物の形でマイクロベシクルにより分泌される。血液流の循環の際に、血小板は癌細胞及びその他の疾患細胞により分泌される物質を吸収することから、前記個別化医療の点から、癌及び他の疾患の比較診断のための興味惹かれる土台を提供するものである。

【0079】

以下の例では、健康なヒトのコントロール被験者から分離された血小板が、ヒト脳腫瘍細胞(神経膠腫)から誘導されるRNA-含有マイクロベシクルから、さらに、それは腫瘍に関連するRNAであって例えば神経膠腫では変異EDFRvIIImRNAを含むマイクロベシクルからRNAを取り込むことができる、ということを示している。従って、神経膠腫から分離される循環血小板がRNAバイオマーカ-を含むことが決定された。RT-PCRを用いて、血小板に見出された変異EDFRvIIImRNAが神経膠腫組織の存在を反映することが確立された。

10

【0080】

腫瘍マ-カ-メッセージの存在は、神経膠腫患者からの血小板に特有ではなく、より広い範囲のここで同定された疾患に適用可能である。前立腺癌マ-カ-のPCA3及びPSAをコードするメッセンジャーRNAは、前立腺癌患者からの血小板に示され得る一方で、これらは健康なコントロール被験者からの血小板には存在しない。

20

【0081】

癌及びその他の疾患に伴う遺伝子変異の検出とは別に、本発明者はまた、遺伝子発現アレイが、特定のタイプ(固体腫瘍)の癌又は他の疾患を患う被験者のものとして、血小板核酸を分類するために使用し得ることを見出した。健康なコントロール被験者から分離された血小板から抽出された核酸、又は神経膠腫患者から分離された血小板から抽出された核酸から得られるmRNA発現プロファイルは個別に異なる、ということが確立された。識別されたmRNA発現プロファイルが得られ、最小の神経膠腫バイオマ-カ-特徴が検出され、これは図3Cでトップ-30として示されている。図3示されるように識別されるプロファイルは、次の遺伝子発現の有意な増加を含むみ：それらは、WFDC1、Kremen1、DEF4A、ARG1、FKBP5、ACRC、ENST0328043、A__32__P167111、MAP2、ECTL8、UNC13B、TP53I3、FDXR、BX119718、SORT1、PFN4、C1QTNF5、A__24__P237896、PGLYRP1、SEC14L2、BC018626、MAOB、TCN1、AMOTL1、TSP50、CD109、A__24__P927015、THC2325987、C18orf1、及びLIN28(これらの遺伝子名のいくつかは、マイクロアレイアクセション番号、例えばAgilentChipのオリゴヌクレオチドプローブの番号を意味する)である。理解されるべきことは、このプロファイルは本発明を限定するものではないということであり、なぜならば当業者は、他の癌及び他の疾患一般について本発明の方法を用いることで他の適切な遺伝子発現プロファイルを得る方法を知るのであるからである。

30

40

【0082】

本発明者は、血液血小板は癌マ-カ-及び疾患マ-カ-を、腫瘍由来又は腫瘍関連又は疾患関連核酸又は核酸発現プロファイルを含むこと、及びこれらの血小板は、ここで同定した癌及び他の疾患の分子プロファイルのための診断土台として作用し得る、ということを見出した。これは個別医療の点で非常に有用である。

【0083】

本発明は、新規で容易に使用できる、循環性疾患由来物質(例えばここで使用される疾患マ-カ-)を分離する方法を提供する。本発明者は、循環血小板から腫瘍由来RNAを分離し、純粋なRNAを得、それにより少量の血液から高品質のRNAを抽出する容易な

50

方法を提供する。血小板核酸 (N A) 分離及び続く分析により、血液中の循環 N A の診断精度の顕著な増加が示される。

【 0 0 8 4 】

本発明者は、疾患患者には、循環血小板は有意の量の疾患由来 R N A を含むことを見出した。この疾患由来 R N A をは疾患についての特異的な遺伝子情報を示し、疾患タイプ、疾患の程度及び多分前記疾患の治療処置に対する感受性をも決定するために使用され得る。血小板 R N A は、ここでは神経膠腫から由来する E G F R v I I I 変異 R N A について説明される特異的な疾患由来 R N A の存在について分析され得る。

【 0 0 8 5 】

本発明は、血液から抽出された血小板などの無核細胞内にある、疾患由来の有核細胞由来の特異的転写物を見出す方法を記載する。この方法は堅牢かつ容易である。この方法は、抽出 N A につき、迅速かつ直接的な手順及び品質に寄与する。臨床的設定内で、血小板抽出 (血液サンプルから) は、すでに一般的生物サンプル収集物で実施されており、従って、これを臨床で実施することは容易であることは予想できる。

10

【 0 0 8 6 】

本発明は疾患由来核酸の存在につき被験者の血液を分析する方法、及び前記方法を用いる、被験者の疾患を診断する方法を提供する。本発明の方法についてここで説明される際には、これらの両方の実施態様が説明されるものとする。

【 0 0 8 7 】

本発明の方法は、例えば血液を含む組織などの無核血液細胞を含む全ての体サンプルで実施され得るが、好ましくは前記サンプルは全血液である。

20

【 0 0 8 8 】

被験者の血液サンプルは、全ての標準方法、例えば静脈抽出で得られる。

【 0 0 8 9 】

必要な血液量は特に制限はない。使用する方法により、当業者は、本発明の種々のステップを実施し、遺伝子分析のための十分な N A を得るために必要なサンプル量を確認することができる。一般に、かかる量は、 $0.01 \mu\text{l}$ から 100ml の範囲の量を含む。

【 0 0 9 0 】

体サンプルは前記サンプル収集に続きすぐに分析され得る。又は、本発明による方法による分析は、保存無核血液細胞、好ましくは血小板の保存画分で実施され得る。試験のための体サンプル、又はその無核血液細胞の画分は、従来技術で知られる方法を用いて保存され得る。収集された無核血液細胞画分で、血小板は好ましくは不活性状態 (即ち、非活性状態) で維持される。この方法で、細胞の完全性と疾患由来核酸が最良に保存される。

30

【 0 0 9 1 】

前記無核血液細胞の画分が血小板の場合、血小板分離画分は好ましくは、貧血小板血漿又は多血小板血漿 (P R P) を含まない。さらに血小板の分離は最適解像度である。

【 0 0 9 2 】

体サンプルは、適切に処理されてもよく、例えば精製、消化又は特定の化合物を抽出するなどである。前記サンプル中の無核血液細胞内に存在する N A を特徴付ける方法、この方法は好ましくは R T - P C R を含む方法に依存して、無核血液細胞は当業者に知られる方法で前記サンプルから抽出され、そこから前記分析方法で必要とされる N A を抽出する適切な媒体へ移される。レシピエント被験者の体サンプルは、過剰核酸と分解酵素 (R N アーゼ、D N アーゼなど) は前記核酸の分解を防止するために除去され得る。

40

【 0 0 9 3 】

被験者の体サンプルからの血小板抽出は全ての可能な方法を含む。輸血医学では、血小板はしばしば血漿交換により収集され、この医学技術ではドナー又は患者の血液が、特定の成分を分離し残りを循環系に戻す装置を通過させるという技術である。個々の血液成分の分離は、特別製遠心分離装置で実施される。血小板交換 (血小板細胞交換とも呼ばれる) は血小板を収集するための交換手順である。現代的自動血小板交換では、血液ドナーはその血小板細胞の一部を与える一方で、その赤血球細胞と少なくとも血液血清の部分を

50

保持することができる。ここで交換により含まれる血漿細胞を含む体サンプルの提供は可能であるが、全血液を収集し、遠心分離によりそれから血小板画分を分離することがしばしばより容易である。一般に、そのような手順では、前記血小板細胞はまず、他の血液成分から、約 $120 \times g$ で約 20 分間、室温で遠心分離されて、多血小板血漿 (PRP) 画分が得られる。血小板細胞はその後洗浄 (例えば PBS - EDTA で) され血漿タンパク質を除去し血小板を濃縮する。洗浄ステップは一般に、 $850 - 1000 \times g$ で約 10 分間室温で行う。さらなる濃縮が実施されてより純粋な血小板画分を得る。

【0094】

血小板分離は通常は、抗凝固剤クエン酸デキストロース (例えば 36 ml クエン酸、 5 mmol/l の KCl、 90 mmol/l の NaCl、 5 mmol/l のグルコース、 10 mmol/l の EDTA、pH 6.8) を含むパキュテナーチューブ内の血液サンプル収集を含む。

10

【0095】

血小板収集の適切な手順は、Ferrettiらの「J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 2180 - 2184」に記載されている。この方法は、多血小板血漿 (PRP) を得るための予備的遠心分離ステップ (1300 rpm 、10 分間) を含む。その後血小板を3回、抗凝固緩衝液 (Tris - HCl、 10 mmol/l ; NaCl 150 mmol/l ; EDTA 1 mmol/l ; グルコース 5 mmol/l ; pH 7.4) で洗浄し、前記条件で遠心して、血漿タンパク質汚染を防止し、全ての残留血液細胞を除去する。最終的遠心は 4000 rpm で20分間行い、血小板分離を実施する。血小板ペレットは洗浄されてよい (例えば、リン酸緩衝生理的食塩水)。疾患マーカーレベルの定量的決定のために、血小板膜のタンパク質濃度が内部標準として使用され得る。かかるタンパク質濃度は、標準として血清アルブミンを用いる Bradford の方法による (Anal Biochem 1976; 72: 248 - 254)。

20

【0096】

前記被験者の体サンプルの提供、及びそれから前記無核血液細胞の抽出に続いて、被験者の無核血液細胞が疾患特異的核酸の存在をスクリーニングされる。疾患特異的核酸が前記無核血液細胞で見つかった場合、又は疾患特異的核酸が、前記無核血液細胞内で、コントロール被験者の影響を受けていない血液サンプルの無核欠系細胞で見出されるよりも高いレベルで見つかった場合、疾患特異的核酸が前記被験者の疾患細胞又は組織によるものであり、前記被験者はここで定義される疾患と診断される。

30

【0097】

疾患特異的核酸 (RNA 及び / 又は DNA 疾患マーカー) は、疾患細胞から由来すると定められ、この細胞は、前記疾患に伴う又は特異的な核酸配列の変異を含むか含まず、及びまた、健康なドナーからの無核血液細胞の核酸と比較してアップレギュレーション又はダウンレギュレーションされる疾患誘導無核血液細胞核酸を含む。ここで、用語「疾患特異的核酸」及び「疾患誘導核酸」は交換可能に使用される。理解されるべきことは、非変異遺伝子が同定され疾患診断に使用され得る、ということである。ある遺伝子はある疾患で過剰発現される場合、この核酸は無核血液細胞に転移され得る。しかし、これらの核酸はすでに健康な被験者の無核血液細胞に存在する場合には、かかる疾患の無核血液細胞中の核酸の複製の数の増加が予期できる。従って、無核血液細胞中のある遺伝子の複製の数の定量化 (定量化 PCR 又はマイクロアレイなどによる) は、かかる遺伝子の過剰発現する疾患の存在を検出するための本方法の側面の実施態様において有利である。

40

【0098】

本方法のさらなるステップは、無核血液細胞抽出核酸画分の提供である。かかる核酸画分は、続いてその中の疾患マーカーの検出のために使用される。無核血液細胞抽出核酸画分は、全ての利用可能な NA の抽出方法により得られる。通常は RNA 抽出は、カオトロピック試薬を用いて実施される。細胞又は組織から全 RNA を分離する第1ステップは、前記細胞を変性条件で破壊することである。1979年に Chirgwinらは、 0.1 M の 2 -メルカプトエタノールを含む強力なタンパク質変性グアニジウムチオシアネート

50

の4 M 溶液を用いてホモジナイズすることでタンパク質のジスルフィド結合を分解し、全RNAを効率的に分離する方法を見出した(Biochemistry、18[24]:5294-9、1979)。RNAはその後エタノールで抽出されるか、塩化セシウム超遠心分離により分離された。1987年にChomczynski及びSacchiは、この方法を修正し、グアニジンチオイソシアネート及フェノール-クロロホルムの混合物を用いて迅速な単一ステップ抽出手順を考案し、その方法は特に、多数のサンプルを処理するため、又は少量の細胞や組織からRNAを分離するために有用である(Analytical Biochemistry、162[1]:156-9、1987)。全ての市販されているキットもまたRNA抽出に使用でき、例えば制限されるものではないが、Ambion社のRNAqueous™ system、Bio101社のRNaid Plus kit、Bioline Ltd.社のRNAce kits、CLONTECH社のNucleoSpin(R) RNA I I及びNucleoTrap mRNA kits、Invitrogen Corp.社のS.N.A.P. Total RNA Isolation Kit及びQIAGEN社のRNeasy kitsが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0099】

抽出核酸サンプルの疾患誘導核酸の検出は、前記疾患について核酸配列変異又は核酸の発現プロファイルを検出するために適切な全ての遺伝子分析技術が利用可能である。通常は、かかる配列変異は、選択的核酸ハイブリダイゼーションで容易に検出され、これはお互いに一本鎖核酸配列との選択的ハイブリダイゼーションによる二本鎖核酸の形成を含む。選択的ハイブリダイゼーションとは、ストリンジェントな条件で、特定の核酸標的配列に対しての核酸配列のハイブリダイゼーションを意味し、非標的核酸配列とのハイブリダイゼーションよりも検出可能なより大きい程度又は非標的核酸を実質的に排除する程度のハイブリダイゼーションを意味する。選択的ハイブリダイゼーションは通常は、お互いに少なくとも80%配列同一、好ましくは90%配列同一、より好ましくは90%配列同一及び最も好ましくは100%配列同一(即ち相補的)を持つ。

【0100】

又は、疾患誘導核酸の検出は、DNA及びRNA配列決定の配列決定技術を通じて実施され得る。

【0101】

RNAの配列変異検出又はRNAの発現プロファイルの検出の場合、RNA内の配列変異又は発現量を検出する前に前記RNAをcDNAに転写することが好ましい。

【0102】

RNAは、RNA依存性DNA及びポリメラーゼ、例えばウイルス、レトロトランスポゾン、細菌などからの逆写酵素を用いてcDNAに逆転写され得る。これらは、RNAアーゼH活性を持ち得るか、又は逆転写酵素のRNAアーゼH活性が制限されるか又は存在しないように変異された逆転写酵素(例えばMMLV-RTRNAアーゼH-)が使用され得る。RNA依存性DNA及び合成(逆転写)はまた、変異や変性反応条件により変更された核酸依存性を示しそれによりRNA依存性DNAポリメラーゼ機能を獲得した酵素により実施され得る。市販キットが、RNAからcDNAへの逆転写に利用可能である。RNAからcDNAへ逆転写されると、前記DNA配列が分析されて癌特異的変異又は発現プロファイルの存在が、例えば前記の選択的核酸ハイブリダイゼーションにより検出され得る。かかる技術はこの技術分野でよく知られており、検出されるべき変異体に特異的な増幅プライマーを用いて選択的に増幅するか、mRNA特異的プローブを用いて核酸アレイに選択的にハイブリダイゼーションすることを含む。又は、一般的プライマーが、問題の変異を含むDNAを増幅するために使用され、前記変異はその後前記変異に特異的なプローブを用いて選択的核酸ハイブリダイゼーションによる増幅物中で検出され得る。発現プロファイルは一般には、この技術分野で知られる定量的ハイブリダイゼーション方法を用いて得られ、以下の実施例で図で説明される。

【0103】

本発明の方法は、全ての核酸増幅方法で実施され得るが、かかる方法には例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR；Mullis 1987、米国特許第4、683、195、4683202、及び800159号）又は増幅反応例えばリガーゼ連鎖反応（LCR；Barany 1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88：189-193；欧州特許出願第320308号）、自己保持配列増幅（3SR；Guatelliら、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87：1874-1878）、鎖転位増幅（SDA；米国特許第5270184及び545566号）、転写増幅システム（TAS；Kwohら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86：1173-1177）、Q-ベータレプリカーゼ（Lizardiら、1988、Bio/Technology 6：1197）、回転サークル増幅（RCA；米国特許第5871921g号）、核酸配列系増幅（NASBA）、開裂断片長多形（米国特許第5719028号）、等温及びキメラプライマー開始核酸増幅（ICAN）、分岐-延長増幅方法（RAM；米国特許第5719028及び942391）又はDNA増幅のための適切な方法、が含まれる。

【0104】

1以上の増幅プライマーへの少数のミスマッチを持つDNA増幅のために、増幅反応は、より緩いストリンジェント条件（例えば、38°Cのアニーリングを用いるPCR増幅が、3.5MのMgCl₂の存在下）で実施される。当業者は、適切なストリンジェント条件を選択することができる。

【0105】

ここでプライマーは、増幅されるそれぞれの特異的な配列の異なる鎖上のその標的領域に対して「実質的に」相補的（即ち、65%、より好ましくは少なくとも80%の相補性）であるように選択される。

例えばイノシトール残基又は不明瞭な塩基などを含むプライマー配列又は前記標的配列に比較して1以上のミスマッチを含むプライマー配列の使用も可能である。一般に、少なくとも65%、より好ましくは少なくとも80%の標的DNAオリゴヌクレオチド配列との同一性を示す配列が、本発明の方法での使用に適すると考えられる。配列ミスマッチはまた、低ストリンジェントハイブリダイゼーション条件を用いる場合には重要ではない。

【0106】

増幅産物の検出は原理的には、この技術分野で知られる全ての適切な方法であり得る。断片の検出は、直接染色する、又は放射性ラベル、抗体、発光色素、蛍光色素又は酵素試薬でラベル化され得る。直接DNAオリゴヌクレオチド染色は、例えば、アクリジンオレンジ、エチジウムピロミド、エチジウムモノアジド又はヘキスト色素などのインターカレーション色素を含む。

【0107】

又は、DNA断片は、ラベル化dNTP塩基を合成DNA断片に導入することで検出され得る。ヌクレオチド塩基に伴う検出ラベルは、例えばフルオレセイン、シアニン色素又はBrdUrdであり得る。

【0108】

プローブにより検出システムを用いる場合、本発明で使用するための適切な検出手順は、例えば、酵素免疫アッセイ（EIA）手順である（Jacobsら、1997、J. Clin. Microbiol. 35、791795）。EIA手順の方法で検出を実施するためには、増幅反応で使用する前方又は後方プライマーはキャプチャ基、例えばビオチン基を含む必要があり、これは続く標的DNA PCR増幅産物のEIA検出のために、標的DNA PCR増幅産物を例えばストレプトアビジンコーティングマイクロタイタープレート壁に固定する基を含み得る。当業者は、EIAする手順で、標的DNA PCR増幅産物を固定化するための他の基が使用され得ることを理解するであろう。

【0109】

ここで開示された標的DNAの検出のために有用なプローブは、好ましくは、前記DNA増幅手順で増幅されるDNA配列領域の少なくとも一部へ結合する。当業者が、ここで

10

20

30

40

50

設定されるように過度な実験を行うことなく標的DNAのヌクレオチド配列に基づき検出するための適切なプローブを調製し得る。また、前記標的DNAの相補配列は、この相補配列鎖が適用される増幅反応で増幅される場合には、本発明の方法で検出プローブとして適切に使用され得る。

【0110】

ここで使用される適切な検出手順は、前記増幅産物及の固定化及び例えばサザンプロットによるそのDNAの配列をプローブ化を含む。他の手順は、前記のEIAする手順を含み得る。結合の検出を容易にするために、前記プローブの増幅反応産生物との結合をモニターすることを容易にするために、特異的増幅産物検出プローブは、発光、着色、酵素又は放射性ラベルなどのラベル部分を有する。かかるラベルはこの技術分野の当業者にはよく知られており、例えば、フルオレセインイソシアシアネート(FITC)、 α -ガラクトシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ストレプトアビジン、ビオチン、ジゴキシゲニン、 35 S又は 125 Iが含まれる。他の例は、この技術分野の当業者にはよく知られている。

【0111】

検出はまた、所謂リバースラインプロット(RLB)アッセイにより実施され得る(Vanden Bruleら、(2002、J. Clin. Microbiol. 40、779787)。この目的のために、RLBプローブは好ましくは、続いて例えばカルボキシルコーティングナイロン膜に固定するために5'アミノ基を持つように合成される。RLBプローブ手順の利点は、そのシステムが簡単なこととその速度であり、従ってハイ
スルーットサンプル処理を可能にする。DNA断片の検出のための核酸プローブの使用は、この技術分野で知られている。ほとんどのこれらの手順は、標的DNAとプローブとのハイブリダイゼーションさらにその後の洗浄を含む。特異性は通常、ハイブリダイゼーション後の洗浄の機能であり、重要な因子は最終洗浄でのイオン強度と温度である。DNA-DNAハイブリッドでは、 T_m (熱融点、即ち、所定のイオン強度及び温度およびpHの下で、50%の相補的標的配列が完全にマッチするプローブにハイブリダイズする温度)は、Meinkoth及びWahl(Anal. Biochem.、138:267-284(1984))による次の式から近似され得る：

$$T_m = 81.5 + 16.6(\log M) + 0.41(\%C) - 0.6(\%ホルム) - 500/L;$$

ここでMは一価のカチオンのモル濃度、%GCはDNAの中のグアノシン及びシトシンヌクレオチドのパーセント、%ホルムはハイブリダイゼーション溶液中のホルムアミドのパーセント及びLは塩数でのハイブリッドの長さを示す。 T_m は約1 低くなる毎に、それぞれ1%のミスマッチとなり；従ってハイブリダイゼーション及び/又は洗浄条件は、望ましい同一性配列にハイブリダイズさせるように調節され得る。例えば、90%を超える同一性配列を探す場合には、 T_m は10 低減させることができる。一般的に、ストリンジェント条件は、所定のイオン強度及びpHで、特定の配列及びその相補鎖について、 T_m よりも約5 低く選択される。しかし、より厳しいストリンジェント条件では、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄を T_m よりも1、2、3又は4 低い温度で実施することができ；中程度のストリンジェント条件では、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄を
 T_m よりも6、7、8、9又は10 低い温度で実施することができ；弱いストリンジェント条件では、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄を T_m よりも11、12、13、14、15又は20 低い温度で実施することができる。前記式、ハイブリダイゼーション及び洗浄組成物、及び望ましい T_m を用いることで、当業者は、前記ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄の種々のストリンジェント性が説明されていることを理解するであろう。望ましい程度のミスマッチが、45 (水溶液)又は32 (ホルムアミド溶液)未満の T_m となる場合には、SSC濃度を上げてより高い温度が使用できるようにすることが好ましい。核酸のハイブリダイゼーションの広範なガイドは、「Tijssen、Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nu

10

20

30

40

50

cleic Acid Probes, Part I, Chapter 2 " Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays "、Elsevier, New York (1993); 及び Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2, Ausubel, et al., Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995)」である。

【0112】

検出プローブは好ましくは、本発明の方法で増幅反応により産生される二本鎖DNA増幅産物の一本鎖に「実質的に」相互的となるように選択される。好ましくは、前記プローブは、標的DNAから生成される増幅産物の固定化可能（例えばビオチンラベル化）なアンチセンス鎖に実質的に相補的である。

【0113】

これは検出プローブが標的配列と1以上のミスマッチを含むことを可能にする。一般に、少なくとも65%、より好ましくは少なくとも89%の標的イリゴヌクレオチド配列との相同性を示す配列は、本発明の方法で使用するために適切であると考えられる。

【0114】

疾患マーカーの存在についての無核血液細胞抽出核酸画分を分析するステップは、従って標準の核酸分析技術で実施され得る。前記核酸画分中の前記核酸マーカーのレベルの、影響を受けない血液サンプルに対しての変化があるかどうかの決定は、前記無核血液細胞中の疾患マーカーの量の定量的測定を含み得る。無核血液細胞から分離された核酸中の疾患特異的マーカーの検出のためのずっと好ましい手順は、従って定量的逆転写PCR (qRT-PCR) である (Freemanら、BioTechniques 26:112-125 (1999))。

【0115】

前記「影響を受けない血液サンプル」とは、健康なコントロール被験者又は疾患になる前の同じ被験者からの無核血液細胞中の疾患マーカーのレベルを意味する。無核血液細胞特徴及び無核血液細胞成分の量は、とりわけ、種および年齢に依存することから、非疾患コントロール無核血液細胞は同じ種、年齢の被験者及び同じサブ集団（例えば喫煙者/非喫煙者）からのものが好ましい。又は、コントロールデータは、データベース及び文献値から採用され得る。理解されるべきことは、コントロールサンプルとしてはまた、特定の時点での疾患被験者からも、疾患の進展を分析するために取得される、ということである。

【0116】

疾患マーカーは、癌/特定変異及び癌特異的変異を含み、癌に伴う知られる広い範囲の変異を含む。種々の癌の変異の例の非限定的例示は、<http://www.sanger.ac.uk/CGP/Census/> 及びこの表中に挙げられる。

【0117】

本発明はさらに、被験者の疾患を診断するためのキットを提供し、前記キットは、前記被験者の無核血液細胞中の少なくとも1つの核酸変異及び/又は核酸プロファイルを特異的に決定するための少なくとも1つの試薬を含む物資の包装物を含む。ここで使用される「診断」とは、疾患の存在、疾患の分類、疾患の程度の決定（程度又はステージ）、疾患の進展のモニター、疾患の結果及び/又は回復予想を意味する。

【0118】

理解されるべきことは、疾患誘導核酸を検出するために必要な機器がキットとして提供され得ることであり、例えばFDA承認済みキットであって、本発明の方法による無核血液細胞中の疾患誘導核酸の検出のための活性成分を含む1以上の投与単位形を含み得る。

【0119】

又は前記キットは、別々に包装された、サンプルを収集する手段および特異的増幅及び/又は検出プライマーを含み得る。

10

20

30

40

50

【0120】

前記キットは、本発明の方法を実施するための指示書を含む。

【0121】

例えば、前記キットは、ディップスティック又はカートリッジ（場合により筐体に含まれる）などの装置を含み、これに血液サンプル又は分離され及び／又は増幅された無核血液細胞核酸サンプルを提供することができ、前記サンプル中の疾患誘導又は疾患特異的核酸又は核酸プロフィールを検出することができるものである。前記装置は、疾患誘導核酸を特異的に検出可能な全ての試薬を含み得る。例えば、前記装置は、疾患誘導核酸に結合する1以上の固定化変異特異的ハイブリダイゼーションプローブ及び、結合を検出するインジケータを含み得る。本発明の実施態様では、支持体が前記装置に提供され、これにハイブリダイゼーションプローブが可動に又は固定的に結合される。

10

【0122】

実施態様によれば、前記装置は側流装置を含み、これは血液サンプル又は分離及び／又は増幅された無核血液細胞核酸サンプルを、前記疾患誘導核酸を検出することができる試薬と接触させるように流すための流入手段を含む。前期試験装置はまた、前記試験が正しく操作されることを保証するための流体制御手段を含み得る。かかる流体制御手段は、コントロール核酸を含み、これは支持体に結合されており、前記試験装置を通じるサンプル流体の適切な流れを確実にする手段としてサンプルに添加される検出プローブをキャプチャする。又は、流体制御手段は、前記制御領域にキャプチャプローブを含み、前記サンプル中に天然に存在するか又はコントロールとして添加された核酸をキャプチャし、これにより前記適切な流れが装置内で生じていることを示す。

20

【0123】

他の側面で、本発明は、本発明の装置を、前記説明した方法の一つを用いて被験者の疾患を診断するための使用を提供する。ここで説明した方法の一つを用いて被験者の疾患を診断する使用のための非常に適切な装置は、血小板RNAチップであり、例えば「Nagalla & Bray (2010) Blood 115 (1): 2-3 及びGnatenko et al. Blood 115 (1): 7-14」に記載されたものである。

【0124】

本発明は、以下に非限定的例により例示される。

30

【実施例】

【0125】

実施例 1

血小板細胞は、膠芽細胞腫患者4人、および健康なドナーから遠心分離ステップにより分離された。血小板細胞はその後Trizol RNA分離を用いてRNA抽出の対象とされた。精製血小板細胞RNA抽出サンプルはcDNAへ変換され、標準のマイクロアレイ手順に従いAgilent 4x44K発現マイクロアレイにより分析した。これにより異なる血小板調製物のmRNAのプロフィールが可能となった。

【0126】

約8500 RNA転写物が、健康被験者からの血小板の発現マイクロアレイでは検出されなかった。これらの転写物は、健康被験者からの血小板中でAgilent 4x44Kチップの検出限界以下のレベルであった。従って、かかるRNA抽出は全て癌診断のための可能なバイオマーカーであり得る。健康被験者からの血小板細胞で発現マイクロアレイにより検出されなかったRNAのうち、相当な組みのRNAが膠芽細胞腫患者からの血小板細胞で検出された。表1は、発現マイクロアレイにより膠芽細胞腫患者から検出されたが、健康被験者からは検出されなかった特異的血小板性RNA転写物をまとめた。4/4患者サンプル(表1A)又は3/4患者サンプル(表1B)で検出され、4人のコントロールサンプルのいずれにも検出されないう特異的RNA転写物が表1にまとめられている。

40

【0127】

50

表 1 : 膠芽細胞腫患者からの血小板細胞で検出されたが、健康ドナーからは検出されない特異的血小板性 RNA 転写物

1 A : 4 人の患者のうち 4 人で検出され、コントロールサンプルからの血小板細胞からは検出されない血小板細胞の転写物

【 0 1 2 8 】

【 表 1 A 】

A_23_P207233	A_23_P47546	A_24_P452024	A_24_P642240	A_24_P654255
A_24_P712193	A_24_P816073	A_32_P142521	A_32_P167111	A_32_P35839
A_32_P59532	AA594975	AF035790	AF119839	AF130062
AI138440	AK098562	ASPM	AW269819	BC002534
BC024745	BC047055	BHMT	BM683433	BX118161
C10orf10	C9orf138	CCL16	CENPQ	CLN5
CLTCL1	COCH	CPA6	CUTL2	DKFZp547H025
DLSTP	DNAJC5B	ENST00000303697	ENST00000315208	ENST00000382726
FILIP1	GAL	GPR149	GTSE1	HAS3
HFE	HOXB6	HOXD11	IGF1	IL21
LDLR	LOC221710	LOC388160	LOC641999	LRRC2
LRRC4	MGC16291	MPDZ	MYCL1	NPR3
OLAH	OR2H1	PLK4	PNMA2	ROBO4
SEPT10	SLC14A1	SP2	SPANXB2	TAF5L
TCEAL7	THC2279825	THC2334717	THC2340924	THC2412206
TIMP4	TMPRSS3	TNFAIP6	TNK1	ZNF596

10

20

1 B : 4 人の患者のうち 4 人で検出され、コントロールサンプルからの血小板細胞からは検出されない血小板細胞の転写物

【 0 1 2 9 】

【表 1 B】

A_23_P72252	A_24_P195400	A_24_P195621	KRT8P23	A_24_P246777	
A_24_P315255	A_24_P647965	A_24_P669822	A_24_P752208	A_24_P790361	
A_24_P834066	A_24_P915245	A_24_P928453	A_24_P929126	A_24_P931713	
A_24_P933278	A_24_P934497	A_24_P935492	A_32_P119949	A_32_P136427	
A_32_P15328	A_32_P182135	A_32_P69993	A_32_P743731	A_32_P75311	
A_32_P92274	AA420988	AA669267	AA843546	AA890136	
AA918648	ABCA10	ABCB9	ACADL	ACE	
ADAM32	AF119848	AF136408	AF217973	AF263545	
AF315716	AF401032	AI291464	AI335947	AI885257	
AK021897	AK057725	AK057935	AK074369	AK091028	
AK096102	AK096991	AK130038	AL133089	ALDH5A1	10
ANKRD40	APOA1	APOA1	APOD	AW385956	
AY358234	BC017851	BC037882	BC038740	BC041899	
BC37295_3	BCL2L11	BF376089	BF435769	BF509481	
BF826743	BHMT2	BHMT2	BM476468	BM681332	
BPI	BQ028381	BX091616	BX647685	C15orf37	
C17orf53	C18orf56	C20orf117	C3orf23	C4orf6	
C4orf7	C6orf10	C6orf52	C9orf39	CART1	
CC2D1A	CCL7	CDC2	CES4	CF527929	
CITED4	CLDN4	CNTN2	COL1A1	COL5A2	
COL6A1	COX11	CPLX2	CPNE6	CRB1	
DB380193	DENND1A	DPPA5	DST	EFEMP1	
EGFR	ENST00000254271	ENST00000258873	ENST00000272235	ENST00000295989	20
ENST00000299308	ENST00000300996	ENST00000315293	ENST00000335534	ENST00000354261	
ENST00000354417	ENST00000355077	ENST00000355247	ENST00000356104	ENST00000369615	
ENST00000374334	ENST00000374458	ENST00000375587	ENST00000381050	ENTPD8	
EPS8L3	ERVWE1	ESX1	F8	FAM104B	
FAM62C	FAM71B	FAM9C	FBXW10	FCRL4	
FGFR1	FLJ25715	FLJ32312	FLJ37543	FLJ39582	
FLJ39779	FNDG5	FRG2	FSIP2	FTCD	
GAPDHS	GAS2L2	GAS8	GCKR	GLRA1	
GPR143	GPR98	GUCA1C	HILS1	HLA-DRB6	
HOXD3	HR44	IGF1	IGF1	IGSF4	
INHBA	ITGAV	JPH1	KIAA0492	KIAA1661	
KIF20A	KLHL9	KREMEN1	LCE3B	LENEP	30
LIFR	LOC222171	LOC339524	LOC348021	LOC388503	
LOC390211	LOC440295	LOC642730	LOC643100	LOC643125	
LOC648556	LOC92270	M31157	MGC39584	MGC43122	
MRAP	MSTO1	MYLC2PL	MYO7A	NDST3	
NF2	NNMT	NR1H4	NTN1	NTRK3	
NTS	NXPH3	ODAM	OPCML	OR8H1	
PALM2-AKAP2	PAX9	PCNXL2	PHC2	PKNOX1	
PLAC1	POTE2	PPCDC	PPFIBP1	PPP1R14C	
RBMY2EP	RCBTB1	RHOD	RRAGB	RSHL1	
RSPO1	S72478	SAA4	SASS6	SDK1	
SLC22A9	SLC26A9	SLCO1A2	SNAP25	SP5	
SPBC25	STEAP1	SUFU	SUNC1	SYCE1	40
SYT12	TAS2R38	TAS2R4	TBC1D3	TBC1D8B	
TCEB3C	TEK	THC2269604	THC2269920	THC2276996	
THC2279230	THC2281591	THC2281747	THC2286878	THC2286962	
THC2289112	THC2296760	THC2316481	THC2316929	THC2339079	
THC2339904	THC2347643	THC2369034	THC2374304	THC2374505	
THC2380237	THC2385918	THC2407039	THC2444579	THC2454812	
THRSP	TM4SF20	TNFRSF13B	TREH	TRPA1	
TRPC7	TSC22D2	TSHZ2	TTY6	UGT8	
UNC13B	USP2	USP6	VLDLR	WWTR1	
X87895	ZNF28	ZNF57			

表 2 : 種々の癌について癌特定機変異

【 0 1 3 0 】
【 表 2 - 1 】

記号	遺伝子 ID	特徴バンド	腫瘍タイプ(体細胞変異)	癌症候群
ABL1	25	9q34.1	CML, ALL, T-ALL	
ABL2	27	1q24-q25	AML	
ACSL3	2181	2q36	前立腺	
AF15Q14	57082	15q14	AML	
AF1Q	10962	1q21	ALL	
AF3p21	51517	3p21	ALL	
AF5q31	27125	5q31	ALL	
AKAP9	10142	7q21-q22	甲状腺乳頭	
AKT1	207	14q32.32	乳癌,結腸直腸癌,卵巣癌,NSCLC	
AKT2	208	19q13.1-q13.2	卵巣,膵臓	
ALK	238	2p23	ALCL, NSCLC,神経芽腫	家族性神経が細胞腫
ALO17	57714	17q25.3	ALCL	
APC	324	5q21	大腸,すい臓,デスモイド,肝芽腫,神経膠腫, 大腸腺腫ポリポーシス;タローコット症	
ARHGEF12	23365	11q23.3	他の CNS	候群
ARHH	399	4p13	AML	
ARNT	405	1q21	NHL	
ASPSR1	79058	17q25	AML	
ASXL1	171023	20q11.1	胞巣状軟部肉腫	
ATF1	466	12q13	MDS, CMML	
			軟部分悪性黒色腫, 血管腫様請求項に正組織球腫	
AT1C	471	2q35	ALCL	

【 0 1 3 1 】

10

20

30

40

【表 2 - 2】

【 0 1 3 2 】

ATM	472	11q22.3	T-PLL,白血病,リンパ腫,髄芽腫,神経膠腫	毛細血管拡張性運動失調
BCL10	8915	1p22	MALT	
BCL11A	53335	2p13	B-CLL	
BCL11B	64919	14q32.1	T-ALL	
BCL2	596	18q21.3	NHL, CLL	
BCL3	602	19q13	CLL	
BCL5	603	17q22	CLL	
BCL6	604	3q27	NHL, CLL	
BCL7A	605	12q24.1	BNHL	
BCL9	607	1q21	B-ALL	
BCR	613	22q11.21	CML, ALL, AML	
BHD	201163	17p11.2	腎,繊維毛包腫,毛嚢腫	バートホッグデューベ症候群
BIRC3	330	11q22-q23	MALT	
BLM	641	15q26.1	白血病,リンパ腫,皮膚扁平上皮癌,他の癌	ブルーム症候群
BMPRIA	657	10q22.3	胃腸ポリープ	若年性ポリーポシス
BRAF	673	7q34	黒色腫,結腸直腸癌,甲状腺乳頭,ポージーライノv,非小細胞肺癌	
			(NSCLC),胆管癌,	
			毛様細胞性星細胞種	
BRCA1	672	17q21	卵巣癌,乳癌,	遺伝性乳癌/卵巣癌
BRCA2	675	13q12	乳癌,卵巣癌,すい臓癌,白血病(FANCB, FANCD1)	遺伝性乳癌/卵巣癌
BRD3	8019	9q34	若年致死正中癌	

10

20

30

40

【表 2 - 3】

【 0 1 3 3 3 】

BRD4	23476	19p13.1	若年致死正中癌		
BRIP1	83990	17q22	AML,白血病,乳癌	フェンコニ貧血J,乳癌感受性	
BTG1	694	12q22	BCLL		
BUB1B	701	15q15	横紋筋肉腫	モザイク斑異数性	
C12orf9	93669	12q14.3	脂肪腫		
C15orf21	283651	15q21.1	前立腺癌		
CANT1	124583	17q25	前立腺癌		
CARD11	84433	7p22	DLBL		
CARS	833	11p15.5	ALCL		
CBFA2T1	862	8q22	AML		
CBFA2T3	863	16q24	AML		
CBFB	865	16q22	AML		
CBL	867	11q23.3	AML, JMML, MDS		
CBLB	868	3q13.11	AML		
CBLC	23624	19q13.2	AML		
CCND1	595	11q13	CLL, B-ALL, breast		
CCND2	894	12p13	NHL, CLL		
CCND3	896	6p21	MM		
CD74	972	5q32	NSCLC		
CD79A	973	19q13.2	DLBCL		
CD79B	974	17q23	DLBCL		
CDH1	999	16q22.1	小葉乳癌,胃癌	家族性胃腸腫瘍	
CDH11	1009	16q22.1	動脈瘤性骨嚢		

10

20

30

40

【表 2 - 4】

CDK4	1019	12q14	メラノーマ	家族性悪性メラノーマ
CDK6	1021	7q21-q22	ALL	
CDKN2A	1029	9p21	メラノーマ,他の複数の腫瘍型,すい臓癌	家族性悪性メラノーマ
-p16(INK4a)				
CDKN2A-	1029	9p21	メラノーマ,他の複数の腫瘍型,すい臓癌	家族性悪性メラノーマ
p14ARF				
CDKN2C	1031	1p32	神経膠腫, MM	
CDX2	1045	13q12.3	AML	
CEBPA	1050	19q13.1	AML, MDS	
CEP1	11064	9q33	MPD, NHL	
CHCHD7	79145	8q11.2	唾液選手	
CHEK2	11200	22q12.1	乳癌	家族性乳癌
CHIC2	26511	4q11-q12	AML	
CHN1	1123	2q31-q32.1	急性骨髄性白血病	
CIC	23152	19q13.2	粘液肉腫完骨肉腫	
CLTC	1213	17q11-qter	ALCL,腎	
CLTCL1	8218	22q11.21	ALCL	
CMKOR1	57007	2q37.3	脂肪腫	
COL1A1	1277	17q21.31-q22	隆起性皮膚繊維維製肉腫	
COPEB	1316	10p15	動脈瘤性骨嚢胞	
COX6C	1345	8q22-q23	前立腺癌,神経膠腫	
			子宮平滑筋腫	

10

20

30

【 0 1 3 4 】

【表 2 - 5】

CREB1	1385	2q34	明細胞肉腫,纖維状血管腫	
			組織球腫	
CREB3L2	64764	7q34	纖維状肉腫	
CREBBP	1387	16p13.3	AL, AML	
CRLF2	64109	Xp22.3; Yp11.3	B-ALL, ダウンズ関連 ALL	
CRTC3	64784	15q26.1	唾液腺粘表皮	
CTNNB1	1499	3p22-p21.3	大腸癌, 卵巣, 肝芽腫, その他, 多形性唾液腺腫	
CYLD	1540	16q12-q13	円柱腫	家族性円柱腫
D10S170	8030	10q21	甲状腺乳頭, CML	
DDB2	1643	11p12	皮膚基底細胞, 皮膚扁平上皮癌, 黑色素腫	色素性乾皮症 (E)
DDIT3	1649	12q13.1-q13.2	脂肪肉腫	
DDX10	1662	11q22-q23	AML*	
DDX5	1655	17q21	前立腺癌	
DDX6	1656	11q23.3	B-NHL	
DEK	7913	6p23	AML	家族性膜胚芽腫
DICER1	23405	14q32.13	胸腺胚芽腫	
DUX4	22947	4q35	軟組織肉腫	
EGFR	1956	7p12.3-p12.1	神経膠腫, NSCLC	家族性肺癌
EIF4A2	1974	3q27.3	NHL	
ELF4	2000	Xq26	AML	
ELK4	2005	1q32	前立腺癌	
ELKS	23085	12p13.3	甲状腺乳頭	

【 0 1 3 5 】

10

20

30

40

【表 2 - 6】

【 0 1 3 6 】

ELL	8178	19p13.1	AL	皮膚基底細胞,皮膚扁平上皮,黒色腫	色素性乾皮症(D)
ELN	2006	7q11.23	B-ALL	皮膚基底細胞,皮膚扁平上皮,黒色腫,メラノーマ	色素性乾皮症(B)
EML4	27436	2p21	NSCLC		
EP300	2033	22q13	結腸直腸癌,乳癌,膵臓癌,AML		
EPS15	2060	1p32	ALL		
ERBB2	2064	17q21.1	乳癌,卵巣癌,他の腫瘍型,		
			NSCLC, 胃癌		
ERCC2	2068	19q13.2-q13.3	皮膚基底細胞,皮膚扁平上皮,黒色腫	色素性乾皮症(D)	
ERCC3	2071	2q21	皮膚基底細胞,皮膚扁平上皮,黒色腫,メラノーマ	色素性乾皮症(B)	
			メラノーマ		
ERCC4	2072	16p13.3-p13.13	皮膚基底細胞,皮膚扁平上皮,黒色腫,メラノーマ	色素性乾皮症(F)	
			メラノーマ		
ERCC5	2073	13q33	皮膚基底細胞,皮膚扁平上皮,黒色腫,メラノーマ	色素性乾皮症(G)	
			メラノーマ		
ERG	2078	21q22.3	ユーング肉腫,前立腺癌,AML		
ETV1	2115	7p22	ユーング肉腫,前立腺癌		
ETV4	2118	17q21	ユーング肉腫,前立腺肉腫,前立腺癌		
ETV5	2119	3q28	前立腺癌		
ETV6	2120	12p13	先天性線維肉腫,複数白血病及びびリンパ腫,分泌性乳癌,MDS,		
			ALL		
EVI1	2122	3q26	AML, CML		
EWSR1	2130	22q12	ユーング肉腫,繊維形成性小球細胞腫,		
			明細胞肉腫,肉腫,筋上皮腫		

10

20

30

【表 2 - 7】

EXT1	2131	8q24.11-q24.13	外骨腫,骨肉腫	複数外骨腫タイプ1
EXT2	2132	11p12-p11	外骨腫,骨肉腫	複数外骨腫タイプ2
EZH2	2146	7q35-q36	DLBCL	
FACL6	23305	5q31	AML, AEL	
FANCA	2175	16q24.3	AML, 白血病	ファンコニ貧血 A
FANCC	2176	9q22.3	AML, 白血病	ファンコニ貧血 C
FANCD2	2177	3p26	AML, 白血病	ファンコニ貧血 D2
FANCE	2178	6p21-p22	AML, 白血病	ファンコニ貧血 E
FANCF	2188	11p15	AML, 白血病	ファンコニ貧血 F
FANCG	2189	9p13	AML, 白血病	ファンコニ貧血 G
FBXW7	55294	4q31.3	子宮内膜,大腸,T-ALL	
FCGR2B	2213	1q23	ALL	
FEV	54738	2q36	ユーンダグ肉腫	
FGFR1	2260	8p11.2-p11.1	MPD, NHL	
FGFR1OP	11116	6q27	MPD, NHL	
FGFR2	2263	10q26	胃.NSCLC,子宮内膜	
FGFR3	2261	4p16.3	膀胱,MM,T-細胞リンパ腫	
FH	2271	1q42.1	平滑筋腫,腎	遺伝性平滑筋腫及び腎細胞癌
FIP1L1	81608	4q12	突発性好酸球増加症候群	
FLI1	2313	11q24	ユーンダグ肉腫	
FLT3	2322	13q12	AML, ALL	
FNBP1	23048	9q23	AML	
FOXL2	668	3q23	卵巣顆粒膜細胞腫瘍	

【 0 1 3 7 】

10

20

30

40

【表 2 - 8】

FOXO1A	2308	13q14.1	歯槽横紋筋肉腫	10
FOXO3A	2309	6q21	AL	
FOXP1	27086	3p14.1	ALL	
FSTL3	10272	19p13	B-CLL	
FUS	2521	16p11.2	脂肪肉腫,AML,ユーンイング肉腫, 血管腫様繊維性組織球腫	20
FVT1	2531	18q21.3	B-NHL	
GAS7	8522	17p	AML*	
GATA1	2623	Xp11.23	ダウン症候群巨核芽球性白血病	
GATA2	2624	3q21.3	AML(CMLプラスト変換)	
GATA3	2625	10p15	乳癌	
GMPS	8833	3q24	AML	
GNAQ	2776	9q21	脈絡膜悪性黒色腫	
GNAS	2778	20q13.2	下垂体腺腫	
GOLGA5	9950	14q	甲状腺乳頭	
GOPC	57120	6q21	膠芽細胞腫	
GPC3	2719	Xq26.1	ウィルムス腺腫	シンブロンゴラビベメル症候群
GPHN	10243	14q24	AL	
GRAF	23092	5q31	AML, MDS	
HCMOGT-1	92521	17p11.2	JMML	
HEAB	10978	11q12	AML	
HEI10	57820	14q11.1	子宮平滑筋腫	
HERPUD1	9709	16q12.2-q13	前立腺	40

【 0 1 3 8 】

【表 2 - 1 0】

IGH@	3492	14q32.33	MM, Burkitt lymphoma, NHL, CLL, B-ALL, MALT, MLCLS	10
IGK@	50802	2p12	バーキットリンパ腫,B-NHL	
IGL@	3535	22q11.1-q11.2	バーキットリンパ腫	
IKZF1	10320	7p12.2	ALL	
IL2	3558	4q26-q27	腸管 T 細胞リンパ腫	
IL21R	50615	16p11	NHL	
IL6ST	3572	5q11	肝細胞 ca	
IRF4	3662	6p25-p23	MM	
IRTA1	83417	1q21	B-NHL	
ITK	3702	5q31-q32	末梢 T 細胞リンパ腫	
JAK1	3716	1p32.3-p31.3	ALL	
JAK2	3717	9p24	ALL, AML, MPD,CML	
JAK3	3718	19p13.1	急性巨核性白血病, 子宮内膜間質腫瘍	
JAZF1	221895	7p15.2-p15.1	肉腫	
JUN	3725	1p32-p31	AML	
KDM5A	5927	12p11	明細胞腎癌	
KDM5C	8242	Xp11.22-p11.21	腎臓,食堂 SCC, MM	
KDM6A	7403	Xp11.2	NSCLC,血管肉腫	
KDR	3791	4q11-q12	毛様細胞性星細胞腫	
KIAA1549	57670	7q34	GIST, AML, TGCT, 肥満細胞症,粘膜炎,家族性消化管間質腫瘍	
KIT	3815	4q12	上皮腫	20
				30
				40

【表 2 - 1 1 1】

KLK2	3817	19q13.41	前立腺	
KRAS	3845	12p12.1	脾臓,結腸直腸,肺,甲状腺,AML,その他	
KTN1	3895	14q22.1	甲状腺乳頭	
LAF4	3899	2q11.2-q12	ALL, T-ALL	
LASP1	3927	17q11-q21.3	AML	
LCK	3932	1p35-p34.3	T-ALL	
LCP1	3936	13q14.1-q14.3	NHL	
LCX	80312	10q21	AML	
LHFP	10186	13q12	脂肪腫	
LIFR	3977	5p13-p12	唾液腺腫	
LMO1	4004	11p15	T-ALL	
LMO2	4005	11p13	T-ALL	
LPP	4026	3q28	脂肪腫,白血病	
LYL1	4066	19p13.2-p13.1	T-ALL	
MADH4	4089	18q21.1	大腸,すい臓,小腸,胃腸ポリープ	若年性ポリープ
MAF	4094	16q22-q23	MM	
MAFB	9935	20q11.2-q13.1	MM	
MALT1	10892	18q21	MALT	
MAML2	84441	11q22-q23	唾液腺粘表皮	
MAP2K4	6416	17p11.2	すい臓癌,乳癌,結腸直腸癌	
MDM2	4193	12q15	肉腫,神経膠腫,結腸直腸癌,その他	
MDM4	4194	1q32	GBM,膀胱,網膜芽細胞腫	
MDS1	4197	3q26	MDS, AML	

10

20

30

【 0 1 4 1 1 】

【表 2 - 1 2】

【 0 1 4 2 2】	MDS2	259283	1p36	MDS		
	MECT1	94159	19p13	唾液腺粘表皮		
	MEN1	4221	11q13	副甲状腺腫瘍,副甲状腺腫,下垂体腺腫,膵島細胞多発性内分泌腫瘍症タイプ1		
	MET	4233	7q31	腎臓,頭頸部扁平上皮細胞	家族性乳頭状腎癌	
	MHC2TA	4261	16p13	NHL		
	MITF	4286	3p14.1	メラノーマ		
	MKL1	57591	22q13	急性巨核球性白血病		
	MLF1	4291	3q25.1	AML		
	MLH1	4292	3p21.3	大腸癌,子宮内膜癌,卵巣癌,CNS	遺伝性非ポリポーシス大腸癌,タローコット症候群	
	MLL	4297	11q23	AML, ALL		
	MLLT1	4298	19p13.3	AL		
	MLLT10	8028	10p12	AL		
	MLLT2	4299	4q21	AL		
	MLLT3	4300	9p22	ALL		
	MLLT4	4301	6q27	AL		
	MLLT6	4302	17q21	AL		
	MLLT7	4303	Xq13.1	AL		
	MN1	4330	22q13	AML, 髄膜腫		
	MPL	4352	p34	MPD	家族性本態性血小板症	
	MSF	10801	17q25	AML*		
	MSH2	4436	2p22-p21	大腸癌,子宮内膜,卵巣	遺伝性非ポリポーシス大腸癌	10
						20
						30
						40

【表 2 - 1 3】

MSH6	2956	2p16	大腸癌,子宮内膜,卵巢	遺伝性非ポリポーシス大腸癌
MSI2	124540	17q23.2	CML	
MSN	4478	Xq11.2-q12	ALCL	
MTCPI	4515	Xq28	T細胞前リンパ球性白血病	
MUC1	4582	1q21	B-NHL	
MUTYH	4595	1p34.3-1p32.1	結腸直腸癌 I	大腸腺腫性ポリポーシス
MYB	4602	6q22-23	腺様嚢胞性癌	
MYC	4609	8q24.12-q24.13	バークिटリンパ腫,他の癌で増幅, B-細胞	
MYCL1	4610	1p34.3	小細胞肺癌	
MYCN	4613	2p24.1	神経芽細胞腫	
MYH11	4629	16p13.13-p13.12	AML	
MYH9	4627	22q13.1	ALCL	
MYST4	23522	10q22	AML	
NACA	4666	12q23-q24.1	NHL	
NBS1	4683	8q21	NHL,神経膠腫,髓芽腫,横紋筋肉腫	ナイメーヘン破損症候群
NCOA1	8648	2p23	歯槽横紋筋肉腫	
NCOA2	10499	8q13.1	AML	
NCOA4	8031	10q11.2	甲状腺乳頭	
NF1	4763	17q12	神経線維腫	神経線維腫症タイプ1
NF2	4771	22q12.2	髄膜腫,聴神経腫,腎臓	神経線維腫症タイプ2
NFIB	4781	9p24.1	腺様嚢胞性癌,脂肪腫	
NFKB2	4791	10q24	B-NHL	
NIN	51199	14q24	MPD	

【 0 1 4 3】

10

20

30

40

【表 2 - 1 4】

NONO	4841	Xq13.1	腎癌乳頭	
NOTCH1	4851	9q34.3	T-ALL	
NOTCH2	4853	1p13-p11	辺縁帯リンパ腫, DLBCL	
NPM1	4869	5q35	NHL, APL, AML	
NR4A3	8013	9q22	粘液肉腫軟骨肉腫	
NRAS	4893	1p13.2	メラノーマ, MM, AML, 甲状腺	
NSD1	64324	5q35	AML	
NTRK1	4914	1q21-q22	甲状腺乳頭	
NTRK3	4916	15q25	先天性繊維肉腫, 分泌乳房	
NUMA1	4926	11q13	APL	
NUP214	8021	9q34.1	AML, T-ALL	
NUP98	4928	11p15	AML	
NUT	256646	q13	I 若年致死正中癌	
OLIG2	10215	21q22.11	T-ALL	
OMD	4958	9q22.31	動脈瘤性骨嚢胞	
P2RY8	286530	Xp22.3; Yp11.3	B-ALL, Downs associated ALL	
PAFAH1B2	5049	11q23	MLCLS	
PALB2	79728	16p12.1	ウィルムス腫瘍, 髓芽腫, AML, 乳癌	フェンコロニ管血 N, 乳癌感受性
PAX3	5077	2q35	胞巣状横紋筋肉腫	
PAX5	5079	9p13	NHL, ALL, B-ALL	
PAX7	5081	1p36.2-p36.12	胞巣状横紋筋肉腫	
PAX8	7849	2q12-q14	甲状腺嚢胞	
PBX1	5087	1q23	前 B-ALL, 筋上皮腫	

【 0 1 4 4】

10

20

30

40

【表 2 - 1 5】

PCM1	5108	8p22-p21.3	甲状腺乳頭,CML,MPD	
PCSK7	9159	11q23.3	MLCLS	
PDE4DIP	9659	1q12	MPD	
PDGFB	5155	22q12.3-q13.1	DFSP	
PDGFRA	5156	4q11-q13	GIST,突発性好酸球增多症候群	
PDGFRB	5159	5q31-q32	MPD, AML, CMML, CML	
PER1	5187	17p13.1-17p12	AML, CMML	
PHOX2B	8929	4p12	神経芽細胞腫	家族性神経芽細胞腫
PICALM	8301	11q14	TALL, AML,	
PIK3CA	5290	3q26.3	大腸,胃,神経膠芽腫,乳癌	
PIK3R1	5295	5q13.1	神経膠芽腫,卵巣,大腸	
PIM1	5292	6p21.2	NHL	
PLAG1	5324	8q12	唾液腺腫	
PML	5371	15q22	APL, ALL	
PMS1	5378	2q31-q33	大腸,子宮内膜癌,卵巣癌	遺伝性非ポリポーシス大腸癌
PMS2	5395	7p22	大腸癌,子宮内膜癌,卵巣癌,髓芽腫,神経膠腫	遺伝性非ポリポーシス大腸癌,タロコット症候群
PMX1	5396	1q24	AML	
PNUTL1	5413	22q11.2	AML	
POU2AF1	5450	11q23.1	NHL	
POU5F1	5460	6p21.31	肉腫	
PPARG	5468	3p25	甲状腺濾胞	
PRCC	5546	1q21.1	腎臓乳頭	

【 0 1 4 5】

10

20

30

40

【表 2 - 1 6】

【 0 1 4 6】	PRDM16	63976	1p36.23-p33	MDS, AML	種々の白血病,リンパ腫	カーニ-症候群
	PRF1	5551	10q22			
	PRKAR1A	5573	17q23-q24		粘液腫,内分泌,甲状腺乳頭	
	PRO1073	29005	11q31.1		腎細胞癌(小児上皮)	
	PSIP2	11168	9p22.2	AML		
	PTCH	5727	9q22.3	皮膚基礎細胞,髓芽腫		母斑基底細胞癌症候群
	PTEN	5728	10q23.3	過嚥腫,神経膠腫,前立腺,子宮内膜		コーデン症候群,パナヤン-リレー-ル バルカバ症候群
	PTPN11	5781	12q24.1	JMML, AML, MDS		
	RAB5EP	9135	17p13	CMML		
	RAD51L1	5890	14q23-q24.2	脂肪腫,子宮筋腫		
	RAF1	5894	3p25	毛葉細胞性星細胞腫		
	RANBP17	64901	5q34	ALL		
	RAP1GDS1	5910	4q21-q25	T-ALL		
	RARA	5914	17q12	APL		
	RB1	5925	13q14	網膜芽細胞腫,肉腫,乳癌,小細胞肺癌		家族性網膜芽細胞腫
	RBM15	64783	1p13	急性巨核球性白血病		
	RECQL4	9401	8q24.3	骨肉腫,皮膚基底細胞及び扁平細胞		ロズムント-トンプソン症候群
	REL	5966	2p13-p12	ホジキンリンパ腫		
	RET	5979	10q11.2	工場延髄,甲状腺乳頭,褐色細胞腫		多発性内分泌腫瘍 2A/2B
	ROSI	6098	6q22	神経膠芽腫,NSCLC		
	RPL22	6146	1p36.31	AML, CML		
	RPN1	6184	3q21.3-q25.2	AML		

10

20

30

40

【表 2 - 1 7】

【 0 1 4 7 】	861	21q22.3	AML, preB- ALL, T-ALL	スバクマン-ダイヤモンD症候群
RUNX1	861	21q22.3	AML, preB- ALL, T-ALL	スバクマン-ダイヤモンD症候群
RUNXBP2	7994	8p11	AML	家族性傍神経節腫
SBDS	51119	7q11	AML, MDS	家族性傍神経節腫
SDH5	54949	11q12.2	傍神経節腫	家族性傍神経節腫
SDHB	6390	1p36.1-p35	傍神経節腫,褐色細胞腫	家族性傍神経節腫
SDHC	6391	1q21	傍神経節腫,褐色細胞腫	家族性傍神経節腫
SDHD	6392	11q23	傍神経節腫,褐色細胞腫	家族性傍神経節腫
SEPT6	23157	Xq24	AML	家族性傍神経節腫
SET	6418	9q34	AML	
SETD2	29072	3p21.31	明細胞腎癌	
SFPQ	6421	1p34.3	腎細胞乳頭	
SFRS3	6428	6p21	濾胞性リンパ腫	
SH3GL1	6455	19p13.3	AL	
SIL	6491	1p32	T-ALL	
SLC45A3	85414	1q32	前立腺	
SMARCA4	6597	19p13.2	NSCLC	
SMARCB1	6598	22q11	悪性ラブラドイド	ラブラドイド素因症候群
SMO	6608	7q31-q32	皮膚基底細胞	
SOCS1	8651	16p13.13	ホジキンリンパ腫,PMBL	
SRGAP3	9901	3p25.3	毛要細胞性性星細胞腫	
SS18	6760	18q11.2	滑膜肉腫	
SS18L1	26039	20q13.3	滑膜肉腫	
SSH3BP1	10006	10p11.2	AML	

10

20

30

40

【表 2 - 1 8】

SSX1	6756	Xp11.23-p11.22	滑膜肉腫	
SSX2	6757	Xp11.23-p11.22	滑膜肉腫	
SSX4	6759	Xp11.23	滑膜肉腫	
STK11	6794	19p13.3	NSCLC, 膀胱癌, 過嚥腫, 卵巣, 精巣	ピューツ-ジェグナー症候群
STL	7955	6q23	B-ALL	髄芽細胞腫素因
SUFU	51684	10q24.32	髄芽腫	
SUZ12	23512	17q11.2	子宮内膜間質腫瘍	
SYK	6850	9q22	MDS, 未梢 T-細胞腫	
TAF15	8148	17q11.1-q11.2	粘液肉腫軟骨肉腫, ALL	
TAL1	6886	1p32	リンパ芽球性白血病/相性	
TAL2	6887	9q31	T-ALL	
TCEA1	6917	8q11.2	唾液腺腫	
TCF1	6927	12q24.2	肝細胞腺腫, 肝細胞 ca	家族性肝細胞腺腫
TCF12	6938	15q21	粘液肉腫軟骨肉腫	
TCF3	6929	19p13.3	前 B-ALL	
TCL1A	8115	14q32.1	T-CLL	
TCL6	27004	14q32.1	T-ALL	
TET2	54790	4q24	MDS	
TFE3	7030	Xp11.22	腎臓乳癌, 泡巣状軟骨肉腫, 腎臓	
TFEB	7942	6p21	腎臓(小児上皮)	
TFG	10342	3q11-q12	甲状腺乳頭, ALCL, NSCLC	
TFP1	29844	19q13	前-B ALL	
TFRC	7037	3q29	NHL	

【 0 1 4 8 】

10

20

30

40

【表 2 - 1 9】

THRAP3	9967	1p34.3	動脈瘤性骨嚢胞	
TIF1	8805	7q32-q34	APL	
TLX1	3195	10q24	T-ALL	
TLX3	30012	5q35.1	T-ALL	
TMPRSS2	7113	21q22.3	前立腺	
TNFAIP3	7128	6q23	辺縁帯 B-細胞リンパ腫,ホジキンリンパ腫	
TNFRSF17	608	16p13.1	原発性縦隔 B 細胞リンパ腫	
TNFRSF6	355	10q24.1	腸管 T-細胞リンパ腫	
TOP1	7150	20q12-q13.1	TGCT,鼻 NK/Tリンパ腫,	
TP53	7157	17p13	火傷関連皮膚扁平上皮細胞 ca	
TPM3	7170	1q22-q23	AML*	
TPM4	7171	19p13.1	乳癌,結腸直腸癌,肺癌,肉腫,副腎皮質,神経	リ-フラウメニ症候群
TPR	7175	1q25	膠腫,複数の他の使用タイプ	
TRA@	6955	14q11.2	甲状腺乳頭,ALCL	
TRB@	6957	7q35	甲状腺乳頭	
TRD@	6964	14q11	T-細胞鼻白血病	
TRIM27	5987	6p22	甲状腺乳頭	
TRIM33	51592	1p13	甲状腺乳頭	
TRIP11	9321	14q31-q32	AML	
TSC1	7248	9q34	過誤腫,腎細胞	結節性硬化症 1

【 0 1 4 9】

10

20

30

40

【表 2 - 2 0】

TSC2	7249	16p13.3	過剰腫,腎細胞	結節性硬化症 2
TSHR	7253	14q31	毒性甲状腺腫	
TTL	150465	2q13	ALL	
USP6	9098	17p13	動脈瘤性骨嚢胞	
VHL	7428	3p25	腎臓,血管腫,褐色細胞腫瘍	フォンヒッペル-リンドウ症候群
WAS	7454	Xp11.23-p11.22	リンパ腫	ウイスコット-アールドリッチ症候群
WHSC1	7468	4p16.3	MM	
WHSC1L1	54904	8p12	AML	
WRN	7486	8p12-p11.2	骨肉腫,髄膜腫,その他	ウェルナー症候群
WT1	7490	11p13	ウィウムス,繊維系成性小円形細胞腫瘍	デニッシュ-ドランツシユ症候群,フレイ ジャ症候群,ファミリアルウィルムス 腫瘍
WTX	139285	Xq11.1	ウィルムス腫瘍	
XPA	7507	9q22.3	皮膚基底細胞,皮膚扁平上皮,メラノーマ	色素性乾皮症(A)
XPC	7508	3p25	皮膚基底細胞,皮膚扁平上皮,メラノーマ	色素性乾皮症(C)
ZNF145	7704	11q23.1	APL	
ZNF198	7750	13q11-q12	MPD, NHL	
ZNF278	23598	22q12-q14	ニューイング肉腫	
ZNF331	55422	19q13.3-q13.4	濾胞性甲状腺腫	
ZNF384	171017	12p13	ALL	
ZNF521	25925	18q11.2	ALL	
ZNF9	7555	3q21	動脈瘤性骨嚢胞	
ZNFN1A1	10320	7p12	ALL, DLBL	

実施例 2
イントロダクション

診断、モニター及び患者の層別化のために非常に予想可能な診断用プラットフォームが、個別医療の発展にとってキーとなる装置である。この例では、腫瘍細胞がインビトロで血液血小板へ(変異)RNAを転移すること、及び膠芽細胞腫及び前立性癌患者から分離した血液血小板が、癌関連RNAバイオマーカーEGFRvIII及びPCA3及びPSAをそれぞれ含むことを示す。さらに、遺伝子発現アレイは、膠芽細胞腫患者からの血小板中のmRNAが、正常コントロール被験者と比較して区別できる特徴を明らかにした。血小板は容易に入手でき、分離できることから、これらは癌の比較診断のための有力な

10

20

30

40

50

プラットフォームを形成し得る。

【0150】

方法

血小板分離及び組織切除

血小板は、EDTA抗凝固剤を含む紫色キャップのBDバキュテナー内に標準の遠心分離で収集し、純度と品質（活性及び凝固性）が顕微鏡で検査され、0.1%未満の赤血球又は白血球の混在が示された。次に、分離された血小板ペレットをさらに使用するために瞬間凍結させた。VU大学医学センター及びUmea大学で、文献（J. Skog et al., Nat Cell Biol. 10(12), 1470-6(2008)）に記載の方法で、膠芽細胞腫と前立腺癌患者から膠芽細胞腫組織切除及び全血液を採取した。

10

【0151】

マイクロベシクル分離、ラベル化及び転移

マイクロベシクルは、U87-EGFRvIII I I I 膠芽細胞腫細胞から分離し、既に記載された方法でラベル化した（J. Skogら、Nat Cell Biol. 10(12)、1470-6(2008)）。U87-dEGFRマイクロベシクルインキュベーションの後、血小板を洗浄し、RNアーゼ酵素で処理して、EGFRvIII I I I RNAが前記血小板へ転移され、それによりRNアーゼ媒介分解から保護されていることを保証した。共焦点顕微鏡分析のために、血小板構造を示すために前記血小板がテキサスレッド共役ジャームアグルチニンで染色され、緑色PKH67の存在によりマイクロベシクル取り込みを分析した。

20

【0152】

RNA精製

RNAは、miRvana (Ambion) 又はmiRNeasy (AQuiagen) を用いて製造者指示書に従って分離した。RNA濃度及び品質は、Bioanalyzer 2100により、全RNA Pico chip (Agilent) を用いて決定した。

【0153】

RT-PCR

EGFRvIII I I I、PCA3、PSA及びGAPDHのRT-PCRは、文献（J. Skogら、Nat Cell Biol. 10(12)、1470-6(2008)）に記載の方法で次のプライマーセットを用いて行った。

30

GAPDHプライマー：

前方 5' - GAAGGTGAAGGTCGGAGTC - 3'

後方 5' - TCAGAAAGATGGTGGGATTTTC - 3'

PSAプライマー：

前方 5' - ATGTGGGTCCCGGTTGTCTT - 3'

後方 5' - TCCACAAATCCGAGACAGGA - 3'

ネストPCA3プライマー：

PCR1：

前方 5' - AGTCCGCTGTGAGTCT - 3'

後方 5' - CCATTTTCAGCAGATGTGTGG - 3'

PCR2：

前方 5' - ATCGACGGCACTTTCTGAGT - 3'

後方 5' - TGTGTGGCCTCAGATGGTAA - 3'

ネストEGFRvIII I I Iプライマー：

PCR1：

前方 5' - CCAGTATTGATCGGGAGAGC - 3'

後方 5' - TGTGGATCCAGAGGAGGAGT - 3'

PCR2：

40

50

前方 5' - G A G C T C T T C G G G G A G C A G - 3 '
 後方 5' - G C C C T T C G C A C T T C T T A C A C - 3 '

【0154】

遺伝子発現アレイ

mRNA発現アレイは、VU大学医学センターマイクロアレイコア施設で、Agilent 4x44K 遺伝子発現アレイを用いて行った。血小板RNAの完全性はAgilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.)を用いて行った。RNAサンプルは、Agilent Low RNA Input Linear Amplification Kit Plus (5188-5340)を用いて製造者の指示書に従って行った。

10

【0155】

まとめると、25ngの全RNAを増幅し、cDNAへT7-ポリメラーゼを用いて転写し、Cys3又はCys5でラベル化した。色素導入は、Nanodrop ND-1000分光装置を用いて測定した。続いて、cRNAをAgilent Gene Expression Hybridization Kit (5188-5242)を用いて製造者の指示書に従ってハイブリダイゼーションした。即ち、825ngのCy3ラベル化cRNAを825ngのCy5ラベル化cRNAと30分間60℃で暗室内で断片化し、Agilent Hybridization Chamber Gasket Slide (G2534-60011)上で、65℃の回転恒温槽内で17時間ハイブリダイゼーションさせた。スライドはAgilent Microarray Scanner (G2565BA)を用いてスキャンした。画像分析及びアレイ正規化は、構造抽出ソフトウェアバージョン9.5 (Agilent Technologies, Inc.)を用いて実施した。Agilent GE2-v5_95手順をデフォルト設定を用いて適用した。

20

【0156】

統計分析

遺伝子発現データのヒートマップをエクセル (Microsoft Office 2007) で、S.A.M.分析プラグインを用いて、偽発見率<0.5%で、中間値中心アレイを用いて精製した。トップ30の有意に異なる発現遺伝子は、ヒートマップビルダv1.1ソフトウェア (Kingら、「Physiol Genomics. Sep 21 2005; 23(1): 103-118」)を用いて図示した。

30

【0157】

結果

この例では、健康なコントロール被験者から分離された血小板は、ヒト脳腫瘍細胞 (膠芽細胞腫) から誘導されたRNAを含有マイクロベシクルを取り込み、変異EGFRvIIIを含む腫瘍関連RNAを含むことが示された。PKH67ラベル化膠芽腫細胞誘導マイクロベシクルが、血液血小板でFACS分析及び共焦点顕微鏡で示される。加えて、健康なコントロール被験者から血小板への変異EGFRvIII RNAの血小板へのマイクロベシクル介在転移が生じることがRT-PCRにより示される。さらに、膠芽腫患者から分離された循環血小板がRNAバイオマーカーを含むことが決定された (図3B)。RT-PCRは、変異EGFRvIII mRNAが、切開された高度膠芽腫組織で見出され (n=18) るかどうかを決定するために使用され、その結果は、同じ患者からの血小板、及び健康なコントロール被験者からの血小板 (N=30) と比較された。前記サンプルは、コード化され、RT-PCRはブラインド検定で実施された。18の膠芽腫サンプルのうち4 (22.8%) は、以前の観察と同様にEGFRvIII転写物を含んでいた。特に、EGFRvIIIは、これらの4人のEGFRvIII陽性患者のうちの3人の血小板から増幅されたが、健康なドナーの血小板のいずれからも増幅されなかったが一方、GAPDH mRNAは全ての血小板サンプルで検出された。可能な偽陰性シグナルは一人の患者からのみ検出され、これは血液サンプルに処理が不適切であったことによる。逆に、一人のEGFRvIII陰性組織サンプルの患者は、血小板サンプルでEGFRvIII陽性

40

50

であり、これは高度の膠芽腫でのEGFRvIII陽性の病巣が不均一であることによるものである。

【0158】

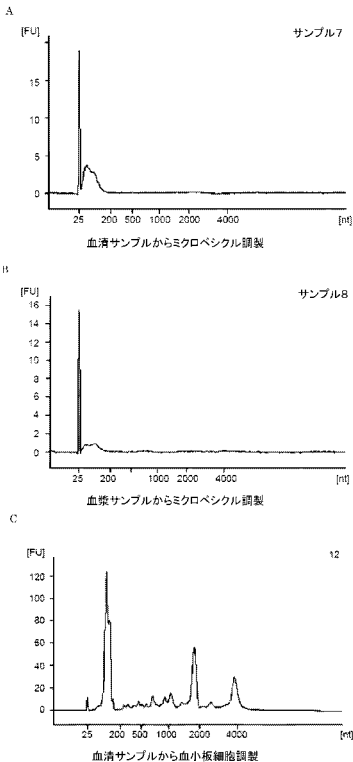
腫瘍関連メッセージの存在は、膠芽腫患者からの血小板に特有ではなく、前立腺癌患者(n=12)からの血小板中には前立腺癌マーカーPCA3及びPSAをコードするmRNA存在し、さらに健康なコントロール被験者(n=19)からの血小板には存在しないことを報告する(図4参照)。最後に遺伝子発現アレイを用いて、健康なコントロール被験者(n=12)及び膠芽腫患者(n=8)から分離された血小板のmRNA発現プロファイルが決定された。区別されたmRNA発現プロファイルが得られ、最小の膠芽腫バイオマーカー特徴が検出された(図1C、左側)。興味あることに、いくつかの可能なバイオマーカーは、コントロールサンプルではほとんど検出されず、膠芽腫サンプルではこれらは非常に強く発現されていた(図1C、右側)。

10

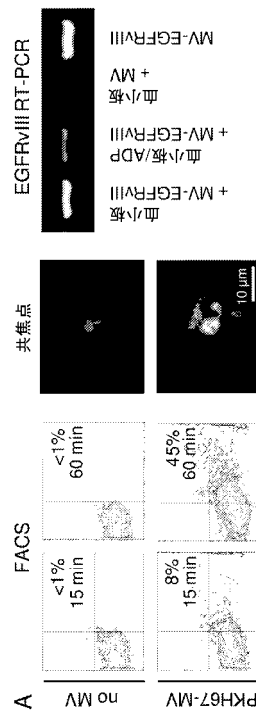
【0159】

結論として、本発明者の発見は、欠形血小板は、腫瘍由来又は腫瘍関連RNAを形で癌マーカーを含み、それにより、個別化医療の点で、癌の分子プロファイルのための診断プラットフォームとして利用することができる、ということを示す。

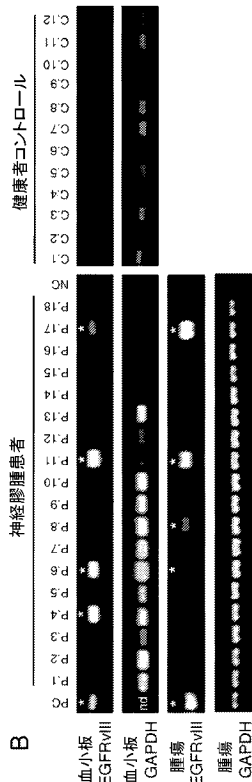
【図1】



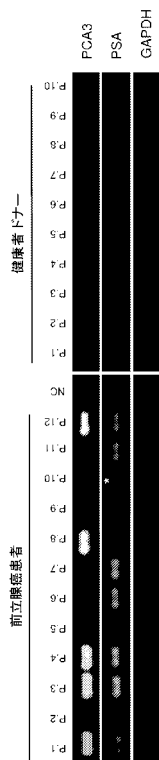
【図3A】



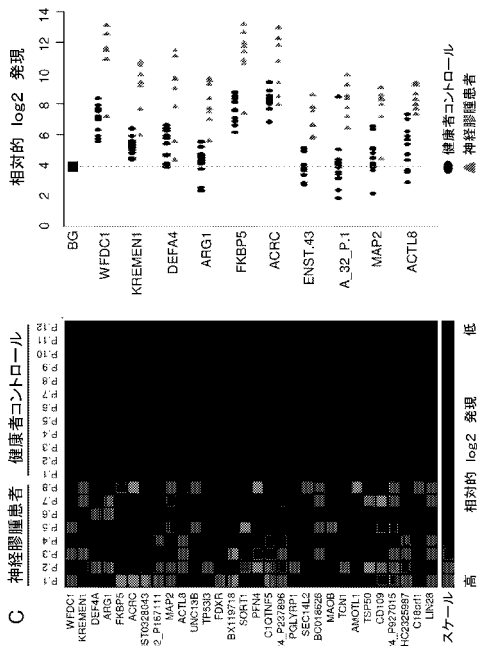
【 図 3 B 】



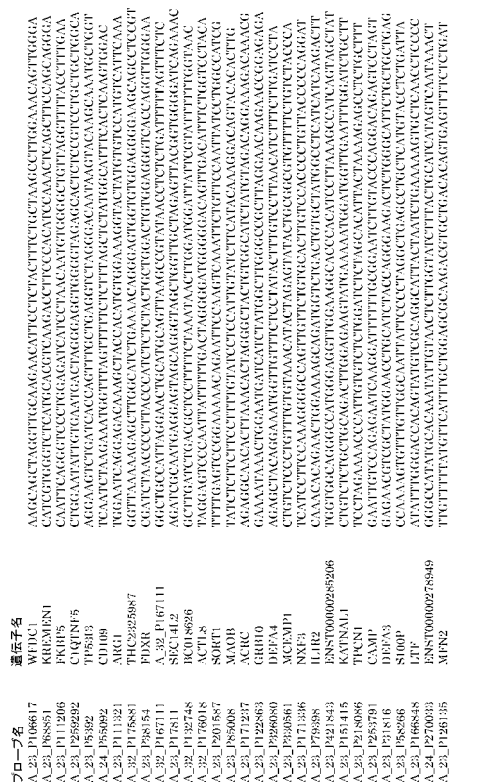
【 図 4 】



【 図 3 C 】

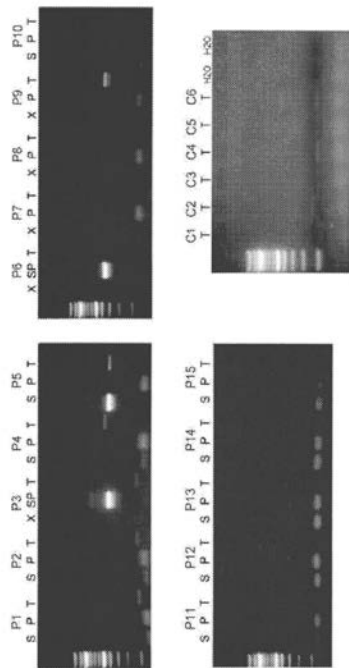


【 図 5 】



プローブ名	遺伝子名
A_23_P106617	WFDC1
A_23_P188851	KREMEN1
A_23_P112006	PRF5
A_23_P129292	C10orf5
A_23_P155092	CD109
A_23_P111321	A_23_P11321
A_23_P178451	TH228897
A_23_P28154	PDXR
A_23_P167111	A_32_P167111
A_23_P178111	SEC14.2
A_23_P132748	DC018626
A_23_P116018	ACTL8
A_23_P186487	UNCL36
A_23_P171237	ANKRD1
A_23_P122563	GRH10
A_23_P226080	DFP4
A_23_P230581	MCEM1
A_23_P171396	NKF1
A_23_P79398	IL1R2
A_23_P421543	ENST0000025206
A_23_P130162	ANKRD11
A_23_P14912	TH228897
A_23_P181816	DFP4.3
A_23_P158296	S100P
A_23_P168448	LTF
A_24_P1270033	ENST00000278849
A_23_P128135	MFN2

【 図 2 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】平成28年7月25日(2016.7.25)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

癌を患う被験者の分類を補助する方法であって、当該方法は：

- 第1の時点で癌マーカーの存在について被験者から採取された血液サンプルを分析することにより、前記被験者の前記癌マーカーのレベルの第1の値を与えるステップであり、前記分析は、

(a) 前記被験者から採取された前記血液サンプル内の無核血液細胞から核酸を抽出し、無核血液細胞抽出核酸画分を提供するステップ、及び

(b) 前記無核血液細胞抽出核酸画分を癌マーカーの存在について分析するステップを含み、

前記癌マーカーが、前記被験者の有核細胞の遺伝子の癌特異的変異であるか、

前記癌マーカーが、前記被験者の有核細胞の遺伝子の癌特異的発現プロファイルであり、

前記癌が、固形腫瘍癌である、

方法を使用して行われる、ステップ、

- 第2の時点で、癌マーカーの存在について被験者から採取された血液サンプルを分析することにより、前記被験者の前記癌マーカーのレベルの第2の値を与えるステップであり

前記分析は、

(a) 前記被験者から採取された前記血液サンプル内の無核血液細胞から核酸を抽出し、無核血液細胞抽出核酸画分を提供するステップ、及び

(b) 前記無核血液細胞抽出核酸画分を癌マーカーの存在について分析するステップを含み、

前記癌マーカーが、前記被験者の有核細胞の遺伝子の癌特異的変異であるか、又は前記癌マーカーが、前記被験者の有核細胞の遺伝子の癌特異的発現プロファイルであり、

前記癌が、固形腫瘍癌である、

方法を使用して行われ、

前記被験者が前記第 1 の時点及び前記第 2 の時点の間に癌治療の対象とされている、ステップ、並びに

- 前記第 1 の値と前記第 2 の値とを比較することにより、前記被験者の前記分類を補助するステップであり、前記分類は、前記被験者の前記癌の段階又は前記被験者への前記癌治療の有効性の決定を含む、ステップ、

を含む、方法。

【請求項 2】

癌を患う被験者の分類を補助する方法であって、当該方法は：

- 癌マーカーの存在について被験者から採取された血液サンプルにつき分析し、それにより前記被験者の癌マーカーのレベルとして一つの試験値を提供するステップであり、前記分析は、

(a) 前記被験者から採取された前記血液サンプル内の無核血液細胞から核酸を抽出し、無核血液細胞抽出核酸画分を提供するステップ、及び

(b) 前記無核血液細胞抽出核酸画分を癌マーカーの存在について分析するステップを含み、

前記癌マーカーが、前記被験者の有核細胞の遺伝子の癌特異的変異であるか、又は前記癌マーカーが、前記被験者の有核細胞の遺伝子の癌特異的発現プロファイルであり、

前記癌が、固形腫瘍癌である、

方法を使用して行われる、ステップ、

- 前記癌マーカーのレベルについての参照値を提供するステップであり、前記参照値は前記癌の特定の段階に関連付けられる、ステップ、及び

- 前記試験値と、前記被験者の前記癌の段階を決定するための前記参照値とを比較することにより、前記被験者の前記分類を補助するステップであり、前記分類は、前記被験者の前記癌の段階の決定を含む、ステップ、

を含む、方法。

【請求項 3】

被験者の診断を補助する方法であって、当該方法は、

(a) 前記被験者から採取された血液サンプル内の無核血液細胞から核酸を抽出し、無核血液細胞抽出核酸画分を提供するステップ、及び

(b) 前記無核血液細胞抽出核酸画分を癌マーカーの存在について分析するステップ、を含み、

前記癌マーカーが、前記被験者の有核細胞の遺伝子の癌特異的変異であるか、又は

前記癌マーカーが、前記被験者の有核細胞の遺伝子の癌特異的発現プロファイルであり、前記癌が、固形腫瘍癌であり、

当該方法は、前記被験者の前記診断を補助する方法の一部であり、かつ前記無核血液細胞抽出核酸画分内の前記癌マーカーの存在が、前記癌を患う前記被験者を指示する、

方法。

【請求項 4】

請求項 1 乃至 3 のいずれか一項に記載の方法であり、前記無核血液細胞が血小板又は赤血球である、方法。

【請求項 5】

請求項 1 乃至 4 のいずれか一項に記載の方法であり、前記癌が、結腸癌、膵臓癌、脳腫

瘍、膀胱癌、乳癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮癌、肝臓癌、腎臓癌、脾臓癌、胸腺癌、甲状腺癌、神経組織癌、上皮組織癌、リンパ節癌、骨肉腫、筋腫瘍及び皮膚癌から選択される、方法。

【請求項 6】

請求項 1 乃至 5 のいずれか一項に記載の方法であり、前記癌特異的変異が染色体遺伝子であるか、又は前記癌特異的発現プロファイルが染色体遺伝子のものである、方法。

【請求項 7】

請求項 1 乃至 6 のいずれか一項に記載の方法であり、前記核酸が、リボ核酸 (RNA) である、方法。

【請求項 8】

請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載の方法であり、前記核酸が、mRNA である、方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/49	(2006.01)	G 0 1 N	33/49	X
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	P
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	F

(31)優先権主張番号 10169897.5

(32)優先日 平成22年7月16日(2010.7.16)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(72)発明者 ニルソン, ロルフ ヨナス

オランダ国 1 0 8 1 ハーフェー アムステルダム, デー ポエルラン 1 0 8 5, カーマー

エフ 5 4 5, フェーユーントフェーユーエムセー内

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 DA13 DA14

4B029 AA07 BB11 FA03 FA12

4B063 QA01 QA17 QA19 QQ03 QQ08 QQ53 QR08 QR56 QR62 QR66

QR82 QS10 QS14 QS24 QS34 QS39 QX02

4C084 AA17 NA20 ZB262 ZB272

专利名称(译)	用于分析受试者的血液样品中疾病标记物的存在的方法		
公开(公告)号	JP2017018099A	公开(公告)日	2017-01-26
申请号	JP2016133808	申请日	2016-07-06
[标]申请(专利权)人(译)	STICHTING VU VUMC		
[标]发明人	ウルディングアトーマス ニルソンロルフヨナス		
发明人	ウルディングアトーマス ニルソン,ロルフ ヨナス		
IPC分类号	C12Q1/68 C12M1/00 A61K45/00 A61P35/00 A61P35/02 G01N33/49 G01N33/50 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6827 C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12M1/00.A A61K45/00 A61P35/00 A61P35/02 G01N33/49.X G01N33/50.P G01N33/53.M C12N15/00.F C12N15/09.200 C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6827.C C12Q1/6827.Z C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z G01N33/49.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/DA13 2G045/DA14 4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/FA03 4B029/FA12 4B063/QA01 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS10 4B063/QS14 4B063/QS24 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/NA20 4C084/ZB262 4C084/ZB272		
代理人(译)	伊藤忠彦		
优先权	2011167973 2011-05-27 EP 2011158912 2011-03-18 EP 61/364831 2010-07-16 US 2010169897 2010-07-16 EP		
其他公开文献	JP6171057B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种分析受试者血样中是否存在疾病标记物的方法。(A)非核血细胞，优选地，以提取从血小板细胞，其中的血液样品中，非核血细胞提取步骤提供了一个核酸部分的核酸，和(b)的无籽血细胞中提取核酸部分，其包括用于疾病标志物的存在分析的步骤中，疾病标记物是受试者的有核细胞的基因中的疾病特异性突变，或疾病标记物是受试者的有核细胞的基因的疾病特异性表达谱。

