

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4824575号
(P4824575)

(45) 発行日 平成23年11月30日(2011.11.30)

(24) 登録日 平成23年9月16日(2011.9.16)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53 M
G O 1 N	33/574	(2006.01)	G O 1 N 33/574 Z

請求項の数 44 (全 137 頁)

(21) 出願番号	特願2006-542730 (P2006-542730)	(73) 特許権者	506051278
(86) (22) 出願日	平成16年12月1日(2004.12.1)		エビゲノミクス アクチェンゲゼルシャフト
(65) 公表番号	特表2007-525208 (P2007-525208A)		ト
(43) 公表日	平成19年9月6日(2007.9.6)		ドイツ連邦共和国, デー-10178 ベ
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/040289		ルリン, クリーネ プラジデンテンシュト
(87) 国際公開番号	W02005/054517		ラーセ 1
(87) 国際公開日	平成17年6月16日(2005.6.16)	(74) 代理人	100099759
審査請求日	平成19年11月30日(2007.11.30)		弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	03090414.8	(74) 代理人	100077517
(32) 優先日	平成15年12月1日(2003.12.1)		弁理士 石田 敬
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100087871
(31) 優先権主張番号	04090040.9		弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成16年2月10日(2004.2.10)	(74) 代理人	100087413
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺細胞増殖性疾患の発症に関連する遺伝子発現の分析のための方法および核酸

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検者の前立腺細胞増殖性疾患の発見および/または弁別を補助するための、次のステップを含む方法:

- 被検者から獲得した生体サンプル中に含まれる被検ゲノムDNAまたはその断片を、該ゲノムDNAまたはその断片の標的配列の内部のメチル化および非メチル化CpGジヌクレオチド配列を弁別するための1つまたは複数の試薬と接触させるステップであって、該標的配列は配列番号36の少なくとも16連続ヌクレオチドを含む配列を含むかまたは該配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを、また該連続ヌクレオチドは少なくとも1つのCpGジヌクレオチドを含むことを、特徴とするステップ; および

- 該弁別に少なくとも部分的に基づいて、少なくとも1つの標的CpGジヌクレオチド配列のメチル化状態、または複数の標的CpGジヌクレオチド配列の平均メチル化状態または平均メチル化状態を反映する値を決定し、以って前立腺細胞増殖性疾患の発見を、または発見と弁別を、少なくとも部分的に実現するステップ。

【請求項 2】

標的配列の内部のメチル化および非メチル化CpGジヌクレオチド配列を弁別するステップは、該標的配列内の非メチル化シトシン塩基のウラシルへの、またはハイブリダイゼーション特性の点でシトシンとは検出可能に異なる別の塩基への、変換を含む請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

標的配列の内部のメチル化および非メチル化CpGジヌクレオチド配列を弁別するステップは、配列番号130、131および該標的配列に対応するそれらの連続領域からなる群より選択される配列の内部での、少なくとも1つのCpGジヌクレオチド配列の、対応する変換または非変換ジヌクレオチド配列へのメチル化状態依存的な変換または非変換のステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

生体サンプルは細胞系、組織スライド、生検、パラフィン包埋組織、体液、射精された精液、尿、血液、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される請求項1に記載の方法。

【請求項5】

標的配列の内部のメチル化および非メチル化CpGジヌクレオチド配列を弁別するステップは、配列番号130、131およびそれらの相補体からなる群より選択される配列と相補的である、または中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする、鎖長15ヌクレオチド以上の連続配列を各々含む少なくとも1つの核酸分子またはペプチド核酸(PNA)分子の使用を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

連続配列は少なくとも1つのCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチド配列を含む請求項5に記載の方法。

【請求項7】

少なくとも2つの核酸分子またはペプチド核酸(PNA)分子の使用を含む請求項5に記載の方法。

【請求項8】

少なくとも2つの核酸分子またはペプチド核酸(PNA)分子の、プライマーオリゴヌクレオチドとして使用であって、配列番号130、131; それらの相補体; およびそれらの配列の該プライマーを含むまたは該プライマーとストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする領域; からなる群より選択される配列の増幅のための使用を含む、請求項5に記載の方法。

【請求項9】

少なくとも4つの核酸分子またはペプチド核酸(PNA)分子の使用を含む請求項5に記載の方法。

【請求項10】

被検者の前立腺細胞増殖性疾患の発見を補助するまたは発見および弁別を補助するための、次のステップを含む方法:

- b. 被検者から獲得した生体サンプル中に含まれる被検ゲノムDNAを抽出する、または他の方法で分離するステップ;
- c. ステップb)のゲノムDNAまたはその断片を1つまたは複数の試薬で処理して5位非メチル化シトシン塩基をウラシルへと、またはハイブリダイゼーション特性の点でシトシンとは検出可能に異なる別の塩基へと、変換するステップ;
- d. 該処理ゲノムDNAまたはその処理断片を増幅酵素および少なくとも2つのプライマーと接触させるステップであって、該プライマーは各々、配列番号130、131およびそれらの相補体からなる群より選択される配列と相補的である、または中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする、鎖長15ヌクレオチド以上の連続配列を含むこと、また該処理DNAまたはその断片は増幅されて少なくとも1つの増幅産物を生み出す、または増幅されないことを特徴とするステップ; および
- e. 該増幅産物の存否または性質を基に、配列番号36の配列の少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのメチル化状態を、または配列番号36の配列の複数のCpGジヌクレオチドの平均メチル化状態または平均メチル化状態を反映する値を、決定し、以って前立腺細胞増殖性疾患の発見を、または発見と弁別を、少なくとも部分的に実現するステップ。

【請求項11】

ステップc)でのゲノムDNAまたはその断片の処理は亜硫酸水素塩、亜硫酸水素、二亜硫

10

20

30

40

50

酸塩およびそれらの組み合わせからなる群より選択される試薬の使用を含む請求項10に記載の方法。

【請求項12】

ステップd)での接触または増幅は、増幅酵素としての耐熱性DNAポリメラーゼの使用；5' 3' エクソヌクレアーゼ活性を欠く酵素の使用；ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法の使用；検出可能な標識を付けた増幅産物核酸分子の生成；およびそれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも1つの方法の使用を含む請求項10に記載の方法。

【請求項13】

検出可能な増幅産物標識は蛍光標識；放射性核種または放射性標識；質量分析計で検出する増幅産物質量標識；質量分析計で検出するシングルポジティブまたはシングルネガティブな正味電荷をもつ増幅産物、および検出可能な増幅産物断片質量標識；およびそれらの組み合わせからなる群より選択される請求項12に記載の方法。

10

【請求項14】

被検者に由来する生体サンプルは細胞系、組織スライド、生検、パラフィン包埋組織、体液、射精された精液、尿、血液、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される請求項10に記載の方法。

【請求項15】

ステップd)で、配列番号130、131およびそれらの相補体からなる群より選択される配列と相補的である、または中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、鎖長15ヌクレオチド以上の連続配列を各々含む核酸分子またはペプチド核酸分子であって、そのハイブリダイゼーション相手となる核酸の増幅を抑制する働きをする少なくとも1つの核酸分子またはペプチド核酸分子の使用をさらに含む、請求項10に記載の方法。

20

【請求項16】

核酸分子またはペプチド核酸分子は各々、5' 3' エクソヌクレアーゼ活性をもつ酵素による分解を受けないように5' 末端が修飾されている請求項15に記載の方法。

【請求項17】

核酸分子またはペプチド核酸分子は各々、3' ヒドロキシル基を欠く請求項15に記載の方法。

【請求項18】

増幅酵素は5' 3' エクソヌクレアーゼ活性を欠くポリメラーゼである請求項15に記載の方法。

30

【請求項19】

ステップe)での決定は、配列番号130、131およびそれらの相補体からなる群より選択される配列と相補的である、または中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、鎖長15ヌクレオチド以上の連続配列を各々含む少なくとも1つの核酸分子またはペプチド核酸分子のハイブリダイゼーションをさらに含む、請求項10に記載の方法。

【請求項20】

少なくとも1つのハイブリダイズする核酸分子またはペプチド核酸分子は固相に結合される請求項19に記載の方法。

40

【請求項21】

複数のハイブリダイズする核酸分子またはペプチド核酸分子が、直線状または実質的に直線状のアレイ、六角形または実質的に六角形のアレイ、四角形または実質的に四角形のアレイ、およびそれらの組み合わせからなるアレイ群より選択される核酸またはペプチド核酸アレイの形で固相に結合される、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

少なくとも1つのハイブリダイズした核酸分子を少なくとも1ヌクレオチド塩基分だけ伸張するステップをさらに含む請求項20に記載の方法。

【請求項23】

50

ステップe)での決定は増幅産物の配列決定を含む請求項10に記載の方法。

【請求項24】

ステップd)での接触または増幅はメチル化特異的プライマーの使用を含む請求項10に記載の方法。

【請求項25】

ステップd)で、1つまたは複数のCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含むプライマーオリゴヌクレオチドの使用を含み、またステップe)で、

配列番号130、131およびそれらの相補体からなる群より選択される配列と相補的である、または中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする、鎖長15ヌクレオチド以上の連続配列を各々含む少なくとも1つの核酸分子またはペプチド核酸分子のハイブリダイゼーション；

10

配列番号130、131およびその相補体からなる群より選択される配列と相補的である、または中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする、鎖長15ヌクレオチド以上の連続配列を含む、少なくとも1つの、固相に結合された核酸分子のハイブリダイゼーション；

配列番号130、131およびその相補体からなる群より選択される配列と相補的である、または中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする、鎖長15ヌクレオチド以上の連続配列を含む少なくとも1つの核酸分子のハイブリダイゼーション、および少なくとも1つの、そうしたハイブリダイズした核酸分子の少なくとも1ヌクレオチド塩基分の伸長；および

20

ステップe)での増幅産物の配列決定；

からなる群より選択される少なくとも1つの方法の使用をさらに含む、請求項10に記載の方法。

【請求項26】

ステップd)で、配列番号130、131およびそれらの相補体からなる群より選択される配列と相補的である、または中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする、鎖長15ヌクレオチド以上の連続配列を各々含む核酸分子またはペプチド核酸分子であって、そのハイブリダイゼーション相手となる核酸の増幅を抑制する働きをする少なくとも1つの核酸分子またはペプチド核酸分子の使用を含み、またステップe)で、

30

配列番号130、131およびそれらの相補体からなる群より選択される配列と相補的である、または中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする、鎖長15ヌクレオチド以上の連続配列を各々含む少なくとも1つの核酸分子またはペプチド核酸分子のハイブリダイゼーション；

配列番号130、131およびその相補体からなる群より選択される配列と相補的である、または中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする、鎖長15ヌクレオチド以上の連続配列を含む、少なくとも1つの、固相に結合された核酸分子のハイブリダイゼーション；

配列番号130、131およびその相補体からなる群より選択される配列と相補的である、または中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする、鎖長15ヌクレオチド以上の連続配列を含む少なくとも1つの核酸分子のハイブリダイゼーション、および少なくとも1つの、そうしたハイブリダイズした核酸分子の少なくとも1ヌクレオチド塩基分の伸長；および

40

ステップe)での増幅産物の配列決定；

からなる群より選択される少なくとも1つの方法の使用をさらに含む、請求項10に記載の方法。

【請求項27】

ステップd)で1つまたは複数のCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含むプライマーオリゴヌクレオチドによる増幅を含み、またステップe)で、配列番号130および131からなる群より選択される配列と相補的である、または中程度にストリンジェントなまたはストリン

50

ジェントな条件の下でハイブリダイズする、鎖長15ヌクレオチド以上の連続配列を含む少なくとも1つの、検出可能に標識した核酸分子のハイブリダイゼーションをさらに含む、請求項10に記載の方法。

【請求項28】

ステップd)で、配列番号130、131およびそれらの相補体からなる群より選択される配列と相補的である、または中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする、鎖長15ヌクレオチド以上の連続配列を各々含む核酸分子またはペプチド核酸分子であって、そのハイブリダイゼーション相手となる核酸の増幅を抑制する働きをする少なくとも1つの核酸分子またはペプチド核酸分子の使用を含み、またステップe)で、配列番号130および131からなる群より選択される配列と相補的である、または中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする、鎖長15ヌクレオチド以上の連続配列を含む少なくとも1つの、検出可能に標識した核酸分子のハイブリダイゼーションをさらに含む、請求項10に記載の方法。

10

【請求項29】

被検者の前立腺細胞増殖性疾患の発見を補助するまたは発見および弁別を補助するための、次のステップを含む方法：

b. 被検者から獲得した生体サンプル中に含まれる被検ゲノムDNAを抽出する、または他の方法で分離するステップ；

c. 配列番号36、およびストリンジェントな条件の下でそれとハイブリダイズする配列からなる群より選択される配列の少なくとも16連続ヌクレオチドを含むステップb)由来ゲノムDNAまたはその断片を、1つまたは複数のメチル化感受性制限酵素と接触させるステップであって、該ゲノムDNAがそれによって各切断認識モチーフにおいて消化されて消化断片を生成するか、またはそれによって消化されないことを特徴とするステップ；および

20

d. 該消化断片の存否または性質を基に、配列番号36の配列の少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのメチル化状態を、または配列番号36の配列の複数のCpGジヌクレオチドの平均メチル化状態または平均メチル化状態を反映する値を、決定し、以って前立腺細胞増殖性疾患の発見を、または発見と弁別を、少なくとも部分的に実現するステップ。

【請求項30】

ステップd)での決定に先立って、消化または非消化ゲノムDNAの増幅をさらに含む請求項29に記載の方法。

30

【請求項31】

増幅は、増幅酵素としての耐熱性DNAポリメラーゼの使用；5' 3' エクソヌクレアーゼ活性を欠く酵素の使用；ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法の使用；検出可能な標識を付けた増幅産物核酸分子の生成；およびそれらの組み合わせからなる群より選択される少なくとも1つの方法の使用を含む請求項30に記載の方法。

【請求項32】

検出可能な増幅産物標識は蛍光標識；放射性核種または放射性標識；質量分析計で検出する増幅産物質量標識；質量分析計で検出するシングルポジティブまたはシングルネガティブな正味電荷をもつ増幅産物、および検出可能な増幅産物断片質量標識；およびそれらの組み合わせからなる群より選択される請求項31に記載の方法。

40

【請求項33】

被検者に由来する生体サンプルは細胞系、組織スライド、生検、パラフィン包埋組織、体液、射精された精液、尿、血液、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される請求項29に記載の方法。

【請求項34】

配列番号36に由来する処理済み核酸であって、該処理は該ゲノムDNA配列の少なくとも1つの非メチル化シトシン塩基をウラシルへと、またはハイブリダイゼーション特性がシトシンとは検出可能に異なる別の塩基へと、変換することを特徴とする処理済み核酸。

【請求項35】

配列番号130、131、248、249およびそれらの相補配列からなる群より選択される処理済

50

みゲノムDNA配列の少なくとも16連続ヌクレオチドを含む核酸であって、該処理は該ゲノムDNA配列の少なくとも1つの非メチル化シトシン塩基をウラシルへと、またはハイブリダイゼーション特性がシトシンとは検出可能に異なる別の塩基へと、変換することを特徴とする核酸。

【請求項36】

連続塩基配列は少なくとも1つのCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチド配列を含む請求項35に記載の核酸。

【請求項37】

処理は亜硫酸水素塩、亜硫酸水素、二亜硫酸塩およびそれらの組み合わせからなる群より選択される試薬の使用を含む請求項35に記載の核酸。

10

【請求項38】

配列番号36の配列の処理済みゲノムDNA配列と相補的である、または中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする、鎖長15ヌクレオチド以上の連続配列を含むオリゴマー。

【請求項39】

少なくとも1つのCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチド配列を含む請求項38に記載のオリゴマー。

【請求項40】

各々請求項38または39に記載の少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴマーセット。

20

【請求項41】

被検者の前立腺細胞増殖性疾患の発見、または発見と弁別に有用なキットであって、
 - 亜硫酸水素塩試薬またはメチル化感受性制限酵素のうちの少なくとも1つ；および
 - 配列番号130、131、248、249およびその相補体からなる群より選択される配列と相補的である、または中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする、鎖長15ヌクレオチド以上の連続配列を各々含む、少なくとも1つの核酸分子またはペプチド核酸分子；
 を含むキット。

【請求項42】

MS-SNuPE、MSP、MethyLight、HeavyMethyl、核酸配列決定法、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるメチル化アッセイ法を実行するための標準試薬類をさらに含む請求項41に記載のキット。

30

【請求項43】

請求項1～33のいずれか1項に記載の方法の前立腺細胞増殖性疾患の発見および/または弁別の補助への使用。

【請求項44】

請求項34～37のいずれか1項に記載の核酸、請求項38および39のいずれか1項に記載のオリゴマー、請求項40に記載のオリゴマーセット、および請求項41および42のいずれか1項に記載のキットの、前立腺細胞増殖性疾患の発見および/または弁別の補助への使用。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は前立腺がん患者でヘテロ発現パターンの変化を示すヒトDNA配列に関する。本発明は特定の実施態様において、該疾患を患う個人の診断方法を提供する。

【0002】

関連出願へのクロスリファレンス

本願は下記の出願について優先権の利益を主張する：欧州特許出願第03090414.8号(出願日2003年12月01日)；欧州特許出願第04090040.9号(出願日2004年02月10日)；欧州特許出願第04090187.8号(出願日2004年05月10日)；および欧州特許出願第04090292.6号(出願日2004年07月21日)；以上の関連出願は参照によりここにその全体が開示される。

50

【 0 0 0 3 】

配列表

配列表は米連邦規則集第37編1.52条(e)項(5)[37 C.F.R. § 1.52(e)(5)]に従って“ 47675-95 Sequence Listing.txt ”という名前の1.64MBテキスト・ファイルとしてコンパクト・ディスク(1/1)に収めた。同ファイルは参照によりここにその全体が開示される。

【 背景技術 】

【 0 0 0 4 】

異常DNAメチル化とがんの相関: CpG「島」内の異常DNAメチル化は、広範囲の遺伝子の抑止または過剰発現につながるCpGジヌクレオチド配列の高メチル化または低メチル化を特徴とし、またヒト悪性腫瘍中に見られ該腫瘍と相関する最も初期の、最も一般的な変化の1つである。さらに、異常メチル化はある種の腫瘍に対応する遺伝子のイントロンおよびコード両領域内のCpGリッチ調節配列中に起こることが示されている。たとえば結腸がんでは異常DNAメチル化は最も顕著な変化の1つであり、また特にp14ARF、p16INK4a、THBS1、MINT2、MINT31といった多数のがん抑制遺伝子やhMLH1などのDNAミスマッチ修復遺伝子を不活性化する。

10

【 0 0 0 5 】

がん細胞では、がん抑制遺伝子の特異的高メチル化に加えてDNA全般の低メチル化を観察することもできる。こうした広範囲の低メチル化は早期に、明らかな腫瘍形成が起こるはるか前に、検出することができる。低メチル化と遺伝子発現増大の間の相関は多数のがん遺伝子で解明されている。

20

【 0 0 0 6 】

前立腺がん: 前立腺がんは米国では男性の最も一般的な悪性腫瘍であり(新患数は約20万人/年)、全世界では男性がん関連死因の第6位(約20万4,000人/年)を占める。前立腺がんは主に高齢者の疾患であり、60~79歳の年齢層の男性は約16%がこの疾患をもつ。剖検での若干の推定によれば、80歳超の全男性の80%は何らかの前立腺疾患(がん、BPH、前立腺炎など)をもっている。BPH(良性前立腺肥大)は50歳以上の男性の約50%に、また75歳以上の男性の95%に存在する。これらの報告から明らかなように、前立腺がんは男性の死病というよりも死の道連れであることが多い。最近の証拠が示唆するところでは、前立腺がんの罹患率は実際には低下している模様であり、治療の改善、手術の改善、早期発見などの結果と思われる。

30

【 0 0 0 7 】

前立腺がんの診断; 分子的アプローチ: 前立腺がん検診に関する米国がん学会の現行ガイドラインは次のような内容となっている: 50歳で前立腺特異抗原(PSA)の血液検査を行い、また直腸指診(DRE)を受けるよう、健康管理の専門家は勧めるのがよい。アフリカ系アメリカ人や前立腺疾患の家族歴がある人々などの高リスク集団は45歳から検診を受け始めるのがよいとされる。前立腺の異常な病変を欠く男性は一般にPSA値が4ng/ml未満である。PSA値が4ng/ml~10ng/ml(いわゆる「グレーゾーン」)の範囲内なら前立腺がんである確率は25%である。結果として、「DRE異常、PSAグレーゾーン」所見の男性は75%の確率で陰性の、すなわち一見無用の生検を受けることとなる。このグレーゾーンを超えると、前立腺がんである確率は高くなり(>67%)、またPSA値の上昇に伴いさらに高まる。種々のPSA(%遊離PSA、PSA増加速度、PSA密度など)測定法があり、各々にがんの存在を発見する精度が対応している。しかし、検出技術の若干の改善や検診絡みの死亡率低下の報告にもかかわらず、偽陽性発生率は相変わらず高い。低特異度はBPHや前立腺炎に伴う血中PSAの上昇に由来する。

40

【 0 0 0 8 】

TRUSガイド下生検は前立腺がん診断の「至適基準」とみなされている。生検は異常PSA値および/またはDRE異常に基づいて推奨される。PSAには、高い割合の生検が不必要とされるようなグレーゾーンがある。それでも、このグレーゾーン(PSA値4.0~10ng/ml)のがんの発見は生検抜きには不可能である。こうした低特異度のために、生検を受ける男性の75%はがんをもたない。しかし生検抜きではがんをもつ人々が見逃されるため、結果的に

50

罹患率と死亡率を高めることになる。あいにく無用の生検には高いリスクも伴う。

【0009】

分子マーカーには、ごく小さなサイズのサンプルおよび/または組織構造がもはや維持されていないサンプルでもきわめて効率的に分析しようといった利点がある。この10年間に、多数の遺伝子について良性前立腺肥大と種々の悪性度の前立腺がんの間の発現差が研究されてきた。しかし、前立腺がんの臨床診断に十分であると判明した単一マーカーはまだない。

【0010】

あるいは、mRNAに基づく高次元アプローチが種々の腫瘍タイプおよび良性、悪性病変を弁別する、より優れた手段をもたらすかもしれない。しかし、臨床環境でのルーチン診断ツールとしてのその応用はmRNAの極端な不安定性、ある種の誘因(たとえばサンプル採取)が作用した後に急速に起こる発現の変化によって、および最も重要なことに、ルーチン生検ではしばしば獲得不可能であるほどの大量のmRNAが分析に必要とされることなどによって、阻まれている(たとえばLipshutz, R.J. et al., *Nature Genetics* 21:20-24, 1999; Bowtell, D.D.L., *Nature Genetics Suppl.* 21:25-32, 1999を参照)。

【0011】

前立腺がんにおける遺伝子の異常メチル化はGstp1、AR、p16 (CDKN2a/INK4a)、CD44、CDH1などを含むいくつかの遺伝子ですすでに観測されている。たとえばLINE-1反復配列のゲノム規模での低メチル化もまたすでに腫瘍進行に関連付けられている(Santourlidis, S., et al., *Prostate* 39:166-74, 1999)。

【0012】

前立腺がんのメチル化マーカー: グルタチオンS-トランスフェラーゼP遺伝子(GSTP1; アクセション番号NM 000852)のコアプロモーター領域は前立腺腫瘍組織中で高メチル化状態にあることが示されている。グルタチオンS-トランスフェラーゼ 酵素は求電子性発がん物質の無害化に関与しており、また酵素活性の障害または低下(GSTP1障害)は新生物の、特に前立腺での発生に関連付けられてきた。GSTP1障害の機序は変異(GSTP*B対立遺伝子はがんリスクの増大に関連付けられてきた)およびメチル化を含む。しかし、Gstp1マーカーの使用に関しては、先行技術はメチル化状態の差異について解析を終えたGstp1プロモーターCpG配列の数に制限される。そのうえ、先行技術にはそうしたマーカーを使用して良性前立腺肥大と種々の悪性度の前立腺がんを弁別するための方法について開示、示唆または教示が何もない。

【0013】

前立腺がんにおける遺伝子の異常メチル化はAR、p16 (CDKN2a/INK4a)、CD44、CDH1などを含むいくつかの他遺伝子ですすでに観測されている。たとえばLINE-1反復配列のゲノム規模での低メチル化もまたすでに腫瘍進行に関連付けられている(Santourlidis, S., et al., *Prostate* 39:166-74, 1999)。

【0014】

しかし、診断的に有用な、または他の面で臨床的に有用な、代用または補足マーカーとしてのこれらの遺伝子の、業務環境での使用は可能となるに至っていない。メチル化差異を示す遺伝子を臨床的に利用可能なプラットフォームへと適用するには、そうした遺伝子の感度および特異度についての多大の研究がさらになお必要である。たとえば公知の転移抑制CD44遺伝子の場合には、下方制御は高メチル化と関係があった。しかし、この遺伝子は正常組織でもメチル化されるため、業務用マーカーとして使用することは不可能であった(Vis, et al., *Mol Urol.* 5:199-203, 2001)。

【0015】

医療検査法の開発: 任意の医療検診および診断検査法に関する2つの評価的尺度は感度と特異度であり、それらは個々の罹患者をすべて正確に例外なく、また対象疾患のない非罹患者を誤って含めることなく、見分けられるという点での検査法の性能(陽性適中率)の尺度である。歴史的には、多数の診断検査法が感度と特異度の低さを批判されてきた。真陽性(TP)は検査が陽性であり、対象疾患も存在する場合である。偽陽性(FP)は検査が陽性

10

20

30

40

50

であるが、対象疾患は存在しない場合である。真陰性(TN)は検査が陰性であり、対象疾患も存在しない場合である。偽陰性(FN)は検査が陰性であるが、対象疾患は存在しない場合である。

【0016】

この場合：感度=TP/(TP+FN)；特異度=TN/(FP+TN)；および陽性適中率=TP/(TP+FP)。

【0017】

感度は、個別患者の対象疾患を正しく発見するという点で検査性能の尺度である。感度の低い検査法では偽陰性すなわち実際には対象疾患があっても結果が陰性とする患者の比率が高くなる。偽陰性の潜在的な危険は、そうした罹患者がある期間にわたり未診断・未治療状態におかれ、その間に治療が手遅れとなる段階まで疾患が進行しかねないことである。感度の低い検査法の例はタンパク質を基礎にしたHIV血液検査である。この種の検査が低感度であるのは、疾患が十分に確立し相当多数のウイルスが血流中に侵入してしまうまでウイルスの存在を検出できないためである。対照的に感度の高い検査法の例はPCR法を使用するウイルス負荷検査である。高感度になるのは、この種の検査ではごく少量のウイルスの検出が可能なためである。誤った診断を下した結果の重大性が高い場合は、高感度が特に重要である。

【0018】

他方、特異度は非罹患者を正確に特定するという点での検査性能の尺度である。特異度の低い検査法では偽陽性すなわち実際には対象疾患がなくても陽性とする患者の比率が高くなる。偽陽性の難点は患者に、患者の健康に悪影響が及びかねない無用の医療処置を、その付帯リスク、精神的・経済的負担と共に強いることにある。特異度の高い診断検査法の開発を困難にしている疾患の特徴は、疾患の機序に、特にがんでは、しばしば複数の遺伝子およびタンパク質が絡むことである。また、ある種のタンパク質は病態とは無関係の理由で高レベルとなる場合がある。特異度の高い検査法の例は、p53変異の検出が可能なためである。さらなる診断処置またはさらなる医療介入に付随するコストまたはリスクがきわめて高い場合は特異度が特に重要である。

【0019】

PSA血液検査法は感度73%、特異度60%、陽性適中率31.5%である。PSA感度および特異度は高めることができるが、トレードオフを伴う。PSA感度を高めるには、「正常」PSA値をもっと若い年齢層に対応する低い値へと調整するかまたは個別患者の血清PSA値の経時変化(PSA増加速度)を追跡すればよい。どちらの方法でもがん発見件数は増加しようが、生検を受ける男性の数も増加しよう。逆に、より高齢層に対応した「正常」PSA値を採用する、%遊離PSAを採用する、または正常値を前立腺の容積を基準にして調整することにより、PSA感度を高めるという方法もある。これら3つの方法では無用の生検の数は減るが、若干のがんが見逃されるというリスクの増大を招く。

【0020】

従って、感度、特異度および/または陽性適中率を高めた前立腺がん診断手段が求められていることは明らかである。

【0021】

針生検による前立腺がん検査における(組織分析抜き)定量的なメチル化特異的PCR(QMSP)検査法単独での感度と特異度の範囲はそれぞれ30~89%、100%~64%となっている(Harden et al. J Natl Cancer Inst 2003; 95: 1634-1637)。しかし、臨床的検診手段としてのこの検査法の陽性適中率は分析されなかった。そのうえ、血清と体液たとえば尿や唾液の遺伝子検査はがん発見のための生検の必要性を低下させ、従って最も効果的な検診または監視手段となろう。しかし、そうした検査法にはきわめて高い感度および特異度が要求されるよう。前立腺がん患者の尿沈渣のGstp1遺伝子高メチル化分析(Cairns, P et al. Clin Cancer Res 7:2727-30, 2001)によれば、生検腫瘍で高メチル化を示した個人22人中わずか6人が尿サンプルでも対応する高メチル化を示したにすぎない。

【0022】

多面的アプローチ： がん診断法は伝統的に単一分子マーカー(遺伝子変異、PSAレベル

10

20

30

40

50

の上昇など)の検出に依存してきた。あいにく、がんは単一分子マーカーでは多数の病態を発見または弁別することに失敗してきた疾患である。こうして、単一マーカーだけを認識するアッセイ法は低い陽性適中率になることが示されてきた。本発明の基本的な面は、メチル化に基づくがん診断法とそうした疾患の検診、診断および治療監視が選り抜きの多重マーカーの使用により、単一マーカーを使用する最先端技術に著しい改善をもたらすと予想されることである。この多重化分析アプローチはがん診断法に特に好適である。がんは単純な疾患でなく、この多面的「パネル」アプローチは、がんの異質性と細胞学的にも臨床的にも整合するからである。

【0023】

明白な技術的必要性： 前立腺肥大と前立腺がんの罹患率(前立腺肥大は50歳以上の男性の50%、75歳以上の男性の95%；前立腺がんは10万人あたり180人)考慮すると、前立腺細胞増殖性疾患の早期診断につながる集団検診のための(たとえば生検や経直腸的超音波検査に代わる)高感度、高精度の非侵襲的な方法をもたらすために使用しうる分子マーカーの開発の技術的必要性はきわめて大きい。

【発明の開示】

【0024】

本発明は前立腺細胞増殖性疾患の発見および/または弁別のための新規な方法を提供し、以って前立腺細胞増殖性疾患の早期診断特に前立腺がん、前立腺がん腫および前立腺新生物の発見のための新規な手段の必要性という長年の懸案に対処する。

【0025】

本発明は、その発現が前立腺細胞増殖性疾患またはその特徴の存在を示す表26に記載の遺伝子パネル、ゲノム配列および/またはその調節領域の提供により、こうした年来の技術上の必要性に答える。特にそのCpG位置のメチル化状態は前立腺細胞増殖性疾患またはその特徴の存在を示す。提供されるのは、そのメチル化を分析すれば前立腺細胞増殖性疾患の発見が可能となるような、好ましい選り抜きの、または組み合わせの遺伝子である。

【0026】

該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、該遺伝子および/または配列は配列番号1023、GSTP1、プロスタグランジンE2受容体、ヒストンH4、RASSF1A、PR-ドメイン・ジンクフィンガータンパク質16、LIMドメインキナーゼ1、オーファン核受容体NR5A2、配列番号1025、配列番号1028、LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質、配列番号1019および配列番号1027からなる群より選択されるのが好ましい。

【0027】

該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、該遺伝子および/または配列はGstp1と、配列番号1017～配列番号1028からなる群より選択される1つまたは複数の配列とであるのも好ましい。該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、Gstp1と配列番号1023とを分析するのが特に好ましい。

【0028】

該方法の目的が前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物の診断および/またはそれらと良性前立腺肥大との弁別である場合には、配列番号1023を分析するのが特に好ましい。配列番号1023と、表26より選択される1つまたは複数の遺伝子および/または配列とを分析するのも好ましい。また、配列番号1023と、GSTP1、プロスタグランジンE2受容体、ヒストンH4、RASSF1A、PR-ドメイン・ジンクフィンガータンパク質16、LIMドメインキナーゼ1、オーファン核受容体NR5A2、配列番号11、配列番号1028、LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質、配列番号1019および配列番号1027からなる群より選択される1つまたは複数の遺伝子および/または配列とを分析するのも好ましい。

10

20

30

40

50

【0029】

特に好ましいのは表22および23に記載の遺伝子の組み合わせ、特に配列番号1023とGSTP1との分析である。

【0030】

該方法の目的が正常前立腺および/またはBPHのうちの1つと前立腺がんとの弁別である場合には、標的配列は表4に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジентな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0031】

該方法の目的が正常前立腺、正常組織のうちの1つと他組織との、他組織のがんおよび/またはBPHと前立腺がんとの、弁別である場合には、標的配列は表5に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジентな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0032】

該方法の目的が前立腺がんと他組織のがんとの弁別である場合には、標的配列は表6に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジентな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0033】

該前立腺細胞増殖性疾患は前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物であるのが特に好ましい。本発明はさらなる実施態様で、非がん性タイプの(BPHと正常前立腺を含む)前立腺組織と前立腺がん腫との弁別を目的とした方法および核酸を提供する。本発明はさらなる実施態様で、前立腺がんと正常前立腺組織、他組織に由来する組織、およびBPHとの弁別を目的とした方法および核酸を提供する。本発明はさらなる実施態様で、前立腺がんと他組織に由来するがんとの弁別を目的とした方法および核酸を提供する。

【0034】

この分析を可能にするために、本発明は前立腺細胞増殖性疾患の発症に関連する生体サンプルのゲノムメチル化分析方法を提供する。該方法は配列番号1~59、配列番号1017~1028、配列番号1116および配列番号1171からなる群より選択される少なくとも1つの核酸またはその断片を、該ゲノム配列または関心配列内のメチル化および非メチル化CpGジヌクレオチドを弁別しうる一試薬または一連の試薬と接触させることを特徴とする。さらに、配列番号1023、配列番号57、配列番号20、配列番号36、配列番号1171、配列番号51、配列番号31、配列番号24、配列番号11、配列番号1028、配列番号4、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、配列番号18、配列番号1019および配列番号1027からなる群より選択される少なくとも1つの核酸またはその断片を、該ゲノム配列または関心配列内のメチル化および非メチル化CpGジヌクレオチドを弁別しうる一試薬または一連の試薬と接触させるのが好ましい。

【0035】

本発明の方法および核酸は前立腺細胞増殖性疾患の発見；集団検診；弁別；監視；発見および監視のうちの少なくとも1つに利用するのが特に好ましい。

【0036】

本発明はゲノムDNAの遺伝的および/または非遺伝的パラメーターを解明するための方法を提供する。該方法は前立腺細胞増殖性疾患の発見および/または弁別の改良に有用である。本発明は最先端技術にいくつかの改善をもたらす。前立腺がん発見のためのメチル化アッセイ法は公知であるものの、前立腺細胞増殖性疾患の発見のための分子クラス分類システムはまだ存在していないし、また前立腺がん腫および新生物を良性疾患から正確に弁

10

20

30

40

50

別するようなものもまだ存在してない。

【 0 0 3 7 】

検査サンプルの由来源は任意好適の由来源でよい。DNAサンプルの由来源は細胞または細胞系、組織スライド、生検、パラフィン包埋組織、体液、射精された精液、尿、血液、およびそれらの組み合わせからなる群より選択するのが好ましい。該由来源は生検、体液、射精された精液、尿または血液であるのが好ましい。

【 0 0 3 8 】

本発明は特に、前立腺細胞増殖性疾患を発見するための、次のステップを含む方法を提供する：ゲノム核酸を含む生体サンプルを獲得するステップ；該核酸またはその断片を、被検核酸の標的配列内のメチル化および非メチル化CpGジヌクレオチド配列を弁別するに足る1つまたは複数の試薬に接触させるステップであって、該標的配列は配列番号1～59、配列番号1017～1028、配列番号1116および配列番号1171の少なくとも16連続ヌクレオチドを含む配列を含むかまたは該配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズすることを、また該連続ヌクレオチドは少なくとも1つのCpGジヌクレオチドを含むことを、特徴とするステップ；および該弁別に少なくとも部分的に基づいて、少なくとも1つの標的CpGジヌクレオチド配列のメチル化状態、または複数の標的CpGジヌクレオチド配列の平均メチル化状態または平均メチル化状態を反映する値を決定するステップ。

【 0 0 3 9 】

該標的配列は配列番号1023、配列番号57、配列番号20、配列番号36、配列番号1171、配列番号51、配列番号31、配列番号24、配列番号11、配列番号1028、配列番号4、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、配列番号18、配列番号1019および配列番号1027の少なくとも16連続ヌクレオチドを含む配列を含むかまたは該配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズし、また該連続ヌクレオチドは少なくとも1つのCpGジヌクレオチドを含むのが特に好ましい。

【 0 0 4 0 】

標的配列内のメチル化および非メチル化CpGジヌクレオチド配列の弁別は好ましくは、少なくとも1つの該CpGジヌクレオチド配列の、配列番号60～295、配列番号1029～1076、配列番号1117～1120、配列番号1172～1175、および該標的配列に対応するそれらの隣接領域からなる群より選択される配列内の対応する変換または無変換ジヌクレオチド配列への、メチル化状態依存性の変換または無変換ステップを含む。

【 0 0 4 1 】

追加の実施態様は、前立腺細胞増殖性疾患を発見および/または弁別するための、次のステップを含む方法を提供する：被検ゲノムDNAを含む生体サンプルを獲得するステップ；該ゲノムDNAを抽出するステップ；該ゲノムDNAまたはその断片を1つまたは複数の試薬で処理して5位非メチル化シトシン塩基をウラシルへと、またはハイブリダイゼーション特性の点でシトシンとは検出可能に異なる別の塩基へと、変換するステップ；該処理ゲノムDNAまたはその処理断片を増幅酵素および少なくとも2つのプライマーと接触させるステップであって、該プライマーは各々、配列番号60～295、配列番号1029～1076、配列番号1117～1120、配列番号1172～1175およびその相補体からなる群より選択される配列と相補的であるまたは中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする、鎖長9ヌクレオチド以上の連続配列を含み、また該処理DNAまたはその断片は増幅されて増幅産物(an amplificate)を生み出す、または増幅ないことを特徴とするステップ；および該増幅産物の存否または性質を基に、配列番号1～59、配列番号1017～1028、配列番号1116および配列番号1171からなる群より選択される少なくとも1つのCpGジヌクレオチド配列のメチル化状態を、または複数のCpGジヌクレオチド配列の平均メチル化状態または平均メチル化状態を反映する値を、決定するステップ。好ましくは、少なくとも1つのそうしたハイブリダイズする核酸分子またはペプチド核酸分子は固相に結合される。好ましくは、決定するステップは下記からなる群より選択される少なくとも1つの方法の使用を含む：配列番号60～295、配列番号1029～1076、配列番号1117～1120、配列番号1172～1175およびその相補体からなる群より選択される配列と相補的であるまたは中程度

10

20

30

40

50

にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする、鎖長9ヌクレオチド以上の連続配列を含む少なくとも1つの核酸分子のハイブリダイゼーション；配列番号60～295、配列番号1029～1076、配列番号1117～1120、配列番号1172～1175およびその相補体からなる群より選択される配列と相補的であるまたは中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする、鎖長9ヌクレオチド以上の連続配列を含む、少なくとも1つの、固相に結合された核酸分子のハイブリダイゼーション；配列番号60～295、配列番号1029～1076、配列番号1117～1120、配列番号1172～1175およびその相補体からなる群より選択される配列と相補的であるまたは中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする、鎖長9ヌクレオチド以上の連続配列を含む少なくとも1つの核酸分子のハイブリダイゼーション、および少なくとも1つの、そうしたハイブリダイズした核酸分子の少なくとも1ヌクレオチド塩基分の伸長；および増幅産物の配列決定。

【0042】

さらなる実施態様は前立腺細胞増殖性疾患を分析および/または弁別するための、次のステップを含む方法を提供する：被検ゲノムDNAを含む生体サンプルを獲得するステップ；該ゲノムDNAを抽出するステップ；配列番号1～59、配列番号1017～1028、配列番号1116および配列番号1171またはストリンジェントな条件の下でそれとハイブリダイズする配列からなる群より選択される1つまたは複数の配列を含む該ゲノムDNAまたはその断片を、1つまたは複数のメチル化感受性制限酵素と接触させるステップであって、該ゲノムDNAがそれによって消化されて消化断片を生成するか、またはそれによって消化されないことを特徴とするステップ；および少なくとも1つのそうした断片の存否または性質を基に、配列番号1～59、配列番号1017～1028、配列番号1116および配列番号1171からなる群より選択される1つまたは複数の配列の、少なくとも1つのCpGジヌクレオチド配列のメチル化状態を、または複数のCpGジヌクレオチド配列の平均メチル化状態または平均メチル化状態を反映する値を、決定するステップ。好ましくは、該消化または非消化ゲノムDNAは該決定ステップの前に増幅する。

【0043】

追加の実施態様は、配列番号1～59、配列番号1017～1028、配列番号1116および配列番号1171からなる群より選択される配列内のシトシン・メチル化パターンを分析するための新規なゲノム核酸配列および化学修飾核酸配列、ならびにオリゴヌクレオチドおよび/またはPNA-オリゴマーを提供する。

【0044】

発明の詳細な説明
用語の意味

用語「発現」は本明細書では遺伝子の転写と翻訳を意味するものとする。遺伝子の発現レベルは遺伝子の転写/翻訳レベルに関連する、または転写/翻訳レベルを指示する任意の因子たとえばメチル化、ヘテロ接合性の消失(以下、LOHともいう)、RNA発現レベルおよびタンパク質発現レベルなどのような因子の分析によって決定してもよい。

【0045】

さらに、転写される遺伝子の活性は(SNPs、点突然変異、欠失、挿入、反復長、転位、および他の多型などを非限定的に含む)遺伝子突然変異を非限定的に含む遺伝的変異による影響を受ける場合もある。

【0046】

用語「実測/予測比(O/E比)」は特定DNA配列内のCpGジヌクレオチドの出現頻度をいい、 $[\text{CpG部位数}/(\text{C塩基数} \times \text{G塩基数})]$ に対応する。

【0047】

用語「CpG島」はゲノムDNAの連続領域のうち、(1)実測/予測比 >0.6 に対応するCpGジヌクレオチドの出現頻度、および(2)「GC含量」 >0.5 という基準を満たすものをいう。CpG島は一般に、常にとは限らないが、鎖長が約0.2kb～約1kbまたは～約2kbである。

【0048】

10

20

30

40

50

用語「メチル化状態」はあるDNA配列内の1つまたは複数のCpGジヌクレオチドにおける5-メチルシトシン (5-mCyt)の存否をいう。あるDNA配列内の1つまたは複数の特定CpGメチル化部位(各々2つのCpG CpGジヌクレオチド配列をもつ)におけるメチル化状態には「非メチル化」、「全メチル化」および「ヘミメチル化」がある。

【0049】

用語「ヘミメチル化」はパリンδροーム構造のCpGメチル化部位のメチル化状態であって、パリンδροーム構造のCpGメチル化部位の2つのCpGジヌクレオチド配列のうちの一方向の単一シトシンだけがメチル化されている状態をいう[たとえば5'-CC^MGG-3'(トップ鎖):3'-GGCC-5(ボトム鎖)]。

【0050】

用語「AUC」は本明細書では曲線下面積の略語であり、特に受診者動作特性(ROC)曲線下面積をいう。ROC曲線は診断検査法の種々の可能なカットオフポイントに対応する真陽性率と偽陽性率の関係を示す曲線である。それは採用するカットオフポイントに応じた感度と特異度とのトレードオフ関係を示す(感度の上昇には必ず特異度の低下が伴う)。ROC曲線下面積(AUC)は診断検査法の精度の尺度である(AUCは大きければ大きいほどよく、至適値は1である。無作為検査では面積が0.5になる対角線の上にROC曲線が重なる; J.P. Egan, Signal Detection Theory and ROC Analysis, Academic Press, New York, 1975を参照)。

【0051】

用語「高メチル化」は、正常対照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量と比較した場合の、検査DNAサンプルのDNA配列内の1つまたは複数のCpGジヌクレオチドにおける5-mCytの存在量の増加に対応する平均メチル化状態をいう。

【0052】

用語「低メチル化」は、正常対照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量と比較した場合の、検査DNAサンプルのDNA配列内の1つまたは複数のCpGジヌクレオチドにおける5-mCytの存在量の減少に対応する平均メチル化状態をいう。

【0053】

用語「マイクロアレイ」は技術的に認められている広い意味での「DNAマイクロアレイ」と「DNAチップ」の両方をいい、技術的に承認されている諸々の固相担体を包摂し、またそれに核酸分子を付着させるための、またはその表面上で核酸分子を合成するための諸々の方法を包摂する。

【0054】

「遺伝的パラメーター」は遺伝子およびその調節に必要とされるさらなる配列の突然変異および多型である。突然変異とされるのは特に挿入や欠失、点変異、逆位、多型、および特に好ましくはSNPs(一塩基多型)などである。

【0055】

「非遺伝的パラメーター」は特にシトシンのメチル化である。さらなる非遺伝的パラメーターの例はヒストンのアセチル化であるが、それは開示の方法を使用して直接分析することができないものの、それはそれでDNAメチル化と関連する。

【0056】

用語「亜硫酸水素塩試薬」は、本明細書で開示するようなメチル化および非メチル化CpGジヌクレオチド配列の弁別に有用である、亜硫酸水素塩、二亜硫酸塩、亜硫酸水素またはそれらの組み合わせを含む試薬をいう。

【0057】

用語「メチル化アッセイ」はあるDNA配列内の1つまたは複数のCpGジヌクレオチド配列のメチル化状態を検定するための任意の方法をいう。

【0058】

用語「MS-AP-PCR」(Methylation-Sensitive Arbitrarily-Primed Polymerase Chain Reaction)は技術的に認められた技術であって、CpGジヌクレオチドを含む可能性が最も高い領域に重点を置くための、CGに富むプライマーの使用による大域的なゲノムスキャンを可

10

20

30

40

50

能にする、かつGonzalgo et al., Cancer Research 57:594-599, 1997で開示されている技術をいう。

【0059】

用語「MethyLight (登録商標)」はEads et al., Cancer Res., 59:2302-2306, 1999で開示されている、技術的に認められた蛍光ベースのリアルタイムPCR技術をいう。

【0060】

用語「HeavyMethyl (登録商標)」アッセイは本明細書で開示した実施態様では、増幅プライマーの間のCpG位置をカバーする、または増幅プライマーによってカバーされる、メチル化特異的プロッキングプローブ(本明細書ではプロッカーともいう)が核酸サンプルのメチル化特異的選択増幅を可能にするアッセイをいう。

10

【0061】

用語「HeavyMethyl (登録商標) MethyLight (登録商標)」アッセイは本明細書で開示した実施態様では、MethyLight (登録商標) アッセイを増幅プライマーの間のCpG位置をカバーするメチル化特異的プロッキングプローブと結合したMethyLight (登録商標) アッセイの変法であるHeavyMethyl (登録商標) MethyLight (登録商標) アッセイをいう。

【0062】

用語「Ms-SNuPE」(Methylation-sensitive Single Nucleotide Primer Extension、メチル化感受性一塩基プライマー伸長)は、Gonzalgo & Jones, Nucleic Acids Res. 25:2529-2531, 1997で開示されている技術的に認められたアッセイをいう。

【0063】

用語「MSP」(Methylation-specific PCR、メチル化特異的PCR)はHerman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826, 1996および米国特許第5,786,146号明細書で開示されている技術的に認められたアッセイをいう。

20

【0064】

用語「COBRA」(Combined Bisulfite Restriction Analysis)はXiong & Laird, Nucleic Acids Res. 25:2523-2534, 1997で開示されている技術的に認められたメチル化アッセイをいう。

【0065】

用語「MCA」(Methylated CpG Island Amplification、メチル化CpG島増幅)はToyota et al., Cancer Res. 59:2307-12, 1999および国際公開第W0 00/26401A1号明細書で開示されているメチル化アッセイをいう。

30

【0066】

用語「ハイブリダイゼーション」は、ワトソン-クリック型塩基対合に沿った、サンプルDNA中のオリゴヌクレオチドとその相補配列との結合による2本鎖構造の形成をいう。

【0067】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は本明細書での定義では、 $5 \times \text{SSC} / 5 \times \text{デンハーツ溶液} / 1.0\% \text{SDS}$ 中68 でのハイブリダイゼーションと $0.2 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{SDS}$ 中室温での洗浄、または技術的に認められているその等価物(たとえば $2.5 \times \text{SSC}$ バッファーによる60 でのハイブリダイゼーション、それに続く低濃度バッファーによる37 での数回の洗浄、それに続く安定した状態での保持といった条件)を伴う。中程度にストリンジェントな条件は本明細書での定義では、 $3 \times \text{SSC}$ 中42 での洗浄または技術的に認められているその等価物を伴う。プローブと標的核酸の間の至適レベルの同一性を達成するためには塩濃度および温度のパラメーターを変えることができる。そうした条件に関する手引きについては、たとえばSambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; およびAusubel et al. (eds.), 1995, Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, N.Y.) at Unit 2.10に求めることができる。

40

【0068】

用語「アレイ配列番号」、「合成アレイ配列番号」または「合成アレイ配列」は、被検アレイの諸々の個別連続配列の頭尾(5' 3')線状合成体(たとえば配列番号1~配列番号

50

71の、同じ順序による頭尾合成体)を含む仮想上または非仮想上の配列をいう。

【0069】

用語「アレイ配列番号ノード」、「合成アレイ配列番号ノード」または「合成アレイ配列ノード」は「アレイ配列番号」、「合成アレイ配列番号」または「合成アレイ配列」の任意の2連続配列間の接続部をいう。

【0070】

合成アレイ配列に関連して、語句「連続ヌクレオチド」は合成アレイの任意の個別連続配列の連続配列領域をいうが、合成アレイ配列の前記「ノード」を含む領域は含まない。

【0071】

概観

本発明は、前立腺細胞増殖性疾患の発症に関連するメチル化パターンの分析に新規な有用性をもつ分子遺伝学的マーカーを提供する。本発明の方法および核酸は前立腺細胞増殖性疾患の発見；集団検診；弁別；監視；発見および監視のうちの少なくとも1つに利用するのが特に好ましい。

【0072】

DNAの亜硫酸水素塩修飾は技術的に認められているCpGメチル化状態評価手段である：5-メチルシトシンは真核細胞DNA中の最も頻繁な共有結合塩基修飾である。それはたとえば転写調節、ゲノムインプリンティングおよび腫瘍形成に関係する。従って、遺伝情報の構成要素としての5-メチルシトシンの同定は大いに重要である。しかし5-メチルシトシンは配列決定によって同定することができない。5-メチルシトシンの塩基対合挙動はシトシンと変わらないからである。しかも、5-メチルシトシンがもっている非遺伝的情報はたとえばPCR時に完全に消失してしまう。

【0073】

5-メチルシトシンの存否に関するDNA分析に最も頻繁に使用される方法は亜硫酸水素塩のシトシンとの特異的反応に基づくものであり、そこでは後続のアルカリ性加水分解によりシトシンがその塩基対合挙動においてチミンに対応するウラシルに変換される。しかし重要なことに、5-メチルシトシンはこれらの条件下で無変化のままである。結果として元のDNAが変換されて、メチルシトシンがそのハイブリダイゼーション挙動によってシトシンとは本来弁別しえないのに、標準的な、技術的に認められている分子生物学的技法により、たとえば増幅+ハイブリダイゼーション法により、または配列決定法により、唯一の残存シトシンとして検出しうるようになる。これらの技法はみな、今日では十分に生かすことができる差別的な塩基対合特性に基づく。

【0074】

公知技術は感度の点からは、被検DNAをアガロースマトリックス中に入れて、DNAの拡散および復元を防ぐようにする(亜硫酸水素塩は1本鎖DNAとだけ反応する)ステップ、および諸々の沈殿・精製ステップを高速透析に取り替えるステップを含む方法によって特徴付けられる[Olek A, et al., A modified and improved method for bisulfite based cytosine methylation analysis(亜硫酸水素塩使用のシトシン・メチル化分析のための改良方法), *Nucleic Acids Res.* 24:5064-6, 1996]。従って、個別細胞についてメチル化状態を分析することが可能であり、該方法の有用性と感度は明らかである。5-メチル化シトシン検出のための技術的に認められている方法の概説はRein, T., et al., *Nucleic Acids Res.*, 26:2255, 1998が行っている。

【0075】

この亜硫酸水素塩法は少数の例外(Zeschnick M, et al., *Fur J Genet.* 5:94-98, 1997)を除いて、現在、研究にしか使用されていない。いずれの場合にも、既知遺伝子の短い特異的断片を亜硫酸水素塩処理後に増幅して、完全な配列決定(Olek & Walter, *Nat Genet.* 1997 17:275-6, 1997)と1つまたは複数のプライマー伸長反応(Gonzalogo & Jones, *Nucleic Acids Res.* 25:2529-2531, 1997; 国際公開第W0 95/00669号明細書；米国特許第6,251,594号明細書)を行って個別シトシン位置を分析するか、または酵素的消化により処理するかである(Xiong & Laird, *Nucleic Acids Res.* 25:2532-34, 1997)。ハイブリダイゼ

10

20

30

40

50

ーションによる検出もまた開示されている(Olek et al. 国際公開第WO 99/28498号明細書)。加えて、個別遺伝子に関するメチル化の検出への亜硫酸水素塩法の使用も開示されている(Grigg & Clark, Bioassays, 16:431-6, 1994; Zeschnigk M, et al., Hum Mol Gene t., 6:387-95, 1997; Feil R, et al., Nucleic Acids Res., 22:695-, 1994; Martin V, et al., Gene, 157:261-4, 1995; 国際公開第WO 9746705号およびWO 9515373号明細書)。

【0076】

本発明は一態様で、配列番号1~59、配列番号1017~1028、配列番号1116および配列番号1171からなる群に由来する配列内のCpGジヌクレオチド配列のメチル化状態の判定への、亜硫酸水素塩法の、1つまたは複数のメチル化アッセイとの組み合わせによる使用を提供する。

10

【0077】

本発明によれば、配列番号1~59、配列番号1017~1028、配列番号1116および配列番号1171からなる群に由来する配列内のCpGジヌクレオチド配列のメチル化状態の判定は前立腺細胞増殖性疾患の発見および/または弁別に有用である。

【0078】

メチル化アッセイ法: 種々のメチル化アッセイ法が技術上周知であり、また本発明と併用可能である。これらのアッセイはあるDNA配列内の1つまたは複数のCpGジヌクレオチドのメチル化状態の判定を可能にする。そうしたアッセイの一例は亜硫酸水素塩処理DNAのDNA配列決定、(配列特異的増幅のための)PCR、サザンプロット法、およびメチル化感受性制限酵素の使用などである。

20

【0079】

たとえばゲノム配列決定は亜硫酸水素塩処理の使用により、DNAメチル化パターンおよび5-メチルシトシン分布の分析用に単純化されるに至った(Frommer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1827-1831, 1992)。加えて亜硫酸水素塩変換DNAに由来するPCR増幅産物の制限酵素消化が使用される。たとえばSadri & Hornsby(Nucl. Acids Res. 24:5058-5059, 1996)が開示している方法、またはCOBRA(Combined Bisulfite Restriction Analysis) (Xiong & Laird, Nucleic Acids Res. 25:2532-34, 1997)。

【0080】

COBRA: COBRA(登録商標)分析は少量のゲノムDNAにおける特定遺伝子座のDNAメチル化度の決定に有用な定量的メチル化アッセイである(Xiong & Laird, Nucleic Acids Res. 25:2532-34, 1997)。簡単に言えば、亜硫酸水素ナトリウムで処理したDNAのPCR産物におけるメチル化依存性配列差を制限酵素消化により明らかにするものである。まずFrommerら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1827-1831, 1992)が開示している方法に従って標準亜硫酸水素塩処理によりメチル化依存性配列差をゲノムDNA中に導入する。次に関心CpG島に対して特異的なプライマーを使用して亜硫酸水素塩変換DNAのPCR増幅を行い、以下、制限エンドヌクレアーゼ消化、ゲル電気泳動、および特異的標識ハイブリダイゼーションプロープの使用による検出へと続く。元のDNAサンプルのメチル化度は消化および非消化PCR産物の相対量により、広範囲のメチル化度にわたり、線形定量的に表示する。さらに、この手法はマイクロダイセクションしたパラフィン包埋組織サンプルから得られたDNAに確

30

40

【0081】

COBRA(登録商標)分析用の一般的な試薬[たとえば一般的なCOBRA(登録商標)分析キットに見られるような試薬]の非限定的な例は特定遺伝子(または亜硫酸水素塩処理DNA配列またはCpG島)用のPCRプライマー; 制限酵素と適切なバッファー; 遺伝子ハイブリダイゼーション用オリゴ; 対照ハイブリダイゼーション用オリゴ; オリゴプロープ用キナーゼ標識キット; および標識ヌクレオチドなどである。さらに、亜硫酸水素塩変換試薬の例はDNA変性用バッファー; スルホン化用バッファー; DNA回収試薬またはキット(沈殿法、限外ろ過法、アフィニティーカラム法など); 脱スルホン化用バッファー; およびDNA回収用の構成要素などである。

50

【 0 0 8 2 】

好ましくは、MethyLight (登録商標) (蛍光ベースのリアルタイムPCR法)(Eads et al., Cancer Res., 59:2302-2306, 1999)、Ms-SNuPE (登録商標) (メチル化感受性一塩基プライマー伸長)反応法(Gonzalzo & Jones, Nucleic Acids Res. 25:2529-2531, 1997)、メチル化特異的PCR法(MSP ; Herman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826, 1996; 米国特許第5,786,146号明細書)、およびメチル化CpG島増幅法(MCA; Toyota et al., Cancer Res. 59:2307-12, 1999)は単独で、またはこれらのうち他の方法と組み合わせて、使用する。

【 0 0 8 3 】

MethyLight (登録商標) : MethyLight (登録商標) 法は、PCRステップ後にさらなる操作を必要とする蛍光ベースのリアルタイムPCR法[TaqMan (登録商標)](Eads et al., Cancer Res., 59:2302-2306, 1999)を使用したハイスループットの定量的メチル化アッセイである。簡単に言えば、MethyLight (登録商標) 法ではまず混合ゲノムDNAサンプルを、標準的な方法により亜硫酸水素ナトリウム反応でメチル化依存性配列差のある混合プールへと変換する(亜硫酸水素塩法は非メチル化シトシン残基をウラシルに変換する)。次いで蛍光ベースのPCRを(既知CpGメチル化部位と重複しないプライマーによる)「バイアスのない」PCR反応または(既知CpGメチル化部位と重複するPCRプライマーによる)「バイアスのある」反応のいずれかで行う。配列差別は増幅法のレベル、蛍光検出法のレベル、または両レベルのいずれかで起きてよい。

【 0 0 8 4 】

MethyLight (登録商標) 法はゲノムDNAサンプルのメチル化パターンの定量的検定法として使用してもよい。その場合、配列差別はプローブ・ハイブリダイゼーションのレベルで起こる。この定量的検定法では、PCR反応は特定の推定メチル化部位と重複する蛍光プローブの存在下にバイアスのない増幅をもたらす。インプットDNA量に関するバイアスのない対照は、プライマー、プローブいずれもどのCpGジヌクレオチドとも重ならないような反応によってもたらされる。あるいは定量的なゲノムメチル化検定法は、バイアスのあるPCRプールを、既知メチル化部位を「カバー」しない対照オリゴヌクレオチドでプローブするか(蛍光ベース型のMSP法)、または潜在メチル化部位をカバーするオリゴヌクレオチドでプローブすることにより、実現される。

【 0 0 8 5 】

MethyLight (登録商標) 法では増幅法にTaqMan (登録商標) プローブを使用することができる。たとえば2本鎖ゲノムDNAを亜硫酸水素ナトリウムで処理し、TaqMan (登録商標) プローブを使用して2組のPCR反応のうち1組[たとえばバイアスのあるプライマーとTaqMan (登録商標) プローブを使用する反応またはバイアスのないプライマーとTaqMan (登録商標) プローブを使用する反応]にかける。TaqMan (登録商標) プローブは蛍光「レポーター」および「クエンチャー」分子で二重標識しており、また比較的高GC含量の領域に対して特異的にし、PCRサイクルにおいて順方向または逆方向プライマーよりも約10 高温で融解するよう設計してある。これにより、TaqMan (登録商標) プローブはPCRアニーリング/伸長ステップで完全にハイブリダイズした状態を保つことができる。TaqポリメラーゼはPCRで新鎖を酵素的に合成していくと最終的には、アニールしたTaqMan (登録商標) プローブに到達するであろう。するとTaqポリメラーゼ5' 3' エンドヌクレアーゼの作用でTaqMan (登録商標) プローブは消化されて排除されるが、その際に蛍光レポーター分子が放出され、それによってその時点でまだクエンチされていないシグナルが、リアルタイム蛍光検出システムにより定量的に検出されることになる。

【 0 0 8 6 】

MethyLight (登録商標) 分析用の一般的な試薬[たとえば一般的なMethyLight (登録商標) 分析キットに見られるような試薬]の非限定的な例は特定遺伝子(または亜硫酸水素塩処理DNA配列またはCpG島)用のPCRプライマー; TaqMan (登録商標) プローブ; 最適化されたPCRバッファーおよびデオキシヌクレオチド; およびTaqポリメラーゼなどである。

【 0 0 8 7 】

Ms-SNuPE: Ms-SNuPE (登録商標)法は特定CpG部位のメチル化差を、DNAの亜硫酸水素塩処理とそれに続く一塩基プライマー伸長に基づいて評価する方法である(Gonzalگو & Jones, *Nucleic Acids Res.* 25:2529-2531, 1997)。簡単に言えば、ゲノムDNAを亜硫酸水素ナトリウムと反応させて非メチル化シトシンをウラシルに変換する一方で、5-メチルシトシンは無変化のままにしておく。次いで亜硫酸水素塩処理DNAに対して特異的なプライマーを使用して所期標的配列の増幅を行い、増幅産物を単離し、関心CpG部位のメチル化分析用鋳型として使用する。少量のDNA(たとえばマイクロダイセクションした病理切片)を分析することができるし、またCpG部位のメチル化状態の判定に制限酵素を使用しないですむ。

【0088】

10

Ms-SNuPE (登録商標)分析用の一般的な試薬[たとえば一般的なMs-SNuPE (登録商標)分析系キットに見られるような試薬]の非限定的な例は特定遺伝子(または亜硫酸水素塩処理DNA配列またはCpG島)用のPCRプライマー;最適化されたPCRバッファーおよびデオキシヌクレオチド;ゲル抽出キット;陽性対照プライマー;特定遺伝子用のMs-SNuPE (登録商標)プライマー;反応バッファー(Ms-SNuPE反応用);および標識ヌクレオチドなどである。さらに、亜硫酸水素塩変換試薬の例はDNA変性用バッファー;スルホン化用バッファー;DNA回収試薬またはキット(沈殿法、限外ろ過法、アフィニティークラム法);脱スルホン化用バッファー;およびDNA回収成分などである。

【0089】

MSP: MSP(メチル化特異的PCR)法はCpG島内のほぼ任意のCpG部位群のメチル化状態の評価を、メチル化感受性制限酵素の使用とは無関係に、可能にする(Herman et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9821-9826, 1996; 米国特許第5,786,146号明細書)。簡単に言えば、DNAを亜硫酸水素ナトリウムで修飾して(メチル化シトシンではなく)非メチル化シトシンをすべてウラシルに変換し、次いでメチル化対非メチル化DNAに対して特異的なプライマーで増幅する。MSP法は少量のDNAを必要とするだけであり、任意のCpG島遺伝子座の0.1%メチル化対立遺伝子に対して感受性があり、またパラフィン包埋サンプルから抽出したDNAにも有効である。MSP分析用の一般的な試薬[たとえば一般的なMSP分析系キットに見られるような試薬]の非限定的な例は特定遺伝子用メチル化および非メチル化PCRプライマー、最適化されたPCRバッファーおよびデオキシヌクレオチド、および特異的プローブなどである。

20

30

【0090】

MCA: MCA法はゲノムDNAのメチル化パターンの変化をスクリーニングしこれらの変化に関連する特定配列を単離するために使用しうる方法である(Toyota et al., *Cancer Res.* 59:2307-12, 1999)。簡単に言えば、認識部位のシトシン・メチル化に対する感受性の異なる制限酵素を使用して、原発がん、細胞系、および正常組織に由来するゲノムDNAを消化し、次いでAP(Arbitrarily-Primed)-PCR増幅を行う。PCR産物を高分解能ポリアクリルアミドゲルで分解後に、メチル化差異を示す断片をクローン化し、配列決定する。次いでクローン化断片をサザン分析用のプローブとして使用して、これらの領域のメチル化差異を確認する。MCA分析用の一般的な試薬[たとえば一般的なMCA分析系キットに見られるような試薬]の非限定的な例はゲノムDNAを任意にプライミングするためのPCRプライマー;PCRバッファーおよびヌクレオチド;制限酵素および適切なバッファー;遺伝子ハイブリダイゼーション用オリゴまたはプローブ;対照ハイブリダイゼーション用オリゴまたはプローブなどである。

40

【0091】

ゲノム配列番号1~59、配列番号1017~1028、配列番号1116および配列番号1171と、配列番号60~295、配列番号1029~1076、配列番号1117~1120、配列番号1172~1175に対応するその非天然型処理変異体は大腸がん細胞増殖性疾患の発見、クラス分類および/または監視に新規な有用性をもつと判明。

【0092】

本発明は一実施態様で、被検者の前立腺細胞増殖性疾患を発見および/または発見・弁

50

別する方法を提供する。該方法は次のステップを含む：

i) 表26に記載の1つまたは複数の遺伝子または遺伝子配列の、および/またはその調節領域の、発現レベルを決定する；

ii) 該発現レベルに従って前立腺細胞増殖性疾患の存否を決定する。

該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、該遺伝子および/または配列は配列番号1023、GSTP1、プロスタグランジンE2受容体、ヒストンH4、RASSF1A、PR-ドメイン・ジンクフィンガータンパク質16、LIMドメインキナーゼ1、オーファン核受容体NR5A2、配列番号11、配列番号1028、LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質、配列番号1019および配列番号1027からなる群より選択されるのが好ましい。

10

【0093】

該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、該遺伝子および/または配列はGstp1と、配列番号1017～配列番号1028からなる群より選択される1つまたは複数の配列とであるのも好ましい。該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、Gstp1と配列番号1023とを分析するのが特に好ましい。

【0094】

該方法の目的が前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物の診断および/またはそれらと良性前立腺肥大との弁別である場合には、配列番号1023を分析するのが特に好ましい。配列番号1023と、表26より選択される1つまたは複数の遺伝子および/または配列とを分析するのも好ましい。

20

【0095】

また、配列番号1023と、GSTP1、プロスタグランジンE2受容体、ヒストンH4、RASSF1A、PR-ドメイン・ジンクフィンガータンパク質16、LIMドメインキナーゼ1、オーファン核受容体NR5A2、配列番号11、配列番号1028、LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質、配列番号1019および配列番号1027からなる群より選択される1つまたは複数の遺伝子および/または配列とを分析するのも好ましい。

30

【0096】

特に好ましいのは表22および23に記載の遺伝子の組み合わせ、特に配列番号1023とGSTP1との分析である。

【0097】

該方法の目的が正常前立腺および/またはBPHのうちの1つと前立腺がんとの弁別である場合には、標的配列は表4に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0098】

該方法の目的が正常前立腺、正常組織のうちの1つと他組織との、他組織のがんおよび/またはBPHと前立腺がんとの、弁別である場合には、標的配列は表5に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

40

【0099】

該方法の目的が前立腺がんと他組織のがんとの弁別である場合には、標的配列は表6に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含

50

むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0100】

該発現レベルはメチル化、ヘテロ接合性の消失(以下、LOHともいう)、RNA発現レベルおよびタンパク質発現レベルなどの分析を非限定的に含む、技術上の標準となっている任意の手段によって決定してもよい。

【0101】

該遺伝子および/または配列の使用は、任意の遺伝子発現分析によって、mRNA発現分析またはタンパク質発現分析によって可能となる。しかし、本発明の最も好ましい実施態様では、前立腺細胞増殖性疾患の発見および/または弁別は、該遺伝子またはゲノム配列およびそのプロモーターまたは調節配列のメチル化状態の分析によって可能となる。遺伝子メチル化の分析方法については本明細書で開示している。

10

【0102】

一実施態様では、該方法は表26に記載の遺伝子からなる群より選択される1つまたは複数の遺伝子またはゲノム配列の、前立腺細胞増殖性疾患の発見および/または弁別のためのマーカーとしての使用を含む。

【0103】

該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、該遺伝子および/または配列は配列番号1023、GSTP1、プロスタグランジンE2受容体、ヒストンH4、RASSF1A、PR-ドメイン・ジンクフィンガータンパク質16、LIMドメインキナーゼ1、オーファン核受容体NR5A2、配列番号11、配列番号1028、LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質、配列番号1019および配列番号1027からなる群より選択されるのが好ましい。

20

【0104】

該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、該遺伝子および/または配列はGstp1と、配列番号1017~配列番号1028からなる群より選択される1つまたは複数の配列とであるのも好ましい。該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、Gstp1と配列番号1023とを分析するのが特に好ましい。

30

【0105】

該方法の目的が前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物の診断および/またはそれらと良性前立腺肥大との弁別である場合には、配列番号1023を分析するのが特に好ましい。配列番号1023と、表26より選択される1つまたは複数の遺伝子および/または配列とを分析するのも好ましい。

【0106】

また、配列番号1023と、GSTP1、プロスタグランジンE2受容体、ヒストンH4、RASSF1A、PR-ドメイン・ジンクフィンガータンパク質16、LIMドメインキナーゼ1、オーファン核受容体NR5A2、配列番号11、配列番号1028、LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質、配列番号1019および配列番号1027からなる群より選択される1つまたは複数の遺伝子および/または配列とを分析するのも好ましい。

40

【0107】

特に好ましいのは表22および23に記載の遺伝子の組み合わせ、特に配列番号1023とGSTP1との分析である。

【0108】

該方法の目的が正常前立腺および/またはBPHのうちの1つと前立腺がんとの弁別である場合には、標的配列は表4に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含

50

む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0109】

該方法の目的が正常前立腺、正常組織のうちの1つと他組織との、他組織のがんおよび/またはBPHと前立腺がんと、弁別である場合には、標的配列は表5に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0110】

該方法の目的が前立腺がんと他組織のがんと弁別である場合には、標的配列は表6に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0111】

該遺伝子および/または配列の使用は、任意の遺伝子発現分析によって、mRNA発現分析またはタンパク質発現分析によって可能となろう。しかし、本発明の最も好ましい実施態様では、前立腺細胞増殖性疾患の発見および/または弁別は、該遺伝子またはゲノム配列およびそのプロモーターまたは調節配列のメチル化状態の分析によって可能となる。遺伝子メチル化の分析方法については本明細書で開示している。

【0112】

表26記載の遺伝子、ゲノム配列またはゲノム配列によって調節される遺伝子のmRNA異常発現レベルは前立腺細胞増殖性疾患の存在に関連する。従って、該遺伝子または配列の発現レベルの上昇または低下は前立腺細胞増殖性疾患の存在に関連する因子に関連付けることが可能であり、またそうした疾患のサブタイプを示唆する。

【0113】

前立腺細胞増殖性疾患の発見および/または弁別ステップで遺伝子またはゲノム配列をコードするmRNAを検出するために、患者からサンプルを獲得する。該DNAサンプルの由来源は細胞または細胞系、組織スライド、生検、パラフィン包埋組織、体液、射精された精液、尿、血液、およびそれらの組み合わせからなる群より選択するのが好ましい。該由来源は生検、体液、射精された精液、尿または血液であるのが好ましい。該サンプルは処理してその中に含まれる核酸を抽出するようにしてもよい。サンプルから得られた核酸はゲル電気泳動法または他の分離法にかける。検出はサンプル中の核酸特にmRNAをハイブリッド2本鎖形成用のプローブとして機能するDNA配列と接触させるステップを含む。ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーはハイブリダイゼーション時および洗浄時の温度、イオン強度、持続時間、ホルムアミド濃度などを含む多数の因子によって決まる。これらの因子についてはたとえばSambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., 1989)で概説されている。形成される2本鎖の検出は通常、標識プローブの使用によって実現される。あるいは、プローブは無標識でも、直接間接に標識したリガンドとの特異的結合により検出しうるようにしてもよい。プローブおよびリガンドを標識するための好適な標識と標識法は技術上周知であり、たとえば公知の方法(たとえばニックトランスレーション法、キナーゼ法)によって導入してもよい放射性標識、ビオチン、蛍光残基、化学発光残基(たとえばジオキシエタン、特にトリガー試薬処理したジオキシエタン)、酵素、抗体などを含む。

【0114】

該遺伝子またはゲノム配列から転写されたmRNAの、サンプル中の検出感度を高めには、逆転写-PCR法を用いて該mRNAから転写されたcDNAを増幅することができる。この逆転写-PCR法は技術上周知である(たとえば前掲Watson and Flemingを参照)。

【0115】

10

20

30

40

50

逆転写-PCR法は次の要領で行うことができる。全細胞RNAをたとえば標準イソチオシアン酸グアニジウム法で単離し、全RNAを逆転写する。この逆転写法は逆転写酵素と3'末端プライマーの使用によるRNA鋳型上でのDNA合成を伴う。一般に、該プライマーはオリゴ(dT)配列を含む。こうして生成したcDNAを次にPCR法とEYA4特異的プライマーを使用して増幅する(Belyavsky et al, Nucl Acid Res 17:2919-2932, 1989; Krug and Berger, Methods in Enzymology, Academic Press, N.Y., Vol.152, pp.316-325, 1987。これらは参照をもって開示される)。

【0116】

表26記載の遺伝子、ゲノム配列またはゲノム配列によって調節される遺伝子がコードするポリペプチドの異常発現レベルは前立腺細胞増殖性疾患の発見および/または弁別に関連する。従って、該ポリペプチドの過剰または過少発現は前立腺がん腫、前立腺新生物および他の前立腺細胞増殖性疾患の存在に関連づけることができる。

10

【0117】

該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、該遺伝子および/または配列は配列番号1023、GSTP1、プロスタグランジンE2受容体、ヒストンH4、RASSF1A、PR-ドメイン・ジンクフィンガータンパク質16、LIMドメインキナーゼ1、オーファン核受容体NR5A2、配列番号11、配列番号1028、LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質、配列番号1019および配列番号1027からなる群より選択されるのが好ましい。

20

【0118】

該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、該遺伝子および/または配列はGstp1と、配列番号1017～配列番号1028からなる群より選択される1つまたは複数の配列とであるのも好ましい。該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、Gstp1と配列番号1023とを分析するのが特に好ましい。

【0119】

該方法の目的が前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物の診断および/またはそれらと良性前立腺肥大との弁別である場合には、配列番号1023を分析するのが特に好ましい。配列番号1023と、表26より選択される1つまたは複数の遺伝子および/または配列とを分析するのも好ましい。

30

【0120】

また、配列番号1023と、GSTP1、プロスタグランジンE2受容体、ヒストンH4、RASSF1A、PR-ドメイン・ジンクフィンガータンパク質16、LIMドメインキナーゼ1、オーファン核受容体NR5A2、配列番号11、配列番号1028、LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質、配列番号1019および配列番号1027からなる群より選択される1つまたは複数の遺伝子および/または配列とを分析するのも好ましい。

【0121】

特に好ましいのは表22および23に記載の遺伝子の組み合わせ、特に配列番号1023とGSTP1との分析である。

40

【0122】

該方法の目的が正常前立腺および/またはBPHのうちの1つと前立腺がんとの弁別である場合には、標的配列は表4に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0123】

該方法の目的が正常前立腺、正常組織のうちの1つと他組織との、他組織のがんおよび/

50

またはBPHと前立腺がんとの、弁別である場合には、標的配列は表5に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0124】

該方法の目的が前立腺がん他組織のがんとの弁別である場合には、標的配列は表6に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする

10

【0125】

技術上周知の任意のタンパク質検出法が使用できる。そうした検出法の非限定的な例は免疫拡散法、免疫電気泳動法、免疫化学法、バインダー-リガンド・アッセイ、免疫組織化学法、凝集および補体アッセイなどである。(たとえばBasic and Clinical Immunology, Sites and Terr, eds., Appleton & Lange, Norwalk, Conn. pp.217-262, 1991を参照。これは参照をもって開示される。) 好ましいのは、抗体をエピトープと反応させてその標識タンパク質または誘導体と競合的に取って代わるステップを含むバインダー-リガンド・イムノアッセイ法である。

【0126】

本発明のある種の実施態様は、表26に記載のゲノム領域の諸々の遺伝子およびゲノム配列からなる群の遺伝子またはゲノム配列によってコードされるポリペプチドに対して特異的な抗体の使用を含む。

20

【0127】

該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、該遺伝子および/または配列は配列番号1023、GSTP1、プロスタグランジンE2受容体、ヒストンH4、RASSF1A、PR-ドメイン・ジンクフィンガータンパク質16、LIMドメインキナーゼ1、オーファン核受容体NR5A2、配列番号11、配列番号1028、LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質、配列番号1019および配列番号1027からなる群より選択されるのが好ましい。

30

【0128】

該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、該遺伝子および/または配列はGstp1と、配列番号1017~配列番号1028からなる群より選択される1つまたは複数の配列とであるのも好ましい。該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、Gstp1と配列番号1023とを分析するのが特に好ましい。

【0129】

該方法の目的が前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物の診断および/またはそれらと良性前立腺肥大との弁別である場合には、配列番号1023を分析するのが特に好ましい。配列番号1023と、表26より選択される1つまたは複数の遺伝子および/または配列とを分析するのも好ましい。

40

【0130】

また、配列番号1023と、GSTP1、プロスタグランジンE2受容体、ヒストンH4、RASSF1A、PR-ドメイン・ジンクフィンガータンパク質16、LIMドメインキナーゼ1、オーファン核受容体NR5A2、配列番号11、配列番号1028、LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質、配列番号1019および配列番号1027からなる群より選択される1つまたは複数の遺伝子および/または配列とを分析するのも好ましい。

50

【0131】

特に好ましいのは表22および23に記載の遺伝子の組み合わせ、特に配列番号1023とGSTP1との分析である。

【0132】

該方法の目的が正常前立腺および/またはBPHのうちの1つと前立腺がんとの弁別である場合には、標的配列は表4に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0133】

該方法の目的が正常前立腺、正常組織のうちの1つと他組織との、他組織のがんおよび/またはBPHと前立腺がんとの、弁別である場合には、標的配列は表5に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0134】

該方法の目的が前立腺がんと他組織のがんとの弁別である場合には、標的配列は表6に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0135】

そうした抗体は、患者の前立腺疾患マーカーの発現レベルを健常者の同じマーカーの発現と比較することによる検出用途に有用であろう。実施態様によっては、モノクローナルまたはポリクローナル抗体の産生を、コードされたポリペプチドを抗原として使用することにより、誘発することができる。そうした抗体はヒト疾患マーカーとしての発現タンパク質の検出に使用することができる。末梢血または組織サンプル中のそうしたタンパク質の存在量は慣用の方法により定量化されよう。抗体-タンパク質結合は蛍光または放射性リガンドによる標識などのような、技術上周知の多様な手段によって検出し定量化してよい。本発明はさらに、前述の方法を実行するためのキットを含む。そうしたキットは被検ポリペプチド特異的な抗体を含む。

【0136】

多数の競合的および非競合的タンパク質結合イムノアッセイが技術上周知である。そうしたアッセイに使用する抗体は凝集試験の場合のように無標識でもよいし、また多様なアッセイ法の場合のように有標識でもよい。使用可能な標識の例はラジオイムノアッセイ(RIA)用、酵素イムノアッセイたとえば酵素抗体法(ELISA)用、蛍光イムノアッセイ用などの放射性核種、酵素、発蛍光体、化学発光体、酵素基質または補因子、酵素阻害物質、粒子、色素などである。ポリクローナルまたはモノクローナル抗体、またはそのエピトープは技術上周知の多数の方法のうち任意の方法によりイムノアッセイ用につくることができる。あるタンパク質に対する抗体を作製するための1つのアプローチは該タンパク質の一部または全部のアミノ酸配列の選定と作製、該配列の化学合成と然るべき動物通常はウサギまたはマウスへの注入である(Milstein and Kohler, Nature 256:496-497, 1975; Gutfre and Milstein, Methods in Enzymology: Immunochemical Techniques 73:1-46, Langone and Banatis eds., Academic Press, 1981. これらは参照により開示される)。ポリペプチドまたはそのエピトープの作製方法の非限定的な例は化学合成、組み換えDNA手法、または生体サンプルからの分離などである。

【0137】

特に好ましい実施態様では、表26記載の遺伝子および/またはゲノム配列の発現レベルは該遺伝子、ゲノム配列および/またはその調節領域のメチル化レベルの分析によって決

10

20

30

40

50

定される。

【0138】

該分析は次のステップを含む：

i) 被検者から得られたゲノムDNAに、該ゲノムDNAの少なくとも1つの標的領域の内部のメチル化および非メチル化CpGジヌクレオチドを弁別しうる少なくとも1つの試薬または一連の試薬を接触させるステップであって、該連続ヌクレオチドは少なくとも1つのCpGジヌクレオチドを含むことを特徴とするステップ；

ii) i)で分析した該標的列配のメチル化状態に従って前立腺細胞増殖性疾患の存否および/またはそのクラス分類を決定するステップ。

【0139】

該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、該遺伝子および/または配列は配列番号1023、GSTP1、プロスタグランジンE2受容体、ヒストンH4、RASSF1A、PR-ドメイン・ジンクフィンガータンパク質16、LIMドメインキナーゼ1、オーファン核受容体NR5A2、配列番号11、配列番号1028、LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質、配列番号1019および配列番号1027からなる群より選択されるのが好ましい。

【0140】

該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、該遺伝子および/または配列はGstp1と、配列番号1017～配列番号1028からなる群より選択される1つまたは複数の配列とであるのも好ましい。該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、Gstp1と配列番号1023とを分析するのが特に好ましい。

【0141】

該方法の目的が前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物の診断および/またはそれらと良性前立腺肥大との弁別である場合には、配列番号1023を分析するのが特に好ましい。配列番号1023と、表26より選択される1つまたは複数の遺伝子および/または配列とを分析するのも好ましい。

【0142】

また、配列番号1023と、GSTP1、プロスタグランジンE2受容体、ヒストンH4、RASSF1A、PR-ドメイン・ジンクフィンガータンパク質16、LIMドメインキナーゼ1、オーファン核受容体NR5A2、配列番号11、配列番号1028、LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質、配列番号1019および配列番号1027からなる群より選択される1つまたは複数の遺伝子および/または配列とを分析するのも好ましい。

【0143】

特に好ましいのは表22および23に記載の遺伝子の組み合わせ、特に配列番号1023とGSTP1との分析である。

【0144】

該方法の目的が正常前立腺および/またはBPHのうちの1つと前立腺がんとの弁別である場合には、標的配列は表4に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0145】

該方法の目的が正常前立腺、正常組織のうちの1つと他組織との、他組織のがんおよび/またはBPHと前立腺がんとの、弁別である場合には、標的配列は表5に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つ

10

20

30

40

50

または複数の配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0146】

該方法の目的が前立腺がんと他組織のがんとの弁別である場合には、標的配列は表6に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0147】

該メチル化分析の第1ステップでは、分析対象のゲノムDNAを分離する。ゲノムDNAの分離には市販キットの使用など技術上の標準である任意の手段を用いてよい。簡単に言えば、関心DNAが細胞膜に包まれている場合には、生体サンプルを酵素的、化学的または機械的な手段より破壊し、溶解しなければならない。次いでDNA溶液からタンパク質や他の不純物をプロテイナーゼKによる消化などによって除去し、該溶液からDNAを回収する。これは、塩析、有機抽出または固相担体へのDNAの結合などを含む多用な方法で行うことができる。方法の選択は所要時間、費用およびDNA所要量などいくつかの因子により左右されよう。

10

【0148】

DNAサンプルの由来源は細胞または細胞系、組織スライド、生検、パラフィン包埋組織、体液、射精された精液、尿、血液、およびそれらの組み合わせからなる群より選択するのが好ましい。該由来源は生検、体液、射精された精液、尿または血液であるのが好ましい。

20

【0149】

次にゲノムDNAサンプルを処理して、5'位がメチル化されていないシトシン塩基がウラシル、チミン、またはハイブリダイゼーション挙動がシトシンとは異なる別の塩基に変換されるようにする。これは本明細書では「処理」として理解されよう。

【0150】

前記のゲノムDNA処理は亜硫酸水素塩(亜硫酸水素、二亜硫酸塩)で、次にアルカリ性加水分解で行われ、非メチル化シトシン核酸塩基がウラシルへと、またはシトシンとは塩基対合挙動を異にする別の塩基へと、変換される結果になるのが好ましい。

30

【0151】

次に、処理したDNAを分析して、前立腺細胞増殖性疾患の存在に関連するおよび/またそうした疾患のサブタイプを示唆する1つまたは複数の(処理前の)標的遺伝子配列のメチル化状態を判定するようにする。該標的領域は表26に記載の遺伝子およびゲノム配列からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子またはゲノム配列の少なくとも16連続ヌクレオチドを含む、または該連続ヌクレオチドとストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。表26に記載の遺伝子の、添付配列表で開示するような配列を分析するのがさらに好ましい。

【0152】

該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、該標的配列は配列番号1023、配列番号57、配列番号20、配列番号36、配列番号1171、配列番号51、配列番号31、配列番号24、配列番号11、配列番号1028、配列番号4、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、配列番号18、配列番号1019および配列番号1027からなる群より選択される配列の少なくとも16連続ヌクレオチドを含むかまたは該連続ヌクレオチドとストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。従って、該配列は処理後に、表26に従う配列番号1043、1044、172、173、98、99、130、131、1172、1173、160、161、120、121、106、107、80、81、1051、1052、66、67、1117、118、1045、1046、1035、1036、94、95、1033、1034、1049、1050およびそれらの連続領域からなる群より選択される、対応する変換または非変換ジヌクレオチド配列へと変換されるのが好ましい。

40

50

【 0 1 5 3 】

該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、該標的配列は配列番号57と、配列番号1017～配列番号1028からなる群より選択される1つまたは複数の配列とからなる群より選択される配列の少なくとも16連続ヌクレオチドを含む配列を含むか、または該配列とストリンジентな条件の下でハイブリダイズするのも好ましい。

【 0 1 5 4 】

該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、配列番号57と配列番号1023を分析するのが特に好ましい。

10

【 0 1 5 5 】

該方法の目的が前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物の診断および/またはそれらと良性前立腺肥大との弁別である場合には、配列番号1023を分析するのが特に好ましい。配列番号1023と、表26より選択される1つまたは複数の遺伝子および/または配列とを分析するのも好ましい。

【 0 1 5 6 】

また、配列番号1023と、GSTP1、プロスタグランジンE2受容体、ヒストンH4、RASSF1A、PR-ドメイン・ジンクフィンガータンパク質16、LIMドメインキナーゼ1、オーファン核受容体NR5A2、配列番号11、配列番号1028、LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質、配列番号1019および配列番号1027からなる群より選択される1つまたは複数の遺伝子および/または配列とを分析するのも好ましい。

20

【 0 1 5 7 】

特に好ましいのは表22および23に記載の遺伝子の組み合わせ、特に配列番号1023とGSTP1との分析である。

【 0 1 5 8 】

該方法の目的が正常前立腺および/またはBPHのうちの1つと前立腺がんとの弁別である場合には、標的配列は表4に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジентな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

30

【 0 1 5 9 】

該方法の目的が正常前立腺、正常組織のうちの1つと他組織との、他組織のがんおよび/またはBPHと前立腺がんとの、弁別である場合には、標的配列は表5に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジентな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【 0 1 6 0 】

該方法の目的が前立腺がんと他組織のがんとの弁別である場合には、標的配列は表6に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジентな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

40

【 0 1 6 1 】

該分析方法は、本明細書に記載のものを含めた技術上周知の方法から選択してもよい。特に好ましいのは本明細書で開示するようなMethyLight、MSP、およびブロッキングオリゴヌクレオチドの使用である。そうした分析に使用される(プライマー、ブロッキングオリゴヌクレオチドおよび検出プローブを含む)任意のオリゴヌクレオチドは配列番号60～295、1029～1076、1117～1120、1172～1175およびそれらの相補配列のうちの1つまたは複

50

数の塩基配列の、鎖長16塩基対以上の断片と逆相補的である、同一である、またはストリンジェントなまたは高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするのがさらに好ましい。そうした分析に使用される(プライマー、ブロッキングオリゴヌクレオチドおよび検出プローブを含む)任意のオリゴヌクレオチドは配列番号1043、1044、172、173、98、99、130、131、1172、1173、160、161、120、121、106、107、80、81、1051、1052、66、67、1117、118、1045、1046、1035、1036、94、95、1033、1034、1049、1050およびそれらの相補配列のうちの1つまたは複数の塩基配列の、鎖長16塩基対以上の断片と逆相補的である、同一である、またはストリンジェントなまたは高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするのがさらに好ましい。

【0162】

10

表26に記載のものから選択される1つまたは複数の遺伝子またはゲノム配列の異常メチル化特に高メチル化は前立腺細胞増殖性疾患の存在に関連する。1つまたは複数の該配列の分析により前立腺細胞増殖性疾患の発見および/または弁別が可能となる。

【0163】

一実施態様では、該方法は表26に記載の遺伝子からなる群より選択される1つまたは複数の遺伝子またはゲノム配列の、前立腺細胞増殖性疾患の発見および/または弁別のためのマーカーとしての使用を含む。

【0164】

該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、該遺伝子および/または配列は配列番号1023、GSTP1、プロスタグランジンE2受容体、ヒストンH4、RASSF1A、PR-ドメイン・ジンクフィンガータンパク質16、LIMドメインキナーゼ1、オーファン核受容体NR5A2、配列番号11、配列番号1028、LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質、配列番号1019および配列番号1027からなる群より選択されるのが好ましい。

20

【0165】

該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、該遺伝子および/または配列はGstp1と、配列番号1017~配列番号1028からなる群より選択される1つまたは複数の配列とであるのも好ましい。該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、Gstp1と配列番号1023とを分析するのが特に好ましい。

30

【0166】

該方法の目的が前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物の診断および/またはそれらと良性前立腺肥大との弁別である場合には、配列番号1023を分析するのが特に好ましい。配列番号1023と、表26より選択される1つまたは複数の遺伝子および/または配列とを分析するのも好ましい。

【0167】

また、配列番号1023と、GSTP1、プロスタグランジンE2受容体、ヒストンH4、RASSF1A、PR-ドメイン・ジンクフィンガータンパク質16、LIMドメインキナーゼ1、オーファン核受容体NR5A2、配列番号11、配列番号1028、LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質、配列番号1019および配列番号1027からなる群より選択される1つまたは複数の遺伝子および/または配列とを分析するのも好ましい。

40

【0168】

特に好ましいのは表22および23に記載の遺伝子の組み合わせ、特に配列番号1023とGSTP1との分析である。

【0169】

該方法の目的が正常前立腺および/またはBPHのうちの1つと前立腺がんとの弁別である場合には、標的配列は表4に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG

50

、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0170】

該方法の目的が正常前立腺、正常組織のうちの1つと他組織との、他組織のがんおよび/またはBPHと前立腺がんと、弁別である場合には、標的配列は表5に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

10

【0171】

該方法の目的が前立腺がんとは他組織のがんとを弁別である場合には、標的配列は表6に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0172】

本発明のある種の実施態様は、生体サンプルの検査による前立腺細胞増殖性疾患の発見および/または弁別に使用するためのキットである。代表的なキットはmRNAと選択的にハイブリダイズする1つまたは複数の核酸断片と該核酸断片の各々に対応する容器とを含んでもよい。ある種の実施態様では、該核酸断片は単一チューブ中に混合されている。さらなる実施態様では、該核酸断片はさらに、標的mRNAを増幅するためのプライマー対を含んでもよい。そうしたキットはさらに、ハイブリダイゼーション、増幅または検出反応のための、任意の緩衝液、溶液、溶媒、酵素、ヌクレオチド、または他の構成要素を含んでもよい。好ましいキット構成要素は逆転写PCR、in situハイブリダイゼーション、ノーザン法および/またはRPA用の試薬を含む。

20

【0173】

本発明の特定の実施態様は、該配列内のメチル化度および/またはパターンの分析の、前立腺細胞増殖性疾患の早期発見とそれに基づく治療の改善とを可能にする新規用途を提供する。さらに、開示の方法は良性疾患を、悪性の可能性があり、また患者の健康にはるかに重大な影響を及ぼす可能性がある前立腺がん腫および新生物などのような疾患から弁別することを可能にする。前立腺細胞増殖性疾患の治療は早期発見により改善するので、開示の方法は医師と患者による、より良い、より多くの情報に基づく治療法の決定を可能にする。

30

【0174】

さらなる改良

本発明は配列番号1~59、配列番号1017~1028、配列番号1116および配列番号1171からなる群より選択されるゲノム配列の新規な使用を提供する。追加の実施態様は、配列番号1~59、配列番号1017~1028、配列番号1116および配列番号1171の修飾変異体、ならびにオリゴヌクレオチドおよび/またはPNA-オリゴマーを、配列番号1~59、配列番号1017~1028、配列番号1116および配列番号1171からなる群内のシトシン・メチル化パターンの分析用に提供する。

40

【0175】

本発明の目的は配列番号1~59、配列番号1017~1028、配列番号1116、配列番号1171およびその相補配列からなる群より選択される少なくとも1つのゲノム配列内の1つまたは複数のCpGジヌクレオチドのメチル化状態の分析を含む。

【0176】

開示の発明はゲノム配列番号1~59、配列番号1017~1028、配列番号1116および配列番号1171に由来する処理核酸を提供するが、該処理は該ゲノムDNA配列の少なくとも1つの非メチル化シトシン塩基をウラシルに、またはハイブリダイゼーション挙動がシトシンとは

50

明らかに異なる別の塩基に、変換するのに適する。問題のゲノム配列は1つまたは複数の連続した、または任意の、メチル化CpG位置を含んでよい。該処理は亜硫酸水素塩、亜硫酸水素、二亜硫酸塩およびそれらの組み合わせからなる群より選択される試薬の使用を含むのが好ましい。本発明の好ましい実施態様では、該目的は少なくとも1つのCpG、TpAまたはCpAジヌクレオチドを含む配列番号60～295、1029～1076、1117～1120、1172～1175およびその相補配列からなる群より選択される配列のうち鎖長16連続ヌクレオチド塩基以上の配列を含む非天然型修飾塩基の分析を含む。本発明の好ましい、さらなる実施態様では、該目的は少なくとも1つのCpG、TpAまたはCpAジヌクレオチドを含む配列番号1043、1044、172、173、98、99、130、131、1172、1173、160、161、120、121、106、107、80、81、1051、1052、66、67、1117、118、1045、1046、1035、1036、94、95、1033、1034、1049、1050およびその相補配列からなる群より選択される配列のうち鎖長16連続ヌクレオチド塩基以上の配列を含む非天然型修飾塩基の分析を含む。配列番号60～295、1029～1076、1117～1120、1172～1175の配列は、配列番号1～59、配列番号1017～1028、配列番号1116および配列番号1171の核酸の非天然型修飾体を提供するが、各ゲノム配列の修飾の結果として、ユニークな、次の点で該ゲノム配列とは異なる配列を有する核酸が合成されることになる。各センス鎖ゲノムDNAたとえば配列番号1につき4つの変換体が開示される。第1の変換体：C TであるがCpGはCpGのままにとどまる(すなわちゲノム配列で、CpGジヌクレオチド配列の全C残基がメチル化されていて、そのために変換を免れる場合に相当)；第2の変換体：開示ゲノム配列の相補体(すなわちアンチセンス鎖)であり、C TであるがCpGはCpGのままにとどまる(すなわちCpGジヌクレオチド配列の全C残基がメチル化体であって、そのために変換を免れる場合に相当)。

【0177】

別の好ましい実施態様では、そうした分析は配列番号1～59、配列番号1017～1028、配列番号1116、配列番号1171、配列番号60～295、1029～1076、1117～1120、1171～1175のゲノムまたは処理(非天然型の修飾)DNA内のシトシン・メチル化状態を検出するためのオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーの使用を含む。好ましい実施態様では、そうした分析は配列番号1043、1044、172、173、98、99、130、131、1172、1173、160、161、120、121、106、107、80、81、1051、1052、66、67、1117、118、1045、1046、1035、1036、94、95、1033、1034、1049、1050のゲノムまたは処理(化学修飾)DNA内のシトシン・メチル化状態を検出するためのオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーの使用を含む。

【0178】

該オリゴヌクレオチドまたはオリゴマーは各々、配列番号60～295、1029～1076、1117～1120、1171～1175の処理核酸配列および/またはその相補配列と、または配列番号1～59、配列番号1017～1028、配列番号1116および配列番号1171のゲノム配列および/またはその相補配列と、中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件(前述)下でハイブリダイズする、鎖長9ヌクレオチド以上の核酸配列を含む。

【0179】

特に好ましいのは、配列番号1043、1044、172、173、98、99、130、131、1172、1173、160、161、120、121、106、107、80、81、1051、1052、66、67、1117、118、1045、1046、1035、1036、94、95、1033、1034、1049、1050の処理核酸配列および/またはその相補配列と、中程度にストリンジェントなまたはストリンジェントな条件(前述)下でハイブリダイズする、鎖長9ヌクレオチド以上の核酸配列を含むオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーである。

【0180】

従って本発明は、配列番号1～59、配列番号1017～1028、配列番号1116、配列番号1171、配列番号60～295、1029～1076、1117～1120、1172～1175の配列の全部または一部と、またはその相補体と、中程度にストリンジェントなおよび/またはストリンジェントな条件下で、ハイブリダイズする核酸分子[たとえばオリゴヌクレオチドおよびペプチド核酸(PNA)分子(PNA-オリゴマー)]を包含する。ハイブリダイズする核酸のハイブリダイズする部分は一般に鎖長が9、15、20、25、30または35ヌクレオチド以上である。しかし、もっ

10

20

30

40

50

と長い分子でも発明の有用性があり、従って本発明の範囲内に包摂される。

【0181】

好ましくは、本発明のハイブリダイズする核酸分子のハイブリダイズする部分は配列番号60~295、1029~1076、1117~1120、1172~1175の配列の全部または一部、またはその相補体との同一性が少なくとも95%または少なくとも98%または100%である。

【0182】

本明細書で開示するタイプのハイブリダイズする核酸はたとえばプライマー(PCRプライマーなど)として、または診断および/または予後用プローブまたはプライマーとして使用することができる。好ましくは、該オリゴヌクレオチドプローブの核酸サンプルとのハイブリダイゼーションはストリンジエントな条件の下で行い、プローブは標的配列と100%同一である。核酸2本鎖またはハイブリッド安定性は、プローブが標的DNAから解離する温度である融解温度 T_m として表される。この融解温度は要求されるストリンジエント条件の定義に使用される。

10

【0183】

配列番号1~59、配列番号1017~1028、配列番号1116および配列番号1171の対応する配列と同一であるよりもむしろ該配列に関連する、または該配列と実質的に同一である、標的配列(たとえば対立遺伝子多型およびSNPs)では、特定の塩(SSCまたはSSPEなど)濃度で相同ハイブリダイゼーションだけが起こる最低温度をまず確定するのが好都合である。次いで、1%ミスマッチあたりの T_m 低下幅を1と仮定し、それに応じてハイブリダイゼーション反応の最終洗浄温度を引き下げる(たとえばプローブとの同一性が95%超である配列を求めるのであれば、最終洗浄温度は5引き下げる)。実際には T_m の変動幅は1%のミスマッチにつき0.5~1.5となる可能性がある。

20

【0184】

たとえば配列番号1に関してポリヌクレオチド位置によって示すような鎖長 X (単位:ヌクレオチド)の本発明オリゴヌクレオチドの例は、連続的に重複する鎖長 X のオリゴヌクレオチドのセット(センス鎖およびアンチセンス鎖のセット)に対応するものを含むが、(任意の X 値に対応する)各連続重複セット内のオリゴヌクレオチドはヌクレオチド位置からの Z オリゴヌクレオチドのサブセット $n \sim (n+(X-1))$ と定義される:

【0185】

ただし、 $n=1,2,3, \dots (Y-(X-1))$;

30

ただし Y は配列番号1の鎖長(単位:ヌクレオチドまたは塩基対)に等しい(2299);

【0186】

X は該セット内の各オリゴヌクレオチドの共通鎖長(単位:ヌクレオチド)に等しい(たとえば連続重複20マーのセットなら $X=20$); および

【0187】

鎖長 Y の任意の配列番号に関する鎖長 X の連続重複オリゴマーの数(Z)は $Y-(X-1)$ に等しい。たとえば $X=20$ の場合、配列番号1のセンス鎖またはアンチセンス鎖のセットでは $Z=2299-19=2280$ である。

【0188】

好ましくは、該セットは少なくとも1つのCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含むオリゴマーのセットに限定される。

40

【0189】

本発明の20マー・オリゴヌクレオチドの例は配列番号1に関するポリヌクレオチド位置によって示される次の2280オリゴマーのセット(およびその相補アンチセンス鎖のセット)を含む:

【0190】

1-20, 2-21, 3-22, 4-23, 5-24,2280-2299。

好ましくは、該セットは少なくとも1つのCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含むオリゴマーに限定される。

【0191】

50

同様にして、本発明の25マー・オリゴヌクレオチドの例は配列番号1に関するポリヌクレオチド位置によって示される次の2,256オリゴマーのセット(およびその相補アンチセンス鎖のセット)を含む:

【0192】

1-25, 2-26, 3-27, 4-28, 5-29,2280-2299.

好ましくは、該セットは少なくとも1つのCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含むオリゴマーに限定される。

【0193】

本発明は配列番号1~59、配列番号1017~1028、配列番号1116、配列番号1171、配列番号60~295、1029~1076、1117~1120、1172~1175(センス鎖およびアンチセンス鎖)の各々について、鎖長X(ただしX=9, 10, 17, 20, 22, 23, 25, 27, 30または35ヌクレオチド)のオリゴヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドの多数の連続重複セットを包摂する。

10

【0194】

本発明のオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーは配列番号1~59、配列番号1017~1028、配列番号1116および配列番号1171に対応するゲノム配列の遺伝的および/または非遺伝的パラメータを確認するのに役立つ効果的な手段となる。該オリゴマーは少なくとも1つのCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含むのが好ましい。

【0195】

本発明のオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーで特に好ましいのはCpGジヌクレオチド(または対応する変換TpGまたはCpAジヌクレオチド)配列のシトシンが該オリゴヌクレオチドの中間3分の1内に存在するものである。すなわちオリゴヌクレオチドがたとえば鎖長13塩基であれば、CpG、TpGまたはCpGジヌクレオチドが5'末端から5番目~9番目ヌクレオチドの範囲内に存在するようなオリゴヌクレオチドである。

20

【0196】

本発明のオリゴヌクレオチドはまた、1つまたは複数の残基またはコンジュゲートへと化学的に結合させることによって修飾し、該オリゴヌクレオチドの活性、安定性および検出を高めることができる。そうした残基またはコンジュゲートの例は発色団、蛍光体、脂質たとえばコレステロール、コール酸、チオエーテル、脂肪族鎖、リン脂質、ポリアミン、ポリエチレングリコール(PEG)、パルミチル基、およびたとえば米国特許第5,514,758号、第5,565,552号、第5,567,810号、第5,574,142号、第5,585,481号、第5,587,371号、第5,597,696号および第5,958,773号の各明細書で開示されている他のものなどである。プローブはまた、特に好ましい対合特性をもつPNA(ペプチド核酸)の形で存在してもよい。従って、該オリゴヌクレオチドはペプチドなどのような他の付加基を含んでもよいし、またハイブリダイゼーションを誘因とする切断剤(Krol et al., BioTechniques 6:958-976, 1988)またはインターカレート剤(Zon, Pharm. Res. 5:539-549, 1988)を含んでもよい。この目的のために、該オリゴヌクレオチドは別の分子たとえば発色団、蛍光体、ペプチド、ハイブリダイゼーションを誘因とする架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーションを誘因とする切断剤などにコンジュゲートしてもよい。

30

【0197】

該オリゴヌクレオチドはまた、少なくとも1つの、技術的に認められた修飾糖および/または塩基部分を含んでもよい、または修飾骨格または非天然ヌクレオシド間結合を含んでもよい。

40

【0198】

本発明の特定の実施態様に従うオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーは一般に「セット」で使用されるが、該セットは配列番号1~59、配列番号1017~1028、配列番号1116および配列番号1171のゲノム配列およびそれらの相補配列のCpGジヌクレオチドの、または配列番号60~295、1029~1076、1117~1120、1172~1175、1017~配列番号1028およびその相補配列に従う処理核酸配列内の対応するCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドの、各々を分析するための少なくとも1つのオリゴマーを含む。しかし、経済的要因等により、該配列内の限られた特定のCpGジヌクレオチドを分析するのが好ましい場合もあることは想定

50

されるので、その場合は該オリゴヌクレオチドセットの内容もそれに応じて変更されよう。

【 0 1 9 9 】

従って特定の実施態様では、本発明は処理ゲノムDNA(配列番号60~295、1029~1076、1117~1120、1172~1175)またはゲノムDNA(配列番号1~59、配列番号1017~1028、配列番号1116および配列番号1171またはその相補配列)のシトシン・メチル化状態の検出に有用である少なくとも2つの(オリゴヌクレオチドおよび/またはPNA-オリゴマー)からなるセットを提供する。これらのプローブは前立腺細胞増殖性疾患の遺伝的および/または非遺伝的パラメーターの診断および/またはクラス分類を可能にする。該オリゴマーセットは処理ゲノムDNA(配列番号60~295、1029~1076、1117~1120、1172~1175)またはゲノムDNA(配列番号1~59、配列番号1017~1028、配列番号1116および配列番号1171またはその相補配列)の単一塩基多型(SNPs)の検出に使用してもよい。

10

【 0 2 0 0 】

特に好ましいのは、処理ゲノムDNA(配列番号1043、1044、172、173、98、99、130、131、1172、1173、160、161、120、121、106、107、80、81、1051、1052、66、67、1117、118、1045、1046、1035、1036、94、95、1033、1034、1049、1050)のシトシン・メチル化状態の検出に有用である少なくとも2つの(オリゴヌクレオチドおよび/またはPNA-オリゴマー)からなるセットである。

【 0 2 0 1 】

好ましい実施態様では、オリゴヌクレオチドセットの少なくとも1つの、またなお好ましくはすべての、構成メンバーが固相に結合される。

20

【 0 2 0 2 】

さらなる実施態様では、本発明は配列番号1~59、配列番号1017~1028、配列番号1116、配列番号1171、配列番号60~295、1029~1076、1117~1120、1172~1175およびその相補配列のうちの1つのDNA配列を、またはそれらの断片を、増幅するための「プライマー」オリゴヌクレオチドとして使用される少なくとも2つのオリゴヌクレオチドからなるセットを提供する。

【 0 2 0 3 】

特に好ましいのは、配列番号1043、1044、172、173、98、99、130、131、1172、1173、160、161、120、121、106、107、80、81、1051、1052、66、67、1117、118、1045、1046、1035、1036、94、95、1033、1034、1049、1050のうちの1つのDNA配列を増幅するための「プライマー」として使用される少なくとも2つの(オリゴヌクレオチドおよび/またはPNA-オリゴマー)からなるセットである。

30

【 0 2 0 4 】

該オリゴヌクレオチドセットは「アレイ」または「DNAチップ」(すなわち固相に結合させた種々のオリゴヌクレオチドおよび/またはPNA-オリゴマー配列の配置)の全部または一部を構成する場合もあるものと想定される。そうした種々のオリゴヌクレオチドおよび/またはPNA-オリゴマー配列のアレイは、たとえば固相上に四角形または六角形の格子状に配置してあることを特徴とする。固相表面はケイ素、ガラス、ポリスチレン、アルミニウム、鋼、鉄、銅、ニッケル、銀または金からなってもよい。ペレットまたは樹脂マトリックスの形で存在しうるニトロセルロースとナイロンなどのプラスチックとを使用してもよい。オリゴマー・アレイ製造の公知技術の概要はNature Geneticsの増刊号(Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999)およびその中の引用文献に求めることができる。固定化DNAアレイのスキャニングにはしばしば蛍光標識プローブが使用される。蛍光標識には、特異的プローブの5'-OHに対するCy3およびCy5色素の単純な結合が特に好適である。ハイブリダイズしたプローブの蛍光の検出はたとえば共焦点顕微鏡を使用して行うことができる。Cy3およびCy5色素は他の多数の色素と共に商業的に入手することができる。

40

【 0 2 0 5 】

また、該オリゴヌクレオチドセットまたはその中の特定の配列は被分析物の複雑な混合

50

体の分析を目的に、「バーチャルアレイ」の全部または一部を構成し、たとえば多様な特異的標識プローブセットの一部として、またはそうしたセットと組み合わせて、「指定子」として使用される場合もあるものと想定される。そうした方法はたとえば米国出願公開第US 2003/0013091号(米国出願第09/898,743号、2003年1月16日公開)明細書で開示されている。そうした方法では、複雑な混合体中の各核酸(すなわち各被分析物)が特異的標識の特異的結合によって検出されるよう、十分な標識が生成される(各標識は直接計数され、該混合体中の各分子種のデジタル情報が得られる結果となる)。

【0206】

本発明のオリゴマーは次のうち少なくとも1の用途に使用するのが特に好ましい: 前立腺細胞増殖性疾患の発見; 集団検診; 弁別; 監視; および発見と監視。これは該セットの、患者から分離した生体サンプル中の前立腺細胞増殖性疾患の発見および/または弁別への使用によって可能となる。特に好ましいのは、次のオリゴヌクレオチドセットのうちの1つより選択される少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むオリゴマーセットである。

10

【0207】

該方法の一実施態様では、表26に記載の遺伝子および配列、それにその相補体からなる群より選択される遺伝子または配列の少なくとも16連続ヌクレオチドを含む、またはその少なくとも16の連続ヌクレオチドとストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする、少なくとも1つの標的配列のメチル化状態の分析により実現される。

【0208】

該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、該遺伝子および/または配列は配列番号1023、GSTP1、プロスタグランジンE2受容体、ヒストンH4、RASSF1A、PR-ドメイン・ジンクフィンガータンパク質16、LIMドメインキナーゼ1、オーファン核受容体NR5A2、配列番号11、配列番号1028、LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質、配列番号1019および配列番号1027からなる群より選択されるのが好ましい。

20

【0209】

該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、該遺伝子および/または配列はGstp1と、配列番号1017~配列番号1028からなる群より選択される1つまたは複数の配列とであるのも好ましい。該方法の目的が前立腺細胞増殖性疾患(最も好ましくは前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物)の診断である場合には、Gstp1と配列番号1023とを分析するのが特に好ましい。

30

【0210】

該方法の目的が前立腺がん、前立腺がん腫および/または前立腺新生物の診断および/またはそれらと良性前立腺肥大との弁別である場合には、配列番号1023を分析するのが特に好ましい。配列番号1023と、表26より選択される1つまたは複数の遺伝子および/または配列とを分析するのも好ましい。

【0211】

また、配列番号1023と、GSTP1、プロスタグランジンE2受容体、ヒストンH4、RASSF1A、PR-ドメイン・ジンクフィンガータンパク質16、LIMドメインキナーゼ1、オーファン核受容体NR5A2、配列番号11、配列番号1028、LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9、配列番号1116、配列番号1025、配列番号1020、リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質、配列番号1019および配列番号1027からなる群より選択される1つまたは複数の遺伝子および/または配列とを分析するのも好ましい。

40

【0212】

特に好ましいのは表22および23に記載の遺伝子の組み合わせ、特に配列番号1023とGSTP1との分析である。

【0213】

該方法の目的が正常前立腺および/またはBPHのうちの1つと前立腺がんとの弁別である

50

場合には、標的配列は表4に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジентな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0214】

該方法の目的が正常前立腺、正常組織のうちの1つと他組織との、他組織のがんおよび/またはBPHと前立腺がんと、弁別である場合には、標的配列は表5に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジентな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

10

【0215】

該方法の目的が前立腺がんとは他組織のがんとを弁別である場合には、標的配列は表6に記載の配列の少なくとも16連続ヌクレオチド(であって、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを少なくとも1つ含む少なくとも16連続ヌクレオチド)を含む1つまたは複数の配列を含むか、または該1つまたは複数の配列とストリンジентな条件の下でハイブリダイズするのが特に好ましい。

【0216】

本発明はさらに、被検者内の配列番号1~59、配列番号1017~1028、配列番号1116および配列番号1171のゲノム配列の遺伝的および/または非遺伝的パラメーターをシトシン・メチル化と一塩基多型の分析により確認するための方法を提供する。該方法は該被検者から獲得した生体サンプル中の1つまたは複数の配列番号1~59、配列番号1017~1028、配列番号1116および配列番号1171を含む核酸に、少なくとも1つの試薬または一連の試薬を接触させるステップを含み、該試薬または一連の試薬で標的核酸内のメチル化および非メチル化CpGジヌクレオチドを弁別することを特徴とする。

20

【0217】

好ましくは、該方法は次のステップを含む：第1のステップで検査対象組織のサンプルを獲得する。DNAサンプルの由来は細胞または細胞系、組織スライド、生検、パラフィン包埋組織、体液、射精された精液、尿、血液、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。該DNA源は生検、体液、射精された精液、尿または血液であるのが好ましい。

30

【0218】

次に該ゲノムDNAをサンプルから単離する。ゲノムDNAの単離には市販キットの使用など技術上の標準である任意の手段を用いてよい。簡単に言えば、関心DNAが細胞膜に包まれている場合には、生体サンプルを酵素的、化学的または機械的な手段より破壊し、溶解しなければならない。次いでDNA溶液からタンパク質や他の不純物をプロテイナーゼKによる消化などによって除去し、該溶液からDNAを回収する。これは、塩析、有機抽出または固相担体へのDNAの結合などを含む多様な方法で行うことができる。方法の選択は所要時間、費用およびDNA量などいくつかの因子により左右されよう。

【0219】

核酸の抽出が済んだら、2本鎖のゲノムDNAを分析に使用する。

該方法の第2ステップでゲノムDNAサンプルを処理して、5'位がメチル化されていないシトシン塩基がウラシル、チミン、またはハイブリダイゼーション挙動がシトシンとは異なる別の塩基に変換されるようにする。これは本明細書では「前処理」または「処理」として理解されよう。

40

【0220】

前記のゲノムDNA処理は亜硫酸水素塩(亜硫酸水素、二亜硫酸塩)で、次にアルカリ性加水分解で行われ、非メチル化シトシン核酸塩基がウラシルへと、またはシトシンとは塩基対合挙動を異にする別の塩基へと、変換される結果になるのが好ましい。

【0221】

50

該方法の第3ステップでは、処理DNAの断片を、本発明のプライマーセットと増幅酵素の使用により増幅する。数DNA断片の増幅は同一反応容器で同時に行うことができる。一般に、この増幅はPCR法で行う。プライマーセットは少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含み、それらの配列が各々、配列番号60～295、1029～1076、1117～1120、1172～1175およびそれらの相補配列のうちの1つまたは複数の塩基配列の、鎖長16塩基対以上の断片と逆相補的である、同一である、またはストリンジェントなまたは高度にストリンジェントな条件の下でハイブリダイズすることを特徴とする。

【0222】

特に好ましいのは、少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含み、それらの配列が配列番号1043、1044、172、173、98、99、130、131、1172、1173、160、161、120、121、106、107、80、81、1051、1052、66、67、1117、118、1045、1046、1035、1036、94、95、1033、1034、1049、1050およびそれらの相補配列のうちの1つの塩基配列の、鎖長16塩基対以上の断片と逆相補的である、同一である、またはストリンジェントなまたは高度にストリンジェントな条件の下でハイブリダイズすることを特徴とするプライマーセットである。

10

【0223】

該方法の別の実施態様では、配列番号1～59、配列番号1017～1028、配列番号1116および配列番号1171のうちの1つまたは複数の配列を含む核酸配列内の、予め選定したCpG位置のメチル化状態がメチル化特異的プライマーの使用により検出されよう。この手法(MSP)はHermanに付与された米国特許第6,265,171号の明細書で開示されている。亜硫酸水素塩処理DNAの増幅へのメチル化状態特異的プライマーの使用は、メチル化核酸と非メチル化核酸の弁別を可能にする。MSPプライマー対は、亜硫酸水素塩処理CpGジヌクレオチドにハイブリダイズする少なくとも1つのプライマーを含む。従って、該プライマー対の配列は少なくとも1つのCpGジヌクレオチドを含む。非メチル化DNAに対して特異的なMSPプライマーはCpGのCの位置にTを含む。従って好ましくは、該プライマーの塩基配列は配列番号60～295、1029～1076、1117～1120、1172～1175およびそれらの相補配列のうちの1つの処理核酸配列にハイブリダイズする鎖長9ヌクレオチド以上の配列を含む必要があるが、該オリゴマーの塩基配列は少なくとも1つのCpGジヌクレオチドを含む。

20

【0224】

好ましくは、該プライマーの塩基配列は配列番号1043、1044、172、173、98、99、130、131、1172、1173、160、161、120、121、106、107、80、81、1051、1052、66、67、1117、118、1045、1046、1035、1036、94、95、1033、1034、1049、1050およびそれらの相補配列のうちの1つの処理核酸配列にハイブリダイズする鎖長9ヌクレオチド以上の配列を含む必要があるが、該オリゴマーの塩基配列は少なくとも1つのCpGジヌクレオチドを含む。

30

【0225】

該方法のさらなる好ましい実施態様はブロッカーオリゴヌクレオチドの使用を含む。そうしたブロッカーオリゴヌクレオチドの使用についてはYu et al., BioTechniques 23:714-720, 1997で開示されている。ブロッキングプローブ・オリゴヌクレオチドはPCRプライマーと共に亜硫酸水素塩処理核酸にハイブリダイズさせる。該核酸のPCR増幅は該ブロッキングプローブの5'位で終了する。すなわち核酸増幅はブロッキングプローブに対する相補配列が存在する位置で抑制されるようにする。該プローブは亜硫酸水素塩処理核酸にメチル化状態特異的にハイブリダイズするよう設計してもよい。たとえば非メチル化核酸セット内のメチル化核酸の検出では、メチル化核酸の増幅の抑制が求められる場合、問題の位置が非メチル化状態にある核酸の増幅の抑制は問題の位置にCpGではなくCpAまたはTpAを含むブロッキングプローブを使用することによって行われよう。

40

【0226】

ブロッカーオリゴヌクレオチドを使用するPCR法では、ポリメラーゼ介在性増幅を効率的に妨げるにはブロッカーオリゴヌクレオチドがポリメラーゼによる伸長を被らないようにする必要がある。好ましくは、これはブロッカー(すなわち3'-デオキシオリゴヌクレオチド、または「遊離」OH基以外により3'位で誘導体化したオリゴヌクレオチド)の使用

50

により実現される。たとえば3'-0-アセチルオリゴヌクレオチドは好ましい種類のブロッカー分子の代表である。

【0227】

加えて、ブロッカーオリゴヌクレオチドのポリメラーゼ介在性分解は妨げるのがよい。好ましくは、そうした妨害は5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を欠くポリメラーゼの使用、またはたとえばブロッカー分子をヌクレアーゼ耐性にするチオアート架橋を5'末端に有する修飾ブロッカーオリゴヌクレオチドの使用を含む。用途によっては、ブロッカーのそうした5'修飾を必要としない場合もある。たとえばブロッカー結合部位とプライマー結合部位が重複し、そのために(たとえば過剰ブロッカーにより)プライマーの結合が妨げられる場合には、ブロッカーオリゴヌクレオチドの分解は大幅に妨げられよう。ポリメラーゼがプライマーを、ブロッカーの方に、さらにはブロッカーを通り抜けるように(5'-3'方向に)、伸長すること(通常、ハイブリダイズしたブロッカーオリゴヌクレオチドを分解させる結果となるプロセス)はないためである。

10

【0228】

本発明のための、また本明細書で開示するような、特に好ましいブロッカー/PCR実施態様はペプチド核酸(PNA)オリゴマーの、ブロッキングオリゴヌクレオチドとしての使用を含む。そうしたPNAブロッカーオリゴマーがふさわしいのは、ポリメラーゼによる分解も伸長も被らないためである。

【0229】

従って好ましくは、該ブロッキングオリゴヌクレオチドの塩基配列は配列番号60~295、1029~1076、1117~1120、1172~1175およびそれらの相補配列のうちの1つの処理核酸配列にハイブリダイズする鎖長9ヌクレオチド以上の配列を含む必要があるが、該オリゴヌクレオチドの塩基配列は少なくとも1つのCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含む。

20

【0230】

さらに好ましくは、該ブロッキングオリゴヌクレオチドの塩基配列は配列番号1043、1044、172、173、98、99、130、131、1172、1173、160、161、120、121、106、107、80、81、1051、1052、66、67、1117、118、1045、1046、1035、1036、94、95、1033、1034、1049、1050およびそれらの相補配列のうちの1つの処理核酸配列にハイブリダイズする鎖長9ヌクレオチド以上の配列を含む必要があるが、該オリゴヌクレオチドの塩基配列は少なくとも1つのCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含む。

30

【0231】

増幅によって得られた断片は直接的または間接的に検出可能な標識をもつことができる。好ましいのは蛍光標識、放射性核種、または質量分析計で検出する標準的な質量をもつ分離可能な分子断片といった形態の標識である。該標識が質量標識である場合には、標識増幅産物は質量分析計による検出能が高まるよう単一の正または負の正味電荷をもつのが好ましい。検出はたとえばMALDI(マトリックス支援レーザー脱離イオン化)質量分析またはエレクトロスプレー質量分析(ESI)により実行し視覚化することができる。

【0232】

MALDI-TOF(飛行時間型)質量分析はきわめて効率的な生体分子分析手段である(Karas & Hillenkamp, Anal Chem., 60:2299-301, 1988)。被分析物を光吸収性マトリックス中に埋め込む。該マトリックスを短いレーザーパルスで蒸発させ、被分析物分子を断片化することなく気化させる。被分析物はマトリックス分子との衝突によりイオン化される。該イオンを印加電圧で加速して電場のない飛行管へと導く。イオンは質量差に応じて異なる加速度で加速する。より小さいイオンは大きいイオンよりも速く検出器に到達する。MALDI-TOF質量分析はペプチドやタンパク質の分析に好適である。核酸の分析はそれよりもやや困難である(Gut & Beck, Current Innovations and Future Trends, 1:147-57, 1995)。核酸分析の感度はペプチドの場合の100分の1程度であり、また断片サイズの増大に伴い不釣合いに低下する。そのうえ、多重負荷電骨格をもつ核酸ではマトリックスを介したイオン化法はかなり低効率である。MALDI-TOF質量分析ではマトリックスの選定が著しく重要な意味をもつ。ペプチドの脱離に関しては、超微結晶を生み出すいくつかのきわめて効率的

40

50

なマトリックスが発見されている。今日DNA用の応答性マトリックスがいくつか存在しているが、ペプチドと核酸の間の感度の差は縮小していない。しかし、この感度差はDNAを化学修飾してペプチドとの類似性を高めることにより、小さくすることができる。たとえば骨格のリン酸基をチオリン酸基で置換してあるホスホロチオアート核酸は、単純なアルキル化反応を利用して電荷中性DNAへと変換することができる(Gut & Beck, *Nucleic Acids Res.* 23: 1367-73, 1995)。この修飾DNAに荷電タグをカップリングするとMALDI-TOF感度がペプチドの場合と同じレベルへと上昇する結果になる。荷電タグ付加のさらなる利点は被分析物の不純物に対する安定性の向上であるが、これは非修飾基質の検出を一段と困難にしている問題である。

【0233】

10

該方法の第4ステップでは、第3ステップで獲得した増幅産物を分析して、処理前のCpGジヌクレオチドのメチル化状態を確認する。

【0234】

増幅産物がMSP増幅で獲得される実施態様では、増幅産物の存否それ自体が、プライマーによってカバーされるCpG位置のメチル化状態を該プライマーの塩基配列に従って示す。

【0235】

標準PCRとメチル化特異的PCRの両方で獲得される増幅産物は、アレイ技術やプローブ系技術、それに配列決定や鑄型依存的伸長の技法などを非限定的に含むハイブリダイゼーションに基づく方法によりさらに分析してもよい。

20

【0236】

該方法の一実施態様では、ステップ3で合成した増幅産物を後でオリゴヌクレオチドおよび/またはPNAプローブのアレイまたはセットとハイブリダイズさせる。その場合、ハイブリダイゼーションは次の要領で起こる：ハイブリダイゼーションに使用するプローブセットは好ましくは少なくとも2つのオリゴヌクレオチドまたはPNA-オリゴマーからなる；ハイブリダイゼーション過程では増幅産物は、あらかじめ固相に結合させておいたオリゴヌクレオチドにハイブリダイズするプローブとして機能する；ハイブリダイズしなかった断片は除去する；該オリゴヌクレオチドは、本発明の配列表に記載の塩基配列の断片と逆相補的な、または同一の、鎖長9ヌクレオチド以上の塩基配列を少なくとも1つ含む；該断片は少なくとも1つのCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含む。

30

【0237】

好ましい実施態様では、該ジヌクレオチドは該オリゴマーの中間3分の1内に存在する。たとえば該オリゴマーが1つのCpGジヌクレオチドを含む場合、該ジヌクレオチドは好ましくは13マーの5'末端から5番目~9番目ヌクレオチドの範囲内に存在する。1つのオリゴヌクレオチドは、配列番号1~59、配列番号1017~1028、配列番号1116および配列番号1171の配列内の、また配列番号60~295、1029~1076、1117~1120、1172~1175内の等価位置の、各CpGジヌクレオチドの分析のために存在する。

【0238】

該オリゴヌクレオチドはペプチド核酸の形で存在してもよい。ハイブリダイズしていない増幅産物は除去し、次いでハイブリダイズした増幅産物を検出する。この場合、増幅産物に付着させる標識はオリゴヌクレオチド配列が位置する固相上の各位置で検出しうるのが好ましい。

40

【0239】

該方法のさらに別の実施態様では、CpG位置のゲノム・メチル化状態を、オリゴヌクレオチドプローブを用いて確認するが、該プローブはPCR増幅プライマー(該プライマーはメチル化状態特異的プライマーでも標準プライマーでもよい)と共に、亜硫酸水素塩処理DNAにハイブリダイズする。

【0240】

該方法の特に好ましい実施態様は二重標識蛍光オリゴヌクレオチドプローブによる蛍光リアルタイム定量PCR [TaqMan (登録商標) PCR法; ABI Prism 7700配列検出システム(Per

50

kin Elmer Applied Biosystems, Foster City, California)]の使用である(Heid et al., Genome Res. 6:986-994, 1996; および米国特許第6,331,393号明細書をも参照)。TaqMan (登録商標) PCR法はTaqMan (登録商標) プローブという非伸長性の問い合わせオリゴヌクレオチドの使用を含むが、該プローブは好ましい実施態様では順方向および逆方向プライマーの間に位置するCpGリッチ配列とハイブリダイズするように設計する。該プローブはさらに、TaqMan (登録商標) オリゴヌクレオチドのヌクレオチドに結合したリンカー部分(ホスホロアミダイトなど)に蛍光「レポーター部分」と「クエンチャー部分」とを共有結合させて含む。MethylLight (登録商標) アッセイともいう亜硫酸水素塩処理後の核酸内のメチル化の分析では、(本明細書で参照によりその全体が開示される)米国特許第6,331,393号明細書で開示されているように、該プローブはメチル化特異的でなければならない。開示の発明との併用にやはり好適であるTaqMan (登録商標) 検出法の変法は、二重プローブ法[Lightcycler (登録商標)]または蛍光増幅プライマー[Sunrise (登録商標)法]の使用を含む。これらの手法はどちらも亜硫酸水素塩処理DNAへの使用に、さらにはCpGジヌクレオチド内のメチル化分析に、適合させるようにしてもよい。

10

【0241】

亜硫酸水素塩処理核酸の分析によるメチル化評価へのプローブオリゴヌクレオチドの使用のためのさらなる好適な方法。該方法のさらなる好ましい実施態様では、該方法の第4ステップはGonzalogo & Jones, Nucleic Acids Res. 25:2529-2531, 1997で開示されているMS-SNuPEなどのように、鑄型依存的伸長法の使用を含む。

【0242】

20

該方法の別のさらなる実施態様では、該方法の第4ステップは該方法の第3ステップで生成した増幅産物の配列決定とそれに続く配列分析を含む(Sanger F., et al., Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467, 1977)。

【0243】

最善の態様

本発明の最も好ましい実施態様では、前述の方法の最初の3ステップに従って、すなわち

- a) 被検者より、被検ゲノムDNAを含む生体サンプルを獲得するステップ;
- b) 該ゲノムDNAを抽出する、または他の方法で分離するステップ;
- c) のゲノムDNAまたはその断片を1つまたは複数の試薬で処理して、5位が非メチル化状態にあるシトシン塩基をウラシルへと、またはハイブリダイゼーション特性の点でシトシンとは検出可能に異なる別の塩基へと変換するステップ;

30

に従ってゲノム核酸を単離し処理するが、その特徴は

d) c)における処理の後にメチル化特異的に、すなわちメチル化特異的プライマーまたはブロックオリゴヌクレオチドの使用により、増幅を行い、またさらに

e) 増幅産物の検出を、前述のようリアルタイム検出法により行う

ことにある。

【0244】

好ましくは、d)における後続の増幅は前述のようにメチル化特異的プライマーの使用によって行う場合に、該メチル化特異的プライマーは配列番号60~295、1029~1076、1117~1120、1172~1175およびそれらの相補配列のうちの1つの処理核酸配列にハイブリダイズする鎖長9ヌクレオチド以上の配列を含み、該オリゴマーの塩基配列は少なくとも1つのCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含む。

40

【0245】

さらに好ましくは、d)における後続の増幅は前述のようにメチル化特異的プライマーの使用によって行う場合に、該メチル化特異的プライマーは配列番号1043、1044、172、173、98、99、130、131、1172、1173、160、161、120、121、106、107、80、81、1051、1052、66、67、1117、118、1045、1046、1035、1036、94、95、1033、1034、1049、1050およびそれらの相補配列のうちの1つの処理核酸配列にハイブリダイズする鎖長9ヌクレオチド以上の配列を含み、また該オリゴマーの塩基配列は少なくとも1つのCpG、TpGまたはCpAジ

50

ヌクレオチドを含む。

【0246】

該方法の別の最も好ましい実施態様では、d)における後続の増幅は前述のようなブロッキングオリゴヌクレオチドの存在下に行う。該ブロッキングオリゴヌクレオチドは配列番号60～295、1029～1076、1117～1120、1172～1175およびそれらの相補配列のうちの1つの処理核酸配列にハイブリダイズする鎖長9ヌクレオチド以上の配列を含み、また該オリゴマーの塩基配列は少なくとも1つのCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含む。

【0247】

該方法のステップe)、すなわち配列番号1～59、配列番号1017～1028、配列番号1116および配列番号1171の1つまたは複数のCpG位置のメチル化状態を示す特異的増幅産物の検出は、前述のようなリアルタイム検出法によって行う。

10

【0248】

本発明の追加的実施態様は本発明のゲノムDNA(配列番号1～59、配列番号1017～1028、配列番号1116および配列番号1171およびその相補体)のメチル化状態の、前処理を必要としない分析方法を提供する。

【0249】

そうした追加的実施態様の第1ステップでは、ゲノムDNAサンプルをその由来組織または細胞から分離する。好ましくは、そうした由来源は細胞系、組織スライド、体液、またはパラフィン包埋組織を含む。第2ステップでは、該ゲノムDNAを抽出する。抽出は界面活性剤溶解物の使用、ソニフィケーションおよびガラスビーズ使用のボルテックス処理を非限

20

【0250】

好ましい実施態様では、DNAは処理前に切断してもよいが、これにはメチル化感受性の制限エンドヌクレアーゼなどを含む技術上標準の手段を用いてよい。

【0251】

第3ステップではDNAを1つまたは複数のメチル化感受性制限酵素で消化する。この消化は制限部位でのDNAの加水分解が特定CpGジヌクレオチドのメチル化状態を示すように行われる。

【0252】

第4ステップは随意的、だが好ましい実施態様であり、そこでは制限断片を増幅する。これはPCR法で行うのが好ましく、またその増幅産物は前述のような好適な検出可能標識すなわち蛍光標識、放射性核種および質量標識を含んでもよい。

30

【0253】

第5ステップでは増幅産物を検出する。検出にはゲル電気泳動分析、ハイブリダイゼーション分析、PCR産物内への検出可能タグの導入、DNAアレイ分析、MALDIまたはESI分析などを含む技術上標準の手段を用いてよい。

【0254】

ゲノム核酸のメチル化状態の判定に続き、配列番号1～59、配列番号1017～1028、配列番号1116および配列番号1171の少なくとも1つのCpGジヌクレオチド配列のメチル化状態、または配列番号1～59、配列番号1017～1028、配列番号1116および配列番号1171の複数のCpGジヌクレオチド配列の平均メチル化状態または平均メチル化状態を反映する値に基づいて前立腺細胞増殖性疾患の存否またはサブクラスを推定する。

40

【0255】

キット

さらに、本発明の追加的な態様はキットであり、該キットはたとえば次のものを含む：亜硫酸水素系試薬；各々が配列番号1～59、配列番号1017～1028、配列番号1116、配列番号1171、配列番号60～295、1029～1076、1117～1120、1172～1175の配列の鎖長16塩基断片と対応する、相補的である、またはストリンジェントなまたは高度にストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするような配列を有する、少なくとも2つのオリゴヌクレオ

50

チドを含むプライマーオリゴヌクレオチドセット；オリゴヌクレオチドおよび/またはPNAオリゴマー；それに開示の方法に関する実施と評価のための説明書。さらなる好ましい実施態様では、該キットはCpG位置特異的メチル化分析のための標準試薬をさらに含むが、該分析はMS-SNuPE、MSP、MethyLight（登録商標）、HeavyMethyl（登録商標）、COBRAおよび核酸配列決定法のうちの1つまたは複数を含むことを特徴とする。

【0256】

さらに好ましくは、該(キット)は亜硫酸水素系試薬；各々が配列番号1043、1044、172、173、98、99、130、131、1172、1173、160、161、120、121、106、107、80、81、1051、1052、66、67、1117、118、1045、1046、1035、1036、94、95、1033、1034、1049、1050の配列の鎖長16塩基断片と対応する、相補的である、またはストリンジェントなまたは高度にストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするような配列を有する、少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むプライマーオリゴヌクレオチドセット；オリゴヌクレオチドおよび/またはPNAオリゴマー；それに開示の方法に関する実施と評価のための説明書を含む。さらなる好ましい実施態様では、該キットはCpG位置特異的メチル化分析のための標準試薬をさらに含むが、該分析はMS-SNuPE、MSP、MethyLight（登録商標）、HeavyMethyl（登録商標）、COBRAおよび核酸配列決定法のうちの1つまたは複数を含むことを特徴とする。

10

【0257】

しかし、本発明に従うキットは前記の構成要素のうちの一部だけを含んでもよい。

【0258】

以上、本発明をある種の好ましい実施態様に従って具体的に開示してきたが、以下の実施例はもっぱら本発明の説明に資するものであり、本発明を最広義の解釈とその等価形態の原理と範囲の内部に限定するものではない。

20

【実施例】

【0259】

以下の実施例では、 μL は「マイクロリットル」すなわち 10^{-6} リットルを、また μM は「マイクロモル」を、それぞれ表す。

【0260】

AP-PCRおよびMCAという探索手法を使用してゲノムDNAプールを分離し分析した(実施例1)。これらの手法は、メチル化感受性酵素の使用によりCpG部位のメチル化と非メチル化を弁別する。一般にまず全ゲノムDNAを消化して管理性を高め、次いでメチル化感受性制限酵素でさらに消化する。非メチル化断片は該部位のために増幅を阻まれるため、メチル化断片が選択的に増幅される。これらの手法を用いて弁別されたメチル化差異のある断片の配列を決定し(実施例2)、EnsemblデータベースのBLAST検索を用いてヒトゲノムと比較する。サンプルセットは診断上解決すべき当初の課題、すなわち前立腺がん腫の発見と正常または良性状態からの弁別の改善に基づいて選定した。3×「全がん」前立腺がんサンプルプール(各プールのサンプル数 $n=10$ 、10、20)、2×BPH(良性前立腺肥大)サンプルプール($n=10$)、3×低グレード前立腺がんサンプルプール($n=10$)、3×高グレード前立腺がんサンプルプール($n=10$)、および1×末梢血リンパ球(PBL)プール($n=9$)を使用して以下の比較を行った：

30

40

【0261】

- ・ BPH対全がん(高&低Gleasonスコア(GS)；移行域(TZ)および末梢域(PZ)、2回比較)
- ・ BPH対低Gleasonスコア($GS < 6$ 、TZ & PZの数は記載のとおり、2回比較)
- ・ BPH対高Gleasonスコア($GS > 7$ 、TZ & PZの数は記載のとおり、2回比較)
- ・ 低Gleasonスコア対高Gleasonスコア(MCAによる；各プールをテスターおよびドライバースとして使用)
- ・ BPH対PBLs
- ・ 全がん対PBLs

BPH対PBLs比較はAP-PCRでは行わなかった。

がんサンプルを含むMCA比較では常に、がんはテスターであった。低対高Gleasonスコア

50

比較は、低Gleasonスコアをテスターとする比較と高Gleasonスコアをテスターとする比較を1回ずつ、計2回行ったが、各回の合計比較件数は10であった。PBLsによる実験ではPBLサンプルはドライバーであった。表1を参照。

【 0 2 6 2 】

【表 1】

表1: 比較研究 (AP-PCRおよびMCA) に使用したサンプルプール (凡例: n=サンプル数/プール; GS=Gleasonスコア; TZ=移行域; PZ=末梢域)

比較	異名	プールタイプ	プール #	n	サンプルの内訳			
					GS<6 TZ	GS<6 PZ	GS>7 TZ	GS>7 PZ
BPH対 全がん	BA1	BPH	1	10	10×BPH			
		全	1	10	2	3	2	3
BPH対 全がん	BA2	BPH	2	10	5×BPH、5×正常			
		全	2	10	3	2	3	2
BPH対 低	BL1	BPH	1	10	10×BPH			
		低	1	10	5	5	0	0
BPH対 低	BL2	BPH	2	10	5×BPH、5×正常			
		低	2	10	5	5	0	0
BPH対 高	BH1	BPH	1	10	10×BPH			
		高	1	10	0	0	5	5
BPH対 高	BH2	BPH	2	10	5×BPH、5×正常			
		高	2	10	0	0	5	5
低対高	HL	低	3	10	5	5	0	0
		高	3	10	0	0	5	5
BPH対 PBLs	BP	BPH	1	10	10×BPH			
		PBL	1	9	9×PBL			
がん対 PBL	CP	全	3	20	5	5	5	5

【 0 2 6 3 】

実施例1 MCAおよびAP-PCR

以下の研究の狙いは、全ゲノム内の、またはその代表的断片内の、少なくとも1つのメチル化差異CpGジヌクレオチド配列を弁別するのに好適な対照アッセイ法を用いて1つまたは複数のprimaryなメチル化差異CpGジヌクレオチド配列を弁別することであった。

【 0 2 6 4 】

すべての手順をプールサンプルおよび/または個別サンプルを対象に行い、分析は2つの探索手法すなわちメチル化CpG増幅(MA)法とarbitrarily-primed PCR(AR-PCR)法を用いて行った。

【 0 2 6 5 】

AP-PCR: AP-PCR法はゲノムDNAのサンプルクラスを対象に次の要領で行った:

1. DNAの分離: 市販Wizard(登録商標)キットを使用してサンプルクラスからゲノムDNAを分離した;

2. 制限酵素による消化: 3つの異なる制限酵素セットRsaI(認識部位: GTAC); RsaI(認識部位: GTAC)プラスHpaII(認識部位: CCGG; メチル化感受性); およびRsaI(認識部位: GTAC)プラスMspI(認識部位: CCGG; メチル化非感受性)により各DNAサンプルプールを37

10

20

30

40

50

で16時間消化した;

3. AP-PCR分析: 制限酵素で消化した各DNAサンプルを表2に記載のプライマーにより、40 °Cのアニーリング温度で、また表3に記載のプライマーセット中の³³P-dATPにより、増幅した;

4. ポリアクリルアミドゲル電気泳動: 各AP-PCRサンプル1.6 μlを5%ポリアクリルアミド配列決定ゲル上に添加し、電気泳動を130Wで4時間行った。ゲルをクロマトグラフィーパーペーパーに移し、サラップでカバーし、ゲルドライヤーで約1時間乾燥させた;

5. オートラジオグラフィー: 乾燥ゲルをマイナス80 °Cで20時間オートラジオグラフィ用フィルムに密着露出させ、次いで現像した。乾燥ゲルにGlogosII Autoradマーカー (Stratagene) を添加し、新しいフィルムで露出を繰り返した。最初のオートラジオグラフィ画像は控えとして残し、二番目の画像をバンドの切り出しに使用した; 次いで

6. メチル化差異に対応するバンドがゲル上で視覚的に確認された。そうしたバンドを切り出し、その中のDNAを分離し、クローニングした (Invitrogen TA Cloning Kitを使用)。

【 0 2 6 6 】

【 表 2 】

表2: 実施例1のAP-PCRに使用したプライマー

名称	配列番号	配列
GC1	928	GGGCCGCGGC
GC2	929	CCCCGCGGGG
GC3	930	CGCGGGGCGG
GC4	931	GCGCGCCGCG
GC5	932	GCGGGGCGGC
G1	933	GCGCGACGT
G2	934	CGGACGCGA
G3	935	CCGCGATCGC
G4	936	TGGCCGCCGA
G5	937	TGCGACGCCG
G6	938	ATCCGCCCGG
G7	939	GCGCATGCCG

【 0 2 6 7 】

【表3】

表2: 実施例1のAP-PCRに使用したプライマー

名称	配列番号	配列
G8	940	GCGACGTGCG
G9	941	GCCGCGNGNG
G10	942	GCCGCGNGNG
APBS1	943	AGCGGCCGCG
APBS5	944	CTCCACGCG
APBS7	945	GAGGTGCGCG
APBS10	946	AGGGACGCG
APBS11	947	GAGAGGCGCG
APBS12	948	GCCCCGCGA
APBS13	949	CGGGCGCGA
APBS17	950	GGGGACGCGA
APBS18	951	ACCCACCCG

10

【0268】

【表4】

20

表3:

組み合わせ	プライマー1	プライマー1	プライマー1
101	GC1	G2	APBS1
103	GC3	G4	APBS1
105	GC5	G6	APBS1
107	GC2	G8	APBS5
109	GC4	G10	APBS5
111	GC1	G8	APBS7
113	GC3	G6	APBS7
115	GC5	G4	APBS7
117	GC2	G2	APBS10
119	GC4	G2	APBS10
121	GC1	G4	APBS11
123	GC3	G5	APBS11
125	GC5	G7	APBS11
127	GC2	G9	APBS12
129	GC4	G9	APBS12
131	GC1	G7	APBS13
133	GC3	G5	APBS13
135	GC5	G3	APBS13
137	GC2	G1	APBS17
139	GC4	G3	APBS17

30

40

【0269】

【表5】

組み合わせ	プライマー1	プライマー1	プライマー1
141	GC1	G5	APBS18
143	GC3	G7	APBS18
145	GC5	G9	APBS18
147	G2	G3	APBS17
149	G4	G5	APBS17
151	G6	G7	APBS17
153	G8	G9	APBS13
155	G8	G10	APBS13
157	G6	G8	APBS12
159	G4	G6	APBS12
161	G2	G4	APBS12
163	G2	G10	APBS11
165	G2	G5	APBS11
167	G4	G7	APBS10
169	G6	G9	APBS10
171	G1	G8	APBS10
173	G6	G10	APBS7
175	G4	G8	APBS7
177	G2	G6	APBS5
179	G4	G10	APBS5
181	G2	G8	APBS5
183	APBS1	APBS10	APBS11

10

20

30

【0270】

【表6】

組み合わせ	プライマー1	プライマー1	プライマー1
185	APBS5	APBS7	APBS17
187	APBS1	APBS12	APBS18
189	APBS10	APBS13	APBS17
191	APBS5	APBS11	APBS12
193	APBS7	APBS10	APBS13
195	APBS1	APBS5	APBS11
197	APBS7	APBS17	APBS18
199	APBS1	APBS12	APBS13

40

【0271】

MCA: MCA法はあるゲノムDNA集団内の、第2集団との比較で見た高メチル化配列を、高メチル化領域を含まない配列を選択的に除外することにより、弁別するために使用した。これは、前述のように、ゲノムDNAを、非メチル化制限領域を平滑末端に切断するメチル

50

化感受性酵素で消化することにより、次いでメチル化非感受性であって付着末端を生じるイソ制限酵素で切断することにより、実現される。これには、アダプターライゲーション、アンプリコンの生成、およびテストター集団のドライバー集団とのサブトラクティブハイブリダイゼーションが続く。

【 0 2 7 2 】

最初の制限酵素消化反応溶液は次の成分を含んだ：

ドライバー：

DNA	510uL
緩衝液4	60uL
100 × BSA	6uL
Sma I (20 U/uL)	2uL

10

テストター：

DNA	68uL
緩衝液4	10uL
10 × BSA	10uL
Sma I (20 U/uL)	2uL

反応混合物は終夜、室温でインキュベートした。

【 0 2 7 3 】

次いでプールをXma I (2uL=100U)により、37 °Cで6時間、さらに消化した。Xma Iは各テストター消化物に2uL (20 U)加え、また各ドライバー消化物に8uL (80 U)加えた。

20

【 0 2 7 4 】

消化物は洗浄後、アダプター-プライマー-RXMA24 + RXMA12 (配列：RXMA24: AGCACTCTCC AGCCTCTCACCGAC(配列番号952); RXMA12: CCGGGTCGGTGA(配列番号953))にライゲートした。これらを70 °Cに加熱し、次いで室温(RT)へと徐冷することにより、ハイブリダイズしてアダプターを作製した。これには次の30uL反応溶液を使用した：

【 0 2 7 5 】

各DNA	33uL
T4緩衝液	6uL
RXMAアダプター-プライマー(100uM)	20uL
リガーゼ	1uL

30

【 0 2 7 6 】

この反応溶液を終夜、室温でインキュベートした。

出発アンプリコンを生成させるための最初の各PCRには、テストター、ドライバー両集団用のライゲーションミックス3uLを使用した。反応溶液の組成は次のとおりであった：

【 0 2 7 7 】

テストター：

100uM RXMA24	1uL
PCR緩衝液	10uL
25mM dNTPs	1.2uL
ddH ₂ O	68.8uL
Titanium Taq	1uL
100%DMSO	2uL
5Mベタイン	10uL

40

各97uLのテストターカクテルに3uLのライゲーション済みテストターDNAを加えた。

【 0 2 7 8 】

ドライバー：

ドライバーの増幅にはdTTPの代わりにdUTPを使用した：

100uM RXMA24	1uL
PCR緩衝液	10uL
25mM dNTPs	1.2uL(dATP, dCTP, dGTP, dUTP各25uM)

50

ddH₂O 68.8uL
 Titanium Taq 1uL
 100%DMSO 2uL
 5Mベタイン 10uL

各97uLのテスターカクテルに3uLのライゲーション済みテスターDNAを加えた。

【 0 2 7 9 】

PCR条件:

72 5分

30サイクル:

95 1分

72 3分

最終伸長:

72 10分。

次いで、テスターアンプリコンをXmaIで消化して突出末端を生じさせ、またドライバーアンプリコンをSmaIで消化して平滑末端断片を生じさせた。

【 0 2 8 0 】

ドライバー (SmaI):

DNA 500uL

緩衝液4 100uL

100 × BSA 10uL

H₂O 340uL

SmaI (20 U/uL) 50uL

合計容量: 1mL。終夜、室温でインキュベート。

【 0 2 8 1 】

テスター (XmaI):

DNA 20uL

緩衝液4 10uL

10 × BSA 10uL

H₂O 59uL

XmaI (50 U/uL) 1uL

合計容量: 100uL。終夜、37 °C でインキュベート。

【 0 2 8 2 】

このテスターには新しいアダプター-プライマー(前記RXMAプライマーの場合と同様にしてハイブリダイズした)セットJXMA24 + JXMA12 (配列: JXMA24: ACCGACGTCGACTATCCATGAA CC (配列番号954); JXMA12: CCGGGGTTTCATG (配列番号955))をライゲートしたが、このライゲーションはThermocyclerを使用して次の反応溶液により、16 °C で2時間行った:

【 0 2 8 3 】

DNA 16uL

T4緩衝液 3uL

JXMA-Pアダプター(100uM) 10uL

T4リガーゼ(400U/uL) 1uL

【 0 2 8 4 】

消化後のテスターアンプリコンとドライバーアンプリコンと一緒にハイブリダイズした。選択的PCR反応にはプライマー-JXMA24 (配列番号954)を使用した。反応溶液の組成は次のとおりであった:

【 0 2 8 5 】

JXMA24 0.5uL

taq緩衝液 5uL

dNTPs 0.6uL

ddH₂O 27.4uL

10

20

30

40

50

ベタイン 5uL
 DMSO 1uL
 Titanium Taq 0.5uL
 DNA 10uL

PCR条件:

72 8分(末端の陥没部分を埋め込む)

5サイクル:

95 1分

72 3分

最終伸長:

72 10分。

10

【 0 2 8 6 】

次に、20uLのMung Bean(緑豆)由来エンドヌクレアーゼ緩衝液+10uLのMung Bean由来エンドヌクレアーゼを加えて37 で30分間インキュベートした。この反応混合物を洗浄し、+25サイクルの、次の反応溶液中での、JXMA24プライマー使用のPCRのための鋳型として使用した:

【 0 2 8 7 】

JXMA24 1uL
 taq緩衝液 10uL
 dNTPs 1.2uL
 ddH2O 27uL
 ベタイン 10uL
 DMSO 2uL
 Titanium Taq 1uL
 DNA 48uL

20

【 0 2 8 8 】

PCR条件:

95 2分

30サイクル:

95 1分

72 3分

30

【 0 2 8 9 】

最終伸長:

72 10分

4 に保持。

生成したPCR産物(テスト)は、XmaIを使用して再び消化した:

DNA 45uL
 緩衝液4 15uL
 10 × BSA 15uL
 H2O 71uL
 XmaI 4uL

40

終夜、37 でインキュベート。

【 0 2 9 0 】

第3のアダプターセットNXMA24 (AGG CAA CTG TGC TAT CCG AGT GAC; 配列番号956) + NXMA12 (CCGGGTCACCTCG; 配列番号957)をライゲートした。このテスト(500ng)の、当初の消化済みドライバ(40ng)に対する2回目のハイブリダイゼーションを、4uL EE (30mM EP PS, 3mM EDTA) + 1uL 5M NaCl中、67 で20時間行った。選択的PCRはNXMA24プライマーを使用して次の要領で行った:

【 0 2 9 1 】

反応溶液:

50

JXMA24 0.5uL
 taq緩衝液 5uL
 dNTPs 0.6uL
 ddH2O 27.4uL
 ベタイン 5uL
 DMSO 1uL
 Titanium Taq 0.5uL
 DNA 10uL

【 0 2 9 2 】

PCR条件:

72 8分(末端の陥没部分を埋め込む)

8サイクル:

95 1分

72 3分

最終伸長:

72 10分。

反応溶液を4 に保持。

10

【 0 2 9 3 】

次に、20uLのMung Bean由来エンドヌクレアーゼ緩衝液+ 10uLのMung Bean由来エンドヌクレアーゼを加えて30 で30分間インキュベートした。この反応混合物を洗浄し、次の要領による+25サイクルの、NXMA24プライマー使用のPCRのための鋳型として使用した:

20

【 0 2 9 4 】

反応溶液:

NXMA24 1uL

taq緩衝液 10uL

dNTPs 1.2uL

ddH2O 27uL

ベタイン 10uL

DMSO 2uL

Titanium Taq 1uL

DNA 48uL

30

【 0 2 9 5 】

PCR条件:

95 2分

30サイクル:

95 1分

72 3分

最終伸長:

72 10分

4 に保持。

生成したPCR産物はXmaIで消化した:

40

【 0 2 9 6 】

反応溶液:

DNA 38uL

緩衝液4 5uL

10 × BSA 5uL

H2O 71uL

XmaI 4uL

終夜、37 でインキュベート。

【 0 2 9 7 】

50

次にDNA消化物を、予めXmaIで消化しホスファターゼで処理しておいたベクターpBC Sk中にライゲートした(675ng)。このライゲーション混合物5uLを使用して、ケミカリーコンピテントTOP(登録商標)細胞をメーカーの説明書に従って形質転換した。形質転換細胞をLB/XGal/IPTG/CAMプレート上にプレATINGした。インサートを含む特定コロニーを実施例2に従って配列決定した。

【0298】

実施例1では潜在的なアッセイマーカー候補となるきわめて多数のユニーク配列がもたらされる結果となった。これらの配列のうちの一部は反復配列の比率が高い(>50%)ため、除外した。この研究のための比較では合計480個のユニーク配列が特定された。これらの配列から、次の評価法を用いて、サブセットをさらに選別した:

10

【0299】

- 多数の方法による出現頻度
- 多数のプール中の出現頻度
- CpG島内に位置
- 遺伝子のプロモーター領域内に位置
- 予測または既知遺伝子の近傍または内部に位置
- 疾患に関連することが判明している
- 遺伝子のクラス(転写因子、増殖因子など)
- 反復配列(マイナス評価)

【0300】

この評価システムでは、MeST配列は前記の各評価基準につき1点の評価を得るが、反復配列比率が50%を超えるとマイナス8点の評価となる。最高は7点、最低はマイナス8点の評価となる。評点はプロプライエタリ・データベースを用いて自動的に生成される。当初セットの480個のMeST配列のうち277個は評点が0またはそれよりも高かった。上記の評価基準と手作業による再吟味に基づき、候補MeSTの数をさらに絞って126個のユニーク配列とした。

20

【0301】

次に、亜硫酸水素塩法による配列分析を目的に、この126配列のPCRプライマーの設計を開始した。そのうち35配列は、好適なプライマーの設計が不可能である、対照DNAからの増幅に失敗した、または配列のさらなる吟味またはEnsemblデータベースの更新により質の悪さまたは反復配列の存在が新たに判明したなどを含む種々の理由から、除外した。

30

【0302】

実施例2 亜硫酸水素塩法による配列分析

【0303】

亜硫酸水素塩配列分析法用に、可能な場合には各特定MeST配列をカバーするように、またはその上流側または下流側の1000bp隣接配列の一部をカバーするように、PCRプライマーを設計した。この研究段階では、実施例1で使用したサンプルを増幅産物の産生に利用した。各サンプルを亜硫酸水素ナトリウムで処理し、配列分析を行った。配列データはABI 3700配列分析技術を用いて獲得した。Epigenomics社独自のESME亜硫酸水素塩配列分析法用トレース解析プログラムを用いて、獲得した配列トレースデータを正規化しメチル化率を計算した。

40

【0304】

亜硫酸水素塩法による配列分析の結果

次の特質が認められた:

1. 亜硫酸水素塩法による配列分析は特定サンプルクラス間のCpG部位のメチル化差異を指示する(Fisherスコア法)。
2. 同時メチル化が観測される。
3. 1部位だけFisherスコアが>1なら、周囲にFisherスコア>0.5の追加部位が存在するか。

次いで、これらの基準による評価で有意の同時メチル化を示すとみなされたゲノム領域

50

をさらに調べた。

【0305】

図1~3は、Epigenomics社のプロプライエタリ・ソフトウェア(詳しくは国際公開第WO 2004/000643号明細書を参照)で分析した亜硫酸水素塩法による配列分析データから生成した順位付けマトリックスを示す。マトリックス全体が一関心領域に対応する配列データを表す。マトリックスの各行は該断片内の単一CpG部位を表し、また各列は個別DNAサンプルを表す。左側の棒はメチル化率の物差しであり、メチル化の度合いが列内の各位置の濃淡で示されるが、黒は100%メチル化を、薄い灰色は0%メチル化を、それぞれ表す。白の位置に該当するデータは得られなかった。

【0306】

図1は遺伝子「プロスタグランジンE2受容体、EP4サブタイプ」の断片に関する配列分析データである。この場合、亜硫酸水素塩法による配列分析は、サンプル間でメチル化パターンに、差異が、非決定的ではあれ、存在することを示した。アレイ法(実施例3)を使用して、もっと大きなサンプルセットを対象に、この遺伝子をさらに調べた。この遺伝子のマーカーとしての精度は他遺伝子と組み合わせて分析すれば、さらに高めることができると見られたからである。

【0307】

図2は遺伝子「オーファン核受容体」の断片(a-1Fetoprotein転写因子)の配列分析データである。この場合、亜硫酸水素塩法による配列分析は、サンプルタイプ間のメチル化または同時メチル化差異を示した。

【0308】

図3は遺伝子「1-アシル-SN-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ」の断片の配列データである。これは低品質の読み取り配列しか得られなかったROI(関心領域)サブセットを代表しており、該遺伝子はアレイ法によって初めて意味のある分析が可能になった(実施例3)。

【0309】

実施例3 アレイ分析

特定のメチル化差異ゲノム領域をハイスループット・アレイ分析法でさらに分析した。診断/クラス分類スクリーニングテストに適した最も有用な最終アッセイ法は体液たとえば血清、血漿または尿沈渣の分析を可能にする(侵襲的な方法が不要となる)。従って、サンプルセットは、高感度アッセイに適した一段と特異的なマーカーセットを提供する意味で、血液中に存在する可能性のある他のがん由来するDNAサンプルを包含した。

【0310】

マイクロアレイ分析用のサンプルセットの説明

マイクロアレイ分析用のサンプルセットを、マーカー候補の感度と特異度の両方に関する情報が得られるように、設計した。前立腺がん、BPHおよび正常前立腺に由来する多数のサンプル(表7)をスクリーニングした。前立腺がんサンプルはGleasonスコア別(高(8)、中(7)、低(6))および領域別(末梢域、移行域)にグループ分けした。BHPサンプルの分布はランダムであったが、ほとんどのBHPは移行域に由来するので、ほとんどのサンプルもまた移行域に由来すると想定することができる。前立腺に対する特異度を調べる検査には前立腺サンプルに加えて、多数の他タイプのがんも含めた。PBLサンプルは、これらのマーカーの血液検査への使用の可能性を調べるために含めた。正常肝および肝がんサンプルも含めたが、その理由はこれらのサンプルではGSTP1のメチル化が観測されたことにある。

【0311】

10

20

30

40

【表7】

表7 アレイ分析用サンプルの概要

サンプルタイプ	サンプルタイプ	サンプルタイプ	
前立腺がん <ul style="list-style-type: none"> 高悪性度 (GS≥8) 移行域 末梢域 低悪性度 (GS≤6) 移行域 末梢域 中悪性度 (GS=7) 移行域 末梢域 追加の前立腺がん ホルモン療法後 	内分泌関連がん <ul style="list-style-type: none"> 乳 男性 女性 卵巣 子宮 他のがん <ul style="list-style-type: none"> 肝 肺 食道 唾液腺 胃 膵 メラノーマ 結腸 	他の正常組織 <ul style="list-style-type: none"> 前立腺 移行域 末梢域 膀胱 腎 肝 精巣 精液 尿管 PBLs 	10
良性前立腺疾患 <ul style="list-style-type: none"> BPH 良性線維腫 前立腺炎 			20
尿生殖路がん <ul style="list-style-type: none"> 膀胱 精巣 腎 			

【0312】

DNA抽出

サンプルは凍結組織かまたは抽出ゲノムDNAか、いずれかの形で受領した。DNAサンプルはみなQiagen Genomic Tip-500カラムまたはMagnaPure装置を使用して抽出した。 30

【0313】

亜硫酸水素塩処理とmPCR

全サンプルの全ゲノムDNAを亜硫酸水素塩処理し、非メチル化シトシンをウラシルへと変換した。メチル化シトシンはそのままに留まった。亜硫酸水素塩処理はEpigenomics社独自の亜硫酸水素塩処理法を使用して行った。患者サンプルあたり2回の独立した亜硫酸水素塩処理反応を行った。亜硫酸水素塩化の後、各DNAサンプル10ngを、6~8プライマー対を含む後続のマルチプレックスPCR(mPCR)反応溶液に使用した。

【0314】

ハイブリダイゼーション

各反応溶液は次のものを含んだ:

各0.4mMのdNTPs

1単位のTaqポリメラーゼ

2.5 μlのPCR緩衝液

3.5mMのMgCl₂

80nMのプライマーセット(12~16プライマー)

11.25ngのDNA(亜硫酸水素塩処理済み)

プライマーの詳細は表1に示すとおりである。

【0315】

40サイクルを次の要領で行った: 変性95 °Cで15分間、アニーリング55 °Cで45秒間、プラ 50

イマー伸長65 で2分間。最終伸長は65 で10分間行った。

【0316】

ハイブリダイゼーション:

次に、各個別サンプルに由来するすべてのPCR産物を、各被検CpG位置に対応する一対の固定化オリゴヌクレオチドを有するガラススライドにハイブリダイズした。これらの検出用オリゴヌクレオチドは各々、元は非メチル化体(TG)またはメチル化体(CG)のいずれかであった1つのCpG部位の近くの亜硫酸水素塩変換配列にハイブリダイズするように設計した。使用した諸々の(有益、非有益ないまぜの)ハイブリダイゼーション用オリゴヌクレオチドのさらなる詳細については表2を参照。ハイブリダイゼーション条件は、TGおよびCG変異体の単一塩基差異の検出を可能にするように選定した。

10

【0317】

mPCR産物各5uLを10×SSARC緩衝液で希釈した。次いで反応混合物を検出用オリゴヌクレオチドと次の要領でハイブリダイズさせた。95 で変性、10 に冷却、42 で一晚ハイブリダイゼーション、次いで10×SSARCおよびdH₂Oにより42 で洗浄。

【0318】

ハイブリダイゼーション用オリゴヌクレオチドのさらなる詳細は表9に示す。

ハイブリダイズした各オリゴヌクレオチドからの蛍光シグナルは、GenePixスキャナー+ソフトウェアを用いて検出した。2シグナル(各CpG位置の分析に使用したCGオリゴヌクレオチドとTGオリゴヌクレオチドに由来)の比を、蛍光シグナル強度の比較を基に計算した。

20

【0319】

各患者につき2分量のDNAを亜硫酸水素塩処理し、また各亜硫酸水素塩処理DNAサンプルにつき2回のハイブリダイゼーションを行った。これは、各患者につき合計4チップを処理したことを意味する。ハイブリダイゼーションでは、サンプルを2処理ラウンドにグループ分けして、潜在的な処理バイアスを防ぐようにした。前述のように、該2ラウンドは各々、各DNAサンプルにつき重複度が2、各患者につき重複度が4となる。サンプルは性、診断、組織および亜硫酸水素塩処理バッチについてランダム化した112サンプルのバッチでハイブリダイズした。

【0320】

データ分析方法

チップデータの分析:

チップデータの分析には、メチル化アレイデータを分析し視覚化するための多様な統計用ツールおよび新規な機械学習方法を包含するEpigenomics社のプロプライエタリ・ソフトウェアEpiScape(登録商標)を使用した。以下、このデータ分析に使用した最も重要なデータ分析手法を要約する。

30

【0321】

生のハイブリダイゼーション強度/メチル化比より:

各CpG位置の対数メチル化比[$\log(\text{CG}/\text{TG})$]は次のステップを含む標準化された前処理パイプラインに従って決定される。この対数比は、ハイブリダイゼーション・ノイズの分散が可能なメチル化率の全範囲にわたってほぼ一定となるような特性をもつ。

40

【0322】

仮説検定

その主課題はサンプルのクラス予測に有意の寄与をなしうるようなマーカーの弁別である。本発明の「特に好ましい実施態様」では、有意の寄与が検出されるのは、該マーカーを含む予測モデルを、該マーカーを欠くモデルと比較してクラス分類性能は改善しないとする帰無仮説が $p < 0.05$ で棄却される場合である。この検定を全潜在マーカーセットに適用したため、p値は多重検定用に補正した。これは、単一マーカーのp値に被検潜在マーカー数を掛けるだけの保守的なBonferroni補正の適用によって行った。また、それほど保守的ではないFDR(false discovery rate)法の適用によっても結果を出した。

【0323】

50

この実施例では終始、マーカー(場合によっては単に遺伝子またはアンプリコンともいう)はゲノム関心領域(ROI)ともいう。マーカーは該ゲノム領域内にいくつかのCpG位置を含む。マーカーには予測力がないという帰無仮説を検定するために、ロジスティック回帰モデルの尤度比検定を用いた。単一マーカーに関するロジスティック回帰モデルは反復ROI内の全CpG位置に由来するメチル化測定値の線形結合である。あてはめロジスティック回帰モデルを、メチル化とは無関係でありかつ帰無仮説を表す不変確率モデルと比較する。マーカーのp値は尤度比検定で計算した。

【0324】

マーカーに関する有意のp値は、このROIのメチル化が2クラスによって与えられるような関心問題に対して何らかの系統的な相関性をもつことを意味する。一般に、有意のp値は優れたクラス分類性能を必ずしも示唆しない。しかし、ロジスティック回帰では線形予測子を検定統計量の基礎として使用するため、小さなp値は優れた臨床性能を示唆する。

【0325】

教師付き学習によるクラスの予測

異なる組織クラスを特定マーカーのCpGアンサンブルがどこまでうまく弁別しうるかについて確かな推定を下すためには、その予測精度をクラス分類によって決定することができる。その目的のために、メチル化プロファイルに基づく予測関数を、固有のクラス標識を付けたある種の組織サンプルセットを使用して計算した。このステップはトレーニングといい、データ標識によって表される事前知識を利用する。次いで独立サンプルセットを対象に、該関数の予測精度を検定した。好ましい方法として、予測関数の学習にはサポートベクターマシン(SVM)アルゴリズムを使用した。この分析では感度と特異度のウェイトを等しくした。これを実現するには、偽陽性および偽陰性のクラス分類に付随するリスクをそれぞれのクラスサイズと反比例するように設定することができる。生成する分類子の感度と特異度はほぼ等しくなると予測しうる。このウェイト付けは臨床条件に応じて調節することができる。

【0326】

組織クラス予測性能の推定：相互検証法

小さなサンプルサイズの場合、相互検証法は弁別関数の予測精度に関する有効確実な推定値をもたらす。従って、マーカーの有意性に加えて相互検証の精度、感度および特異度の推定値ももたらされる。各クラス分類課題では、サンプルをほぼ等しいサイズの5群に分けた。次いでこれら5群のうち4群を利用して学習アルゴリズムをトレーニングした。この方法で得られた予測子を次に、残りの独立試験サンプル群を利用して検定した。該独立試験サンプル群の諸々の可能な選択肢について事前知識を一切使わず該学習アルゴリズムを10回実行し、そのときの正しい陽性および陰性クラス分類の件数を数えた。該サンプルセットの10ランダム順列を対象にこの手順を繰り返すことにより、サンプルを1つのトレーニングサンプルセットと1つの独立検定セットへと単純に分割する場合よりも優れた予測性能の推定が得られるようにした。

【0327】

データ分析の結果

アレイデータ分析の最初のステップは、諸々の前立腺由来組織の比較研究で弁別力のあるマーカーに目を向けることであった。まず、正常およびBPH前立腺組織を前立腺がん組織と比較したが、この研究に使用したマーカーには望ましい基準を満たすp値を示すものも多かった(図4)。次に、前立腺がん組織を、この研究に使用した他の諸々の組織クラスと比較した(図7)。このサンプルセットではほぼすべてのマーカーが既定の統計基準を満たした。GSTP1遺伝子は前立腺がんでは高メチル化していることが知られているが、他タイプのがんでもまた高メチル化を示す。そこで、最終的に前立腺がん對他タイプのがん比較でメチル化レベルを詳しく調べることにした。

【0328】

前立腺正常およびBPH vs前立腺がん

この比較では、陰性クラスは正常前立腺およびBPHに由来する91のサンプルからなった

。陽性クラスは99の前立腺がんサンプルからなった。ほとんどのマーカーはp値<0.05の基準を満たした(図4)。この分析のp値、精度、感度および特異度を表4に示す。図5に示すのは、そのうちの最優良12マーカーである。

【0329】

前立腺正常および他組織vs前立腺がん

次に、完全なサンプルセットを対象に比較を行った。陰性群は、表7に記載の他臓器由来の正常組織および前立腺以外のがんを包含するよう拡大した。この陰性クラスは正常前立腺、BPH、および他の正常およびがん組織に由来する254のサンプルからなった。陽性クラスは99の前立腺がんサンプルからなった。ほとんどのマーカーはやはりp値 0.05の有意水準を満たす(表5)。最高性能マーカーの精度は約86%である(図6および/または表5を参照)。この分析のp値、精度、感度および特異度を表5に示す。図7に示すのは、そのうちの最優良12マーカーである。

10

【0330】

他のがんvs前立腺がん

GSTP1(最先端をいくメチル化前立腺がんマーカー)の高メチル化は前立腺特異的ではないので、前立腺がんと他のがんのメチル化状態をもっと詳しく調べてみた。図16は、GSTP1(配列番号57)が肝がんでも高度に高メチル化し、また乳がんでもある程度高メチル化していることを示す。それにもかかわらず、他のいくつかの最優良マーカーは前立腺がんと肝がんを十分に弁別する。この分析のp値、精度、感度および特異度を表6に示す。図8に示すのは、そのうちの最優良12マーカーである。

20

【0331】

表4~6は次のような組織比較に際しての全マーカーの性能特性をまとめたものである：正常前立腺およびBPH vs. 前立腺がん(表4)；正常前立腺、BPH および他組織vs. 前立腺がん(表5)；および他のがん組織vs. 前立腺がん(表6)。

【0332】

表4および5の分析は、分析群にBHPおよび正常前立腺サンプルを含んでいた。正常前立腺およびBPH vs. 前立腺がんの分析は前立腺特異的環境でのマーカーの性能を測定するのが狙いであった。がん、正常の両方を含む他組織を絡めた分析(正常前立腺、BPH および他組織vs. 前立腺がん)は、遠隔サンプル中のマーカーの総合的な性能を向上または変化させる可能性のあるバックグラウンドと併せてマーカー性能を考察したものである。

30

【0333】

GSTP1は複数タイプのがんでメチル化される傾向があるため、がんのタイプ(表6)の比較も行った。こうした特異度の欠如は体液ベースのアッセイではマーカーの性能にマイナスの影響を及ぼしかねない。GSTP1(配列番号57)は前立腺がんでも高メチル化しているが、予想どおり肝がんでも高メチル化している。肝がんではIGF2(配列番号58)も同様にメチル化している。図8に示すマーカーの大多数は、前立腺がんを除くほとんどのタイプのがんで非メチル化状態にある。図4~8からは、有益かつ正確なマーカーとしての可能性を秘めた多数の候補が存在することが分かる。高感度と高特異度を確保するには複数のマーカーを組み合わせるのがよいであろう。

【0334】

40

【表 8】

表4: 正常前立腺、BPH および他組織vs. 前立腺がん

ゲノム	配列番号				p値	精度	感度	特異度
	処理メチル化セン ス鎖	処理メチル化アン チセンス 鎖	処理非メチル化セン ス鎖	処理非メチル化アンチセン ス鎖				
57	172	173	290	291	1.30E-027	0.86	0.67	0.93
23	104	105	222	223	2.00E-029	0.81	0.75	0.83
36	130	131	248	249	3.80E-018	0.75	0.75	0.76
56	170	171	288	289	1.10E-012	0.74	0.62	0.79
11	80	81	198	199	5.10E-019	0.74	0.76	0.74
20	98	99	216	217	4.90E-016	0.73	0.77	0.71
22	102	103	220	221	1.10E-009	0.7	0.61	0.74
31	120	121	238	239	6.90E-018	0.7	0.79	0.66
30	118	119	236	237	1.60E-012	0.69	0.81	0.64
58	174	175	292	293	1.20E-011	0.68	0.71	0.67
34	126	127	244	245	5.50E-009	0.68	0.65	0.69
41	140	141	258	259	1.50E-008	0.67	0.7	0.66
59	176	177	294	295	4.90E-007	0.67	0.59	0.7
51	160	161	278	279	1.50E-012	0.67	0.76	0.63
24	106	107	224	225	1.30E-006	0.67	0.67	0.67
18	94	95	212	213	1.10E-014	0.67	0.84	0.6
54	166	167	284	285	3.80E-007	0.66	0.7	0.65
27	112	113	230	231	6.60E-007	0.66	0.7	0.64
7	72	73	190	191	8.30E-005	0.65	0.62	0.67
35	128	129	246	247	1.00E-004	0.65	0.53	0.69
16	90	91	208	209	7.50E-011	0.64	0.77	0.6
38	134	135	252	253	1.20E-004	0.64	0.63	0.64
14	86	87	204	205	5.20E-008	0.63	0.72	0.6
25	108	109	226	227	3.50E-011	0.62	0.79	0.56
1	60	61	178	179	8.20E-005	0.62	0.67	0.6
28	114	115	232	233	1.40E-003	0.62	0.67	0.59
43	144	145	262	263	3.70E-002	0.61	0.56	0.63
4	66	67	184	185	4.40E-004	0.61	0.64	0.59
26	110	111	228	229	5.60E-003	0.6	0.64	0.59
12	82	83	200	201	3.00E-004	0.58	0.75	0.52
21	100	101	218	219	1.80E-002	0.57	0.64	0.54
33	124	125	242	243	1.10E-002	0.56	0.66	0.53

10

20

30

40

【 0 3 3 5 】

【表9】

表5: 正常前立腺およびBPH vs. 前立腺がん

ゲノム	配列番号				p値	精度	感度	特異度
	処理メチル化セン ス鎖	処理メチル化アン チセンス 鎖	処理非メチル化セン ス鎖	処理非メチル化アンチセン ス鎖				
57	172	173	290	291	4.60E-023	0.85	0.77	0.93
36	130	131	248	249	8.10E-019	0.81	0.75	0.86
23	104	105	222	223	6.10E-019	0.8	0.75	0.85
34	126	127	244	245	3.10E-015	0.78	0.71	0.86
20	98	99	216	217	1.60E-016	0.78	0.75	0.8
31	120	121	238	239	5.20E-015	0.76	0.71	0.81
59	176	177	294	295	1.90E-014	0.76	0.68	0.84
56	170	171	288	289	2.00E-013	0.76	0.65	0.53
30	118	119	236	237	5.90E-011	0.75	0.76	0.75
48	154	155	272	273	2.70E-11	0.74	0.71	0.78
54	166	167	284	285	1.20E-009	0.74	0.72	0.76
11	80	81	198	199	1.00E-010	0.74	0.69	0.8
24	106	107	224	225	1.10E-011	0.72	0.67	0.78
14	86	87	204	205	3.50E-009	0.71	0.63	0.8
18	94	95	212	213	3.10E-010	0.71	0.76	0.66
28	114	115	232	233	7.80E-008	0.71	0.69	0.72
8	74	75	192	193	4.10E-008	0.7	0.72	0.68
7	72	73	190	191	3.00E-004	0.7	0.62	0.78
4	66	67	184	185	6.30E-009	0.69	0.66	0.72
35	128	129	246	247	1.40E-008	0.69	0.59	0.8
27	112	113	230	231	1.40E-006	0.69	0.68	0.7
58	174	175	292	293	8.90E-006	0.68	0.65	0.71
26	110	111	228	229	1.20E-008	0.68	0.69	0.66
22	102	103	220	221	3.40E-008	0.67	0.57	0.78
41	140	141	258	259	7.90E-005	0.66	0.67	0.66
37	132	133	250	251	1.70E-006	0.66	0.6	0.73
1	60	61	178	179	7.40E-005	0.66	0.72	0.6
49	156	157	274	275	1.80E-005	0.66	0.62	0.71
16	90	91	208	209	1.30E-003	0.65	0.67	0.62
2	62	63	180	181	1.50E-002	0.64	0.66	0.63
44	146	147	264	265	7.50E-004	0.64	0.67	0.6
32	122	123	240	241	2.50E-003	0.64	0.59	0.69

10

20

30

40

【0336】

【表 1 0】

13	84	85	202	203	5.10E-002	0.63	0.61	0.66
47	152	153	270	271	2.00E-002	0.63	0.64	0.61
42	142	143	260	261	3.30E-003	0.62	0.67	0.57
55	168	169	286	287	7.10E-003	0.62	0.67	0.57
29	116	117	234	235	5.10E-002	0.62	0.64	0.59
3	64	65	182	183	1.30E-001	0.61	0.59	0.64
50	158	159	276	277	1.00E+000	0.6	0.64	0.56
51	160	161	278	279	2.90E-002	0.6	0.65	0.56
43	144	145	262	263	9.60E-002	0.6	0.6	0.61
21	100	101	218	219	6.20E-001	0.59	0.66	0.52
46	150	151	268	269	3.00E-001	0.59	0.59	0.59
10	78	79	196	197	5.50E-001	0.59	0.52	0.66
38	134	135	252	253	5.10E-001	0.58	0.55	0.62
25	108	109	226	227	1.20E-002	0.57	0.52	0.63
15	88	89	206	207	1.00E+000	0.56	0.48	0.65
6	70	71	188	189	1.00E+000	0.56	0.63	0.48
33	124	125	242	243	1.00E+000	0.55	0.43	0.68
5	68	69	186	187	1.00E+000	0.55	0.6	0.5
9	76	77	194	195	1.00E+000	0.55	0.53	0.56
52	162	163	280	281	1.00E+000	0.54	0.48	0.6
40	138	139	256	257	1.00E+000	0.53	0.48	0.58
45	148	149	266	267	1.00E+000	0.52	0.38	0.68
17	92	93	210	211	1.00E+000	0.52	0.58	0.46
12	82	83	200	201	1.00E+000	0.47	0.36	0.58
39	136	137	254	255	1.00E+000	0.45	0.46	0.45
19	96	97	214	215	1.00E+000	0.4	0.46	0.32

10

20

30

【 0 3 3 7 】

【表 1 1】

表6: 他のがんvs. 前立腺がん

ゲノム	配列番号				p値	精度	感度	特異度
	処理メチル化セン ス鎖	処理メチル化アン チセンス 鎖	処理非メチル化セン ス鎖	処理非メチル化アンチセン ス鎖				
57	172	173	290	291	9.7e-14	0.80	0.70	0.89
23	104	105	222	223	2.4e-19	0.78	0.75	0.81
25	108	109	226	227	6.9e-16	0.75	0.85	0.65
11	80	81	198	199	2.0e-13	0.75	0.76	0.73
51	160	161	278	279	2.0e-12	0.74	0.79	0.69
31	120	121	238	239	1.5e-13	0.74	0.92	0.58
16	90	91	208	209	1.1e-14	0.73	0.82	0.66
30	118	119	236	237	2.4e-08	0.73	0.82	0.64
10	78	79	196	197	5.5e-11	0.72	0.83	0.63
41	140	141	258	259	9.4e-07	0.70	0.73	0.66
18	94	95	212	213	5.0e-09	0.69	0.83	0.57
14	86	87	204	205	2.8e-09	0.69	0.86	0.55
20	98	99	216	217	9.2e-07	0.68	0.78	0.60
12	82	83	200	201	9.7e-07	0.68	0.76	0.61
36	130	131	248	249	6.1e-08	0.67	0.74	0.62
38	134	135	252	253	3.8e-05	0.67	0.66	0.69
22	102	103	220	221	4.1e-05	0.67	0.62	0.71
58	174	175	292	293	1.6e-08	0.66	0.73	0.61
46	150	151	268	269	6.6e-08	0.66	0.87	0.48
56	170	171	288	289	4.6e-05	0.66	0.60	0.72
27	112	113	230	231	1.4e-02	0.65	0.69	0.62
21	100	101	218	219	5.6e-05	0.64	0.70	0.59
15	88	89	206	207	4.5e-05	0.63	0.85	0.43
5	68	69	186	187	4.4e-06	0.63	0.73	0.54
42	142	143	260	261	2.8e-04	0.62	0.77	0.49
34	126	127	244	245	6.8e-03	0.62	0.70	0.55
7	72	73	190	191	3.0e-03	0.62	0.56	0.66
33	124	125	242	243	7.6e-02	0.61	0.72	0.52
28	114	115	232	233	7.2e-01	0.60	0.73	0.49
6	70	71	188	189	2.8e-01	0.60	0.65	0.55
1	60	61	178	179	9.5e-02	0.59	0.60	0.58
59	176	177	294	295	5.1e-02	0.59	0.62	0.56

10

20

30

40

【 0 3 3 8 】

【表 1 2】

43	144	145	262	263	4.2e-01	0.59	0.58	0.60
24	106	107	224	225	1.3e-01	0.59	0.76	0.43
37	132	133	250	251	1.1e-01	0.59	0.69	0.49
48	154	155	272	273	5.8e-01	0.59	0.72	0.47
4	66	67	184	185	4.2e-02	0.58	0.71	0.48
45	148	149	266	267	1.0e+00	0.58	0.79	0.40
39	136	137	254	255	3.1e-02	0.58	0.55	0.61
55	168	169	286	287	1.0e+00	0.58	0.69	0.48
26	110	111	228	229	7.3e-02	0.58	0.67	0.49
2	62	63	180	181	1.0e+00	0.57	0.63	0.52
54	166	167	284	285	8.2e-01	0.57	0.68	0.47
49	156	157	274	275	5.9e-02	0.56	0.82	0.34
8	74	75	192	193	1.0e+00	0.56	0.61	0.51
13	84	85	202	203	1.0e+00	0.56	0.59	0.53
32	122	123	240	241	1.0e+00	0.55	0.63	0.49
29	116	117	234	235	1.0e+00	0.55	0.55	0.55
19	96	97	214	215	1.0e+00	0.55	0.54	0.55
47	152	153	270	271	1.0e+00	0.54	0.84	0.29
9	76	77	194	195	9.7e-02	0.54	0.55	0.53
50	158	159	276	277	1.0e+00	0.54	0.62	0.47
52	162	163	280	281	1.0e+00	0.54	0.51	0.56
17	92	93	210	211	1.0e+00	0.54	0.49	0.57
44	146	147	264	265	1.0e+00	0.53	0.60	0.47
35	128	129	246	247	1.0e+00	0.52	0.45	0.59
3	64	65	182	183	1.0e+00	0.52	0.59	0.45
40	138	139	256	257	1.0e+00	0.51	0.56	0.47

10

20

30

【0339】

表7は実施例3の冒頭に収めた。

【0340】

【表 1 3】

表8

名前/配列番号	プライマー	増幅産物の長さ
(配列番号1)	TGGTATAGGAGGAGAAGAGTTG (配列番号296) TCAATCCCTAAAACCCAAA (配列番号297)	327
(配列番号2)	ACCCAAACTAACAATCAAAAAT (配列番号299) GGAAGGAAGGATGAGAGTAT (配列番号298)	326
(配列番号3)	GGAAGGTTTAAGGTGAGAGAA (配列番号300) CAAATAACCAATCCCCTAAA (配列番号301)	339
LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9 (配列番号4)	CCCAATATAAATCTACCAACC (配列番号303) TTATTTGAATTTGGAGGTATG (配列番号302)	372
(配列番号5)	TTAATGAAGTAGGTTTGTATTGT (配列番号304) CCTCCAAAATCTTAACCAAAT (配列番号305)	421
(配列番号6)	CCCAACTAACTCAAATCCAC (配列番号307) TTTATTTTAGGAGGAAGGATT (配列番号306)	434
(配列番号7)	GTGGTTTTGGGAATTAGTAT (配列番号308) CTCCTACATATCCCATCTCATC (配列番号309)	483

10

20

30

【 0 3 4 1 】

【表14】

名前/配列番号	プライマー	増幅産物の長さ
ユビキチン様タンパク質SMT3C前駆体 (ユビキチンホモロジドメインタンパク質PIC1) (ユビキチン様タンパク質UBL1) (ユビキチン関連タンパク質SUMO-1) (GAP修飾タンパク質1) (GMP1) (セントリン) (配列番号8)	AATTAAGGTTTAGGGTTTTGTTT (配列番号310) ACCTCCCTACAAATCTACCTAC (配列番号311)	365
Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンダブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	ATAGTTTTGTGGTTTAAGAGG (配列番号312) ACCCTAACCTTATACAATACCAAC (配列番号313)	414
Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンダブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	GGTGGGGTTATTAAGGAGTTTA (配列番号314) CTCAACTACCATACCCAAAAA (配列番号315)	480
(配列番号10)	TTGTGTTGGTTGTAAGGA (配列番号316) CAAACACTATACACCTCTCAACA (配列番号317)	428
(配列番号11)	TTGAGGTTATTGGTTTATAGTTTT (配列番号318) CCCTAACCCCTTCTA (配列番号319)	457
(配列番号12)	ACTCCATACACTTTTACCAACC (配列番号321) TGTGTGAAATGTTTAGTTAATTG (配列番号320)	455
HOOK2タンパク質 (配列番号13)	TGTGTTAGGAATGATTGGGTA (配列番号322) AATTTCAAACCAAATCACC (配列番号323)	461

10

20

30

【0342】

【表15】

名前/配列番号	プライマー	増幅産物の長さ
(配列番号14)	AATTACCAACCAATTCCTCTTA (配列番号325) GGTTGGGATTTTAGTGTGTG (配列番号324)	366
(配列番号14)	TTATTTGAGGGATTTATTGGAG (配列番号326) CCTTATTAACCTTACCACCCTAT (配列番号327)	382
(配列番号15)	GTGGGTTAGTGGGAGTTAT (配列番号328) TAAAAACCCTTCCTACCTCTTA (配列番号329)	440
(配列番号16)	AGATGGGTATGATTTTGGGTT (配列番号330) ACTAACTCAACCACCTCACTAA (配列番号331)	181
(配列番号17)	TTTTGGTTAGTTTATGGGGTA (配列番号332) CACTACTTCAAATCCATCTACA (配列番号333)	484
リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質(レチノイン酸誘導性E3タンパク質)(HA1520) LAM5 (配列番号18)	TAAC TTCACAAATTACCCAACA (配列番号335) AAGAGTGAGGAGTAAGGGAGTT (配列番号334)	455
type 1イノシトール-1, 4, 5-三リン酸5-ホスファターゼ(EC 3. 1. 3. 56) (5PTASE) (配列番号19)	TTTTGGGGTTAGTATGTGAGTT (配列番号336) ATCCAACAACCTTCTCCTC (配列番号337)	482
プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体)(PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	GAAGAGGAATGGGAAAATTAG (配列番号338) TCACCAACAAAATACCCAA (配列番号339)	500

10

20

30

【0343】

【表 16】

名前/配列番号	プライマー	増幅産物の長さ
プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ (プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体 EP4サブタイプ) (配列番号20)	AACCATCAACCATACCTATTTTC (配列番号341) TGAGTAAGATGATTATTTGGATTT (配列番号340)	467
(配列番号21)	CACTTCCACCTCCTTATATC (配列番号343) ATTGGGTTTGAAGAGTTGTAG (配列番号342)	398
(配列番号22)	ATGATGGGAATATGTAAGAATGA (配列番号344) CTTCTCACTACTAATCTCCTACCC (配列番号345)	290
拡散型ヌクレオシドトランスポーター1 (拡散型 ニトロベンジルメルカプトプリンリボシド感受性 ヌクレオシドトランスポーター) (拡散型NBMPR感受性 ヌクレオシドトランスポーター) (ヌクレオシドトラン スポーター、ES型) (配列番号23)	GAGTTGGAGGGTTTTGTTTTA (配列番号346) CAAACCTCCATAAAATTCATCT (配列番号347)	410
オーファン核受容体NR5A2 (α -1-フェトブ ロテイン転写因子) (肝細胞転写因子) (B1 結合因子) (HB1F) (CYP7Aプロモーター結合 因子) (配列番号24)	CCACTCACTCAACCCATAA (配列番号349) GTGTGAGGTTTGGGTATTTTT (配列番号348)	398
タンパク質-チロシンホスファターゼX前 駆体 (EC 3. 1. 3. 48) (脾島自己抗原関連タ ンパク質) (ICAAR) (IAR) (ホグリソ) (配列番号25)	GATGGTGGGTAGTGTGTTTAT (配列番号350) AAAACCTATCTACACCTTCTCTT (配列番号351)	378

10

20

30

【 0 3 4 4 】

【表17】

名前/配列番号	プライマー	増幅産物の長さ
(配列番号26)	ATCCCACCAAACCTCTAC (配列番号353) AATTAGAGAAGGTTAAATGGGT (配列番号352)	300
(配列番号27)	AATAACTCCAACCTTCCTCCC (配列番号355) GGGATTTGGGAATTTATTGT (配列番号354)	237
(配列番号27)	GGTGGATGAGTAGTTTGAAGTTT (配列番号356) AAAAACCCCTTCCCTCT (配列番号357)	427
(配列番号28)	GTTGGGTTTAGTAATTGAAAA (配列番号358) ACCAACACAACTAACACTTACAT (配列番号359)	404
ペルオキシソーム膜タンパク質PEX14 (ペルオキシシン14) (ペルオキシソーム膜アンカータンパク質PEX14) (PTS1受容体ドッキングタンパク質) (配列番号29)	AAGAGGTTTTATGGTGTGAG (配列番号360) CACTCCCTTCCAACTATAC (配列番号361)	473
ホメオボックスタンパク質HOX-B6 (HOX-2B) (HOX-2.2) (配列番号30)	CTCCTCAATTCTACCAAAA (配列番号363) GTGAAAAAGGAGAGTAAATTG (配列番号362)	356
LIMドメインキナーゼ1 (EC 2.7.1.37) (LIMK-1) (配列番号31)	AAACCCTACTTCTACAACAA (配列番号365) GGAAAGGATAGGATGTTGGAT (配列番号364)	420

10

20

30

【0345】

【表18】

名前/配列番号	プライマー	増幅産物の長さ
低親和性免疫グロブリン γ Fc受容体II-A 前駆体 (Fc- γ RII-A) (FCRII-A) (IGG Fc受 容体II-A) (Fc- γ RIIA) (CD32) (CDW32) (配列番号32)	CAATCCCCTTAAACAAACC (配列番号367) GGAAAGGATAGGATGTTGGAT (配列番号366)	500
1-アシル-SN-グリセロール-3-ホスファタ ーゼアシルトランスフェラーゼ γ (EC 2.3 .1.51) (1-AGPアシルトランスフェラーゼ 3) (1-AGPAT 3) (リソホスファチジン酸ア シルトランスフェラーゼ γ) (LPAAT- γ) (1- アシルグリセロール-3-リン酸O-アシル トランスフェラーゼ3) (配列番号33)	CACAATTTCCACAAAACA (配列番号369) TTAGGGAGATGAGATTAAGGA (配列番号368)	379
ホメオボックスタンパク質GSH-2 (配列番号34)	TATATGGGGTGGGAGATTTTT (配列番号370) CCTTCCCCTCCTTCTTATACT (配列番号371)	276
(配列番号35)	AAAATTCITTCCTCCTAAACA (配列番号373) TTAGGGTTATTAGGTAAATGA (配列番号372)	478
ヒストンH4 (配列番号36)	TTAGTTGAGAAAGTGGGGT (配列番号374) CTACCTCAAACCAAATCCTC (配列番号375)	421

10

20

30

【0346】

【表19】

名前/配列番号	プライマー	増幅産物の長さ
電位依存性カリウムチャンネル・サブファミリー-KQTメンバー2 (神経芽細胞腫特異的カリウムチャンネルKQT様2) (配列番号37)	TTTTGGAGTTATAGGGTTTTGT (配列番号376) CTTCAACATCTCCAATCC (配列番号377)	441
アダプター関連タンパク質複合体1 σ -1Bサブユニット (σ -アダプチン1B) (アダプタータンパク質複合体AP-1 σ -1Bサブユニット) (ゴルジアダプター-HA1/AP1アダプチン σ -1Bサブユニット) (クラスリン集合タンパク質複合体1 σ -1B小鎖) (AP-1クラスリンの σ -1Bサブユニット) (DC22) (配列番号38)	AAACCTAAAAATCCAACACAAA (配列番号379) GGGTTATGTTAAGGGAGAAAG (配列番号378)	215
(配列番号39)	AATAACCTAATCTCCAACCC (配列番号381) ATTTGTGGTAGTTAATAGGTATGTTA (配列番号380)	465
(配列番号40)	TACCCACCATATACCAAACTAAA (配列番号383) TAGAGAAGTTGTTGTTGGTTG (配列番号382)	484
ペリプラキン (195kDaコーニファイドエンペロープ前駆体) (195kDa腫瘍随伴性天疱瘡抗原) (配列番号41)	ATTTGTGGGTATTATTTGTTG (配列番号384) AACCACCTTCTCCCTAAT (配列番号385)	409
(配列番号42)	GTAATAATTGGGTAGGGGTTA (配列番号386) AACCAATATCAAATAACTAAAATCC (配列番号387)	394
(配列番号43)	AAAATCCAATCCTAAAACCTA (配列番号389) TATTTGAGAAAGTGGTAGGAGG (配列番号388)	296

10

20

30

【0347】

【表20】

名前/配列番号	プライマー	増幅産物の長さ
(配列番号44)	AACCCTAAGTTCTAACAATTCC (配列番号391) TTTATGTTTGTGGGGTAGT (配列番号390)	492
(配列番号45)	ACCCAATCAACTACATAACTAA (配列番号393) GTGAGAGTGGGTGTTGAAAT (配列番号392)	498
(配列番号46)	GAAGGTAGGTTAGTAAGAAGGGT (配列番号394) TACCTAATCCCCAAAACA (配列番号395)	289
(配列番号47)	CACTCACTTAATCATCACCATC (配列番号397) GGAGGAGTTGGGAGTTAGTAT (配列番号396)	459
(配列番号48)	TGATTTGATTAGTTTGGTATTGTT (配列番号398) CAAACACCCCTTAACCCT (配列番号399)	454
(配列番号49)	TAGTGTGTTTGGTTAGAGTGGT (配列番号400) ACACATCTTAACTTCCCA (配列番号401)	249
DNA複製因子; ショウジョウバエ double p arkedホモログ (配列番号50)	AACCAACACCTCCTAACAAT (配列番号403) GTTGGGTTTATTTGAGTTGAG (配列番号402)	412

10

20

30

【0348】

【表 2 1】

名前/配列番号	プライマー	増幅産物の長さ
PRドメインジंकフィンガータンパク質16 (転写因子MEL1) (配列番号51)	TTGTTTGTGTTTGTAGTAAGAAGG (配列番号404) ATACCCCAATAACCCACCTCTAT (配列番号405)	475
腫瘍抑制サブトランスファラブル候補5; P45 Beckwith-Wiedemann領域1A; Beckwith-Wiedemann症候群染色体領域1、候補A; 異物排出輸送体様タンパク質; 有機カチオン輸送体様2; 腫瘍抑制STF CDNA 5; 刷り込まれた多数回膜貫通型多特異性輸送体関連タンパク質 (配列番号52)	ACCAATCTAAAAATCCCAAC (配列番号407) GGTATTAGGAGGTAGAAGTGGA (配列番号406)	474
CDH1 (配列番号54)	GAGGTTGGGTTAGAGGAT (配列番号408) CAAACCTACAAATACTTTACAATTC (配列番号409)	478
CD44 (配列番号56)	GAAAGGAGAGGTTAAAGGTTG (配列番号410) AACTCACTTAATCCAATCCC (配列番号411)	696
GSTP1 (配列番号57)	CCTCTCCCCTACCTATAAA (配列番号413) GTTGGTTTTATGTTGGGATGG (配列番号412)	469
VIAAT (配列番号59)	CAAACCAATTCTCAATATCC (配列番号415) GAAGTTGTTGATATGAGGTTGTTA (配列番号414)	434

10

20

30

【 0 3 4 9 】

【表 2 2】

表9

番号	遺伝子の名前/配列番号	オリゴ:
1	VIAAT (配列番号59)	TAGACGGGACGTTTA (配列番号416)
2	VIAAT (配列番号59)	TAATTAGATGTGGATGTT (配列番号417)
3	VIAAT (配列番号59)	TTCGTATAGGTACGCGA (配列番号418)
4	VIAAT (配列番号59)	TTTTTGTATAGGTATGTGA (配列番号419)
5	VIAAT (配列番号59)	TTCGTACCGTATTAT (配列番号420)
6	VIAAT (配列番号59)	GAGTTTGTATGTGTATT (配列番号421)
7	VIAAT (配列番号59)	TTCGGTCGTTTAGCGT (配列番号422)
8	VIAAT (配列番号59)	ATTTGGTTGTTTAGTGT (配列番号423)
9	(配列番号1)	GTCGGTGGTTCGAGTA (配列番号424)
10	(配列番号1)	GTTGGTGGTTTGAGTAT (配列番号425)
11	(配列番号1)	GGAATTCACGGGGAG (配列番号426)
12	(配列番号1)	GGGAATTTGATGGGA (配列番号427)
13	(配列番号1)	TTCGTGGGCGTTTAG (配列番号428)
14	(配列番号1)	TTTGTTGGGTGTTTAGT (配列番号429)
15	(配列番号1)	GTCGTTCCGCGATGA (配列番号430)
16	(配列番号1)	GGTTGTTGTTGATGTAG (配列番号431)
17	(配列番号2)	GTATTGCCGTTTATT (配列番号432)
18	(配列番号2)	AGGGTATTGTGTGTTA (配列番号433)

10

20

30

40

【 0 3 5 0 】

【表 2 3】

19	(配列番号2)	AGGTACGTGGCGTTTT (配列番号434)	
20	(配列番号2)	AGGTATGTGGTGTTTT (配列番号435)	
21	(配列番号2)	GAGTTCGCGGTAGTT (配列番号436)	
22	(配列番号2)	AGGAGTTGTGGTAG (配列番号437)	10
23	(配列番号2)	ATAGTTTTCCGTTTT (配列番号438)	
24	(配列番号2)	AGTTTTTGTGTTTAGGA (配列番号439)	
25	(配列番号3)	TTTCGGTCGCGAATAT (配列番号440)	
26	(配列番号3)	TTTGGTTGTAATATTTT (配列番号441)	
27	(配列番号3)	GTCGAGAGTTCGCGTT (配列番号442)	20
28	(配列番号3)	TAGTTGAGAGTTTGTGT (配列番号443)	
29	(配列番号3)	TTTCGGTACGACGTTT (配列番号444)	
30	(配列番号3)	GAGTTTTGGTATGATGT (配列番号445)	
31	(配列番号3)	ATTGGCCGCGTTTAA (配列番号446)	
32	(配列番号3)	ATTGGGTGTGGTTTAA (配列番号447)	30
33	LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9 (配列番号4)	ATTGTCGGGATACGTT (配列番号448)	
34	LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9 (配列番号4)	GATTGTTGGGATATGTT (配列番号449)	
35	LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9 (配列番号4)	TTAGTGTCCGTTATT (配列番号450)	
36	LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9 (配列番号4)	AGTGTGTGTTATTTGG (配列番号451)	
37	LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9 (配列番号4)	TGAAACGTTACGTTA (配列番号452)	40

【 0 3 5 1 】

【表 2 4】

38	LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9 (配列番号4)	AGTGAAATGTTAGTGTT (配列番号453)
39	LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9 (配列番号4)	AAAGGCGCGTTTTTA (配列番号454)
40	LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9 (配列番号4)	TTGAAAGGTGTGGTTT (配列番号455)
41	(配列番号5)	TAAGTAGCGCGTTGT (配列番号456)
42	(配列番号5)	TAAGTAGTGGTGTGTA (配列番号457)
43	(配列番号5)	GAGATGACCGTCGTGG (配列番号458)
44	(配列番号5)	GAGATGAGTGTGTGG (配列番号459)
45	(配列番号5)	GTCGTTTCGTTAGTAACGG (配列番号460)
46	(配列番号5)	GTTGTTTGTAGTAATGG (配列番号461)
47	(配列番号5)	TATCGGTTTTCCGGT (配列番号462)
48	(配列番号5)	ATATTGTTTTTGTGGT (配列番号463)
49	(配列番号5)	TTGACGCGGTGATT (配列番号464)
50	(配列番号5)	TTGGATGGTGTAT (配列番号465)
51	(配列番号6)	GACGTTGTCGTAATGA (配列番号466)
52	(配列番号6)	TGATGTTGTGTAATGA (配列番号467)
53	(配列番号6)	AGTATACGACGCGGA (配列番号468)
54	(配列番号6)	AGAGTATATGAGATGTGA (配列番号469)
55	(配列番号6)	TTCGTTTATCGTCCGG (配列番号470)
56	(配列番号6)	TTGTTTATTGTGGT (配列番号471)

10

20

30

40

【 0 3 5 2 】

【表 2 5】

57	(配列番号6)	AGGACGTAGAGCGTAG (配列番号472)
58	(配列番号6)	TGAGGATGTAGAGTGT (配列番号473)
59	(配列番号7)	TATAGACGGTGGCGA (配列番号474)
60	(配列番号7)	TATAGATGGTGGGTGA (配列番号475)
61	(配列番号7)	ATTTATCGCGTGGTT (配列番号476)
62	(配列番号7)	GGATTATTGTGGTG (配列番号477)
63	(配列番号7)	ATTCGTTGATTCGCGG (配列番号478)
64	(配列番号7)	TTTGTTGATTTGTGGG (配列番号479)
65	ユビキチン様タンパク質SMT3C前駆体(ユビキチンホモロジドメインタンパク質PIC1)(ユビキチン様タンパク質UBL1)(ユビキチン関連タンパク質SUMO-1)(GAP修飾タンパク質1)(GMP1)(セントリン) (配列番号8)	TTTAGTCGATTCGGGA (配列番号480)
66	ユビキチン様タンパク質SMT3C前駆体(ユビキチンホモロジドメインタンパク質PIC1)(ユビキチン様タンパク質UBL1)(ユビキチン関連タンパク質SUMO-1)(GAP修飾タンパク質1)(GMP1)(セントリン) (配列番号8)	AGTTGATTTGGGAGAA (配列番号481)

10

20

30

【 0 3 5 3 】

【表 2 6】

67	ユビキチン様タンパク質SMT3C前駆体 (ユビキチンホモロジードメインタンパク質PIC1) (ユビキチン様タンパク質UBL1) (ユビキチン関連タンパク質SUMO-1) (GAP修飾タンパク質1) (GMP1) (セントリン) (配列番号8)	TGAGCGAGTTCGGAGA (配列番号482)	
68	ユビキチン様タンパク質SMT3C前駆体 (ユビキチンホモロジードメインタンパク質PIC1) (ユビキチン様タンパク質UBL1) (ユビキチン関連タンパク質SUMO-1) (GAP修飾タンパク質1) (GMP1) (セントリン) (配列番号8)	GATGAGTGAGTTTGGG (配列番号483)	10
69	ユビキチン様タンパク質SMT3C前駆体 (ユビキチンホモロジードメインタンパク質PIC1) (ユビキチン様タンパク質UBL1) (ユビキチン関連タンパク質SUMO-1) (GAP修飾タンパク質1) (GMP1) (セントリン) (配列番号8)	TTTCGGGAGTTTCGTA (配列番号484)	
70	ユビキチン様タンパク質SMT3C前駆体 (ユビキチンホモロジードメインタンパク質PIC1) (ユビキチン様タンパク質UBL1) (ユビキチン関連タンパク質SUMO-1) (GAP修飾タンパク質1) (GMP1) (セントリン) (配列番号8)	TTTCGGGAGTTTGTAGT (配列番号485)	20
71	ユビキチン様タンパク質SMT3C前駆体 (ユビキチンホモロジードメインタンパク質PIC1) (ユビキチン様タンパク質UBL1) (ユビキチン関連タンパク質SUMO-1) (GAP修飾タンパク質1) (GMP1) (セントリン) (配列番号8)	TTTCGGTCGTAGTCGG (配列番号486)	30

【 0 3 5 4 】

【表 27】

72	ユビキチン様タンパク質SMT3C前駆体 (ユビキチンホモロジドメインタンパク質PIC1) (ユビキチン様タンパク質UBL1) (ユビキチン関連タンパク質SUMO-1) (GAP修飾タンパク質1) (GMP1) (セントリン) (配列番号8)	ATTTTGGTTGTAGTTGG (配列番号487)
73	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンダブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	ATTGAGTTCGGTTCGT (配列番号488)
74	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンダブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	ATTGAGTTTGGTTTGT (配列番号489)
75	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンダブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	TAGCGTATATGCGATT (配列番号490)
76	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンダブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	GGGTAGTGTATATGTGA (配列番号491)
77	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンダブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	ATATGCGATTGATTTACGG (配列番号492)
78	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンダブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	ATATGTGATTGATTTATGG (配列番号493)
79	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンダブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	TTATAGCGTCGTATGG (配列番号494)

10

20

30

【 0 3 5 5 】

【表 2 8】

80	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンドブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	ATAGTGTGTATGGGAA (配列番号495)
81	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンドブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	GACGTAGGTTTCGTGAT (配列番号496)
82	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンドブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	ATGATGTAGGTTTGGA (配列番号497)
83	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンドブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	GGTAGCGTTTATTCGT (配列番号498)
84	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンドブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	AGGTAGTGTATTATTGTA (配列番号499)
85	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンドブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	ATAGTCGAGTTTCGTT (配列番号500)
86	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンドブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	GTTGAGTTTTGTTTAGG (配列番号501)
87	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンドブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	TGGGTATACGTGTTAG (配列番号502)
88	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンドブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	TATGGGTATATGTGTTAG (配列番号503)

10

20

30

【 0 3 5 6 】

【表 29】

89	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンドブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	TTAGATGCGTAAGGTT (504)
90	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンドブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	ATTAGATGTGTAAGGTTT (配列番号505)
91	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンドブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	TTATGGGTCGTAGGAT (配列番号506)
92	Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンドブルジンクフィンガータンパク質 (配列番号9)	ATGGGTTGTAGGATTG (配列番号507)
93	(配列番号10)	TTCGTTTAGTTACGTACGG (配列番号508)
94	(配列番号10)	TTTGTTTAGTTATGTATGG (509)
95	(配列番号10)	TAGTTACGTACGGATAT (配列番号510)
96	(配列番号10)	TTATGTATGGATATTTGG (配列番号511)
97	(配列番号10)	AGGATACGTAGTTCGT (配列番号512)
98	(配列番号10)	AGGATATGTAGTTTGATA (配列番号513)
99	(配列番号10)	AGTTCGTATATTTTCGG (配列番号514)
100	(配列番号10)	AGTTTGTATATTTTGGTA (配列番号515)
101	(配列番号11)	TACGGGGTCGTTTCGTA (配列番号516)
102	(配列番号11)	TATGGGTTGTTGTAT (配列番号517)
103	(配列番号11)	TTCGTAGCGATCGTA (配列番号518)
104	(配列番号11)	GATTTGTAGGTGATTGT (配列番号519)

10

20

30

【 0 3 5 7 】

40

【表 3 0】

105	(配列番号11)	TAGCGTTCGATTCGTT (配列番号520)	
106	(配列番号11)	TAGTGGTTGATTTGTTT (配列番号521)	
107	(配列番号11)	GTCGTTACGTTTTTCGG (配列番号522)	
108	(配列番号11)	TAGAGTTGTTATGTTTTTGG (配列番号523)	10
109	(配列番号12)	AAGTTCGTTACGGCGG (配列番号524)	
110	(配列番号12)	AGTTTGTTATGGTGGG (配列番号525)	
111	(配列番号12)	TACGTTGGTCGACGTT (配列番号526)	
112	(配列番号12)	TTTATGTTGGTTGATGT (配列番号527)	
113	(配列番号12)	GAGTCGGACGGTGTTT (配列番号528)	20
114	(配列番号12)	GAGTTGGATGGTGTTT (配列番号529)	
115	HOOK2タンパク質 (配列番号13)	TAGCGTAAAGGGACGAG (配列番号530)	
116	HOOK2タンパク質 (配列番号13)	TAGTGTAAGGGATGAG (配列番号531)	
117	HOOK2タンパク質 (配列番号13)	ATCGCGATATTTTCGTT (配列番号532)	
118	HOOK2タンパク質 (配列番号13)	GGATGTGGATATTTTGT (配列番号533)	
119	HOOK2タンパク質 (配列番号13)	ATTCGTTTTTCGGAGT (配列番号534)	30
120	HOOK2タンパク質 (配列番号13)	GGATATTTTGTTTTTGGG (配列番号535)	
121	HOOK2タンパク質 (配列番号13)	AGGTAGCGTAAAGGGA (配列番号536)	
122	HOOK2タンパク質 (配列番号13)	AGGTAGTGTAAGGGA (配列番号537)	
123	(配列番号14)	TAACGTATCGTTAGGG (配列番号538)	
124	(配列番号14)	AATGTATTGTTAGGATG (配列番号539)	40

【 0 3 5 8 】

【表 3 1】

125	(配列番号14)	TTTTTGGCGGGAGTA (配列番号540)	
126	(配列番号14)	TTTTGGTGTGGAGTAG (配列番号541)	
127	(配列番号14)	TAGAGTTCGACGGTT (配列番号542)	
128	(配列番号14)	AGAGTTTGATGGGTTT (配列番号543)	10
129	(配列番号14)	ATCGAATTTATCGGTCGG (配列番号544)	
130	(配列番号14)	ATTGAATTTATTGGTTGG (配列番号545)	
131	(配列番号14)	TATTACGGGGAACGGT (配列番号546)	
132	(配列番号14)	TATTATGGGGAATGGTT (配列番号547)	
133	(配列番号14)	GAACGGTTCGTTTTTA (配列番号548)	20
134	(配列番号14)	GGGAATGTTTTTTTT (配列番号549)	
135	(配列番号14)	AAGGGATCGTTTTTTT (配列番号550)	
136	(配列番号14)	TAAGGGATTGTTTTTTT (配列番号551)	
137	(配列番号14)	TTTTAGGGCGTTTAA (配列番号552)	
138	(配列番号14)	TTAGGGTGGTTTAAGG (配列番号553)	
139	(配列番号15)	TGACGAAAATCGATTG (配列番号554)	30
140	(配列番号15)	GATGAAAATTGATTGGAT (配列番号555)	
141	(配列番号15)	GGGTATACGAATACGT (配列番号556)	
142	(配列番号15)	GTGGTATATGAATATGT (配列番号557)	
143	(配列番号15)	TTCGAGGTACGGGTT (配列番号558)	
144	(配列番号15)	TTTGAGGTTATGGGTT (配列番号559)	40

【 0 3 5 9 】

【表 3 2】

145	(配列番号15)	TGTTCCGAGGTATATACGT (配列番号560)	
146	(配列番号15)	TTGTTTGAGGTATATATGT (配列番号561)	
147	(配列番号16)	AGGAGATTCGGTTATAT (配列番号562)	
148	(配列番号16)	GAGGAGATTTGGTTATAT (配列番号563)	10
149	(配列番号16)	GTTATTTTCGGTAATGTT (配列番号564)	
150	(配列番号16)	AGGTTATTTTGGTAATG (配列番号565)	
151	(配列番号16)	TATTACTCGTTAGTTTGA (配列番号566)	
152	(配列番号16)	TATTAGTTGTTAGTTTGGAG (配列番号567)	
153	(配列番号16)	AGGTTTATACGATAAAGG (配列番号568)	20
154	(配列番号16)	AGGTTTATATGATAAAGGT (配列番号569)	
155	(配列番号17)	TTCCAATATTAGCGCGT (配列番号570)	
156	(配列番号17)	ATTTTGAATATTAGTGTGT (配列番号571)	
157	(配列番号17)	TTTATGACGCGGAGT (配列番号572)	
158	(配列番号17)	GAGTGGTGAGTTTAGG (配列番号573)	
159	(配列番号17)	AGTCGGTAACCGGTAT (配列番号574)	30
160	(配列番号17)	AGAGTTGGTAATGTGTA (配列番号575)	
161	(配列番号17)	TTTTTACGCGGAAGG (配列番号576)	
162	(配列番号17)	TTTTATGTGAAGGGG (配列番号577)	

【 0 3 6 0 】

40

【表 3 3】

163	リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質 (レチノイン酸誘導性E3タンパク質) (HA1520) LAM5 (配列番号18)	AGGTCGGTCGTAGATA (配列番号578)
164	リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質 (レチノイン酸誘導性E3タンパク質) (HA1520) LAM5 (配列番号18)	GAGGTTGGTTGTAGAT (配列番号579)
165	リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質 (レチノイン酸誘導性E3タンパク質) (HA1520) LAM5 (配列番号18)	GACGTTTATTTTCGAGG (配列番号580)
166	リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質 (レチノイン酸誘導性E3タンパク質) (HA1520) LAM5 (配列番号18)	TGATGTTTATTTTGAGGT (配列番号581)
167	リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質 (レチノイン酸誘導性E3タンパク質) (HA1520) LAM5 (配列番号18)	TTTGATCGGGATGTGA (配列番号582)
168	リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質 (レチノイン酸誘導性E3タンパク質) (HA1520) LAM5 (配列番号18)	TTTGATTGGGATGTGA (配列番号583)
169	リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質 (レチノイン酸誘導性E3タンパク質) (HA1520) LAM5 (配列番号18)	TGTAATTGACGTTTATTT (配列番号584)
170	リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質 (レチノイン酸誘導性E3タンパク質) (HA1520) LAM5 (配列番号18)	AATGTAATTGATGTTTATTT (配列番号585)
171	type 1イノシトール-1, 4, 5-三リン酸5-ホスファターゼ (EC 3. 1. 3. 56) (5PTASE) (配列番号19)	ATCGGTGTTAGCGGAT (配列番号586)

10

20

【 0 3 6 1 】

30

【表 3 4】

172	type 1イノシトール-1, 4, 5-三リン酸5-ホスファターゼ (EC 3. 1. 3. 56) (5PTASE) (配列番号19)	AATTGGTGTAGTGGA (配列番号587)
173	type 1イノシトール-1, 4, 5-三リン酸5-ホスファターゼ (EC 3. 1. 3. 56) (5PTASE) (配列番号19)	ATGTTCTAGGTGTCGG (配列番号588)
174	type 1イノシトール-1, 4, 5-三リン酸5-ホスファターゼ (EC 3. 1. 3. 56) (5PTASE) (配列番号19)	TTTGTAGGTGTTGGTA (配列番号589)
175	type 1イノシトール-1, 4, 5-三リン酸5-ホスファターゼ (EC 3. 1. 3. 56) (5PTASE) (配列番号19)	GTCGTTGTATCGAGG (配列番号590)
176	type 1イノシトール-1, 4, 5-三リン酸5-ホスファターゼ (EC 3. 1. 3. 56) (5PTASE) (配列番号19)	GGTGTGTTATTGAGG (配列番号591)
177	type 1イノシトール-1, 4, 5-三リン酸5-ホスファターゼ (EC 3. 1. 3. 56) (5PTASE) (配列番号19)	ATTGCGGTTTTATCGG (配列番号592)
178	type 1イノシトール-1, 4, 5-三リン酸5-ホスファターゼ (EC 3. 1. 3. 56) (5PTASE) (配列番号19)	ATTGTGGTTTTATTGGT (配列番号593)
179	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	TTCGATCGTTGAATA (配列番号594)
180	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	TTGAGTTTTGATTGGTT (配列番号595)

10

20

30

【 0 3 6 2 】

【表 3 5】

181	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	TAAGTCGCGTAAGGAG (配列番号596)	
182	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	AAGTTGTGTAAGGAGTA (配列番号597)	10
183	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	AGGTTGTTAATCGTT (配列番号598)	
184	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	TGAGGTTTGTAAATTGT (配列番号599)	
185	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	TACGTTGGACGTATAG (配列番号600)	20
186	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	AGAGTATGTTGGATGTA (配列番号601)	
187	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	AGTCGCGAGTTATCGA (配列番号602)	
188	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	AGTTGTGAGTTATTGAG (配列番号603)	30
189	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	TAGCGCGTCGTATATA (配列番号604)	

【 0 3 6 3 】

【表 3 6】

190	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	GGAGTAGTGTGTTGTAT (配列番号605)	
191	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	GTCGAAAGTCGTTGAG (配列番号606)	10
192	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	GTTGAAAGTTGTTGAGG (配列番号607)	
193	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	TAGGACGTATCGCGAG (配列番号608)	
194	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	TAGGATGATTGTGAGT (配列番号609)	20
195	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	AGTGTATCGTTTTTCGG (配列番号610)	
196	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	TAGTGTATTGTTTTTGG (配列番号611)	
197	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	TTCGTTTACGGTAGTT (配列番号612)	30
198	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	ATTTTTGTTTATGGTAGTT (配列番号613)	

【 0 3 6 4 】

【表 3 7】

199	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	AGCGTATCGTTAGTTA (配列番号614)
200	プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体) (PGE受容体EP4サブタイプ) (配列番号20)	AGGTTGTGATTGTTAG (配列番号615)
201	(配列番号21)	ATTCGGCGAATAGTAG (配列番号616)
202	(配列番号21)	TATTTGGTGAATAGTAGTA (配列番号617)
203	(配列番号21)	ATAGCGTTGGTCGTTA (配列番号618)
204	(配列番号21)	ATAGTGTGGTTGTTAG (配列番号619)
205	(配列番号21)	TTCGGGATACCAGTTT (配列番号620)
206	(配列番号21)	GTTTGGGATATGAGTTT (配列番号621)
207	(配列番号21)	TACGATAAGTCGGAGA (配列番号622)
208	(配列番号21)	GGGGTTATGATAAGTTGG (配列番号623)
209	(配列番号22)	TATCGCGGAGTTGTAT (配列番号624)
210	(配列番号22)	TTAACGTTTGGGACGT (配列番号625)
211	(配列番号22)	TTAACGTTTGGGACGT (配列番号626)
212	(配列番号22)	TTAATGTTTGGGGATGT (配列番号627)
213	(配列番号22)	TATTCGCGTTTTAGAT (配列番号628)

10

20

30

【 0 3 6 5 】

【表 3 8】

214	(配列番号22)	TTATTTGTGTTTTAGATTA (配列番号629)	
215	拡散型ヌクレオシドトランスポーター1 (拡散型 ニトロベンジルメルカプトプリンリボシド感受 性ヌクレオシドトランスポーター) (拡散型NBMPR 感受性ヌクレオシドトランスポーター) (ヌクレ オシドトランスポーター、ES型) (配列番号23)	AGGGATAACCGAATATT (配列番号630)	10
216	拡散型ヌクレオシドトランスポーター1 (拡散型 ニトロベンジルメルカプトプリンリボシド感受 性ヌクレオシドトランスポーター) (拡散型NBMPR 感受性ヌクレオシドトランスポーター) (ヌクレ オシドトランスポーター、ES型) (配列番号23)	GAAGGATAATGGAATAT (配列番号631)	
217	拡散型ヌクレオシドトランスポーター1 (拡散型 ニトロベンジルメルカプトプリンリボシド感受 性ヌクレオシドトランスポーター) (拡散型NBMPR 感受性ヌクレオシドトランスポーター) (ヌクレ オシドトランスポーター、ES型) (配列番号23)	GAATAGTTTCGAGATGA (配列番号632)	20
218	拡散型ヌクレオシドトランスポーター1 (拡散型 ニトロベンジルメルカプトプリンリボシド感受 性ヌクレオシドトランスポーター) (拡散型NBMPR 感受性ヌクレオシドトランスポーター) (ヌクレ オシドトランスポーター、ES型) (配列番号23)	GGAATAGTTTTGAGATGA (配列番号633)	
219	オーファン核受容体NR5A2 (α -1-フェトプロテイン 転写因子) (肝細胞転写因子) (B1結合因子) (HB1 F) (CYP7Aプロモーター結合因子) (配列番号24)	TTTTCGACGAAGTTTT (配列番号634)	30

【 0 3 6 6 】

【表 3 9】

220	オーファン核受容体NR5A2 (α -1-フェトプロテイン転写因子) (肝細胞転写因子) (B1結合因子) (HB1 F) (CYP7Aプロモーター結合因子) (配列番号24)	TTTTGATGAAGTTTTGTT (配列番号635)
221	オーファン核受容体NR5A2 (α -1-フェトプロテイン転写因子) (肝細胞転写因子) (B1結合因子) (HB1 F) (CYP7Aプロモーター結合因子) (配列番号24)	TTACGGAGCGTTTTA (配列番号636)
222	オーファン核受容体NR5A2 (α -1-フェトプロテイン転写因子) (肝細胞転写因子) (B1結合因子) (HB1 F) (CYP7Aプロモーター結合因子) (配列番号24)	TTTTATGGAGGTGTTTT (配列番号637)
223	オーファン核受容体NR5A2 (α -1-フェトプロテイン転写因子) (肝細胞転写因子) (B1結合因子) (HB1 F) (CYP7Aプロモーター結合因子) (配列番号24)	AGCGGAATTTATCGGG (配列番号638)
224	オーファン核受容体NR5A2 (α -1-フェトプロテイン転写因子) (肝細胞転写因子) (B1結合因子) (HB1 F) (CYP7Aプロモーター結合因子) (配列番号24)	GGTGAATTTATTGGGG (配列番号639)
225	オーファン核受容体NR5A2 (α -1-フェトプロテイン転写因子) (肝細胞転写因子) (B1結合因子) (HB1 F) (CYP7Aプロモーター結合因子) (配列番号24)	TAGTCGAAGTAGGCGT (配列番号640)
226	オーファン核受容体NR5A2 (α -1-フェトプロテイン転写因子) (肝細胞転写因子) (B1結合因子) (HB1 F) (CYP7Aプロモーター結合因子) (配列番号24)	TAGTTGAAGTAGGTGTT (配列番号641)

10

20

30

【 0 3 6 7 】

【表 4 0】

227	タンパク質-チロシンホスファターゼX前駆体 (EC 3.1.3.48) (臍島自己抗原関連タンパク質) (ICAA R) (IAR) (ホグリン) (配列番号25)	TTCGATCGAAGGTAAT (配列番号642)
228	タンパク質-チロシンホスファターゼX前駆体 (EC 3.1.3.48) (臍島自己抗原関連タンパク質) (ICAA R) (IAR) (ホグリン) (配列番号25)	TTTGTTTGATTGAAGGT (配列番号643)
229	タンパク質-チロシンホスファターゼX前駆体 (EC 3.1.3.48) (臍島自己抗原関連タンパク質) (ICAA R) (IAR) (ホグリン) (配列番号25)	AGGCGATCGATATTAG (配列番号644)
230	タンパク質-チロシンホスファターゼX前駆体 (EC 3.1.3.48) (臍島自己抗原関連タンパク質) (ICAA R) (IAR) (ホグリン) (配列番号25)	GGTGATTGATATTAGGG (配列番号645)
231	タンパク質-チロシンホスファターゼX前駆体 (EC 3.1.3.48) (臍島自己抗原関連タンパク質) (ICAA R) (IAR) (ホグリン) (配列番号25)	TTAGCGTTCGTCGTTA (配列番号646)
232	タンパク質-チロシンホスファターゼX前駆体 (EC 3.1.3.48) (臍島自己抗原関連タンパク質) (ICAA R) (IAR) (ホグリン) (配列番号25)	TAATTAGTGTTTGTGTTA (配列番号647)
233	タンパク質-チロシンホスファターゼX前駆体 (EC 3.1.3.48) (臍島自己抗原関連タンパク質) (ICAA R) (IAR) (ホグリン) (配列番号25)	ATCGGTTCCGGGAATTT (配列番号648)

10

20

30

【 0 3 6 8 】

【表 4 1】

234	タンパク質-チロシンホスファターゼX前駆体 (EC 3.1.3.48) (臍島自己抗原関連タンパク質) (ICAA R) (IAR) (ホグリン) (配列番号25)	AGATTGGTTGGGAAT (配列番号649)
235	(配列番号26)	GTCGATTCGTTACGG (配列番号650)
236	(配列番号26)	GTTGATTTGTTATGGG (配列番号651)
237	(配列番号26)	TTCGGTTTCGTATTA (配列番号652)
238	(配列番号26)	TTTTGGTTTTGTATTAG (配列番号653)
239	(配列番号26)	AATTCGCGTTTCGAT (配列番号654)
240	(配列番号26)	AATTTGTGTTTTGATG (配列番号655)
241	(配列番号26)	GTCGTTTCGCGGAGAT (配列番号656)
242	(配列番号26)	GTTGTTTTGTGGAGATT (配列番号657)
243	(配列番号27)	ATTGGTCGATTCGCGG (配列番号658)
244	(配列番号27)	TATTGGTTGATTTGTGG (配列番号659)
245	(配列番号27)	ATCGTTTCGATTCGG (配列番号660)
246	(配列番号27)	AGTGTTCGATTTGGT (配列番号661)
247	(配列番号27)	ATCGAGCGTTTCGATT (配列番号662)
248	(配列番号27)	GGATTGAGTGTGTTGAT (配列番号663)
249	(配列番号27)	ATTCGCGTATTCGAGA (配列番号664)
250	(配列番号27)	TTTGTGATTTGAGAGG (配列番号665)
251	(配列番号27)	GACGTTCCGATTA (配列番号666)

10

20

30

40

【 0 3 6 9 】

【表 4 2】

252	(配列番号27)	TGGATGTTTGTGATTAA (配列番号667)	
253	(配列番号27)	AAGTCGATATCGCGGT (配列番号668)	
254	(配列番号27)	AAAAGTTGATATTGTGGT (配列番号669)	
255	(配列番号27)	ACCGTTCGGAAGTTA (配列番号670)	10
256	(配列番号27)	GGAGTGTTTGAAGTT (配列番号671)	
257	(配列番号27)	TATTCGGACGGGATA (配列番号672)	
258	(配列番号27)	ATTTGGATGGGATAG (配列番号673)	
259	(配列番号27)	GAGACGCTAGTTAT (配列番号674)	
260	(配列番号27)	GGGAGATGTAGGTT (配列番号675)	20
261	(配列番号28)	TAGTTTTCGGCAAGG (配列番号676)	
262	(配列番号28)	GGTAGTTTTGGTGAAG (配列番号677)	
263	(配列番号28)	AAGGCGGTGACGTAAA (配列番号678)	
264	(配列番号28)	AAGGTGGTGATGTAAA (配列番号679)	
265	(配列番号28)	ATGGCGTAAGTACGTT (配列番号680)	30
266	(配列番号28)	GATGGTGAAGTATGTT (配列番号681)	
267	(配列番号28)	AGTACGTTCCGGACGA (配列番号682)	
268	(配列番号28)	AACTATGTTTGGGATGA (配列番号683)	

【 0 3 7 0 】

40

【表 4 3】

269	ペルオキソーム膜タンパク質PEX14 (ペルオキシシン14) (ペルオキソーム膜アンカータンパク質PEX14) (PTS1受容体ドッキングタンパク質) (配列番号29)	ATGGTATTCGGGTCGT (配列番号684)	
270	ペルオキソーム膜タンパク質PEX14 (ペルオキシシン14) (ペルオキソーム膜アンカータンパク質PEX14) (PTS1受容体ドッキングタンパク質) (配列番号29)	TATGGTATTTGGGTTGT (配列番号685)	10
271	ペルオキソーム膜タンパク質PEX14 (ペルオキシシン14) (ペルオキソーム膜アンカータンパク質PEX14) (PTS1受容体ドッキングタンパク質) (配列番号29)	TTGGAGCGTTAAGTAA (配列番号686)	
272	ペルオキソーム膜タンパク質PEX14 (ペルオキシシン14) (ペルオキソーム膜アンカータンパク質PEX14) (PTS1受容体ドッキングタンパク質) (配列番号29)	TATTTGGAGTGTAAAGTA (配列番号687)	20
273	ペルオキソーム膜タンパク質PEX14 (ペルオキシシン14) (ペルオキソーム膜アンカータンパク質PEX14) (PTS1受容体ドッキングタンパク質) (配列番号29)	TGAAAGATTCGTTTGT (配列番号688)	
274	ペルオキソーム膜タンパク質PEX14 (ペルオキシシン14) (ペルオキソーム膜アンカータンパク質PEX14) (PTS1受容体ドッキングタンパク質) (配列番号29)	GTGAAAGATTTGTTTGT (配列番号689)	30
275	ペルオキソーム膜タンパク質PEX14 (ペルオキシシン14) (ペルオキソーム膜アンカータンパク質PEX14) (PTS1受容体ドッキングタンパク質) (配列番号29)	TGTATAACGAGAGGTG (配列番号690)	

【 0 3 7 1 】

【表 4 4】

276	ペルオキシソーム膜タンパク質PEX14 (ペルオキシシン14) (ペルオキシソーム膜アンカータンパク質PEX14) (PTS1受容体ドッキングタンパク質) (配列番号29)	TGTATAATGAGAGGTGA (配列番号691)
277	ペルオキシソーム膜タンパク質PEX14 (ペルオキシシン14) (ペルオキシソーム膜アンカータンパク質PEX14) (PTS1受容体ドッキングタンパク質) (配列番号29)	ATGTTTTCGGGTATGGA (配列番号692)
278	ペルオキシソーム膜タンパク質PEX14 (ペルオキシシン14) (ペルオキシソーム膜アンカータンパク質PEX14) (PTS1受容体ドッキングタンパク質) (配列番号29)	ATGTTTTCGGGTATGGA (配列番号693)
279	ホメオボックスタンパク質HOX-B6 (HOX-2B) (HOX-2.2) (配列番号30)	TTTTCGAGGAATTCGT (配列番号694)
280	ホメオボックスタンパク質HOX-B6 (HOX-2B) (HOX-2.2) (配列番号30)	TTTTTTGAGGAATTTGTT (配列番号695)
281	ホメオボックスタンパク質HOX-B6 (HOX-2B) (HOX-2.2) (配列番号30)	ATAGTTTTCGGGGGT (配列番号696)
282	ホメオボックスタンパク質HOX-B6 (HOX-2B) (HOX-2.2) (配列番号30)	TATAGTTTTTGGTGGGT (配列番号697)
283	ホメオボックスタンパク質HOX-B6 (HOX-2B) (HOX-2.2) (配列番号30)	TTTTTTCGGCGTAGATA (配列番号698)
284	ホメオボックスタンパク質HOX-B6 (HOX-2B) (HOX-2.2) (配列番号30)	TGTTTTTGGTGTAGAT (配列番号699)
285	ホメオボックスタンパク質HOX-B6 (HOX-2B) (HOX-2.2) (配列番号30)	TTACGGCGGTAGAGA (配列番号700)
286	ホメオボックスタンパク質HOX-B6 (HOX-2B) (HOX-2.2) (配列番号30)	GGAGTTATGGGTGTTA (配列番号701)

10

20

30

40

【 0 3 7 2 】

【表 4 5】

287	LIMドメインキナーゼ1 (EC 2. 7. 1. 37) (LIMK-1) (配列番号31)	TATCGGATTATCGCGG (配列番号702)
288	LIMドメインキナーゼ1 (EC 2. 7. 1. 37) (LIMK-1) (配列番号31)	ATTGGATTATTGTGGGG (配列番号703)
289	LIMドメインキナーゼ1 (EC 2. 7. 1. 37) (LIMK-1) (配列番号31)	GTCGGTAGTTTATCGGAT (配列番号704)
290	LIMドメインキナーゼ1 (EC 2. 7. 1. 37) (LIMK-1) (配列番号31)	GTTGGTAGTTTATTGGAT (配列番号705)
291	LIMドメインキナーゼ1 (EC 2. 7. 1. 37) (LIMK-1) (配列番号31)	TAGGAGACGTTACGTT (配列番号706)
292	LIMドメインキナーゼ1 (EC 2. 7. 1. 37) (LIMK-1) (配列番号31)	AGATGTTATGTTAGGGT (配列番号707)
293	低親和性免疫グロブリン γ Fc受容体II-A前駆体 (Fc- γ RII-A) (FCRII-A) (IGG Fc受容体II-A) (Fc- γ RIIA) (CD32) (CDW32) (配列番号32)	AAGAACGGACGTGTTT (配列番号708)
294	低親和性免疫グロブリン γ Fc受容体II-A前駆体 (Fc- γ RII-A) (FCRII-A) (IGG Fc受容体II-A) (Fc- γ RIIA) (CD32) (CDW32) (配列番号32)	AGGAAGAATGGATGTG (配列番号709)
295	低親和性免疫グロブリン γ Fc受容体II-A前駆体 (Fc- γ RII-A) (FCRII-A) (IGG Fc受容体II-A) (Fc- γ RIIA) (CD32) (CDW32) (配列番号32)	TTTTTGCATAGTCGG (配列番号710)

10

20

【 0 3 7 3 】

【表 4 6】

296	低親和性免疫グロブリン γ Fc受容体II-A前駆体 (Fc- γ RII-A) (FCRII-A) (IGG Fc受容体II-A) (Fc- γ RIIA) (CD32) (CDW32) (配列番号32)	GTTTTGTGATAGTTGG (配列番号711)	
297	低親和性免疫グロブリン γ Fc受容体II-A前駆体 (Fc- γ RII-A) (FCRII-A) (IGG Fc受容体II-A) (Fc- γ RIIA) (CD32) (CDW32) (配列番号32)	TAGCGCCGATTTAAGG (配列番号712)	10
298	低親和性免疫グロブリン γ Fc受容体II-A前駆体 (Fc- γ RII-A) (FCRII-A) (IGG Fc受容体II-A) (Fc- γ RIIA) (CD32) (CDW32) (配列番号32)	GTAGTGGTGATTTAAGG (配列番号713)	
299	低親和性免疫グロブリン γ Fc受容体II-A前駆体 (Fc- γ RII-A) (FCRII-A) (IGG Fc受容体II-A) (Fc- γ RIIA) (CD32) (CDW32) (配列番号32)	TTTACGAGCGAGTCGT (配列番号714)	
300	低親和性免疫グロブリン γ Fc受容体II-A前駆体 (Fc- γ RII-A) (FCRII-A) (IGG Fc受容体II-A) (Fc- γ RIIA) (CD32) (CDW32) (配列番号32)	TTTTATGAGTGAGTTGTT (配列番号715)	20

【 0 3 7 4 】

【表 4 7】

301	1-アシル-SN-グリセロール-3-ホスファターゼ アシルトランスフェラーゼ γ (EC 2. 3. 1. 51) (1-AG Pアシルトランスフェラーゼ3) (1-AGPAT 3) (リン ホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ γ) (LPAAT- γ) (1-アシルグリセロール-3-リン酸O- アシルトランスフェラーゼ3) (配列番号33)	TTTCGATAGTATACGGG (配列番号716)	30
302	1-アシル-SN-グリセロール-3-ホスファターゼ アシルトランスフェラーゼ γ (EC 2. 3. 1. 51) (1-AG Pアシルトランスフェラーゼ3) (1-AGPAT 3) (リン ホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ γ) (LPAAT- γ) (1-アシルグリセロール-3-リン酸O- アシルトランスフェラーゼ3) (配列番号33)	TTTGATAGTATATGGGGA (配列番号717)	
303	1-アシル-SN-グリセロール-3-ホスファターゼ アシルトランスフェラーゼ γ (EC 2. 3. 1. 51) (1-AG Pアシルトランスフェラーゼ3) (1-AGPAT 3) (リン ホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ γ) (LPAAT- γ) (1-アシルグリセロール-3-リン酸O- アシルトランスフェラーゼ3) (配列番号33)	AAGGGTGCCTTCGTTA (配列番号718)	40

【 0 3 7 5 】

【表 4 8】

304	1-アシル-SN-グリセロール-3-ホスファターゼ アシルトランスフェラーゼ (EC 2. 3. 1. 51) (1-AG Pアシルトランスフェラーゼ3) (1-AGPAT 3) (リソ ホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ) (LPAAT-γ) (1-アシルグリセロール-3-リン酸0- アシルトランスフェラーゼ3) (配列番号33)	AAGGGAGTGTGGTTA (配列番号719)	
305	1-アシル-SN-グリセロール-3-ホスファターゼ アシルトランスフェラーゼ (EC 2. 3. 1. 51) (1-AG Pアシルトランスフェラーゼ3) (1-AGPAT 3) (リソ ホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ) (LPAAT-γ) (1-アシルグリセロール-3-リン酸0- アシルトランスフェラーゼ3) (配列番号33)	AATAATAGCGACGGGG (配列番号720)	10
306	1-アシル-SN-グリセロール-3-ホスファターゼ アシルトランスフェラーゼ (EC 2. 3. 1. 51) (1-AG Pアシルトランスフェラーゼ3) (1-AGPAT 3) (リソ ホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ) (LPAAT-γ) (1-アシルグリセロール-3-リン酸0- アシルトランスフェラーゼ3) (配列番号33)	TAATAGTGATGGGGT (配列番号721)	20
307	ホメオボックスタンパク質GSH-2 (配列番号34)	TTTGAATCGTCGAGT (配列番号722)	
308	ホメオボックスタンパク質GSH-2 (配列番号34)	AGAATTGTTGAGTGAAG (配列番号723)	
309	ホメオボックスタンパク質GSH-2 (配列番号34)	TTTTTCGTCGGTTCGTA (配列番号724)	
310	ホメオボックスタンパク質GSH-2 (配列番号34)	TTTGTGGTTGTAGGA (配列番号725)	
311	ホメオボックスタンパク質GSH-2 (配列番号34)	AGGACGGCGTTTATTA (配列番号726)	30
312	ホメオボックスタンパク質GSH-2 (配列番号34)	GATGAGGATGGTGGT (配列番号727)	

【 0 3 7 6 】

【表 4 9】

313	ホメオボックスタンパク質GSH-2 (配列番号34)	TTCGATTTCCGAGGAT (配列番号728)	
314	ホメオボックスタンパク質GSH-2 (配列番号34)	TTTGATTTTGGAGGATT (配列番号729)	
315	(配列番号35)	TTCGTTATCGAGAGTT (配列番号730)	
316	(配列番号35)	GGGTTTTGTTATTGAGA (配列番号731)	10
317	(配列番号35)	GACGTGAGCGTTTAGG (配列番号732)	
318	(配列番号35)	GATGTGAGTGTTAGGG (配列番号733)	
319	(配列番号35)	TACGGAGTTGGCGTTA (配列番号734)	
320	(配列番号35)	TTTATGGAGTTGGTGT (配列番号735)	
321	(配列番号35)	TTGGTTCGTCGAGGAT (配列番号736)	20
322	(配列番号35)	TTGGTTTGTGAGGAT (配列番号737)	
323	ヒストンH4 (配列番号36)	ATCGAAATCGTAGAGG (配列番号738)	
324	ヒストンH4 (配列番号36)	ATTGAAATGTAGAGGG (配列番号739)	
325	ヒストンH4 (配列番号36)	TATGGCGGTGATCGTT (配列番号740)	
326	ヒストンH4 (配列番号36)	TTTATGGTGGTATTGT (配列番号741)	
327	ヒストンH4 (配列番号36)	TTACGGCGTTCCGAT (配列番号742)	30
328	ヒストンH4 (配列番号36)	TTATGGTGTTTGGATT (配列番号743)	
329	ヒストンH4 (配列番号36)	ATGCGTTTTACGTCGT (配列番号744)	
330	ヒストンH4 (配列番号36)	AGATGTGTTTTATGTTGT (配列番号745)	
331	ヒストンH4 (配列番号36)	TAAGGCGTCGGATGGT (配列番号746)	
332	ヒストンH4 (配列番号36)	GAGTAAGGTGTTGGAT (配列番号747)	40

【 0 3 7 7 】

【表50】

333	ヒストンH4 (配列番号36)	TATTTACGGTGGCGT (配列番号748)
334	ヒストンH4 (配列番号36)	ATTTTATGGTGGTGT (配列番号749)
335	電位依存性カリウムチャンネル・サブファミリー KQTメンバー2 (神経芽細胞腫特異的カリウムチャンネルKQT様2) (配列番号37)	ATTTCGGAGGTATCGT (配列番号750)
336	電位依存性カリウムチャンネル・サブファミリー KQTメンバー2 (神経芽細胞腫特異的カリウムチャンネルKQT様2) (配列番号37)	TTTGGAGGTATTGTGT (配列番号751)
337	電位依存性カリウムチャンネル・サブファミリー KQTメンバー2 (神経芽細胞腫特異的カリウムチャンネルKQT様2) (配列番号37)	TTCGTACGGGTATAG (配列番号752)
338	電位依存性カリウムチャンネル・サブファミリー KQTメンバー2 (神経芽細胞腫特異的カリウムチャンネルKQT様2) (配列番号37)	GGTTTGTATGGGTATA (配列番号753)
339	電位依存性カリウムチャンネル・サブファミリー KQTメンバー2 (神経芽細胞腫特異的カリウムチャンネルKQT様2) (配列番号37)	TATAAGCGTTACGGT (配列番号754)
340	電位依存性カリウムチャンネル・サブファミリー KQTメンバー2 (神経芽細胞腫特異的カリウムチャンネルKQT様2) (配列番号37)	GGTATAAGGTGTTATGG (配列番号755)

10

20

30

【0378】

【表 5 1】

341	電位依存性カリウムチャンネル・サブファミリー KQTメンバー2 (神経芽細胞腫特異的カリウムチャンネルKQT様2) (配列番号37)	TTACGGTCGGTAGTA (配列番号756)	
342	電位依存性カリウムチャンネル・サブファミリー KQTメンバー2 (神経芽細胞腫特異的カリウムチャンネルKQT様2) (配列番号37)	TATGGTTGTAGTAGT (配列番号757)	10
343	アダプター関連タンパク質複合体1 σ -1Bサブユニット (σ -アダプチン1B) (アダプタータンパク質複合体AP-1 σ -1Bサブユニット) (ゴルジアダプターHA1/AP1アダプチン σ -1Bサブユニット) (クラスリン集合タンパク質複合体1 σ -1B小鎖) (AP-1クラスリンの σ -1Bサブユニット) (DC22) (配列番号38)	TTATTCGTAGTTTTCCG (配列番号758)	
344	アダプター関連タンパク質複合体1 σ -1Bサブユニット (σ -アダプチン1B) (アダプタータンパク質複合体AP-1 σ -1Bサブユニット) (ゴルジアダプターHA1/AP1アダプチン σ -1Bサブユニット) (クラスリン集合タンパク質複合体1 σ -1B小鎖) (AP-1クラスリンの σ -1Bサブユニット) (DC22) (配列番号38)	GTTTATTTGTAGTTTTGG (配列番号759)	20

【 0 3 7 9 】

【表 5 2】

345	アダプター関連タンパク質複合体1 σ -1Bサブユニット (σ -アダプチン1B) (アダプタータンパク質複合体AP-1 σ -1Bサブユニット) (ゴルジアダプターHA1/AP1アダプチン σ -1Bサブユニット) (クラスリン集合タンパク質複合体1 σ -1B小鎖) (AP-1クラスリンの σ -1Bサブユニット) (DC22) (配列番号38)	TGTAATCGTTTATTCGT (配列番号760)	30
346	アダプター関連タンパク質複合体1 σ -1Bサブユニット (σ -アダプチン1B) (アダプタータンパク質複合体AP-1 σ -1Bサブユニット) (ゴルジアダプターHA1/AP1アダプチン σ -1Bサブユニット) (クラスリン集合タンパク質複合体1 σ -1B小鎖) (AP-1クラスリンの σ -1Bサブユニット) (DC22) (配列番号38)	TAATTGTTTATTTGTAGTTT (配列番号761)	40
347	アダプター関連タンパク質複合体1 σ -1Bサブユニット (σ -アダプチン1B) (アダプタータンパク質複合体AP-1 σ -1Bサブユニット) (ゴルジアダプターHA1/AP1アダプチン σ -1Bサブユニット) (クラスリン集合タンパク質複合体1 σ -1B小鎖) (AP-1クラスリンの σ -1Bサブユニット) (DC22) (配列番号38)	TTCGAAGTCGGGATTA (配列番号762)	

【 0 3 8 0 】

【 表 5 3 】

348	アダプター関連タンパク質複合体1 σ -1Bサブユニット (σ -アダプチン1B) (アダプタータンパク質複合体AP-1 σ -1Bサブユニット) (ゴルジアダプターHA1/AP1アダプチン σ -1Bサブユニット) (クラスリン集合タンパク質複合体1 σ -1B小鎖) (AP-1クラスリンの σ -1Bサブユニット) (DC22) (配列番号38)	ATTTTGAAGTTGGGATT (配列番号763)	10
349	アダプター関連タンパク質複合体1 σ -1Bサブユニット (σ -アダプチン1B) (アダプタータンパク質複合体AP-1 σ -1Bサブユニット) (ゴルジアダプターHA1/AP1アダプチン σ -1Bサブユニット) (クラスリン集合タンパク質複合体1 σ -1B小鎖) (AP-1クラスリンの σ -1Bサブユニット) (DC22) (配列番号38)	ATCGAGTGATTTTGAAG (配列番号764)	
350	アダプター関連タンパク質複合体1 σ -1Bサブユニット (σ -アダプチン1B) (アダプタータンパク質複合体AP-1 σ -1Bサブユニット) (ゴルジアダプターHA1/AP1アダプチン σ -1Bサブユニット) (クラスリン集合タンパク質複合体1 σ -1B小鎖) (AP-1クラスリンの σ -1Bサブユニット) (DC22) (配列番号38)	GGATTGAGAGTATTTTGA (配列番号765)	20
351	(配列番号39)	TAAGCGGTATAAGTCGG (配列番号766)	
352	(配列番号39)	AGTGGTATAAGTTGGTT (配列番号767)	
353	(配列番号39)	TTCGTAAGCGGTATA (配列番号768)	
354	(配列番号39)	ATAATTTGGTAAGTGGTA (配列番号769)	30
355	(配列番号39)	TTCGTGATTTTACGTTA (配列番号770)	
356	(配列番号39)	AATTTTGTATTTTATGTT (配列番号771)	

【 0 3 8 1 】

【表 5 4】

357	(配列番号39)	TGGCGACGAAGTGTA (配列番号772)	
358	(配列番号39)	TTTGTGGTGATGAAGT (配列番号773)	
359	(配列番号40)	TAGCGGGTTTACGGAG (配列番号774)	
360	(配列番号40)	AGTACTGGGTTTATGG (配列番号775)	10
361	(配列番号40)	TAACGAGTCGACCGGA (配列番号776)	
362	(配列番号40)	AATGAGTTGAGTGGAG (配列番号777)	
363	(配列番号40)	TTTTCCGCGTAAGTT (配列番号778)	
364	(配列番号40)	TTTTTGTGTGAAGTTAA (配列番号779)	
365	(配列番号40)	TAGGACGATTCGGATA (配列番号780)	20
366	(配列番号40)	AGGATGATTTGGATAGT (配列番号781)	
367	(配列番号40)	TTCCAGTGAAAGCGGTA (配列番号782)	
368	(配列番号40)	TTTGAGTGAAAGTGGTA (配列番号783)	
369	ペリプラキン (195kDaコーニファイドエンベロー プ前駆体) (195kDa腫瘍随伴性天疱瘡抗原) (配列番号41)	TTACGTTTTTCGTGAAAT (配列番号784)	
370	ペリプラキン (195kDaコーニファイドエンベロー プ前駆体) (195kDa腫瘍随伴性天疱瘡抗原) (配列番号41)	TTTTATGTTTTTGTGAAAT (配列番号785)	30
371	ペリプラキン (195kDaコーニファイドエンベロー プ前駆体) (195kDa腫瘍随伴性天疱瘡抗原) (配列番号41)	GGGAGGACGTAGAGTA (配列番号786)	

【 0 3 8 2 】

【表 5 5】

372	ペリプラキン (195kDaコーニファイドエンベロ プ前駆体) (195kDa腫瘍随伴性天疱瘡抗原) (配列番号41)	GGGAGGATGTAGAGTA (配列番号787)
373	ペリプラキン (195kDaコーニファイドエンベロ プ前駆体) (195kDa腫瘍随伴性天疱瘡抗原) (配列番号41)	TGGGTTATCGTTTATATT (配列番号788)
374	ペリプラキン (195kDaコーニファイドエンベロ プ前駆体) (195kDa腫瘍随伴性天疱瘡抗原) (配列番号41)	TTGGGTTATTGTTTATATT (配列番号789)
375	ペリプラキン (195kDaコーニファイドエンベロ プ前駆体) (195kDa腫瘍随伴性天疱瘡抗原) (配列番号41)	TGGTATCGGTTTTTGA (配列番号790)
376	ペリプラキン (195kDaコーニファイドエンベロ プ前駆体) (195kDa腫瘍随伴性天疱瘡抗原) (配列番号41)	TGGTATTGGTTTTTGA (配列番号791)
377	ペリプラキン (195kDaコーニファイドエンベロ プ前駆体) (195kDa腫瘍随伴性天疱瘡抗原) (配列番号41)	GTTTAGGTTCCAGTTTA (配列番号792)
378	ペリプラキン (195kDaコーニファイドエンベロ プ前駆体) (195kDa腫瘍随伴性天疱瘡抗原) (配列番号41)	GGTTTAGGTTTGAGTTTA (配列番号793)
379	(配列番号42)	AGAATTGCGACGGTTT (配列番号794)
380	(配列番号42)	AATTGTGATGGTTTGT (配列番号795)
381	(配列番号42)	TTACGTTTATTTACGGG (配列番号796)
382	(配列番号42)	TATGTTTATTTATGGGGAT (配列番号797)
383	(配列番号42)	TGGATGTGCGGAAGAA (配列番号798)
384	(配列番号42)	GATGTGTGGAAGAAGT (配列番号799)

10

20

30

【 0 3 8 3 】

【表 5 6】

385	(配列番号42)	ATGGGTACGTTGTTTA (配列番号800)	
386	(配列番号42)	TATGGGTATGTTGTTTAT (配列番号801)	
387	(配列番号42)	GGATATTTGCGTTAGTA (配列番号802)	
388	(配列番号42)	GGATATTTGTGTTAGTATT (配列番号803)	10
389	(配列番号43)	GACGTGTTCCGGTTTTA (配列番号804)	
390	(配列番号43)	GATGTGTTTGGGTTTTA (配列番号805)	
391	(配列番号43)	AGTCGACGTTTGAGG (配列番号806)	
392	(配列番号43)	AGTTGATGTTTGAGG (配列番号807)	
393	(配列番号43)	TTATTGCGTTGTTAAGT (配列番号808)	20
394	(配列番号43)	GTTATTGTGTTGTTAAGT (配列番号809)	
395	(配列番号44)	ATTTAAACGGGTCGT (配列番号810)	
396	(配列番号44)	AATTTAAATGGGTTGT (配列番号811)	
397	(配列番号44)	ATCGGTTTTTTGTATCGAATA (配列番号812)	
398	(配列番号44)	ATTGGTTTTTTGTATTGAATA (配列番号813)	30
399	(配列番号44)	TTCGGCGTTTTTCGTAG (配列番号814)	
400	(配列番号44)	TGAAAGTTCGGCGTTT (配列番号815)	
401	(配列番号44)	TTTGGTGTGTTTGTAGG (配列番号816)	
402	(配列番号44)	ATCGGTTTTTCGAGGT (配列番号817)	
403	(配列番号45)	ATCGGTTTTTCGAGGT (配列番号818)	
404	(配列番号45)	ATTGGTTTTTTGAGGTT (配列番号819)	40

【 0 3 8 4 】

【表 5 7】

405	(配列番号45)	GGTCGATTTTCGCGTA (配列番号820)	
406	(配列番号45)	TGGTTGATTTTGTGTA (配列番号821)	
407	(配列番号46)	GGTAATTCGCGTATT (配列番号822)	
408	(配列番号46)	TTGGTAATTTGTGTATT (配列番号823)	10
409	(配列番号47)	TATGCGTATACGTGGT (配列番号824)	
410	(配列番号47)	ATGTTATATGTGGTTT (配列番号825)	
411	(配列番号47)	GTCGTTTTATCGGTAT (配列番号826)	
412	(配列番号47)	TGGTTGTTTTATGTGTAT (配列番号827)	
413	(配列番号47)	TGGTTGTTTTATGTGTAT (配列番号828)	20
414	(配列番号47)	ATTAGTTTTGAATTTTGT (配列番号829)	
415	(配列番号48)	TAGCGAGGTCGTTTT (配列番号830)	
416	(配列番号48)	TAGTGAGGTTGTTTT (配列番号831)	
417	(配列番号48)	TTAGTCCGTCGCGTA (配列番号832)	
418	(配列番号48)	AGGTTGTGTTGGTAGA (配列番号833)	
419	(配列番号48)	ATTCGTTTACGTCGT (配列番号834)	30
420	(配列番号48)	GGATTTGTTTATGTTGT (配列番号835)	
421	(配列番号48)	TTTTCGTATTCGGTA (配列番号836)	
422	(配列番号48)	TTTGTATTTGGTAAAAG (配列番号837)	
423	(配列番号48)	AGGATCCGGATTCGTA (配列番号838)	
424	(配列番号48)	AGGATTGGGATTTGTAG (配列番号839)	40

【 0 3 8 5 】

【表 5 8】

425	(配列番号48)	TTCGTTTAAGCGGGT (配列番号840)	
426	(配列番号48)	TTTGTTTAAGTGGGT (配列番号841)	
427	(配列番号49)	ATATTCGTGCGGTCGG (配列番号842)	
428	(配列番号49)	ATATTTGTGTGTTGGA (配列番号843)	10
429	(配列番号49)	TTAGGTCGTGGAATGT (配列番号844)	
430	(配列番号49)	TTAGGTTGTGGAATGT (配列番号845)	
431	(配列番号49)	AGGAATCGTGAGTAGG (配列番号846)	
432	(配列番号49)	AGGAATTGTGAGTAGG (配列番号847)	
433	DNA複製因子; ショウジョウバエdouble parked ホモログ (配列番号50)	TTCGATGTCGAGTCGG (配列番号848)	20
434	DNA複製因子; ショウジョウバエdouble parked ホモログ (配列番号50)	ATTTGATATTGAGTTGGT (配列番号849)	
435	DNA複製因子; ショウジョウバエdouble parked ホモログ (配列番号50)	ATTCGCGTTTTAACGT (配列番号850)	
436	DNA複製因子; ショウジョウバエdouble parked ホモログ (配列番号50)	TTTGTGTTTTAATGTGGA (配列番号851)	
437	DNA複製因子; ショウジョウバエdouble parked ホモログ (配列番号50)	TTCGTTGGGACGTAA (配列番号852)	30
438	DNA複製因子; ショウジョウバエdouble parked ホモログ (配列番号50)	TTTGGTTGGGATGTAA (配列番号853)	
439	DNA複製因子; ショウジョウバエdouble parked ホモログ (配列番号50)	TTAAGCGTTTAGCGA (配列番号854)	
440	DNA複製因子; ショウジョウバエdouble parked ホモログ (配列番号50)	TTTTAAGGTGTTAGTGA (配列番号855)	40

【 0 3 8 6 】

【表59】

441	PRドメインジンクフィンガータンパク質16 (転写因子MEL1) (配列番号51)	TATCGTCGAGTGTGTA (配列番号856)	
442	PRドメインジンクフィンガータンパク質16 (転写因子MEL1) (配列番号51)	GGGGTTATTGTTGAGT (配列番号857)	
443	PRドメインジンクフィンガータンパク質16 (転写因子MEL1) (配列番号51)	TATTATTCCGAGTTAGAGG (配列番号858)	10
444	PRドメインジンクフィンガータンパク質16 (転写因子MEL1) (配列番号51)	TTATTATTTGAGTTAGAGG (配列番号859)	
445	PRドメインジンクフィンガータンパク質16 (転写因子MEL1) (配列番号51)	AGGATTCCGTTGAAGAA (配列番号860)	
446	PRドメインジンクフィンガータンパク質16 (転写因子MEL1) (配列番号51)	GTAGGATTTGTTGAAGA (配列番号861)	20
447	PRドメインジンクフィンガータンパク質16 (転写因子MEL1) (配列番号51)	TTATTAGCGCATATTTTAA (配列番号862)	
448	PRドメインジンクフィンガータンパク質16 (転写因子MEL1) (配列番号51)	TATTAGGTGATATTTAAGT (配列番号863)	
449	腫瘍抑制サブトランスファラブル候補5; P45 Beckwith-Wiedemann領域1A; Beckwith-Wiedemann症候群染色体領域1、候補A; 異物排出輸送体様タンパク質; 有機カチオン輸送体様2; 腫瘍抑制STF CDNA 5; 刷り込まれた多数回膜貫通型多特異性輸送体関連タンパク質 (配列番号52)	TAGTACGTTGGTTCGG (配列番号864)	30

【0387】

【表 6 0】

450	腫瘍抑制サブトランスファラブル候補5; P45 Beckwith-Wiedemann領域1A; Beckwith-Wiedemann症候群染色体領域1、候補A; 異物排出輸送体様タンパク質; 有機カチオン輸送体様2; 腫瘍抑制STF CDNA 5; 刷り込まれた多数回膜貫通型多特異性輸送体関連タンパク質 (配列番号52)	TATGTTGGTTTGAGT (配列番号865)	
451	腫瘍抑制サブトランスファラブル候補5; P45 Beckwith-Wiedemann領域1A; Beckwith-Wiedemann症候群染色体領域1、候補A; 異物排出輸送体様タンパク質; 有機カチオン輸送体様2; 腫瘍抑制STF CDNA 5; 刷り込まれた多数回膜貫通型多特異性輸送体関連タンパク質 (配列番号52)	AGTTGTTTCGATGATTAG (配列番号866)	10
452	腫瘍抑制サブトランスファラブル候補5; P45 Beckwith-Wiedemann領域1A; Beckwith-Wiedemann症候群染色体領域1、候補A; 異物排出輸送体様タンパク質; 有機カチオン輸送体様2; 腫瘍抑制STF CDNA 5; 刷り込まれた多数回膜貫通型多特異性輸送体関連タンパク質 (配列番号52)	TTTAGTTGTTTGATGATTA (配列番号867)	20

【 0 3 8 8 】

【表 6 1】

453	腫瘍抑制サブトランスファラブル候補5; P45 Beckwith-Wiedemann領域1A; Beckwith-Wiedemann症候群染色体領域1、候補A; 異物排出輸送体様タンパク質; 有機カチオン輸送体様2; 腫瘍抑制STF CDNA 5; 刷り込まれた多数回膜貫通型多特異性輸送体関連タンパク質 (配列番号52)	AGATTAGTACGTTGGTT (配列番号868)	30
454	腫瘍抑制サブトランスファラブル候補5; P45 Beckwith-Wiedemann領域1A; Beckwith-Wiedemann症候群染色体領域1、候補A; 異物排出輸送体様タンパク質; 有機カチオン輸送体様2; 腫瘍抑制STF CDNA 5; 刷り込まれた多数回膜貫通型多特異性輸送体関連タンパク質 (配列番号52)	AAGATTAGTATGTTGGTT (配列番号869)	40
455	腫瘍抑制サブトランスファラブル候補5; P45 Beckwith-Wiedemann領域1A; Beckwith-Wiedemann症候群染色体領域1、候補A; 異物排出輸送体様タンパク質; 有機カチオン輸送体様2; 腫瘍抑制STF CDNA 5; 刷り込まれた多数回膜貫通型多特異性輸送体関連タンパク質 (配列番号52)	TTAAGCGGGGAGTTT (配列番号870)	

【 0 3 8 9 】

【表 6 2】

456	腫瘍抑制サブトランスフェラブル候補5; P45 Beckwith-Wiedemann領域1A; Beckwith-Wiedemann症候群染色体領域1、候補A; 異物排出輸送体様タンパク質; 有機カチオン輸送体様2; 腫瘍抑制STF CDNA 5; 刷り込まれた多数回膜貫通型多特異性輸送体関連タンパク質 (配列番号52)	GTTTAAAGTGGGAGT (配列番号871)	
457	腫瘍抑制サブトランスフェラブル候補5; P45 Beckwith-Wiedemann領域1A; Beckwith-Wiedemann症候群染色体領域1、候補A; 異物排出輸送体様タンパク質; 有機カチオン輸送体様2; 腫瘍抑制STF CDNA 5; 刷り込まれた多数回膜貫通型多特異性輸送体関連タンパク質 (配列番号52)	AGATGGTATCGTTAGG (配列番号872)	10
458	腫瘍抑制サブトランスフェラブル候補5; P45 Beckwith-Wiedemann領域1A; Beckwith-Wiedemann症候群染色体領域1、候補A; 異物排出輸送体様タンパク質; 有機カチオン輸送体様2; 腫瘍抑制STF CDNA 5; 刷り込まれた多数回膜貫通型多特異性輸送体関連タンパク質 (配列番号52)	ATGGTATTGTTAGGTG (配列番号873)	20
459	CDH1 (配列番号54)	TATCGCGTTTATGCCA (配列番号874)	
460	CDH1 (配列番号54)	ATTGTGTTTATGTGAGG (配列番号875)	
461	CDH1 (配列番号54)	TTATCGGAGGTCGGGT (配列番号876)	
462	CDH1 (配列番号54)	TTATGTGAGGTTGGGT (配列番号877)	
463	CDH1 (配列番号54)	TTAATTACGGTACGG (配列番号878)	30
464	CDH1 (配列番号54)	AATTAGTGGTATGGGG (配列番号879)	

【 0 3 9 0 】

【表 6 3】

465	CDH1 (配列番号54)	TAGTGGCGTCGGAATT (配列番号880)	
466	CDH1 (配列番号54)	TAGTGGTGTGGAATT (配列番号881)	
467	CDKN2a (配列番号55)	GCGGTTGTTAACGTAT (配列番号882)	
468	CDKN2a (配列番号55)	GGGTGTGTTAATGTA (配列番号883)	10
469	CDKN2a (配列番号55)	TGTTAACGTATCGAAT (配列番号884)	
470	CDKN2a (配列番号55)	GTTGTTAATGTATTGAAT (配列番号885)	
471	CDKN2a (配列番号55)	AATAGTTACGGTCGGA (配列番号886)	
472	CDKN2a (配列番号55)	AGTTATGGTTGAGGT (配列番号887)	
473	CDKN2a (配列番号55)	GTCGGAGGTCGATTTA (配列番号888)	20
474	CDKN2a (配列番号55)	GGTTCGAGTTGATTTA (配列番号889)	
475	CD44 (配列番号56)	AGGTATTCGCGATAT (配列番号890)	
476	CD44 (配列番号56)	AGGTATTTGTGATATTTT (配列番号891)	
477	CD44 (配列番号56)	TAGGTTGCGTTCGTTAT (配列番号892)	
478	CD44 (配列番号56)	TAGGTTTGGTTTGTATT (配列番号893)	
479	CD44 (配列番号56)	GTTGTTTCGATATTA (配列番号894)	30
480	CD44 (配列番号56)	TTTGTTCGATATTATGG (配列番号895)	
481	CD44 (配列番号56)	TTTGGCGTAGATCGGT (配列番号896)	
482	CD44 (配列番号56)	TTTGGGTAGATTGGT (配列番号897)	
483	CD44 (配列番号56)	TTTAGCGCGATTCCG (配列番号898)	
484	CD44 (配列番号56)	GTTTAGTGTGATTGG (配列番号899)	40

【 0 3 9 1 】

【表 6 4】

485	GSTP1 (配列番号57)	ATCGTTGCGATTTCCG (配列番号900)	
486	GSTP1 (配列番号57)	ATTGTTGTGATTTTGA (配列番号901)	
487	GSTP1 (配列番号57)	AGTGTCCGTAGCGAAT (配列番号902)	
488	GSTP1 (配列番号57)	GTGTGTAGTGAATTGG (配列番号903)	10
489	GSTP1 (配列番号57)	GAGTCGTCCGTAGTT (配列番号904)	
490	GSTP1 (配列番号57)	GGAGTTGTTGTAGTT (配列番号905)	
491	GSTP1 (配列番号57)	ATTTTCGTCCGTTTAG (配列番号906)	
492	GSTP1 (配列番号57)	GGATTTTTGTTGTTTTA (配列番号907)	
493	GSTP1 (配列番号57)	TTCGCGTTTTTCGAGT (配列番号908)	20
494	GSTP1 (配列番号57)	TTTGTGTTTTTGAGTT (配列番号909)	
495	GSTP1 (配列番号57)	TAGCGAAGTTTCGCGG (配列番号910)	
496	GSTP1 (配列番号57)	AGTGAAGTTTTGTGGT (配列番号911)	
497	GSTP1 (配列番号57)	GTCGCGGTATTTATT (配列番号912)	
498	GSTP1 (配列番号57)	GGGTTGTGTATTTAT (配列番号913)	30
499	IGF2 (配列番号58)	TACGTATAAAATTCGTATT (配列番号914)	
500	IGF2 (配列番号58)	AAATTATGTATAAAATTTGT (配列番号915)	
501	IGF2 (配列番号58)	ATAGACCGGAGTTCGG (配列番号916)	
502	IGF2 (配列番号58)	AGATGTGAGTTTGGTT (配列番号917)	
503	IGF2 (配列番号58)	TATCGGGTGCCTTA (配列番号918)	
504	IGF2 (配列番号58)	ATTGGGGTGTGTTAA (配列番号919)	40

【 0 3 9 2 】

【表 6 5】

505	IGF2 (配列番号58)	TTACGGAGGTTTCGGT (配列番号920)
506	IGF2 (配列番号58)	TTATGGTGGTTTTGGT (配列番号921)
507	AR (配列番号53)	TTATAGTCGTAGTCGGT (配列番号922)
508	AR (配列番号53)	AGTTGTAGTTGGTTTTG (配列番号923)
509	AR (配列番号53)	GTCGTGGTCGTTAGTA (配列番号924)
510	AR (配列番号53)	GTTGTGGTTGTTAGTAA (配列番号925)
511	AR (配列番号53)	TATTTTCGGACGAGGA (配列番号926)
512	AR (配列番号53)	AGTATTTTGGATGAGG (配列番号927)

10

20

【 0 3 9 3 】

実施例4

次の分析では、次の表10に記載の遺伝子のメチル化状態を、表10に記載のプライマーを使用するMSP(メチル化特異的PCR)法により分析した。

【 0 3 9 4 】

この研究は前立腺がん、BHPの各組織サンプル50個を対象に行った。ゲノムDNAは亜硫酸水素塩法で処理した後にMSP法で分析した。この処理により、非メチル化シトシンはウラシルに変換されたが、メチル化シトシンはそのままに留まった。亜硫酸水素塩処理はOlek et al. (1996)で開示されているプロトコールに若干の変更を加えて行った。次いで、メチル化特異的プライマーを用いて関心配列を増幅し、増幅産物をTaqmanプローブ(表10)により検出した。

30

【 0 3 9 5 】

【表66】

表10

ゲノム 配列番号	プライマー	プライマー	Taqmanプローブ
20	cgcgctactccgcataca (配列番号958)	gaggtaatcgagcggtcg (配列番号959)	/56-FAM/cgccaattcatagc ccgcacc /3BHQ (配列番号960)
36	accgaaaatagccttcacg (配列番号961)	gcgttatcgtaaagtattgcgc (配列番号962)	/56-FAM/cgcgacgaacaaa acgccg/3BHQ_1/ (配列番号963)
36	gcgtttttagctcgtcgcg (配列番号964)	gcgttatcgtaaagtattgcgc (配列番号965)	/56-FAM/ccgaccatccgacg ccttactcg/3BHQ_1/ (配列番号966)
51	cgaatttataccgaacgctcc tagc (配列番号967)	aggttacggaggtcgaggtcg (配列番号968)	56-FAM/cccgccatcgaccgtt cccgacccta/3BHQ_1/ (配列番号969)
51	tcccgaaattataccgaacg (配列番号970)	ttttatttaggggtcggaac (配列番号971)	56-FAM/acgccccccatcga ccg/3BHQ_1/ (配列番号972)
24	tigtggttcggaagagac (配列番号973)	cttcgatcgaaaaaacg (配列番号974)	56-FAM/aactacgcaaac cgca/3BHQ_1/ (配列番号975)
31	cgttttttagcttttatttcgc (配列番号976)	gacaaaaaacgccagtc (配列番号977)	56-FAM/ccgacaattcaccga atcaccg/3BHQ_1/ (配列番号978)
11	atctcacctaccgtcgcg (配列番号979)	taggagtcgatcgtttgc (配列番号980)	56-FAM/acgaacgttagcacc gataccaacta /3BHQ_1/ (配列番号981)
4	aacgtatcccgacaatccg (配列番号982)	gagtatttaaggtttagtg aaacgttagc (配列番号983)	56-FAM/caaataacgacac taaacgcataattc /3BHQ_1/ (配列番号984)
4	tgttttcggagtcgcttc (配列番号985)	aaatcaaaccgacgatacga (配列番号986)	56-FAM/ccgataaacgcgctc caaaccg/3BHQ_1/ (配列番号987)

10

20

30

【0396】

用語「BHQ」はBlack Hole Quencher(BHQ(登録商標))色素を意味し、また「FAM」は常用の蛍光色素である。

40

【0397】

試薬:

MSP法の確立と鑄型の増幅には標準的な試薬/サイクル条件を使用する。標準条件の概要は表11および12に示す。生体サンプルに取り掛かる前に、100ピコグラムの完全メチル化DNAを陽性対照として、また100ナノグラムの非メチル化DNAを陰性対照として、それぞれ使用して、アンプリコンを作製した。また、50ngの非メチル化DNAをバックグラウンドに50pgのメチル化DNAを使用して、相対感度の点から反応条件もチェックした。試薬濃度は表11のとおりであり、ABI 7700で使用されるサイクル条件は表12のとおりである。

【0398】

50

【表 6 7】

表11: 試薬濃度

試薬	原液濃度 (μM)	最終使用濃度 (nM)	MM濃度 (μM)	MM容量 (μL)
順方向	10.0	500.0	3.33	35.0
逆方向	10.0	500.0	3.33	35.0
プローブ	100.0	400.0	2.67	2.8
水	-			32.8
Taqmix	-			245.0
合計	-			350.0

10

【 0 3 9 9 】

【表 6 8】

表12: サイクル条件

温度 ($^{\circ}\text{C}$)	時間 (秒)	サイクル数
変性		1
95	600	
アニーリング		50
95	10	
60または63	45	

20

【 0 4 0 0 】

データの分析

教師付き学習によるクラス予測

30

【 0 4 0 1 】

異なる組織クラスを特定マーカーのCpGアンサンプルがどこまでうまく弁別しうるかについて確かな推定を下すためには、その予測精度をクラス分類によって決定することができる。その目的のために、メチル化プロファイルに基づく予測関数を、固有のクラス標識を付けたある種の組織サンプルセットを使用して計算した。このステップはトレーニングといい、データ標識によって表される事前知識を利用する。次いで独立サンプルセットを対象に、該関数の予測精度を検定した。好ましい方法として、予測関数の学習にはサポートベクターマシン(SVM)アルゴリズムを使用した(たとえばCristiannini, N. and Shawe-Taylor, J., An introduction to support vector machines, Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2000; Duda, R.O., Hart, P. E., and Stock, D.G., Pattern Classification, New York: John Wiley & Sons, 2001を参照)。この分析では感度と特異度のウェイトを等しくした。これを実現するには、偽陽性および偽陰性のクラス分類に付随するリスクをそれぞれのクラスサイズと反比例するように設定することができる。生成する分類子の感度と特異度はほぼ等しくなると予測しうる。このウェイト付けは臨床条件に応じて調節することができる。

40

【 0 4 0 2 】

結果

該マーカーの感度と特異度を求めるために、定期済みのパラメーターを使用して前立腺がん、BHPの各50サンプルをスクリーニングした。サンプルはメチル化DNA対非メチル化DN

50

Aの技術的な基準に従ってプレスクリーニングしておいたものである。MethyLightリアルタイムPCR法によるアッセイを、メチル化DNAに対して特異的であり、通常の非メチル化DNAは増幅しないことを確認したうえで、TaqManプラットフォーム(ABI7900)で行った。最終的なアッセイ成績は表13のとおりである。AUCと対応する感度および特異度の値はSVMアルゴリズムを使用して計算した。

【0403】

【表69】

表13

遺伝子の名前	ゲノム配列番号	AUC	感度	特異度
プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ	20	0.921	0.829	0.871
ヒストンH4	36	0.918	0.88	0.719
PR-ドメイン ジンクフィンガータンパク質16	51	0.871	0.768	0.822
オーファン核受容体NR5A2	24	0.859	0.694	0.878
LIMドメインキナーゼ1	31	0.868	0.791	0.755
ゲノム領域	11	0.842	0.815	0.704
LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9	4	0.745	0.695	0.653

【0404】

実施例5

以下の研究の目的は、種々の体液サンプル中の前立腺がんマーカーのメチル化状態を分析し、好ましい選択肢の体液サンプル(尿か血清か)、好ましいマーカー、マーカー類またはマーカーの組み合わせを特定することであった。研究には、種々の人種(コーカシアン、アフリカ系アメリカンなど)を代表する平均年齢65歳の患者80人に由来する、対応付けした血清および尿沈渣サンプルを使用した。いずれの場合も、ゲノムDNAを亜硫酸水素塩で処理した後にHeavyMethyl法またはMSP法で分析した。

【0405】

尿沈渣は次の要領で分析用に調製し、亜硫酸水素塩で処理した：

- ・ Magnapure DNA抽出キットを使用して200uLの尿沈渣を溶出液量100uLに精製した
- ・ Magnapure溶出液を対象に5uL HD6 PCRを行い、DNA濃度を求めた
- ・ DNA溶液100uLを、亜硫酸水素塩法で処理した
- ・ 10uL C3亜硫酸水素塩処理特異的定量的PCR
- ・ 5uLの「Merck亜硫酸塩テスト」

血清は次の要領で分析用に調製し、亜硫酸水素塩で処理した：

- ・ Magnapure DNA Large Volume Total核酸を使用して1mLの血清サンプルを溶出液量100uLに精製した
- ・ Magnapure溶出液を対象に5uL HD6 PCRを行い、DNA濃度を求めた
- ・ DNA溶液100uLを、独自の亜硫酸水素塩法で処理した
- ・ 10uL C3亜硫酸水素塩処理特異的定量的PCR
- ・ 5uLの「Merck亜硫酸塩テスト」

HD6は非亜硫酸水素塩変換DNAを増幅するゲノムアッセイである。抽出後のDNAの定量に使用する。 グロブリン遺伝子特異的である。

【0406】

C3はGSTP1遺伝子のエクソン4の近傍に位置する亜硫酸水素塩特異的アッセイである。亜硫酸水素塩変換DNAの定量にも使用される発明者らのHB14アッセイと同じ要領で使用した。

【0407】

どちらのアッセイも標準曲線を使用する必要があり、増幅曲線の位置と対応する濃度からDNAサンプルの定量値を求める。

10

20

30

40

50

【0408】

後述の要領で、各マーカーにつきサンプルあたり10uLの亜硫酸水素塩処理DNAを対象に1回のPCRを行った。

【0409】

GSTP1遺伝子のHeavyMethylアッセイ

【0410】

ここでは、次の表1に記載のプライマーを使用したメチル化特異的増幅法により遺伝子GSTP1のメチル化状態を分析した。

【0411】

関心配列の増幅にはメチル化特異的プライマーと、非メチル化DNAの非特異的増幅を抑えるためのブロッカーオリゴヌクレオチドとを使用する。次いで、メチル化特異的Lightcyclerプローブにより増幅産物を検出する。

【0412】

【表70】

表14: GSTP1のHeavyMethyl (登録商標)-Lightcycler (登録商標) 分析に使用するオリゴヌクレオチド

配列番号	配列	タイプ
988	gggattatTTTTATAAGGTT	プライマー
989	ctctaaaccccatcccc	プライマー
990	cccatccccaaaaacacaaaccac	ブロッカー
991	CGtCGtCGtAGTtTTCGtt-fluo	プローブ
992	red640-tAGTGAGTACGCGCGGtt-pho	プローブ

【0413】

反応条件:

PCRプログラム

95 での変性処理

95 10分

50サイクル 勾配

95 での変性処理 10秒(1 /秒)

56 でのアニーリング 30秒(1 /秒) 検出

72 での鎖伸長 10秒(1 /秒)

【0414】

遺伝子「ヒストンH4」のMSP分析

ここでは、次の表15に記載のプライマーを使用したメチル化特異的増幅法により遺伝子「ヒストンH4」のメチル化状態を分析した。

【0415】

関心配列の増幅にはメチル化特異的プライマーを使用し、次いでメチル化特異的Taqmanプローブにより増幅産物を検出する。

【0416】

【表 7 1】

表15: MSP用オリゴヌクレオチドー「ヒストンH4」のTaqman分析

配列番号	配列	タイプ
993	accgaaaatacgcttcacg	プライマー
994	gcgttatcgtaaagtattgcgc	プライマー
995	/56-FAM/cgcgaacaaaacgccg/3BHQ_1/	プローブ

10

【 0 4 1 7 】

反応条件:

PCRプログラム

95 での変性処理

95 10分

50サイクル

勾配

95 での変性処理 10秒(20 /秒)

60 でのアニーリング 45秒(20 /秒) 検出

【 0 4 1 8 】

遺伝子「プロスタグランジンE2受容体」のMSP分析

ここでは、次の表16に記載のプライマーを使用したメチル化特異的増幅法により遺伝子「プロスタグランジンE2受容体」のメチル化状態を分析した。

20

【 0 4 1 9 】

関心配列の増幅にはメチル化特異的プライマーを使用し、次いでメチル化特異的Taqmanプローブにより増幅産物を検出する。

【 0 4 2 0 】

【表 7 2】

表16A: MSP用オリゴヌクレオチドー「プロスタグランジンE2受容体」のTaqman分析

配列番号	配列	タイプ
996	cgcgctactccgcataca	プライマー
997	gaggtaatcgaggcggctcg	プライマー
998	/56-FAM/cgccaattcatatcgccgcacc/3BHQ_1/	プローブ

30

【 0 4 2 1 】

PCRプログラム

95 での変性処理

95 10分

50サイクル

勾配

95 での変性処理 10秒(20 /秒)

60 でのアニーリング 45秒(20 /秒) 検出

遺伝子「オーファン核受容体NR5A2」のMSP分析

ここでは、次の表16に記載のプライマーを使用したメチル化特異的増幅法により遺伝子「オーファン核受容体NR5A2」のメチル化状態を分析した。

40

【 0 4 2 2 】

関心配列の増幅にはメチル化特異的プライマーを使用し、次いでメチル化特異的Taqmanプローブにより増幅産物を検出する。

【 0 4 2 3 】

50

【表 7 3】

表16B: MSP用オリゴヌクレオチド-「オーファン核受容体NR5A2」のTaqman分析

配列番号	配列	タイプ
999	ttgtggttcgggaagagac	プライマー
1000	tcccgaactcttcgatcg	プライマー
1001	aactacgcgcaaacccgcga	プローブ

10

【 0 4 2 4 】

PCRプログラム

95 での変性処理

95 10分

50サイクル

勾配

95 での変性処理 10秒(20 /秒)

60 でのアニーリング 45秒(20 /秒) 検出

【 0 4 2 5 】

マーカー分析

C3亜硫酸水素塩特異的PCRを用いて、結果をそれぞれ、増幅の+/-評価により定性的に、また全DNAに占めるメチル化DNAの比率の決定により定量的に、分析した。各アッセイでは全メチル化DNAを測定するために、100%メチル化標準(Chemicon SSS1処理DNA)曲線を使用した。

20

【 0 4 2 6 】

結果

【 0 4 2 7 】

各マーカーについて、アッセイの受診者動作特性曲線(ROC曲線)を決定した。ROCは診断検査法で種々の可能なカットオフポイントに対応する真陽性率と偽陽性率の関係を示す曲線である。そこでは採用するカットオフポイントに応じた感度と特異度の間のトレードオフ関係が示される(感度の上昇には必ず特異度の低下を伴う)。ROC曲線下面積(AUC)は診断検査法の精度の尺度である(AUCは大きければ大きいほどよく、至適値は1である。無作為検査では面積が0.5になる対角線の上にROC曲線が重なる; J.P. Egan, Signal Detection Theory and ROC Analysis, Academic Press, New York, 1975を参照)。

30

【 0 4 2 8 】

得られたAUCの値:

血清:

マーカー: HeavyMethyl GSTP1

AUC: 0.51

マーカー: MSP ヒストンH4

AUC: 0.59

マーカー: MSP プロスタグランジンE2受容体

AUC: 0.52

マーカー: MSP オーファン核受容体NR5A2

AUC: 0.50

尿:

マーカー: HeavyMethyl GSTP1

AUC: 0.58

マーカー: MSP ヒストンH4

AUC: 0.5

40

【 0 4 2 9 】

50

マーカー：MSP プロスタグランジンE2受容体

AUC： 0.49

マーカー：MSP オーファン核受容体NR5A2

AUC： 0.56

【 0 4 3 0 】

前立腺がんを正確に発見するには、複数のマーカー(すなわち遺伝子パネル)の総合的な分析を行うのが好ましい。尿系サンプルの分析では、マーカーの好ましい組み合わせはGSTP1、「プロスタグランジンE2受容体」および「オーファン核受容体NR5A2」の組み合わせである(感度0.37、特異度0.72)。血清系サンプルの分析では、好ましい組み合わせはGSTP1、「ヒストンH4」および「オーファン核受容体NR5A2」の組み合わせである(感度0.35、特異度0.75)。

10

【 0 4 3 1 】

表18に記載の遺伝子のMSP分析

【 0 4 3 2 】

ここでは、表18に記載の特定遺伝子のメチル化状態を、次の表6に記載のプライマーおよびプローブを使用したMSP TaqManアッセイ法で分析した。

【 0 4 3 3 】

使用したサンプルの内訳は前立腺がん腫組織×10、良性前立腺肥大(BPH)組織×10、および正常前立腺組織×5であった。ゲノムDNAは亜硫酸水素塩処理後にMSP法で分析した。すべてのサンプルの全ゲノムDNAを亜硫酸水素塩処理すると、非メチル化シトシンはウラシルに変換された。メチル化シトシンはそのままに留まった。亜硫酸水素塩処理はOlek et al. (1996)で開示されているプロトコールに若干の変更を加えて行った。

20

【 0 4 3 4 】

次いで、亜硫酸水素塩処理DNAに対して特異的なプライマーを用いて関心配列を増幅し、TaqManおよび/またはLightcyclerプラットフォームを用いてTaqmanプローブにより増幅産物を検出した。結果を次の表20に示す。

【 0 4 3 5 】

試薬とサイクル条件は次のとおりであった：

【 0 4 3 6 】

【表 7 4】

配列番号20

試薬	終濃度
順方向プライマー	0.5 μ M
逆方向プライマー	0.5 μ M
プローブ	0.4 μ M
MgCl	2.5mM
FastStart	1×
水	-
鋳型	-
合計	-

10

温度 (°C)	時間 (秒)	勾配 (°C/秒)	回収 ?	サイクル数
変性				1
95	600	20		
アニーリング				50
95	10	20		
60	45	20	単回	
冷却				1
40	30	20		

20

【 0 4 3 7 】

【表 7 5】

配列番号36

試薬	MM容量 (μ L)
順方向プライマー	35.0
逆方向プライマー	35.0
プローブ	2.8
水	32.2
Taqmix	245.0
合計	350.0

30

温度 (°C)	時間 (秒)	サイクル数
変性		1
95	600	
アニーリング		50
95	10	
60	45	

40

【 0 4 3 8 】

【表 7 6】

配列番号31

試薬	終濃度
順方向プライマー	0.5 μ M
逆方向プライマー	0.5 μ M
プローブ	0.4 μ M
MgCl	2.5mM
FastStart	1×
水	-
鋳型	-
合計	-

10

温度 (°C)	時間 (秒)	勾配 (°C/秒)	回収 ?	サイクル数
変性				1
95	600	20		
アニーリング				50
95	10	20		
60	45	20	単回	
冷却				1
40	30	20		

20

【 0 4 3 9 】

【表 7 7】

配列番号11

試薬	MM容量 (uL)
順方向プライマー	35.0
逆方向プライマー	35.0
プローブ	2.8
水	32.2
Taqmix	245.0
合計	350.0

30

温度 (°C)	時間 (秒)	サイクル数
変性		1
95	600	
アニーリング		50
95	10	
60	45	

40

【 0 4 4 0 】

【表78】

表19

ゲノム 配列番号	順方向プライマー 配列番号	逆方向プライマー 配列番号	プローブ 配列番号
20	1002	1003	1004
36 (アッセイ4)	1005	1006	1007
36 (アッセイ1)	1008	1009	1010
31	1011	1012	1013
11	1014	1015	1016

10

【0441】

【表79】

表20

ゲノム配列番号	感度 (%)	特異度
20	70	88
36 (アッセイ1)	60	94
31	80	80
11	80	79
36 (アッセイ4)	60	98

20

【0442】

実施例6

はじめに

30

【0443】

GSTP1遺伝子は解析が最も進んでいる前立腺診断メチル化マーカーの1つである。以下の研究は、GSTP1の異常メチル化を示さないような前立腺がんを弁別しうる前立腺診断メチル化マーカーの特定が狙いである。特定されるマーカーは、前立腺がんの診断および/または検査のための、GSTP1を含む遺伝子パネルのメンバーとして特に有用であろうと期待される。

【0444】

全ゲノム的なメチル化分析実験により、GSTP1遺伝子では異なるDNAメチル化プロファイルを示すような、前立腺がんサブタイプ間でメチル化差異を生じる配列候補を特定するようにした。この研究には全ゲノム的なメチル化分析法であるAP-PCRおよびMCAを使用した。実験計画に記載の要領で、AP-PCR法で2件の比較を、MCA法で3件の比較を、それぞれ行った。

40

【0445】

比較は実施例1に記載のプロトコールに従って行った。

実験計画

この研究には次の4サンプルプールを使用した。

【0446】

【表 8 0】

プール #	サンプルの種類	プール略称	サンプル数	所見
1	前立腺がんGSTP1陽性	GSTP1 (+)	12	APPCRとMCAに使用
2	前立腺がんGSTP1陰性	GSTP1 (-)	2	APPCRとMCAに使用
3	前立腺がんGSTP1陰性	GSTP1 (-)	4	MCA だけに使用

10

【 0 4 4 7】

AP-PCRでは、3サンプルプール(プール# 1、2および4)を実験し、多重比較が行えるようにした。次の3件の比較を行ったGSTP1(+)対GSTP1(-)、GSTP1(+)対GSTP1(?)およびGSTP1(-)対GSTP1(?)。同じゲル上で同じ泳動速度を示したバンドは、メチル化差異があっても同じ配列を有するものとみなし、従って1回だけクローニングし、配列分析した。しかし、メチル化差異のあるどのバンドにも一意のMeST IDを割り当てた。

【 0 4 4 8】

MCAでは2件の比較を行った。どちらの比較でもGSTP1(+)サンプルプール(プール# 1)をテスターとして、GSTP1(-)サンプルプール(プール#2またはプール#3)をドライバーとして、使用した。

20

【 0 4 4 9】

実験結果の要約

- ・ 96の非重複、メチル化差異配列が特定された
 - ・ 96配列のうち39配列はAP-PCR法によって特定された
 - ・ 96配列のうち57配列はMCA法によって特定された
 - ・ 非重複、メチル化差異配列のうち61配列は評点が0以上であった
- 両法を使用して現れた配列はなかった

30

方法別の評点:

【 0 4 5 0】

【表 8 1】

4	前立腺がんGSTP1発現の可能性あり		GSTP1 (?)	2	APPCRだけに使用	
評点	0	1	2	3	4	5
AP-PCR	0	9	10	10	4	2
MCA	2	13	9	1	1	1
合計	2	22	19	11	4	3

40

【 0 4 5 1】

メチル化差異を示す興味深い候補配列

96の非重複、メチル化差異配列の評価には次のパラメーターを使用した:

%反復配列 - メチル化差異配列の3' または5' 側1000bp隣接領域内の反復配列の百分率;

50

%CpG島 - メチル化差異配列の上流、下流いずれかの側に隣接するCpG島の百分率；
 プロモーター内 - メチル化差異配列がエクソン1の上流5000bp内に認められる；
 遺伝子内 - メチル化差異配列が隣接エクソン間のどこかに認められる。

【0452】

これらの配列のうち、配列番号1017～1028を選別してさらに分析したが、特に興味深いのは配列番号1023であった。配列番号1017～1028は、次の実施例7に記載の高感度アッセイでさらに詳しく調べた。

【0453】

実施例7

はじめに

ここでは、表21に記載の遺伝子のメチル化状態を、実施例4に記載の方法とサンプルを使用するメチル化特異的PCR法で分析した。

【0454】

この研究は前立腺がん、BHPの各組織サンプル50個を対象に行った。ゲノムDNAは亜硫酸水素塩法で処理した後にMSP法で分析した。この処理により、非メチル化シトシンはウラシルに変換されたが、メチル化シトシンはそのままに留まった。亜硫酸水素塩処理はOlek et al. (1996)で開示されているプロトコールに若干の変更を加えて行った。次いで、メチル化特異的プライマーを用いて関心配列を増幅し、増幅産物をTaqmanプローブ(表21を参照)により検出した。

【0455】

【表82】

表21

ゲノム配列番号	順方向プライマー配列番号	逆方向プライマー配列番号	プローブ配列番号
1017	1077	1078	1079
1024	1080	1081	1082
1027	1083	1084	1085
1018	1086	1087	1088
1019	1089	1090	1091
1021	1092	1093	1094
1023	1095	1096	1097
1023	1098	1099	1100
1025	1101	1102	1103
1028	1104	1105	1106
1026	1107	1108	1109
1020	1110	1111	1112
1116	1113	1114	1115
18	1179	1180	1181

【0456】

結果：

使用した統計手法は実施例4で説明したとおりである。

【0457】

【表 8 3】

表24: MSPアッセイの感度と特異度

遺伝子	ROC AUC	SVM 精度	SVM 感度	SVM 特異度
配列番号1023	0.953	0.898	0.888	0.908
RASSF1a, Nelson	0.903	0.828	0.800	0.857
配列番号1028	0.809	0.763	0.742	0.783
配列番号1113	0.629	0.561	0.527	0.597
配列番号1025	0.579	0.561	0.240	0.896
配列番号1020	0.561	0.567	0.599	0.534
配列番号1019	0.532	0.527	0.869	0.171
配列番号1027	0.512	0.499	0.895	0.088
配列番号18	0.533	0.491	0.803	0.167

【 0 4 5 8 】

実施例8

パネル

実施例1～7から推測したアッセイ成績で見た最優良マーカーを表25に示す。

前立腺がんの発見という点でのマーカーの性能を最大限に高めるために、実施例4および7に記載のMSPアッセイ済みマーカーを2遺伝子および3遺伝子からなる遺伝子パネルとして組み合わせた。表22～24はMSPアッセイ済みマーカーの組み合わせの前立腺がん発見における感度と特異度を示す。

【 0 4 5 9 】

【表 8 4】

表22: 2マーカーを組み合わせたMSPアッセイの前立腺がんの感度と特異度

マーカー1	マーカー2	感度	特異度
配列番号1023	配列番号57	0.860	0.967
配列番号1023	配列番号20	0.864	0.948
配列番号1023	配列番号4	0.864	0.935
配列番号1028	配列番号1023	0.860	0.938
配列番号1116	配列番号1023	0.860	0.938
配列番号1027	配列番号1023	0.860	0.938
配列番号1019	配列番号1023	0.860	0.938
配列番号1020	配列番号1023	0.860	0.938
配列番号1023	配列番号1025	0.860	0.938
配列番号1023	配列番号11	0.860	0.938
配列番号1023	配列番号24	0.860	0.938
配列番号1023	配列番号18	0.860	0.938
配列番号1023	配列番号31	0.864	0.933
配列番号1023	配列番号35	0.880	0.917
配列番号20	配列番号57	0.812	0.978

10

20

30

40

50

【 0 4 6 0 】

【 表 8 5 】

表23: 3マーカーを組み合わせたMSPアッセイの前立腺がんの感度と特異度

マーカー1	マーカー2	マーカー3	感度	特異度
配列番号1023	配列番号18	配列番号57	0.86	0.97916667
配列番号1023	配列番号4	配列番号57	0.86	0.97826087
配列番号1116	配列番号1023	配列番号57	0.86	0.975
配列番号1020	配列番号1023	配列番号57	0.864	0.97083333
配列番号1028	配列番号1023	配列番号57	0.86	0.97083333
配列番号1027	配列番号1023	配列番号57	0.864	0.96666667
配列番号1023	配列番号57	RASSF1a	0.86	0.97021277
配列番号1019	配列番号1023	配列番号57	0.86	0.96666667
配列番号1023	配列番号31	配列番号57	0.864	0.9625
配列番号1019	配列番号1023	配列番号20	0.868	0.95652174
配列番号1023	配列番号20	配列番号4	0.88	0.94347826
配列番号1023	配列番号1025	配列番号57	0.852	0.97083333
配列番号1023	配列番号51	配列番号57	0.86	0.9625
配列番号1023	配列番号20	配列番号57	0.86	0.96086957
配列番号1020	配列番号1023	配列番号20	0.868	0.95217391

10

20

【 0 4 6 1 】

実施例9

前記MSPアッセイ法の代替アッセイ法としてHeavyMethylアッセイ法をさらに確立した。
使用プライマーおよびプロッカーを表24に示す。

【 0 4 6 2 】

【表 8 6】

表24: HeavyMethylアッセイ法の構成要素

マーカー	プライマー 配列番号	プライマー 配列番号	ブロッカー 配列番号	プローブ 配列番号	プローブ 配列番号
GSTP1 (アッセイ1)	1121	1122	1123	1124	1125
GSTP1 (アッセイ2)	1126	1127	1128	1129	1130
GSTP1 (アッセイ3)	1131	1132	1133	1134	1135
GSTP1 (アッセイ4)	1136	1137	1138	1139	1140
配列番号20 (アッセイ1)	1141	1142	1143	1144	1145
配列番号20 (アッセイ2)	1146	1147	1148	1149	1150
配列番号24 (アッセイ1)	1151	1152	1153	1154	1155
配列番号24 (アッセイ2)	1156	1157	1158	1159	1160
配列番号24 (アッセイ3)	1161	1162	1163	1164	1165
配列番号36 (アッセイ1)	1166	1167	1168	1169	1170

10

20

【 0 4 6 3 】

GSTP1 LightCyclerプログラム:

活性化: 95 10分

50サイクル:

95 10秒(20 /秒)

56 30秒(20 /秒)

72 10秒(20 /秒) 検出

融解曲線:

95 10秒 20

40 10秒 20

70 0秒 0.1

冷却: 40 5秒

30

40

【 0 4 6 4 】

配列番号20、配列番号24および配列番号36 LightCyclerプログラム:

活性化: 95 10分

55サイクル:

95 10秒(20 /秒)

56 30秒(20 /秒)

72 10秒(20 /秒) 検出

融解:

95 10秒 20

35 20秒 20 検出

50

95 0秒 0.1

【0465】

【表87】

表25

マーカー	ROC AUC	AUC 標準誤差	SVM 精度	SVM 感度	SVM 特異度
配列番号1023	0.953	0.000	0.898	0.888	0.908
GSTP1	0.932	0.001	0.928	0.892	0.965
プロスタグランジンE2受容体	0.921	0.001	0.849	0.829	0.871
ヒストンH4	0.918	0.001	0.801	0.880	0.719
RASSF1a	0.903	0.001	0.828	0.800	0.857
PRドメインジंकフィンガー タンパク質16	0.871	0.001	0.794	0.768	0.822
LIMドメインキナーゼ1	0.868	0.001	0.773	0.791	0.755
オーファン核受容体NR5A2	0.859	0.001	0.784	0.694	0.878
配列番号11	0.842	0.002	0.761	0.815	0.704
配列番号1028	0.809	0.002	0.762	0.742	0.783
LIM/ホメオボックスタンパク質 LHX9	0.745	0.003	0.675	0.659	0.653
配列番号1116	0.629	0.003	0.561	0.527	0.597
配列番号1025	0.579	0.001	0.561	0.240	0.896
配列番号1020	0.561	0.003	0.567	0.599	0.534
リソソーム関連 多数回膜貫通タンパク質	0.533	0.004	0.491	0.803	0.167
配列番号1019	0.532	0.004	0.527	0.869	0.171
配列番号1027	0.512	0.001	0.499	0.895	0.088

10

20

30

【0466】

【表 8 8】

表26: 本発明の遺伝子および配列

遺伝子 ref seq ID	配列番号				
	ゲノム	メチル化 変換センス鎖	メチル化変換 アンチセンス鎖	非メチル化 変換センス鎖	非メチル化変換 アンチセンス鎖
ゲノム配列	1	60	61	178	179
ゲノム配列	2	62	63	180	181
ゲノム配列	3	64	65	182	183
NM_014242	4	66	67	184	185
ゲノム配列	5	68	69	186	187
ゲノム配列	6	70	71	188	189
ゲノム配列	7	72	73	190	191
NM_003352	8	74	75	192	193
NM_003458	9	76	77	194	195
ゲノム配列	10	78	79	196	197
ゲノム配列	11	80	81	198	199
ゲノム配列	12	82	83	200	201
NM_013312	13	84	85	202	203
ゲノム配列	14	86	87	204	205
ゲノム配列	15	88	89	206	207
ゲノム配列	16	90	91	208	209
ゲノム配列	17	92	93	210	211
NM_006762	18	94	95	212	213
NM_005539	19	96	97	214	215
NM_000958	20	98	99	216	217
ゲノム配列	21	100	101	218	219
ゲノム配列	22	102	103	220	221
NM_004955	23	104	105	222	223
NM_003822	24	106	107	224	225
NM_032526	25	108	109	226	227
ゲノム配列	26	110	111	228	229
ゲノム配列	27	112	113	230	231
ゲノム配列	28	114	115	232	233
NM_004565	29	116	117	234	235
NM_156037	30	118	119	236	237
NM_002314	31	120	121	238	239
NM_021642	32	122	123	240	241
NM_020132	33	124	125	242	243
NM_133267	34	126	127	244	245

【 0 4 6 7 】

【表 8 9】

遺伝子 ref seq ID	配列番号				
	ゲノム	メチル化 変換センス鎖	メチル化変換 アンチセンス鎖	非メチル化 変換センス鎖	非メチル化変換 アンチセンス鎖
ゲノム配列	35	128	129	246	247
NM_003495	36	130	131	248	249
NM_004518	37	132	133	250	251
NM_003916	38	134	135	252	253
ゲノム配列	39	136	137	254	255
ゲノム配列	40	138	139	256	257
NM_002705	41	140	141	258	259
ゲノム配列	42	142	143	260	261
ゲノム配列	43	144	145	262	263
ゲノム配列	44	146	147	264	265
ゲノム配列	45	148	149	266	267
ゲノム配列	46	150	151	268	269
ゲノム配列	47	152	153	270	271
ゲノム配列	48	154	155	272	273
ゲノム配列	49	156	157	274	275
NM_030928	50	158	169	276	277
NM_022114	51	160	161	278	279
NM_002555	52	162	163	280	281
NM_000044	53	164	165	282	283
NM_004360	54	166	167	284	285
NM_000077	55	168	169	286	287
NM_000610	56	170	171	288	289
NM_000852	57	172	173	290	291
NM_000612	58	174	175	292	293
NM_080552	59	176	177	294	295
ゲノム配列	1017	1029	1030	1053	1054
ゲノム配列	1018	1031	1032	1055	1056
ゲノム配列	1019	1032	1034	1057	1058
ゲノム配列	1020	1033	1036	1059	1060
ゲノム配列	1021	1034	1038	1061	1062
ゲノム配列	1022	1035	1040	1063	1064
ゲノム配列	1023	1036	1042	1065	1066
ゲノム配列	1024	1037	1044	1067	1068
ゲノム配列	1025	1038	1046	1069	1070
ゲノム配列	1026	1039	1048	1071	1072
ゲノム配列	1027	1040	1050	1073	1074

【 0 4 6 8 】

【表 9 0】

遺伝子 ref seq ID	配列番号				
	ゲノム	メチル化 変換センス鎖	メチル化変換 アンチセンス鎖	非メチル化 変換センス鎖	非メチル化変換 アンチセンス鎖
ゲノム配列	1028	1041	1052	1075	1076
ゲノム配列	1116	1117	1118	1119	1120
AF102770	1171	1172	1173	1174	1175

10

【 0 4 6 9】

表26に記載の遺伝子の名前(表では「ゲノム配列」と明記しているが、その特定配列にマップされた遺伝子は現在存在しない。)

【 0 4 7 0】

NM 014242: LIM/ホメオボックスタンパク質LHX9

NM 003352: ユビキチン様タンパク質SMT3C前駆体(ユビキチンホモロジドメインタンパク質PIC1)(ユビキチン様タンパク質UBL1)(ユビキチン関連タンパク質SUMO-1)(GAP修飾タンパク質1)(GMP1)(セントリン)

【 0 4 7 1】

NM 003458: Bassoon; ジンクフィンガータンパク質231; ニューロンダブルジンクフィンガータンパク質

20

【 0 4 7 2】

NM 013312: HOOK2タンパク質

NM 006762: リソソーム関連多数回膜貫通タンパク質(レチノイン酸誘導性E3タンパク質)(HA1520) LAM5

【 0 4 7 3】

NM 005539: type 1イノシトール-1,4,5-三リン酸5-ホスファターゼ(EC 3.1.3.56) (5PT ASE)

【 0 4 7 4】

NM 000958: プロスタグランジンE2受容体EP4サブタイプ(プロスタノイドEP4受容体)(PGE受容体EP4サブタイプ)

30

【 0 4 7 5】

NM 004955: 拡散型ヌクレオシドトランスポーター1(拡散型ニトロベンジルメルカプトプリンリボシド感受性ヌクレオシドトランスポーター)(拡散型NBMPR感受性ヌクレオシドトランスポーター)(ヌクレオシドトランスポーター、ES型)

【 0 4 7 6】

NM 003822: オーファン核受容体NR5A2(-1-フェトプロテイン転写因子)(肝細胞転写因子)(B1結合因子)(HB1F)(CYP7Aプロモーター結合因子)

【 0 4 7 7】

NM 032526: タンパク質-チロシンホスファターゼX前駆体(EC 3.1.3.48)(臍島自己抗原関連タンパク質)(ICAAR) (IAR)(ホグリリン)

40

【 0 4 7 8】

NM 004565: ペルオキシソーム膜タンパク質PEX14(ペルオキシシン14)(ペルオキシソーム膜アンカータンパク質PEX14)(PTS1受容体ドッキングタンパク質)

【 0 4 7 9】

NM 156037: ホメオボックスタンパク質HOX-B6 (HOX-2B) (HOX-2.2)

NM 002314: LIMドメインキナーゼ1(EC 2.7.1.37) (LIMK-1)

NM 021642: 低親和性免疫グロブリン Fc受容体II-A前駆体(Fc- RII-A)(FCRII-A)(IGG Fc受容体II-A)(Fc- RIIA) (CD32) (CDW32)

50

【 0 4 8 0 】

NM 020132: 1-アシル-SN-グリセロール-3-ホスファターゼアシルトランスフェラーゼ (EC 2.3.1.51) (1-AGPアシルトランスフェラーゼ3)(1-AGPAT 3)(リソホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ) (LPAAT-) (1-アシルグリセロール-3-リン酸0-アシルトランスフェラーゼ3)

【 0 4 8 1 】

NM 133267: ホメオボックスタンパク質GSH-2

NM 003495: ヒストンH4

NM 004518: 電位依存性カリウムチャンネル・サブファミリー-KQTメンバー2 (神経芽細胞腫特異的カリウムチャンネルKQT様2)

10

【 0 4 8 2 】

NM 003916: アダプター関連タンパク質複合体1 1Bサブユニット(-アダプチン1B)(アダプタータンパク質複合体AP-1 -1Bサブユニット)(ゴルジアダプターHA1/AP1アダプチン -1Bサブユニット)(クラスリン集合タンパク質複合体1 -1B小鎖)(AP-1クラスリンの -1Bサブユニット) (DC22)

【 0 4 8 3 】

NM 002705: ペリプラキン(195kDaコーニファイドエンベロープ前駆体) (195kDa腫瘍随伴性天疱瘡抗原)

【 0 4 8 4 】

NM 030928: DNA複製因子; ショウジョウバエdouble parkedホモログ

20

NM 022114: PRドメインジंकフィンガータンパク質16(転写因子MEL1)

NM 002555: 腫瘍抑制サブトランスファラブル候補5; P45 Beckwith-Wiedemann領域1A; Beckwith-Wiedemann症候群染色体領域1、候補A; 異物排出輸送体様タンパク質; 有機カチオン輸送体様2; 腫瘍抑制STF CDNA 5; 刷り込まれた多数回膜貫通型多特異性輸送体関連タンパク質

【 0 4 8 5 】

NM 000044: AR

NM 004360: CDH1

NM 000077: CDKN2a

NM 000610: CD44

30

NM 000852: GSTP1

NM 000612: IGF2

NM 080552: VIAAT

AF102770: RAFF1A

【 図面の簡単な説明 】

【 0 4 8 6 】

【図1】図1から3は亜硫酸水素塩法による配列分析データから生成した順位付けマトリックスを示す。マトリックス全体が一断片に対応する配列データを表す。マトリックスの各行は該断片内の単一CpG部位を表し、また各列は個別サンプルを表す。左側の棒はメチル化率の物差しであり、メチル化の度合いが列内の各位置の濃淡で示されるが、黒は100%メチル化を、薄い灰色は0%メチル化を、それぞれ表す。白の位置に該当するデータは得られなかった。

40

【 0 4 8 7 】

図1は遺伝子「プロスタグランジンE2受容体、EP4サブタイプ」の断片に関する配列分析データである(配列分析サンプルは前立腺がん腫に由来する)。

【図2】遺伝子「オーファン核受容体」の断片a-1Fetoprotein転写因子の配列分析データである(配列分析サンプルは前立腺がん腫に由来する)。

【図3】遺伝子「1-アシル-SN-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ」の断片の配列データである。

【図4】実施例3に基づく正常前立腺およびBPH vs. 前立腺がんマーカー順位を示す。各個

50

別関心領域がポイントとして表わされている。左側のグラフはgenewiseロジスティック回帰モデルからの非補正p値を与える。上下の点線は5% BonferroniおよびFDR限界をそれぞれ示す。X軸は個別CpG位置に対応するp値を示す。p値は実測される分布がデータセット中で偶然に起こる確率である。右側のグラフはすべてのオリゴヌクレオチドからのメチル化測定値をトレーニングデータとした線形SVMの精度、感度および特異度を与える。各ゲノム領域の精度は黒の四角で、特異度は白抜きのひし形で、また感度は白抜きの四角で、それぞれ表している。X軸で示す精度は正しくクラス分類されたサンプルの割合である。

【図5】実施例3に基づく正常前立腺およびBPH vs. 前立腺がん弁別用の最良12マーカーを示す。正常前立腺およびBPHサンプルは左側に、前立腺がんは右側に、それぞれ示す。各列は1サンプルを表し、各行は1オリゴヌクレオチドを表す。オリゴヌクレオチドは候補マーカーごとにグループ分けしてある。表示のマーカーは上から下へと順に精度が高まる。各マーカーの右側に記載してあるのはBonferroni補正p値である。メチル化データは個別オリゴヌクレオチドに関する1標準偏差を基準に中心化および標準化している。色はオリゴヌクレオチドメチル化状態の平均値からの相対距離を表す。緑は任意のオリゴヌクレオチド内の低メチル化CpGを表し、赤は任意のオリゴヌクレオチド内の高メチル化CpGを表す。

10

【図6】実施例3に基づく正常前立腺、BPHおよび他組織 vs. 前立腺がんマーカー順位を示す。各個別関心領域がポイントとして表されている。左側のグラフはgenewiseロジスティック回帰モデルからの非補正p値を与える。上下の点線は5% BonferroniおよびFDR限界をそれぞれ示す。X軸は個別CpG位置に対応するp値を示す。p値は実測される分布がデータセット中で偶然に起こる確率である。右側のグラフはすべてのオリゴヌクレオチドからのメチル化測定値をトレーニングデータとした線形SVMの精度、感度および特異度を与える。各ゲノム領域の精度は黒の四角で、特異度は白抜きのひし形で、また感度は白抜きの四角で、それぞれ表している。X軸で示す精度は正しくクラス分類されたサンプルの割合である。

20

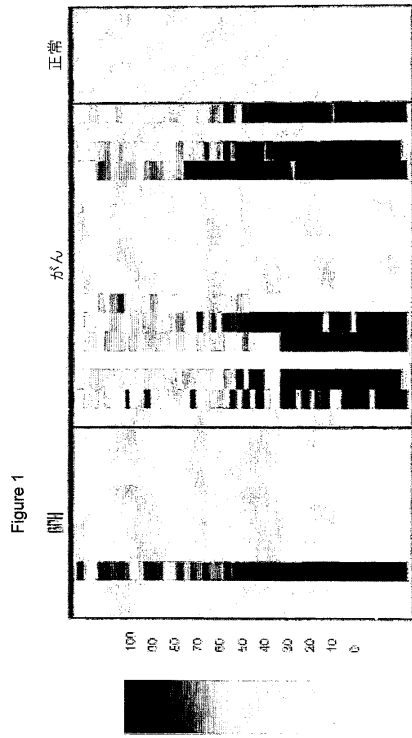
【図7】実施例3に基づく正常前立腺、BPHおよび他組織 vs. 前立腺がん弁別用の最良12マーカーを示す。正常前立腺、BPHおよび他組織サンプルは左側に示す。「他組織」は、表7に記載の他臓器に由来する正常組織および前立腺以外の臓器のがんを含んだ。前立腺がんは右側に示す。各列は1サンプルを表し、各行は1オリゴヌクレオチドを表す。オリゴヌクレオチドは候補マーカーごとにグループ分けしてある。表示のマーカーは上から下へと順に精度が高まる。各マーカーの右側に記載してあるのはBonferroni補正p値である。メチル化データは個別オリゴヌクレオチドに関する1標準偏差を基準に中心化および標準化している。色はオリゴヌクレオチドメチル化状態の平均値からの相対距離を表す。緑は任意のオリゴヌクレオチド内の低メチル化CpGを表し、赤は任意のオリゴヌクレオチド内の高メチル化CpGを表す。

30

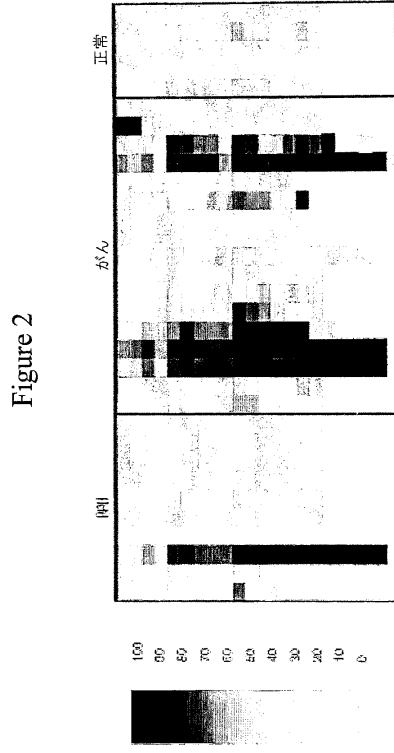
【図8】実施例3に基づく正常前立腺、BPHおよび他組織 vs. 前立腺がんマーカー順位を示す。各個別関心領域がポイントとして表されている。左側のグラフはgenewiseロジスティック回帰モデルからの非補正p値を与える。上下の点線は5% BonferroniおよびFDR限界をそれぞれ示す。X軸は個別CpG位置に対応するp値を示す。p値は実測される分布がデータセット中で偶然に起こる確率である。次のがんが左から右へと順に示されている：膀胱、メラノーマ、精巣、腎、子宮内膜がん、肺、乳、膵、肝、卵巣、唾液腺、および前立腺。

40

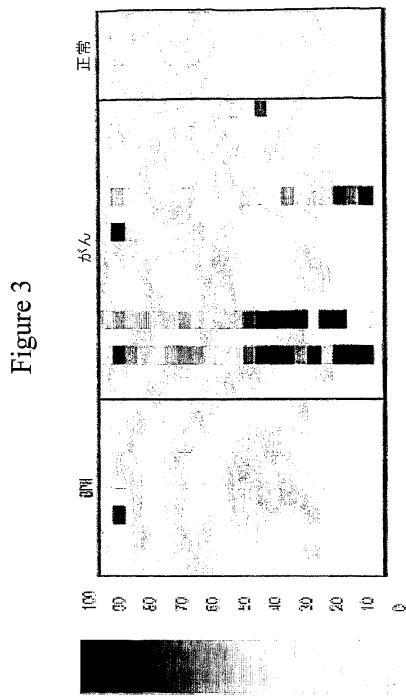
【 図 1 】



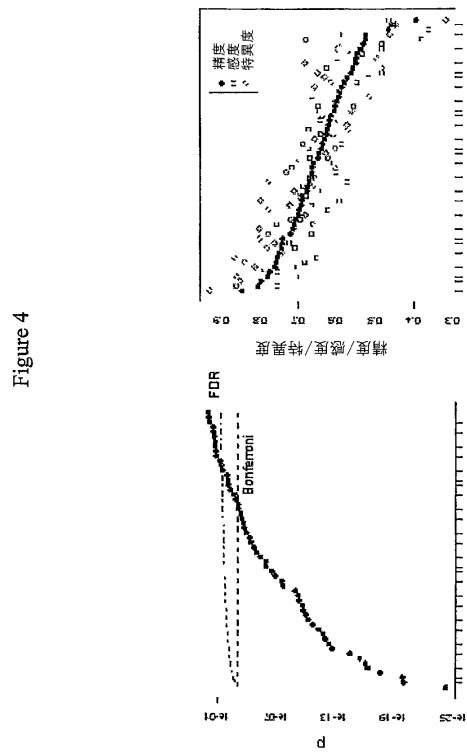
【 図 2 】



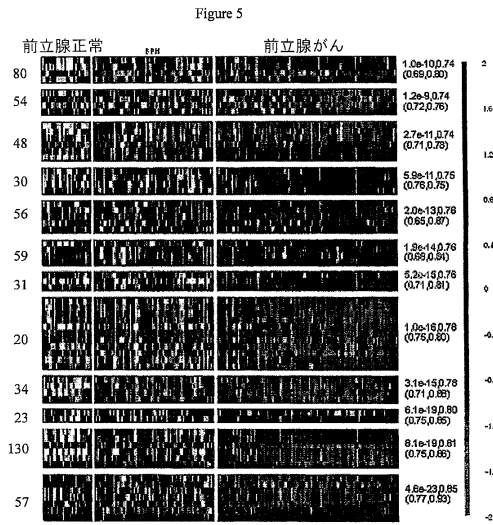
【 図 3 】



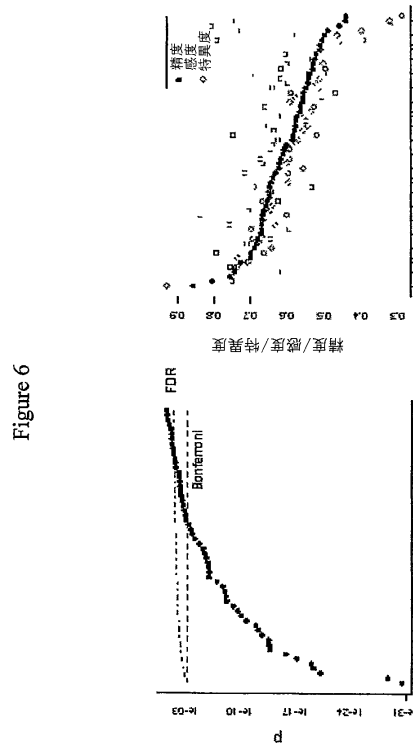
【 図 4 】



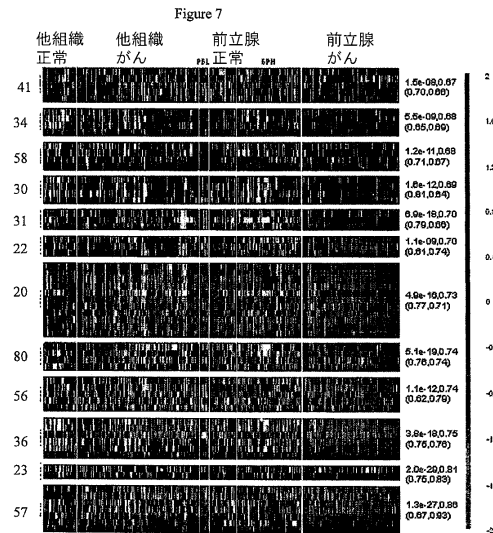
【 図 5 】



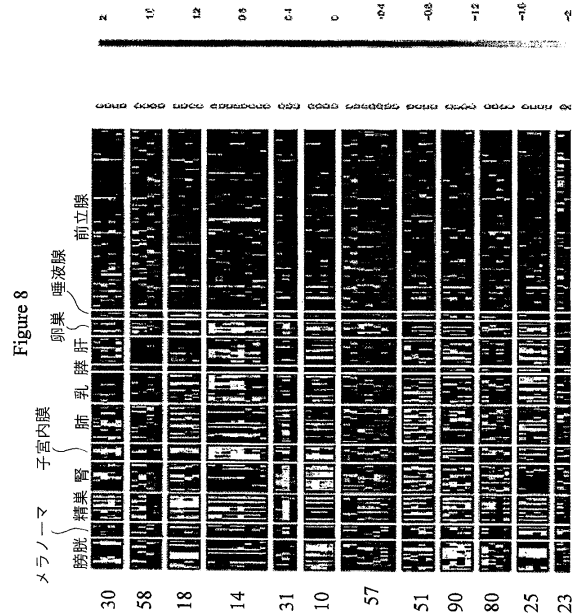
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【配列表】

0004824575000001.app

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 04090187.8
 (32)優先日 平成16年5月10日(2004.5.10)
 (33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
- (31)優先権主張番号 04090292.6
 (32)優先日 平成16年7月21日(2004.7.21)
 (33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
- (74)代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一
- (72)発明者 デイ, ケビン ジェイ.
 アメリカ合衆国, ワシントン 98038, メープル バレー, トゥーハンドレッドフィフティ
 ファースト アベニュー サウスイースト 27954
- (72)発明者 コットレル, スーザン
 アメリカ合衆国, ワシントン 98103, シアトル, メリディアン アベニュー ノース 350
 9
- (72)発明者 ディストラー, ユールゲン
 ドイツ連邦共和国, 10825 ベルリン, ヘバルトシュトラッセ 2
- (72)発明者 モロッチェ, アンドリュウ
 アメリカ合衆国, ワシントン 98102, シアトル, ベレビュー アベニュー イースト 316
 , #402
- (72)発明者 ヤマムラ, スー
 アメリカ合衆国, ワシントン 98006, ベレビュー, サウスイースト フォティーセカンド
 ストリート 15349
- (72)発明者 デッカー, シャロン
 アメリカ合衆国, ワシントン 98038, メープル バレー, サウスイースト トゥーハンドレ
 ッドナインス プレイス 23306
- (72)発明者 オキャンブ, イレカ
 アメリカ合衆国, ワシントン 98133, シアトル, リンデン アベニュー ノース 13520
 , アpartment 425
- (72)発明者 デボス, テオ
 アメリカ合衆国, ワシントン 98125, シアトル, ノースイースト ワンハンドレッ
 ス ストリート 1208

審査官 石丸 聡

- (56)参考文献 国際公開第02/103042(WO, A1)
 国際公開第02/018632(WO, A1)
 国際公開第02/103041(WO, A1)
 国際公開第02/081749(WO, A1)
 Cancer Sci., vol. 94, pages 536-539 (June 2003)
 日本病理学会会誌, 第91巻, 第193頁, 3-E-1(2002年)
 日本病理学会会誌, 第92巻, 第200頁, 1-G-12(2003年4月)
 最新医学, 第58巻, 第2354-2367頁(2003年9月)
 Jpn. J. Cancer Res., vol. 93, pages 605-609 (2002)
 Appl. Environ. Microbiol., vol. 74, pages 840-849 (Feb. 2008)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

C12Q 1/68

G01N 33/53

G01N 33/574

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

专利名称(译)	用于分析与前列腺细胞增殖性疾病的发展相关的基因表达的方法和核酸		
公开(公告)号	JP4824575B2	公开(公告)日	2011-11-30
申请号	JP2006542730	申请日	2004-12-01
[标]申请(专利权)人(译)	外延基因组股份公司		
[标]发明人	デイケビンジェイ コットレルスーザン ディストラーユールゲン モロッティアンドリュウ ヤمامラスー デッカーシャロン オキャンピレカ デボステオ		
发明人	デイ,ケビン ジェイ. コットレル,スーザン ディストラー,ユールゲン モロッティ,アンドリュウ ヤمامラ,スー デッカー,シャロン オキャンピ,イレカ デボス,テオ		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/154 C12Q2600/158 C12Q2600/16		
FI分类号	C12N15/00.ZNAA C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/574.Z		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一		
审查员(译)	石丸聡		
优先权	2003090414 2003-12-01 EP 2004090040 2004-02-10 EP 2004090187 2004-05-10 EP 2004090292 2004-07-21 EP		
其他公开文献	JP2007525208A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于发现和/或区分前列腺细胞增殖性疾病的方法和核酸。这通过分析基因组或其子集的表达状态来实现。

表1: 比較研究 (AP-PCRおよびMCA) に使用したサンプルプール (凡例: n=サンプル数/プール; GS=Gleasonスコア; TZ=移行域; PZ=未梢域)

比較	異名	プールタイプ	プール #	n	サンプルの内訳			
					GS<6 TZ	GS<6 PZ	GS>7 TZ	GS>7 PZ
BPH対 全がん	BA1	BPH	1	10	10×BPH			
		全	1	10	2	3	2	3
BPH対 全がん	BA2	BPH	2	10	5×BPH, 5×正常			
		全	2	10	3	2	3	2
BPH対 低	BL1	BPH	1	10	10×BPH			
		低	1	10	5	5	0	0
BPH対 低	BL2	BPH	2	10	5×BPH, 5×正常			
		低	2	10	5	5	0	0
BPH対 高	BH1	BPH	1	10	10×BPH			
		高	1	10	0	0	5	5
BPH対 高	BH2	BPH	2	10	5×BPH, 5×正常			
		高	2	10	0	0	5	5
低対高	HL	低	3	10	5	5	0	0
		高	3	10	0	0	5	5
BPH対 PBLs	BP	BPH	1	10	10×BPH			
		PBL	1	9	9×PBL			
がん対 PBL	CP	全	3	20	5	5	5	5