

Specimen	423	424	425	426	427	428	429	430	431	Specimen	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460
PLN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PLN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PLN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PLN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PLN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PLN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PLN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PLN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PLN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PLN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PLN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PLN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PLN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	MBN71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																		

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

胎児を身ごもった妊娠女性において妊娠 - 関連障害を検出又はモニタリングする方法であって：

(a) 女性から生物学的試料を得る工程であり、ここで試料は、全血、血清、血漿、尿又は唾液である工程；

(b) 試料中の CpG - 含有ゲノム配列のメチル化状態を決定する工程であり、ここで胎児由来のゲノム配列及び女性由来のゲノム配列が、示差的にメチル化され、これにより試料中の女性由来のゲノム配列と胎児由来のゲノム配列を識別し、ここで該ゲノム配列は、長さが少なくとも 15 個のヌクレオチドであり、少なくとも 1 個のシトシンを含み、そして第 21 染色体上の領域内にあり、ここで、該領域は、(1) CGI137、ホスホジエステラーゼ 9A (PDE9A)、ホモ・サピエンスタンパク質ホスファターゼ 1、調節(阻害)サブユニット 2 偽遺伝子 2 (PPP1R2P2)、Fem1A (シーエレガンス)への類似、CGI009、カルボニルレダクターゼ 1 (CBR1)、ダウン症細胞接着分子 (DSCAM)、及び第 21 染色体オープンリーディングフレーム 29 (C21orf29)、ホロカルボキシラーゼ合成酵素 (HLCs)、及び CGI132 からなる群より選択される、ゲノム遺伝子座；並びに、(2) この遺伝子座から 10 kb を超えない上流及び/又は下流の DNA 配列：からなる、工程；

(c) 胎児由来のゲノム配列のレベルを決定する工程；並びに

(d) 胎児由来のゲノム配列のレベルを、標準対照と比較する工程であり、ここで標準対照からの増加又は減少は、妊娠 - 関連障害の存在又は進行を示す工程：を含む、方法。

【請求項 2】

女性由来のゲノム配列がメチル化され、そして胎児由来のゲノム配列がメチル化されない、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

女性由来のゲノム配列がメチル化されず、そして胎児由来のゲノム配列がメチル化される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記工程 (b) が、試料をメチル化された及びメチル化されない DNA を示差的に修飾する試薬で処理することによって実行される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

前記試薬が、亜硫酸水素塩を含む、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

前記試薬が、メチル化された DNA を優先的に切断する 1 種又は複数の酵素を含む、請求項 4 記載の方法。

【請求項 7】

前記試薬が、メチル化されない DNA を優先的に切断する 1 種又は複数の酵素を含む、請求項 4 記載の方法。

【請求項 8】

前記工程 (b) が、メチル化 - 特異的 PCR により実行される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

胎児を身ごもった妊娠女性において妊娠 - 関連障害を検出又はモニタリングする方法であり：

(a) 女性由来の生物学的試料中の DNA を得る工程であり、ここで試料は、全血、血清、血漿、尿又は唾液である工程；

(b) 工程 (a) 由来の DNA を、亜硫酸水素塩で処理する工程；並びに

(c) 工程 (b) 由来の DNA 及び 2 種のプライマーを用いて増幅反応を実行し、CpG - 含有ゲノム配列を増幅する工程であり、ここで該ゲノム配列は、長さが少なくとも 15 個のヌクレオチドであり、少なくとも 1 個のシトシンを含み、そして第 21 染色体上の領域内にあり、ここで該領域は、(1) CGI137、ホスホジエステラーゼ 9A (PD

10

20

30

40

50

E 9 A)、ホモ・サピエンスタンパク質ホスファターゼ 1、調節(阻害)サブユニット 2 偽遺伝子 2 (P P P 1 R 2 P 2)、F e m 1 A (シーエレガンス)への類似、C G I 0 0 9、カルボニルレダクターゼ 1 (C B R 1)、ダウン症細胞接着分子 (D S C A M)、第 2 1 染色体オープンリーディングフレーム 2 9 (C 2 1 o r f 2 9)、ホロカルボキシラーゼ合成酵素 (H L C S)、及び C G I 1 3 2 からなる群より選択される、ゲノム遺伝子座；並びに、(2)この遺伝子座から 1 0 k b を超えない上流及び/又は下流の D N A 配列：からなり；

並びに、ここで 2 種のプライマーの少なくとも 1 種は、胎児由来のゲノム配列へ示差的に結合する工程；並びに

(d)工程(c)由来のゲノム配列の増幅された部分のレベルを、標準対照と比較する工程であり、ここで標準対照からの増加又は減少は、妊娠-関連障害の存在又は進行を示す工程：を含む、方法。

【請求項 1 0】

前記増幅反応が、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) である、請求項 9 記載の方法。

【請求項 1 1】

前記増幅反応が、メチル化-特異的 P C R である、請求項 9 記載の方法。

【請求項 1 2】

前記増幅反応が、核酸配列に基づく増幅である、請求項 9 記載の方法。

【請求項 1 3】

前記増幅反応が、鎖置換反応である、請求項 9 記載の方法。

【請求項 1 4】

前記増幅反応が、分枝 D N A 増幅反応である、請求項 9 記載の方法。

【請求項 1 5】

妊娠-関連障害が、子癇前症である、請求項 1 又は 9 記載の方法。

【請求項 1 6】

妊娠-関連障害が、早期分娩である、請求項 1 又は 9 記載の方法。

【請求項 1 7】

妊娠-関連障害が、妊娠悪阻である、請求項 1 又は 9 記載の方法。

【請求項 1 8】

妊娠-関連障害が、異所性妊娠である、請求項 1 又は 9 記載の方法。

【請求項 1 9】

妊娠-関連障害、染色体異数性である、請求項 1 又は 9 記載の方法。

【請求項 2 0】

妊娠-関連障害が、トリソミー 2 1 である、請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 1】

妊娠-関連障害が、子宮内発育遅延である、請求項 1 又は 9 記載の方法。

【請求項 2 2】

妊娠-関連障害を検出及びモニタリングする方法であり；

(a)女性由来の生物学的試料中の D N A を得る工程であり、ここで試料は、全血、血清、血漿、尿又は唾液である工程；

(b)工程(a)由来の D N A を、メチル化された及びメチル化されない D N A を示差的に修飾する試薬で処理する工程；

(c)工程(b)由来の C p G - 含有ゲノム配列ヌクレオチド配列を決定する工程であり、ここでゲノム配列は、長さが少なくとも 1 5 個のヌクレオチドであり、少なくとも 1 個のシトシンを含み、そして第 2 1 染色体上の領域内にあり、ここで該領域は、(1)C G I 1 3 7、ホスホジエステラーゼ 9 A (P D E 9 A)、ホモ・サピエンスタンパク質ホスファターゼ 1、調節(阻害)サブユニット 2 偽遺伝子 2 (P P P 1 R 2 P 2)、F e m 1 A (シーエレガンス)への類似、C G I 0 0 9、カルボニルレダクターゼ 1 (C B R 1)、ダウン症細胞接着分子 (D S C A M)、及び第 2 1 染色体オープンリーディングフレーム 2 9 (C 2 1 o r f 2 9)、ホロカルボキシラーゼ合成酵素 (H L C S)、及び C G

10

20

30

40

50

I 1 3 2 からなる群より選択される、ゲノム遺伝子座；並びに、(2) この遺伝子座から 1 0 k b を超えない上流及び / 又は下流の D N A 配列：からなる、工程；並びに

(d) 工程 (c) 由来のヌクレオチド配列のプロファイルを、標準対照と比較する工程であり、ここで標準対照からのプロファイルの変化は、妊娠 - 関連障害の存在又は進行を示す工程：を含む、方法。

【請求項 2 3】

前記試薬が、亜硫酸水素塩を含む、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 4】

前記試薬が、メチル化された D N A を優先的に切断する 1 種又は複数の酵素を含む、請求項 2 2 記載の方法。

10

【請求項 2 5】

前記試薬が、メチル化されない D N A を優先的に切断する 1 種又は複数の酵素を含む、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 6】

ゲノム配列を増幅するために、工程 (b) 由来の D N A 及び 2 種のプライマーを用いる増幅工程を更に含む、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 7】

前記増幅工程が、P C R により実行される、請求項 2 6 記載の方法。

【請求項 2 8】

前記増幅工程が、メチル化 - 特異的 P C R により実行される、請求項 2 6 記載の方法。

20

【請求項 2 9】

前記工程 (c) が、質量分析により実行される、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 3 0】

前記工程 (c) が、プライマー伸長により実行される、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 3 1】

前記工程 (c) が、ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションにより実行される、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 3 2】

前記工程 (c) が、リアル - タイム P C R により実行される、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 3 3】

工程 (c) が、電気泳動により実行される、請求項 2 2 記載の方法。

30

【請求項 3 4】

妊婦内の胎児においてトリソミー 2 1 を検出する方法であり：

(a) 女性から生物学的試料を得る工程であり、ここで試料は、全血、血清、血漿、尿又は唾液である工程；

(b) 工程 (a) 由来の試料を、メチル化された及びメチル化されない D N A を示差的に修飾する試薬で処理する工程；

(c) C p G - 含有ゲノム配列の対立遺伝子を分析する工程であり、ここでゲノム配列は、長さが少なくとも 1 5 個のヌクレオチドであり、少なくとも 1 個のシトシンを含み、そして第 2 1 染色体上の領域内にあり、ここで該領域は、(1) C G I 1 3 7、ホスホジエステラーゼ 9 A (P D E 9 A)、ホモ・サピエンスタンパク質ホスファターゼ 1、調節 (阻害) サブユニット 2 偽遺伝子 2 (P P P 1 R 2 P 2)、F e m 1 A (シーエレガンス) への類似、C G I 0 0 9、カルボニルレダクターゼ 1 (C B R 1)、ダウン症細胞接着分子 (D S C A M)、及び第 2 1 染色体オープンリーディングフレーム 2 9 (C 2 1 o r f 2 9)、ホロカルボキシラーゼ合成酵素 (H L C S)、及び C G I 1 3 2 からなる群より選択される、ゲノム遺伝子座；並びに、(2) この遺伝子座から 1 0 k b を超えない上流及び / 又は下流の D N A 配列：からなる、工程；並びに

40

(d) これらの対立遺伝子の比を決定する工程であり、ここでトリソミー 2 1 を有さない胎児を身ごもっている女性の比からの偏差は、その胎児のトリソミー 2 1 を示す工程：を含む、方法。

50

【請求項 35】

前記試薬が、亜硫酸水素塩を含む、請求項 34 記載の方法。

【請求項 36】

前記試薬が、メチル化された DNA を優先的に切断する 1 種又は複数の酵素を含む、請求項 34 記載の方法。

【請求項 37】

前記試薬が、メチル化されない DNA を優先的に切断する 1 種又は複数の酵素を含む、請求項 34 記載の方法。

【請求項 38】

メチル化された又はメチル化されないゲノム配列を増幅するために、工程 (b) の後に増幅工程を更に含む、請求項 34 記載の方法。

【請求項 39】

前記増幅工程が、PCR により実行される、請求項 38 記載の方法。

【請求項 40】

前記増幅工程が、メチル化 - 特異的 PCR により実行される、請求項 38 記載の方法。

【請求項 41】

前記工程 (c) が、質量分析により実行される、請求項 34 記載の方法。

【請求項 42】

前記工程 (c) が、プライマー伸長アッセイにより実行される、請求項 34 記載の方法。

【請求項 43】

前記工程 (c) が、リアル - タイム PCR により実行される、請求項 34 記載の方法。

【請求項 44】

前記工程 (c) が、ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションにより実行される、請求項 34 記載の方法。

【請求項 45】

前記工程 (c) が、電気泳動により実行される、請求項 34 記載の方法。

【請求項 46】

胎児由来のゲノム配列の 2 つの異なる対立遺伝子が、一塩基多型、挿入 - 欠失多型、又は単純な縦列反復配列多型を含む、請求項 34 記載の方法。

【請求項 47】

胎児を身ごもった妊娠女性における妊娠 - 関連障害を検出又はモニタリングする方法であり：

(a) 女性から生物学的試料を得る工程であり、ここで試料は、全血、血清、血漿、尿又は唾液である工程；

(b) 試料中の CpG - 含有ゲノム配列のレベルを決定する工程であり、ここで該ゲノム配列は、長さが少なくとも 15 個のヌクレオチドであり、少なくとも 1 個のメチル化されないシトシンを含み、そして第 21 染色体上の領域内にあり、ここで該領域は、(1) CGI 137、ホスホジエステラーゼ 9A (PDE9A)、ホモ・サピエンスタンパク質ホスファターゼ 1、調節 (阻害) サブユニット 2 偽遺伝子 2 (PPP1R2P2)、Fem1A (シーエレガンス) への類似からなる群より選択される、ゲノム遺伝子座；並びに、(2) この遺伝子座から 10 kb を超えない上流及び / 又は下流の DNA 配列；からなる、工程；並びに

(c) このゲノム配列のレベルを、標準対照と比較する工程であり、ここで標準対照からの増加又は減少は、妊娠 - 関連障害の存在又は進行を示す工程：を含む、方法。

【請求項 48】

胎児を身ごもった妊娠女性における妊娠 - 関連障害を検出又はモニタリングする方法であり：

(a) 女性から生物学的試料を得る工程であり、ここで試料は、全血、血清、血漿、尿又は唾液である工程；

10

20

30

40

50

(b) 試料中の CpG - 含有ゲノム配列のレベルを決定する工程であり、ここで該ゲノム配列は、長さが少なくとも 15 個のヌクレオチドであり、少なくとも 1 個のメチル化されたシトシンを含み、そして第 21 染色体上の領域内にあり、ここで該領域は、(1) CGI009、カルボニルレダクターゼ 1 (CBR1)、ダウン症細胞接着分子 (DSCAM)、第 21 染色体オープンリーディングフレーム 29 (C21orf29)、ホロカルボキシラーゼ合成酵素 (HLCS)、及び CGI132 からなる群より選択される、ゲノム遺伝子座；並びに、(2) この遺伝子座から 10 kb を超えない上流及び / 又は下流の DNA 配列：からなる、工程；並びに

(c) このゲノム配列のレベルを、標準対照と比較する工程であり、ここで標準対照からの増加又は減少は、妊娠 - 関連障害の存在又は進行を示す工程：を含む、方法。

10

【請求項 49】

前記工程 (b) が、血液試料中に存在する DNA を、メチル化された及びメチル化されないシトシンを示差的に修飾する試薬で処理する工程を含む、請求項 47 又は 48 記載の方法。

【請求項 50】

前記試薬が、亜硫酸水素塩を含む、請求項 49 記載の方法。

【請求項 51】

前記試薬が、メチル化されたシトシンを含む DNA を優先的に切断する 1 種又は複数の酵素を含む、請求項 49 記載の方法。

【請求項 52】

前記試薬が、メチル化されないシトシンを含む DNA を優先的に切断する 1 種又は複数の酵素を含む、請求項 49 記載の方法。

20

【請求項 53】

前記工程 (b) が、増幅反応を含む、請求項 47 又は 48 記載の方法。

【請求項 54】

前記増幅反応が、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) である、請求項 53 記載の方法。

【請求項 55】

前記 PCR が、メチル化 - 特異的 PCR である、請求項 54 記載の方法。

【請求項 56】

前記増幅反応が、核酸配列ベースの増幅である、請求項 53 記載の方法。

30

【請求項 57】

前記増幅反応が、鎖置換反応である、請求項 53 記載の方法。

【請求項 58】

前記増幅反応が、分枝 DNA 増幅反応である、請求項 53 記載の方法。

【請求項 59】

ゲノム DNA 配列のレベルが、電気泳動により決定される、請求項 47 又は 48 記載の方法。

【請求項 60】

ゲノム DNA 配列のレベルが、ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションにより決定される、請求項 47 又は 48 記載の方法。

40

【請求項 61】

妊娠 - 関連障害が、子癇前症である、請求項 47 又は 48 記載の方法。

【請求項 62】

妊娠 - 関連障害が、早期分娩である、請求項 47 又は 48 記載の方法。

【請求項 63】

妊娠 - 関連障害が、妊娠悪阻である、請求項 47 又は 48 記載の方法。

【請求項 64】

妊娠 - 関連障害が、異所性妊娠である、請求項 47 又は 48 記載の方法。

【請求項 65】

妊娠 - 関連障害が、トリソミー 21 である、請求項 47 又は 48 記載の方法。

50

【請求項 6 6】

妊娠 - 関連障害が、子宮内発育遅延である、請求項 4 7 又は 4 8 記載の方法。

【請求項 6 7】

ゲノム配列が、C p G アイランドである、請求項 1、9、22、34、47 又は 4 8 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2006年5月3日に出願された、米国特許仮出願第60/797,456号の優先権を主張するものであり、この仮出願の内容は全体が本明細書に参照として組入れられている。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

妊娠又は出産時の合併症の可能性及び胎児の遺伝的欠陥を含む、妊娠に関連した状態の早期検出は、母体と胎児の両方の安全に必要な早期の医学的介入を可能にするので、これは極めて重大である。出生前診断は、絨毛膜絨毛検査(CVS)又は羊水穿刺のような手法により胎児から単離された細胞を用い、慣習的に行われている。しかしこれらの従来の方法は、侵襲的であり、かつ最も慎重な操作であっても母体と胎児の両方に予測不可能なリスクが存在する(Taborら, Lancet 1:1287-1293, 1986)。

【0003】

これらの侵襲的アプローチの代替が、いくつかの種類の胎児細胞が母体循環系に認められ(Johansenら, Prenat. Diagn. 15:921-931, 1995)、そしてより重要なことに、細胞 - 非含有胎児DNAの循環を、母体血漿及び血清中に検出することができる(Loら, Lancet 350:485-487, 1997)という発見に従い、例えば胎児の異常を検出するための出生前スクリーニングのために開発されている。母体血液中の胎児DNAの量は、胎児細胞を単離しかつ濃厚化する工程を必要とする代替法とは対照的に、血漿又は血清の複雑な処置を行うことのない遺伝解析に十分であることが示されている。胎仔アカゲザル(Fetal rhesus) D (RhD) 遺伝子多型解析(Loら, N. Engl. J. Med. 339:1734-1738, 1998)、胎児の性別診断(Costaら, N. Engl. J. Med. 346:1502, 2002)、及びいくつかの胎児障害の診断(Amicucciら, Clin. Chem. 46:301-302, 2000; Saitoら, Lancet 356:1170, 2000; 及び、Chiuら, Lancet 360:998-1000, 2002)は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)をベースにした技術を使用し、母体の血漿又は血清中の胎児のDNAを検出することにより実現されている。

【0004】

加えて、母体血漿/血清中の胎児DNAの定量的異常が、子癇前症(Loら, Clin. Chem. 45:184-188, 1999、及び、Zhongら, Am. J. Obstet. Gynecol. 184:414-419, 2001)、胎児トリソミー21(Loら, Clin. Chem. 45:1747-1751, 1999、及びZhongら, Prenat. Diagn. 20:795-798, 2000)、及び妊娠悪阻(Sekizawaら, Clin. Chem. 47:2164-2165, 2001)において報告されている。出生前遺伝解析のための母体血液中の胎児核酸の検出も、米国特許第6,258,540号に開示されている。

【0005】

母体血液中に存在する胎児RNAも、妊娠 - 関連した状態の診断道具として確立されている。例えば米国特許出願第09/876,005号は、母体血液中の胎児RNAの検出を基にした非侵襲的技術を開示し; 米国特許出願第10/759,783号は更に、母体血液中に存在するある種のmRNA種(例えば、hCG、hCRH、hPL、KISS1、TPFI2、及びPLACL)の量は、子癇前症、胎児の染色体異数性、及び早期分娩のような妊娠 - 関連障害の診断、モニタリング、又は予測のマーカーとして使用することができることを開示している。

【0006】

10

20

30

40

50

このDNAの安定性は、胎児DNA - ベースの診断に関する利点を提供するが、ひとつの重要な制限がこのアプローチには存在する：胎児及び母体の両方のDNAは、妊婦の血液の非細胞(acellular)部分、例えば血清又は血漿に存在する。従って、正確な診断を確実にするためには、胎児DNAを母体DNAから識別することが必要である。胎児及び母体DNAは、それらの異なるメチル化プロファイルにより識別することができることは、第20030044388号として公開された米国特許出願第09/944,951号において、最初に開示された。Landesらは、米国特許出願公開第2003021152号において、出生前診断に、示差的メチル化マーカーを使用することができることも提唱した。本開示において、第21染色体に位置した多くのヒトゲノムDNA配列は、胎児に又は成人(例えば妊婦)に起源したゲノムDNAにおいて示差的にメチル化される領域を含む遺伝子座として最初に同定された。従って、これらの示差的にメチル化されたゲノム遺伝子座は、胎児及び母体DNAの適切な同定又は定量をもたらし、その結果出生前状態の信頼できる診断を可能にする。

10

【発明の開示】

【0007】

発明の簡単な概要

本発明の第一の態様において、胎児を身ごもった妊娠女性において妊娠 - 関連障害を検出又はモニタリングする方法が提供される。この方法は：(a)女性から生物学的試料を得る工程であり、ここで試料は、全血、血清、血漿、尿又は唾液である工程；(b)試料中のCpG-含有ゲノム配列のメチル化状態を決定する工程であり、ここで胎児由来のゲノム配列及び女性由来のゲノム配列が、示差的にメチル化され、これにより試料中の女性由来のゲノム配列と胎児由来のゲノム配列を識別し、ここで該ゲノム配列は、長さが少なくとも15個のヌクレオチドであり、少なくとも1個のシトシンを含み、及び第21染色体上の領域内にあり、並びにここでこの領域は、(1)CGI137、ホスホジエステラーゼ9A(PDE9A)、ホモ・サピエンスタンパク質ホスファターゼ1、調節(阻害)サブユニット2偽遺伝子2(PPP1R2P2)、Fem1A(シーエレガンス(Caenorhabditis elegans))への類似、CGI009、カルボニルレダクターゼ1(CBR1)、ダウン症細胞接着分子(DSCAM)、及び第21染色体オープンリーディングフレーム29(C21orf29)、ホロカルボキシラーゼ合成酵素(HLCS)、及びCGI132からなる群より選択される、ゲノム遺伝子座；並びに、(2)この遺伝子座から10kbを超えない上流及び/又は下流のDNA配列：からなる、工程；(c)胎児由来のゲノム配列のレベルを決定する工程；並びに、(d)胎児由来のゲノム配列のレベルを、標準対照と比較する工程であり、ここで標準対照からの増加又は減少は、妊娠 - 関連障害の存在又は進行を示す工程：を含む。

20

30

【0008】

一部の実施態様において、女性由来のゲノム配列はメチル化され、及び胎児由来のゲノム配列はメチル化されない。別の実施態様において、女性由来のゲノム配列はメチル化されず、及び胎児由来のゲノム配列はメチル化される。

【0009】

一部の実施態様において、工程(b)は、試料の、メチル化された及びメチル化されないDNAを示差的に修飾する試薬による処理により実行される。例えば、この試薬は、亜硫酸水素塩を含んでよい；又は、この試薬は、メチル化されたDNAを優先的に切断する1種又は複数の酵素を含んでよい；又は、この試薬は、メチル化されないDNAを優先的に切断する1種又は複数の酵素を含んでよい。一部の実施態様において、工程(b)は、メチル化 - 特異的PCRにより実行される。

40

【0010】

第二の本発明の態様において、胎児を身ごもった妊娠女性において妊娠 - 関連障害を検出又はモニタリングする方法が提供される。この方法は：(a)女性由来の生物学的試料中のDNAを得る工程であり、ここで試料は、全血、血清、血漿、尿又は唾液である工程；(b)工程(a)由来のDNAを、亜硫酸水素塩で処理する工程；並びに、(c)工程

50

(b) 由来のDNA及び2種のプライマーを用いて増幅反応を実行し、CpG - 含有ゲノム配列を増幅する工程であり、ここで該ゲノム配列は、長さが少なくとも15個のヌクレオチドであり、少なくとも1個のシトシンを含み、及び第21染色体上の領域内にあり、並びにここでこの領域は、(1)CGI137、ホスホジエステラーゼ9A(PDE9A)、ホモ・サピエンスタンパク質ホスファターゼ1、調節(障害)サブユニット2偽遺伝子2(PPP1R2P2)、Fem1A(シーエレガンス)への類似、CGI009、カルボニルレダクターゼ1(CBR1)、ダウン症細胞接着分子(DSCAM)、第21染色体オープンリーディングフレーム29(C21orf29)、ホロカルボキシラーゼ合成酵素(HLCS)、及びCGI132からなる群より選択される、ゲノム遺伝子座；並びに、(2)この遺伝子座から10kbを超えない上流及び/又は下流のDNA配列：からなり；並びに、ここで2種のプライマーの少なくとも1種は、胎児由来のゲノム配列へ示差的に結合する工程；並びに、(d)工程(c)由来のゲノム配列の増幅された部分のレベルを、標準対照と比較する工程であり、ここで標準対照からの増加又は減少は、妊娠 - 関連障害の存在又は進行を示す工程：を含む。

10

【0011】

一部の実施態様において、増幅反応は、メチル化 - 特異的PCRのような、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である。別の実施態様において、増幅反応は、核酸配列ベースの増幅、鎖置換反応、又は分枝DNA増幅反応である。

【0012】

この方法は、本発明の第一の態様において説明された方法に加え、子癇前症、早期分娩、妊娠悪阻、異所性妊娠、染色体異数性(例えば、トリソミー 21)、及び子宮内発育遅延のような状態の検出又はモニタリングに適している。

20

【0013】

本発明の第三の態様において、妊娠 - 関連障害を検出及びモニタリングする方法が提供される。この方法は：(a)女性由来の生物学的試料中のDNAを得る工程であり、ここで試料は、全血、血清、血漿、尿又は唾液である工程；(b)工程(a)由来のDNAを、メチル化された及びメチル化されないDNAを示差的に修飾する試薬で処理する工程；(c)工程(b)由来のCpG - 含有ゲノム配列ヌクレオチド配列を決定する工程であり、ここでゲノム配列は、長さが少なくとも15個のヌクレオチドであり、少なくとも1個のシトシンを含み、及び第21染色体上の領域内にあり、並びにここでこの領域は、(1)CGI137、ホスホジエステラーゼ9A(PDE9A)、ホモ・サピエンスタンパク質ホスファターゼ1、調節(障害)サブユニット2偽遺伝子2(PPP1R2P2)、Fem1A(シーエレガンス)への類似、CGI009、カルボニルレダクターゼ1(CBR1)、ダウン症細胞接着分子(DSCAM)、及び第21染色体オープンリーディングフレーム29(C21orf29)、ホロカルボキシラーゼ合成酵素(HLCS)、及びCGI132からなる群より選択される、ゲノム遺伝子座；並びに、(2)この遺伝子座から10kbを超えない上流及び/又は下流のDNA配列：からなる、工程；並びに、(d)工程(c)由来のヌクレオチド配列のプロファイルを、標準対照と比較する工程であり、ここで標準対照からのプロファイルの変化は、妊娠 - 関連障害の存在又は進行を示す工程：を含む。

30

40

【0014】

一部の実施態様において、試薬は、亜硫酸水素塩を含むか；又は、試薬は、メチル化されたDNAを優先的に切断する1種又は複数の酵素を含んでよい；又は、試薬は、メチル化されないDNAを優先的に切断する1種又は複数の酵素を含んでよい。

【0015】

一部の実施態様において、本方法は、ゲノム配列を増幅するために、工程(b)由来のDNA及び2種のプライマーを用いる増幅工程を更に含んでよい。例えば、この増幅工程は、メチル化 - 特異的PCRのような、PCRにより実行され得る。一部の実施態様において、工程(c)は、質量分析により実行される。別の実施態様において、工程(c)は、プライマー伸長により実行される。工程(c)を実行するための他の可能性のある手段

50

は、ポリヌクレオチドハイブリダイゼーション、リアル - タイム P C R、及び電気泳動を含む。

【 0 0 1 6 】

第四の本発明の態様において、妊婦の胎児においてトリソミー 2 1 を検出する方法が提供される。この方法は：(a) 女性から生物学的試料を得る工程であり、ここで試料は、全血、血清、血漿、尿又は唾液である工程；(b) 工程 (a) 由来の試料を、メチル化された及びメチル化されない D N A を示差的に修飾する試薬で処理する工程；(c) C p G - 含有ゲノム配列の対立遺伝子を分析する工程であり、ここでゲノム配列は、長さが少なくとも 1 5 個のヌクレオチドであり、少なくとも 1 個のシトシンを含み、及び第 2 1 染色体上の領域内にあり、並びにここでこの領域は、(1) C G I 1 3 7、ホスホジエステラーゼ 9 A (P D E 9 A)、ホモ・サピエンスタンパク質ホスファターゼ 1、調節 (阻害) サブユニット 2 偽遺伝子 2 (P P P 1 R 2 P 2)、F e m 1 A (シーエレガンス) への類似、C G I 0 0 9、カルボニルレダクターゼ 1 (C B R 1)、ダウン症細胞接着分子 (D S C A M)、及び第 2 1 染色体オープンリーディングフレーム 2 9 (C 2 1 o r f 2 9)、ホロカルボキシラーゼ合成酵素 (H L C S)、及び C G I 1 3 2 からなる群より選択される、ゲノム遺伝子座；並びに、(2) この遺伝子座から 1 0 k b を超えない上流及び / 又は下流の D N A 配列：からなる、工程；並びに、(d) 対立遺伝子の比を決定する工程であり、ここでトリソミー 2 1 を有さない胎児を身ごもっている女性の比からの偏差は、その胎児のトリソミー 2 1 を示す工程：を含む。

10

【 0 0 1 7 】

一部の実施態様において、試薬は、亜硫酸水素塩を含む。別の実施態様において、試薬は、メチル化された D N A を優先的に切断する 1 種又は複数の酵素を含む。あるいは、試薬は、メチル化されない D N A を優先的に切断する 1 種又は複数の酵素を含んでよい。

20

【 0 0 1 8 】

一部の実施態様において、本方法は、メチル化された又はメチル化されないゲノム配列を増幅するために、工程 (b) の後に増幅工程を更に含む。この増幅工程は、メチル化 - 特異的 P C R のような、P C R により実行されてよい。

【 0 0 1 9 】

特許請求された方法の工程 (c) の実施において、様々な可能性が存在する。例えば工程は、質量分析、プライマー伸長アッセイ、リアル - タイム P C R、ポリヌクレオチドハイブリダイゼーション、又は電気泳動により実行することができる。

30

【 0 0 2 0 】

本方法の一部の実施態様において、胎児由来の第 2 1 染色体上のゲノム配列の 2 つの異なる対立遺伝子は、一塩基多型、挿入 - 欠失多型、又は単純な縦列反復配列多型を含む。

【 0 0 2 1 】

本発明の第五の態様において、胎児を身ごもった妊娠女性における妊娠 - 関連障害を検出又はモニタリングする方法が提供される。この方法は：(a) 女性から生物学的試料を得る工程であり、ここで試料は、全血、血清、血漿、尿又は唾液である工程；(b) 試料中の C p G - 含有ゲノム配列のレベルを決定する工程であり、ここで該ゲノム配列は、長さが少なくとも 1 5 個のヌクレオチドであり、少なくとも 1 個のメチル化されないシトシンを含み、及び第 2 1 染色体上の領域内にあり、並びにここでこの領域は、(1) C G I 1 3 7、ホスホジエステラーゼ 9 A (P D E 9 A)、ホモ・サピエンスタンパク質ホスファターゼ 1、調節 (阻害) サブユニット 2 偽遺伝子 2 (P P P 1 R 2 P 2)、F e m 1 A (シーエレガンス) への類似からなる群より選択される、ゲノム遺伝子座；並びに、(2) この遺伝子座から 1 0 k b を超えない上流及び / 又は下流の D N A 配列：からなる、工程；並びに、(c) このゲノム配列のレベルを、標準対照と比較する工程であり、ここで標準対照からの増加又は減少は、妊娠 - 関連障害の存在又は進行を示す工程：を含む。

40

【 0 0 2 2 】

一部の実施態様において、工程 (b) は、血液試料中に存在する D N A を、メチル化された及びメチル化されないシトシンを示差的に修飾する試薬により処理する工程を含む。

50

この試薬は、亜硫酸水素塩を含んでよい、又はこれは、メチル化されたシトシンを含む DNA を優先的に切断する 1 種又は複数の酵素を含んでよい、又はこれは、メチル化されないシトシンを含む DNA を優先的に切断する 1 種又は複数の酵素を含んでよい。

【0023】

一部の実施態様において、工程 (b) は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、特にメチル化 - 特異的 PCR のような増幅反応を含む。この増幅反応は、核酸配列ベースの増幅、鎖置換反応、分枝 DNA 増幅反応であってもよい。一部の実施態様において、ゲノム DNA 配列のレベルは、電気泳動又はポリヌクレオチドハイブリダイゼーションにより決定される。

【0024】

この方法は、子癇前症、早期分娩、妊娠悪阻、異所性妊娠、トリソミー 21、及び子宮内発育遅延を含む、多くの妊娠 - 関連障害を検出又はモニタリングするのに適している。

【0025】

本発明の第六の態様において、胎児を身ごもった妊娠女性における妊娠 - 関連障害を検出又はモニタリングする方法が提供される。この方法は：(a) 女性から生物学的試料を得る工程であり、ここで試料は、全血、血清、血漿、尿又は唾液である工程；(b) 試料中の CpG - 含有ゲノム配列のレベルを決定する工程であり、ここで該ゲノム配列は、長さが少なくとも 15 個のヌクレオチドであり、少なくとも 1 個のメチル化されたシトシンを含み、及び第 21 染色体上の領域内にあり、並びにここでこの領域は、(1) CGI 009、カルボニルレダクターゼ 1 (CBR1)、ダウン症細胞接着分子 (DSCAM)、第 21 染色体オープンリーディングフレーム 29 (C21orf29)、ホロカルボキシラーゼ合成酵素 (HLCS)、及び CGI 132 からなる群より選択される、ゲノム遺伝子座；並びに、(2) この遺伝子座から 10 kb を超えない上流及び / 又は下流の DNA 配列：からなる、工程；並びに、(c) このゲノム配列のレベルを、標準対照と比較する工程であり、ここで標準対照からの増加又は減少は、妊娠 - 関連障害の存在又は進行を示す工程：を含む。

【0026】

一部の実施態様において、工程 (b) は、血液試料中に存在する DNA を、メチル化された及びメチル化されないシトシンを示差的に修飾する試薬で処理する工程を含む。この試薬は、亜硫酸水素塩を含んでよい、又はこれはメチル化されたシトシンを含む DNA を優先的に切断する 1 種又は複数の酵素を含んでよい、又はこれは、メチル化されないシトシンを含む DNA を優先的に切断する 1 種又は複数の酵素を含んでよい。

【0027】

一部の実施態様において、工程 (b) は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、特にメチル化 - 特異的 PCR のような増幅反応を含む。増幅反応は、核酸配列ベースの増幅、鎖置換反応、分枝 DNA 増幅反応であってもよい。一部の実施態様において、ゲノム DNA 配列のレベルは、電気泳動又はポリヌクレオチドハイブリダイゼーションにより決定される。

【0028】

この方法は、子癇前症、早期分娩、妊娠悪阻、異所性妊娠、トリソミー 21、及び子宮内発育遅延を含む、多くの妊娠 - 関連障害を検出又はモニタリングするのに適している。

【0029】

前述の全ての態様における本発明の実践において、CpG アイランドは、場合によっては CpG - 含有ゲノム配列として使用されることがあるが、別の場合には、CpG - 含有ゲノム配列は、CpG アイランドではないことがある。

【0030】

本発明の方法は、全ての態様において、女性において実行されるあらゆる工程を伴うことなく実行することができる。これらの実施態様において、本発明の方法は、女性から生物学的試料を得る工程を省略し、試料について実行される最初に列記された工程で始まる。本出願における他の開示は全て、状況がそうでないことを明確に必要としない限りは、

10

20

30

40

50

これらの実施態様に同等に適用される。

【0031】

従って本実施態様の第一の態様の方法は：胎児を身ごもった妊娠女性における妊娠 - 関連障害を検出又はモニタリングする方法となり、これは：(a) [省略]；(b) 女性由来の生物学的試料中の CpG - 含有ゲノム配列のメチル化状態を決定する工程であり、ここで試料は、全血、血清、血漿、尿又は唾液であり、ここで胎児由来のゲノム配列及び女性由来のゲノム配列は、示差的にメチル化され、これにより試料中の女性由来のゲノム配列と胎児由来のゲノム配列を識別し、ここで該ゲノム配列は、長さが少なくとも15個のヌクレオチドであり、少なくとも1個のシトシンを含み、及び第21染色体上の領域内にあり、並びにここでこの領域は、(1) CGI137、ホスホジエステラーゼ9A (PDE9A)、ホモ・サピエンスタンパク質ホスファターゼ1、調節(障害)サブユニット2偽遺伝子2 (PPP1R2P2)、Fem1A (シーエレガンス) への類似、CGI009、カルボニルレダクターゼ1 (CBR1)、ダウン症細胞接着分子 (DSCAM)、及び第21染色体オープンリーディングフレーム29 (C21orf29)、ホロカルボキシラーゼ合成酵素 (HLCs)、及びCGI132からなる群より選択される、ゲノム遺伝子座；並びに、(2) この遺伝子座から10kbを超えない上流及び/又は下流のDNA配列：からなる、工程；(c) 胎児由来のゲノム配列のレベルを決定する工程；並びに、(d) 胎児由来のゲノム配列のレベルを標準対照と比較する工程であり、ここで標準対照からの増加又は減少は、妊娠 - 関連障害の存在又は進行を示す工程：を含む。

10

【0032】

同様に、本実施態様の第二の態様の方法は：胎児を身ごもった妊娠女性における妊娠 - 関連障害を検出又はモニタリングする方法となり、これは：(a) [省略]；(b) 女性由来の生物学的試料のDNAを亜硫酸水素塩で処置する工程であり、ここで試料は、全血、血清、血漿、尿又は唾液である工程；(c) 工程(b)由来のDNA及び2種のプライマーを用いて増幅反応を行い、CpG - 含有ゲノム配列を増幅する工程であり、ここで該ゲノム配列は、長さが少なくとも15個のヌクレオチドであり、少なくとも1個のシトシンを含み、及び第21染色体上の領域内にあり、並びにここでこの領域は、(1) CGI137、ホスホジエステラーゼ9A (PDE9A)、ホモ・サピエンスタンパク質ホスファターゼ1、調節(障害)サブユニット2偽遺伝子2 (PPP1R2P2)、Fem1A (シーエレガンス) への類似、CGI009、カルボニルレダクターゼ1 (CBR1)、ダウン症細胞接着分子 (DSCAM)、第21染色体オープンリーディングフレーム29 (C21orf29)、ホロカルボキシラーゼ合成酵素 (HLCs)、及びCGI132からなる群より選択される、ゲノム遺伝子座；(2) この遺伝子座から10kbを超えない上流及び/又は下流のDNA配列：からなり、並びにこれらの2種のプライマーの少なくとも1種は、胎児由来のゲノム配列に示差的に結合する工程；並びに、(d) 工程(c)由来のゲノム配列の増幅された部分のレベルを標準対照と比較する工程であり、ここで標準対照からの増加又は減少は、妊娠 - 関連障害の存在又は進行を示す工程：を含む。

20

30

【0033】

同様に、本実施態様の第三の態様の方法は：妊娠 - 関連障害を検出又はモニタリングする方法となり、これは：(a) [省略]；(b) 女性由来の生物学的試料のDNAを、メチル化された及びメチル化されないDNAを示差的に修飾する試薬で処置する工程であり、ここで試料は、全血、血清、血漿、尿又は唾液である工程；(c) 工程(b)由来のCpG - 含有ゲノム配列のヌクレオチド配列を決定する工程であり、ここで該ゲノム配列は、長さが少なくとも15個のヌクレオチドであり、少なくとも1個のシトシンを含み、及び第21染色体上の領域内にあり、並びにここでこの領域は、(1) CGI137、ホスホジエステラーゼ9A (PDE9A)、ホモ・サピエンスタンパク質ホスファターゼ1、調節(障害)サブユニット2偽遺伝子2 (PPP1R2P2)、Fem1A (シーエレガンス) への類似、CGI009、カルボニルレダクターゼ1 (CBR1)、ダウン症細胞接着分子 (DSCAM)、第21染色体オープンリーディングフレーム29 (C21orf29)、ホロカルボキシラーゼ合成酵素 (HLCs)、及びCGI132からなる群よ

40

50

り選択される、ゲノム遺伝子座；(2)この遺伝子座から10kbを超えない上流及び/又は下流のDNA配列：からなる工程；並びに、(d)工程(c)由来のヌクレオチド配列のプロファイルを標準対照と比較する工程であり、ここで標準対照からのプロファイルの変化は、妊娠-関連障害の存在又は進行を示す工程：を含む。

【0034】

同様に、本実施態様の第四の態様の方法は：妊婦の胎児においてトリソミー21を検出する方法となり、これは：(a)〔省略〕；(b)女性由来の生物学的試料を、メチル化された及びメチル化されないDNAを示差的に修飾する試薬で処置する工程であり、ここで試料は、全血、血清、血漿、尿又は唾液である工程；(c)CpG-含有ゲノム配列の対立遺伝子を分析する工程であり、ここで該ゲノム配列は、長さが少なくとも15個のヌクレオチドであり、少なくとも1個のシトシンを含み、及び第21染色体上の領域内にあり、並びにここでこの領域は、(1)CGI137、ホスホジエステラーゼ9A(PDE9A)、ホモ・サピエンスタンパク質ホスファターゼ1、調節(阻害)サブユニット2偽遺伝子2(PPP1R2P2)、Fem1A(シーエレガンス)への類似、CGI009、カルボニルレダクターゼ1(CBR1)、ダウン症細胞接着分子(DSCAM)、第21染色体オープンリーディングフレーム29(C21orf29)、ホロカルボキシラーゼ合成酵素(HLCS)、及びCGI132からなる群より選択される、ゲノム遺伝子座；(2)この遺伝子座から10kbを超えない上流及び/又は下流のDNA配列：からなる工程；並びに、(d)対立遺伝子の比を決定する工程であり、ここでトリソミー21を有さない胎児を身ごもっている女性の比からの偏差は、胎児におけるトリソミー21を示す工程：を含む。

10

20

【0035】

同様に、本実施態様の第五の態様の方法は：胎児を身ごもった妊娠女性における妊娠-関連障害を検出又はモニタリングする方法となり、これは：(a)〔省略〕；(b)女性由来の生物学的試料のCpG-含有ゲノム配列のレベルを決定する工程であり、ここで試料は、全血、血清、血漿、尿又は唾液であり、ここで該ゲノム配列は、長さが少なくとも15個のヌクレオチドであり、少なくとも1個のメチル化されないシトシンを含み、及び第21染色体上の領域内にあり、並びにここでこの領域は、(1)CGI137、ホスホジエステラーゼ9A(PDE9A)、ホモ・サピエンスタンパク質ホスファターゼ1、調節(阻害)サブユニット2偽遺伝子2(PPP1R2P2)、Fem1A(シーエレガンス)への類似からなる群より選択される、ゲノム遺伝子座；(2)この遺伝子座から10kbを超えない上流及び/又は下流のDNA配列：からなる工程；並びに、(c)このゲノム配列のレベルを標準対照と比較する工程であり、ここで標準対照からの増加又は減少は、妊娠-関連障害の存在又は進行を示す工程：を含む。

30

【0036】

同様に、本実施態様の第六の態様の方法は：胎児を身ごもった妊娠女性において妊娠-関連障害を検出又はモニタリングする方法となり、これは：(a)〔省略〕；(b)女性由来の生物学的試料のCpG-含有ゲノム配列のレベルを決定する工程であり、ここで試料は、全血、血清、血漿、尿又は唾液であり、ここで該ゲノム配列は、長さが少なくとも15個のヌクレオチドであり、少なくとも1個のメチル化されたシトシンを含み、及び第21染色体上の領域内にあり、並びにここでこの領域は、(1)CGI009、カルボニルレダクターゼ1(CBR1)、ダウン症細胞接着分子(DSCAM)、第21染色体オープンリーディングフレーム29(C21orf29)、ホロカルボキシラーゼ合成酵素(HLCS)、及びCGI132からなる群より選択される、ゲノム遺伝子座；(2)この遺伝子座から10kbを超えない上流及び/又は下流のDNA配列：からなる工程；並びに、(c)このゲノム配列のレベルを標準対照と比較する工程であり、ここで標準対照からの増加又は減少は、妊娠-関連障害の存在又は進行を示す工程：を含む。

40

【0037】

定義

本出願において使用される用語「妊娠-関連障害」は、妊婦、女性が身ごもっている胎

50

児、又は女性と胎児の両方に影響を及ぼし得るいずれかの状態又は疾患を意味する。このような状態又は疾患は、限定された期間、例えば妊娠もしくは出産時にその症状を顕在化するか、又は胎児が誕生後の全生存期間続くことがある。妊娠 - 関連障害の一部の例は、異所性妊娠、子癰前症、早期分娩、及びトリソミー 21 のような胎児の染色体異常である。

【0038】

本明細書において使用される「CpG - 含有ゲノム配列」は、ヒト胎児又は妊婦のような個体のゲノムにおける規定された位置でのDNA配列のセグメントを意味する。典型的には「CpG - 含有ゲノム配列」は、長さが少なくとも15個のヌクレオチドであり、及び少なくとも1個のシトシンを含む。好ましくはこれは、長さが少なくとも30、50、80、100、150、200、250、又は300個のヌクレオチドであり、及び少なくとも2、5、10、15、20、25、又は30個のシトシンを含むことができる。例えば第21染色体上の所定の遺伝子座（例えばCpGアイランドCGI137、PDE9A、CGI009など）の周囲に中心のある領域内などの、所定の位置のいずれかひとつの「CpG - 含有ゲノム配列」に関して、ヌクレオチド配列変動は、個体毎に、及び同じ個体についてであっても対立遺伝子毎に存在することができる。典型的には、このような規定された遺伝子座（例えばCpGアイランド）の周囲に中心のある領域は、その遺伝子座に加え、上流及び/又は下流の配列を含む。上流又は下流の各配列（各々、その遺伝子座の5'又は3'境界から数える）は、10kbほども長いことができ、別の場合は、5kb、2kb、1kb、500bp、200bp、又は100bpの長さであってよい。更に「CpG - 含有ゲノム配列」は、タンパク質生成のために転写された又は転写されないヌクレオチド配列を包含することができ、このヌクレオチド配列は、タンパク質 - コード配列、非タンパク質 - コード配列（例えば転写プロモーター）、又はそれらの組合せであることができる。

【0039】

本出願における「CpGアイランド」は、最小の長さ、最小のGC含量、及び観察されたCpG頻度/予測されたCpG頻度（OCF/ECF）の最低比を有するゲノムにおいて認められたDNA配列のセグメントを説明する。Yamadaらの論文(Genome Research 14: 247-266, 2004)は、CpGアイランドの決定に関する一式の標準を説明しており：これは、長さが少なくとも400個のヌクレオチドであり、50%よりも大きいGC含量を有し、かつ0.6よりも大きいOCF/ECF比を有さなければならない。他の研究者ら(Takaiら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:3740-3745, 2002)は、長さが少なくとも200個のヌクレオチドであり、50%よりも大きいGC含量を有し、かつ0.6よりも大きいOCF/ECF比を有する配列として、より厳密さの低いCpGアイランドを規定している。本出願において使用される第21染色体上の「CpGアイランド」の概念は、前記判定基準を基にした染色体の走査のためにデザインされた現在利用可能なコンピュータプログラムのいずれかひとつにより提供される、CpGアイランドプロファイルが合致するものであり、スクリーニングプロセスにおいてウィンドウサイズ100、200、又は300個のヌクレオチド及びシフト又はステップサイズ1、2、又は3個のヌクレオチドを使用する場合に得られた結果を包含している。本開示において命名された個々のCpGアイランドは更に、本明細書の表1に示されているように、それらの対応するゲノムコンティグのGenBankでの寄託番号、バージョン及び領域、UCSCゲノムブラウザのHuman May 2004 (hg17) アセンブリ(genome.ucsc.edu)の第21染色体配列に対する染色体位置、並びに所定の条件下でPCRプライマーにより増幅されるそれらの能力により規定される。

【0040】

本明細書において使用される用語「エピジェネティックな状態」又は「エピジェネティック状況」は、主要なヌクレオチド配列以外の核酸（例えば、DNA又はRNA）の分子レベルでの任意の構造特徴を意味する。例えば、ゲノムDNAのエピジェネティックな状態は、例えばそのメチル化パターン又はその細胞タンパク質との会合により決定もしくは

影響されたその二次又は三次構造を含んでよい。

【 0 0 4 1 】

ゲノム配列のメチル化の状態を説明するために本出願において使用される用語「メチル化プロファイル」又は「メチル化状態」は、メチル化に関連した特定のゲノム遺伝子座でのDNAセグメントの特徴を意味する。このような特徴は、このDNA配列内のシトシン(C)残基のいずれかがメチル化されているかどうか、メチル化されたC残基(複数)の位置、残基のいずれか特定のストレッチでのメチル化されたCの割合、及び例えば対立遺伝子の起源の差に起因したメチル化における対立遺伝子の差などを含むが、これらに限定されるものではない。用語「メチル化プロファイル」又は「メチル化状態」は、生物学的試料中のいずれか特定の残基のストレッチでのメチル化されたC又はメチル化されないCの相対濃度又は絶対濃度も意味する。

10

【 0 0 4 2 】

本明細書において使用される用語「一塩基多型」又は「SNP」は、同じゲノム配列の異なる対立遺伝子内の単独のヌクレオチド残基に存在するポリヌクレオチド配列変動を意味する。この変動は、ゲノム配列がタンパク質生成時に転写される場合に、ゲノム配列のコード領域又は非-コード領域(すなわちプロモーター領域)内で起こり得る。1つ又は複数のSNPの検出は、単独のゲノム配列の異なる対立遺伝子の鑑別をもたらす。

【 0 0 4 3 】

本明細書において使用される用語「血液」は、妊婦又は妊娠の可能性について試験される女性からの血液試料又は血液調製品を意味する。この用語は、全血又は血液の任意の画分、例えば通常の定義の血清及び血漿を包含している。

20

【 0 0 4 4 】

本明細書において使用される用語「亜硫酸水素塩」は、メチル化されたシトシンを化学修飾することなく、シトシン(C)をウラシル(U)に化学転換することが可能である、従ってDNAのメチル化状態を基にDNA配列を示差的に修飾するために使用することができる、全ての種類の亜硫酸水素塩、例えば亜硫酸水素ナトリウムを包含している。

【 0 0 4 5 】

本明細書において使用されるメチル化又は非-メチル化DNAを「示差的に修飾する」試薬とは、それにより識別可能な生成物がメチル化及び非-メチル化DNAから生じ、これによりDNAメチル化状態を確定することができるプロセスにおいて、メチル化された及び/又はメチル化されないDNAを修飾する任意の試薬を包含している。このようなプロセスは、化学反応(例えば亜硫酸水素塩によるC->U転換)及び酵素処理(例えば、メチル化-依存型エンドヌクレアーゼによる切断)を含むが、これらに限定されるものではない。従って、メチル化されたDNAを優先的に切断又は消化する酵素は、DNAがメチル化された場合にはるかにより高い効率でDNA分子を切断又は消化することが可能であるものであるのに対し、メチル化されないDNAを優先的に切断又は消化する酵素は、DNAがメチル化されない場合に有意により高い効率を示す。

30

【 0 0 4 6 】

用語「核酸」又は「ポリヌクレオチド」は、一本鎖又は二本鎖のいずれかの形の、デオキシリボ核酸(DNA)又はリボ核酸(RNA)及びそれらのポリマーを意味する。特に限定しない限りは、この用語は、参照核酸と類似した結合特性を有し、かつ天然のヌクレオチドと同様の様式で代謝される、天然ヌクレオチドの公知の類似体を含む核酸を包含している。別に指定しない限りは、特定の核酸配列は、それらの保存的に修飾された変種(例えば縮重コドン置換)、対立遺伝子、相同分子種、一塩基多型(SNPs)、及び相補配列、更には明確に指定された配列も暗に包含している。具体的には縮重コドン置換は、1つ又は複数の選択された(又は全ての)コドンの三番目の位置が、ゆらぎ塩基(mixed-base)及び/又はデオキシイノシン残基により置換されている配列を作出することにより実現され得る(Batzerら, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsukaら, J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); 及び、Rossoliniら, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。用語核酸は、遺伝子、遺伝子によりコードされたcDNA、及びmRNAと互換的に使用され

40

50

る。

【 0 0 4 7 】

用語「遺伝子」は、ポリペプチド鎖の作出に関連したDNAのセグメントを意味し；これは、遺伝子産物の転写／翻訳並びに転写／翻訳の調節に関連したコード領域に先行する及び後続する領域（リーダー及びトレーラー）、更には個々のコードセグメント（エキソン）の間の介在配列（イントロン）を含む。

【 0 0 4 8 】

本出願において用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、アミノ酸残基の高分子を意味するようここでは互換的に使用される。これらの用語は、1個又は複数のアミノ酸残基が、対応する天然のアミノ酸の人工的化学模倣物質であるアミノ酸高

10

【 0 0 4 9 】

用語「アミノ酸」は、天然アミノ酸及び合成アミノ酸、更には天然のアミノ酸と同様の様式で機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣物質を意味する。天然のアミノ酸は、遺伝暗号によりコードされたもの、更には後に修飾されるそのようなアミノ酸、例えばヒドロキシプロリン、 α -カルボキシグルタミン酸及びO-ホスホセリンなどである。

【 0 0 5 0 】

アミノ酸は本明細書において、生化学命名に関するIUPAC-IUB委員会(IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)により推奨される一般に公知の三文字記号又は一文字記号のいずれかにより示される。同様にヌクレオチドは、それらの一般に受け入れられている一文字コードにより示される。

20

【 0 0 5 1 】

本出願において使用される「増加」又は「減少」は、確立された標準対照からの検出可能な正又は負の量の変化を意味する。増加は、対照値の好ましくは少なくとも10%、より好ましくは50%、更により好ましくは2倍、なおより好ましくは少なくとも5倍、及び最も好ましくは少なくとも10倍の正の変化である。同様に減少は、対照の好ましくは少なくとも10%、より好ましくは50%、更により好ましくは少なくとも80%、及び最も好ましくは少なくとも90%の負の変化である。比較基準からの量の変化又は差異を示す他の用語、例えば「より多い」又は「より少ない」は、本出願において先に説明したものと同様の様式で使用される。

30

【 0 0 5 2 】

本明細書において使用される「ポリヌクレオチドハイブリダイゼーション法」は、好適なハイブリダイゼーション条件下で、既知の配列のポリヌクレオチドプローブとWatson-Crick塩基対合を形成するその能力を基にした、ポリヌクレオチドの存在及び／又は量を検出する方法を意味する。このようなハイブリダイゼーション法の例は、サザンブロット及びノーザンブロットがある。

【 0 0 5 3 】

本明細書において使用される「プライマー」は、例えば様々なメチル化状態で、第21染色体上のCpGアイランドCGI137、PDE9A、又はCGI009内に位置したもののような、特定のゲノム配列に対応したポリヌクレオチド配列を基にヌクレオチド配列を増幅するために、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のような増幅法において使用することができるオリゴヌクレオチドを意味する。ポリヌクレオチド配列の増幅のためのPCRプライマーの少なくとも1つは、その配列に関して配列-特異的である。

40

【 0 0 5 4 】

本明細書において使用される「標準対照」とは、被験試料中に存在する例えば第21染色体上のCpGアイランドCGI137、PDE9A、又はCGI009内に位置したもののような、特定のゲノム配列の量又はメチル化状態を比較するために、本発明の方法の

50

使用に適した予め定められた量又はメチル化プロファイル（これは、メチル化に関連した複数の異なる区分可能な特性を含んでよい）のゲノム配列を含有する試料を意味する。標準対照として利用される試料は、胎児と母体の両方が妊娠 - 関連障害又は合併症を発症するリスクがない、正常胎児を身ごもっている平均的健康妊婦の血液中の、妊娠時の規定された時間（例えば第 1 三半期）について典型である関心対象の遺伝子の平均の量又はメチル化プロファイルを提供する。

【 0 0 5 5 】

妊婦を説明する文脈で使用される用語「平均」は、その女性が染色体異常の胎児を有する、又は妊娠 - 関連状態（例えば異所性妊娠、子癰前症又は早期分娩など）に罹患しているというような、少なくとも 1 種の関連状態を有さないという事実を意味する。他の文脈で使用される用語「平均」は、染色体が正常な胎児を妊娠し、かついかなる妊娠 - 関連疾患又は状態にも罹患していない健康女性の無作為に選択された群を代表する女性の血液中に認められる母体及び胎児起源の両方の特定のゲノム配列（例えば第 2 1 染色体上の CpG アイランド CGI 137、PDE9A、又は CGI 009 内に位置したもの）のメチル化プロファイルのような、ある特徴を意味する。この選択された群は、これらの女性間での関心対象のゲノム配列の平均の量又はメチル化プロファイルは、妥当な精度で、正常胎児を伴う健康妊婦の一般集団における対応するプロファイルを反映するために、十分な数の女性を含まなければならない。加えて選択された女性群は一般に、潜在的妊娠 - 関連障害の徴候に関して血液が試験される女性の在胎月齢と同様の在胎月齢を有する。本発明を
10
20
実践するのに好ましい在胎月齢は、スクリーニングされる障害に応じて変動してよい。例えば妊婦は、子癰前症のリスクについて妊娠第 2 三半期の間にスクリーニングされることが好ましいのに対し、胎児の染色体異数性は、可能な限り早期にスクリーニングされ診断されることが好ましい。更に試験するのに好ましい在胎月齢は、試験における関心対象の遺伝子によっても異なってよい。

【 0 0 5 6 】

本明細書において使用される用語「子癰前症」は、妊娠時に生じる状態を意味し、その主な症状は、尿タンパク質及び浮腫（膨潤）の存在を随伴することが多い高血圧の様々な形である、子癰前症は時には、妊娠中毒と称され、これは発作を伴う子癰前症である「子癰」と称されるより重篤な障害に関連している。これらの状態は通常、妊娠後期（20 週以降）に発症するが、誕生直後又は妊娠 20 週以前に発症することもある。
30

【 0 0 5 7 】

本明細書において使用される用語「早期分娩」又は「早産」は、約 40 週の妊娠期間満期の 3 週以上前に始まる分娩で、治療しない場合未熟児に繋がることが多い分娩の状態を意味する。

【 0 0 5 8 】

本明細書において使用される用語「妊娠悪阻」は、妊娠中、特に第 1 三半期の、極端で持続する悪心及び吐気を意味する。悪心及び吐気は、脱水につながり、妊娠に必要な体重増加を妨げることがある。

【 0 0 5 9 】

「異所性妊娠」は、受精卵が子宮の外側に着床した異常妊娠を意味する。異所性妊娠のほとんどの症例において、卵は卵管内に定着するが、この用語は、受精卵が女性の卵巣、腹部又は頸部に着床する異常な妊娠も包含している。
40

【 0 0 6 0 】

発明の詳細な説明

I. 緒言

母体血漿中の胎児 DNA の存在は、1997 年に最初に報告され、かつ単純に母体血液試料の分析による非侵襲的出生前診断の可能性を提示している (Lo ら, Lancet 350:485-487, 1997)。今日まで、多くの可能性のある臨床適用が開発されている。特に母体血漿中の胎児 DNA 濃度の量的異常は、子癰前症、早期分娩、分娩前出血、侵襲的胎盤形成、胎児のダウン症、及びその他の胎児の染色体異数性を含む、多くの妊娠 - 関連障害に関連してい
50

ることがわかっている。従って母体血漿中の胎児DNAの分析は、胎児母体の健全性のモニタリングの可能性のあるマーカーであることが示唆されている。

【0061】

しかし胎児DNAは、母体血漿中のバックグラウンドの母体DNAと共存している。従ってほとんどの報告された適用は、Y-染色体配列の検出に頼っており、その理由はこれらは最も好都合なことに母体DNAから識別可能であるからである。このようなアプローチは、現存するアッセイの適用可能性を、全ての妊娠のわずかに50%に、すなわち男性胎児の場合に制限する。従って母体血漿検出のための性別と無関係の胎児DNAマーカーの開発の大きい必要性が存在する。

【0062】

胎児及び母体DNAは、それらのメチル化状態の差異により識別することができるが、先に明らかにされた(米国特許出願公開第20030044388号)。メチル化は、エピジェネティック現象であり、これはDNA配列の変化に関わることなく表現型を変更するプロセスを意味する。本発明者のひとり(Y.M.D. Lo)とそのグループは、ゲノムインプリンティングを示す遺伝子座であるH19での父親-及び母親-から受け継いだ対立遺伝子の間のDNAメチル化状態の差異(示差的メチル化、従って特定の対立遺伝子の親起源に関連した単独の遺伝子の2つの対立遺伝子の示差的発現)を調べることにより、母体血漿から胎児-由来の母親から受け継いだDNA配列を検出するためのエピジェネティックマーカー使用の実現可能性を最初に明らかにした(Poonら, Clin. Chem. 48:35-41, 2002)。Landesらも、非侵襲的出生前診断のためのエピジェネティックマーカーの使用を提唱した(米国特許出願公開第20030211522号)。

【0063】

本発明者らは最近、胎盤-由来のRNAを、母体血漿中で検出することができることを明らかにした(Ngら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:4748-4753, 2003)。他方で、正常な個人の血漿DNAは、主に造血細胞に由来することが示された(Luiら, Clin. Chem. 48:421-427, 2002)。従って母体DNAの支配的給源は、末梢血細胞由来であるのに対し、胎盤は、母体血漿へ放出される胎児DNAの可能性のある給源であることが仮定された。従って母体血漿中で検出するための汎用の胎児-特異性DNAマーカー開発の一つの戦略は、胎盤と母体末梢血細胞の間で示差的にメチル化された遺伝子を同定することである。

【0064】

本発明者らは、最初に、第21染色体上の特定のゲノム座に位置した多くのゲノム配列は、胎児由来(例えば胎盤由来)の胎児DNAと、母親の末梢血細胞由来の母体DNAの間で示差的にメチル化されていることを明らかにした。従ってこの発見は、胎児及び母体のゲノムDNAを識別する新規アプローチ並びに非侵襲的出生前診断の新規方法を提供する。

【0065】

II. 全般的方法

本発明を実践する上で、分子生物学の分野において慣習的技術を利用する。本発明において使用する一般的方法を明らかにする基本書は、Sambrook及びRussellの「Molecular Cloning, A Laboratory Manual」(第3版、2001);Krieglerの「Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual」(1990);並びに、「Current Protocols in Molecular Biology」(Ausubelら編集、1994))を含む。

【0066】

核酸に関して、サイズは、キロベース(kb)又は塩基対(bp)のいずれかで示される。これらは、アガロース又はアクリルアミドゲル電気泳動、配列決定された核酸、又は公開されたDNA配列に由来した概算値である。タンパク質に関して、サイズは、キロダルトン(kDa)又はアミノ酸残基数で示される。タンパク質サイズは、ゲル電気泳動、配列決定されたタンパク質、由来したアミノ酸配列、又は公開されたタンパク質配列から推定される。

【0067】

市販されていないオリゴヌクレオチドは、例えば、Beaucage及びCaruthersにより最初に説明された固相ホスホロアミダイトリエステル法(Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862 (1981))に従うか、Van Devanterらにより説明された自動合成装置の使用(Nucleic Acids Res. 12: 6159-6168 (1984))により、化学的に合成した。オリゴヌクレオチドの精製は、例えばPearson及びReanierにより説明されたような未変性アクリルアミドゲル電気泳動又は陰イオン交換高速液体クロマトグラフィー(HPLC)(J. Chrom. 255: 137-149 (1983))などの、いずれかの技術分野において認められた戦略を用い実行される。

【0068】

本発明のゲノム配列、例えばCGI137、PDE9A、及びCGI009のような第21染色体上のCpGアイランド内に位置するもの、並びに合成オリゴヌクレオチドのポリヌクレオチド配列は、例えばWallaceらの二本鎖鋳型配列決定のための鎖終結法(Gene 16: 21-26 (1981))を用いて証明することができる。

【0069】

III. 血液試料の獲得及びDNAの抽出

本発明は、妊娠 - 関連状態又は障害の存在を検出及び/又は進行をモニタリングするための非侵襲的手段として、母体血液中に認められた胎児DNAのエピジェネティック状態を分析することに関する。従って本発明を実践する第一の工程は、妊婦から血液試料を得、その試料からDNAを抽出することである。

【0070】

A. 血液試料の獲得

血液試料は、本発明の方法を用い試験するのに適した在胎月齢の妊婦から得られる。好適な在胎月齢は、以下に説明されるように、試験される障害によって決まる。女性からの血液採取は、一般に下記の病院又は診療所の標準プロトコルに従い実行される。適量の末梢血、例えば典型的には5~50mlが採取され、更に調製されるまで、標準手順に従い貯蔵されてよい。

【0071】

B. 血液試料の調製

本発明の母体血液中に認められた胎児DNAの分析は、例えば全血、血清又は血漿を用いて実行されてよい。母体血液からの血清又は血漿の調製法は、当業者に周知である。例えば妊婦の血液を、血液凝固を防ぐために、EDTA含有チューブ又はVacutainer SST(Becton Dickinson, フランクリンレーク, NJ)のような特定の市販の製品に入れ、その後血漿を、遠心分離により全血から得ることができる。他方で血清は、血液凝固後の遠心分離を伴う又は伴わずに得ることができる。遠心分離が使用される場合、これは典型的には、好適な速度、例えば1,500~3,000xgで行われるが、これらに限定されるものではない。血漿又は血清は、DNA抽出のための新たなチューブに移す前に、追加の遠心分離工程に供されてもよい。

【0072】

全血の非細胞部分に加え、DNAも、女性からの全血試料の遠心分離及び血漿の除去後に得ることができる、パフィーコート部分に濃厚化された、細胞画分から回収されてよい。

【0073】

C. DNAの抽出

血液を含む生物学的試料からDNAを抽出する多くの方法が存在する。DNA調製の一般的な方法(例えば、Sambrook及びRussell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第3版, 2001に記載)は、以下である: 様々な市販の試薬又はキット、例えばQiaAmp DNA Mini Kit又はQiaAmp DNA Blood Mini Kit(Qiagen, ヒルデン, 独国)、GenomicPrep(商標)Blood DNA Isolation Kit(Promega, マジソン, WI)、及びGFX(商標)Genomic Blood DNA Purification Kit(Amersham, ピスカタウェイ, NJ)などを使用し、妊婦由来の血液試料からDNAを得ることができる。これらの方法の2種以上の組合せを使用してもよい。

【0074】

I V . D N A のメチル化 - 特異的 化学修飾

妊婦の血液試料からの抽出時に、D N A は、メチル化 - 示差的様式で D N A を化学修飾することが可能である試薬により処理され、すなわち、処理後に、メチル化されたシトシン (C) 残基及びメチル化されない C 残基から異なる識別可能な化学構造を生じる。典型的にはそのような試薬は、D N A 分子中のメチル化されない C 残基 (複数) と反応し、各メチル化されない C 残基をウラシル (U) 残基へ転換する一方で、メチル化された C 残基は変化しないままである。この C - > U 転換は、核酸の一次配列の変化を基にしたメチル化状態を検出及び比較することができる。本目的に適した試薬の例は、亜硫酸水素ナトリウムのような亜硫酸水素塩である。D N A の化学修飾に亜硫酸水素塩を使用する方法は、当該技術分野において周知であり (例えば、Herman ら、Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:9 821-9826, 1996 を参照のこと)、ここでは詳細には論じない。

【 0 0 7 5 】

当業者が認めるように、ここでは名称を挙げないがメチル化された及びメチル化されない D N A を示差的に修飾する同じ化学特性 (又はいずれか他の機構により) を有するいずれか他の試薬を、本発明の実践に使用することができる。例えば D N A のメチル化 - 特異的修飾は、メチル化 - 感受性制限酵素によっても実行され、その一部は典型的には、メチル化されない D N A 断片を切断するが、メチル化された D N A 断片は切断しないのに対し、他のもの (例えば、メチル化 - 依存型エンドヌクレアーゼ M c r B C) は、メチル化されたシトシンを含む D N A を切断するが、メチル化されない D N A は切断しない。加えて、化学修飾と制限酵素処理の組合せ、例えば一緒にした亜硫酸水素塩制限併用分析 (C O B R A) を、本発明の実践に使用することができる。

【 0 0 7 6 】

V . ポリヌクレオチド配列増幅及び決定

メチル化 - 示差的様式で D N A を化学修飾した後、次に処理された D N A を、配列 - ベースの分析に供し、その結果、胎児 D N A 由来の 1 種又は複数の本発明のゲノム配列 (例えば C G I 1 3 7、P D E 9 A、及び C G I 0 0 9 のような、第 2 1 染色体上の C p G アイランド内に位置するもの) を、母体 D N A 由来のそれらの対応物から識別することができる。かつ胎児のゲノム配列メチル化プロファイルを決 定し、かつ標準対照と比較することができる。更に、一旦胎児起源のひとつの特定のゲノム配列が、母体対応物と比べ高メチル化されるか又は低メチル化されることが決定され されたならば、この胎児のゲノム配列の量は、その特異的メチル化状態を基に決定することができる。引き続き、この量は、標準対照値と比較され、ある種の妊娠 - 関連障害の可能性の指標として役立つ。

【 0 0 7 7 】

A . ヌクレオチド配列の増幅

メチル化特異的修飾後の、ゲノム配列の配列解析前に、増幅反応は任意である。一部の 本発明の実施態様において、増幅は、特定のメチル化パターンを有する第 2 1 染色体上の C p G - 含有ゲノム配列を優先的に増幅するために実行され、その結果ひとつの特定の給源由来の、例えば胎盤又は胎児の他の組織由来のゲノム配列のみが、検出されかつ分析される。

【 0 0 7 8 】

様々なポリヌクレオチド増幅法が、十分に確立され、かつ研究に頻用されている。例えば、ポリヌクレオチド配列増幅に関するポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) の一般的方法は、当該技術分野において周知であり、従ってここでは詳細に説明しない。P C R の方法、プロトコール、プライマーデザインの原理の総説に関しては、例えば Innis らの「PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications」, Academic Press, Inc. N. Y., 1990 を参照のこと。P C R 試薬及びプロトコールは、Roche Molecular Systems のような商業的業者から入手することもできる。

【 0 0 7 9 】

P C R は、熱に安定した酵素を使用する自動化されたプロセスとして最も頻繁に実行される。このプロセスにおいて、反応混合物の温度は、変性領域、プライマーアニーリング

領域、及び伸長反応領域を自動的に循環される。具体的にこの目的に適合された装置が、市販されている。

【0080】

標的ポリヌクレオチド配列（例えば、胎児及び母体配列が示差的にメチル化される第21染色体上のCpG-含有ゲノム配列）のPCR増幅は、典型的には本発明の実践において使用されるが、当業者は、母体血液試料に認められたゲノム配列の増幅は、その各々は十分な増幅を提供する、リガーゼ連鎖反応（LCR）、転写-媒介型増幅、及び自家持続配列複製法又は核酸配列-ベースの増幅（NASBA）のようないずれか公知の方法で実現することができることを認めるであろう。より最近になって開発された分岐DNA技法も、特定のメチル化パターンを示す本発明の特定のゲノム配列の存在を定性的に示すため、又は母体血液中のこの特定のゲノム配列の量を定量的に決定するために使用することができる。臨床試料における核酸配列の直接定量に関する分岐DNAシグナル増幅の総説については、Nolte, Adv. Clin. Chem. 33:201-235, 1998を参照のこと。

10

【0081】

B. ポリヌクレオチド配列の決定

ポリヌクレオチド配列決定の技術も、よく確立されており、関連研究分野で広く実践されている。例えば、ポリヌクレオチド配列決定の基本原則及び一般技術は、分子生物学及び組換え遺伝子の様々な研究論文及び専門書に説明されており、例えばWallaceらの論文(前掲); Sambrook及びRussellの論文(前掲); 並びに、Ausubelらの論文(前掲)がある。手動又は自動のいずれかで、研究室において日常的に実践されているDNA配列決定法は、本発明の実践に使用することができる。本発明の方法の実践のためにポリヌクレオチド配列の変化(例えばC->U)を検出するのに適した追加の手段は、質量分析、プライマー伸長、ポリヌクレオチドハイブリダイゼーション、リアル-タイムPCR、及び電気泳動を含むが、これらに限定されるものではない。

20

【0082】

VI. 標準対照の確立

本発明の方法の実践のために標準対照を確立する目的で、健常胎児を身ごもっている健常な妊婦の群が、最初に選択される。これらの女性は、同様の在胎月齢であり、これは子癇前症、胎児の染色体異数性、及び早期分娩などの状態の本発明の方法を用いるスクリーニングに適当な妊娠期間内である。同様に標準対照が、健常な非-妊婦の群からの試料を用いて確立される。

30

【0083】

選択された妊婦及び女性たちが身ごもっている胎児の健常な状態は、女性の血圧のモニタリング、分娩開始の記録、並びにCVS及び羊水穿刺を用いる胎児の遺伝分析の実行を含むが、これらに限定されるものではない、よく確立された日常的に使用される方法により確認される。

【0084】

更に、健常な胎児を身ごもっている健常な妊婦の選択された群は、妥当なサイズでなければならない、その結果母体血液中の胎児を起源とする本発明のゲノム配列の平均量、又はこの群から得られた母体血液中の胎児ゲノム配列のメチル化プロファイルは、健常な胎児を身ごもっている健常な女性の一般集団の中の正常又は平均の量又はメチル化プロファイルの代表と当然みなすことができる。選択された群は、少なくとも10名の女性を含むことが好ましい。

40

【0085】

胎児のゲノム配列メチル化プロファイルに関する標準対照は、この特定のゲノム配列のメチル化状態の複数の差異及び区分可能な態様を反映している。例えば、メチル化プロファイルのひとつの態様は、いずれか所定のC残基がメチル化されているかどうかであり; 別の態様は、特定のゲノム配列内のメチル化されたC塩基の数であり; このプロファイルの更なる態様は、いずれか所定の位置でメチル化されたCの割合である。メチル化プロファイルの追加の態様は、メチル化の対立遺伝子の差、示差的にメチル化された対立遺伝子

50

の比などを含むが、これらに限定されるものではない。胎児ゲノム配列メチル化プロファイルは、例えば胎盤又は他の胎児組織などの組織の種類に応じて変動してもよい。従って個別の標準対照は、試験において使用される様々な胎児組織について確立されてよい。

【0086】

選択された健常な対照群の各女性において認められた個別の値を基にした母体血液中に存在する特定の胎児ゲノム配列について、一旦平均レベル又はメチル化プロファイルが確立されたならば、この平均又は中央値又は代表値又はプロファイルは、標準対照とみなされる。従って同様の胎児ゲノム配列の量又は同様の胎児ゲノム配列のメチル化プロファイルを含む血液試料は、標準対照として使用することができる。更に平均又は中央値又は代表量のゲノムDNA配列、もしくは平均又は中央値又は代表のメチル化プロファイルのゲノムDNA配列を含む溶液を、人工的に集成することができ、これは標準対照として役立つ。加えて個別の標準対照が、胎児起源のゲノム配列のメチル化プロファイルの様々な態様について確立されてもよい。

10

【実施例】

【0087】

下記実施例は、単に例証により提供され、限定するものではない。当業者は、本質的に同じ又は同様の結果を得るために、変更又は修飾することができる様々な重要でないパラメータを容易に認めるであろう。

【0088】

実施例 1

20

本発明者らは、母体血液中の胎児 - 特異的であるエピジェネティックマーカーを同定することを目的とした。先行するデータは、母体血漿中の胎児DNA分子は、主に胎盤に由来する(Chimら, Proc Natl Acad Sci USA., 102: 14753-14758; Masuzakiら, J Med Genet 41, 289-292, 2004; Floriら, Hum Reprod 19, 723-724, 2004)が、母体血漿中のバックグラウンドDNAは、母体血液細胞に由来する(Luiら, Clin Chem 48, 421-427, 2002)ことを示唆している。従って、胎児のエピジェネティックマーカーを同定するために、これら2種の組織型間で示差的メチル化を明らかにする遺伝子座を確定することを目的として、遺伝子座のメチル化プロファイルを胎盤組織及び母体血液細胞の両方で評価した。このようなマーカーは、出生前診断及び妊娠 - 関連状態のモニタリングに使用することができる。

30

【0089】

材料及び方法

CpG - 含有ゲノム配列の同定。DNAメチル化は、CpGジヌクレオチド中のシトシン残基の5番目の炭素位置へのメチル基の付加を意味する。第21染色体q上のそのようなCpGジヌクレオチドのクラスターは、UCSC Genome Bioinformatics Siteのゲノムブラウザ(genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway)によりコンピュータで同定した(Yamadaら, Genome Res 14, 247-266, 2004)。CpG部位は更に、下記判定基準を基に予備選択した(subselect): 最低のグアニン及びシトシン含量が50%、観察されたCpG頻度/予想されたCpG頻度の最小比が少なくとも0.6である、長さが少なくとも400bpのDNA配列のストレッチ。CpG含有ゲノム配列が同定された後、本発明者らは、先に同定されたゲノム領域の更に上流及び下流のCpG部位へ、例えばPDE9A領域A及びCに分岐させた(branched)。

40

【0090】

対象の募集及び試料採取。胎盤組織及び対応する血液試料を、妊娠の第1及び第3三半期の女性から収集した。胎盤組織は、帝王切開出産後の第3三半期対象から、及び妊娠中絶後の第1三半期対象から得た。分娩の始まる前又は任意の産科手技の行われる前に、母体の血液(10mL)を、EDTA血液チューブに収集した。血液試料は、1600×gで、4で10分間遠心した。血漿を慎重に除いた後、パフィーコート部分を得、これを-20で個別に貯蔵した。胎盤組織は、リン酸緩衝生理食塩水ですすぎ、飾りのない(plain)ポリプロピレン製チューブ中で-80で貯蔵した。

50

【 0 0 9 1 】

亜硫酸水素塩処理塩基配列決定。DNAを、胎盤組織及び母体バフィーコートから、各々、QIAamp DNA Mini Kit及びQIAanip DNA Blood Mini Kit(Qiagen, ヒルデン, 独国)を製造業者の指示に従い使用し、抽出した。各試料に関して、CpGenome DNA Modification Kit(Intergen, ブルリントン, MA)を製造業者の指示に従い使用し、DNA 1 µgを、亜硫酸水素塩転換に供し、これはメチル化されないシトシン残基をウラシルへ転換するが、メチル化されたシトシン残基は未変化のまま留める。次に亜硫酸水素塩転換されたDNAは、CpG部位に隣接するプライマー対(表1)による、PCR増幅に供した。一部のCpG-含有ゲノム配列は、2又は3種のPCR、すなわち領域A、B及びCにより調べた。プライマーは、あらゆる可能性のあるメチル化されたシトシン残基に結合しないようにデザインした。これらのプライマーは、例証として示しているが、この目的のために使用することができるプライマーの範囲を限定するものとみなしてはならない。TaqMan PCR Core Reagent Kit (Applied Biosystems, フォスターシティ, CA)において供給された試薬を使用した。各PCRのための試薬組成は、表1に詳述した。典型的には、PCRは、ジメチルスルホキシド(DMSO)又はベタインを含む又は含まずに、MgCl₂、プライマー、TaqGold、1X緩衝液II、各dNTPの200 µMを含み、最終反応容積25 µl中で実行した。温度プロファイルは、95 10分間の最初の変性工程、それに続く95 で1分間、55~65 のアニーリング温度範囲で1分間(表1)、72 で1分間を40サイクル、72 で10分間の最後の伸長からなった。単独分子の分解時のメチル化状態を分析するために、PCR産物は、プラスミドベクターへ、pGEM-T Easy Vector System (Promega, マジソン, WI)を使用し、TA-クローニングした。正の(positive)組換え体クローン由来の挿入断片を、BigDye Terminator Cycle Sequencing v1.1キット(Applied Biosystems)を製造業者の指示に従い使用するサイクルシーケンシングにより分析した。genCLEANカラム(Genetix)による精製後、試料8 µlを、Hi-Diホルムアミド12 µlへ添加し、3100 DNA Analyzer (Applied Biosystems)上を試行させた。

10

20

【 0 0 9 2 】

【表 1】

表 1. 試験した第21染色体上のゲノム配列のアイデンティティ、位置、プライマー配列及びPCR反応条件。米国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) の GenBank に寄託されたゲノムコンテイング上の各領域 (寄託番号、バージョン、開始及び終結ヌクレオチド番号)、並びに UCSC ゲノムブラウザ (genome.ucsc.edu web site で入手) の Human May 2004 (hg17) アセンブリ上の染色体位置 (染色体、開始及び終結ヌクレオチド番号) を、各々、第二列及び第三列に示している。

配列名	ゲノムコンテイング上の領域	染色体位置	F-プライマー		R-プライマー		PCR条件					
			(5' -3')	(5' -3')	(5' -3')		MgCl ₂ (mM)	Primer (nM)	DMSO (%)	Betaine (mM)	TaqGold (U)	アニーリング温度 (°C)
CG1137 領域A	NT_011515.11 : 2742901-2743142	chr21:46, 249, 993-46, 250, 234	GGTGGGTG GAGGAGGTAGT		ACCCRAACCC RTCTCTACCTACAA		2	200	0	0	1	62
CG1137 領域B	NT_011515.11 : 2742666-2743001	chr21:46, 249, 758-46, 250, 093	AAGGGAGTTGACA TATTGAGGTTTAT		AACACCTAAA AAACTCCRAAA		3	200	0	0	1	60
PDE9A 領域A	NT_030188.4 : 1099474-1099776	chr21:42, 978, 102-42, 978, 404	GTTTTAGGGAGG GGGTATTYAGT		AATCTATTTTCTATTTTC ACTATTTCCAAATAAAA		3	200	0	0	1.25	60
PDE9A 領域B	NT_030188.4 : 1100569-1100940	chr21:42, 979, 197-42, 979, 568	GTATGTAATTAATG AAAACATGAGTTTGAT		CRAAAAACCCCTT ATAAAAACCRRA		3	400	0	0	0.625	55
PDE9A 領域C	NT_030188.4 : 1101439-1101851	chr21:42, 980, 067-42, 980, 479	GGTGGTTGTGTG GTTTGGTTTTAGT		ACCCAAAATAC CCCAAAACCATAAA		3	200	0	0	1.25	60
PPP1R2P2 領域A	NT_011512.10 : 22921010-22921356	chr21:36, 181, 010-36, 181, 356	AGGTTTTTTAGTG GGGAAAAAATGCT		CRAAACTCCRACTCT TAACTCAAAATAACTA		3	300	0	0	1.25	62
PPP1R2P2 領域B	NT_011512.10 : 22921311-22921479	chr21:36, 181, 311-36, 181, 479	GATTTAYGTYGA GTAGTTATTTTGAGTTAAG		AACTCCTCTCC ACACTCCCTTA		3	100	0	0	1.25	60
Fem1A (C.エレガンス) 領域Aへの類似	NT_011512.10 : 796376-796709	chr21:14, 056, 376-14, 056, 709	AGGTTAATGATTGTATATT TAAAGTTTTAGGATATTT		ACCAATACTCCAC CAGRTCCAAATAA		4	100	0	0	1.25	65

10

20

30

40

【表 2】

Fem1A (C. エレガンス) 領域Bへの類似	NT_011512.10:7966 79-796961	chr21:14, 056, 679- 14, 056, 961	AYGTTATTGGGA YGTGGTGGAGTATT	CCRATTAAACCACTC CAAAATTAACCTAATA	4	100	0	0	1.25	65
CG1009	NT_011512.10: 12596247-12596458	chr21:25, 856, 247- 25, 856, 458	AAAAAGGYGTTTGG TYGGTTATCAGTAT	AAACTAAAATCR ACRTACCTACAA	3	200	0	0	1	60
CBR1	NT_011512.10: 23103970-23104340	chr21:36, 363, 970- 36, 364, 340	GTTAYCTGGTGGTAAATAG TTAGTAGTTAGACATTAGTT	CAAACCRATACCC TTATTACCTCCAA	1.5	400	0	0	1	60
DSCAM	NT_011512.10: 27880652-27880936	chr21:41, 140, 652- 41, 140, 936	YGVGVTGTCGTTT TTGTATATTGTTTT	CAAAAAAATTAAACAAA AAATCCATATAACTAAAA	3	200	0	0	1	60
C21orf29	NT_011515.11: 1446687-1446915	chr21:44, 963, 779- 44, 954, 007	AGTTTGGTAGTTATTGG AATAGTTAAATCAGTT	AACTTCTGATCCTA CTCCCTAAATCTATA	3	200	0	0	1	57
CG1111	NT_011515.11: 1193113-1193374	chr21:44, 700, 205- 44, 700, 466	TTTTTTTAGGTAG TTGAAAGAAAAGG	CCTCCCTCGT CAAAATAAAC	2	200	3	0	1.25	52
CG1121	NT_011515.11: 1756431-1756699	chr21:45, 263, 523- 45, 263, 791	TTTTTACATATTTT TTGGGTTTAAGGTT	AAATCCACCTA CCCAAACACC	3	400	0	1	1.25	60
K1A0656 領域A	NT_011512.10: 1097983-1098273	chr21:14, 357, 983- 14, 358, 273	TTGGTGGTYGYGAAG TGTTTTTTGTTAGTATT	ACCTCTCAAAACCRAA TAAACCTAACAAAAC	2	300	0	0	1.25	66
K1A0656 領域B	NT_011512.10: 1098230-1098519	chr21:14, 358, 230- 14, 358, 519	GYGVGYGTTTAAVGG TTTTTGTTAGGTTTAT	CATAATAATACTTC TCAAAACCCCAATCA	2	400	0	0	1.25	65
HSF2BP 領域A	NT_011515.11: 394974-395324	chr21:43, 902, 066- 43, 902, 416	TAYGGAGTAGAGACAGA GTGATTATTTATTTTAYGT	CRACAACRACCA TAAACRAAACRA	3	400	5	0	1.25	55
HSF2BP 領域B	NT_011515.11: 395238-395572	chr21:43, 902, 330- 43, 902, 664	GTTTAAATAVGTTG GYGYGTTTAGGGGT	TTACATCAAAAACCTAAT TTCCCTTCTACTTTACAA	4	400	0	0	1.25	65
COL6A1 領域A	NT_011515.11: 2740284-2740642	chr21:46, 247, 376- 43, 247, 734	GTTYGGTYGGGAG GTTTTGTGATATT	AACTACRAAACRAAAT AAACAACCRITTAACATA	3	600	0	0	1.25	60
COL6A1 領域B	NT_011515.11: 2740579-2740899	chr21:46, 247, 671- 46, 247, 991	TYGGTTTATTGCGGT TGTATTATTAGGGTT	TCCATAACATCGA CCACACTAACCCAA	4	200	0	0	1.25	65

【0093】

データ比較及び統計解析。C p G 部位は、配列がシトシンである場合に、メチル化されたとしてスコア化し；それがチミン残基（ウラシルのデオキシ対応物）により占拠された場合に、メチル化されないとしてスコア化した。各 C p G 部位に関するメチル化されたシ

10

20

30

40

50

トシン残基の割合を、胎盤組織試料に加え母体血液試料の間で決定した。メチル化された及びメチル化されないシトシンの分布を、各 CpG 部位に関して、胎盤組織と母体パフィーコートの間で、カイ二乗検定により比較した。p 値 < 0.05 は、統計学的に有意差とみなした。統計解析は、Sigma Stat 3.0ソフトウェア(SPSS)を用いて実行した。

【0094】

結果と考察

コンピュータ検索により同定された CpG - 含有ゲノム配列の中で、13 遺伝子座に、本研究は注目した。これらの遺伝子座の名称、染色体位置及び GenBank 寄託番号を、表 1 に列記した。試験した各遺伝子座に関して、胎盤組織及び母体血液細胞上で亜硫酸水素塩処理塩基配列決定を実行した。

【0095】

CGI137。CGI137のメチル化プロファイルを、5名の妊娠第3三半期から収集した胎盤組織及び対応する母体血液細胞間で試験した。5症例全ての領域A及びBに関する亜硫酸水素塩処理塩基配列決定データは、各々、図1A及び1Bに示した。各パネルの各行は、1個のクローンに関する亜硫酸水素塩処理塩基配列決定の結果を示すのに対し、各列は、ゲノム配列内の個別の CpG ジヌクレオチドを表す。CpG 部位での配列決定されたクローン全ての中のメチル化されたクローンの割合であるメチル化指標は、5名の胎盤組織及び母体血液細胞試料の全てについて決定した。このデータは、図2A及び2Bにまとめた。胎盤は、母体血液細胞に比べ、低メチル化されたことが認められる。カイ二乗検定を、各 CpG 部位での胎盤組織及び母体血液細胞の間のメチル化された及びメチル化されないクローンの分布を比較するために、実行した。胎盤と母体血液細胞の間のメチル化指標の差は、21種の CpG 部位全てについて統計学的に有意であった(カイ二乗、 $P < 0.0001$ 、表2A及び2B)。

【0096】

【表3】

表2A. CGI137領域A内の個別のCpG部位での胎盤組織及び母体血液細胞のメチル化プロファイルと比較する亜硫酸水素塩処理塩基配列決定データ及びカイ二乗検定のまとめ。個別のCpG部位は、UCSCゲノムブラウザのHuman May 2004 (hg17) アセンブリのchr21:46,249,636 (+1) に対するそれらのヌクレオチド位置により指定した。

試料	メチル化状態	指定されたCpG部位でのクローン番号										
		430	439	442	472	477	481	495	513	541	553	581
第3三半期の胎盤												
	メチル化	6	13	9	39	45	27	18	17	17	33	27
	非メチル化	66	59	63	33	27	45	54	55	55	39	45
第3三半期の母体血液細胞												
	メチル化	71	71	68	73	73	74	73	69	68	72	73
	非メチル化	3	3	6	1	1	0	1	5	6	2	1

比較 指定されたCpG部位でのカイ二乗及びp-値

第3三半期の胎盤対第3三半期の母体血液細胞

	430	439	442	472	477	481	485	513	541	553	581
カイ二乗	108.9	87.458	89.127	37.968	28.477	63.957	81.195	70.247	67.167	45.343	60.43
p-値	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

【0097】

【表 4】

表2B. CGI137領域B内の個別のCpG部位での胎盤組織及び母体血液細胞のメチル化プロファイルと比較する亜硫酸水素塩処理塩基配列決定データ及びカイ二乗検定のまとめ。個別のCpG部位は、UCSCゲノムブラウザのHuman May 2004 (hg17) アセンブリのchr21:46,249,636 (+1) に対するそれらのヌクレオチド位置により指定した。

試料 メチル化状態	指定されたCpG部位でのクローン番号									
	237	253	305	314	331	351	354	389	392	430
第3三半期の胎盤										
メチル化	39	20	39	39	26	35	28	16	20	9
非メチル化	29	48	29	29	42	33	40	52	48	59
第3三半期の母体血液細胞										
メチル化	55	55	57	57	57	59	55	56	54	57
非メチル化	4	4	2	2	2	0	3	3	5	2
比較	指定されたCpG部位でのカイ二乗及びp-値									
第3三半期の胎盤対第3三半期の母体血液細胞										
	237	263	305	314	331	361	354	389	392	430
カイ二乗	19.307	50.587	24.301	24.301	45	37.995	38.373	62.693	49.794	84.687
p-値	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

10

20

【0098】

ホスホジエステラーゼ9A (PDE9A)。PDE9Aのメチル化プロファイルを、5名の妊娠第3三半期及び5名の第1三半期から収集した胎盤組織及び対応する母体血液細胞間で試験した。クローニング及び亜硫酸水素塩処理塩基配列決定を実行し、並びに領域Aアンプリコンに関する胎盤組織及び母体血液細胞中の試験したCpG部位のメチル化指標を、図3A及び3Bにまとめた。領域Bに関する対応するデータを、図3C及び3Dにまとめた。領域Cに関する第3三半期の胎盤組織及び母体血液細胞の間の比較を、図3Eに示した。概して、胎盤は、母体血液細胞に比べ、低メチル化された。先に説明したようにカイ二乗検定を実行し、これら2種の組織間の統計学的有意差を評価した。第3三半期の比較のCpG2250以外は全て、妊娠第1及び第3三半期の両方において統計学的に有意差があった(カイ二乗検定、表3Aから3E)。

30

【0099】

【表 5】

表 3A. PDE9A 領域 A 内の個別の CpG 部位での第 3 三半期の胎盤組織及び母体血液細胞のメチル化プロファイルと比較する亜硫酸水素塩処理塩基配列決定データ、メチル化指標及びカイニ乗検定のまとめ。個別の CpG 部位は、UCSC ゲノムブラウザの Human May 2004 (hg17) アセンブリの chr21:42,978,424 (+1) の逆鎖に対するそれらのヌクレオチド位置により指定した。

母体 バフィーコート		CpG85	CpG90	CpG97	CpG100	CpG108	CpG117	CpG147	CpG164	CpG192	CpG233	CpG243
	C	37	36	37	35	35	36	30	30	23	15	29
	T	3	4	3	5	5	4	10	10	17	25	11
	メチル化指標	0.93	0.90	0.93	0.88	0.88	0.90	0.75	0.75	0.58	0.38	0.73
	C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
胎盤	C	3	3	3	4	5	4	3	3	3	3	8
	T	37	37	37	36	35	36	37	37	37	37	32
	メチル化指標	0.08	0.08	0.08	0.10	0.13	0.10	0.08	0.08	0.08	0.08	0.20
	C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	カイニ乗	54.450	51.232	54.450	45.028	42.050	48.050	34.868	34.868	20.570	5.674	20.113
	p-値	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.003	=<0.001

10

20

【0100】

【表 6】

表 3B. PDE9A 領域 A 内の個別の CpG 部位での第 1 三半期の胎盤組織及び母体血液細胞のメチル化プロファイルと比較する亜硫酸水素塩処理塩基配列決定データ、メチル化指標及びカイニ乗検定のまとめ。個別の CpG 部位は、UCSC ゲノムブラウザの Human May 2004 (hg17) アセンブリの chr21:42,978,424 (+1) の逆鎖に対するそれらのヌクレオチド位置により指定した。

母体 バフィーコート		CpG85	CpG90	CpG97	CpG100	CpG108	CpG117	CpG147	CpG164	CpG192	CpG233	CpG243
	C	38	32	38	37	38	34	34	26	27	16	24
	T	2	8	2	3	2	6	6	14	13	24	16
	メチル化指標	0.95	0.80	0.95	0.93	0.95	0.85	0.85	0.65	0.68	0.40	0.60
	C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
胎盤	C	6	6	8	7	12	8	7	3	9	6	8
	T	34	34	32	33	28	32	33	37	31	34	32
	メチル化指標	0.15	0.15	0.20	0.18	0.30	0.20	0.18	0.08	0.23	0.15	0.20
	C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	カイニ乗	48.535	31.328	43.018	42.475	33.333	31.328	33.821	26.180	14.596	5.078	11.719
	p-値	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.024	=<0.001

30

40

【0101】

表 3C. PDE9A 領域 B 内の個別の CpG 部位での第 3 三半期の胎盤組織及び母体血液細胞のメチル化プロファイルを比較する亜硫酸水素塩処理塩基配列決定データ、メチル化指標及びカイ二乗検定のまとめ。個別の CpG 部位は、UCSC ゲノムブラウザの Human May 2004 (hg17) アセンブリの chr21:42, 978, 718 (+1) に対するそれらのヌクレオチド位置により指定した。

	CpG553	CpG572	CpG577	CpG585	CpG590	CpG597	CpG613	CpG616	CpG622	CpG628	CpG636	CpG638	CpG683	CpG707
母体バフィーコート	C	38	40	40	36	35	37	35	40	37	39	39	37	39
	T	2	0	0	4	5	3	0	3	1	1	1	3	1
	メチル化指標	0.95	1.00	1.00	0.90	0.88	0.93	1.00	0.93	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98
	C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
胎盤	C	16	15	17	16	15	13	14	15	15	16	14	13	15
	T	24	25	23	24	25	27	26	25	28	24	26	27	25
	メチル化指標	0.40	0.38	0.43	0.40	0.38	0.33	0.35	0.38	0.30	0.40	0.35	0.33	0.38
	C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
カイ二乗		25.128	33.513	29.535	19.835	19.253	28.213	21.066	33.513	24.231	36.565	28.16	32.201	28.213
	p-値	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001

	CpG713	CpG723	CpG732	CpG734	CpG739	CpG750	CpG756	CpG761	CpG763	CpG772	CpG780	CpG798	CpG808	CpG820	CpG828
母体バフィーコート	C	37	40	40	40	40	37	39	40	38	40	39	40	38	2
	T	3	0	0	0	0	3	1	0	2	0	1	0	2	38
	メチル化指標	0.93	1.00	1.00	1.00	1.00	0.93	0.98	1.00	0.95	1.00	0.98	1.00	0.95	0.05
	C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
胎盤	C	23	22	16	19	17	18	16	19	18	19	20	16	14	2
	T	17	18	24	21	23	22	24	21	22	21	20	24	26	38
	メチル化指標	0.58	0.55	0.40	0.48	0.43	0.45	0.40	0.48	0.45	0.48	0.50	0.40	0.35	0.05
	C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
カイ二乗		11.267	20.717	31.488	25.827	29.535	27.649	22.362	22.633	22.364	21.488	25.827	31.488	29.066	0.263
	p-値	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	0.608

【表 8】

表 3D. PDE9A 領域 B 内の個別の CpG 部位での第 1 三半期の胎盤組織及び母体血液細胞のメチル化プロファイルと比較する亜硫酸水素塩処理塩基配列決定データ、メチル化指標及びカイ二乗検定のまとめ。個別の CpG 部位は、UCSC ゲノムブラウザの Human May 2004 (hg17) アセンブリの chr21:42,978,718 (+1) に対するそれらのヌクレオチド位置により指定した。

	CpG553	CpG572	CpG577	CpG585	CpG590	CpG597	CpG613	CpG616	CpG622	CpG628	CpG636	CpG638	CpG683	CpG707
母体バフィコート														
C	36	40	40	39	40	39	39	40	39	40	38	40	39	36
T	4	0	0	1	0	1	1	0	1	0	2	0	1	4
メチル化指標	0.90	1.00	1.00	0.98	1.00	0.98	0.98	1.00	0.98	1.00	0.95	1.00	0.98	0.90
C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
胎盤														
C	16	16	17	13	16	15	11	17	16	16	15	13	14	15
T	24	24	23	27	24	25	29	23	24	24	25	27	26	25
メチル化指標	0.40	0.40	0.43	0.33	0.40	0.38	0.28	0.43	0.40	0.40	0.38	0.33	0.35	0.38
C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
カイ二乗	19.835	31.488	29.535	34.341	31.488	30.142	38.88	29.535	28.16	31.488	27.058	37.792	32.201	21.636
p-値	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001

	CpG713	CpG723	CpG732	CpG734	CpG739	CpG750	CpG756	CpG761	CpG763	CpG772	CpG780	CpG798	CpG808
母体バフィコート													
C	37	38	40	39	40	37	40	39	40	40	38	38	39
T	3	2	0	1	0	3	0	1	0	0	2	2	1
メチル化指標	0.93	0.95	1.00	0.98	1.00	0.93	1.00	0.98	1.00	1.00	0.95	0.95	0.98
C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
胎盤													
C	14	16	17	16	16	16	16	13	17	17	18	16	15
T	26	24	23	24	24	24	24	27	23	23	22	24	25
メチル化指標	0.35	0.40	0.43	0.40	0.40	0.40	0.40	0.33	0.43	0.43	0.45	0.40	0.38
C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
カイ二乗	26.18	25.128	29.535	28.16	31.488	22.362	31.488	34.341	29.535	29.535	21.488	25.128	30.142
p-値	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001

【表 9】

表 3E. PDE9A 領域 C 内の個別の CpG 部位での第 3 三半期の胎盤組織及び母体血液細胞のメチル化プロファイルと比較する亜硫酸水素塩処理塩基配列決定データ、メチル化指標及びカイ二乗検定のまとめ。個別の CpG 部位は、UCSC ゲノムブラウザの Human May 2004 (hg17) アセンブリの chr21:42, 978, 005 (+1) に対するそれらのヌクレオチド位置により指定した。

母体バフィーコート		CpG2150	CpG2200	CpG2250	CpG2344	CpG2408	CpG2440
	C	36	39	34	39	37	39
	T	4	1	6	1	3	1
	メチル化指標	0. 90	0. 98	0. 85	0. 98	0. 93	0. 98
	C+T	40	40	40	40	40	40
胎盤	C	32	26	28	22	20	27
	T	8	14	12	18	20	13
	メチル化指標	0. 80	0. 65	0. 70	0. 55	0. 50	0. 68
	C+T	40	40	40	40	40	40
	カイ二乗	0. 882	11. 815	1. 792	17. 670	15. 622	10. 476
	p-値	0. 348	=<0. 001	0. 181	=<0. 001	=<0. 001	0. 001

【 0 1 0 4 】

ホモ・サピエンスタンパク質ホスファターゼ 1、調節（阻害）サブユニット 2 偽遺伝子 2（PPP1R2P2）。PPP1R2P2 領域 A のメチル化プロファイルを、5 名の妊娠第 3 三半期及び 5 名の第 1 三半期から収集した胎盤組織及び対応する母体血液細胞間で試験した。クローニング及び亜硫酸水素塩処理塩基配列決定を実行し、並びに胎盤組織及び母体血液細胞中の領域 A に関する試験した CpG 部位のメチル化指標を、図 4 A 及び 4 B にまとめた。概して、胎盤は、母体血液細胞に比べ、低メチル化された。先に説明したようにカイ二乗検定を実行し、これら 2 種の組織間の統計学的有意差を評価した。試験した CpG 部位の中で、2 3 種は、妊娠第 3 三半期において統計学的有意差があり、並びに 2 3 名は、妊娠第 1 三半期において統計学的有意差があった（カイ二乗検定、表 4 A 及び 4 B）。加えて、PPP1R2P2 領域 B の CpG 部位のメチル化プロファイルも、5 名の妊娠第 3 三半期から収集した胎盤組織及び対応する母体血液細胞間のクローニング及び亜硫酸水素塩処理塩基配列決定により分析した。領域 B のほとんどの CpG 部位に関して、胎盤組織は、母体血液細胞に比べ、低メチル化された。領域 B のメチル化指標を、図 4 C にまとめた。先に説明したようにカイ二乗検定を実行し、これら 2 種の組織間の統計学的有意差を評価した。1 2 種の試験した CpG 部位の中で、5 種は、統計学的に有意差があった（カイ二乗検定、表 4 C）。

【 0 1 0 5 】

【表 10】

表 4A. PPIR2P2 領域 A 内の個別の CpG 部位での第 3 三半期の胎盤組織及び母体血液細胞のメチル化プロファイルを比較する亜硫酸酸素塩処理塩基配列決定データ、メチル化指標及びカイ二乗検定のまとめ。個別の CpG 部位は、UCSC ゲノムブラウザの Human May 2004 (hg17) アセンブリの chr21:36,180,493 (+1) に対するそれらのヌクレオチド位置により指定した。

	CpG579	CpG582	CpG587	CpG589	CpG591	CpG605	CpG613	CpG616	CpG618	CpG625	CpG637	CpG654	CpG669	CpG676	CpG688	CpG697
バフィコート																
	C	61	61	60	58	60	54	62	62	60	60	60	57	54	59	58
	T	1	1	2	4	2	8	0	0	2	2	2	5	8	3	4
メチル化指標	0.98	0.98	0.97	0.94	0.97	0.87	1.00	1.00	0.97	1.00	0.97	0.97	0.92	0.87	0.95	0.94
	C+T	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62
胎盤																
	C	46	47	61	47	46	46	40	45	34	33	32	23	36	36	27
	T	16	15	1	15	16	16	22	17	28	29	30	39	26	26	35
メチル化指標	0.74	0.76	0.93	0.76	0.74	0.74	0.74	0.65	0.73	0.55	0.53	0.52	0.69	0.58	0.58	0.44
	C+T	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62
カイ二乗	13.361	12.127	1.11E-14	6.216	10.983	2.532	2.532	24.369	17.451	27.482	35.287	30.705	14.676	38.363	11.711	21.784
p-値	=<0.001	=<0.001	1.000	0.013	=<0.001	0.112	0.112	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.001

	CpG714	CpG726	CpG740	CpG746	CpG765	CpG774	CpG784	CpG802	CpG815	CpG817
バフィコート										
	C	60	55	60	61	60	61	61	62	57
	T	2	7	2	1	2	1	1	0	5
メチル化指標	0.97	0.89	0.97	0.98	0.97	0.94	0.98	0.98	1.00	0.92
	C+T	62	62	62	62	62	62	62	62	62
胎盤										
	C	49	44	44	49	51	59	29	39	33
	T	13	18	18	13	11	3	33	23	29
メチル化指標	0.79	0.71	0.71	0.79	0.82	0.95	0.60	0.47	0.63	0.53
	C+T	62	62	62	62	62	62	62	62	62
カイ二乗	7.584	5.01	13.413	9.743	5.5	1.38E-14	25.744	38.942	25.836	21.437
p-値	0.006	0.025	=<0.001	0.002	0.019	1.000	=<0.001	=<0.001	=<0.001	=<0.001

【0106】

10

20

30

40

【表 1 1】

表 4B. PPP1R2P2 領域 A 内の個別の CpG 部位での第 1 三半期の胎盤組織及び母体血液細胞のメチル化プロファイルを比較する亜硫酸水素塩処理塩基配列決定データ、メチル化指標及びカイ二乗検定のまとめ。個別の CpG 部位は、UCSC ゲノムブラウザの Human May 2004 (hg17) アセンブリの chr21:36,180,493 (+1) に対するそれらのヌクレオチド位置により指定した。

	CpG579	CpG582	CpG587	CpG589	CpG591	CpG605	CpG613	CpG616	CpG618	CpG625	CpG637	CpG654	CpG669	CpG676	CpG688	CpG697
バフィーコート																
	C	53	53	53	51	52	53	51	54	53	53	44	45	50	49	48
	T	1	1	3	2	1	3	3	0	1	1	10	9	4	5	6
メチル化指標	0.9815	0.9815	0.981	0.9444	0.963	0.981	0.9444	0.9444	1	0.9815	0.9815	0.815	0.8333	0.9259	0.9074	0.8889
	C+T	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54
胎盤																
	C	39	35	49	29	40	49	24	33	27	20	35	10	27	20	13
	T	15	19	5	25	14	5	30	21	27	34	19	44	27	34	41
メチル化指標	0.7222	0.6481	0.907	0.537	0.741	0.907	0.4444	0.6111	0.5	0.3704	0.5926	0.648	0.1852	0.5	0.3704	0.2407
	C+T	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54
カイ二乗	12.399	17.734	1.588	21.263	8.878	1.588	29.498	15.482	33.383	43.285	22.097	3.017	42.83	21.899	31.465	43.547
p-値	≤ 0.001	≤ 0.001	0.208	≤ 0.001	0.003	0.208	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	0.082	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001

	CpG714	CpG726	CpG740	CpG746	CpG765	CpG774	CpG784	CpG802	CpG815	CpG817
バフィーコート										
	C	52	53	53	54	52	51	51	54	51
	T	2	1	2	0	2	3	3	0	3
メチル化指標	0.963	0.9815	0.963	0.981	1	0.963	0.9444	0.9444	1	0.9444
	C+T	54	54	54	54	54	54	54	54	54
胎盤										
	C	40	29	43	42	33	27	33	32	22
	T	14	25	11	12	21	27	21	22	32
メチル化指標	0.741	0.537	0.796	0.778	0.6481	0.6111	0.5	0.6111	0.5926	0.4074
	C+T	54	54	54	54	54	54	54	54	54
カイ二乗	8.878	26.797	5.597	8.745	20.693	17.899	24.415	15.482	25.173	33.14
p-値	0.003	≤ 0.001	0.018	0.003	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001

【0107】

10

20

30

40

【表 1 2】

表 4C. PPP1R2P2 領域 B 内の個別の CpG 部位での第 1 三半期の胎盤組織及び母体血液細胞のメチル化プロファイルと比較する亜硫酸水素塩処理塩基配列決定データ、メチル化指標及びカイ二乗検定のまとめ。個別の CpG 部位は、UCSC ゲノムブラウザの Human May 2004 (hg17) アセンブリの chr21 : 36,180,493 (+1) に対するそれらのヌクレオチド位置により指定した。

	CpG826	CpG829	CpG854	CpG863	CpG872	CpG887	CpG892	CpG942	CpG945	CpG951	CpG967	CpG979
母体バフィコート												
C	31	32	40	38	39	36	36	38	29	30	2	7
T	9	8	0	2	1	4	4	2	11	10	38	33
メチル化指標	0.78	0.80	1.00	0.95	0.98	0.90	0.90	0.95	0.73	0.75	0.05	0.18
C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
胎盤												
C	31	30	33	28	26	19	31	27	24	24	0	10
T	9	10	7	12	14	21	9	13	16	16	40	30
メチル化指標	0.78	0.75	0.83	0.70	0.65	0.48	0.78	0.68	0.60	0.60	0.00	0.25
C+T	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
カイ二乗	0.072	0.072	5.636	7.013	11.815	14.895	1.470	8.205	0.894	1.425	0.513	0.299
p-値	0.789	0.789	0.018	0.008	<0.001	<0.001	0.225	0.004	0.344	0.233	0.474	0.585

【0108】

F e m 1 A (シーエレガンス(*C. elegans*))への類似。F e m 1 A (シーエレガンス)への類似のメチル化プロファイルを、5名の妊娠第3三半期から収集した胎盤組織及び対応する母体血液細胞間で試験した。クローニング及び亜硫酸水素塩処理塩基配列決定を実行し、並びに胎盤組織及び母体血液細胞中の試験したC p G部位のメチル化指標を、各々、図5A及び5Bにまとめた。概して、胎盤は、母体血液細胞に比べ、低メチル化された。先に説明したようにカイ二乗検定を実行し、これら2種の組織間の統計学的有意差を評

10

20

30

40

50

価した。試験した CpG 部位の中で、8 種は、領域 A において統計学的有意差があり、及び 7 種は、領域 B において統計学的有意差があった（カイ二乗検定、表 5 A 及び 5 B）。

【 0 1 0 9 】

【 表 1 3 】

表 5A. Fem1A (シーエレガンス) への類似の領域 A 内の個別の CpG 部位での第 3 三半期の胎盤組織及び母体血液細胞のメチル化プロファイルと比較する亜硫酸水素塩処理塩基配列決定データ、メチル化指標及びカイ二乗検定のまとめ。個別の CpG 部位は、UCSC ゲノムブラウザーの Human May 2004 (hg17) アセンブリの chr21: 14, 056, 070 (+1) に対するそれらのヌクレオチド位置により指定した。

		CpG358	CpG429	CpG467	CpG472	CpG475	CpG484	CpG487	CpG491
バフィーコート	C	39	44	40	42	42	42	38	41
	T	5	0	4	2	2	2	6	3
	メチル化指標	0.89	1.00	0.91	0.95	0.95	0.95	0.86	0.93
胎盤	C	8	24	17	14	13	16	16	18
	T	36	20	27	30	31	28	28	26
	メチル化指標	0.18	0.55	0.39	0.32	0.30	0.36	0.36	0.41
カイ二乗		41.1	23.359	24.104	35.799	38.012	31.609	16.97	24.893
p-値		P=<0.001	P=<0.001	P=<0.001	P=<0.001	P=<0.001	P=<0.001	P=<0.001	P=<0.001

10

20

【 0 1 1 0 】

【表 1 4】

表 5B. Fem1A(シーエレガンス)への類似の領域 B 内の個別の CpG 部位での第 3 三半期の胎盤組織及び母体血液細胞のメチル化プロファイルと比較する亜硫酸水素塩処理塩基配列決定データ、メチル化指標及びカイ二乗検定のまとめ。個別の CpG 部位は、UCSC ゲノムブラウザの Human May 2004 (hg17) アセンブリの chr21: 14, 056, 070 (+1) に対するそれらのヌクレオチド位置により指定した。

	CpG623	CpG650	CpG653	CpG655	CpG659	CpG668	CpG676	CpG686	CpG692	CpG709	CpG712	CpG715
バフィコート	C	23	24	21	18	22	21	24	23	23	19	23
	T	5	4	7	10	6	7	4	5	5	9	5
メチル化指標		0.82	0.86	0.75	0.64	0.79	0.75	0.86	0.82	0.82	0.68	0.82
胎盤	C	23	16	14	11	12	13	9	9	12	12	14
	T	5	12	14	17	16	15	19	19	16	16	14
メチル化指標		0.82	0.57	0.50	0.39	0.43	0.46	0.32	0.32	0.43	0.43	0.50
カイ二乗		0.122	4.288	2.743	2.575	6.064	3.668	14.461	12.323	7.619	2.601	5.098
p-値		0.727	0.038	0.098	0.109	0.014	0.055	P<0.001	P<0.001	0.006	0.107	0.024

10

20

30

40

【0 1 1 1】

C G I 0 0 9。2 名の母体血液細胞試料由来の C G I 0 0 9 のメチル化プロファイル、正常妊娠から収集した 2 名の第 1 三半期及び 2 名の第 3 三半期の胎盤組織試料、更には胎児がトリソミー 2 1 を有する妊娠からの 2 名の第 1 三半期胎盤組織試料のものと比較した。クローニング及び亜硫酸水素塩処理塩基配列決定を実行し、並びに胎盤組織及び母体血液細胞中の試験した CpG 部位のメチル化指標を、図 6 にまとめた。概して、胎盤は、

50

母体血液細胞に比べ、高メチル化された。

【 0 1 1 2 】

カルボニルレダクターゼ 1 (C B R 1)。2 名の母体血液細胞試料由来の C B R 1 のプロファイルを、正常妊娠から収集した 2 名の第 1 三半期胎盤組織試料、更には胎児がトリソミー 2 1 を有する妊娠からの 2 名の第 1 三半期胎盤組織試料のものと比較した。クローニング及び亜硫酸水素塩処理塩基配列決定を実行し、並びに胎盤組織及び母体血液細胞中の試験した C p G 部位のメチル化指標を、図 7 にまとめた。概して、胎盤は、母体血液細胞に比べ、高メチル化された。20 種の試験した C p G 部位の中で、正常妊娠及びトリソミー 2 1 妊娠の両方の母体血液細胞及び第 1 三半期胎盤組織の間で全て、統計学的有意差があった (カイ二乗検定、表 6)。

【 0 1 1 3 】

【表 1 5】

表 6. CBR1 内の個別の CpG 部位での正常及びトリソミー 21 の第 1 三半期の胎盤組織及び母体血液細胞のメチル化プロファイルと比較する亜硫酸水素塩処理塩基配列決定データ、メチル化指標及びカイニ乗検定のまとめ。個別の CpG 部位は、UCSC ゲノムブラウザの Human May 2004 (hg17) アセンブリの chr21 :36,363,538 (+1) に対するそれらのヌクレオチド位置により指定した。

CpG	474	481	488	520	529	536	539	547	577	582	590	599	605	607	614	618	622	633	639	641
母体バフィーコート	#C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	#T	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	27	28	
第 1 三半期 T21 胎盤	#C	11	11	9	8	6	7	7	5	10	8	7	10	8	6	7	8	8	7	7
	#T	15	15	17	18	20	19	19	21	16	18	19	16	18	20	19	18	19	19	19
第 1 正常胎盤	#C	8	8	6	7	8	7	8	7	8	6	7	6	8	8	7	7	6	5	8
	#T	14	14	16	15	14	15	14	15	14	16	15	16	14	14	15	15	16	17	14
第 1 三半期 T21 胎盤対母体血液細胞	カイニ乗	12.383	12.383	9.272	7.823	5.12	6.439	6.439	3.866	10.791	7.823	6.439	10.791	7.823	5.12	6.439	7.823	7.823	6.439	4.122
	p-値	<0.001	<0.001	0.002	0.005	0.024	0.011	0.011	0.049	0.001	0.005	0.011	0.001	0.005	0.024	0.011	0.005	0.005	0.011	0.042
第 1 三半期正常胎盤対母体血液細胞	カイニ乗	9.567	9.567	6.287	7.885	9.567	7.885	9.567	7.885	9.567	6.287	7.885	6.287	9.567	9.567	9.567	7.885	7.885	6.287	2.659
	p-値	0.002	0.002	0.012	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.012	0.005	0.012	0.002	0.002	0.002	0.05	0.005	0.012	0.103
メチル化指標	474	481	488	520	529	536	539	547	577	582	590	599	605	607	614	618	622	633	639	641
第 1 三半期正常胎盤	0.3636	0.3636	0.2727	0.3182	0.3636	0.3182	0.3636	0.3182	0.3636	0.2727	0.3182	0.2727	0.3636	0.3636	0.3636	0.3182	0.3182	0.2727	0.2273	0.3636
第 1 三半期 T21 胎盤	0.4231	0.4231	0.3462	0.3077	0.2308	0.2692	0.2692	0.1923	0.3846	0.3077	0.2692	0.3846	0.3077	0.2308	0.2692	0.3077	0.3077	0.2692	0.2692	0.2692
第 1 三半期母体血液細胞	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0357

【0 1 1 4】

ダウン症細胞接着分子 (DSCAM)。2 名の母体血液細胞試料由来の DSCAM のメチル化プロファイルを、正常妊娠から収集した 2 名の第 1 三半期及び 2 名の第 3 三半期の胎盤組織試料、更には胎児がトリソミー 21 を有する妊娠からの 2 名の第 1 三半期の胎盤

10

20

30

40

50

組織試料のものと比較した。クローニング及び亜硫酸水素塩処理塩基配列決定を実行し、並びに胎盤組織及び母体血液細胞中の試験したCpG部位のメチル化指標を、図8にまとめた。概して、胎盤は、母体血液細胞に比べ、高メチル化された。27種の試験したCpG部位の中で、正常妊娠及びトリソミー21妊娠の両方の母体血液細胞及び第1三半期胎盤組織の間で全て、統計学的有意差があった(カイ二乗検定、表7)。

【0115】

【表 1 6】

表 7. DSCAM 内の個別の CpG 部位での正常及びトリソミー 21 の第 1 三半期の胎盤組織及び母体血液細胞のメチル化プロファイルと比較する亜硫酸塩処理塩基配列決定データ、メチル化指標及びカイ二乗検定のまとめ。個別の CpG 部位は、UCSC ゲノムブラウザの Human May 2004 (hg17) アセンブリの chr21 : 41, 139, 872 (+1) に対するそれらのヌクレオチド位置により指定した。

CpG	810	814	817	819	825	831	835	848	851	870	878	895	901	903	907	920	928	931	942
母体バフィーコート																			
#C	2	1	1	1	1	2	2	1	2	0	1	2	1	0	0	0	1	1	1
#T	24	25	25	25	25	24	24	25	24	26	25	24	25	26	26	26	25	25	25
T21胎盤																			
#C	9	9	9	10	9	9	10	10	9	10	9	9	9	10	10	10	8	9	10
#T	5	5	5	4	5	5	4	4	5	4	5	5	5	4	4	4	6	5	4
第3正常胎盤																			
#C	4	3	3	3	3	4	4	1	5	5	5	3	2	2	3	2	3	2	3
#T	20	21	21	21	21	20	20	23	19	19	19	21	22	22	21	22	21	22	21
第1正常胎盤																			
#C	8	8	8	8	10	8	8	8	8	8	6	9	8	8	8	7	8	7	7
#T	10	10	10	10	8	10	10	10	10	10	12	9	10	10	10	11	10	11	11
第1三半期正常胎盤対母体血液細胞																			
カイ二乗	6.222	8.424	8.424	8.424	12.536	6.222	6.222	8.424	6.222	11.294	4.885	8.023	8.424	11.294	11.294	9.293	8.424	6.583	6.583
p-値	0.013	0.004	0.004	0.004	<0.001	0.013	0.013	0.004	0.013	<0.001	0.027	0.005	0.004	<0.001	<0.001	0.002	0.004	0.01	0.01
第3三半期正常胎盤対母体血液細胞																			
カイ二乗	0.292	0.366	0.366	0.366	0.366	0.292	0.292	0.442	0.865	3.926	1.991	0.0089	0.0051	0.608	1.596	0.608	0.366	0.0051	0.366
p-値	0.589	0.545	0.545	0.545	0.545	0.589	0.589	0.506	0.352	0.048	0.158	0.925	0.943	0.435	0.206	0.435	0.545	0.943	0.545
第1三半期T21胎盤対母体血液細胞																			
カイ二乗	11.918	14.652	14.652	17.595	14.652	11.918	14.699	17.595	11.918	21.099	14.652	11.918	14.652	21.099	21.099	21.099	11.925	14.652	17.595
p-値	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
メチル化指標																			
CpG	810	814	817	819	826	831	835	848	851	870	878	895	901	903	907	920	928	931	942
第1三半期正常胎盤	0.4444	0.4444	0.4444	0.4444	0.5556	0.4444	0.4444	0.4444	0.4444	0.4444	0.3333	0.5	0.4444	0.4444	0.4444	0.3889	0.4444	0.3889	0.3889
第1三半期T21胎盤	0.6429	0.6429	0.6429	0.7143	0.6429	0.6429	0.7143	0.7143	0.6429	0.7143	0.6429	0.6429	0.6429	0.7143	0.7143	0.7143	0.5714	0.6429	0.7143
第3三半期正常胎盤	0.1667	0.125	0.125	0.125	0.125	0.1667	0.1667	0.0417	0.2083	0.2083	0.2083	0.125	0.0833	0.0833	0.125	0.0833	0.125	0.0833	0.125
第1三半期血液細胞	0.0769	0.0385	0.0385	0.0385	0.0385	0.0769	0.0769	0.0385	0.0769	0	0.0385	0.0769	0.0385	0	0	0	0.0385	0.0385	0.0385

【0 1 1 6】

第 2 1 染色体オープンリーディングフレーム 2 9 (C 2 1 o r f 2 9) 。 2 名の母体血液細胞試料由来の C 2 1 o r f 2 9 のメチル化プロファイルを、正常妊娠から収集した 1 名の第 1 三半期及び 2 名の第 3 三半期の胎盤組織試料、更には胎児がトリソミー 2 1 を有

する妊娠からの 2 名の第 1 三半期の胎盤組織試料のものと比較した。クローニング及び亜硫酸水素塩処理塩基配列決定を実行し、並びに胎盤組織及び母体血液細胞中の試験した CpG 部位のメチル化指標を、図 9 にまとめた。概して、胎盤は、母体血液細胞に比べ、高メチル化された。16 種の試験した CpG 部位の中で、母体血液細胞とトリソミー 21 妊娠第 1 三半期胎盤組織、正常妊娠の妊娠第 1 三半期及び第 3 三半期の胎盤組織の間で、各々、全て、9 種及び 10 種の部位が、統計学的有意差があった（カイ二乗検定、表 8）。

【 0 1 1 7 】

【表 17】

表 8. C21orf29 内の個別の CpG 部位での正常及びトリソミー21の第1三半期の胎盤組織及び母体血液細胞のメチル化プロファイルと比較する亜硫酸水素塩処理塩基配列決定データ、メチル化指標及びカイ二乗検定のまとめ。個別の CpG 部位は、UCSC ゲノムブラウザの Human May 2004 (hg17) アセンブリの chr21: 44,953,288 (+1) に対するそれらのヌクレオチド位置により指定した。

	CpG	533	540	555	558	601	612	623	637	639	643	656	669	672	674	682	685
第1三半期正常胎盤	#C	5	4	6	4	8	4	3	1	1	4	3	1	1	2	3	1
	#T	3	4	2	4	0	4	5	7	7	4	5	7	7	6	5	7
第1三半期T21胎盤	#C	9	10	9	5	12	10	11	12	7	12	12	11	7	8	8	8
	#T	7	6	7	11	4	6	5	4	9	4	4	5	9	8	8	8
第3三半期正常胎盤	#C	5	6	4	2	13	4	14	7	8	11	5	2	1	2	1	4
	#T	17	16	18	20	9	18	8	15	14	11	17	20	21	20	21	18
第1三半期母体血液細胞	#C	0	1	0	1	2	1	3	2	1	2	0	1	2	1	0	1
	#T	24	23	24	23	22	23	21	22	23	22	24	23	22	23	24	23
第1三半期正常胎盤対第1三半期母体血液細胞																	
カイ二乗		13.3531	6.4000	17.5043	6.4000	19.3939	6.4000	1.0940	0.1226	N/A	4.3761	6.0077	N/A	0.1226	1.1034	6.0077	N/A
p-値		0.0003	0.0114	0.0000	0.0114	0.0000	0.0114	0.2956	0.7262	N/A	0.0364	0.0142	N/A	0.7262	0.2935	0.0142	N/A
第1三半期T21胎盤対第1三半期母体血液細胞																	
カイ二乗		14.3429	13.589	14.3429	3.6029	15.9386	13.589	10.994	15.939	7.0898	15.939	22.267	16.116	5.0239	9.086	12.038	9.086
p-値		0.00015	0.0002	0.00015	0.0577	6.5E-05	0.0002	0.0009	7E-05	0.0078	7E-05	2E-06	5E-05	0.025	0.0026	0.0005	0.0026
第3三半期正常胎盤対第1三半期母体血液細胞																	
カイ二乗		3.99865	3.1277	2.76351	0.9379	11.2461	1.1054	10.781	2.6888	5.6535	7.8813	3.9987	0.9379	0.0061	0.0061	0.0019	1.1054
p-値		0.4554	0.077	0.9644	0.061	0.0008	0.2931	0.001	0.1023	0.0174	0.005	0.0455	0.0061	0.9379	0.9379	0.9649	0.2931
メチル化指標																	
CpG		533	540	555	558	601	612	623	637	639	643	656	669	672	674	682	685
第1三半期正常胎盤		0.6250	0.5000	0.7500	0.5000	1.0000	0.5000	0.3750	0.1250	0.1250	0.5000	0.3750	0.1250	0.1250	0.2500	0.3750	0.1250
第1三半期T21胎盤		0.5625	0.6250	0.5625	0.3125	0.7500	0.6250	0.6875	0.7500	0.4375	0.7500	0.7500	0.6875	0.4375	0.5000	0.5000	0.5000
第3三半期正常胎盤		0.2273	0.2727	0.1818	0.0909	0.5909	0.1818	0.6364	0.3182	0.3636	0.5000	0.2273	0.0909	0.0455	0.0909	0.0455	0.1818
第1三半期母体血液細胞		0.0000	0.0417	0.0000	0.0417	0.0833	0.0417	0.1250	0.0833	0.0417	0.0833	0.0000	0.0417	0.0833	0.0417	0.0000	0.0417

【0118】

胎盤組織と母体血液細胞の間で示差的メチル化パターンを示さなかった遺伝子座。胎盤組織と母体血液細胞の間の示差的メチル化は、試験した遺伝子座全てについて普遍的には認められなかった。CGI111のメチル化プロファイルを、4名の妊娠第3三半期か

10

20

30

40

50

ら収集した胎盤組織と対応する母体血液細胞の間で試験した。クローニング及び亜硫酸水素塩処理塩基配列決定を実行し、結果を図 10 に示した。母体血液細胞及び胎盤組織の両方に由来するクローンは、優先的にメチル化されなかった。

【 0 1 1 9 】

同様に、5名の妊娠第3三半期の母体血液細胞と胎盤組織の間のメチル化プロファイルは、CGI 121に関して、CpG部位1603を除いて、有意差はなかった（図 11 及び表 9）。

【 0 1 2 0 】

表 9. CG1121 内の個別の CpG 部位での第 1 三半期の胎盤組織及び母体血液細胞のメチル化プロファイルと比較する亜硫酸塩処理塩基配列決定データ、メチル化指標及びカイニ乗検定のまとめ。個別の CpG 部位は、UCSC ゲノムブラウザの chr21 : 45,262,112 (+1) に対するそれらのヌクレオチド位置により指定した。

		CpG 1477	CpG 1480	CpG 1493	CpG 1505	CpG 1512	CpG 1514	CpG 1518	CpG 1528	CpG 1533	CpG 1553	CpG 1560	CpG 1567	CpG 1581	CpG 1603	CpG 1610	CpG 1616	CpG 1619	CpG 1643	CpG 1648	CpG 1656	CpG 1659
バフィー コート	C	3	1	3	5	8	8	10	9	6	8	3	5	8	3	10	7	10	14	14	13	17
	T	19	21	19	17	14	14	12	13	16	14	19	17	14	19	12	15	12	8	8	9	5
	メチル化指標	0.14	0.05	0.14	0.23	0.36	0.36	0.45	0.41	0.27	0.36	0.14	0.23	0.36	0.14	0.45	0.32	0.45	0.64	0.64	0.59	0.77
	C+T	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
胎盤	C	7	5	7	9	14	15	14	9	6	13	4	3	9	11	11	9	6	10	14	14	11
	T	15	17	15	13	8	7	8	13	16	9	18	19	13	11	11	13	16	12	8	8	11
	メチル化指標	0.32	0.23	0.32	0.41	0.64	0.68	0.64	0.41	0.27	0.59	0.18	0.14	0.41	0.50	0.50	0.41	0.27	0.45	0.64	0.64	0.5
	C+T	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
	カイ二乗	1.165	1.737	1.165	0.943	2.273	3.280	0.825	0.094	0.115	1.458	6E-16	0.153	0.096	5.133	0.091	0.098	0.884	0.825	0.098	0.096	2.455
	p-値	0.280	0.188	0.280	0.332	0.132	0.070	0.364	0.759	0.735	0.227	1.000	0.696	0.757	0.023	0.763	0.754	0.347	0.364	0.754	0.757	0.117

他方で、K I A A 0 6 5 6、熱ショック転写因子2結合タンパク質(H S F 2 B P)及びC O L 6 A 1に関して、試験した胎盤組織及び母体血液細胞は、両方とも優先的にメチル化されたが、そのメチル化指標間に有意差はなかった。

【 0 1 2 2 】

実施例 2

胎盤組織と母体血液細胞の間で示差的メチル化プロファイルを伴う C G - 含有ゲノム配列は、母体血液検出のための胎児のエピジェネティックマーカーとして有用である。母体血液中の胎児 - 由来の D N A 分子を母体に由来するものから識別するためには、アッセイは、各々示差的にメチル化された遺伝子座の胎盤 - 特異的エピジェネティック型の検出を目標としなければならない。C G I 1 3 7 の胎盤 - 特異的型 (図 1) を、すなわちメチル化されない分子を標的化するアッセイが開発され、並びにその特異性について評価された。

【 0 1 2 3 】

材料及び方法

試料の処理及び D N A 抽出。第 3 三半期の胎盤組織試料及び対応する母体血液試料を、選択された (elective) 帝王切開による出産を経験している対象から収集した。母体血液 (1 0 m L) を、出産前と出産後に、E D T A チューブに採取した。これらの血液試料を、1 6 0 0 x g、4 で 1 0 分間遠心分離した。血漿を慎重に除去した後に、パフィーコート部分を得、個別に - 2 0 で貯蔵した。更に血漿を、1 6 , 0 0 0 x g で 1 0 分間遠心分離し、血漿 1 . 6 m L を、清潔なポリプロピレン製チューブへ、下側層細胞ペレットを破壊しないように注意深く移した。胎盤組織の生検試料を、リン酸緩衝生理食塩水ですすぎ、飾りのないポリプロピレン製チューブ内で - 8 0 で貯蔵した。QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, ヒルデン, 独国) を用い、胎盤組織から D N A を抽出した。母体の血漿及びパフィーコート由来の D N A を、QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, ヒルデン, 独国) を製造業者の指示に従い使用し、抽出した。胎盤及びパフィーコートの各 D N A 試料について、1 µ g D N A を、Methylamp (商標) DNA Modification Kit (Epigentek Inc., ニューヨーク, NY) により、製造業者の指示に従い、メチル化されないシトシン残基をウラシルへ転換するが、メチル化されたシトシン残基は未変化で残す亜硫酸水素塩転換に供した。1 . 6 m L 血漿から抽出された D N A も、亜硫酸水素塩転換に供した。パフィーコート及び胎盤の D N A 調製物の 9 5 : 5 の比の混合物で構成される、混合された亜硫酸水素塩 - 転換された D N A の追加のアリコートも調製した。

【 0 1 2 4 】

均質 M a s s E X T E N D アッセイ。胎盤組織は C G I 1 3 7 で母体血液細胞に関して低メチル化されているので (図 1 及び 2)、C G I 1 3 7 のメチル化されない型の検出を標的とするアッセイをデザインした。本アッセイは、MassARRAY (Sequenom, サンディエゴ, CA) プラットフォームを基本にしている。メチル化特異的プライマーを、C G I 1 3 7 のメチル化されない型の特異的増幅のためにデザインした。これらのプライマーの位置の図解は図 1 2 に示し、これらのプライマー配列は表 1 0 に列記した。フォワードプライマーは、C p G 部位 4 7 2、4 7 7、4 8 1 及び 4 8 6 に及ぶ。リバープライマーは、C p G 部位 5 5 3 及び 5 6 1 に及ぶ。アンプリコンは、G e n B a n k 寄託番号: N T _ 0 1 1 5 1 5 の座標 2 7 4 2 9 9 8 - 2 7 4 3 1 3 0 間に広がる。C p G 部位 5 4 1 のメチル化状態を調べるために、均質 MassEXTEND (hME) プロトコルを基本にしたプライマー伸長アッセイ (図 1 2) をデザインした。基本的に、このプライマーの伸長プライマーは、C p G 部位 5 4 1 までヌクレオチド 3 ' へ広がる (表 1 0)。メチル化されない分子は、d d (2 ' , 3 ' - ジデオキシヌクレオチド) A T P の取込みにより、1 個のヌクレオチドだけ伸長される一方、メチル化された分子は、d G T P、引き続き d d A T P の取込みにより、2 個のヌクレオチドだけ伸長する。メチル化されない分子及びメチル化された分子は、引き続き検出され、それらの質量差について、MassARRAY (商標) Analyzer Compact (Sequenom) 質量分析において分解される。

【 0 1 2 5 】

10

20

30

40

【表 19】

表 10. CGI137 のメチル化されない型を標的化する hME アッセイのプライマー配列

プライマー	配列 (5' から3')
フォワードプライマー	TGTTATAGCTAGGGATATGTTTTGTTTGACGT
リバースプライマー	TCTCTACCTACAATTCTATAAAAAACACTTATCCA
伸長プライマー	ATCCCCAACATTTTCCC

10

【0126】

胎盤（亜硫酸水素塩転換前の DNA 150 ng と等量）、母体バフィーコート試料及び混合物由来の亜硫酸水素塩 - 転換された DNA の 3 μ L に加え、亜硫酸水素塩 - 転換された血漿 DNA の 10 μ L（母体血漿 1.6 mL から抽出した DNA と等量）を、各 25 μ L の PCR 反応において増幅した。各反応液は、2.0 mM MgCl₂ (Applied Biosystems)、dATP、dGTP 及び dCTP の各々 200 μ M、dUTP の 400 μ M (Applied Biosystems)、フォワード及びリバースプライマー各々 200 nM (Integrated DNA Technologies, コラルビル, IA)、並びに AmpliTaq Gold（登録商標）DNA ポリメラーゼ 1 U (Applied Biosystems) を含む、1X PCR 緩衝液 (Applied Biosystems, フォスターシティー, CA) を含んだ。PCR 反応は、95 で 10 分間で開始し、引き続き 94 で 30 秒間の変性、60 で 40 秒間のアニーリング、72 で 40 秒間の伸長を 40 サイクルし、並びに最後に 72 で 5 分間のインキュベーションした。

20

【0127】

PCR 産物に、エビのアルカリホスファターゼ処理を施し、残留する dNTP を脱リン酸化し、後続のプライマー伸長アッセイにおけるそれらの取込みを防いだ。各 25 μ L の PCR 反応液に関して、hME 緩衝液 (Sequenom) 0.34 μ L、エビのアルカリホスファターゼ (Sequenom) 0.6 μ L、及び水 3.06 μ L を添加した。この反応混合液を、37 で 40 分間インキュベーションし、引き続き 85 で 5 分間失活させた。

【0128】

プライマー伸長反応に関して、1500 nM の伸長プライマー (Integrated DNA Technologies)、1.15 U の Thermosequenase (Sequenom)、並びに ddATP、ddCTP、dTTP 及び dGTP 各 64 μ M (Sequenom) を含有する、塩基伸長反応カクテル 4 μ L を、PCR 産物 10 μ L へ添加した。反応条件は、94 で 2 分間、引き続き 94 で 5 秒間、52 で 5 秒間、及び 72 で 5 秒間を 75 サイクルであった。

30

【0129】

質量分析を妨害するかもしれない塩を除去するために、最終塩基伸長産物を、SpectroCLEAN (Sequenom) 樹脂できれいにした。水 24 μ L 及び樹脂 12 mg を、各塩基伸長産物に添加した。最終混合物を、回転板 (rotator) で 20 分間混合した。361 g で 5 分間遠心分離した後、反応液およそ 10 nL を、SpectroPoint ナノディスペンサー (Sequenom) を用い、3-ヒドロキシピコリン酸のマトリックスを予めスポットした 384 - フォーマット SpectroCHIP (Sequenom) 上に分注した。MassARRAY (商標) Analyzer Compact 質量分析計 (Sequenom) を使用し、SpectroCHIP からデータ獲得した。質量分析データを、SpectroTYPER (Sequenom) データベースへ解析のために自動的に取り込んだ。

40

【0130】

結果と考察

MassARRAY 解析のための質量スペクトルを、図 13 に示している。CGI137 のメチル化されない型のプライマー伸長産物を、胎盤及び出産前血漿 DNA 試料に加え、母体バフィーコートと胎盤 DNA の 95 : 5 混合物において検出することができる。これらのデータは、本アッセイは、画分濃度 5 % まで低下された、母体血漿及び DNA 混合物中の C

50

G I 1 3 7 の胎盤 - 由来のメチル化されない型の検出に対し感度がよいことを示唆している。出産後母体血漿試料において、シグナルは検出されず、このことはC G I 1 3 7 のメチル化されない型の妊娠 - 特異性を確認している。母体バフィーコート試料中のシグナルの欠如も、本アッセイのC G I 1 3 7 のメチル化されない型の検出に対する特異性を確認している。まとめると、胎盤組織と母体血液細胞の間のC G I 1 3 7 のメチル化プロファイルの差異のために、母体血液細胞由来のC G I 1 3 7 メチル化された分子のバックグラウンド間で、C G I 1 3 7 の胎盤 - 由来の型を検出することを目標とする、感度の良い特異的アッセイを開発することができる。胎盤は、胎児DNAの母体循環への放出の組織給源であり(Chimら, 前掲)、母体循環は母体血液細胞由来のDNAの高いバックグラウンドを含む(Liuら, 前掲)ので、胎盤 - 特異的エピジェネティックマーカーを標的化するアッセイは、母体血液中の胎児 - 特異的核酸分子を検出するために有用である。

10

【 0 1 3 1 】

実施例 3

別の方法である亜硫酸水素塩制限併用解析 (C O B R A) (Xiong及びLaird, Nucleic Acids Res 25: 2532-2534, 1997) を使用し、胎盤及び母体血液細胞由来のDNAの間の第21染色体上の3ゲノム配列 (表 1 1) の示差的メチル化の存在を評価した。

【 0 1 3 2 】

【表 2 0】

表 11. 第 21 染色体上の試験したゲノム配列のアイデンティティ、位置、プライマー配列及び PCR 反応条件。米国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) の GenBank に登録されたゲノムコンテイング上の各領域 (寄託番号、バージョン、開始及び終結ヌクレオチド番号)、並びに UCSC ゲノムブラウザ (genome.ucsc.edu web site で入手) の Human May 2004 (hg17) アセンブリ上の染色体位置 (染色体、開始及び終結ヌクレオチド番号) を、各々、第二列及び第三列に示している。

配列名	ゲノムコンテイング 上の領域	染色体位置	F-プライマー (5'-3')	R-プライマー (5'-3')	PCR条件					
					MgCl ₂ (mM)	Primer (nM)	PCRx エンハンサー	HotStar Taq (U)	アニーリング 温度 (°C)	サイクル 数
HLC5領域A	NT_011512.10 : 24015427-24015090	chr21 : 34, 275, 090- 37, 275, 427	GGAGTGTTAAATTTC GTTATTTTGTGTTAT	CRCTACCGTTCTC CACTAACTACTCAAA	3	200	2x	0.4	58	55
HLC5領域B1	NT_011512.10 : 24015074-24014765	chr21 : 37, 274, 765- 37, 275, 074	AGGAGTTAGAVGTT TTAGTTCGTGGTT	CTAAACACCCR AATCCCCAAA	2.5	200	2x	0.4	60	50
HLC5領域B2	NT_011512.10 : 24015063-24014651	chr21 : 37, 274, 651- 37, 275, 063	GTTTAGTTCGT GGTTAGAGTGGT	CTAAAAATAAAAA CAAAATCCAAACAAA	3	200	2x	0.4	58	55
CG1009	NT_011512.10 : 12596248-12596458	chr21 : 25, 856, 248- 25, 856, 458	AAAAGCGTTTCG TVCGTTATGAGTTAT	AACTAAATCRACRTA CCTACAATACCAAAA	3	200	2x	0.4	58	50
CG1132	NT_011515.11 : 2381159-2381368	chr21 : 45, 888, 251- 45, 888, 460	TTGCGGTTAY GGCGATTTAGTTT	CRAAACRAACR AACCAAACCTAA	3	200	2x	0.4	58	50

10

20

30

40

【0133】

材料及び方法

亜硫酸水素塩制限併用解析 (Combined Bisulfite Restriction Analysis) (COBRA)。
DNA 1 µg を、EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, オレンジ, CA) により

50

、製造業者の指示に従い、亜硫酸水素塩転換に供した。その後亜硫酸水素塩へ転換された DNA (当初の非転換 DNA 投入量を基に) 40 ng に、一部変更した実施例 1 に説明されたような PCR 増幅を施した。HotStar Taq DNA Polymerase Kit (Qiagen, ヒルデン, 独国) 供給の試薬を使用した。各 PCR のための試薬組成は、表 11 に詳細に示した。典型的には、PCR は、MgCl₂、プライマー、HotStar Taq、1X PCR 緩衝液、各 dNTP の 50 μM、及び 2X PCR x エンハンサー (Invitrogen, カールスバッド, CA) を含む、最終反応容積 20 μl で実行した。温度プロファイルは、最初の変性工程 95 で 15 分間、引き続き 95 で 20 秒間、58 もしくは 60 で 30 秒間 (表 11)、72 で 1.5 分間の 50 ~ 55 サイクル、並びに最後の伸長 72 で 3 分間からなった。その後 PCR 産物に、制限酵素消化を施した。各遺伝子座それぞれに使用した制限酵素は、亜硫酸水素塩転換後のメチル化された配列とメチル化されない配列の間のその識別能に関して選択した。本質的に制限部位は、メチル化された配列又はメチル化されない配列のいずれか一方のみに存在し、両方には存在せず、そのためこれらの配列の一方が消化されるのに対し、他方は依然無傷である (表 12)。制限酵素消化は、PCR 産物 5 μl、1X 好適な緩衝液、及び 10 U 制限酵素 (又は偽消化のために含まず) を含む、最終反応容積 20 μl 中で、製造業者の推奨温度で 2 時間実行した。全ての酵素は、New England Biolabs (ビバリー, MA) から購入した。その後消化産物は、ゲル電気泳動により分析した。

10

【0134】

【表 21】

20

表 12. COBRA 分析のための結果の予測

遺伝子座名	酵素	切断状態	メチル化状態	完全な消化による産物 (bp)
HLCS 領域 A	BstUI	切断せず	メチル化されず	338
		切断	メチル化された	285, 53
HLCS 領域 B1	BstUI	切断せず	メチル化されず	310
		切断	メチル化された	45, 22, 176, 30, 37
HLCS 領域 B2	BstUI	切断せず	メチル化されず	413
		切断	メチル化された	34, 22, 176, 30, 151
CGI009	BstUI	切断せず	メチル化されず	211
		切断	メチル化された	82, 63, 51, 15
CGI132	BstUI	切断せず	メチル化されず	210
		切断	メチル化された	60, 49, 56, 45

30

【0135】

クローニング及び亜硫酸水素塩処理塩基配列決定。先に示した「亜硫酸水素塩制限併用解析 (COBRA)」セッションにおいて説明したものと同一 PCR 増幅反応由来の DNA を、クローニング及び亜硫酸水素塩処理塩基配列決定に使用した。単独の分子の分解時のメチル化状態を分析するために、PCR 産物を、プラスミドベクターへ、pGEM-T Easy Vector System (Promega, マジソン, WI) を使用し、TA-クローニングした。正の組換え体クローン由来の挿入断片を、BigDye Terminator Cycle Sequencing v1.1 キット (Applied Biosystems) を製造業者の指示に従い使用し、サイクルシーケンシングにより分析した。エタノール沈殿による精製後、これらの試料を、Hi-ジホルムアミド 10 μl に再懸濁し、3100 DNA Analyzer (Applied Biosystems) 上を試行させた。

40

【0136】

結果と考察

ホロカルボキシラーゼ合成酵素 (HLCS)。2名の母体血液細胞試料由来の HLCS の推定プロモーター領域のメチル化プロファイルを、正常妊娠から収集した 2名の第1三

50

半期及び2名の第3三半期胎盤組織試料、更にはトリソミー21妊娠からの2名の第1三半期の胎盤組織試料のそれと比較した。COBRAアッセイを行い、並びに領域A、領域B1及び領域B2に関するゲル電気泳動データを、各々、図14A、14B及び14Cに示した。概して、胎盤は、母体血液細胞と比べ、高メチル化された。単独の分子の分解時のメチル化状態を更に分析するために、領域B2に関してクローニング及び亜硫酸水素塩処理塩基配列決定実験を実行し、図17に示された結果は、HLCSのメチル化は胎盤特異的であることを確認した。

【0137】

CGI009。2名の母体血液細胞試料由来のCGI009のメチル化プロファイルを、正常妊娠から収集した2名の第1三半期及び2名の第3三半期胎盤組織試料、更にはトリソミー21妊娠からの2名の第1三半期の胎盤組織試料のそれと比較した。COBRAアッセイを行い、並びにゲル電気泳動データを、図15に示した。概して、胎盤は、母体血液細胞と比べ、高メチル化された。

【0138】

CGI132。2名の母体血液細胞試料由来のCGI132のメチル化プロファイルを、正常妊娠から収集した2名の第1三半期及び2名の第3三半期胎盤組織試料、更にはトリソミー21妊娠からの2名の第1三半期の胎盤組織試料のそれと比較した。COBRAアッセイを行い、並びにゲル電気泳動データを、図16に示した。概して、胎盤は、母体血液細胞と比べ、高メチル化された。

【0139】

実施例4

胎盤組織及び母体血液細胞中で同定されたマーカーの示差的メチル化の特徴を基に、胎盤及び母体血液細胞由来のDNA間のHLCS領域B2のゲノム配列(表11)の示差的メチル化を定量的に分析するために、メチル化感受性制限酵素消化、それに続くリアルタイム定量的PCRを使用する別法を開発した。

【0140】

材料及び方法

メチル化感受性制限酵素消化。DNAを、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, ヒルデン, 独国)を用い、胎盤組織から抽出した。母体バフィーコート及び血漿由来のDNAは、QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, ヒルデン, 独国)を用い、製造業者の指示に従い抽出した。胎盤及びバフィーコートDNA試料の各々について、DNA 100 ngに、メチル化感受性制限酵素消化を施した。制限酵素消化は、DNA、1X好適な緩衝液、並びに25 UのHpaII及び50 UのBstUI(又は偽消化のため含まず)を含む、最終反応容積50 µlにおいて、製造業者の推奨温度で少なくとも16時間実行した。各母体血漿試料に関して、血漿1.6 mlを、DNA抽出に使用し、脱イオン水50 µlで溶出し、その21 µlに、制限酵素消化を施した。酵素消化は、DNA、1X好適な緩衝液、並びに20 UのHpaII及び30 UのBstUI(又は偽消化のため含まず)を含む、最終反応容積30 µlにおいて、製造業者の推奨温度で少なくとも16時間実行した。全ての酵素は、New England Biolabs(ビバリー, MA)から購入した。その後消化産物は、リアルタイム定量的PCRにより分析した。これらの選択された制限酵素は、メチル化されないDNAのみを消化し、メチル化されたDNAは消化しなかった。実施例3由来のデータは、HLCSは、胎盤組織において高メチル化され及び母体血液細胞において低メチル化されたことを示したので、本発明者らは、母体血液細胞由来のほとんどのDNAは消化され、結果制限酵素処理後検出不可能であるのに対し、ある割合の胎盤組織由来のDNAは、検出可能であり続けると予想した。

【0141】

リアルタイム定量的PCR。リアルタイムPCRアッセイを、制限酵素消化を伴う及び伴わないHLCSゲノムDNAの定量分析のために開発した。制限酵素処理したDNA又は偽消化試料4 µlを、リアルタイムPCRアッセイに使用した。各反応液は、1X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, フォスターシティ, CA)、300

10

20

30

40

50

n M フォワードプライマー (5' -CCGTGTGGCCAGAGGTG-3')、3 0 0 n M リバースプライマー (5' -TGGGAGCCGGAACCTACC-3')、及び100nMのTaqManプローブ (5' -6FAM-TCCCCGACCTGGCCCTTTGCC-TAMRA-3')を含んだ。温度プロファイルは、5 0 で2分間、9 5 で1 0 分間、9 5 で1 5 秒、及び6 0 で1分間を5 0 サイクルであった。全ての反応は、2 つ組で試行し、平均量を採用した。光学密度測定により当初定量した連続希釈したヒトゲノムDNAは、本アッセイの定量標準として使用した。制限酵素消化後に検出可能なH L C S DNAはメチル化された画分を表したので、本発明者らは、メチル化指標としてリアル - タイム定量的P C Rを表した。試料のメチル化指標は、酵素消化後のH L C S DNA濃度を、偽消化で得られた濃度で除算することにより計算した。

【0 1 4 2】

10

結果と考察

8名の母体血液細胞試料由来のH L C Sの推定プロモーター領域のメチル化プロファイル、正常妊娠から収集した2名の第1三半期及び2名の第3三半期の胎盤組織試料のそれと比較した。制限酵素消化、それに続くリアルタイムP C R分析を実行し、結果を図1 8に示した。全ての母体血液細胞試料由来のDNAは、制限酵素によりほとんど消化され、0に近づくメチル化指標を生じたのに対し；胎盤組織由来のDNAは、部分的に消化され、0 . 5 6 7 ~ 0 . 9 6 6の範囲のメチル化指標を生じた。

【0 1 4 3】

先のデータは、胎盤は、胎児DNAの主要組織供給源であるのに対し、母体血液細胞は、母体血漿中で検出可能であるバックグラウンド母体DNAの主な貢献者であることを示唆している。本発明者らは、H L C S DNAの胎盤 - 特異的 (母体血液細胞に関して) 画分、すなわちメチル化された又は非 - 消化画分は、母体血漿中で検出され、かつ妊娠 - 特異的であると考えている。2 5名の正常妊娠個人から、対形成した出産前及び出産後の第3三半期血漿試料を収集した。制限酵素消化、それに続くリアルタイムP C Rアッセイを実行し、結果を図1 9に示した。H L C Sシグナルは、酵素消化された出産前第3三半期血漿試料において正に検出され、出産後低下することが示されている。酵素消化後の出産後血漿試料中のH L C S濃度の中央値は、酵素消化後の出産前の血漿試料のH L C S濃度の中央値の8 . 1 %であった (図1 9 A)。酵素処理した出産前及び出産後の血漿のクリアランスパターンは、検出されたH L C Sシグナルは、妊娠 - 特異的であることを指摘している。対照的に、偽制限酵素消化された出産後母体血漿中のH L C S DNA濃度の中央値は、偽消化した出産前試料のその8 3 . 8 %であった (図1 9 B)。

20

30

【0 1 4 4】

公開されたアミノ酸配列又はポリヌクレオチド配列を含む、本出願に引用された全ての特許、特許出願、及び他の刊行物は、その全体が全ての目的で参照として組入れられている。

【図面の簡単な説明】

【0 1 4 5】

【図1 A】対形成した胎盤組織及び母体血液細胞の間のC G I 1 3 7 (A) 領域A及び (B) 領域Bのクローニング及び亜硫酸水素塩処理塩基配列決定。個別のC p G部位は、U C S C ゲノムブラウザのHuman May 2 0 0 4 (h g l 7) アセンブリのc h r 2 1 : 4 6 , 2 4 9 , 6 3 6 (+ 1) に対して規定されたヌクレオチド位置で、第一行にわたって番号付けした。各後続行は、クローニングにより単離された単独のDNA分子におけるC p G部位にわたるメチル化状態を示す。黒丸及び白丸は、各々、メチル化された及びメチル化されないC p G部位を表す。胎盤組織試料由来のクローンは、接頭文字「P L N」で記したのに対し、母体血液細胞由来のクローンは、接頭文字「M B N」で記した。同じ妊娠個体由来の胎盤及び母体血液細胞は、「P L N」又は「M B N」の後の同じ試料番号により確定される。

40

【図1 B】図1 Aに同じ。

【0 1 4 6】

【図2 A】C G I 1 3 7 (A) 領域A及び (B) 領域B内の試験したC p G部位の各々に

50

関する胎盤試料及び母体血液細胞試料の配列決定されたクローンの全ての間でのメチル化指標のボックスプロット。x - 軸にわたり、個別のC p G部位を、U C S C ゲノムブラウザのHuman May 2004 (hg17) アセンブリのchr 21 : 46 , 249 , 636 (+1) に対するそれらのヌクレオチド位置で示した。

【図2B】図2Aに同じ。

【0147】

【図3A】領域A (A及びB)、領域B (C及びD)並びに領域C (E)に関する妊娠第3三半期及び妊娠第1三半期の間のPDE9A内の試験されたC p G部位の各々に関する胎盤試料及び母体血液細胞試料の配列決定されたクローンの全ての間でのメチル化指標のボックスプロット。図3A及び3Bに関して、x - 軸にわたり、個別のC p G部位が、U C S C ゲノムブラウザのHuman May 2004 (hg17) アセンブリのchr 21 : 42 , 978 , 424 (+1) の逆鎖に対するそれらのヌクレオチド位置で示され；並びに、図3C及び3Dに関して、chr 21 : 42 , 978 , 718 (+1) のフォワード鎖に対し；図3Eに関して、chr 21 : 42 , 978 , 005 (+1) のフォワード鎖に対し示されている。

【図3B】図3Aに同じ。

【図3C】図3Aに同じ。

【図3D】図3Aに同じ。

【図3E】図3Aに同じ。

【0148】

【図4A】(A)妊娠第3三半期及び(B)妊娠第1三半期の間のPPP1R2P2の領域A内、並びに(C)妊娠第3三半期の間のPPP1R2P2の領域B内の試験されたC p G部位の各々に関する胎盤及び母体血液細胞試料の配列決定されたクローンの全ての間でのメチル化指標のボックスプロット。x - 軸にわたり、個別のC p G部位が、U C S C ゲノムブラウザのHuman May 2004 (hg17) アセンブリのchr 21 : 36 , 180 , 493 (+1) に対するそれらのヌクレオチド位置で示されている。

【図4B】図4Aに同じ。

【図4C】図4Aに同じ。

【0149】

【図5A】Fem1A (シーエレガンス) 類似の(A)領域A及び(B)領域B内の試験されたC p G部位の各々に関する胎盤試料及び母体血液細胞試料の配列決定されたクローンの全ての間でのメチル化指標のボックスプロット。x - 軸にわたり、個別のC p G部位が、U C S C ゲノムブラウザのHuman May 2004 (hg17) アセンブリのchr 21 : 14 , 056 , 070 (+1) に対するそれらのヌクレオチド位置で示されている。

【図5B】図5Aに同じ。

【0150】

【図6】CGI009内の試験されたC p G部位の各々に関する胎盤試料及び母体血液細胞試料の配列決定されたクローンの全ての間でのメチル化指標のボックスプロット。x - 軸にわたり、個別のC p G部位が、U C S C ゲノムブラウザのHuman May 2004 (hg17) アセンブリのchr 21 : 25 , 855 , 701 (+1) に対するそれらのヌクレオチド位置で示されている。

【0151】

【図7】カルボニルレダクターゼ1内の試験されたC p G部位の各々に関する胎盤試料及び母体血液細胞試料の配列決定されたクローンの全ての間でのメチル化指標のボックスプロット。x - 軸にわたり、個別のC p G部位が、U C S C ゲノムブラウザのHuman May 2004 (hg17) アセンブリのchr 21 : 36 , 363 , 538 (+1) に対するそれらのヌクレオチド位置で示されている。

【0152】

【図8】ダウン症細胞接着分子内の試験されたC p G部位の各々に関する胎盤試料及び母

10

20

30

40

50

体血液細胞試料の配列決定されたクローンの全ての間でのメチル化指標のボックスプロット。x - 軸にわたり、個別のCpG部位が、UCSCゲノムブラウザのHuman May 2004 (hg17)アセンブリのchr21 : 41, 139, 872 (+1)に対するそれらのヌクレオチド位置で示されている。

【0153】

【図9】C21orf29内の試験されたCpG部位の各々に関する胎盤試料及び母体血液細胞試料の配列決定されたクローンの全ての間でのメチル化指標のボックスプロット。x - 軸にわたり、個別のCpG部位が、UCSCゲノムブラウザのHuman May 2004 (hg17)アセンブリのchr21 : 44, 953, 288 (+1)に対するそれらのヌクレオチド位置で示されている。

10

【0154】

【図10】対形成した胎盤組織及び母体血液細胞の間のCGI111のクローニング及び亜硫酸水素塩処理塩基配列決定。個別のCpG部位は、UCSCゲノムブラウザのHuman May 2004 (hg17)アセンブリのchr21 : 44, 699, 072 (+1)に対して規定されたヌクレオチド位置で、第一行にわたって番号付けした。各後続行は、クローニングにより単離された単独のDNA分子におけるCpG部位にわたるメチル化状態を示す。黒丸及び白丸は、各々、メチル化された及びメチル化されないCpG部位を表す。胎盤組織試料由来のクローンは、接頭文字「PLN」で記したのに対し、母体血液細胞由来のクローンは、接頭文字「MBN」で記した。同じ妊娠個体由来の胎盤及び母体血液細胞は、「PLN」又は「MBN」の後の同じ試料番号により確定される。

20

【0155】

【図11】CGI121内の試験されたCpG部位の各々に関する胎盤試料及び母体血液細胞試料の配列決定されたクローンの全ての間でのメチル化指標のボックスプロット。x - 軸にわたり、個別のCpG部位が、UCSCゲノムブラウザのHuman May 2004 (hg17)アセンブリのchr21 : 45, 262, 112 (+1)に対するそれらのヌクレオチド位置で示されている。

【0156】

【図12】CGI137の非メチル化型を標的化する相同MassExtendアッセイの図。増幅された領域に広がるヌクレオチド配列が示されている。オリジナルのDNA配列は、亜硫酸水素塩 - 転換された配列の上に並置している。CpG部位は、「+」印で確定される。CpG部位は追加的に番号付けし、この番号付けは図1A及び2A並びに表2Aに対応している。CpGジヌクレオチドの一部ではないシトシン残基は、「:」印で確定される。示された亜硫酸水素塩 - 転換された配列は、全てのCpG部位はメチル化されたという仮定を基にしている。フォワードプライマー、伸長プライマー及びリバースプライマーの並置は、亜硫酸水素塩 - 転換された配列の下側に示している。

30

【0157】

【図13 - 1】CGI137の非メチル化型を標的化する相同MassExtendアッセイの質量分析トレーシング。純粋な胎盤DNA、母体バフィーコートDNA、95 : 5 (母体バフィーコートDNA : 胎盤DNA)混合物、出産前及び後の母体血漿並びに非鋳型対照(NTC)の結果を示している。全ての質量スペクトルに関して、x - 軸は、検出された伸長産物の分子量(鋭いピークで示される)を示すのに対し、y - 軸は、任意の単位で強度を示す。メチル化されない分子の予想された位置には、印を付けた。

40

【図13 - 2】図13 - 1に同じ。

【0158】

【図14A】(A)ホロカルボキシラーゼ合成酵素の領域A、(B)領域B1、及び(C)領域B2の亜硫酸水素塩制限併用解析(COBR)。2種のトリソミー21胎盤(T21 PLN)、2種の第1三半期正常胎盤(正常PLN 1st)、2種の第3三半期正常胎盤(正常PLN 3rd)、及び2種の第1三半期母体血液細胞(バフィーコート)を分析した。PCR産物を、BstUI酵素を含む(+)又は含まず(-)に消化した

50

。DNAメチル化は、より小さいサイズの消化産物の出現により検出した。1 kb ラダー (Invitrogen カールスバッド, CA) (M) を、ゲル電気泳動において使用した。

【図 14 B】図 14 A に同じ。

【図 14 C】図 14 A に同じ。

【0159】

【図 15】CGI 009 の COBRA 分析。2 種のトリソミー 21 胎盤 (T21 PLN)、2 種の第 1 三半期正常胎盤 (正常 PLN 1st)、2 種の第 3 三半期正常胎盤 (正常 PLN 3rd)、及び 2 種の第 1 三半期母体血液細胞 (パフィーコート) を分析した。PCR 産物を、BstUI 酵素を含む (+) 又は含まず (-) に消化した。DNA メチル化は、より小さいサイズの消化産物の出現により検出した。1 kb ラダー (Invitrogen カールスバッド, CA) (M) を、ゲル電気泳動において使用した。

10

【0160】

【図 16】CGI 132 の COBRA 分析。2 種のトリソミー 21 胎盤 (T21 PLN)、2 種の第 1 三半期正常胎盤 (正常 PLN 1st)、2 種の第 3 三半期正常胎盤 (正常 PLN 3rd)、及び 2 種の第 1 三半期母体血液細胞 (パフィーコート) を分析した。PCR 産物を、BstUI 酵素を含む (+) 又は含まず (-) に消化した。DNA メチル化は、より小さいサイズの消化産物の出現により検出した。1 kb ラダー (Invitrogen カールスバッド, CA) (M) を、ゲル電気泳動において使用した。

20

【0161】

【図 17】胎盤組織及び母体血液細胞の間の HLC S 領域 B2 のクローニング及び亜硫酸水素塩処理塩基配列決定。個別の CpG 部位は、UCSC ゲノムブラウザの Human May 2004 (hg17) アセンブリの chr21:37,274,682-37,275,036 の逆鎖に対して規定されたヌクレオチド位置で、第一行にわたって番号付けした。各後続行は、クローニングにより単離された単独の DNA 分子における CpG 部位にわたるメチル化状態を示す。黒丸及び白丸は、各々、メチル化された及びメチル化されない CpG 部位を表す。トリソミー 21、正常第 1 三半期及び正常第 3 三半期の胎盤組織試料由来のクローンは、各々、接頭文字「T21 PLN」、「正常 PLN 1st」及び「正常 PLN 3rd」で記したのに対し、母体血液細胞由来のクローンは、接頭文字「パフィーコート」で記した。同じ妊娠個体由来の胎盤及び母体血液細胞は、接頭文字の後の同じ試料番号により確定される。

30

【0162】

【図 18】胎盤組織及び母体パフィーコート由来の HLC S DNA の定量。メチル化指標は、同じ試料の偽消化対照において決定された総濃度で除算した、制限酵素処理後の HLC S DNA 濃度と規定した。胎盤組織由来の DNA は、「正常 PLN」と記し、母体パフィーコート由来の DNA は、「MBC」と記している。

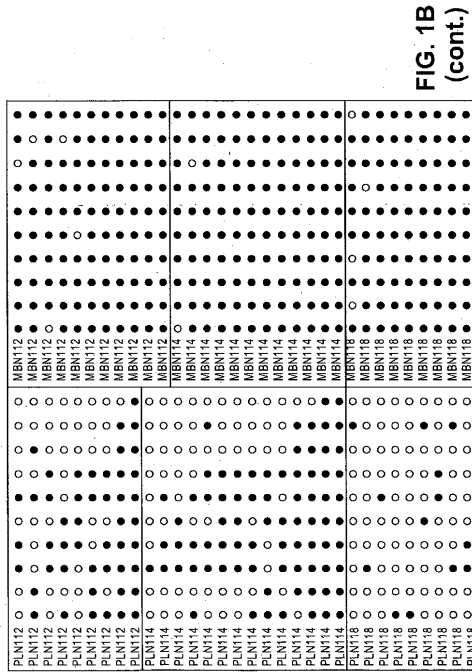
【0163】

【図 19 A】第 3 三半期母体血漿中の胎児 - 特異性 HLC S 検出。HLC S シグナルは、メチル化感受性制限酵素処理を行った (図 19 A) 又は行わなかった (図 19 B) 母体血漿試料において検出した。出産前血漿試料を、「Pre」と記したのに対し、出産後血漿試料は、「Post」と記した。制限酵素 HpaII 及び BstUI を、消化反応において使用し、このプロットにおいて「(+)」と記した。酵素処理しない偽消化は、「(-)」と記した。

40

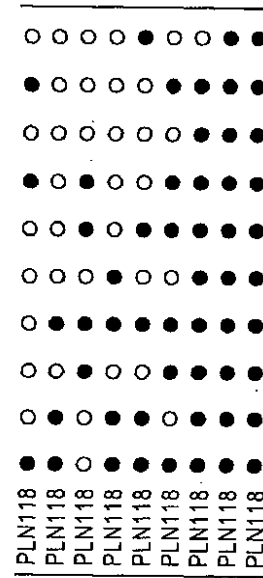
【図 19 B】図 19 A に同じ。

【図 1 B - 2】

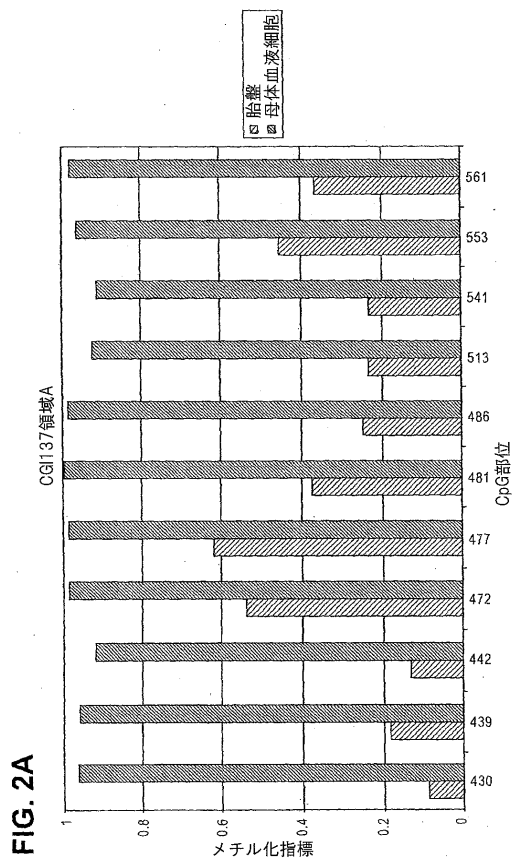


【図 1 B - 3】

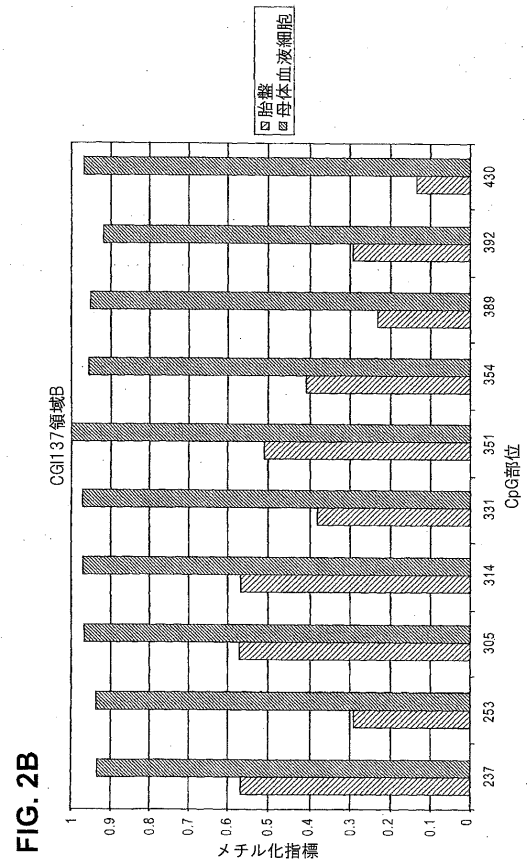
FIG. 1B (cont.)



【図 2 A】

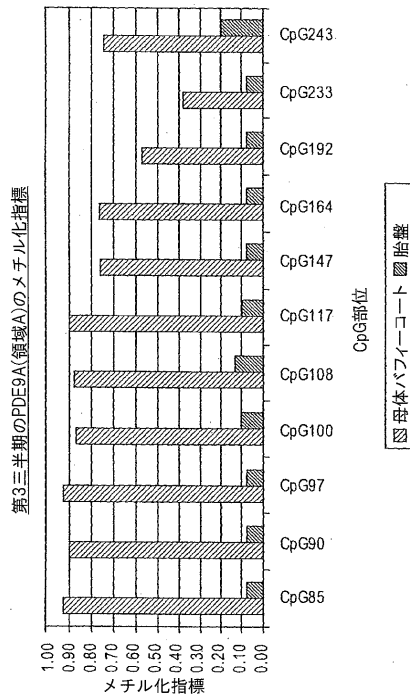


【図 2 B】



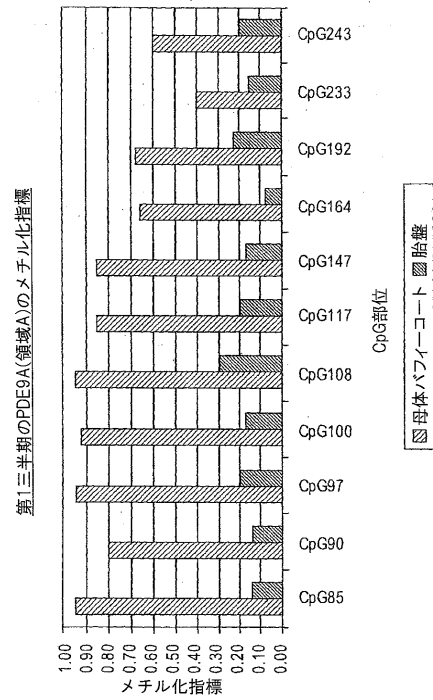
【図 3 A】

FIG. 3A



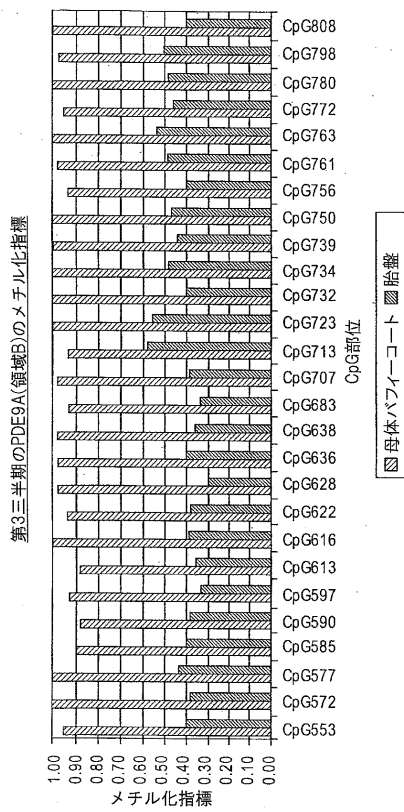
【図 3 B】

FIG. 3B



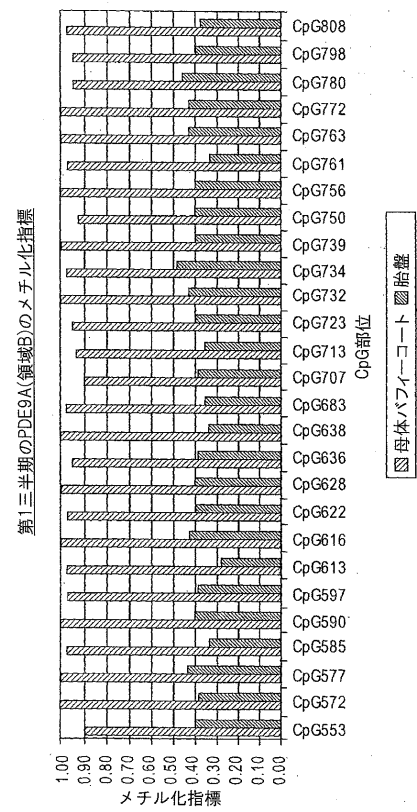
【図 3 C】

FIG. 3C



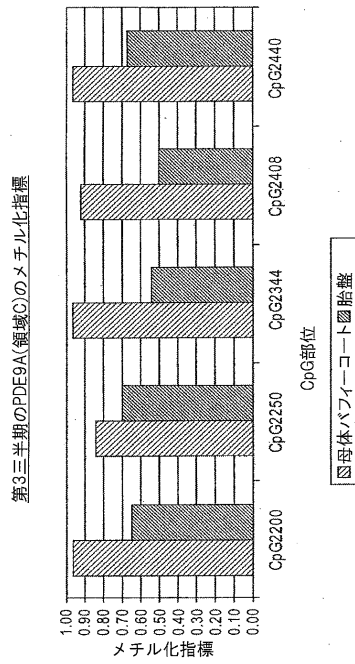
【図 3 D】

FIG. 3D



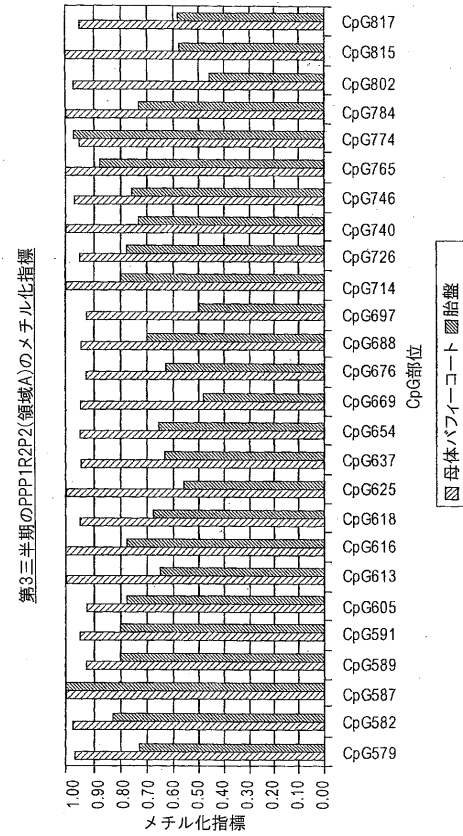
【図 3 E】

FIG. 3E



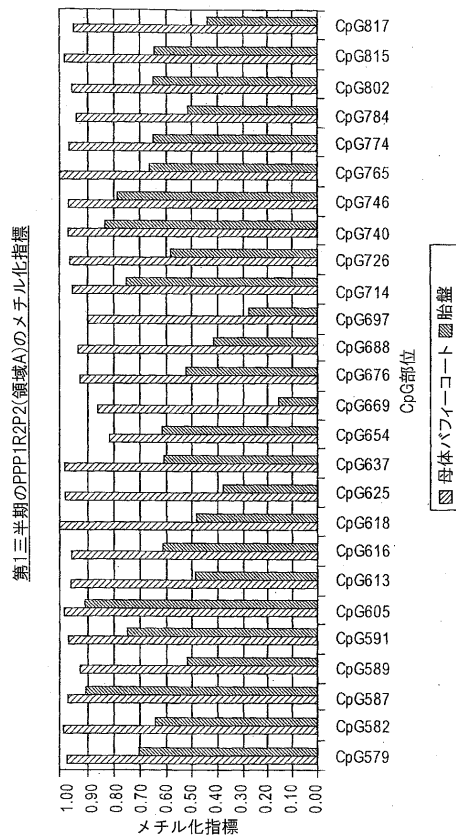
【図 4 A】

FIG. 4A



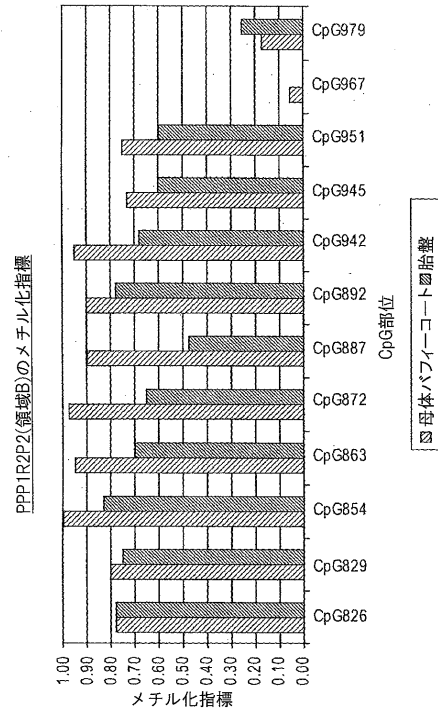
【図 4 B】

FIG. 4B

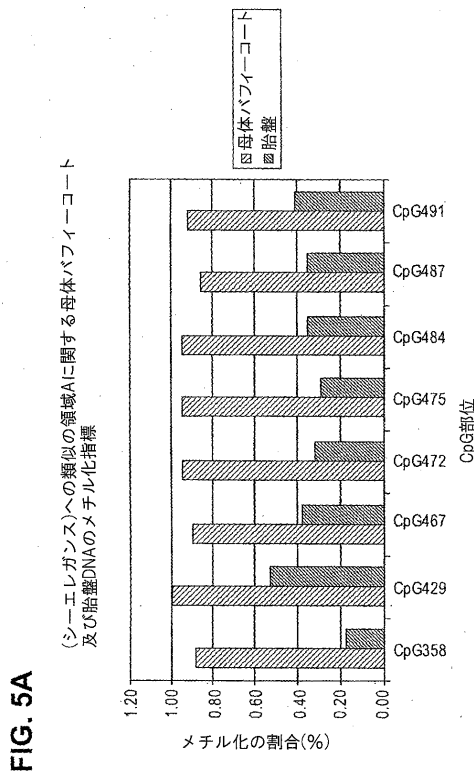


【図 4 C】

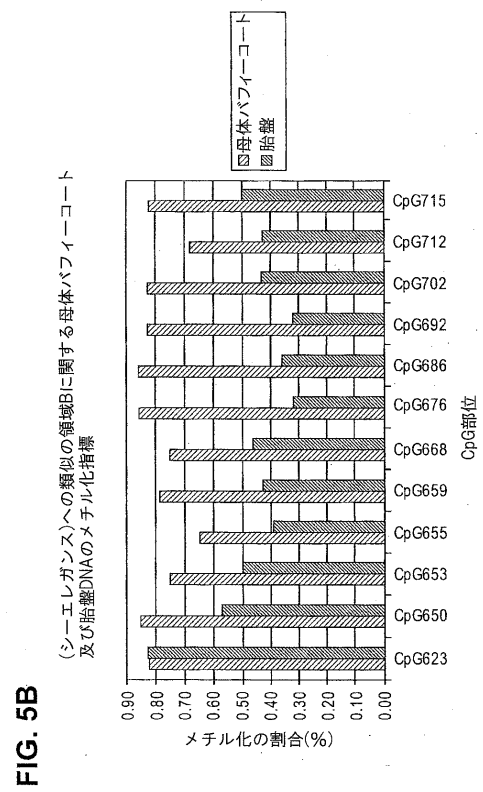
FIG. 4C



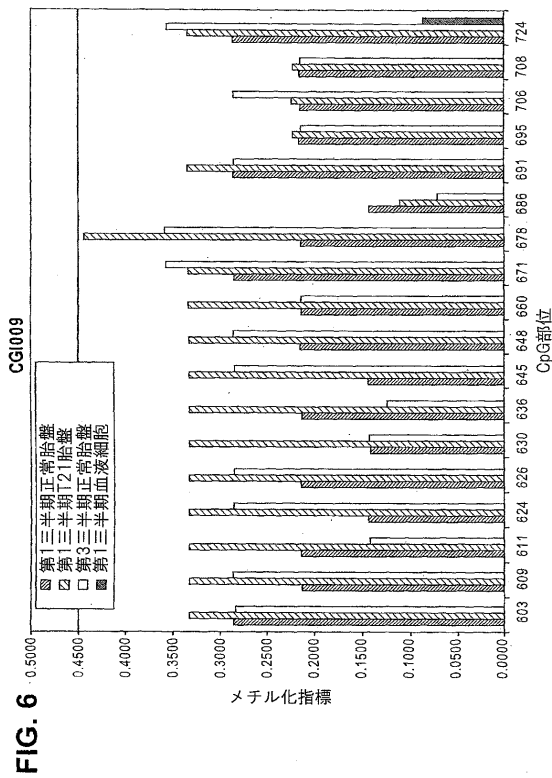
【図 5 A】



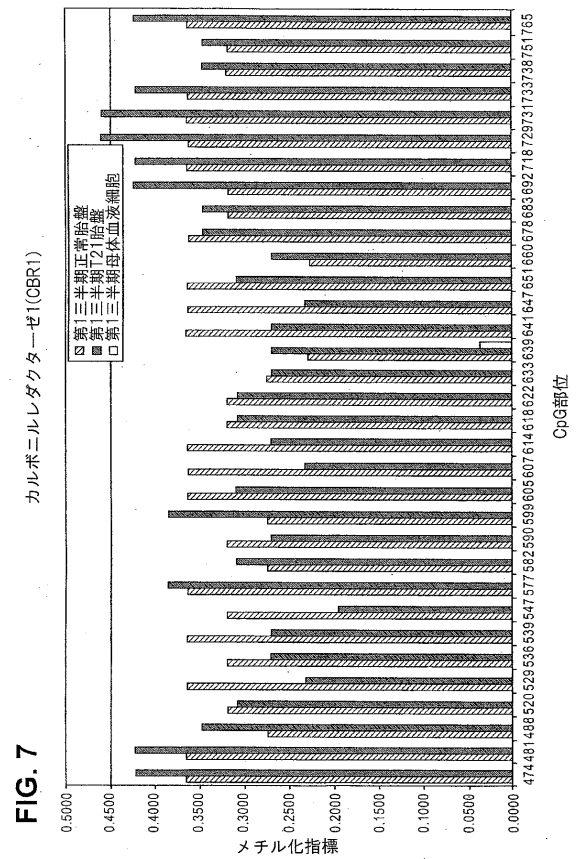
【図 5 B】



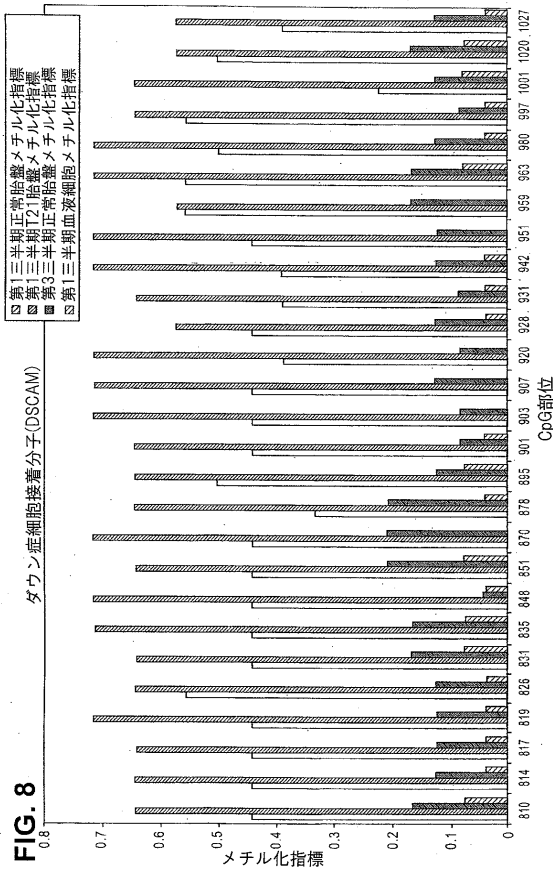
【図 6】



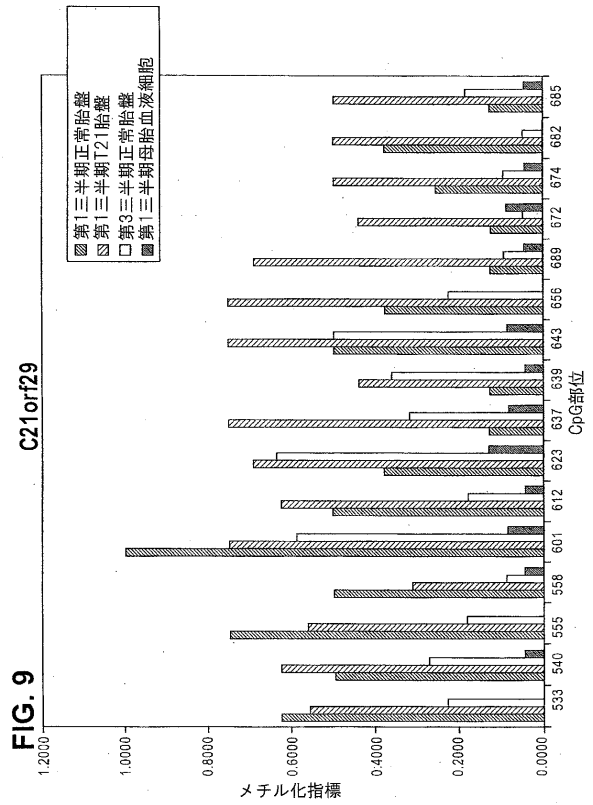
【図 7】



【図 8】



【図 9】

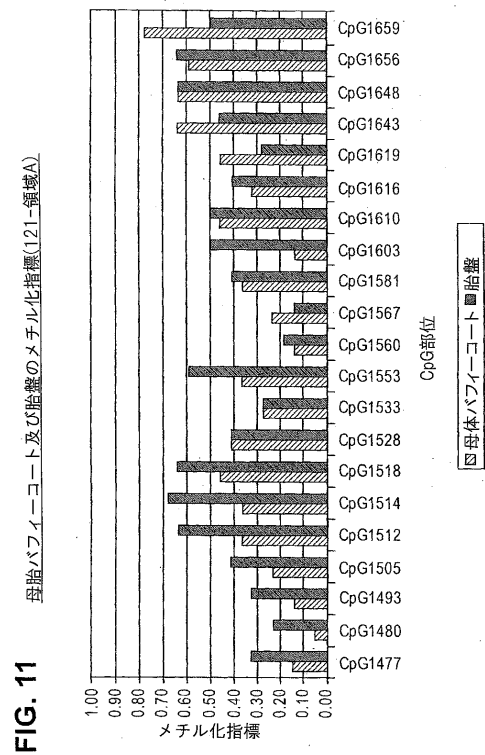


【図 10】

FIG. 10

試料	クローン	CpG1375	CpG1364	CpG1358	CpG1342	CpG1331	CpG1329	CpG1313	CpG1307	CpG1297	CpG1293	CpG1289	CpG1287	CpG1285	CpG1260	CpG1246	CpG1186	CpG1184	CpG1179
MENT14	1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
MENT14	2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
PLN114	4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
PLN114	1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
PLN114	4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
PLN114	7	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
MENT18	2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
MENT18	3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
MENT18	4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
MENT18	6	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
MENT18	7	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
PLN118	1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
PLN118	2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
PLN118	3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
PLN118	5	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
PLN118	7	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

【図 11】



【 図 1 3 - 1 】

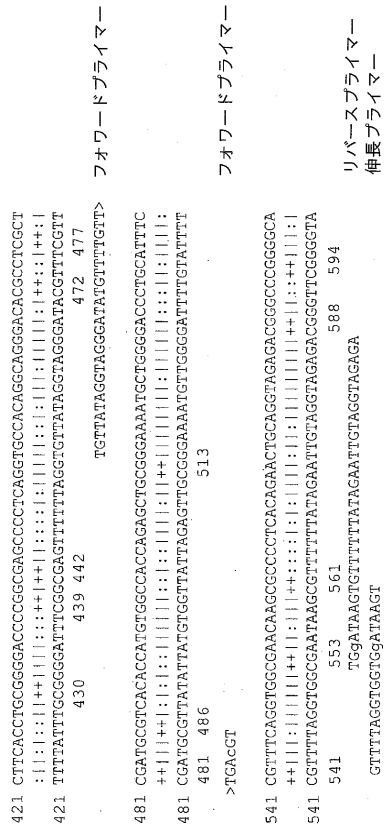
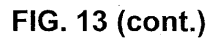


FIG. 13

The figure displays three mass spectra plots, each showing intensity (強度) on the y-axis and mass (質量) on the x-axis. The x-axis ranges from 4800 to 6800 with major ticks every 200 units. The y-axis scale varies for each plot: 0-7 for the top plot, 0-10 for the middle plot, and 0-6 for the bottom plot.

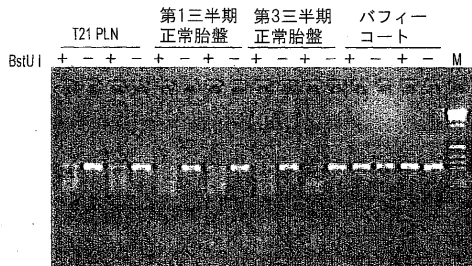
- Top Plot:** Labeled "胎盤" (Placenta) and "非メチル化" (Non-methylated). It shows a small peak at mass 5000 and three prominent peaks at approximately 5300, 5950, and 6250.
- Middle Plot:** Labeled "母体バフィーコート" (Maternal Buffy Coat). It shows a small peak at mass 5000 and two prominent peaks at approximately 5950 and 6250.
- Bottom Plot:** Labeled ".95 : 5混合物" (0.95 : 5 Mixture). It shows a small peak at mass 5000 and three prominent peaks at approximately 5300, 5950, and 6250, with relative intensities similar to the placenta sample.

【 図 1 4 A 】



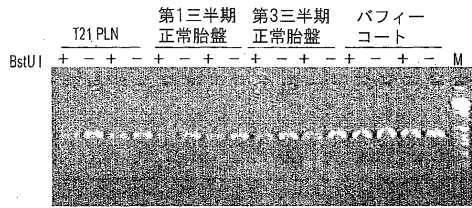
BstU I	T21 PLN			第1三半期 正常胎盤			第3三半期 正常胎盤			パフィー コート			M
	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+		

FIG. 14B



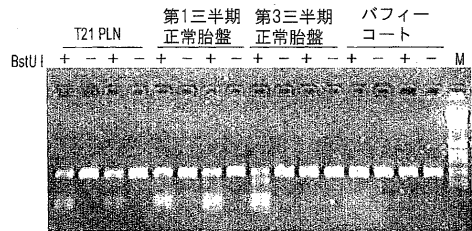
【 図 1 4 C 】

FIG. 14C

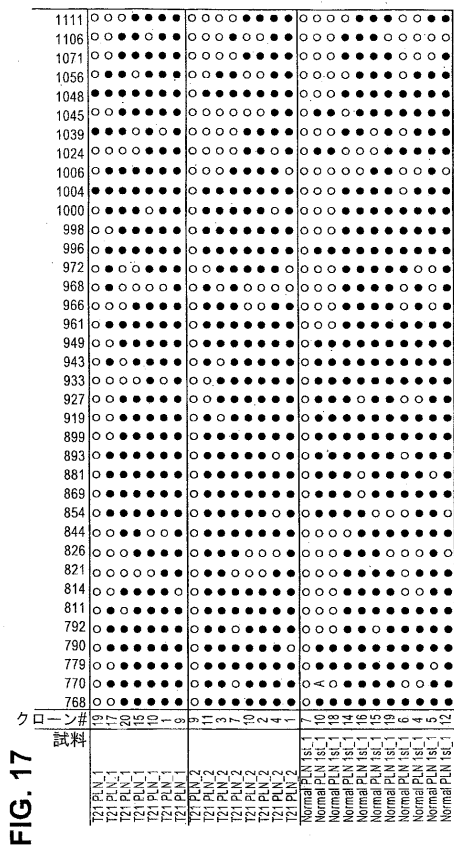


【 図 1 5 】

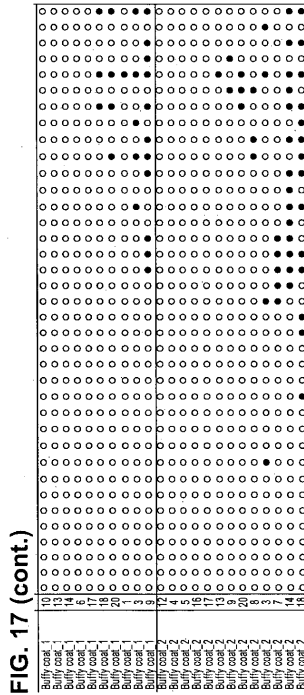
FIG. 15



【 図 1 7 】

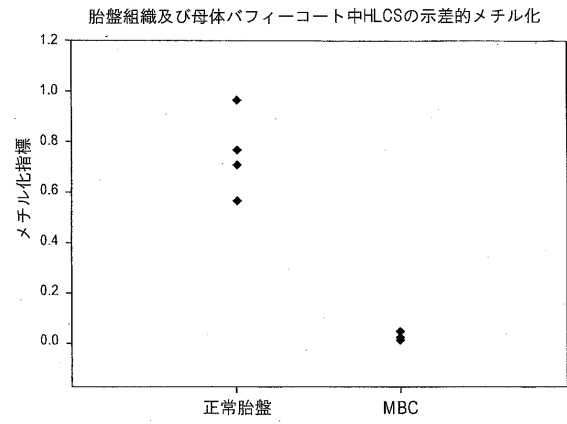


【図 17 - 3】



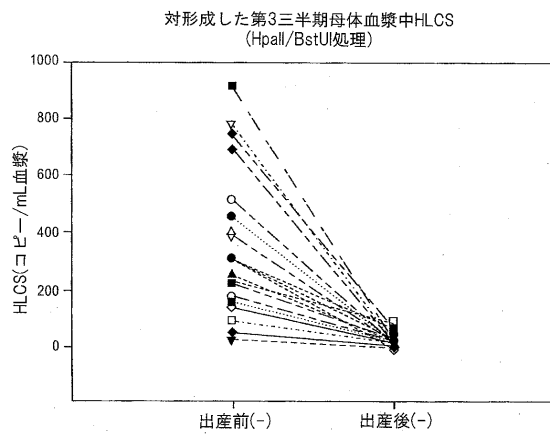
【図 18】

FIG. 18



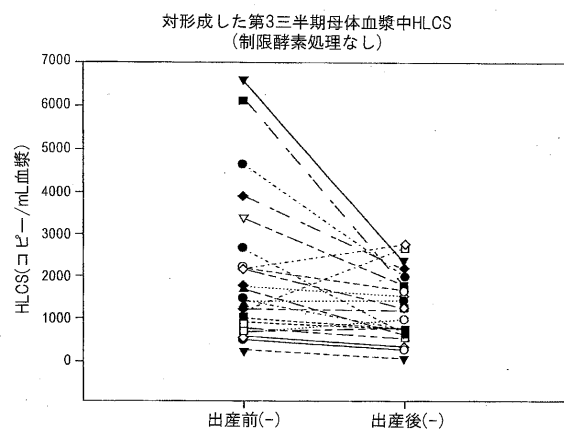
【図 19 A】

FIG. 19A



【図 19 B】

FIG. 19B



【配列表】

2009535050000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成21年1月5日(2009.1.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0092

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0092】

【表 1】

表 1. 試験した第 21 染色体上のゲノム配列のアイデンティティ、位置、プライマー配列及び PCR 反応条件。米国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) の GenBank に登録されたゲノムコンテイング上の各領域 (寄託番号、バーション、開始及び終結ヌクレオチド番号)、並びに UCSC ゲノムブラウザ (genome.ucsc.edu web site で入手) の Human May 2004 (hg17) アセンブリ上の染色体位置 (染色体、開始及び終結ヌクレオチド番号) を、各々、第二列及び第三列に示している。

配列名	ゲノムコンテイング上の領域	染色体位置	F-プライマー		R-プライマー		PCR 条件					
			SEQ ID NO.	(5' -3')	SEQ ID NO.	(5' -3')	MgCl ₂ (mM)	Primer (nM)	DMSO (%)	BetaIne (mM)	TadGold (U)	アニーリング温度 (°C)
CGI137 領域A	NT_011515.11 : 2742901-2743142	chr21:46, 249, 993-46, 250, 234	6	GGTTGGGTG GAGGAGGTAGT	7	ACCCRAACCC RICTCTACCTACAA	2	200	0	0	1	62
CGI137 領域B	NT_011515.11 : 2742666-2743001	chr21:46, 249, 758-46, 250, 093	8	AAGCGGAGTTGAGA TATTGTAGGTTTAT	9	AACACTAAA AAACCTCCRAAA	3	200	0	0	1	60
PDE9A 領域A	NT_030188.4 : 1099474-1099776	chr21:42, 978, 102-42, 978, 404	10	GTTTTAGGAGG GGGTATTTYGAGT	11	AATCTATTTCTATATTC ACTATTTCCAAATAAAA	3	200	0	0	1.25	60
PDE9A 領域B	NT_030188.4 : 1100569-1100940	chr21:42, 979, 197-42, 979, 568	12	GTATGTATTAAATTAATG AAAACATGAGTTTGAT	13	CRAAAAACCCCTT ATAAAAAACRA	3	400	0	0	0.625	55
PDE9A 領域C	NT_030188.4 : 1101439-1101851	chr21:42, 980, 067-42, 980, 479	14	GGTGGTGTGTGT GTTTGGTTTTAGT	15	ACCCAAAAATAC CCCAAACCATAAA	3	200	0	0	1.25	60
PPP1R2P2 領域A	NT_011512.10 : 22921010-22921356	chr21:36, 181, 010-36, 181, 356	16	AGGTTTTTTAGTG GGGAAAAATGGT	17	CRAACTTCCRACTCT TAACTCAAAAATACTA	3	300	0	0	1.25	62
PPP1R2P2 領域B	NT_011512.10 : 22921311-22921479	chr21:36, 181, 311-36, 181, 479	18	GATTTTAYGTGTA GTAGTATTTTCAGTTAAG	19	AACTCCTCTCC ACACCTCCRTA	3	100	0	0	1.25	60
Fem1A (C. エレガンス) 領域Aへの類似	NT_011512.10 : 796376-796709	chr21:14, 056, 376-14, 056, 709	20	AGGTTAATGATTTGTATATT TAAAAGTTTTAGCATATTT	21	ACCAATACTCCAC CACRTCCAAATAA	4	100	0	0	1.25	65
Fem1A (C. エレガンス) 領域Bへの類似	NT_011512.10 : 796679-796961	chr21:14, 056, 679-14, 056, 961	22	AVGGTTATTGGA YGTGGTGGAGTATT	23	CCGATTAAACACCTC CAAATTAACCTAATA	4	100	0	0	1.25	65

【表 2】

CG1009	NT_011512.10: 12596247-12596458	chr21:25,856,247- 25,856,458	AAAAAGGCGTTTGG TYGGTTATGATTAT	<u>24</u>	AACTAAATCR ACRTACCTACAA	<u>25</u>	3	200	0	0	1	60
CBR1	NT_011512.10: 23103970-23104340	chr21:36,363,970- 36,364,340	GTTAYGTGGTAGTAAATAG TTAGTAGTTACAGATTAGTT	<u>26</u>	CAACCRATACCC TTATTACCTCAA	<u>27</u>	1.5	400	0	0	1	60
DSCAM	NT_011512.10: 27880652-27880936	chr21:41,140,652- 41,140,936	YGVGVTTCYGTGTT TTGTATAATTGTTTT	<u>28</u>	CAAAAAAATTAACAAA AAATCCATATAACTAAAA	<u>29</u>	3	200	0	0	1	60
C21orf29	NT_011515.11: 1446687-1446915	chr21:44,953,779- 44,954,007	AGTTTGGTAGTATTG AATAGTTAAATGAGTT	<u>30</u>	AACCTTCATCCTA CTCCCTAAATCTATA	<u>31</u>	3	200	0	0	1	57
CG1111	NT_011515.11: 1193113-1193374	chr21:44,700,205- 44,700,466	TTTTTTAGGTAG TTCAAGAAAAGG	<u>32</u>	CCTCCCTCCT CAAAATAAC	<u>33</u>	2	200	3	0	1.25	52
CG1121	NT_011515.11: 1756431-1756699	chr21:45,263,523- 45,263,791	TTTTAGATATTT TTGGGTTAAGGTT	<u>34</u>	AAATCCACCTA CCCAACACCC	<u>35</u>	3	400	0	1	1.25	60
KIAA0656 領域A	NT_011512.10: 1097983-1098273	chr21:14,357,983- 14,358,273	TTGGTGGTYGYGAAG TGTTTTGTTAGTATT	<u>36</u>	ACCTCTCAACCRAA TAAACCTAACAAAC	<u>37</u>	2	300	0	0	1.25	66
KIAA0656 領域B	NT_011512.10: 1098230-1098519	chr21:14,358,230- 14,358,519	GYGYGVTTTAAYGG TTTTGTAGGTTTAT	<u>38</u>	CATAATAATACTTC TCAACCCCAATCA	<u>39</u>	2	400	0	0	1.25	65
HSF2BP 領域A	NT_011515.11: 394974-395324	chr21:43,902,066- 43,902,416	TAYGGAGTAGACAAGACA GTGATTATTTATTTTAYGT	<u>40</u>	CRACAACRACCA TAAACRAAACRA	<u>41</u>	3	400	5	0	1.25	55
HSF2BP 領域B	NT_011515.11: 395238-395572	chr21:43,902,330- 43,902,664	GTTAAATAVGTTG GYGYGTTTAGGGT	<u>42</u>	TTACATCAAACTAACT TTCCTTCTACTTTACAA	<u>43</u>	4	400	0	0	1.25	65
COL6A1 領域A	NT_011515.11: 2740284-2740642	chr21:46,247,376- 46,247,734	GTTYGGTYGGGAG GTTTTGCTATTT	<u>44</u>	AACTACRAAACRAAT AAACAACCTTAACATA	<u>45</u>	3	600	0	0	1.25	60
COL6A1 領域B	NT_011515.11: 2740579-2740899	chr21:46,247,671- 46,247,991	TYGGTTTATTVGGT TGTATTATTAGGTT	<u>46</u>	TCCATAACATCGA CGACACTAACCAA	<u>47</u>	4	200	0	0	1.25	65

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0125

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0125】

【表19】

表 10. CGI137 のメチル化されない型を標的化する hME アッセイのプライマー配列

プライマー	配列 (5' から3')	(SEQ IDNO:)
フォワードプライマー	TGTTATAGGTAGGGATATGTTTTGTTTGACGT	(3)
リバースプライマー	TCTCTACCTACAATTCTATAAAAAACACTTATCCA	(48)
伸長プライマー	ATCCCCAACATTTTCCC	(49)

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0132

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0132】

【表 20】

表 11. 第 21 染色体上の試験したゲノム配列のアイデンティティ、位置、プライマー配列及び PCR 反応条件。米国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) の GenBank に寄託されたゲノムコンテイング上の各領域 (寄託番号、バージョン、開始及び終結ヌクレオチド番号)、並びに UCSC ゲノムブラウザ (genome.ucsc.edu web site で入手) の Human May 2004 (hg17) アセンブリ上の染色体位置 (染色体、開始及び終結ヌクレオチド番号) を、各々、第二列及び第三列に示している。

配列名	ゲノムコンテイング 上の領域	染色体位置	F-プライマー	SEQ ID NO.	R-プライマー	SEQ ID NO.	PCR条件					
							MgCl ₂ (mM)	Primer (nM)	PCRx エンハンサー	HotStar Taq (U)	アニーリング 温度 (°C)	サイクル 数
			(5' -3')		(5' -3')							
HLC5領域A	NT_011512.10 : 24015427-24015090	chr21 : 34, 275, 090- 37, 275, 427	GGAGTGTAAATTGG GTTATTTTGTGTTAT	50	CRCTACCTTCTC CACTAACTACTCAAA	51	3	200	2x	0.4	58	55
HLC5領域B1	NT_011512.10 : 24015074-24014765	chr21 : 37, 274, 765- 37, 275, 074	AGCAGTTAGAGTGT TTAGTTCGTGTTGTT	52	CTAAACACCCCR AATCCCCAAAA	53	2.5	200	2x	0.4	60	50
HLC5領域B2	NT_011512.10 : 24015063-24014651	chr21 : 37, 274, 651- 37, 275, 063	GTTTAGTTCGTGTT GGTTACAGGTGTT	54	CTAAAAATAAAAA CAAAATCCAAAAACAAA	55	3	200	2x	0.4	58	55
CG1009	NT_011512.10 : 12596248-12596458	chr21 : 25, 856, 248- 25, 856, 458	AAAAGCGTTTGG TYGGTTATGAGTTAT	56	AAACTAAATCRAGRTA CCTACAATACCAAAAA	57	3	200	2x	0.4	58	50

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0141

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0141】

リアルタイム定量的PCR。リアルタイムPCRアッセイを、制限酵素消化を伴う及び伴わないHLCSDNAの定量分析のために開発した。制限酵素処理したDNA又は偽消化試料4μlを、リアルタイムPCRアッセイに使用した。各反応液は、1X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, フォスターシティ, CA)、300nMフォワードプライマー(5'-CCGTGTGGCCAGAGGTG-3'; 配列番号60)、300nMリバースプライマー(5'-TGGGAGCCGGAACCTACC-3'; 配列番号61)、及び100nMのTaqManプロブ(5'-6FAM-TCCCGACCTGGCCCTTTGCC-TAMRA-3'; 配列番号62)を含んだ。温度プロフィールは、50で2分間、95で10分間、95で15秒、及び60で1分間を50サイクルであった。全ての反応は、2つ組で試行し、平均量を採用した。光学密度測定により当初定量した連続希釈したヒトゲノムDNAは、本アッセイの定量標準として使用した。制限酵素消化後に検出可能なHLCSDNAはメチル化された画分を表したので、本発明者らは、メチル化指標としてリアル-タイム定量的PCRを表した。試料のメチル化指標は、酵素消化後のHLCSDNA濃度を、偽消化で得られた濃度で除算することにより計算した。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0156

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0156】

【図12】CGI137の非メチル化型を標的化する相同MassEXTENDアッセイの図。増幅された領域に広がるヌクレオチド配列が示されている。オリジナルのDNA配列(配列番号1)は、亜硫酸水素塩-転換された配列(配列番号2)の上に並置している。CpG部位は、「++」印で確定される。CpG部位は追加的に番号付けし、この番号付けは図1A及び2A並びに表2Aに対応している。CpGジヌクレオチドの一部ではないシトシン残基は、「:」印で確定される。示された亜硫酸水素塩-転換された配列は、全てのCpG部位はメチル化されたという仮定を基にしている。フォワードプライマー、伸長プライマー及びリバースプライマーの並置(配列番号3-5)は、亜硫酸水素塩-転換された配列の下側に示している。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/GB2007/001627
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/118852 A (UNIV HONG KONG CHINESE) 15 December 2005 (2005-12-15) paragraphs [0007] ~ [0016]; claims 1-56; figures 1-10	1-47, 49-67
A	US 2003/044388 A1 (LO Y.M.D. ET AL.) 6 March 2003 (2003-03-06) cited in the application abstract; claims 1-5,8-26; example 2	1-47, 49-67
A	US 2003/211522 A1 (LANDES GREGORY M. ET AL.) 13 November 2003 (2003-11-13) cited in the application abstract; claims 1-4; figures 1-3; examples 1-5	1-47, 49-67
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
7 December 2007		20/03/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Barz, Wolfgang

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2007/001627

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>POON L.L.M. ET AL.: "Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma"</p> <p>CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WASHINGTON, DC, US,</p> <p>vol. 48, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 35-41, XP002247509</p> <p>ISSN: 0009-9147</p> <p>cited in the application</p> <p>the whole document</p>	1-47, 49-67
A	<p>WO 2004/065629 A (UNIV HONG KONG CHINESE)</p> <p>5 August 2004 (2004-08-05)</p> <p>abstract</p>	1-47, 49-67
A	<p>LO Y.M.D.: "Fetal DNA in maternal plasma: Biology and diagnostic applications"</p> <p>CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WASHINGTON, DC, US,</p> <p>vol. 46, no. 12, December 2000 (2000-12), pages 1903-1906, XP002247511</p> <p>ISSN: 0009-9147</p> <p>cited in the application</p> <p>the whole document</p>	1-47, 49-67
A	<p>LO Y.M.D. ET AL.: "Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum"</p> <p>LANCET THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB,</p> <p>vol. 350, no. 9076,</p> <p>16 August 1997 (1997-08-16), pages 485-487, XP005106839</p> <p>ISSN: 0140-6736</p> <p>cited in the application</p> <p>the whole document</p>	1-47, 49-67
A	<p>LEUNG T.N. ET AL.: "Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia"</p> <p>CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WASHINGTON, DC, US,</p> <p>vol. 47, no. 1, January 2001 (2001-01), pages 137-139, XP002355635</p> <p>ISSN: 0009-9147</p> <p>the whole document</p>	1-47, 49-67

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2007/001627

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SEKIZAWA A. ET AL.: "Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum" CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WASHINGTON, DC, US, vol. 47, no. 12, December 2001 (2001-12), pages 2164-2165, XP002356072 ISSN: 0009-9147 the whole document	1-47, 49-67

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2007/001627

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 1-67 are directed to diagnostic methods encompassing a potential surgical step ("obtaining a biological sample from the woman"), the search has been carried out based on the corresponding methods lacking such a surgical step.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-47, 49-67 (all partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2007/001627

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-47, 49-67 (all partially)

Methods for detecting or monitoring a pregnancy-associated disorder in a biological sample from a pregnant woman, said methods comprising the determination of the methylation status of a CpG-containing genomic sequence of at least 15 nt within the genomic locus CGI137 on chromosome 21.

2. claims: 1-47, 49-67 (all partially)

Same as invention 1, but within the genomic locus PGE9A (phosphodiesterase 9A) on chromosome 21.

3. claims: 1-47, 49-67 (all partially)

Same as invention 1, but within the genomic locus PPP1R2P2 (homo sapiens protein phosphatase 1 regulatory subunit 2 pseudogene 2) on chromosome 21.

4. claims: 1-47, 49-67 (all partially)

Same as invention 1, but within the genomic locus "Similarity to Fem1A (C. elegans)" on chromosome 21.

5. claims: 1-46, 48-67 (all partially)

Same as invention 1, but within the genomic locus CGI009 on chromosome 21.

6. claims: 1-46, 48-67 (all partially)

Same as invention 1, but within the genomic locus CBR1 (carbonyl reductase 1) on chromosome 21.

7. claims: 1-46, 48-67 (all partially)

Same as invention 1, but within the genomic locus DSCAM (Down syndrome cell adhesion molecule) on chromosome 21.

8. claims: 1-46, 48-67 (all partially)

Same as invention 1, but within the genomic locus "chromosome 21 open reading frame 29" (C12orf29).

International Application No. PCT/GB2007/001627

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

9. claims: 1-46, 48-67 (all partially)

Same as invention 1, but within the genomic locus HLCS
(holocarboxylase synthetase) on chromosome 21.

10. claims: 1-46, 48-67 (all partially)

Same as invention 1, but within the genomic locus CGI132 on
chromosome 21.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2007/001627

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005118852 A	15-12-2005	AU 2005250223 A1 CA 2568755 A1 EP 1751307 A2	15-12-2005 15-12-2005 14-02-2007
US 2003044388 A1	06-03-2003	AT 353977 T AU 2002324135 A1 CA 2456140 A1 CN 1665936 A DE 60218182 T2 DK 1421211 T3 EP 1421211 A2 ES 2280562 T3 WO 03020974 A2 JP 2005501566 T US 2005282185 A1	15-03-2007 18-03-2003 13-03-2003 07-09-2005 07-02-2008 29-05-2007 26-05-2004 16-09-2007 13-03-2003 20-01-2005 22-12-2005
US 2003211522 A1	13-11-2003	NONE	
WO 2004065629 A	05-08-2004	AU 2004205774 A1 CA 2513292 A1 CN 1723289 A EP 1583846 A1 JP 2006515517 T	05-08-2004 05-08-2004 18-01-2006 12-10-2005 01-06-2006

フロントページの続き

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

(74)代理人 100087413

弁理士 古賀 哲次

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 ロー, ユク ミン デニス

中華人民共和国, 香港特別行政区, カオルーン, ホマンティン, キング タク ストリート 7, 4 / エフ

(72)発明者 チウ, ロッサ ワイ クン

中華人民共和国, ニュー テリトリーズ, タイ ポー, フン ラム ドライブ 1, コンステレイション コープ, ブロック 1, フラット 1 エー

(72)発明者 チム, スティーブン シュー チュン

中華人民共和国, 香港特別行政区, クオリー ベイ, コーンヒル, ブロック エー, 20 / エフ, フラット 2011

(72)発明者 ディン, チュンミン

中華人民共和国, 香港特別行政区, ニュー テリトリーズ, シャティン, ザ チャイニーズ ユニバーシティ オブ ホンコン, ユニバーシティ レジデンス 11, フラット 6 ビー

(72)発明者 チン, シェンナン

中華人民共和国, 香港特別行政区, ニュー テリトリーズ, シャティン, ザ チャイニーズ ユニバーシティ オブ ホンコン, ユニバーシティ レジデンス 11, フラット 6 ビー

(72)発明者 リー, トレイシー ユエン ハン

中華人民共和国, 香港特別行政区, ツェン ワン, ベルベデーレ ガーデン, フェイズ 3, ブロック 1, フラット 4 ジー

(72)発明者 ルン, フィオナ ミウ フン

中華人民共和国, 香港特別行政区, ニュー テリトリーズ, クワイ チュン, ライ キング エステイト, ヤット キング ハウス, ルーム 1116

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 CA20 HA12

4B063 QA01 QA13 QA19 QQ03 QQ42 QR62 QS16 QS25 QS34 QX02

专利名称(译)	用于产前诊断和监测的新型胎儿标记物		
公开(公告)号	JP2009535050A	公开(公告)日	2009-10-01
申请号	JP2009508462	申请日	2007-05-03
[标]申请(专利权)人(译)	香港中文大学		
申请(专利权)人(译)	香港大学中国		
[标]发明人	ローユクミンデニス チウロツサワイクン チムスティーブンシューチュン ディンチュンミン チンシェンナン リートレイシーユエンハン ルンフィオナミウフン		
发明人	ロー,ユク ミン デニス チウ,ロツサ ワイ クン チム,スティーブン シュー チュン ディン,チュンミン チン,シェンナン リー,トレイシー ユエン ハン ルン,フィオナ ミウ フン		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6827 C12Q1/6883 C12Q2600/154 C12Q2600/156 C12Q2523/125 C12Q1/6813 C12Q1/686 G01N33/50		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 中村弘 池田 达则		
优先权	60/797456 2006-05-03 US 11/784499 2007-04-06 US		
其他公开文献	JP2009535050A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本申请提供了新的胎儿标记物用于产前诊断和监测某些妊娠相关病症的用途。更具体地，本发明已发现位于胎儿21号染色体上的某些CpG岛显示出位于母体染色体21上的相应CpG岛的不同甲基化谱。属于该应用程序还提供用于诊断或监测相关病症的试剂盒。

[illegible]