

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6043185号
(P6043185)

(45) 発行日 平成29年2月22日(2017.2.22)

(24) 登録日 平成28年11月18日(2016.11.18)

(51) Int.Cl.		F I			
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q	1/04	Z N A
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53	M

請求項の数 22 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2012-505025 (P2012-505025)	(73) 特許権者	512297538
(86) (22) 出願日	平成21年4月17日(2009.4.17)		国防醫學院
(65) 公表番号	特表2012-523822 (P2012-523822A)		台湾台北市内湖區民權東路6段161號
(43) 公表日	平成24年10月11日(2012.10.11)	(74) 代理人	100082418
(86) 国際出願番号	PCT/CN2009/000411		弁理士 山口 朔生
(87) 国際公開番号	W02010/118559	(72) 発明者	▲頼▼鴻政
(87) 国際公開日	平成22年10月21日(2010.10.21)		台湾台北市成功路二段325号5楼
審査請求日	平成23年10月17日(2011.10.17)		
審判番号	不服2014-22337 (P2014-22337/J1)	合議体	
審判請求日	平成26年11月4日(2014.11.4)	審判長	田村 明照
		審判官	三原 健治
		審判官	中島 庸子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌検診の方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

癌の検出方法であって、

工程1: 人体から取り出してある被検査検体を提供すること、

工程2: 該被検査検体のゲノムDNAの中における少なくとも一つのターゲット遺伝子のCpG配列の高度なメチル化の正常レベルとの差異を検査・測定し、

該ターゲット遺伝子が、PDE8B, PTPRRとZNF582からなるグループから選ばれる少なくとも一つから構成されること、およびターゲット遺伝子ZNF582がSEQ ID No: 11, 12に示すプライマー、またはSEQ ID No: 19, 20に示すプライマーによって識別されることを特徴とする、癌の検出方法。

【請求項2】

前記の被検査検体が、子宮頸管スミア、腹水、血液、尿液、糞便、痰、口腔粘膜細胞、胃液、胆汁、子宮頸上皮細胞、手術後の癌組織などのイン・ビトロ・サンプルであることを特徴とする、請求項1に記載の癌の検出方法。

【請求項3】

前記のターゲット遺伝子のCpG配列の高度なメチル化の正常レベルとの差異の検査・測定方法が、メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応(methylation-specific PCR, MSP)、定量的メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応(quantitative methylation-specific PCR, QMSP)、重亜硫酸塩・シーケンシング(bisulfite sequencing, BS)、マイクロアレイ(microarrays)、質量スペクトル(mass spectrometer)分析、変性高速液体クロマトグ

10

20

ラフィー (denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC) , ピロリン酸・シーケンシングであることを特徴とする、請求項1に記載の癌の検出方法。

【請求項4】

前記のターゲット遺伝子PDE8BがSEQ ID No:2に示すヌクレオシド配列を有し、ターゲット遺伝子PTPRRがSEQ ID No:3に示すヌクレオシド配列を有し、ターゲット遺伝子ZNF582がSEQ ID No:4に示すヌクレオシド配列を有することを特徴とする、請求項1に記載の癌の検出方法。

【請求項5】

前記のターゲット遺伝子PDE8BがSEQ ID No: 7, 8に示すプライマー、またはSEQ ID No: 15, 16に示すプライマーによって識別され、ターゲット遺伝子PTPRRがSEQ ID No: 9, 10に示すプライマー、またはSEQ ID No: 17, 18に示すプライマーによって識別されることを特徴とする、請求項1に記載の癌の検出方法。

10

【請求項6】

子宮頸癌の検出方法であって、
 工程1: 人体から取り出してある被検査検体を提供すること、
 工程2: 該被検査検体のゲノムDNAの中における少なくとも一つのターゲット遺伝子のCpG配列の高度なメチル化の正常レベルとの差異を検査・測定し、
 該ターゲット遺伝子が、PDE8B,PTPRRとZNF582からなるグループから選ばれる少なくとも一つから構成されることを特徴とする、子宮頸癌の検出方法。

【請求項7】

20

前記の被検査検体が、子宮頸管スミア、血液、尿液、子宮頸上皮細胞、手術後の癌組織などのイン・ビトロ・サンプルであることを特徴とする、請求項6に記載の子宮頸癌の検出方法。

【請求項8】

前記の被検査検体が、異状の子宮頸管スミアであることを特徴とする、請求項6に記載の子宮頸癌の検出方法。

【請求項9】

前記の被検査検体は、ヒトパピローマウイルス検査が陽性を呈する子宮頸細胞検体であることを特徴とする、請求項6に記載の子宮頸癌の検出方法。

【請求項10】

30

前記のターゲット遺伝子のCpG配列の高度なメチル化の正常レベルとの差異の検査・測定方法が、メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応 (methylation-specific PCR, MSP) , 定量的メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応 (quantitative methylation-specific PCR, QMSP) , 重亜硫酸塩・シーケンシング (bisulfite sequencing, BS) , マイクロアレイ (microarrays) , 質量スペクトル (mass spectrometer) 分析, 変性高速液体クロマトグラフィー (denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC) , ピロリン酸・シーケンシングであることを特徴とする、請求項6に記載の子宮頸癌の検出方法。

【請求項11】

前記のターゲット遺伝子PDE8BがSEQ ID No:2に示すヌクレオシド配列を有し、ターゲット遺伝子PTPRRがSEQ ID No:3に示すヌクレオシド配列を有し、ターゲット遺伝子ZNF582がSEQ ID No:4に示すヌクレオシド配列を有することを特徴とする、請求項6に記載の子宮頸癌の検出方法。

40

【請求項12】

前記のターゲット遺伝子PDE8BがSEQ ID No: 7, 8に示すプライマー、またはSEQ ID No: 15, 16に示すプライマーによって識別され、ターゲット遺伝子PTPRRがSEQ ID No: 9, 10に示すプライマー、またはSEQ ID No: 17, 18に示すプライマーによって識別され、ターゲット遺伝子ZNF582がSEQ ID No: 11, 12に示すプライマー、またはSEQ ID No: 19, 20に示すプライマーによって識別されることを特徴とする、請求項6に記載の子宮頸癌の検出方法。

【請求項13】

50

卵巣癌の検出方法であって、

工程1：人体から取り出してある被検査検体を提供すること、

工程2：該被検査検体のゲノムDNAの中における少なくとも一つのターゲット遺伝子のCpG配列の高度なメチル化の正常レベルとの差異を検査・測定し、

該ターゲット遺伝子が、PTPRRとZNF582からなるグループから選ばれる少なくとも一つから構成されることを特徴とする、卵巣癌の検出方法。

【請求項14】

前記の被検査検体が、卵巣癌組織、腹水、血液、尿液、手術後の癌組織などのイン・ピトロ・サンプルであることを特徴とする、請求項13に記載の卵巣癌の検出方法。

【請求項15】

前記のターゲット遺伝子のCpG配列の高度なメチル化の正常レベルとの差異の検査・測定方法が、メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応 (methylation-specific PCR, MSP)、定量的メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応 (quantitative methylation-specific PCR, QMSP)、重亜硫酸塩・シーケンシング (bisulfite sequencing, BS)、マイクロアレイ (microarrays)、質量スペクトル (mass spectrometer) 分析、変性高速液体クロマトグラフィー (denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC)、ピロリン酸・シーケンシングであることを特徴とする、請求項13に記載の卵巣癌の検出方法。

【請求項16】

前記のターゲット遺伝子PTPRRがSEQ ID No:3に示すヌクレオシド配列を有し、ターゲット遺伝子ZNF582がSEQ ID No:4に示すヌクレオシド配列を有することを特徴とする、請求項13に記載の卵巣癌の検出方法。

【請求項17】

前記のターゲット遺伝子PTPRRがSEQ ID No: 9, 10に示すプライマー、またはSEQ ID No: 17, 18に示すプライマーによって識別され、ターゲット遺伝子ZNF582がSEQ ID No: 11, 12に示すプライマー、またはSEQ ID No: 19, 20に示すプライマーによって識別されることを特徴とする、請求項13に記載の卵巣癌の検出方法。

【請求項18】

大腸癌の検出方法であって、

工程1：人体から取り出してある被検査検体を提供すること、

工程2：該被検査検体のゲノムDNAの中における少なくとも一つのターゲット遺伝子のCpG配列の高度なメチル化の正常レベルとの差異を検査・測定し、

該ターゲット遺伝子が、PDE8B,PTPRRとZNF582からなるグループから選ばれる少なくとも一つから構成されることを特徴とする、大腸癌の検出方法。

【請求項19】

前記の被検査検体が、腹水、血液、尿液、手術後の癌組織などのイン・ピトロ・サンプルであることを特徴とする、請求項18に記載の大腸癌の検出方法。

【請求項20】

前記のターゲット遺伝子のCpG配列の高度なメチル化の正常レベルとの差異の検査・測定方法が、メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応 (methylation-specific PCR, MSP)、定量的メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応 (quantitative methylation-specific PCR, QMSP)、重亜硫酸塩・シーケンシング (bisulfite sequencing, BS)、マイクロアレイ (microarrays)、質量スペクトル (mass spectrometer) 分析、変性高速液体クロマトグラフィー (denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC)、ピロリン酸・シーケンシングであることを特徴とする、請求項18に記載の大腸癌の検出方法。

【請求項21】

前記のターゲット遺伝子PDE8BがSEQ ID No:2に示すヌクレオシド配列を有し、ターゲット遺伝子PTPRRがSEQ ID No:3に示すヌクレオシド配列を有し、ターゲット遺伝子ZNF582がSEQ ID No:4に示すヌクレオシド配列を有することを特徴とする、請求項18に記載の大腸癌の検出方法。

【請求項22】

10

20

30

40

50

前記のターゲット遺伝子PDE8BがSEQ ID No: 7, 8に示すプライマー、またはSEQ ID No: 15, 16に示すプライマーによって識別され、ターゲット遺伝子PTPRRがSEQ ID No: 9, 10に示すプライマー、またはSEQ ID No: 17, 18に示すプライマーによって識別され、ターゲット遺伝子ZNF582がSEQ ID No: 11, 12に示すプライマー、またはSEQ ID No: 19, 20に示すプライマーによって識別されることを特徴とする、請求項18に記載の大腸癌の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌検診の方法に関するもので、特にメチル化DNAを生物標記とする癌検診の方法に関するものである。

10

【背景技術】

【0002】

子宮頸癌が全世界および台湾女性の主要な死因の一つで、2002年に世界保健機構（WHO）の統計に基づき、子宮頸癌が全世界の女性癌死因の第2位で、乳癌に次ぎ、定期的に子宮頸癌の検診を受けるのは、子宮頸癌の予防の最も良い方法で、慣用の子宮頸癌の検診方式は、主として2種類があり、一つが最も既知のパパニコロー塗抹標本検査（Pap smear）で、他がヒトパピローマウイルス検査（HPV testing）で、パパニコロー塗抹標本検査が子宮頸部の分泌物を取り出し、顕微鏡にて、その中の脱落した上皮細胞の中に癌病変を生成するかどうかを観察することにより、早期的に子宮頸癌を検査・測定するが、そしてHPV検査が、ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction, RT-PCR）又はHybrid Captureの方式により、サンプルの中にヒトパピローマウイルス（human papilloma virus, HPV）のウイルスが存在するかどうかを、検査する。

20

【0003】

然しながら、パパニコロー塗抹標本検査（Pap smear）は、医師によりサンプリングする必要があり、検診技師/病理医師により塗抹標本をチェックするが、高い偽陰性率（High false negative rate）を生成して癌前病変の診断と治療を遅延しやすい以外に、更に必要な人力量およびコストが高すぎ、数多くの開発途中の国家にとって、普及する困難性があり、一方、ヒトパピローマウイルス検査（HPV testing）が高い感度を有するが、但し高い偽陽性率（High false positive rate）を生成しやすくなり、患者が無駄に心配するだけでなく、更に沢山の医療資源を偽陽性の患者の追跡検査の上に浪費し、従ってどのように子宮頸癌の検査方法の正確性および便利性を向上するのは、子宮頸癌の検査を普及する重要な課題の一つである。

30

【0004】

遺伝子の欠点（genomic deletions）が腫瘍形成の重要な因子と考え、長い間に我々は、何れもゲノムの中におけるコードがATCGの4個塩基により配列する観念に馴染み、Knudsonさんは、早めに1975年に2段階発生説（two-hit theory）を提出し、幾つかの同源の腫瘍抑制遺伝子が伴隨する突然変異または欠点により癌の生成を招いてもよい、或いは癌を生成しやすいことを、指すが、然しながら、他の影響表現型（phenotype）のメッセージは、修飾された塩基5-メチルシトシン（5-methylcytosine）の中に保存する可能性があり、現在5-メチルシトシンが哺乳類動物の細胞内の回文配列5'-CpG-3'の中に存在することを発見し、哺乳類動物の細胞内にある“CpG島”（CpG islands, CGIs）と称する幾つかの区域の以外に、大部分のCpGジヌクレオチドリン酸が何れもメチル化され、CpG島は、約1000個塩基が（1Kb）に対する区域内に大量のGC-とCpG-を含有することを指し、通常遺伝子の近くに位置し、且つ広範に表現する遺伝子のプロモーターの近くに発見される。シトシンのメチル化がDNA合成に発生した後に、メチル化の寄贈者のS-アデノシルメチオニン（S-adenosylmethionine, SAM）から、メチルが酵素を経由してシトシンの第5個カーボンの位置上に転移し、該酵素反応がDNAメチル転移酵素（DNA methyltransferase, DNMTs）により実行され、DNMT1が哺乳類動物の主要なメチル転移酵素で、半メチル化の位置をコピーした後に全メチル化に回復（post-replicative restoration）することを担当し、維

40

50

持メチル化 (maintenance methylation) と称し、逆にDNMT3AとDNMT3Bが主としてメチル化の新たな位置を担当して看做し、更新メチル化 (de novo methylation) と称する工程を行う。

【 0 0 0 5 】

CpGジヌクレオチドリ酸がメチル化に対するロス (loss of methylation) は、即ち一般的な低度メチル化が癌細胞内の第1個超遺伝異常 (epigenetic abnormality) であるが、然しながら、過去数年間の研究に示すように、特定の位置 (例えば幾つかの腫瘍抑制遺伝子) の高度なメチル化 (site-specific hypermethylation) 及びその機能の喪失に関係があり、癌の生成時に選択優位 (selective advantages) を提供する可能性があり、プロモーターの区域上にあるCpG島の高度なメチル化が、ヒストン修飾 (histone modification) に伴随する遺伝子サイレンシング (gene silencing) により、クロマチン再構成 (chromatin remodeling) を招いてもよいが、染色体の欠陥および遺伝子の病変の以外に、プロモーターの高度なメチル化により招かれた腫瘍抑制遺伝子の超遺伝子サイレンシング現象 (epigenetic silencing) も、常に人類癌の中に発見される。

10

【 0 0 0 6 】

最近の流行病学の研究に示すように、血清葉酸 (serum folate) の濃度 (メチルの主要なソース) がHPVの感染と除去に関連し、メチル・サイクル (methyl cycle) の代謝作用の中に、酵素の遺伝子多型性 (genetic polymorphisms) も、嘗て子宮頸の上皮内病変の発展と関連することを報道し、一般的な超遺伝子進化観念の通りで、DNAメチル化と子宮頸癌との間の関連研究も、同様に盛んに行い、子宮頸癌のDNAメチル化の研究が日増しに増え、メチル化を使用して子宮頸癌の検診とする可能性を表示し、遺伝と環境との相互作用の特性のために、腫瘍抑制遺伝子のメチル化の度合いが、違う遺伝子および違うグループにより異なり、違う病気も異なるメチル化表現型 (methylator phenotypes) を有してもよいが、然しながら、子宮頸癌のメチル化表現型およびそのHPV遺伝子型の関連が依然として未知であり、そして子宮頸癌の中にどのような特定の遺伝子がメチル化されてもよい且つどのぐらいの遺伝子が必要で臨床応用の需要を満たしてもよいのは、該等問題について、依然として将来接触・論議する必要がある話題となる。

20

【 0 0 0 7 】

本発明の発明者は、以前に既に台湾 (TW Pat. Pub. No. 200831900)、中国 (CN Appl. No.200810094659.2)、マレーシア (UI20085354) と米国 (US Pat. Pub. No. 20080311570) には、関連する特許の出願 (以下に前案と称する。) を提出し、本発明が前案の延伸で、本発明の発明者が新規な癌検診の生物指標およびその検診の方法を発見する。

30

【 0 0 0 8 】

これより了解できるのは、前記の既存の子宮頸癌の検診方法が、依然として沢山の欠点を有し、本当に良好な設計ではなく、そしてより改良する必要がある。

【 0 0 0 9 】

本発明の発明者は、前述の既存の子宮頸癌の検診方法により生成された各項目の欠点を鑑み、より改良して革新しようとする意図し、且つ多年を経て苦心して孤独に努力して鋭意に研究した後に、ついに本発明の癌検診の方法を、成功的に研究して完成する。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 0 】

本発明の目的は、即ち子宮頸癌の検診方法を提供することにより、第1線の子宮頸癌の検診 (cancer screen) と看做すものである。

【 0 0 1 1 】

本発明の副次的な目的は、子宮頸癌の検診方法を提供するもので、該方法が、第1線の子宮頸癌の検診と看做してもよい以外に、更に第2線の子宮頸癌の検診と看做してもよく、ヒトパピローマウイルス検査 (HPV testing) 又は不確定なテスト・ピースの結果を補助することにより、より正確な子宮頸癌の検診効果を達成できる。

【 0 0 1 2 】

50

本発明の更なる他の目的は、癌診断の方法を提供するもので、該方法が、子宮頸癌の検査・測定の上に応用できる以外に、更に他の癌（例えば卵巣癌、大腸癌）の検査・測定の上に応用することにより、異状検体の診断を補助してもよい。

【課題を解決するための手段】

【0013】

前記の発明の目的を達成できる癌検診の方法は、被検査検体の細胞中におけるターゲット遺伝子のメチル化状態を検査・測定することにより癌の有無の検診指標と看做すが、該方法は、下記の工程を含んでなるが、

工程1：人体から取り出してある被検査検体を提供すること、

工程2：該被検査検体のゲノムDNAの中における少なくとも一つのターゲット遺伝子のCpG配列メチル化状態を検査・測定し、該ターゲット遺伝子が、PDE8B,PTPRRとZNF582からなるグループから選ばれる少なくとも一つから構成されること、

工程3：該ターゲット遺伝子のメチル化状態の有無に基づき、該検体が癌または癌前病変を有するかどうかを判断し、或いは治療・予防の指標と看做すこと。

【0014】

その中でも、該被検査検体が、子宮頸管スミア、卵巣癌組織、腹水、血液、尿液、糞便、痰、口腔粘膜細胞、胃液、胆汁、子宮頸上皮細胞または手術後の癌組織などである。

【0015】

その中でも、該ターゲット遺伝子のCpG配列メチル化状態の検査・測定方法が、メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応（methylation-specific PCR, MSP）、定量的メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応（quantitative methylation-specific PCR, QMSP）、重亜硫酸塩・シーケンシング（bisulfite sequencing, BS）、マイクロアレイ（microarrays）、質量スペクトル（mass spectrometer）分析、変性高速液体クロマトグラフィー（denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC）を含むが、但しこれらに限定されない。

【0016】

その中でも、該ターゲット遺伝子PDE8BがSEQ ID No: 7, 8, 15, 16に示すプライマーによって識別され、ターゲット遺伝子PTPRRがSEQ ID No: 9, 10, 17, 18に示すヌクレオシド配列を有し、ターゲット遺伝子ZNF582がSEQ ID No: 11, 12, 19, 20に示すヌクレオシド配列を有する。

【0017】

その中でも、該ターゲット遺伝子PDE8BがSEQ ID No:2に示すヌクレオシド配列を有する。

【0018】

その中でも、該ターゲット遺伝子PTPRRがSEQ ID No:3に示すヌクレオシド配列を有する。

【0019】

その中でも、該ターゲット遺伝子ZNF582がSEQ ID No:4に示すヌクレオシド配列を有する。

【0020】

更に、前記の検診指標および検診方法は、ひいては子宮頸癌および大腸癌の検診に用いられることが出来る。

【0021】

本発明は、ひいては卵巣癌の検診方法を提供し、被検査検体の細胞中におけるターゲット遺伝子のメチル化状態を検査・測定することにより卵巣癌の有無の検診の指標と看做すが、該方法は、下記の工程を含んでなるが、

工程1：人体から取り出してある被検査検体を提供すること、

工程2：該被検査検体のゲノムDNAの中における少なくとも一つのターゲット遺伝子のCpG配列メチル化状態を検査・測定し、該ターゲット遺伝子が、PTPRRとZNF582からなるグループから選ばれる少なくとも一つから構成されること、

10

20

30

40

50

工程3：ターゲット遺伝子のメチル化状態の有無に基づき、該検体が卵巣癌病変を有するかどうかを判断し、或いは治療・予防の指標と看做すこと。

その中でも、該被検査検体が、卵巣癌組織、腹水、血液、尿液または手術後の癌組織などである。

【0022】

その中でも、該ターゲット遺伝子のCpG配列メチル化状態の検査・測定方法が、メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応 (methylation-specific PCR, MSP)、定量的メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応 (quantitative methylation-specific PCR, QMSP)、重亜硫酸塩・シーケンシング (bisulfite sequencing, BS)、マイクロアレイ (microarrays)、質量スペクトル (mass spectrometer) 分析、変性高速液体クロマトグラフィー (denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC)、ピロリン酸・シーケンシングを含むが、但しこれらに限定されない。

10

【0024】

その中でも、該ターゲット遺伝子PTPRRがSEQ ID No:3に示すヌクレオシド配列を有する。

【0025】

その中でも、該ターゲット遺伝子ZNF582がSEQ ID No:4に示すヌクレオシド配列を有する。

また、その中でも、該ターゲット遺伝子PTPRRがSEQ ID No: 9, 10, 17, 18に示すヌクレオシド配列を有し、ターゲット遺伝子ZNF582がSEQ ID No: 11, 12, 19, 20に示すヌクレオシド配列を有する。

20

【0026】

技術用語の“被検査検体”が、イン・ビトロの被検査サンプルを指し、該サンプルが、前記の子宮頸管スミア、腹水、血液、尿液、糞便、痰、口腔粘膜細胞、胃液、胆汁、子宮頸上皮細胞または手術後の癌組織などのイン・ビトロの検体サンプルを含む。本発明の癌検診の方法は、該等イン・ビトロ・サンプルの中におけるターゲット遺伝子のメチル化状態を検査・測定するために用いられることにより、各種類の癌の検診指標と看做す。本発明の提供する癌検診の方法およびその検診指標は、研究員が実験室の中に検査・測定を行うように供してもよい。

30

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1A】本発明の癌検診の方法の使用するターゲット遺伝子PTPRRで、各種類の子宮頸サンプルの中に重亜硫酸塩・シーケンシング (BS) の分析を行う結果である。

【図1B】本発明の癌検診の方法の使用するターゲット遺伝子ZNF582で、各種類の子宮頸サンプルの中に重亜硫酸塩・シーケンシング (BS) の分析を行う結果である。

【図1C】本発明の癌検診の方法の使用するターゲット遺伝子PDE8Bで、各種類の子宮頸サンプルの中に重亜硫酸塩・シーケンシング (BS) の分析を行う結果である。

【図1D】本発明の癌検診の方法の使用するターゲット遺伝子DBC1で、各種類の子宮頸サンプルの中に重亜硫酸塩・シーケンシング (BS) の分析を行う結果である。

40

【発明を実施するための形態】

【0028】

本発明は、下記の実施例により、更に表示・明記されるが、但し本発明が下記の実施例により限定されない。

【実施例】

【0029】

実施例1 材料および方法

一、材料

試験材料が1シリーズの完備の子宮頸病変サンプルを含み、鱗状細胞癌 (squamous cell

50

carcinoma, SCC, n=20)、腺癌(adenocarcinoma, AC, n=20)と正常な子宮頸サンプル(n=10)を含んでなる。全ての子宮頸サンプル、卵巣サンプルと大腸癌サンプルが、何れも台北市の三軍総病院から取得されるが、各サンプルのゲノムDNA(genomic DNA)がQIAamp DNA組セット(QIAGEN)により抽出され、且つ全ゲノムの中におけるDNAメチル化の状況を照合・分析するために用いられる。更に分析前に、何れもBioanalyzer(Agilent)により、ゲノムDNAの品質を検査・測定する。本実施例には、10 µgのプロッキングのDNAにより、MeDIP(Methyl DNA IP)を行う。

【0030】

二、MeDIP及びCpG island-Plus-Promoterアレイ(CpG island-Plus-Promoter arrays)により行われたDNAメチル化の分析

10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000
1010
1020
1030
1040
1050
1060
1070
1080
1090
1100
1110
1120
1130
1140
1150
1160
1170
1180
1190
1200
1210
1220
1230
1240
1250
1260
1270
1280
1290
1300
1310
1320
1330
1340
1350
1360
1370
1380
1390
1400
1410
1420
1430
1440
1450
1460
1470
1480
1490
1500
1510
1520
1530
1540
1550
1560
1570
1580
1590
1600
1610
1620
1630
1640
1650
1660
1670
1680
1690
1700
1710
1720
1730
1740
1750
1760
1770
1780
1790
1800
1810
1820
1830
1840
1850
1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
2170
2180
2190
2200
2210
2220
2230
2240
2250
2260
2270
2280
2290
2300
2310
2320
2330
2340
2350
2360
2370
2380
2390
2400
2410
2420
2430
2440
2450
2460
2470
2480
2490
2500
2510
2520
2530
2540
2550
2560
2570
2580
2590
2600
2610
2620
2630
2640
2650
2660
2670
2680
2690
2700
2710
2720
2730
2740
2750
2760
2770
2780
2790
2800
2810
2820
2830
2840
2850
2860
2870
2880
2890
2900
2910
2920
2930
2940
2950
2960
2970
2980
2990
3000
3010
3020
3030
3040
3050
3060
3070
3080
3090
3100
3110
3120
3130
3140
3150
3160
3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
3280
3290
3300
3310
3320
3330
3340
3350
3360
3370
3380
3390
3400
3410
3420
3430
3440
3450
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560
3570
3580
3590
3600
3610
3620
3630
3640
3650
3660
3670
3680
3690
3700
3710
3720
3730
3740
3750
3760
3770
3780
3790
3800
3810
3820
3830
3840
3850
3860
3870
3880
3890
3900
3910
3920
3930
3940
3950
3960
3970
3980
3990
4000
4010
4020
4030
4040
4050
4060
4070
4080
4090
4100
4110
4120
4130
4140
4150
4160
4170
4180
4190
4200
4210
4220
4230
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
4360
4370
4380
4390
4400
4410
4420
4430
4440
4450
4460
4470
4480
4490
4500
4510
4520
4530
4540
4550
4560
4570
4580
4590
4600
4610
4620
4630
4640
4650
4660
4670
4680
4690
4700
4710
4720
4730
4740
4750
4760
4770
4780
4790
4800
4810
4820
4830
4840
4850
4860
4870
4880
4890
4900
4910
4920
4930
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200
5210
5220
5230
5240
5250
5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
5470
5480
5490
5500
5510
5520
5530
5540
5550
5560
5570
5580
5590
5600
5610
5620
5630
5640
5650
5660
5670
5680
5690
5700
5710
5720
5730
5740
5750
5760
5770
5780
5790
5800
5810
5820
5830
5840
5850
5860
5870
5880
5890
5900
5910
5920
5930
5940
5950
5960
5970
5980
5990
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6100
6110
6120
6130
6140
6150
6160
6170
6180
6190
6200
6210
6220
6230
6240
6250
6260
6270
6280
6290
6300
6310
6320
6330
6340
6350
6360
6370
6380
6390
6400
6410
6420
6430
6440
6450
6460
6470
6480
6490
6500
6510
6520
6530
6540
6550
6560
6570
6580
6590
6600
6610
6620
6630
6640
6650
6660
6670
6680
6690
6700
6710
6720
6730
6740
6750
6760
6770
6780
6790
6800
6810
6820
6830
6840
6850
6860
6870
6880
6890
6900
6910
6920
6930
6940
6950
6960
6970
6980
6990
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7100
7110
7120
7130
7140
7150
7160
7170
7180
7190
7200
7210
7220
7230
7240
7250
7260
7270
7280
7290
7300
7310
7320
7330
7340
7350
7360
7370
7380
7390
7400
7410
7420
7430
7440
7450
7460
7470
7480
7490
7500
7510
7520
7530
7540
7550
7560
7570
7580
7590
7600
7610
7620
7630
7640
7650
7660
7670
7680
7690
7700
7710
7720
7730
7740
7750
7760
7770
7780
7790
7800
7810
7820
7830
7840
7850
7860
7870
7880
7890
7900
7910
7920
7930
7940
7950
7960
7970
7980
7990
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8100
8110
8120
8130
8140
8150
8160
8170
8180
8190
8200
8210
8220
8230
8240
8250
8260
8270
8280
8290
8300
8310
8320
8330
8340
8350
8360
8370
8380
8390
8400
8410
8420
8430
8440
8450
8460
8470
8480
8490
8500
8510
8520
8530
8540
8550
8560
8570
8580
8590
8600
8610
8620
8630
8640
8650
8660
8670
8680
8690
8700
8710
8720
8730
8740
8750
8760
8770
8780
8790
8800
8810
8820
8830
8840
8850
8860
8870
8880
8890
8900
8910
8920
8930
8940
8950
8960
8970
8980
8990
9000
9010
9020
9030
9040
9050
9060
9070
9080
9090
9100
9110
9120
9130
9140
9150
9160
9170
9180
9190
9200
9210
9220
9230
9240
9250
9260
9270
9280
9290
9300
9310
9320
9330
9340
9350
9360
9370
9380
9390
9400
9410
9420
9430
9440
9450
9460
9470
9480
9490
9500
9510
9520
9530
9540
9550
9560
9570
9580
9590
9600
9610
9620
9630
9640
9650
9660
9670
9680
9690
9700
9710
9720
9730
9740
9750
9760
9770
9780
9790
9800
9810
9820
9830
9840
9850
9860
9870
9880
9890
9900
9910
9920
9930
9940
9950
9960
9970
9980
9990
10000

【0031】

30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000
1010
1020
1030
1040
1050
1060
1070
1080
1090
1100
1110
1120
1130
1140
1150
1160
1170
1180
1190
1200
1210
1220
1230
1240
1250
1260
1270
1280
1290
1300
1310
1320
1330
1340
1350
1360
1370
1380
1390
1400
1410
1420
1430
1440
1450
1460
1470
1480
1490
1500
1510
1520
1530
1540
1550
1560
1570
1580
1590
1600
1610
1620
1630
1640
1650
1660
1670
1680
1690
1700
1710
1720
1730
1740
1750
1760
1770
1780
1790
1800
1810
1820
1830
1840
1850
1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
2170
2180
2190
2200
2210
2220
2230
2240
2250
2260
2270
2280
2290
2300
2310
2320
2330
2340
2350
2360
2370
2380
2390
2400
2410
2420
2430
2440
2450
2460
2470
2480
2490
2500
2510
2520
2530
2540
2550
2560
2570
2580
2590
2600
2610
2620
2630
2640
2650
2660
2670
2680
2690
2700
2710
2720
2730
2740
2750
2760
2770
2780
2790
2800
2810
2820
2830
2840
2850
2860
2870
2880
2890
2900
2910
2920
2930
2940
2950
2960
2970
2980
2990
3000
3010
3020
3030
3040
3050
3060
3070
3080
3090
3100
3110
3120
3130
3140
3150
3160
3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
3280
3290
3300
3310
3320
3330
3340
3350
3360
3370
3380
3390
3400
3410
3420
3430
3440
3450
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560
3570
3580
3590
3600
3610
3620
3630
3640
3650
3660
3670
3680
3690
3700
3710
3720
3730
3740
3750
3760
3770
3780
3790
3800
3810
3820
3830
3840
3850
3860
3870
3880
3890
3900
3910
3920
3930
3940
3950
3960
3970
3980
3990
4000
4010
4020
4030
4040
4050
4060
4070
4080
4090
4100
4110
4120
4130
4140
4150
4160
4170
4180
4190
4200
4210
4220
4230
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
4360
4370
4380
4390
4400
4410
4420
4430
4440
4450
4460
4470
4480
4490
4500
4510
4520
4530
4540
4550
4560
4570
4580
4590
4600
4610
4620
4630
4640
4650
4660
4670
4680
4690
4700
4710
4720
4730
4740
4750
4760
4770
4780
4790
4800
4810
4820
4830
4840
4850
4860
4870
4880
4890
4900
4910
4920
4930
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200
5210
5220
5230
5240
5250
5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
5470
5480
5490
5500
5510
5520
5530
5540
5550
5560
5570
5580
5590
5600
5610
5620
5630
5640
5650
5660
5670
5680
5690
5700
5710
5720
5730
5740
5750
5760
5770
5780
5790
5800
5810
5820
5830
5840
5850
5860
5870
5880
5890
5900
5910
5920
5930
5940
5950
5960
5970
5980
5990
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6100
6110
6120
6130
6140
6150
6160
6170
6180
6190
6200
6210
6220
6230
6240
6250
6260
6270
6280
6290
6300
6310
6320
6330
6340
6350
6360
6370
6380
6390
6400
6410
6420
6430
6440
6450
6460
6470
6480
6490
6500
6510
6520
6530
6540
6550
6560
6570
6580
6590
6600
6610
6620
6630
6640
6650
6660
6670
6680
6690
6700
6710
6720
6730
6740
6750
6760
6770
6780
6790
6800
6810
6820
6830
6840
6850
6860
6870
6880
6890
6900
6910
6920
6930
6940
6950
6960
6970
6980
6990
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7100
7110
7120
7130
7140
7150
7160
7170
7180
7190
7200
7210
7220
7230
7240
7250
7260
7270
7280
7290
7300
7310
7320
7330
7340
7350
7360
7370
7380
7390
7400
7410
7420
7430
7440
7450
7460
7470
7480
7490
7500
7510
7520
7530
7540
7550
7560
7570
7580
7590
7600
7610
7620
7630
7640
7650
7660
7670
7680
7690
7700
7710
7720
7730
7740
7750
7760
7770
7780
7790
7800
7810
7820
7830
7840
7850
7860
7870
7880
7890
7900
7910
7920
7930
7940
7950
7960
7970
7980
7990
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8100
8110
8120
8130
8140
8150
8160
8170
8180
8190
8200
8210
8220
8230
8240
8250
8260
8270
8280
8290
8300
8310
8320
8330
8340
8350
8360
8370
8380
8390
8400
8410
8420
8430
8440
8450
8460
8470
8480
8490
8500
8510
8520
8530
8540
8550
8560
8570
8580
8590
8600
8610
8620
8630
8640
8650
8660
8670
8680
8690
8700
8710
8720
8730
8740
8750
8760
8770
8780
8790
8800
8810
8820
8830
8840
8850
8860
8870
8880
8890
8900
8910
8920
8930
8940
8950
8960
8970
8980
8990
9000
9010
9020
9030
9040
9050
9060
9070
9080
9090
9100
9110
9120
9130
9140
9150
9160
9170
9180
9190
9200
9210
9220
9230
9240
9250
9260
9270
9280
9290
9300
9310
9320
9330
9340
9350
9360
9370
9380
9390
9400
9410
9420
9430
9440
9450
9460
9470
9480
9490
9500
9510
9520
9530
9540
9550
9560
9570
9580
9590
9600
9610
9620
9630
9640
9650
9660
9670
9680
9690
9700
9710
9720
9730
9740
9750
9760
9770
9780
9790
9800
9810
9820
9830
9840
9850
9860
9870
9880
9890
9900
9910
9920
9930
9940
9950
9960
9970
9980
9990
10000

【0032】

10
20
30
40
50
60
70

Chemicon社の生産したDNA修飾組セット (DNA modification kit, Chemicon, Terneuclea, CA) を使用し、重亜硫酸塩修飾作用を行うが、1 μgのサンプルのゲノムDNA (genomic DNA) を取り、重亜硫酸塩により、ゲノムDNAに対して化学修飾を行い、単鎖DNAの中に、全ての非メチル化のシトシンが、何れ脱アミノ作用を生成してウラシルに変換し、そしてメチル化のシトシンが修飾されず、依然として5 - メチルシトシンの状態を保持し、最後に反応後のサンプルDNAを、70 μl、55 のTF緩衝液 (TE buffer) の中に溶けることにより、メチル化特異的PCR (MSP) を行う。

【 0 0 3 3 】

その他に人類周囲血 (peripheral blood) の正常なDNAを取り、重亜硫酸塩修飾作用を行うことにより、非メチル化のプロモーター配列を有する対照群と看做す。

10

【 0 0 3 4 】

1 μgの重亜硫酸塩修飾作用を経た後のサンプルのゲノムDNAと対照群DNAを取り、MSPプライマーにてメチル化特異的PCRを行って拡増することにより、該MSPプライマーが、メチル化の遺伝子配列を識別するMSPプライマー (M) であってもよく、各ターゲット遺伝子のMSPプライマー配列が表1に示す通りで、メチル化特異的PCR反応物の総体積が25 μlで、1 μlの既に修飾された型版DNA、プライマー毎に各1.5 pmol、0.2 mmol/L dNTPsと1 unit Gold Taq DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA) を含むが、混合済みの反応物を、95 の下に5分間置き、続いて95 に30秒間解離 (denature) し、適当なプライマーにより、粘着 (annealing) 温度に30秒間粘着し、72 に30秒間合成することを、サイクルと看做し、解離・粘着・合成工程が併せて35回のサイクルを繰り返し、その後

20

に再び72 に放置して5分間反応する。拡増後の生成物が、臭化エチジウム (ethidium bromide, EtBr) を含有する2.5%エポキシ・コロイドにより電気泳動を行い、紫外線の下に

【 0 0 3 5 】

表1 メチル化特異的PCR (MSP) の使用するMSPプライマーの配列

遺伝子の 名称	プライマーの種類	プライマーの配列	
DBC1	M ポジティブセンス (F')	5' gtttctgctgttttctgctggagatc 3'	(SEQ ID No : 5)
	アンチセンス (R')	5' gctctcgctctcgctattactcgcct 3'	(SEQ ID No : 6)
PDE8B	M ポジティブセンス (F')	5' tgtgtatgcgcggttttctgttc 3'	(SEQ ID No : 7)
	アンチセンス (R')	5' acctatataatccgcgcctcgcgc 3'	(SEQ ID No : 8)
PTPRR	M ポジティブセンス (F')	5' cggcgttggtgatgttagtagtc 3'	(SEQ ID No : 9)
	アンチセンス (R')	5' aattacgaataaaaaaacaaaacgcgc 3'	(SEQ ID No : 10)
ZNF582	M ポジティブセンス (F')	5' tgacggtttttgtttatcggttatc 3'	(SEQ ID No : 11)
	アンチセンス (R')	5' cgaacgcaaacgtacctacgc 3'	(SEQ ID No : 12)

30

40

【 0 0 3 6 】

プライマーの種類Mが、メチル化の遺伝子配列を均一的に識別できるMSPプライマーを表示する。

【 0 0 3 7 】

全てのサンプルが、何れも少なくとも2回の独立な重亜硫酸塩修飾作用およびメチル化特異的PCRを行い、メチル化の遺伝子配列を均一的に識別できるMSPプライマー (M) を使用して行うPCR反応の中に、同一のサンプル方法によりPCR生成物を2回以上に合成すれば、該サンプルがメチル化を有することを看做し、メチル化の遺伝子配列を均一的に識別で

50

きるMSPプライマー（M）を使用し増殖するPCR生成物を、pCR4-TOPOキャリア（Invitrogen, Carlsbad, CA）の中に選択・繁殖し、少なくとも5個の独立なクローン（clones）を選択して重亜硫酸塩・シーケンシング（BS）を行い、重亜硫酸塩・シーケンシング（BS）の使用するプライマーが、表2に示す通りで、377オートマチック・シーケンサー（Applied Biosystems, Foster City, CA）を使用し、重亜硫酸塩・シーケンシングを行うが、そのシーケンシングの結果が、シーケンス・チャートに示す通りで、重亜硫酸塩・シーケンシングの配列番号が、それぞれDBC1_BS（SEQ ID No : 21）、PDE8B_BS（SEQ ID No : 22）、PTPRR_BS（SEQ ID No : 23）とZNF582_BS（SEQ ID No : 24）となる。

【 0 0 3 8 】

表2 重亜硫酸塩・シーケンシング（BS）の使用するプライマーの配列

遺伝子の名称	プライマーの種類	プライマーの配列	
DBC1	M ポジティブセンス (F')	5' ggtaagtttttttgygtagtt 3'	(SEQ ID No : 13)
	アンチセンス (R')	5' tactccctctacctccrctctctc 3'	(SEQ ID No : 14)
PDE8B	M ポジティブセンス (F')	5' ttgtggytagaggatttagttggt 3'	(SEQ ID No : 15)
	アンチセンス (R')	5' ctaaaaacraacccatccctc 3'	(SEQ ID No : 16)
PTPRR	M ポジティブセンス (F')	5' ggaattttatgtgaaattttttgtt 3'	(SEQ ID No : 17)
	アンチセンス (R')	5' cccacttcaataaaaatactataaaaaaac 3'	(SEQ ID No : 18)
ZNF582	M ポジティブセンス (F')	5' tagtgayggtttttgtttattggttatt 3'	(SEQ ID No : 19)
	アンチセンス (R')	5' taaacrtaaaaacaacccrctct 3'	(SEQ ID No : 20)

【 0 0 3 9 】

実施例2 子宮頸癌のメチル化ターゲット遺伝子の選別

CpG island-Plus-Promoterアレイ（CpG island-Plus-Promoter arrays）により選別を行った後に、子宮頸癌細胞に高度なメチル化現象を具備できる4個のターゲット遺伝子を選別し、それぞれがDBC1（SEQ ID No : 1）、PDE8B（SEQ ID No : 2）、PTPRR（SEQ ID No : 3）とZNF582（SEQ ID No : 4）となり、その詳細なデータが表3に示す通りで、表3より了解できるのは、この4個の遺伝子が既知のDBC1と膀胱癌との関連性の以外に、目前に該等遺伝子と子宮頸癌との間の関連性を示す研究が非常に少なくなる。

【 0 0 4 0 】

表3 CpG island-Plus-Promoterアレイにより子宮頸癌細胞中にメチル化を有する遺伝子を、選別する詳細なデータ

遺伝子の名称	UniGene番号	染色体の位置決め	遺伝子の全名	SEQ ID No
DBC1	NM_014618	9q32-q33	Deleted in bladder cancer 1	SEQ ID No : 1
PDE8B	NM_003719	5q14.1	phosphodiesterase 8B	SEQ ID No : 2
PTPRR	NM_002849	12q15	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	SEQ ID No : 3
ZNF582	NM_144690	19q13.43	zinc finger protein 582	SEQ ID No : 4

10

20

30

40

50

【 0 0 4 1 】

実施例3 重亜硫酸塩・シークエンシング (BS) による子宮頸病変サンプルの中におけるターゲット遺伝子のメチル化状態の分析

ターゲット遺伝子：PTPRR

試験サンプルのグループ：

1. HeLa子宮頸癌細胞株 (HeLa_0)、
2. 10 μMのDNAメチル転移酵素抑制剤5' - a z a - 2' -deoxycytidine (AZC) のHeLa子宮頸癌細胞株 (HeLa_10D) を処理すること、
3. 10 μMのDNAメチル転移酵素抑制剤5' - a z a - 2' -deoxycytidine (AZC) と0.33 μMのTSA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) のHeLa子宮頸癌細胞株 (HeLa_DT) を同時に処理すること、
4. 子宮頸部腺癌サンプル (AC)、
5. 子宮頸の鱗状細胞癌サンプル (SCC)、
6. 対照群 (normal) : 正常な子宮頸の血液DNAをメチル化無しの対照群とすること。

10

【 0 0 4 2 】

前記の各試験サンプルが、重亜硫酸塩の修飾を経た後に、続いて重亜硫酸塩・シークエンシング (BS) により、各試験サンプルの中におけるターゲット遺伝子 (PTPRR) に高度なメチル化 (hypermethylation) 現象を存在するかどうかを分析し、結果が図1に示す通りで、黒色がメチル化の区域を表示し、白色がメチル化無しの区域を表示する。ターゲット遺伝子PTPRR h は、対照群と腺癌の中にメチル化現象が無く、HeLa子宮頸癌細胞株 (HeLa_0) と子宮頸の鱗状細胞癌サンプル (SCC) の中に、ターゲット遺伝子PTPRRが高度なメチル化現象を呈する。従ってPTPRRのメチル化の度合いにより、子宮頸癌にかかるかどうかを検診できるために用いられる。

20

【 0 0 4 3 】

その他に、子宮頸癌サンプルの中にターゲット遺伝子のメチル化の度合いがDNAメチル化作用を介して調整するかどうかを確認するために、10 μMのDNAメチル転移酵素抑制剤5' - a z a - 2' -deoxycytidine (AZC) (Sigma Chemical Co.) により、HeLa子宮頸癌細胞株を処理し、更に該細胞から抽出されたDNAサンプルが、重亜硫酸塩の修飾を経た後に、続いて重亜硫酸塩・シークエンシング (BS) をする。結果が図 1 Aに示す通りで、子宮頸の鱗状細胞癌サンプル (SCC) とHeLa子宮頸癌細胞株 (HeLa_0) を比較すると、AZC処理を経た後のHeLa子宮頸癌細胞株 (HeLa_10D) は、そのターゲット遺伝子PTPRRが一部分の区域にメチル化を既に除去することを、表示する。

30

【 0 0 4 4 】

trichostatin A (TSA) が、アセト酵素抑制剤 (histone deacetylase (HDAC) inhibitors) を除去するために、更にメチル化の度合いをも低減・弱化するように用いられることが出来る。HeLa子宮頸癌細胞株がAZCとTSA (HeLa_DT) を同時に処理させるが、その結果が図 1 Aに示す通りで、子宮頸の鱗状細胞癌サンプル (SCC) とHeLa子宮頸癌細胞株 (HeLa_0) を互いに比較すると、AZCとTSA処理を経た後のHeLa子宮頸癌細胞株 (HeLa_DT) は、そのターゲット遺伝子PTPRRが大幅に脱メチル化されることを示す。

40

【 0 0 4 5 】

前記の結果を総合し、子宮頸癌サンプルの中に、ターゲット遺伝子PTPRRが確かにDNAメチル化作用を経由してメチル化されてもよい。

【 0 0 4 6 】

ターゲット遺伝子：ZNF582

試験サンプルのグループ：

1. HeLa子宮頸癌細胞株 (HeLa_0)、
2. 10 μMのDNAメチル転移酵素抑制剤5' - a z a - 2' -deoxycytidine (AZC) のHeLa子宮頸癌細胞株 (HeLa_10D) を処理すること、
3. 10 μMのDNAメチル転移酵素抑制剤5' - a z a - 2' -deoxycytidine (AZC) と0.33 μMのTSAのHeLa子宮頸癌細胞株 (HeLa_DT) を同時に処理すること、

50

4. 子宮頸の鱗状細胞癌サンプル1 (SCC1)、
5. 子宮頸の鱗状細胞癌サンプル2 (SCC2)、
6. 対照群 (normal) : 正常な子宮頸の血液DNAをメチル化無しの対照群とすること。

【0047】

その中でも、子宮頸の鱗状細胞癌のサンプル1とサンプル2が、それぞれ異なる患者のサンプルである。

【0048】

前記の試験サンプルが、重亜硫酸塩・シーケンシング (BS) により、各試験サンプルの中におけるターゲット遺伝子 (ZNF582) に高度なメチル化 (hypermethylation) 現象を存在するかどうかを分析し、結果が図1Bに示す通りで、対照群と互いに比較すると、ターゲット遺伝子ZNF582における子宮頸の鱗状細胞癌サンプル1 (SCC1)、子宮頸の鱗状細胞癌サンプル2 (SCC2) 及びHeLa子宮頸癌細胞株 (HeLa_0) が、高度なメチル化現象を呈する。従ってターゲット遺伝子ZNF582が、子宮頸癌サンプルの中に高度なメチル化されてもよい。

【0049】

ターゲット遺伝子: PDE8B

試験サンプルのグループ:

1. SiHa子宮頸癌細胞株 (SiHa_0)、
2. 10 μMのDNAメチル転移酵素抑制剤5' - a z a - 2' -deoxycytidine (AZC) のSiHa子宮頸癌細胞株 (SiHa_10D) を処理すること、
3. 10 μMのDNAメチル転移酵素抑制剤5' - a z a - 2' -deoxycytidine (AZC) と0.33 μMのTSAのSiHa子宮頸癌細胞株 (SiHa_DT) を同時に処理すること、
4. 子宮頸の鱗状細胞癌サンプル1 (SCC1)、
5. 子宮頸の鱗状細胞癌サンプル2 (SCC2)、
6. 対照群 (normal) : 正常な子宮頸の血液DNAをメチル化無しの対照群とすること。

【0050】

その中でも、子宮頸の鱗状細胞癌のサンプル1とサンプル2が、それぞれ異なる患者のサンプルである。

【0051】

前記の試験サンプルが、重亜硫酸塩・シーケンシング (BS) により、各試験サンプルの中におけるターゲット遺伝子 (PDE8B) に高度なメチル化 (hypermethylation) 現象を存在するかどうかを分析し、結果が図1Cに示す通りで、対照群と互いに比較すると、ターゲット遺伝子PDE8Bにおける子宮頸の鱗状細胞癌サンプル1 (SCC1)、子宮頸の鱗状細胞癌サンプル2 (SCC2) 及びSiHa子宮頸癌細胞株 (SiHa_0) が、高度なメチル化現象を呈する。従ってターゲット遺伝子PDE8Bが、子宮頸癌サンプルの中に高度なメチル化されてもよい。

【0052】

ターゲット遺伝子: DBC1

試験サンプルのグループ:

1. SiHa子宮頸癌細胞株 (SiHa_0)、
2. 10 μMのDNAメチル転移酵素抑制剤5' - a z a - 2' -deoxycytidine (AZC) のSiHa子宮頸癌細胞株 (SiHa_10D) を処理すること、
3. 10 μMのDNAメチル転移酵素抑制剤5' - a z a - 2' -deoxycytidine (AZC) と0.33 μMのTSAのSiHa子宮頸癌細胞株 (SiHa_DT) を同時に処理すること、
4. 子宮頸の鱗状細胞癌サンプル1 (SCC1)、
5. 子宮頸の鱗状細胞癌サンプル2 (SCC2)、
6. 対照群 (normal) : 正常な子宮頸の血液DNAをメチル化無しの対照群とすること。

【0053】

その中でも、子宮頸の鱗状細胞癌のサンプル1とサンプル2が、それぞれ異なる患者のサンプルである。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 4 】

前記の試験サンプルが、重亜硫酸塩・シークエンシング（BS）により、各試験サンプルの中におけるターゲット遺伝子（DBC1）に高度なメチル化（hypermethylation）現象を存在するかどうかを分析し、結果が図1Dに示す通りで、対照群と互いに比較すると、ターゲット遺伝子DBC1における子宮頸の鱗状細胞癌サンプル1（SCC1）、子宮頸の鱗状細胞癌サンプル2（SCC2）及びSiHa子宮頸癌細胞株（SiHa_0）が、高度なメチル化現象を呈する。従ってターゲット遺伝子DBC1が、子宮頸癌サンプルの中に高度なメチル化されてもよい。

【 0 0 5 5 】

実施例4 子宮頸癌サンプルの内におけるターゲット遺伝子のメチル化の分析

メチル化特異的PCR（MSP）により、該子宮頸の鱗状細胞癌（SCC）サンプルの中における4個のターゲット遺伝子のメチル化状態を分析し、そのメチル化状態の分析結果が、表4に示す通りで、結果を示し、正常な子宮頸サンプルの中におけるDBC1、PDE8B、PTPRRとZNF582のメチル化の周波数が、それぞれ11%、0%、9%と6%となり、子宮頸の鱗状細胞癌サンプルの中におけるDBC1、PDE8B、PTPRRとZNF582のメチル化の周波数が、それぞれ100%、47%、100%と97%となる。これにより了解できるのは、子宮頸の鱗状細胞癌サンプルの中に、該4個の遺伝子が何れも大幅にメチル化される。従ってDBC1、PDE8B、PTPRRとZNF582のメチル化の度合いが、確かに子宮頸癌を検診する検診指標と看做してもよい。

10

【 0 0 5 6 】

表4 子宮頸の鱗状細胞癌サンプルの中におけるターゲット遺伝子のメチル化状態の分析

20

ターゲット遺伝子のメチル化の周波数（%）		
	正常な子宮頸サンプル (n=54)	子宮頸の鱗状細胞癌サンプル (n=30)
DBC1	11%	100%
PDE8B	0%	47%
PTPRR	9%	100%
ZNF582	6%	97%

30

【 0 0 5 7 】

実施例5 卵巣腫瘍サンプルの内におけるターゲット遺伝子のメチル化の分析

メチル化特異的PCR（MSP）により、卵巣腫瘍サンプルの中におけるターゲット遺伝子のメチル化状態を分析し、そのメチル化状態の分析結果が、表5に示す通りで、卵巣悪性腫瘍サンプル及び卵巣良性腫瘍サンプルの中におけるDBC1、PTPRRとZNF582のこの3個の遺伝子のメチル化状態を分析し、結果を示すように、卵巣悪性腫瘍サンプルの中におけるDBC1、PTPRRとZNF582のメチル化の周波数が、それぞれ50.3%、50.0%と56.3%となり、卵巣良性腫瘍サンプルの中におけるDBC1、PTPRRとZNF582のメチル化の周波数が、それぞれ2.5%、0.0%と12.5%となる。そのメチル化の差異の度合いが、それぞれ53.8%、50.0%と43.8%となる。従って、卵巣良性腫瘍サンプルと比較すると、該卵巣悪性腫瘍サンプルの中における3個の遺伝子のメチル化状態が、著しく大幅に高くなる。従ってDBC1、PTPRRとZNF582のメチル化の度合いが、確かに卵巣癌を検診する検診指標と看做してもよい。

40

【 0 0 5 8 】

表5 卵巣腫瘍サンプルの中におけるターゲット遺伝子のメチル化状態の分析

	卵巣悪性腫瘍 (n=28)	卵巣良性腫瘍 (n=28)	メチル化の度合いの差異
DBC1	56.3%	2.5%	53.8%
PTPRR	50.0%	0.0%	50.0%
ZNF582	56.3%	12.5%	43.8%

10

【0059】

実施例6 大腸癌サンプルの中におけるターゲット遺伝子のメチル化の分析

メチル化特異的PCR (MSP) により、大腸癌サンプルの中におけるターゲット遺伝子のメチル化状態を分析し、そのメチル化状態の分析結果が、表6に示す通りで、大腸癌サンプルの中におけるDBC1, PDE8B, PTPRRとZNF582のこの4個の遺伝子のメチル化状態を分析し、結果を示すように、大腸癌サンプルの中におけるDBC1, PDE8B, PTPRRとZNF582のメチル化の周波数が、それぞれ100.0%、100.0%、100.0%と100.0%となり、正常な大腸組織サンプルの中におけるDBC1, PDE8B, PTPRRとZNF582のメチル化の周波数が、それぞれ25.0%、25.0%、25.0%と25.0%となる。従って、正常な大腸組織サンプルと比較すると、該大腸癌サンプルの中における4個の遺伝子のメチル化状態が、著しく大幅に高くなる。従ってDBC1, PDE8B, PTPRRとZNF582のメチル化の度合いが、確かに大腸癌を検診する検診指標と看做してもよい。

20

【0060】

表6 大腸癌サンプルの中におけるターゲット遺伝子のメチル化状態の分析

	ターゲット遺伝子のメチル化の周波数 (%)	
	正常な大腸組織サンプル (n=24)	大腸癌サンプル (n=20)
DBC1	25%	100%
PDE8B	25%	100%
PTPRR	25%	100%
ZNF582	25%	100%

30

【0061】

本発明の提供する癌診断の方法は、前記の従来技術と互いに比較する時に、下記の利点を更に有する。

40

【0062】

1. 本発明の提供する癌検診の方法は、イン・ビトロの検体中における特定な遺伝子のメチル化の度合いを、癌の有無の診断指標と看做し、子宮頸管スミア及びヒトパピローマウイルス検査 (HPV testing) の方法と比較する時に、本発明の癌診断方法の敏感性と均一性が何れも前記の両者よりも高くなる。

【0063】

2. 本発明の提供する癌検診の方法は、第1線の子宮頸癌の検診と看做してもよい以外に、更にヒトパピローマウイルス検査 (HPV testing) をも合併または補助して検査・実験でき、第2線の子宮頸癌の検診と看做すことにより、より正確な子宮頸癌の検診効果を達

50

成できる。

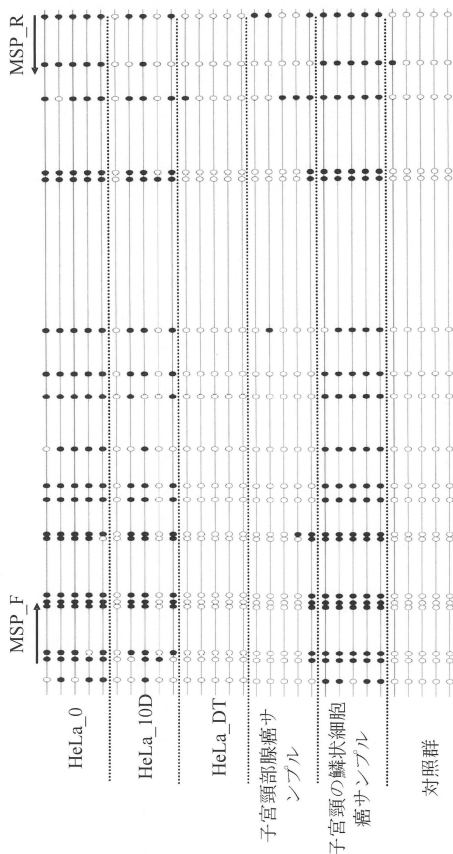
【0064】

3.本発明の提供する癌診断の方法は、子宮頸癌の検査・測定の上に応用できる以外に、更に他の癌（例えば卵巣癌、大腸癌）の検査・測定の上に応用することにより、異状検体の診断を補助してもよい。

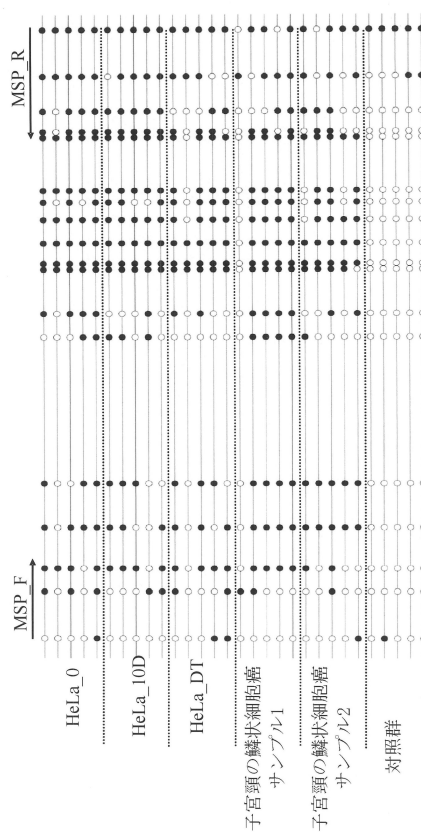
【0065】

以上の叙述は、ただ本発明のより好ましい実施例のみで、本発明に対して説明性だけで、そして限定性がない。当業界の技術者の理解により、本発明の特許請求の範囲に限定される精神および範囲内に数多くの変更、修正、さらに等価な効果を行ってもよく、例えば被検査者の検体中に各ターゲット遺伝子のメチル化度合いの判断方式などの変化の等価な実施例が、何れも本発明の特許請求の範囲中に含まれるべきである。

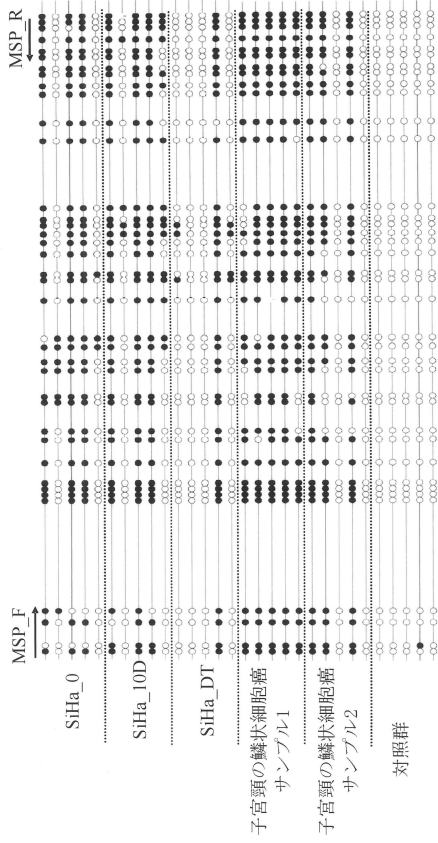
【図1A】



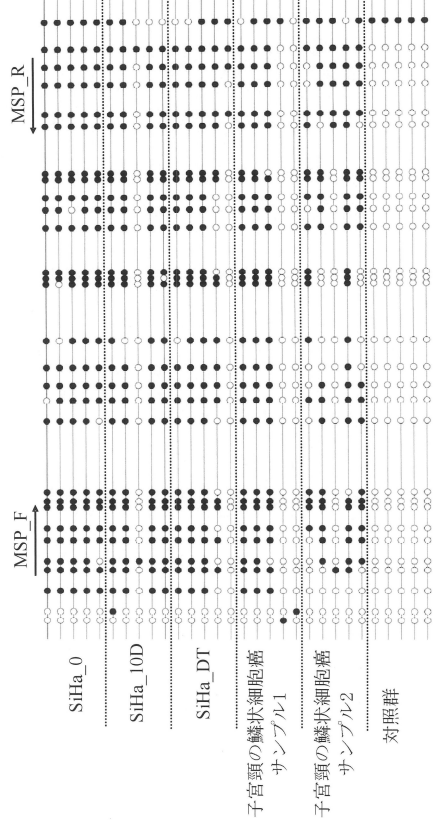
【図1B】



【 1 C 】



【 1 D 】



【 配列表 】

000604318500001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 特表2008-502332(JP,A)

Mod. Pathol. , 2008 , Vol. 21 , No. 5 , p. 632 - 638

Cell Res. , 2003 , Vol. 13 , No. 5 , p. 319 - 333

Hum. Mol. Genet. , Feb. 2009 , Vol. 18 , No. 10 , p. 1755
- 1768

J. Clin. Oncol. , 2004 , Vol. 22 , No. 22 , p. 4632 - 4642

Clin. Cancer Res. , 2006 , Vol. 12 , No. 22 , p. 6626 - 6
636

Cancer Res. , 2006 , Vol. 66 , No. 12 , p. 6118 - 6128

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/00

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

CPlus / BIOSIS / MEDLINE / EMBASE / WPIDS (STN)

专利名称(译)	癌症检查方法		
公开(公告)号	JP6043185B2	公开(公告)日	2017-02-22
申请号	JP2012505025	申请日	2009-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	頼鴻政		
申请(专利权)人(译)	▲頼▼鴻政		
当前申请(专利权)人(译)	國防醫學院		
[标]发明人	頼鴻政		
发明人	▲頼▼鴻政		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/04 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2537/164 C12Q2600/154		
FI分类号	C12Q1/68.A C12Q1/04.ZNA G01N33/53.M		
其他公开文献	JP2012523822A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

筛选癌症的方法包括以下步骤：(1) 提供试样；(2) 检测试样基因组DNA中至少一个靶基因中CpG序列的甲基化率，其中靶基因由PTPRR，ZNF582，PDE8B和DBC1组成；(3) 根据至少一种靶基因中甲基化状态的存在与否，判断标本中是否存在癌症或癌变；其中检测甲基化状态的方法是甲基化特异性PCR (MSP)，定量甲基化特异性PCR (QMSP)，亚硫酸氢盐测序 (BS)，微阵列，质谱仪，变性高效液相色谱 (DHPLC) 等。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6043185号 (P6043185)
(45) 発行日 平成29年2月22日 (2017. 2. 22)	(24) 登録日 平成28年11月18日 (2016. 11. 18)	
(51) Int. Cl. F 1		
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/04 (2006. 01)	A
C 1 2 Q 1/04 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 (2006. 01)	Z N A M
請求項の数 22 (全 17 頁)		
(21) 出願番号 特願2012-505025 (P2012-505025)	(73) 特許権者 512297538 國防醫學院 台湾台北市内湖區民權東路6段161號	
(86) (22) 出願日 平成21年4月17日 (2009. 4. 17)		
(65) 公表番号 特表2012-523822 (P2012-523822A)	(74) 代理人 100082418 弁理士 山口 翔生	
(63) 公表日 平成24年10月11日 (2012. 10. 11)		
(88) 国際出願番号 PCT/CN2009/000411	(72) 発明者 ▲頼▼鴻政 台湾台北市成功路二段325号5楼	
(87) 国際公開番号 W02010/118559		
(87) 国際公開日 平成22年10月21日 (2010. 10. 21)		
審査請求日 平成23年10月17日 (2011. 10. 17)	合議体	
審査番号 不願2014-22337 (P2014-22337/1)	審判長 田村 明照	
審判請求日 平成26年11月4日 (2014. 11. 4)	審判官 三原 健治	
	審判官 中島 庸子	
	最終頁に続く	

(64) 【発明の名称】 癌検査の方法