

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-510575

(P2013-510575A)

(43) 公表日 平成25年3月28日(2013.3.28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	Z 4 B O 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D 4 B O 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G O 1 N 33/53	M
A 6 1 B 10/00 (2006.01)	G O 1 N 33/53	Y
	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-538952 (P2012-538952)
 (86) (22) 出願日 平成22年11月10日 (2010.11.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年7月9日 (2012.7.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/056252
 (87) 国際公開番号 W02011/060080
 (87) 国際公開日 平成23年5月19日 (2011.5.19)
 (31) 優先権主張番号 61/259,783
 (32) 優先日 平成21年11月10日 (2009.11.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/360,556
 (32) 優先日 平成22年7月1日 (2010.7.1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/387,313
 (32) 優先日 平成22年9月28日 (2010.9.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512121990
 ジェマ・ダイアグノスティックス、インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国ミシガン州48107、アナーバー、ピー・オー・ボックス 7977
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100096013
 弁理士 富田 博行
 (74) 代理人 100092967
 弁理士 星野 修

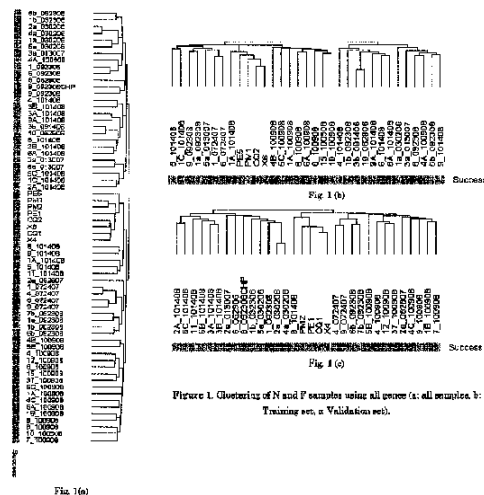
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 卵丘細胞が差示発現する遺伝子およびそれらを用いる妊娠受容能をもつ卵母細胞の同定のためのアッセイ

(57) 【要約】

“妊娠受容能をもつ”卵母細胞を同定する遺伝学的手段を提供する。これらの手段は、妊娠受容能をもつ卵母細胞に由来する卵丘細胞に特徴的レベルで(アップレギュレートまたはダウンレギュレートされて)発現する1以上の遺伝子の発現レベルを検出することを含む。この特徴的な遺伝子発現レベル、すなわち本明細書中で“妊娠シグナチャー”と呼ぶパターンを用いて、生存可能な妊娠の発生を妨害または阻止する原因状態、たとえば閉経前状態、他のホルモン機能障害、卵巣機能障害、卵巣嚢胞、癌または他の細胞増殖障害、自己免疫障害などの状態を伴う対象を同定することもできる。好ましい態様において、妊娠シグナチャーはABCA6、NCAM1、OLFML3、PTPRA、SDF4、GPR137B、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、NDNL2、SLC26A3、およびTERTのうち1以上を含むであろう。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の段階を含む、受精した際に生存可能な妊娠を生じることができる卵母細胞を同定する非侵襲的方法：

(i) 雌性ドナーからの妊娠受容能について検査すべき卵母細胞またはそのドナーの他の卵母細胞に随伴する少なくとも 1 個の卵丘細胞を入手する；

(i i) その少なくとも 1 個の卵丘細胞による少なくとも 1 つの遺伝子の発現をアッセイする；その遺伝子の発現は、その卵丘細胞に随伴する卵母細胞が、受精させて適切な子宮環境内へ移植した際に生存可能な妊娠をもたらす能力と相関し、その際、遺伝子は表 4 中のもの、および / または ABCA6、NCAM1、OLFM L3、PTPRA、SDF 4、GPR137B、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、NDNL2、SLC26A3 および TERF2IP、またはそれらのオルソログ、スプライズバリエーションもしくは対立遺伝子バリエーションから選択される；そして

(i i i) その少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルを、妊娠受容能をもつ卵母細胞に随伴する卵丘細胞による特徴的な発現レベルと比較したものに基づいて、その卵母細胞またはその雌性ドナーに由来する他の卵母細胞が、受精させて適切な子宮環境内へ移植した際に生存可能な妊娠をもたらすことが潜在的に可能であるかどうかを同定する。

【請求項 2】

その発現を検出すべき少なくとも 1 つの遺伝子が、ABCA6、NCAM1、OLFM L3、PTPRA、SDF4、GPR137B、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、NDNL2、SLC26A3、および TERF2IP からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

その方法により、それらの遺伝子のうち 2 以上の発現を検出する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

その方法により、それらの遺伝子のうち 3 以上の発現を検出する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

その方法により、それらの遺伝子のうち 4 以上の発現を検出する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

その方法により、それらの遺伝子のうち 5 以上の発現を検出する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

その方法により、それらの遺伝子のうち 6 以上の発現を検出する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

その方法により、それらの遺伝子のうち 7 以上の発現を検出する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】

その方法により、それらの遺伝子のうち 8 以上の発現を検出する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 10】

卵母細胞が哺乳動物の卵母細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

卵母細胞がヒトの卵母細胞である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

卵母細胞がヒト以外の霊長類の卵母細胞である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

その発現が生存可能な妊娠を潜在的にもたらず卵母細胞の能力と相関する、A B C A 6、N C A M 1、O L F M L 3、P T P R A、S D F 4、G P R 1 3 7 B、D D I T 4、D U S P 1、G P R 1 3 7 B、I D U A、K C T D 5、N D N L 2、S L C 2 6 A 3、およびT E R F 2 I Pから選択される少なくとも5つの遺伝子の発現を測定する、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

その発現が生存可能な妊娠を潜在的にもたらず卵母細胞の能力と相関する、A B C A 6、N C A M 1、O L F M L 3、P T P R A、S D F 4、G P R 1 3 7 B、D D I T 4、D U S P 1、G P R 1 3 7 B、I D U A、K C T D 5、N D N L 2、S L C 2 6 A 3、およびT E R F 2 I Pから選択される少なくとも6つの遺伝子の発現を測定する、請求項13

10

【請求項15】

その発現が生存可能な妊娠を潜在的にもたらず卵母細胞の能力と相関する、A B C A 6、N C A M 1、O L F M L 3、P T P R A、S D F 4、G P R 1 3 7 B、D D I T 4、D U S P 1、G P R 1 3 7 B、I D U A、K C T D 5、N D N L 2、S L C 2 6 A 3、およびT E R F 2 I Pから選択される少なくとも7つの遺伝子の発現を測定する、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

その発現が生存可能な妊娠を潜在的にもたらず卵母細胞の能力と相関する、A B C A 6、N C A M 1、O L F M L 3、P T P R A、S D F 4、G P R 1 3 7 B、D D I T 4、D U S P 1、G P R 1 3 7 B、I D U A、K C T D 5、N D N L 2、S L C 2 6 A 3、およびT E R F 2 I Pから選択される少なくとも8つの遺伝子の発現を測定する、請求項15

20

【請求項17】

その発現が生存可能な妊娠を潜在的にもたらず卵母細胞の能力と相関する、A B C A 6、N C A M 1、O L F M L 3、P T P R A、S D F 4、G P R 1 3 7 B、D D I T 4、D U S P 1、G P R 1 3 7 B、I D U A、K C T D 5、N D N L 2、S L C 2 6 A 3、およびT E R F 2 I Pから選択される少なくとも9つの遺伝子の発現を測定する、請求項14

に記載の方法。

【請求項18】

その発現が生存可能な妊娠を潜在的にもたらず卵母細胞の能力と相関する少なくとも10の遺伝子の発現を測定する、請求項14に記載の方法。

30

【請求項19】

その発現が生存可能な妊娠を潜在的にもたらず卵母細胞の能力と相関する少なくとも15の遺伝子の発現を同定する、請求項1に記載の方法。

【請求項20】

その発現が生存可能な妊娠を潜在的にもたらず卵母細胞の能力と相関する少なくとも20の遺伝子の発現を同定する、請求項1に記載の方法。

【請求項21】

その発現が生存可能な妊娠を潜在的にもたらず卵母細胞の能力と相関する、表4中のものから選択される少なくとも20～50の遺伝子の発現をアッセイする、請求項1に記載の方法。

40

【請求項22】

その発現が生存可能な妊娠を潜在的にもたらず卵母細胞の能力と相関する、表4中のものから選択される少なくとも50～100の遺伝子の発現をアッセイする、請求項1に記載の方法。

【請求項23】

遺伝子の発現をアッセイする方法が差示的遺伝子発現をモニターする方法を使用する、請求項1に記載の方法。

【請求項24】

50

その方法が、インデクシングディファレンシャルディスプレイ逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (DDRT-PCR) を指標とすることを含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 25】

卵母細胞が最高で 35 歳のヒト女性から入手される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

卵母細胞が少なくとも 25 歳のヒト女性から入手される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 27】

卵母細胞が少なくとも 30 歳のヒト女性から入手される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 28】

卵母細胞が少なくとも 35 歳のヒト女性から入手される、請求項 18 に記載の方法。

10

【請求項 29】

卵母細胞が少なくとも 40 歳のヒト女性から入手される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 30】

その少なくとも 1 つの遺伝子の異常な発現が、閉経、癌、卵巢機能障害、卵巢嚢胞、自己免疫障害およびホルモン機能障害から選択される状態と相関する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 31】

下記の段階を含む、受精処置の有効性を評価する方法：

(i) ヒト女性を想定受精増強処置により処置する；

(ii) 処置後にそのヒト女性から卵母細胞およびそれに随伴する卵丘細胞を入手し、そしてその卵母細胞に随伴する少なくとも 1 つの卵丘細胞による、表 4 中に含まれるものならびにさらに ABCA6、NCAM1、OLFML3、PTPRA、SDF4、GPR137B、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、NDNL2、SLC26A3 および TERF2IP、またはそれらのオルソログおよび対立遺伝子バリエーションもしくはスプライスバリエーションから選択される少なくとも 1 つの遺伝子の発現を測定する；そして

20

(iii) その卵母細胞に随伴する細胞によるその少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルを、正常卵母細胞または妊娠卵母細胞に随伴する卵丘細胞によるその遺伝子の特徴的な発現レベルと比較したものに基づいて、その処置が有効であるかどうかを評価する。

【請求項 32】

受精処置がホルモン療法を含む、請求項 31 に記載の方法。

30

【請求項 33】

対象が閉経期にあり、処置がホルモン置換療法を含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 34】

遺伝子発現をリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) により検出する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 35】

遺伝子発現を RT-PCR により検出する、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 36】

遺伝子発現をインデクシングディファレンシャルディスプレイ逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (DDRT-PCR) を指標とすることにより差示検出する、請求項 1 または 31 に記載の方法。

40

【請求項 37】

遺伝子発現結果が卵丘細胞からの RNA を用いて得られる、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

対象において受精潜在性を評価する方法であって、妊娠潜在性を評価しようとする卵母細胞またはその対象から採取した他の卵母細胞に随伴する卵丘細胞による、表 4 中のもの、ならびに ABCA6、NCAM1、OLFML3、PTPRA、SDF4、GPR137B、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、NDNL2、SLC26A3 および TERF2IP、またはそれらのオルソログ、スプライスバリエーション

50

トもしくは対立遺伝子バリエーションから選択される特異的妊娠シグナチャー遺伝子の発現レベルを検出し、その発現レベルを、生存可能な妊娠をもたらすことができる卵母細胞に随伴する卵丘細胞によるそれらの遺伝子の特徴的な発現レベルと比較し；そして、その卵丘細胞が妊娠受容能をもつ卵母細胞に特徴的なレベルで1以上の妊娠シグナチャー遺伝子を発現しているかどうかに基づいて、その対象が潜在的に“妊娠受容能をもつ”かどうかを判定することを含む方法。

【請求項39】

少なくとも1つの遺伝子が、ABCA6、NCAM1、OLFML3、PTPRA、SDF4、GPR137B、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、NDNL2、SLC26A3、およびTERF2IPからなる群から選択される少なくとも2つの遺伝子を含む、請求項38に記載の方法。

10

【請求項40】

少なくとも1つの遺伝子が、ABCA6、NCAM1、OLFML3、PTPRA、SDF4、GPR137B、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、NDNL2、SLC26A3、およびTERF2IPからなる群から選択される少なくとも3つの遺伝子を含む、請求項38に記載の方法。

【請求項41】

少なくとも1つの遺伝子が、ABCA6、NCAM1、OLFML3、PTPRA、SDF4、GPR137B、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、NDNL2、SLC26A3、およびTERF2IPからなる群から選択される少なくとも4つの遺伝子を含む、請求項38に記載の方法。

20

【請求項42】

少なくとも1つの遺伝子が、ABCA6、NCAM1、OLFML3、PTPRA、SDF4、GPR137B、ABCA6、NCAM1、OLFML3、PTPRA、SDF4、GPR137B、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、NDNL2、SLC26A3、およびTERF2IPからなる群から選択される少なくとも5つの遺伝子を含む、請求項38に記載の方法。

【請求項43】

少なくとも1つの遺伝子が、ABCA6、NCAM1、OLFML3、PTPRA、SDF4、GPR137B、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、NDNL2、SLC26A3、およびTERF2IPからなる群から選択される少なくとも6つの遺伝子を含む、請求項38に記載の方法。

30

【請求項44】

少なくとも1つの遺伝子が、ABCA6、NCAM1、OLFML3、PTPRA、SDF4、GPR137B、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、NDNL2、SLC26A3、およびTERF2IPからなる群から選択される少なくとも7つの遺伝子を含む、請求項38に記載の方法。

【請求項45】

少なくとも1つの遺伝子が、ABCA6、NCAM1、OLFML3、PTPRA、SDF4、GPR137B、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、NDNL2、SLC26A3、およびTERF2IPからなる群から選択される8、9、10、11、12、13、または14すべての遺伝子を含む、請求項38に記載の方法。

40

【請求項46】

その方法が、インデクシングディファレンシャルディスプレイ逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(DDRT-PCR)を指標とすることにより差示的遺伝子発現をモニターする、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

“妊娠シグナチャー”ポリペプチドに特異的に結合する抗体を用いて遺伝子発現を検出する、請求項1に記載の方法。

50

【請求項 48】

ドナー卵丘細胞における、表 4 からの遺伝子のセット、および / または ABCA6、NCAM1、OLFML3、PTPRA、SDF4、GPR137B、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、NDNL2、SLC26A3 および TERF2IP の発現を用いて、異数性から選択される妊娠を排除する卵母細胞異常性を同定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 49】

受容能をもつ卵母細胞または受容能をもつ胚を選択するための方法であって、卵母細胞および胚を囲む卵丘細胞において、表 4 中の遺伝子、および / または ABCA6、NCAM1、OLFML3、PTPRA、SDF4、GPR137B、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、NDNL2、SLC26A3 および TERF2IP から選択される 1 以上の遺伝子の発現レベルを測定する段階を含む方法。

10

【請求項 50】

受容能をもつ卵母細胞を選択するための方法であって、表 4 中の遺伝子のうち少なくとも 5 つまたは ABCA6、NCAM1、OLFML3、PTPRA、SDF4、GPR137B、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、NDNL2、SLC26A3 および TERF2IP からなる遺伝子のうち少なくとも 5 つの発現レベルを測定する段階を含む方法。

【請求項 51】

受容能をもつ胚を選択するための方法であって、胚を囲む卵丘細胞において少なくとも 10 の遺伝子の発現レベルを測定する段階を含み、その際、それらの遺伝子が表 4 中のもの、または ABCA6、NCAM1、OLFML3、PTPRA、SDF4、GPR137B、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、NDNL2、SLC26A3 および TERF2IP からなる群の遺伝子から選択される方法。

20

【請求項 52】

さらに、試料中の遺伝子の発現レベルを対照と比較することからなる段階を含み、その際、試料と対照の間の遺伝子の発現レベルの差の検出はその卵母細胞または胚が受容能をもつかどうかの指標となる、請求項 49 ~ 51 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 53】

さらに、卵丘細胞に随伴する卵母細胞を受精させることを含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 54】

さらに、卵母細胞を雌性ホストの子宮に移植することを含む、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

雌性ホストは卵母細胞と異なる種のものである、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

雌性ホストは卵母細胞と同じ種のものである、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 57】

雌性ホストはそれから卵母細胞を得た個体である、請求項 56 に記載の方法。

40

【請求項 58】

雌性ホストはそれから卵母細胞を得た個体と異なる個体である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 59】

妊娠受容能について検査すべき卵母細胞に随伴する少なくとも 1 つの卵丘細胞の遺伝子発現と、妊娠受容能をもつ卵母細胞に随伴する卵丘細胞による特徴的な発現レベルとの比較を、重み付き投票法、ベイズ複合共変量法、対角線形識別法、最近接重心法、k - 最近接法、シュランケン重心法、支援ベクターマシーン、複合共変量法、およびそのいずれかの組み合わせからなる群から選択される方法を用いて実施する、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 60】

妊娠受容能について検査すべき卵母細胞に随伴する少なくとも1つの卵丘細胞の遺伝子発現と、妊娠受容能をもつ卵母細胞に随伴する卵丘細胞による特徴的な発現レベルとの比較を、重み付き投票法を用いて実施する、請求項59に記載の方法。

【請求項 61】

妊娠受容能について検査すべき卵母細胞に随伴する少なくとも1つの卵丘細胞の、遺伝子 ABCA6、NCAM1、OLFML3、PTPRA、SDF4、GPR137B、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、NDNL2、SLC26A3 および TERF2IP、またはそれらのオルソログ、スプライスバリエーションもしくは対立遺伝子バリエーションの遺伝子発現を、妊娠受容能をもつ卵母細胞に随伴する卵丘細胞による特徴的な発現レベルと比較することを含む、請求項59または60に記載の方法。

10

【請求項 62】

さらに、雌性ドナーに由来する卵母細胞を受精させて適切な子宮環境内へ移植した際に生存可能な妊娠を潜在的にもたらしうことができるかどうかを示すインディケータを作成することを含む、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 63】

インディケータをレポートとして提供する、請求項62に記載の方法。

【請求項 64】

インディケータを電子ディスプレイ上に表示する、請求項62に記載の方法。

【請求項 65】

インディケータを電子コミュニケーションとして提供する、請求項62に記載の方法

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の引照

[0001] 本出願は、US provisional application Serial No. 61/388,296、2010年9月30日出願；US provisional application Serial No. 61/387,313および61/387,286、両方とも2010年月9日28日出願；US provisional application Serial No. 61/360,556、2010年7月1日出願およびUS provisional application Serial No. 61/259,783、2009年11月10日出願に基づく優先権を主張する。本出願はUS Serial No 11/584,580、2006年10月23日出願にも関係し、これはUS Serial No. 11/437,797、2006年月5日22出願の一部継続出願であり、これはUS Serial No. 11/091,883、2005年3月29日出願の一部継続出願であり、これはprovisional application No. 60/556,875、2004年3月29日出願に基づく優先権を主張する。これらの出願すべてを全体として本明細書に援用する。

30

【0002】

発明の分野

[0002] 本発明は、卵丘細胞(cumulus cell)におけるその発現が、その卵丘細胞に随伴する卵母細胞または同じドナーから得られる卵母細胞が妊娠受容能をもつ(pregnancy competent)かどうか、すなわち体外受精に際して生存可能な妊娠をもたらすことができるかどうかと相関する、227のヒト遺伝子群、および好ましい14遺伝子のセットを同定する。さらに本発明は、卵丘細胞における発現が卵母細胞の受容能と相関するこれら227の遺伝子の同定および好ましい14遺伝子のセットの同定をもたらした遺伝子発現検出法および統計分析法を提供する。

40

【0003】

[0003] この知見に基づいて、本発明は、卵母細胞に随伴するかまたは同じドナーに由来する卵丘細胞によるこれら227の遺伝子のうち1以上またはこれら14の遺伝子のうち1以上の発現レベルを検出することによってIVF法に用いるのに潜在的に適したヒト卵母細胞を同定するための方法および検査キットを提供する。さらにこの知見に基づいて、本発明はさらに、受精させて適切な子宮環境へ移植した際に生存可能な妊娠をもたらす

50

可能性がより高いヒト卵母細胞を同定するための検査キットを提供する。卵丘細胞におけるその発現が妊娠潜在性と相関する227の遺伝子のセットは後記の表4に含まれる。さらに、好ましい14遺伝子のセットは表12中にあり、ABCA6、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、KRAS、NCAM1、NDNL2、OLFML3、PTPRA、SDF4、SLC26A3、およびTERF2IPからなる。

【0004】

[0004] 以上に基づいて、本発明はさらに、雌性対象から単離した卵母細胞から得た卵丘細胞における、表4に含まれるこれら227の特異的遺伝子または好ましい14遺伝子のセットのうち1以上の発現を分析することにより、年齢(閉経)、原疾患状態または薬物療法による卵巣機能障害の結果として妊娠機能障害をもつ雌性対象、好ましくはヒト女性を同定するための遺伝学的方法を提供する。

10

【0005】

[0005] 本発明はまた、受精処置またはホルモン処置を受けた雌性対象の卵丘細胞によるこれら227または14の特異的遺伝子のうち1以上の発現にその処置が及ぼす影響を評価することにより、想定受精処置またはホルモン処置の有効性を評価する方法を提供する。

【背景技術】

【0006】

[0006] 発明の背景

[0007] 現在、ある雌性対象が、“妊娠受容能をもつ”卵母細胞、すなわち自然または人為的手段で受精した際に胚を生成でき、それが次いで適切な子宮環境へ移行した際に生存可能な子孫をもたらすことができる卵母細胞を産生するかどうかを同定するための信頼できる商業的に入手される遺伝学的方法または遺伝学以外の方法はない。むしろ、一般的な受精能評価方法は、ホルモンレベル、卵母細胞の数および質の視診、雌性生殖系臓器の外科的または非侵襲的(MRI)検査などに基づいて受精能を評価する。しばしば、ある女性が生存可能な妊娠の形成に問題をもつ場合、長期間、たとえば1年以上後には、診断は“説明できない”受精問題となる可能性があり、その女性は単純に試みを続けるか、あるいは他の選択肢、たとえば養子または代理出産を求めるようにアドバイスされる。

20

【0007】

[0008] 一部は、妊娠受容能をもつ卵母細胞を同定するための手段がないためであろうが、人工生殖技術(assisted reproductive technology)(ART)の成功率、すなわち体外受精(in vitro fertilization)(IVF)の試みによる妊娠率および出産率は依然として低い。主観的な形態学的パラメーターが今でもIVFおよびICSIプログラムに使用する健全な胚を選択するための主な基準である。しかし、そのような基準では胚の受容能を実際に予測することはできない。多数の研究が、幾つかの異なる形態学的基準の組み合わせによってより厳密に胚が選択されることを示している。胚の選択のための形態学的基準は移植する当日に評価され、原則として初期胚の卵割(受精後25~27時間目)、2日目、3日目または5日目の卵割球の数およびサイズ、4または8細胞期のフラグメンテーション率および多核化の存在に基づく(Fenwick et al., Hum Reprod, 17, 407-12. (2002))。

30

40

【0008】

[0009] 最近の研究により、受精用の卵母細胞の選択は得られる胚すべてをそれらの質に関係なく移植するのと比較してARTの結果を改善しないことが示された(La Sala et al., Fertil Steril. (2008))。

【0009】

[0010] IVF成功率を高め、新鮮置換のための胚の数を減らして多胎妊娠率を低下させるために、最高の着床潜在性をもつ生存可能な胚を同定することが求められている。これらすべての理由で、胚選択のための幾つかのバイオマーカーが現在調べられている(Hao uzi et al., Gynecol Obstet Fertil, 36, 730-742. (2008); He et al., Nature, 444, 12-3. (2006))。

50

【 0 0 1 0 】

[0011] 妊娠をもたらす胚は、そうではない胚と比較してそれらの代謝プロファイルが異なるので、幾つかの研究は非侵襲的な胚培養培地の評価により検出できる分子シグナチャーの同定を試みている(Brison et al., Hum Reprod, 19, 2319-24. (2004); Gardner et al., Fertil Steril, 76, 1175-80. (2001); Sakkas and Gardner, Curr Opin Obstet Gynecol, 17, 283-8 (2005); Seli et al., Fertil Steril, 88, 1350-7. (2007); Zhu et al. Fertil Steril.(2007)。

【 0 0 1 1 】

[0012] ゲノミクスも、胚の発生に際しての遺伝学的機能および細胞機能の重要な知識を提供しつつある。McKenzie et al., Hum Reprod, 19, 2869-74. (2004); Feuerstein et al., Hum Reprod, 22, 3069-77は、卵丘細胞中の幾つかの遺伝子、たとえばシクロオキシゲナーゼ2 (COX2) の発現が卵母細胞および胚の質の指標になると報告した。さらに、グレムリン1 (Gremlin 1) (GREM1)、ヒアルロン酸シターゼ2 (HAS2)、ステロイド形成急性調節タンパク質 (steroidogenic acute regulatory protein) (STAR)、ステアロイル - 補酵素Aデサチュラーゼ1および5 (SCD1および5)、アンフィレギュリン (amphiregulin) (AREG)、ならびにペントラキシン3 (pentraxin 3) (PTX3) も胚の質と正の相関性をもつと報告されている(Zhang et al., Fertil Steril, 83 Suppl 1, 1169-79. (2005))。より最近になって、ヒト卵丘細胞中のグルタチオンペルオキシダーゼ3 (GPX3)、ケモカイン受容体4 (CXCR4)、サイクリンD2 (CCND2) およびカテニン デルタ1 (CTNND1) は胚の質と逆の相関性をもつことが、胚の発生に際しての初期卵割速度に基づいて示された(van Montfoort et al., (2008) Mol Hum Reprod, 14, 157-68. (2008))。

10

20

【 0 0 1 2 】

[0013] Cillo et al., Reprod. 134: 645-50 (2007)も、特定の卵丘細胞遺伝子、すなわちHAS2、GREM1およびPTX3の発現と、卵母細胞の質および胚の発生との相関性を示唆している。さらに、Assidi et al. Biol. Reprod. 79(2) 209-222 (2008)は、特定の卵丘細胞遺伝子、すなわちEGFR、CD44、HAS2、PTSG2およびBTCの発現と、卵母細胞の質およびそれからの胚の発生との相関性を示唆している。さらに、Bettegowda et al., Biol. Reprod. 79(2): 301-309 (2008)は、特定のプロテイナーゼカテプシン遺伝子の発現と、ウシ卵母細胞の質およびそれからの子孫の発生との相関性を示唆している。

30

【 0 0 1 3 】

[0014] さらに、Zhangらに最近付与された特許(2009年8月11日)は、卵丘細胞におけるペントラキシン3およびBCL-2メンバーを検出して卵母細胞の質を評価することを権利請求している。US20040058975、2004年3月25日公開も、EP2受容体および/またはシクロオキシゲナーゼCOX-2の拮抗が卵丘細胞の増殖および卵母細胞の発育を促進すると教示している。

【 0 0 1 4 】

[0015] また、初期卵割は妊娠を予測するための信頼性のあるバイオマーカーであることが示されている(Lundin et al, Hum Reprod, 16, 2652-7. (2001); Van Montfoort et al., Hum Reprod, 19, 2103-8 (2004); Yang et al, Fertil Steril, 88, 1573-8 (2007))が、妊娠予後と相関する卵丘細胞の遺伝子発現プロファイルについてはほとんど報告されていない(ただし、Assou et al., Mol Hum Reprod. 2008 Dec; 14(12): 711-9. Epub 2008 Nov 21を参照)。

40

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 5 】

【 特許文献 1 】 Zhang et al. (2009年8月11日)

【 特許文献 2 】 US20040058975

【 非特許文献 】

50

【 0 0 1 6 】

- 【非特許文献 1】Fenwick et al., Hum Reprod, 17, 407-12. (2002)
- 【非特許文献 2】La Sala et al., Fertil Steril. (2008)
- 【非特許文献 3】Haouzi et al., Gynecol Obstet Fertil, 36, 730-742. (2008)
- 【非特許文献 4】He et al., Nature, 444, 12-3. (2006)
- 【非特許文献 5】Brison et al., Hum Reprod, 19, 2319-24. (2004)
- 【非特許文献 6】Gardner et al., Fertil Steril, 76, 1175-80. (2001)
- 【非特許文献 7】Sakkas and Gardner, Curr Opin Obstet Gynecol, 17, 283-8 (2005)
- 【非特許文献 8】Seli et al., Fertil Steril, 88, 1350-7. (2007)
- 【非特許文献 9】Zhu et al. Fertil Steril. (2007) 10
- 【非特許文献 10】McKenzie et al., Hum Reprod, 19, 2869-74. (2004)
- 【非特許文献 11】Feuerstein et al, Hum Reprod, 22, 3069-77
- 【非特許文献 12】Zhang et al., Fertil Steril, 83 Suppl 1, 1169-79. (2005)
- 【非特許文献 13】van Montfoort et al., (2008) Mol Hum Reprod, 14, 157-68.(2008)
- 【非特許文献 14】Cillo et al., Reprod. 134: 645-50 (2007)
- 【非特許文献 15】Assidi et al. Biol. Reprod. 79(2) 209-222 (2008)
- 【非特許文献 16】Bettegowda et al., Biol. Reprod. 79(2): 301-309 (2008)
- 【非特許文献 17】Lundin et al, Hum Reprod, 16, 2652-7. (2001)
- 【非特許文献 18】Van Montfoort et al., Hum Reprod, 19, 2103-8 (2004)
- 【非特許文献 19】Yang et al, Fertil Steril, 88, 1573-8 (2007) 20
- 【非特許文献 20】Assou et al., Mol Hum Reprod. 2008 Dec; 14(12): 711-9
- 【非特許文献 21】Epub 2008 Nov 21

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 7 】

[0016] したがって、以上にもかかわらず、I V F法に用いるのに適した卵母細胞を同定し、女性における遺伝子に基づく受精問題を同定するための、代替となる、より予測性のある方法を提供することがきわめて望ましいであろう。特に、卵丘細胞によるその発現が卵母細胞の妊娠受容能と相関する他の遺伝子およびバイオマーカーの同定、ならびにそれらを用いた検査キットおよびアッセイ法はI V F法の結果を向上させることができるので、きわめて望ましいであろう。 30

【 0 0 1 8 】

[0017] これらの方法および検査キットはさらに、卵母細胞関連の受精問題を伴う女性の同定を提供するであろう；これは、そのような受精問題は妊娠を排除する他の健康問題、たとえば癌、閉経状態、ホルモン機能障害、卵巣嚢胞、または他の原疾患もしくは健康関連問題と相関している可能性があるので望ましい。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 9 】

[0018] 本発明は、受容能をもつ卵母細胞を選択するための方法であって、表4中の227の遺伝子またはA B C A 6、D D I T 4、D U S P 1、G P R 1 3 7 B、I D U A、K C T D 5、K R A S、N C A M 1、N D N L 2、O L F M L 3、P T P R A、S D F 4、S L C 2 6 A 3およびT E R F 2 I Pからなる群から選択される14の遺伝子のいずれかの発現レベルを測定する段階を含む方法に関する。 40

【 0 0 2 0 】

[0019] 本発明はまた、受容能をもつ胚を選択するための方法であって、卵母細胞を囲む卵丘細胞における特異的遺伝子の発現レベルを測定する段階を含み、その際、遺伝子は表4中のものまたはA B C A 6、D D I T 4、D U S P 1、G P R 1 3 7 B、I D U A、K C T D 5、K R A S、N C A M 1、N D N L 2、O L F M L 3、P T P R A、S D F 4、S L C 2 6 A 3およびT E R F 2 I Pからなる群から選択される14の遺伝子である方法に関する。 50

【0021】

[0020] 本発明はまた、受容能をもつ卵母細胞または受容能をもつ胚を選択するための方法であって、卵母細胞または胚を囲む卵丘細胞において表4中の227の遺伝子または ABCA6、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、KRAS、NCAM1、NDNL2、OLFML3、PTPRA、SDF4、SLC26A3 および TERF2IP からなる群から選択される14の遺伝子から選択される1以上の遺伝子の発現レベルを測定する段階を含む方法に関する。

【0022】

[0021] これらの遺伝子のうち1以上の異常な発現レベルは、早期の胚分裂停止に起因する受容能のない卵母細胞または胚の予測に役立つ。

[0022] 前記のように、女性ドナーの卵丘細胞によるこれらの遺伝子の発現レベルは、その卵丘細胞に随伴するかまたは同じ対象に由来する卵母細胞が自然または人為的手段により受精した際に“妊娠受容能をもつ”可能性と相関することが見出された。これらの遺伝子および発現レベルは、本出願人らが“妊娠シグナチャー”と呼ぶものを構成する。さらに、妊娠シグナチャーは前記に示した本出願人の先の出願に開示した1以上の遺伝子をさらに含むことができる。

【0023】

[0023] “妊娠シグナチャー”を構成する遺伝子または対応するポリペプチドのうち1以上の発現検出レベルに基づいて、ある個体はその個体の卵母細胞をIVF法に使用するのに潜在的に不適切にする遺伝子関連の受精問題をもつかどうかを判定する新規方法を提供することは、本発明の関連する目的である。妊娠シグナチャーを構成する遺伝子および遺伝子産物は、この場合も好ましくは表4に含まれるものから選択され、および/または ABCA6、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、KRAS、NCAM1、NDNL2、OLFML3、PTPRA、SDF4、SLC26A3 および TERF2IP からなる群から選択される。

【0024】

[0024] 本発明の他の目的は、下記の段階を含む、雌性受精処置の有効性を評価する方法を提供することである：

(i) “生存可能な妊娠”をもつことを阻止または阻害する問題を伴うと推定される雌性対象を処置する；

(ii) その受精処置後にその雌性対象から少なくとも1つの卵母細胞およびそれに随伴する細胞を単離する；

(iii) 単離した卵母細胞に随伴する少なくとも1つの卵丘細胞を単離し、“妊娠受容能をもつ”卵母細胞に特徴的な発現レベルで発現する表4中のものから選択される少なくとも1つの遺伝子または ABCA6、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、KRAS、NCAM1、NDNL2、OLFML3、PTPRA、SDF4、SLC26A3 および TERF2IP から選択される少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを検出する；そして

(iv) 処置の結果としてその遺伝子が“妊娠受容能をもつ”卵母細胞に特徴的な発現レベルで発現しているかどうかに基づいて、その受精処置の推定有効性を判定する。

【0025】

[0025] 本発明の他の特定の目的は、妊娠シグナチャーを構成する1以上の遺伝子の発現を調節することにより不妊症を処置するための新規方法を提供することである。これらの方法は、表4に含まれる遺伝子、または ABCA6、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、KRAS、NCAM1、NDNL2、OLFML3、PTPRA、SDF4、SLC26A3 および TERF2IP のうち1以上、ならびにそれらのスプライズバリエーションまたは対立遺伝子バリエーションの発現に作動または拮抗する化合物を投与することを含む。

【0026】

[0026] 本発明の他の目的は、想定受精処置の有効性を評価するための動物モデルを提

10

20

30

40

50

供することであり、ヒト以外の動物、たとえばヒト以外の霊長類の妊娠受容能をもつ卵母細胞に随伴する卵丘細胞に特徴的なレベルで発現する遺伝子を同定し；そのヒト以外の動物において想定受精処置がそれらの遺伝子の発現レベルに及ぼした作用、すなわちその処置の結果として、妊娠受容能をもつ卵母細胞に随伴する卵丘細胞にみられる遺伝子発現レベル（“妊娠シグナチャー”）をより良好に模倣した遺伝子発現レベルが、表4中の227の遺伝子のうち1以上、またはABC A6、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、KRAS、NCAM1、NDNL2、OLFML3、PTPRA、SDF4、SLC26A3およびTERF2IPからなる14の遺伝子群のうち1以上において生じるかどうかに基づいて、その処置の有効性を評価することを含む。

【図面の簡単な説明】

10

【0027】

【図1a】[0027] 図1a～cは、FおよびNの全試料（65試料）、トレーニングセット（training set）の試料（33試料）および検証セット（validation set）の試料（32試料）のクラスタリングを、全遺伝子を用いて別個に示す（a：全試料，b：トレーニングセット，c：検証セット）。類似度の距離（metric of similarity）としてピアソンの相関（Pearson's correlation）を用いる平均連鎖法（average linkage method）を利用し、行正規化（row normalization）に従って、試料を階層的クラスタリング法（hierarchical clustering）でクラスタリングする；Sneath, P. (1973) Numerical taxonomy; the principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman, San Francisco, CA USA. 図1：全遺伝子を用いたNおよびF試料のクラスタリング（a：全試料，b：トレーニングセット，c：検証セット）。

20

【図1b】[0027] 図1a～cは、FおよびNの全試料（65試料）、トレーニングセット（training set）の試料（33試料）および検証セット（validation set）の試料（32試料）のクラスタリングを、全遺伝子を用いて別個に示す（a：全試料，b：トレーニングセット，c：検証セット）。類似度の距離（metric of similarity）としてピアソンの相関（Pearson's correlation）を用いる平均連鎖法（average linkage method）を利用し、行正規化（row normalization）に従って、試料を階層的クラスタリング法（hierarchical clustering）でクラスタリングする；Sneath, P. (1973) Numerical taxonomy; the principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman, San Francisco, CA USA. 図1：全遺伝子を用いたNおよびF試料のクラスタリング（a：全試料，b：トレーニングセット，c：検証セット）。

30

【図1c】[0027] 図1a～cは、FおよびNの全試料（65試料）、トレーニングセット（training set）の試料（33試料）および検証セット（validation set）の試料（32試料）のクラスタリングを、全遺伝子を用いて別個に示す（a：全試料，b：トレーニングセット，c：検証セット）。類似度の距離（metric of similarity）としてピアソンの相関（Pearson's correlation）を用いる平均連鎖法（average linkage method）を利用し、行正規化（row normalization）に従って、試料を階層的クラスタリング法（hierarchical clustering）でクラスタリングする；Sneath, P. (1973) Numerical taxonomy; the principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman, San Francisco, CA USA. 図1：全遺伝子を用いたNおよびF試料のクラスタリング（a：全試料，b：トレーニングセット，c：検証セット）。

40

【図2】[0028] 図2a～bは、1180の記述遺伝子（descriptive gene）を用いたNおよびF試料のクラスタリングを示す（a：トレーニングセット，b：検証セット）。その結果は、トレーニングセット（F対N）で同定されたt-検定に基づく差次発現を示す（多重仮説検定のためにボンフェロニ補正（Bonferroni correction）して $p < 0.05$ ）。得られた“記述遺伝子”と呼ばれる1180の遺伝子を用いてトレーニングセットおよび検証セットを個別にクラスタリングした。

【図3】[0029] 図3は、227の予測遺伝子（predictor gene）を用いたNおよびF試料のクラスタリングを示す（a：トレーニングセット，b：検証セット）。このデータはトレーニングセットにおいて不適正予測された試料のみがクラスタリングにおいても誤置

50

される (misplaced) ことを明らかにするが、検証セットクラスタリングにおける F 試料と N 試料の混合挙動は重み付き投票法 (weighted voting approach) によりなされた貢献を強調する。

【図 4】[0030] 図 4 は、A) 表 4 中の予測遺伝子セット (P G ' s) に有意性を指定する方法、B) P G ' s を改良する方法、および C) 最終的な予測遺伝子セットをさらに分析する方法を模式的に示す。

【図 5】[0031] 図 5 は、各遺伝子について、その遺伝子が 40 の数値をもつ試料の数を示す。結果は“古い”35 試料について計算されている。図 5 には、各遺伝子について 40 の数値をもつ試料の数を、本発明の遺伝子 (“H a s a n 遺伝子”と表示した 196 の遺伝子) および T L D A 上の全 379 遺伝子 (“全遺伝子”と表示) について別個にプロットしたものを示す。

【図 6】[0032] 図 6 は、40 の数値をもつ遺伝子の数を各試料について示す。結果は“古い”35 試料について計算されている：各遺伝子について、その遺伝子が 40 の数値をもつ試料の数を示す。結果は“新しい”14 試料について計算されている。

【図 7】[0033] 図 7 は、各遺伝子について、その遺伝子が 40 の数値をもつ試料の数を示す。結果は“新しい”14 試料について計算されている。

【図 8】[0034] 図 8 は、40 の数値をもつ遺伝子の数を各試料について示す。結果は“新しい”14 試料について計算されている。

【図 9】[0035] 図 9 は、下記の因子に基づく遺伝子の分布を示す：その遺伝子が属するグループ (P または A)；T L D A とマイクロアレイにおけるその遺伝子のアップ/ダウンレギュレーションの一致 (方向が同じであれば 10、そうでなければ -10)；その遺伝子が 40 の数値をもつ試料の数。この分析は、種々の個数の異常値を除外して、スケールリングした (scaled) 数値およびスケールリングしていない (unscaled) 数値について個別に実施される。

【発明を実施するための形態】

【0028】

[0036] 発明の詳細な記述

[0037] 本発明をより詳細に述べる前に、以下の定義を示す。本出願においてその他のすべての語および句は、本発明の分野の当業者が解釈するようにそれらの通常の意味により解釈すべきである。

【0029】

[0038] “妊娠受容能をもつ卵母細胞”は、自然または人為的手段により受精した場合にそれが適切な子宮環境内で構成されると生存可能な妊娠をもたらすことができる雌性生殖細胞または卵子を表わす。

【0030】

[0039] 用語“受容能をもつ胚”は、同様に妊娠に導く高い着床率をもつ胚を表わす。用語“高い着床率”は、子宮内へ移植した際に胚が子宮環境内に着床して生存可能な胎児を生じ、その妊娠を終結させる措置または事象がなければそれが発育して生存可能な子孫になる潜在性を意味する。

【0031】

[0040] “生存可能な妊娠”は、受精した卵母細胞が適切な子宮環境内に収容された際に発育すること、およびそれが発育して生存可能な胎児になり、その妊娠を終結させる措置または事象がなければそれが発育して生存可能な子孫になることを表わす。

【0032】

[0041] “卵丘細胞”は、卵母細胞を囲む細胞塊に含まれる細胞を表わす。これは“卵母細胞に随伴する細胞”の例である。これらの細胞は、受精した際に“妊娠受容能をもつ”卵母細胞をもたらすのに必要なその栄養要求その他の要求の一部を卵母細胞に提供することに関与すると考えられている (Buccione, R., Schroeder, A.C., and Eppig, J.J. (1990). Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. Biol Reprod 43, 543-547.)。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 3 】

[0042] “差示的遺伝子発現”は、目的組織、本明細書中では好ましくは卵母細胞に随伴する細胞、たとえば卵丘細胞内で、その発現が変動する遺伝子を表わす。

[0043] “リアルタイムRT-PCR”は、試料中の特定のRNA転写体の増幅と定量が同時にできる方法またはそれに用いる装置を表わす。

【 0 0 3 4 】

[0044] “マイクロアレイ分析”は、特定の試料、たとえば組織試料または細胞試料中の、特異的遺伝子の発現レベルの定量を表わす。

[0045] 本明細書中で“妊娠シグナチャー”は、表4中の特異的遺伝子またはABC A 6、DDIT 4、DUSP 1、GPR 1 3 7 B、IDUA、KCTD 5、KRAS、NCAM 1、NDNL 2、OLFML 3、PTPRA、SDF 4、SLC 2 6 A 3およびTERF 2 IPからなる群から選択される14の遺伝子、ならびにそれらのオルソログ、スプライズバリエーションまたは対立遺伝子バリエーションから選択される1以上の遺伝子またはそれらによりコードされるポリペプチドの正常な発現レベルを表わす；その際これらの遺伝子またはポリペプチドは、正常な卵丘細胞において、これらの1以上の遺伝子またはポリペプチドを特徴的レベルで発現する卵丘細胞に随伴する卵母細胞は生存可能な妊娠を生じる可能性がより高いという可能性と相関するレベルで発現する。

10

【 0 0 3 5 】

[0046] 本明細書中で、特定の検出した発現核酸配列またはポリペプチドに関して“卵丘遺伝子の特徴的発現レベル”は、特定の遺伝子またはポリペプチドが、正常な卵丘細胞に随伴する卵丘細胞または正常もしくは発生受容能をもつ卵母細胞に随伴するものにみられるレベルと実質的に類似するレベルで発現することを意味する。

20

【 0 0 3 6 】

[0047] “実質的に類似する”は、個々の遺伝子の発現レベルが、正常な卵丘細胞による遺伝子またはポリペプチドの発現の検出レベルの好ましくは±1～5倍の範囲内、より好ましくは±1～3倍の範囲内、よりさらに好ましくは±1～1.5倍の範囲内、最も好ましくは±1.0～1.3、1.0～1.2、1.0～1.2倍の範囲内にあることを意味する。

【 0 0 3 7 】

[0048] 本発明によれば、卵母細胞は自然サイクル、変異させた自然サイクル、またはcIVFもしくはICSIのために刺激したサイクルから生じたものであってもよい。用語“自然サイクル”は、雌または女性が卵母細胞を産生する自然サイクルを表わす。用語“変異させた自然サイクル”は、組換えFSHまたはhMGに関連するGnRHアンタゴニストによる緩和な卵巣刺激下で、雌または女性が1または2個の卵母細胞を産生するプロセスを表わす。用語“刺激したサイクル”は、組換えFSHまたはhMGに関連するGnRHアゴニストまたはアンタゴニストによる緩和な卵巣刺激下で、雌または女性が1以上の卵母細胞を産生するプロセスを表わす。

30

【 0 0 3 8 】

[0049] “適切な妊娠シグナチャーをもつかまたは妊娠受容能をもつと判定された卵母細胞または卵丘細胞”は、卵母細胞またはその卵母細胞に随伴する卵丘細胞、あるいは同じ対象から被験卵丘細胞とほぼ同じ時点で(0～6か月以内)得られた卵母細胞であって、表4中のもまたはABC A 6、DDIT 4、DUSP 1、GPR 1 3 7 B、IDUA、KCTD 5、KRAS、NCAM 1、NDNL 2、OLFML 3、PTPRA、SDF 4、SLC 2 6 A 3およびTERF 2 IPからなる群から選択される14の遺伝子、またはそれらのオルソログ、スプライズバリエーションもしくは対立遺伝子バリエーションのうち少なくとも1つの遺伝子またはそれらによりコードされるポリペプチドを正常な卵丘細胞が発現するレベルに特徴的な様式で発現すると判定されたものを表わす。表4に含まれるもの、またはそれらの対立遺伝子バリエーションもしくはスプライズバリエーションのうち、好ましくは少なくとも2もしくは3つの遺伝子、より好ましくは少なくとも3～10の遺伝子、10～50の遺伝子、さらには最高100またはそれ以上の遺伝子が特徴的な様式で発現す

40

50

る。多数の、たとえば10以上のオーダーの遺伝子の発現を対象の遺伝学に基づくアッセイで評価する場合、適切な妊娠シグナチャーは、全部または実質的に全部、すなわち少なくとも70~80%の検出遺伝子が正常な卵丘細胞に特徴的な様式で発現することを意味すると理解すべきである。たとえば、10の遺伝子の発現を検出する場合、それらの遺伝子のうち少なくとも7、8または9の遺伝子が、好ましくは正常な卵丘細胞、すなわち正常な胚および生存可能な妊娠を生じることができる卵母細胞に随伴する卵丘細胞と一致するレベルで発現するであろう。

【0039】

[0050] 一般に、妊娠シグナチャーに関して、特徴的な発現レベルは少なくとも3~5、5~10、10~20、可能ならば少なくとも50~100の遺伝子についてみられ、それらは“妊娠受容能をもつ”卵母細胞を囲む卵丘細胞に特徴的なレベルで発現する。これは、分析される卵丘細胞内で遺伝子が発現するレベルおよび遺伝子発現の分布を含むものとする。

10

【0040】

[0051] “妊娠シグナチャー遺伝子”は、正常または“妊娠受容能をもつ”卵母細胞に随伴する卵丘細胞が特徴的なレベルで発現する遺伝子を表わす。これらの遺伝子は表4中に含まれ、さらにABCA6、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、KRAS、NCAM1、NDNL2、OLFML3、PTPRA、SDF4、SLC26A3およびTERF2IPからなる群から選択される14の遺伝子、ならびにそれらのオルソログ、スプライスバリエーションおよび対立遺伝子バリエーションを含む。この表中に、遺伝子はそれらの名称および寄託番号で表示される。本発明はさらにこれらの遺伝子の対立遺伝子バリエーションおよびスプライスバリエーションならびにオルソログの検出を含むことを理解すべきである。

20

【0041】

[0052] “妊娠シグナチャー遺伝子またはポリペプチドの発現を検出するのに適したプローブ”は、転写された遺伝子または対応するポリペプチドの発現を特異的に検出する核酸配列(単数または複数)またはリガンド、たとえば抗体を表わす。好ましい態様において、発現はリアルタイムPCR検出法の使用により選択される。

【0042】

[0053] “IVF”は、体外受精を表わす。

30

[0054] 用語“古典的な体外受精”または“cIVF”は、卵母細胞を体外、すなわちインビトロで精子により受精させるプロセスを表わす。IVFは、体内受精が失敗した場合の主要な受精処置である。用語“細胞質内精子注入(intracytoplasmic sperm injection)”または“ICSI”は、1個の精子を卵母細胞に直接注入する体外受精法を表わす。この方法は、雄性不妊因子を克服するために採用されるのが最も一般的であるが、それは卵母細胞に精子が容易に透過できない場合にも、また時には特に精子の供与を伴う体外受精法として採用できる。

【0043】

[0055] “透明帯”は、卵母細胞の最も外側の領域を表わす。

[0056] “差示発現遺伝子を検出するための方法”は、発現した遺伝子転写体またはコードされたポリペプチドを特異的に検出するプローブを用いて差示的遺伝子発現を定量評価するためのいずれか既知の方法を包含する。そのような方法の例には、下記のものが含まれる：インデクシング(indexing)ディファレンシャルディスプレイ逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(differential display reverse transcription polymerase chain reaction)(DDRT-PCR; Mahadeva et al, 1998, J. Mol. Biol. 284: 1391-1318; WO 94/01582; サブトラクティブmRNAハイブリダイゼーション(参照: Advanced Mol. Biol.; R.M. Twyman (1999) Bios Scientific Publishers, Oxford, p. 334、核酸アレイまたはマイクロアレイの使用(参照: Nature Genetics, 1999, vol. 21, Suppl. 1061)、および遺伝子発現の連続分析(serial analysis of gene expression)(SAGE)、たとえばValculesev et al, Science (1995) 270: 484-487を参照)、およびリアルタイムPCR

40

50

(RT-PCR)。たとえば、卵母細胞における転写遺伝子の差示的レベルは、ノーザンブロット法および/またはRT-PCRの使用により検出できる。

【0044】

[0057] 好ましい方法はCRL増幅プロトコルであり、これは本出願人の先の出願に開示した新規な全RNA増幅プロトコルであって鋳型スイッチングPCRとT7を基礎とする増幅法を組み合わせたものを表わす。このプロトコルは、数個の細胞または限定された全RNAしかない試料に好適である。

【0045】

[0058] 好ましくは“妊娠シグナチャー”遺伝子は、DNAチップ、たとえばcDNA配列を含むフィルターアレイ、またはcDNAもしくはインサイチュウ合成オリゴヌクレオチド配列を含むガラスチップへの、RNAまたはDNAのハイブリダイゼーションにより検出される。フィルター付きアレイは、一般に高存在量または中等度存在量の遺伝子用として、より良好である。DNAチップは低存在量の遺伝子を検出できる。例示態様において、ヒトゲノム由来の遺伝子またはそのサブセットを含む試料をAffymetrix GeneChipで検査することができる。

10

【0046】

[0059] あるいは、妊娠シグナチャー遺伝子によりコードされるポリペプチドまたはそれに結合する抗体を含むポリペプチドアレイを作成して検出および診断に使用できる。

[0060] “EASE”は遺伝子個体学(gene ontology)プロトコルであり、遺伝子のリストから、あるカテゴリー内にその番号のサブグループ遺伝子がみられる確率に基づいて各遺伝子に指定した機能カテゴリーに基づき、マイクロアレイ上に現われるそのカテゴリーからの遺伝子の頻度を考慮してサブグループを形成する。

20

【0047】

[0061] 以上に基づいて、本発明は、ある雌性、好ましくはヒトまたはヒト以外の哺乳動物が“妊娠受容能をもつ”卵母細胞を産生するかどうか、あるいは特定の卵母細胞が妊娠受容能をもつかどうかを検出する新規方法を提供する。この方法は、“妊娠受容能をもつ”卵母細胞に随伴する(それらを囲む)卵丘細胞が特徴的なレベルで発現する表4中の遺伝子またはABCA6、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、KRAS、NCAM1、NDNL2、OLFML3、PTPRA、SDF4、SLC26A3およびTERF2IPからなる群から選択される14の遺伝子のうち1以上の発現レベルを検出することを伴う;すなわち、これらの卵母細胞は自然または人為的手段(IVF)により受精して適切な子宮環境内へ移行した際に、その妊娠が何らかの事象または措置、たとえば外科的介入またはホルモン介入により終結されない限り、生存可能な妊娠、すなわち生存可能な胎児に発育して最終的に子孫になる胚をもたらすことができる。

30

【0048】

[0062] 本明細書中に記載するように、本発明者らは、卵丘細胞に発現する、胚の潜在性および妊娠予後のバイオマーカーである一組の遺伝子を決定した。本発明者らは、卵母細胞を囲む卵丘細胞の遺伝子発現プロファイルが種々の妊娠予後と相関することを立証し、これにより妊娠に向けて発育する卵母細胞の特異的発現シグナチャーを同定することができた。本発明者らの結果は、卵母細胞を囲む卵丘細胞の分析は卵母細胞選択のための非侵襲的方法であることを示す。

40

【0049】

[0063] 表4中の予測遺伝子のセットおよび表12において同定した14遺伝子のセットは、既知のヒト遺伝子である。しかし、(卵丘細胞における)これらの遺伝子の発現はこれまで卵母細胞の受容能または胚の発生と関連づけられていなかった。したがって本発明は、受容能をもつ卵母細胞を選択するための方法であって、卵母細胞を囲む卵丘細胞における特異的遺伝子の発現レベルを測定する段階を含み、その際、遺伝子は表4中の227の遺伝子またはABCA6、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、KRAS、NCAM1、NDNL2、OLFML3、PTPRA、SDF4、

50

S L C 2 6 A 3 および T E R F 2 I P からなる群から選択される 1 4 の遺伝子のうち少なくとも 1 つを含む方法に関する。

【 0 0 5 0 】

[0064] 本発明の方法は、さらに試料中の遺伝子の発現レベルを対照と比較することからなる段階を含み、その際、試料と対照の間の遺伝子の発現レベルの差の検出は、その卵母細胞が受容能をもつかどうかの指標となる。対照は、受容能をもつ卵母細胞に随伴する卵丘細胞を含む試料、または未受精 (unfertilized) 卵母細胞に随伴する卵丘細胞を含む試料で構成されてもよい。

【 0 0 5 1 】

[0065] 本発明の方法は、好ましくはヒト女性に適用できるが、他の哺乳動物（たとえば、霊長類、イヌ、ネコ、ブタ、ウシなど）にも適用できる。

[0066] 本発明の方法は、体外受精処置の有効性を評価するために特に適切である。したがって本発明はまた、雌性対象において管理された卵巢過剰刺激 (controlled ovarian hyperstimulation) (C O S) プロトコルの有効性を評価するための下記を含む方法に関する： i) 雌性対象から少なくとも 1 個の卵母細胞をその卵丘細胞と共に入手し； i i) 本発明の方法によりその卵母細胞が受容能をもつ卵母細胞であるかどうかを判定する。

【 0 0 5 2 】

[0067] 次いで、その方法の後に、受容能をもつ卵母細胞を発生専門医が選択し、そしてたとえば古典的な体外受精 (c I V F) プロトコルを用いて、または細胞質内精子注入 (I C S I) プロトコル下において、体外でそれらを受精させる。

【 0 0 5 3 】

[0068] 本発明の他の目的は、管理された卵巢過剰刺激 (C O S) プロトコルの有効性をモニターするための下記を含む方法に関する： i) 自然、変異または刺激サイクル下で女性から少なくとも 1 個の卵母細胞をその卵丘細胞と共に単離し； i i) 本発明の方法によりその卵母細胞が受容能をもつ卵母細胞であるかどうかを判定し； i i i) そして C O S 処置の有効性を、それにより受容能をもつ卵母細胞が生成するかどうかに基づいてモニターする。

【 0 0 5 4 】

[0069] C O S 処置は、組換え F S H または h M G に関連する G n R H アゴニストまたはアンタゴニストからなる群から選択される少なくとも 1 種類の有効成分に基づくものであってもよい。

【 0 0 5 5 】

[0070] 本発明はまた、受容能をもつ胚を選択するための方法であって、表 4 中の 2 2 7 の遺伝子または A B C A 6、D D I T 4、D U S P 1、G P R 1 3 7 B、I D U A、K C T D 5、K R A S、N C A M 1、N D N L 2、O L F M L 3、P T P R A、S D F 4、S L C 2 6 A 3 および T E R F 2 I P からなる群から選択される 1 4 の遺伝子のうち少なくとも 1 つの発現レベルを測定する段階を含む方法に関する。

【 0 0 5 6 】

[0071] 本発明の方法はさらに、試料中の遺伝子の発現レベルを対照と比較することからなる段階を含み、その際、試料と対照の間の遺伝子の発現レベルの差の検出は、その胚が受容能をもつかどうかの指標となる。対照は、生存可能な胎児を生じる胚に随伴する卵丘細胞を含む試料、または生存可能な胎児を生じない胚に随伴する卵丘細胞を含む試料で構成されてもよい。

【 0 0 5 7 】

[0072] 本発明の方法は胚の形態学的考察からの独立をもたらすことが注目される。2 つの胚が同じ形態学的観点をもつけれども本発明の方法によれば妊娠に至る着床率が異なるという可能性がある。

【 0 0 5 8 】

[0073] 本発明の方法は、好ましくはヒト女性に適用できるが、他の哺乳動物（たとえ

10

20

30

40

50

ば、霊長類、イヌ、ネコ、ブタ、ウシなど)にも適用できる。

[0074] 本発明はまた、ある胚が受容能をもつ卵母細胞であるかどうかを判定するための方法であって、胚を囲む卵丘細胞中の45の遺伝子の発現レベルを測定することを含み、その際、それらの遺伝子は表4中の227の遺伝子またはABC A6、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、KRAS、NCAM1、NDNL2、OLFML3、PTPRA、SDF4、SLC26A3およびTERF2IPからなる群から選択される14の遺伝子のうち少なくとも1つを含む方法に関する。

【0059】

[0075] 本発明はまた、ある胚が受容能をもつ胚であるかどうかを判定するための下記を含む方法に関する：i) 卵母細胞をその卵丘細胞と共に入手し；ii) その卵母細胞を体外受精させ；そしてiii) 本発明の方法により段階i)の卵母細胞が受容能をもつ卵母細胞であるかどうかを判定することにより、段階ii)から得られる胚が受容能をもつかどうかを判定する。

10

【0060】

[0076] 本発明はまた、受容能をもつ卵母細胞または受容能をもつ胚を選択するための方法であって、卵母細胞または胚を囲む卵丘細胞において、表4中の227の遺伝子のうち少なくとも1つまたはABC A6、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、KRAS、NCAM1、NDNL2、OLFML3、PTPRA、SDF4、SLC26A3およびTERF2IPからなる群から選択される14の遺伝子から選択される1以上の遺伝子の発現レベルを測定する段階を含む方法に関する。選択したこれらの遺伝子のうち1以上の異常な発現は、受容能をもたない卵母細胞または胚、着床できない不能な胚、あるいは早期胚停止が原因で受容能をもたない卵母細胞または胚を予測するのに役立つ。

20

【0061】

[0077] 本発明の方法は、雌性の妊娠予後を向上させるために特に適切である。したがって本発明はまた、雌性の妊娠予後を向上させるための下記を含む方法に関する：i) 本発明の方法を実施することにより受容能をもつ胚を選択し；iii) 段階i)で選択した胚をその雌性の子宮内に移植し、その際、雌性は卵母細胞のドナーであってもよく、そうでなくてもよい。

【0062】

30

[0078] したがって前記の方法は、発生専門医が妊娠予後の潜在性が乏しい胚を子宮に移植するのを避けるのに役立つであろう。前記の方法は、着床および妊娠を導くことができる受容能をもつ胚を選択することにより、多胎妊娠を避けるのにも特に適切である。

【0063】

[0079] 前記のすべての場合、それらの方法は、卵丘細胞および胚の遺伝子発現プロフィールと妊娠予後の関係を表わす。

[0080] 本発明の遺伝子の発現レベルを測定するための方法：

[0081] “妊娠シグナチャー”中の遺伝子、すなわち表4中の227の遺伝子のうち少なくとも1つ、またはABC A6、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、KRAS、NCAM1、NDNL2、OLFML3、PTPRA、SDF4、SLC26A3およびTERF2IPからなる群から選択される14の遺伝子のうち少なくとも1つの発現レベルの測定は、多様な手法で実施できる。一般に、測定する発現レベルは相対的発現レベルである。

40

【0064】

[0082] より好ましくは、測定は、試料を選択試薬、たとえばプローブ、プライマーまたはリガンドと接触させ、これにより試料中に最初にあった目的とするポリペプチドまたは核酸の存在を検出し、あるいは量を測定することを含む。接触は、いずれか適切な器具、たとえばプレート、マイクロタイターディッシュ、試験管、ウェル、ガラス、カラムなどにおいて実施できる。特定の態様において、接触は試薬でコートした支持体、たとえば核酸アレイまたは特異的リガンドのアレイ上で実施される。支持体は固体または半固体支

50

持体、たとえばガラス、プラスチック、ナイロン、紙、金属、ポリマーなどで構成される適切な支持体のいずれであってもよい。支持体は多様な形態およびサイズのもの、たとえばスライド、膜、ビーズ、カラム、ゲルなどであってもよい。接触は、試薬と試料の核酸またはポリペプチドとの間で形成される検出可能な複合体、たとえば核酸ハイブリッドまたは抗体-抗原複合体に適切な、いずれかの条件下で行なうことができる。

【0065】

[0083] 好ましい態様において、発現レベルはmRNAの量を測定することにより測定できる。

[0084] mRNAの量を測定するための方法は当技術分野で周知である。たとえば、試料(たとえば、患者から調製した細胞または組織)中に含有される核酸をまず標準法に従って、たとえば細胞溶解酵素または化学物質溶液を用いて抽出し、あるいは製造業者の指示に従って核酸結合樹脂により抽出する。抽出したmRNAを次いでハイブリダイゼーション(たとえば、ノーザンブロット分析)および/または増幅(たとえば、RT-PCR)により検出する。好ましくは、定量または半定量RT-PCRが好ましい。リアルタイム定量または半定量RT-PCRが特に有利である。他の増幅方法には、リガーゼ連鎖反応(ligase chain reaction)(LCR)、転写仲介増幅(transcription-mediated amplification)(TMA)、鎖置換増幅(strand displacement amplification)(SDA)および核酸配列に基づく増幅(nucleic acid sequence based amplification)(NASBA)が含まれる。

【0066】

[0085] 少なくとも10のヌクレオチドをもち、かつ本発明の目的mRNAに対して配列の相補性または相同性を示す核酸は、ハイブリダイゼーションプローブまたは増幅プライマーとして有用である。そのような核酸は同一である必要はないが、一般に匹敵するサイズの相同領域に対して少なくとも約80%同一、好ましくは少なくとも85%同一、よりさらに好ましくは95~95%同一であると理解される。特定の態様において、核酸をハイブリダイゼーションの検出のための適宜な手段、たとえば検出可能な標識と組み合わせるのことが有利である。蛍光性、放射性、酵素性、または他のリガンド(たとえば、アビジン/ビオチン)を含めた広範な適宜な指示薬が当技術分野で知られている。

【0067】

[0086] プローブは一般に、10~1000、たとえば10~800、より好ましくは15~700、一般に20~500ヌクレオチドの長さの一本鎖核酸を含む。プライマーは一般に、より短い10~25ヌクレオチドの長さの一本鎖核酸であり、増幅すべき目的核酸と完全またはほぼ完全に一致するように設計される。プローブおよびプライマーは、それらがハイブリダイズする核酸に“特異的”である；すなわち、それらは好ましくは高緊縮ハイブリダイゼーション条件(最高融解温度 T_m に相当する；たとえば50%ホルムアミド、5xまたは6xSCC。SCCは0.15M NaCl、0.015Mクエン酸Naである)下でハイブリダイズする。前記のハイブリダイゼーションおよび検出法に用いる核酸プライマーまたはプローブをキットとして組み込むことができる。そのようなキットは、コンセンサスプライマーおよび分子プローブを含む。好ましいキットは、増幅が起きたかどうかを判定するために必要な構成要素も含む。キットは、たとえばPCR緩衝液および酵素；陽性対照配列、反応制御プライマー；ならびに特異的配列を増幅および検出するための指示も含むことができる。

【0068】

[0087] 特定の態様において、本発明の方法は卵丘細胞から抽出した全RNAを用意し、それらのRNAを増幅させ、そして特異的プローブにハイブリダイズさせる段階を含む；より具体的には定量または半定量RT-PCRによる。

【0069】

[0088] 他の好ましい態様において、発現レベルをDNAチップ分析により測定する。そのようなDNAチップまたは核酸マイクロアレイは支持体に化学結合した種々の核酸プローブから構成され、支持体はマイクロチップ、ガラススライドまたはマイクロスフェア

10

20

30

40

50

サイズのビーズであってもよい。マイクロチップは、ポリマー、プラスチック、樹脂、多糖類、シリカもしくはシリカ系材料、カーボン、金属、無機ガラス、またはニトロセルロースで作成することができる。プローブは、核酸、たとえばcDNAまたはオリゴヌクレオチドを含むことができ、それらは約10～約60塩基対であってもよい。発現レベルを測定するために、被験対象からの試料を場合によりまず逆転写したものを標識し、ハイブリダイゼーション条件下でマイクロアレイと接触させて、マイクロアレイ表面に付着したプローブ配列に相補的な標的核酸との間に複合体を形成させる。標識付きのハイブリダイズした複合体を次いで検出し、定量または半定量することができる。標識化は種々の方法で、たとえば放射性標識法または蛍光標識法を用いて達成できる。マイクロアレイハイブリダイゼーション法の多数の変法を当業者は利用できる(たとえば、Hoheisel, Nature Reviews, Genetics, 2006, 7: 200-210による総説を参照)。

10

【0070】

[0089] これに関して、本発明はさらに、表4中の227の遺伝子またはABC A6、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、KRAS、NCAM1、NDNL2、OLFML3、PTPRA、SDF4、SLC26A3およびTERF2IPからなる群から選択される14の遺伝子のうち少なくとも1つに対して特異的な核酸を保有する固体支持体を含むDNAチップを提供する。

【0071】

[0090] これらの遺伝子の発現レベルを測定するための他の方法には、それらの遺伝子がコードするタンパク質の量の測定が含まれる。

20

[0091] そのような方法は、試料中に存在するマーカータンパク質と選択的に相互作用しうる結合パートナーと試料を接触させることを含む。結合パートナーは一般に抗体であり、それはポリクローナルまたはモノクローナルであってもよく、好ましくはモノクローナルである。

【0072】

[0092] タンパク質の存在は、標準的な電気泳動法および免疫診断法(イムノアッセイ法、たとえば競合、直接反応、またはサンドイッチタイプのアッセイ法を含む)を用いて検出できる。そのようなアッセイ法には下記のものが含まれるが、それらに限定されない: ウェスタンブロット法; 凝集試験; 酵素標識および仲介型のイムノアッセイ、たとえばELISA; ビオチン/アビジンタイプのアッセイ法; ラジオイムノアッセイ; 免疫電気泳動; 免疫沈降法など。これらの反応は一般に、標識、たとえば蛍光標識、化学発光標識、放射性標識、酵素標識または色素分子の解明、あるいは抗原およびそれと反応した抗体(単数または複数)の間の複合体の形成を検出するための他の方法を含む。

30

【0073】

[0093] 上記のアッセイ法は一般に、液相中の結合していないタンパク質を、抗原-抗体複合体が結合した固相支持体から分離することを伴う。本発明の実施に使用できる固体支持体には、ニトロセルロース(たとえば、膜またはマイクロタイターウェルの形のもの); ポリ塩化ビニル(たとえば、シートまたはマイクロタイターウェル); ポリスチレンラテックス(たとえば、ビーズまたはマイクロタイタープレート); ポリフッ化ビニリデン; ジアゾ化紙; ナイロン膜; 活性化ビーズ、磁気反応性ビーズなどの支持体が含まれる。より具体的にはELISA法を使用でき、その際、マイクロタイタープレートのウェルを被験タンパク質に対する抗体でコートする。次いで、マーカータンパク質を含有するかまたは含有する疑いのある生体試料を、コートされたウェルに添加する。抗体-抗原複合体が形成しうるのに十分な期間のインキュベーション後、プレート(単数または複数)を洗浄して、結合していない部分を除去し、検出可能な状態に標識した二次結合分子を添加する。二次結合分子を捕獲されているいずれかの試料マーカータンパク質と反応させ、プレートを洗浄し、そして二次結合分子の存在を当技術分野で周知の方法を用いて検出する。

40

【0074】

[0094] あるいは、免疫組織化学的(IHC)方法が好ましい場合がある。IHCは特

50

に試料または組織検体中の標的をインサイチュー検出する方法を提供する。試料の全体的な細胞統合性はIHCにおいて維持されるので、目的とする標的の存在と位置の両方を検出できる。一般に試料をホルマリンで固定し、パラフィンに包埋し、切断して染色およびその後の光学顕微鏡による検査のための切片にする。現在のIHC法は、直接標識化、または二次抗体を基礎とするかもしくはハプテンを基礎とする標識化のいずれかを用いる。既知のIHCシステムの例には、たとえばEnVision(商標)(DakoCytomation)、PowerVision(登録商標)(Immunovision,アリゾナ州スプリングデール)、NBA(商標)キット(Zymed Laboratories Inc.,カリフォルニア州サウスサンフランシスコ)、ヒストファイン(HistoFine)(登録商標)(ニチレイ社,日本東京)が含まれる。

【0075】

10

[0095] 特定の態様において、組織切片(たとえば、卵丘細胞を含む試料)を、目的遺伝子によりコードされるタンパク質に対する抗体と共にインキュベートした後、スライドまたは他の支持体上にマウントすることができる。次いで、適切な固体支持体にマウントしたこの試料の顕微鏡検査を行なうことができる。顕微鏡写真を作成するためには、試料を含む切片をガラススライドまたは他の平坦な支持体上にマウントし、選択的染色により目的タンパク質の存在を強調することができる。

【0076】

[0096] したがって、IHC試料はたとえば下記を含むことができる:(a)卵丘細胞を含む標本、(b)それらの細胞の固定および包埋、ならびに(c)それらの細胞試料中の目的タンパク質の検出。ある態様において、IHC染色法はたとえば下記の段階を含むことができる:組織の切取りおよびトリミング、固定、脱水、パラフィン浸潤、薄い切片への切断、ガラススライド上へのマウンティング、ベーキング、脱パラフィン、再水和、抗原回復(retrieval)、遮断段階、一次抗体の適用、洗浄、二次抗体(場合によっては適切な検出可能な標識に結合したもの)の適用、洗浄、対比染色、および顕微鏡検査。

20

【0077】

[0097] 本発明はまた、前記の方法を実施するためのキットに関するものであり、その際、キットは卵母細胞または胚が受容能をもつかどうかの指標となる表4中の227の遺伝子またはABC A6、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、KRAS、NCAM1、NDNL2、OLFML3、PTPRA、SDF4、SLC26A3およびTERF2IPからなる群から選択される14の遺伝子のうち少なくとも1つの発現レベルを測定するための手段を含む。

30

【0078】

[0098] 卵丘細胞における表4中の227の遺伝子および14遺伝子のセットの発現が移植に際しての卵母細胞の受容能および胚の発生と相関することを本発明者らがいかにして決定したかについての以下の記載および実施例により、本発明をさらに説明する。ただし、決してこれらの例および記載が本発明の範囲を限定するとは解釈すべきでない。

【実施例】

【0079】

[0099] これを行なった手段の例を以下に詳細に記載する。

[00100] 本発明を実施するための第1観点は、女性および潜在的に他の哺乳動物の妊娠シグナチャーを構成する遺伝子を同定することを伴い、妊娠受容能をもつかまたはもたない女性ドナーから採集した卵丘細胞における遺伝子の発現を同定および比較することにより達成された。これは、ドナー女性の種々のヒト卵母細胞から卵丘細胞を採集し、そして患者に1または2個の想定受精卵を移植することにより行なわれた。これらの患者を次いで移植の結果に基づいて、完全妊娠、部分妊娠および妊娠なしに基づき3グループに分けた。この方法に用いた卵母細胞それぞれについて、54,000以上の転写体を含むAffymetrix HG 133 Plus 2アレイを用いてその卵母細胞を囲む少なくとも1つの卵丘細胞の転写プロフィールを決定した。患者が表1に定める除外基準のいずれにも該当しない場合にのみ試験に含めた。

40

【0080】

50

表 1 : 患者の除外基準

【 0 0 8 1 】

【 表 1 】

雌性側:
年齢>35
低い卵巣保存
PCOS
>IVF サイクル2
>4cm 類線維腫の存在
BMI > 35
化学療法歴または腹部もしくは骨盤 への放射線照射歴
雄性側:
精巣生検歴
<500万の精子

10

【 0 0 8 2 】

[00101] より具体的には、卵母細胞が健全な幼児を産生する能力の予測に役立つ遺伝子シグナチャーを見出すために、本発明者らは54,000以上の転写体を含むAffymetrix HG 133 Plus 2アレイを用いて、その卵母細胞を囲む少なくとも1つの卵丘細胞のトランスクリプトームをプロファイリングした。個々の卵丘試料からの全RNAをPicoPure RNA単離キット(Molecular Devices, カリフォルニア州サニーベール)により単離した。少量のRNAをマイクロアレイ分析に必要なレベルにまで確実に一貫して増幅するのを保証する自社開発プロトコルにより試料RNAを増幅した(Kocabas, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 103, 14027-14032 (2006))。

20

【 0 0 8 3 】

[00102] 得られた増幅RNA (aRNA) をAffymetrixアレイにハイブリダイズさせた。どの胚移植も妊娠成功をもたらさなかった36の試料(不成功(No success)に関するNと表示)およびすべての移植が妊娠成功をもたらした30の試料(完全妊娠(Full success)に関するFと表示)を用いた。妊娠成功に影響を及ぼす既知の混同因子はなく、年齢またはIVFサイクル数など関連の臨床パラメーターはFとNのグループ間で有意差がなかった。

30

【 0 0 8 4 】

[00103] 品質管理(QC)パラメーターを65試料すべてについて、製造業者(Affymetrix)から無料で入手できるExpression Console(商標)(EC)ソフトウェアにより計算した。スケールングファクター(全体的チップ強度の2%調整平均(trimmed mean)を同等化するために必要な係数)、存在(present)と呼出されるプローブセットのパーセント、スパイクおよびラベリングコントロールについての3'-5'比、ならびにハウスキーピング遺伝子を含めたすべてのQCパラメーターが、すべての試料について許容範囲内であった(製造業者のガイドラインの記載に従った)。妊娠成功に影響を及ぼす既知の混同因子はなく、年齢またはIVFサイクル数など関連の臨床パラメーターはFとNのグループ間で有意差がなかった(t-検定 $p > 0.05$) (表1を参照)。許容のための追加の基準には、多嚢胞性卵巣症候群(Polycystic Ovarian Syndrome)(PCOS)が存在しないこと、化学療法歴または腹部もしくは骨盤への放射線照射歴がないこと、>4cmの壁内または粘膜下類線維腫が存在しないこと、また雄性側には、精巣生検歴がないこと、および精子数>500万であることが含まれていた。

40

【 0 0 8 5 】

[00104] 予測モデルの確実性を証明するために、FおよびN試料をトレーニングセットと検証セットにランダムに分けた。目標は、トレーニングセットに発現した予測遺伝子

50

セットを見出し、次いで予測モデルの開発に用いていない検証セットにおいてこれらの予測遺伝子の性能を検定することであった。この戦略は（すべての試料をシグナチャーの開発に用いるのとは異なり）過剰当てはめ（over-fitting）を防ぎ、予測シグナチャーの頑健性（robustness）の評価を得ることができる（Nevins, J.R. and Potti, A. (2007) Mining gene expression profiles: expression signatures as cancer phenotypes, Nat Rev Genet, 8, 601-609.）。

【 0 0 8 6 】

[00105] 表 2 に示すように、33 試料（15 F；18 N）をトレーニングセットに用い、32 試料（15 F；18 N）を検証セットに用いた。

[00106] トレーニングセットおよび検証セットに用いた試料を表 2 に示す。

【 0 0 8 7 】

表 2 . 予測の目的でトレーニングセットおよび検証セットに用いた試料

【 0 0 8 8 】

【表 2】

トレーニング		検証	
試料名	成功	試料名	成功
8_100908	F	1B_100908	F
4B_100908	F	5B_100908	F
6_092308	F	1_092308	F
6A_101408	F	3B_101408	F
1A_100908	F	12_100908	F
15_100908	F	4_100908	F
6_101408	F	37_100908	F
1A_101408	F	8_092308CHP	F
9_092308	F	4_072407	F
6A_100908	F	1b_032306	F
1_072407	F	2a_013007	F
5a_013007	F	2a_030206	F
3a_013007	F	4a_030206	F
3b_091406	F	2a_062807	F
6_072407	F	9_072407	F
1C_101408	N	5C_101408	N
4A_100908	N	2A_101408	N
10_100908	N	4C_100908	N
9_101408	N	9_100908	N
1a_092308	N	8_101408	N
4_101408	N	5B_101408	N
6_100908	N	11_101408	N
5_101408	N	3A_101408	N
9A_101408	N	6b_092308	N
1b_092308	N	7b_092308	N
5b_092308	N	7_100908	N
5C_100908	N	6_062906	N
10_062906	N	5a_030206	N
1a_030206	N	CQ1	N
CQ2	N	PE1	N
PE5	N	PM2	N
PM1	N	X4	N
X6	N		

【 0 0 8 9 】

[00107] 図 1 に、本発明者らは、全遺伝子を用いた、F および N の全試料（65 試料）、トレーニングセットの試料（33 試料）および検証セットの試料（32 試料）のクラスタリングを示す。類似度の距離（metric of similarity）としてピアソンの相関（Pear

10

20

30

40

50

son's correlation) を用いる平均連鎖法 (average linkage method) を利用し、行正規化 (row normalization) に従って、試料を階層的クラスタリング法 (hierarchical clustering) でクラスタリングする; Sneath, P. (1973) Numerical taxonomy; the principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman, San Francisco, CA USA.

【 0 0 9 0 】

[00108] クラスタリング過程で、チップ上の完全転写プロファイリング、すなわち 54 K + 転写体すべてを用いる。3 データセットすべてのクラスタリングが、妊娠成功に基づく分離がないことを指摘している。これは、発現結果を成功と関連させる表現型特異的遺伝子の同定を見出して最終的に予測遺伝子セットを同定するためには、管理下での学習分析が必要であることを示唆する。

10

【 0 0 9 1 】

[00109] 成功と関連する遺伝子を見出すために、t - 検定に基づく差次発現を示す遺伝子 (多重仮説検定のためにボンフェロニ補正 (Bonferroni correction) して $p < 0.05$) をトレーニングセット (F 対 N) において同定した。得られた “記述遺伝子 (descriptive gene)” と呼ばれる 1180 の遺伝子を用いてトレーニングセットおよび検証セットを個別にクラスタリングした (図 2)。その結果は、特にトレーニングセットにおいて N と F の試料の分離に成功したことを示す; このセットの試料は、表 4 中の妊娠シグナチャー遺伝子ならびに ABCA6、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、KRAS、NCAM1、NDNL2、OLFML3、PTPRA、SDF4、SLC26A3 および TERF2IP からなる群から選択される 14 の遺伝子を同定するために用いられたからである。

20

【 0 0 9 2 】

[00110] 次に、これらの 1180 の遺伝子を用いて 1 点排除交差検証法 (leave-one-out-cross-validation) (L1OXV) をトレーニングセットにおいて実施した。この方法では、予測遺伝子セット中の最初の遺伝子数 (複数)、たとえば P を固定する。次にトレーニングセット中の 1 試料を排除し、残りの試料を用いて N と F を識別するトップ P 個の遺伝子 (複数) を計算する。これら P 個の遺伝子 (複数) を用いて、排除される試料を N または F と予測する。この操作をトレーニングセットの 33 試料すべてについて繰り返す (一度に 1 つを排除する)。適正予測の総数をトレーニングセットにおける予測子の精度として挙げる。

30

【 0 0 9 3 】

[00111] L1OXV 過程で種々の数値の P、すなわち予測遺伝子数を試みて、良好な L1OXV 予測精度を示すものについて、これらの遺伝子を検証セットに適用する。検証セットにおいて適正に予測された試料数を検証セットにおける予測精度としてレポートする。高いトレーニング精度および検証精度が得られる最小の P、すなわち精度グラフが平坦になる P を予測遺伝子セットとしてレポートする。用いた予測アルゴリズムは、重み付き投票法 (Weighted Voting) (Golub et al., Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring, Science, 286, 531-537 (1999)、ベイズ複合共変量法 (Bayesian Compound Covariate); (Wright et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 100, 9991-9996 (1999)); 対角線形識別法 (Diagonal Linear Discriminant) (Dudoit et al., citation, 97, 77-87); 最近接重心法 (Nearest Centroid)、k - 最近接法 (k-Nearest Neighbors) (Golub et al., Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring, Science, 286, 531-537 (1999)); シュランケン重心法 (Shrunken Centroids) (Tibshirani et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 99, 6567-6572 (2002)); 支援ベクターマシン (Support Vector Machines) (Radmacher, et al., J Comput Biol, 9, 505-511 (2002))、および複合共変量法 (Compound Covariate) (Hedenfalk et al., N Engl J Med, 344, 539-548 (2001)) であった。

40

【 0 0 9 4 】

50

[00112] 本発明者らの分析では重み付き投票法が227遺伝子の予測子セットについて最良の予測を行ない、97%のL1OXV精度(32/33の適正予測)および88%(28/32適正予測)の検証セット精度を与えた。“予測遺伝子”と呼ぶこれら227の遺伝子は、フィッシャー検定(Fisher's test)を用いてトレーニングセットと検証セットの両方に関して有意($p < 0.05$)の予測結果を与えた。予測結果を表3に示す。

【0095】

[00113] 表3. トレーニングおよび検証データセットについての予測結果

【0096】

【表3】

トレーニング			検証		
試料名	真のクラス	予測クラス	試料名	真のクラス	予測クラス
1b_092308	N	N	6b_092308	N	N
5b_092308	N	N	7b_092308	N	N
1a_092308	N	N	9_100908	N	N
6_100908	N	N	4C_100908	N	N
4A_100908	N	N	7_100908	N	N
10_100908	N	N	11_101408	N	N
5C_100908	N	N	8_101408	N	N
5_101408	N	N	3A_101408	N	N
9_101408	N	N	5B_101408	N	N
9A_101408	N	N	2A_101408	N	N
4_101408	N	N	5C_101408	N	N
1C_101408	N	N	5a_030206	N	N
1a_030206	N	N	6_062906	N	N
10_062906	N	F	CQ1	N	N
CQ2	N	N	PE1	N	N
X6	N	N	PM2	N	N
PE5	N	N	X4	N	N
PM1	N	N	8_092308CHP	F	F
9_092308	F	F	1_092308	F	F
6_092308	F	F	4_100908	F	F
15_100908	F	F	12_100908	F	F
1A_100908	F	F	37_100908	F	F
8_100908	F	F	1B_100908	F	F
4B_100908	F	F	5B_100908	F	N
6A_100908	F	F	3B_101408	F	N
1A_101408	F	F	1b_032306	F	F
6_101408	F	F	2a_013007	F	F
6A_101408	F	F	2a_030206	F	N
1_072407	F	F	2a_062807	F	F
3a_013007	F	F	4_072407	F	F
3b_091406	F	F	4a_030206	F	N
5a_013007	F	F	9_072407	F	F
6_072407	F	F			

【0097】

[00114] 図3に、227の予測遺伝子リストを用いたトレーニングセットおよび検証セットのクラスタリングを示す。トレーニングセットにおいて不適正予測された試料のみはクラスタリングにおいても誤置される(misplaced)が、検証セットクラスタリングにおけるFおよびN試料の混合挙動は重み付き投票法によりなされた貢献を強調することに注目されたい。

【0098】

10

20

30

40

50

[00115] 以上に基づいて、本発明者らは、卵丘細胞におけるその発現を評価できる一組のヒト遺伝子(表4に含まれる)を同定し、その卵丘細胞に随伴する卵母細胞(または被験卵丘細胞を単離するために用いた同じドナーに由来する卵母細胞)の妊娠潜在性を評価するために、正常な卵母細胞に相関するそれらの遺伝子の発現レベル、すなわち生存可能な妊娠を生じることができる卵母細胞に随伴するものと比較した。追加試料の分析によって、その発現を卵丘細胞において評価することができる好ましい14遺伝子のセット(表12に含まれる)を同定し、その卵丘細胞に随伴する卵母細胞(または被験卵丘細胞を単離するために用いた同じドナーに由来する卵母細胞)の妊娠潜在性を評価するために、正常な卵母細胞に相関するそれらの遺伝子の発現レベル、すなわち生存可能な妊娠を生じることができる卵母細胞に随伴するものと比較した。

10

【0099】

[00116] これらの遺伝子のリストは臨床関連のものであるが、より最適な妊娠シグナチャー遺伝子セットを同定するために、これら227および14の予測遺伝子のリストを機能分析し、さらに検証して、さらに改良できると本発明者らは期待する。

【0100】

[00117] それに関して、この表4に含まれる予測遺伝子のリストおよび表12に含まれる14遺伝子のセットを改良するために使用できる下記の手法を以下に記載する。

[00118] 本発明者らはこれら227または14の予測遺伝子(PG's)に対する有意性を、2つの戦略を用いて指定する: i) クラスラベルを並べ替え(permute)、先に適用したものと同一方法を用いて最適な227遺伝子の予測子を同定し、この摂動(perturbed)データセットを用いてそれらの性能を計算する; ii) 元のデータセットを用いて、ランダムに選択した227遺伝子の予測子の性能を検定する。上記の戦略を用いて得た結果に対するPG'sの性能比較を用いて、PG'sの有意性を評価する。PG'sを改良するために、完全データセットを別のトレーニングセットと検証セットに分け、それぞれの区画(split)について最適な予測遺伝子セットを計算する。これらの予測子を相互およびPG'sと比較して、一貫して良好な予測子として現われる遺伝子からなる最終的な予測遺伝子セットを得る。次いでこの最終セットをその有意性および精度について評価する。最後に、さらにこの最終的な予測遺伝子セットを下記について分析する: i) 有意に過剰呈示された(over-represented)GOカテゴリーを見出すための遺伝子個体学(Gene Ontology)(GO)機能分類、ii) 既知の生物学的経路、遺伝子ネットワーク、疾患経路、小分子と薬物標的の相互作用における関与、iii) 共通/個別の転写調節エレメントを同定するためのプロモーター領域分析、およびmiRNA標的分析、ならびにiv) それらの局在性、分泌潜在性、およびライゲーション特性。以下において、本発明者らはこの全作業流れを詳細に説明し、それを図4にまとめる。

20

30

【0101】

[00119] 本発明者らは、ハイスループット転写プロファイリングおよびプロテオミクスデータセットの両方を用いて糖尿病、脊髄異形成症候群、慢性肝疾患、および種々の形態の癌の予測バイオマーカーを見出すのに、本明細書に定める方法を以前に適用した(参照: Aivado et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 104, 1307-1312 2007); Jones et al., Clin Cancer Res, 11, 5730-5739 (2007); Jones, et al., J Urol, 179, 730-736 (2007); Out et al. Diabetes Care, 30, 638-643 (2007); Out et al., J Biol Chem, 282, 11197-11204 (2007); Prall et al., Int J Hematol, 89, 173-187(2009); Spentzos et al., J Clin Oncol, 23, 7911-7918 (2005)、およびZinkin et al, Clin Cancer Res, 14, 470-477 (2008)。これらの研究すべてにおいてこれらのバイオマーカーは有意の予測性をもつことが認められ、この予測子セットを定めるために用いられていなかった新しいデータセットについて実験と解析の両方により独立して検証された。

40

【0102】

[00120] 予測アルゴリズム

[00121] “信号対ノイズ比”(SNR)は、遺伝子gの予測値を評価するために用いられる(Golub et al., Science, 286, 531-537 (1999).)。 $\mu_F(g)$ および $\mu_N(g)$

50

を、それぞれ F (妊娠成功) および N (妊娠失敗) 試料グループの遺伝子 g の平均値とする。同様に、 $F(g)$ および $N(g)$ を、それぞれ F および N 試料グループの遺伝子 g の標準偏差とする。 $SNR(g) = [\mu F(g) - \mu N(g)] / [F(g) + N(g)]$ と定義する。この算術式は両グループについて理想遺伝子発現ベクター付近の近隣 RM を規定し、ここで $M = |F| + |N|$ 、すなわちデータセット中の試料の総数である。SNR はいずれかのグループで著しく偏った発現を伴う遺伝子を処罰し (punish)、遺伝子のメンバーシップについての符号付きランキング法 (signed ranking method) を提供する。この場合、大きな正の数値は F グループについて良好な予測子の指標となり、大きな負の数値 (絶対値) は N グループについて良好な予測子の指標となる。本発明者らはまた、理想化発現パターンと特定遺伝子 g の間の相関性の境界を $B(g) = [\mu F(g) + \mu N(g)] / 2$ と定義する。

【0103】

[00122] この方法で、P 個の遺伝子の予測遺伝子セット $G = \{g_1, g_2, \dots, g_P\}$ 、F および N 試料のグループ、ならびに予測すべき新しい試料 S を評価する。 g_i ($1 < i < P$) の投票 (vote) を $V_i = SNR(g_i) [S(g_i) - B(g_i)]$ と定義する；ここで、 $S(g_i)$ は S 中の遺伝子 g_i の信号値を表わす。 V_i は、 $S(g_i)$ がいかに良好に F および N 試料の g_i の“挙動”に関係しているかを表わす。 V_i が正であれば g_i に基づいて S は F であると予測されると結論し、 V_i が負であれば g_i は S を N であると予測する。予測子セット中のすべての遺伝子について繰り返して、P 個の投票を求め、 V_F をすべての正の投票の和とし、 V_N をすべての負の投票の和とする。絶対値で V_F が V_N より大きければ、試料 S を F と予測する；そうでなければ、S を N と予測する。本発明者らの先の試験で、トレーニングセットを用いて頑健な予測遺伝子が得られ、これを独立した検証セットについて試験した。

【0104】

[00123] 予測遺伝子セットの有意性

[00124] 頑健な予測遺伝子セットを得るために、試料をトレーニングセットと検証セットにランダムに分ける。本発明者らは予め重み付き投票法を用いて交差検証を排除して (L1OXV)、227 の予測遺伝子のセットを得た。この分析法で、T および V を、それぞれトレーニングセットおよび検証セットに用いた F および N 試料の数とした。これに関して、トレーニンググループの試料のうち 1 つを排除し、トレーニングセット中の T - 1 F 試料および N 試料中で最大 SNR をもつ P 個の遺伝子を見出した。これら P 個の遺伝子を用いて、前記の方法により、排除した試料を F または N のいずれであるか予測する。適正予測の数がトレーニングセットに関する L1OXV 予測精度になり、最高予測精度をもつ最小の P を続いて検証セットについて試験する。本発明者らの予備試験で、P は 227 であることが見出され、その予測精度はそれぞれトレーニングセットおよび検証セットについて 97% および 88% であった。

【0105】

[00125] これら 227 の予測遺伝子の統計的有意性も評価する。これを評価するために、2 段階戦略を採用する。第 1 相では、トレーニングセットに用いた試料のクラスラベルをランダムにシャフルする；すなわち、ランダムサブセットの F 試料を N と呼び、同様にランダムサブセットの N 試料を F と呼ぶ。この摂動データセットを用いて、トレーニングセットに関して 227 の遺伝子の重み付き投票法による L1OXV 精度を計算する。この設定で、並べ替えたクラスラベルを用いて最高 SNR 値をもつ 227 の遺伝子を選択する。クラスラベル並べ替えを B 回実施し、b 回目の並べ替え L1OXV 精度を A_b とする。本発明者らの元の 227 遺伝子の予測子セットの L1OXV 精度の有意性を $p = 1 / B$ ($A_b > 97\%$) と評価し、ここで、I は指示関数であり、 $A_b > 97\%$ であれば 1、その他の場合は 0 の数値と仮定する。同様に、 A'_b を、検証セットに関して b 回目の並べ替えを用いて得た 227 遺伝子の予測精度とする。次いで、検証セットに関して本発明者らの 227 遺伝子の予測子セットの予測精度有意性を $p = 1 / B$ ($A'_b > 88\%$) と評価する。

10

20

30

40

50

【0106】

[00126] 有意性を評価するための第2相では、元のクラスラベルを維持するが、ランダムに227遺伝子のセットを取り出し、トレーニングセットに関するそれらのL1OXV精度および検証セットにおける予測精度を評価する。このランダム選択をB回実施し、AbおよびA'bを、それぞれb回目の選択についてのトレーニングセットに関するL1OXV精度および検証セットにおける予測精度とする。同様に、L1OXV精度についての有意性を $p = 1 / B \cdot I(Ab > 97\%)$ として計算し、検証セットの予測精度についての有意性を $p = 1 / B \cdot I(A'b > 88\%)$ として計算する。両相において $B = 1000$ である。

【0107】

[00127] 予測遺伝子セットのさらなる改良

[00128] 227遺伝子の予測子セットをさらに改良するために、同様にトレーニングセットおよび検証セットの種々の区画を使用し、得られる遺伝子セットの重なりを調べる。良好に規定された予測子を見出すために、改良プロセスでは本発明者らの全データセットをトレーニングセットと検証セットに半分に分けるのではなく；むしろ75%の試料をトレーニングセットに用い、25%の試料を検証セットに用いる。さらに、L1OXVの代わりに10倍交差検証戦略を適応する。この場合、トレーニングセットに関して予測子を見出す際、一度に1つの試料を排除するのではなく；代わりにトレーニングセット中の試料の総数の10%を排除する。各反復に際して残り90%の試料を用いて予測子セットを計算し、この予測子セットで、排除した10%の試料を予測する。次いで適正予測の総数を用いて予測精度を計算する。

【0108】

[00129] 各データ区画について、検証セットに関する予測精度および予測遺伝子セットの有意性を前記に従って評価する。次いで各区画で見出した予測遺伝子セットを相互に、および元の227遺伝子の予測子セットと交差させて、一貫して良好な予測子として現われる遺伝子を見出す。このために、交差検証法を用いて、全データセットに関してより改良された予測遺伝子セットを形成し、その予測精度および有意性を計算する。

【0109】

[00130] クラスタリングおよび機能分析

[00131] 算術平均付き重みなし対グループ法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic-mean) (UPGMA) (Sneath, P. (1973) Numerical taxonomy; the principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman, San Francisco, CA USA)、類似度木 (similarity tree) 構築のために用いた階層的クラスタリング (hierarchical clustering) 法、および主成分分析 (principal components analysis) (PCA) (Otu, et al., J Biol Chem, 282, 11197-11204 (2007))を用いて、試料および遺伝子のクラスタリングを実施する。階層的クラスタリング法では、平均連鎖クラスタリング (average linkage clustering) を適用する前に発現データマトリックスを各遺伝子について行正規化 (row-normalized) し、ピアソンの相関 (Pearson's correlation) を距離の尺度として用いる。元の分散を可能な限り多く維持しながら多変量データ対象物をより低次元空間内へ射影するPCAでは、各試料を平均ゼロおよび標準偏差1まで正規化する。

【0110】

[00132] 機能分析は、それ以上の調査の根拠となる目的遺伝子リスト中に遺伝子個体学 (Gene Ontology) (GO) カテゴリーを見出すことからなる (Ashburner, et al., Nat Genet, 25, 25-29 (2000))。発現分析の系統的探索法 (Expression Analysis Systematic Explorer) (EASE) は、そのセットにおいて過剰呈示され (over-represented)、したがってさらに関心もたれる可能性のある、生物学的関連カテゴリーを同定する (Hosack et al., Genome Biol, 4, R70) (2003)。

【0111】

[00133] これを達成するために、EASEは各プローブをGOカテゴリーに付随するEntrez Gene identifier (Maglott, et al., Nucleic Acids Res, 35, D26-31 (2001))に

10

20

30

40

50

マッピングする。GO Consortium (Geneontology. org)は、各遺伝子を(適用可能な場合は)3つのGOカテゴリ中の1以上のクラスに指定する:生物学的機能、細胞プロセス、および分子機能。EASEは入力遺伝子リスト中の過剰呈示されているGOカテゴリを、フィッシャー正解確率(Fisher exact probabilities)のジャックナイフ反復リサンプリング(jackknife iterative resampling)を用いて同定し、ボンフェロニ多重検定補正(Bonferroni multiple testing correction)する。“EASEスコア”はジャックナイフフィッシャー正解確率の分布の上限である。少ない数の遺伝子を含むカテゴリは標準重みに達しない(under-weighted)ので、EASEスコアはフィッシャー正解検定より頑健である。EASE分析は予測遺伝子リストをチップ上の全遺伝子に対して検定し、EASEスコアは入力リスト中のGOカテゴリの過剰呈示の尤度(likelihood)について計算される。過剰呈示は、与えられた入力リスト中に、分布がランダムであれば出現するであろうと予想されたより頻繁に現われる特定のGOカテゴリ、たとえば細胞周期、に属する遺伝子のグループを記述する。EASEスコアは有意性レベルであり、小さいEASEスコアほど過剰呈示における信頼性が増すことの指標となる。0.05以下のEASEスコアをもつGOカテゴリを有意に過剰呈示しているとして選択する。

10

【0112】

[00134] 経路分析

[00135] 経路分析、機能強化分析(functional enrichment analysis)、または遺伝子セット分析は、マイクロアレイ試験で有意に調節される前決定した遺伝子セットまたはクラスに注目する。Ingenuity Software Knowledge Base (IKB)(カリフォルニア州レッドウッドシティー)を用いて、基礎となる転写調節を最も良く説明するネットワークおよび経路を同定する。IKBは、頑健な相互作用データベースを提供する科学文献の手動管理(manual curation)に基づく、遺伝子および/または遺伝子産物間の相互作用を利用する。目的とする遺伝子リストが分析されると、結果を2方法で考察する:i)入力遺伝子リストおよび限定的な拡張を用いて形成されたネットワーク、ii)入力遺伝子のサブセットを有意に宿す既知の生物学的経路。両方の結果を、最終遺伝子ネットワークと部分的に相互作用することが知られている薬物、低分子代謝産物、機能、および疾患に関してさらに分析することができる。この方法で、本発明者らの予測遺伝子セットによって最も良く説明される経路を同定し、これらのネットワークに対するさらなる摂動を推論する。さらに、前決定した正準経路(canonical pathway)に必ずしも属さない新しい相互作用ネットワークを作成することができる。

20

30

【0113】

[00136] プロモーターおよびmiRNA標的の分析

[00137] 本発明者らの予測シグナチャー中の遺伝子の5kb上流を調べ、同定したこれらの領域を、プロモーター分析および相互作用ツール(promoter analysis and interaction tool)PAINT(Vadigepalli et al, OMICS, 7, 235-252 (2003))およびoPOSSUM(Ho Sui et al., Nucleic Acids Res, 33, 3154-3164 (2005))を用いて分析する。これらの方法は、入力遺伝子リストのプロモーター領域のモデルを作成し、これらの領域の転写調節エレメント(transcription regulatory element)(TRE)を同定する。次いでそれらの結果をTREの過剰呈示について分析し、基礎となるマイクロアレイデータに関して遺伝子調節に重要な潜在的転写因子を見出す。

40

【0114】

[00138] 予測遺伝子のもうひとつの潜在的調節機序はmiRNAによるものであり、これは主に転写後抑制またはmRNA分解によって配列特異的な様式で遺伝子発現を調節する。TargetScanS(<http://www.targetscan.org/>)を用いて、予測遺伝子についてmiRNA標的部位を同定することができる。TargetScanSはTargetscanの改良バージョンであり、UTRを2~8塩基のmiRNAに対する完全ワトソン-クリック相補セグメントについて検索し、各miRNA標的部位相互作用についてRNAevalによりフォールディング自由エネルギーGを計算し、次いで各UTRにZスコアを指定する(Lewis et al., Cell, 115, 787-798 (2003))。こうして、入力遺伝子

50

リストにおけるmiRNA標的が、miRNA結合部位のコンピューター処理により同定される。

【0115】

[00139] 分泌タンパク質および膜リガンドの予測

[00140] 細胞内でのタンパク質の局在性および輸送は、それらのアミノ酸配列中の固有のシグナルにより支配されている。本発明者らの予測遺伝子リストを、これに関してそれらがコードするタンパク質により分析することができる。タンパク質のアノテーションがその局在性、分泌ポテンシャル、ライゲーションその他の特性について情報を伝えるのに十分な場合、標的をそれ以後の試験のために単離するには手動でのフィルタリングで十分であろう。実質的なアノテーションがない場合、高精度コンピューターアルゴリズム TargetPを用いてタンパク質の上記特性を予測することができる；これは、神経回路網を利用し、タンパク質のN末端の特徴を考慮に入れる(Emanuelsson et al. Nat Protoc, 2, 953-971 (2007))。分泌タンパク質を予測する場合、タンパク質の分泌ポテンシャルを低下させる膜貫通ドメインをもつものをフィルタリングで除去することが役立つ。これらのタンパク質における膜貫通ドメインの予測は、予測のために隠れマルコフ・モデル(hidden Markov model)を用いる独立パージョンのTMHMMを用いて行なわれる(Sonhammer et al., Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol, 6, 175-182 (1998))。PSORT9に規定された方法によりこの分析を補足することもできる(Horton et al, Nucleic Acids Res, 35, W585-587 (2007))；これは、その予測戦略において、k-最近接分類法、およびギャップなし多重アラインメントから得られる重み付きマトリックスを使用する。

10

20

【0116】

[00141] 別の戦略

[00142] さらに、場合により2方法で本発明者らの分析を向上させることができる。

[00143] 信号値の計算および正規化：モデルを基礎とする方法、たとえばdChip(Li et al., Genome Biol, 2, RESEARCH0032 (2001).)およびRMA(Irizarry et al., Nucleic Acids Res, 31, e15. (2001))を用いて遺伝子チップデータを正規化および要約することができる。これらはAffymetrix MAS 5.0正規化(Hubbell et al., Bioinformatics, 18, 1585-1592. (2002))より優れていることが示されたが、本発明者らはこれらの方法の使用を避けた；それらはベースライン試料に依存し、新しい試料の追加に適応しないからである(Barash et al., Bioinformatics, 20, 839-846 (2004))。言い換えると、新しい試料をデータセットに追加するので、それ以前のモデルに基づく信号分析は無効になり、したがって完全な分析ワークフローが繰り返される。本発明者らのデータセットは絶えず増大し、以前の所見を新たに追加した試料において検証する必要があるので、本発明者らはMAS 5.0、すなわち新しい試料の追加に対して頑健な信号値計算および正規化方法を用いる。AffymetrixからのExpression Console中のProbe Logarithmic Intensity Error(PLIER)ワークフローと呼ばれる新しい方法(www.affymetrix.com)は、四分位点正規化(quintile normalization)を含み、プローブアフィニティー、経験的プローブ性能の利用によって、また低濃度および高濃度付近の誤りを適宜処理することによって、改良された信号値を提供する(Katz et al., BMC Bioinformatics, 7, 464 (2006))。PLIERは新しい試料の追加に対してMAS 5.0ほど頑健ではないが、それはモデルを基礎とする方法と比較してより良好な性能を備えており、したがって信号値計算および正規化のための本発明者らの別の戦略である。

30

40

【0117】

[00144] 予測アルゴリズム：

[00145] 本発明者らの先の試験において最良の性能をもつ予測アルゴリズムであった重み付き投票法のほかに、本発明者らの結果が本出願に述べる成功基準に一致しない場合は下記の予測アルゴリズムを試みる計画を立てる：ベイズ複合共変量法(Bayesian Compound Covariate)(Dudoit et al., Journal of the American Statistical Association, 97, 77-87 (2002))；Wright et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 100, 9991-9996 (2003)

50

)、対角線形識別法 (Diagonal Linear Discriminant)、最近接重心法 (Nearest Centroid)、 k -最近接法 (k -Nearest Neighbors) (Golub et al., Science, 286, 531-537 (1999))、シュランケン重心法 (Shrunken Centroids) (Tibshirani et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 99, 6567-6572 (2002))、支援ベクターマシン (Support Vector Machines) (Radmacher et al., J Comput Biol, 9, 505-511 (2002))、および複合共変量法 (Compound Covariate) (Hedenfalk et al., N Engl J Med, 344, 539-548 (2001))。

【0118】

[00146] $qRT-PCR$ を基礎とするTaqman (商標) Low Density Arrays (LDA)を用いる予測遺伝子セットの検証

[00147] Taqman LDA (Applied Biosystems)は、384の遺伝子をごく少量のRNAから高い適合度で同時 $qRT-PCR$ 分析できるマイクロフルイドプレート (microfluidic plate) である。単一の特注LDAを用いて2セットの遺伝子を検証する：1.) 予備マイクロアレイ試験で同定したPG'S、および2.) 本発明者らの共同研究者Dagan Wells (オックスフォード大学) が提供したセット。独立した試験で、Wellsらは卵母細胞に異数性で随伴する卵丘細胞に発現する遺伝子のセットを同定した。細胞遺伝学研究により、平均年齢32の女性において1/4の卵母細胞が異数体であることが明らかになった (Fragouli Cytogenet Genome Res; 114:30-38 (2006))。これらの遺伝子セットの両方を合わせることによって、より最適でより強力な妊娠シグナチャーを同定することができる。

【0119】

[00148] それに基づいて、本発明者らの特注LDAで処理するために先にマイクロアレイ分析を行なった65の組から25のF (完全妊娠成功) および24のN (妊娠成功なし) 卵丘細胞試料をランダムに選択する。これらのcDNA (マイクロアレイ分析から残ったもの) を調製し、ABI 7900HTマシンでLDA当たり1試料をApplied Biosystems' Taqman LDA指示に従って処理する。各転写体の絶対定量を実施する。得られた増幅データを7000 System SDSソフトウェア (Applied Biosystems) により分析し、各遺伝子の強度値を対照遺伝子に対して正規化する。

【0120】

[00149] マイクロアレイ結果との比較

[00150] スピアマンの順位相関 (Spearman's rank correlation) およびマン-ホイットニーU検定 (Mann-Whitney U test) を適用して、試料全体にわたってマイクロアレイおよびLDAにより得た各遺伝子につき発現レベルを比較する。パラメトリックモデルにおける分布仮定は2プラットフォームでは有効でない可能性があり、かつ基礎となる手法および正規化法の差のため2プラットフォーム間の信号値を比較できない可能性があるため、これらのノンパラメトリック法および順位に基づく方法を採用する。試験した遺伝子それぞれについて、LDAに用いたFとNの試料間の変化倍率も計算する。この変化の方向がマイクロアレイ結果にみられるものと一致し、2プラットフォーム間で遺伝子発現プロフィールが有意には変化しないまであり ($p > 0.05$)、相関性が高い ($r > 0.9$) ならば、これらの遺伝子を検証されたラベル付けする。LDA実験に用いた試料に対する検証された遺伝子の予測力を、LDAとマイクロアレイ両方の信号値を別個に用いて評価する。同様に、検証された遺伝子の予測精度を、マイクロアレイ信号値を用いた完全データセットを用いて評価する。これらの予測プロセスで、試料をトレーニングセットと検証セットに分け (75% - 25%の区画)、そしてトレーニングセットについてモデルを構築してそれを検証セットについて検査することにより、予測精度を計算する。この予測戦略において、前記の重み付き投票法を適用する。

【0121】

[00151] 別の戦略

[00152] 予測遺伝子がLDAプラットフォームにおいて前記のように検証されない場合、または検証された遺伝子を用いて良好な予測結果が得られない場合、予測戦略を改変し、予測遺伝子シグナチャーの頑健性を犠牲にすることによって、より高い精度および妊娠予後と良好に相関する遺伝子を得ることができる。この目的のために、元のデータセット

をトレーニングセットと検証セットに分けずに予測遺伝子シグナチャーを計算する。代わりに、完全なマイクロアレイデータセットを用いて予測子を構築し、前記に従ってその精度を計算し、その統計的有意性を評価する。この予測戦略に際して、重み付き投票法を用いて完全データセットに適用する10倍排除交差検証法 (leave-ten-fold-out cross validation) を用いる。

【0122】

[00153] 他の試料への妊娠予測子の適用

[00154] 15のF (完全妊娠成功) および15のN (妊娠成功なし) の新しい卵丘細胞試料を採集する。前記に従ってRNAを単離する。ABI's High Capacity cDNA Reverse Transcriptionキットを用いて逆転写を完了させ、特注の予備増幅プール (ABI) を用いてcDNAの増幅を完了させる。予備増幅およびqRT-PCRサイクリングは、ABI 7900HTマシーンにより、LDA当たり1試料で、Applied Biosystems' Taqman LDA指示に従って逐次行なわれる。各転写体の絶対定量を行なう。得られた増幅データを7000 System SDSソフトウェア (Applied Biosystems) により分析し、各遺伝子の強度値を対照遺伝子に対して正規化する。

10

【0123】

[00155] LDAプラットフォームにおいて検証した最終的な予測遺伝子を用いて、前向き研究における試料からなる完全データセットに関して予測モデルを構築する。次いで、後向き研究で得た信号値を用いて、このモデルを新しい試料に適用する。この予測戦略で、前記に述べた重み付き投票法を適用する。

20

【0124】

[00156] 別の戦略

[00157] 場合によっては、より厳密な信号値を得るために、後向き研究で実施した実験を繰り返すか、あるいは本発明者らの検証努力の統計的パワーを潜在的に増強するために、用いる試料数を増加してもよい。

【0125】

[00158] したがって、以上に基づいて、好ましい態様において本発明方法は、妊娠受容能をもつ卵母細胞を産生する女性対象または産生しない女性対象を、表4に含まれる差示発現する遺伝子のセットもしくは表12に含まれる14遺伝子のセットまたは対応するコードされたポリペプチドの発現レベルに基づいて同定するために用いられる。ただし本発明方法は、ヒト以外の動物、たとえばイヌ、コウモリ、ウシ、ウマを含めた他の哺乳動物、鳥類、両生類、爬虫類などにも適用できる。たとえば、本発明を用いて、すなわち表4中の妊娠シグナチャー遺伝子もしくは表12に含まれる14遺伝子のセットまたはその相補体のうち1以上の発現を調節する化合物をスクリーニングすることにより、想定雌性受精処置の研究のための動物モデルを誘導することができる。さらに本発明を用いて、妊娠受容能をもつ卵母細胞を産生する能力を排除または阻害する異常、たとえば卵巣機能障害、卵巣嚢胞、閉経前もしくは閉経状態、癌、自己免疫障害、ホルモン機能障害、細胞増殖障害、または妊娠受容能をもつ卵母細胞の発生を阻害もしくは排除する他の状態を伴う雌性対象を同定することができる。

30

【0126】

[00159] たとえば、特異的な妊娠シグナチャー遺伝子の特徴的な発現レベルで発現しない対象をスクリーニングして、それらが妊娠受容能をもつ卵母細胞を産生するのを排除する基礎健康状態を伴うかどうかを評価する。特に、そのような対象をスクリーニングして、それらが閉経の徴候を示しているかどうか、癌、自己免疫疾患または卵巣異常、たとえば卵巣嚢胞を伴うかどうか、あるいは“妊娠受容能をもつ”卵母細胞を産生するのを排除する可能性のある他の健康状態、たとえばホルモン障害、アレルギー性障害などを伴うかどうかを評価する。

40

【0127】

[00160] さらに本発明を用いて、ヒトまたはヒト以外の雌性対象における想定雌性受精処置の有効性を評価することができる。本質的に、そのような方法は下記を含むである

50

う：雌性対象、好ましくは女性を、想定妊娠増強処置により処置し、処置後に少なくとも1個の卵母細胞および随伴する周囲卵丘細胞をその女性から単離し、場合によりさらに処置前に少なくとも1個の卵母細胞および随伴する周囲細胞をその女性から単離し、単離した卵母細胞それぞれから少なくとも1個の卵丘細胞を単離し；妊娠受容能をもつ卵母細胞に随伴する（を囲む）卵丘細胞が特徴的レベルで発現するかまたは特徴的レベルで発現しない少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを検出し；その処置が、妊娠受容能をもつ卵母細胞を囲む卵丘細胞に（処置しない場合より）より特徴的なレベルで少なくとも1つの妊娠シグナチャー遺伝子を発現する卵丘細胞を生じるかどうかに基づいて、その想定受精処置の有効性を評価する。前記のように、雌性ヒト対象が好ましいが、本発明方法はヒト以外の雌性動物、たとえばヒト以外の雌性霊長類、または想定ヒト受精処置の評価のための他の適切な動物モデルにおいて、想定受精処置の有効性を評価するために使用できる。

10

【0128】

[00161] さらにまた本発明は、体外または体内受精処置の有効性を向上させるために使用できる。特に、“妊娠受容能をもたない”または未熟であることが認められた卵母細胞を、体内または体外受精の前、途中または後に、“妊娠シグナチャー”遺伝子であると同定された遺伝子がコードする1以上の遺伝子産物、たとえばホルモン、増殖因子、分化因子などを含有する培地で培養することができる。本質的にこれらの遺伝子産物の存在は、通常は“妊娠受容能をもつ”卵母細胞を囲む卵丘細胞が発現して、それらが普通は卵母細胞に栄養供給し、これによりこれらの卵母細胞が受精した際に生存可能な妊娠をもたらす能力が促進される栄養性遺伝子産物の不足を補うはずである。

20

【0129】

[00162] あるいは、それらの妊娠シグナチャー遺伝子がコードする1以上の遺伝子産物またはそれらの遺伝子の発現を調節する化合物を、妊娠受容能をもつ卵母細胞を産生しないことが本発明の方法により見出された対象に投与してもよい。そのような投与は、非経口、たとえば静脈内、筋肉内、皮下への注射によるか、あるいは経口または経皮投与によるものであってもよい。あるいは、これらの遺伝子産物を標的部位、たとえば雌性の卵巣または子宮環境に局所投与してもよい。たとえば、雌性対象の子宮または卵巣に、“妊娠シグナチャー”遺伝子がコードする1以上の遺伝子産物またはそのような遺伝子の調節剤を持続送達する薬物送達デバイスを埋め込むことができる。

30

【0130】

[00163] したがって、一般に本発明は、排卵時の卵子、好ましくはヒトの卵子に由来する卵丘細胞（好ましくは卵丘細胞）が発現する遺伝子であってその発現レベルはその卵子が自然受精または人工受精して適切な子宮環境へ移行した際に生存可能な妊娠を生じる能力と相関する遺伝子の、同一性および相対量に関する同定および特性解明を伴う。

【0131】

[00164] 1例示態様において、本発明は、卵母細胞の受容能またはある個体が受容能をもつ卵母細胞を産生するかどうかを評価する手段として前記に例示した核酸またはタンパク質の既知の検査法を用いて、卵丘細胞による表4中のいずれかの組み合わせ、すなわち少なくとも1、2、3、4、5、6、10、50、...100、200...227の遺伝子、または表12中の14のいずれかの組み合わせの遺伝子の発現を、正常な卵丘細胞が発現するレベルと比較してアッセイする。

40

【0132】

[00165] ただし、例示態様における本発明は表4中の遺伝子および表12の遺伝子のいずれかの組み合わせを選択するが、好ましい態様において本発明は、表12中の少なくとも2つの遺伝子、より好ましくは少なくとも3つ、およびこれらの遺伝子14すべての発現を、卵母細胞の受容能を評価する手段としてアッセイする。さらに本発明方法は、あるいは、差示発現する卵丘細胞が発現する表4および表12中のものから選択される1以上の遺伝子であってそれらの発現が卵母細胞の受容能と相関する遺伝子の発現レベルを、その発現が同様に予測に役立つことが認められた他の遺伝子と共にモニターすることにより実施できる。

50

【 0 1 3 3 】

[00166] 表 4 : ヒト卵丘細胞が差示発現する、妊娠受容能に関連するヒト遺伝子

【 0 1 3 4 】

【表 4 - 1】

遺伝子名	遺伝子記号	代表的な 公開 ID	Entrez 遺伝子	変化倍率 (E/N)
クラウディン 1	CLDN1	AF101051	9076	5.413001
CDNA FLJ20134 fis, クローン COL06604	---	AK000141	---	1.622237
CDNA FLJ31010 fis, クローン HLUNG2000174	---	AK055572	---	1.616133
カルシウム/カルモジュリン 依存性プロテインキナーゼ II インヒビター 1	CAMK2N1	AW162846	55450	1.555865
仮説タンパク質 DKFZp547J222	DKFZp547J222	AL512720	84237	1.486741
シンタキシン 11	STX11	AF071504	8676	1.478423
染色体 1 オープン リーディングフレーム 180	C1orf180	AK092806	439927	1.447737
CDNA FLJ36648 fis, クローン UTERU1000138	---	R08650	---	1.446137
シヌクレイン, ベータ	SNCB	NM_003085	6620	1.439097

10

20

【 0 1 3 5 】

【表 4 - 2】

染色体 15 オープン リーディングフレーム 41	C15orf41	AK026504	84529	1.411212
多重 EGF-様-ドメイン 11	MEGF11	AL834326	84465	1.404959
DNA-損傷誘導性転写体 4	DDIT4	NM_019058	54541	1.390497
トランスフォーミング 増殖因子, ベータ 2	TGFB2	M19154	7042	1.390203
CD22 分子	CD22	X59350	933	1.366033
転写遺伝子座	---	AL080072	---	1.363304
プロテインチロシンホス ファターゼ, 受容体タイプ, M	PTPRM	BC029442	5797	1.348507
---	---	NM_025062	---	1.336922
仮説タンパク質 LOC100128822	LOC100128822	AW952781	1E+08	1.330737
DTW ドメイン含有 1	DTWD1	AW977964	56986	1.307044
二重特異性 ホスファターゼ 1	DUSP1	AA530892	1843	1.2986
三部分モチーフ含有 10	TRIM10	X90539	10107	1.295834
Gタンパク質共役型受容体 137B	GPR137B	NM_003272	7107	1.287113
レチキュロン 4 受容体様 2	RTN4RL2	AI240883	349667	1.27649
CDNA クローン IMAGE:3946787	---	BC009873	---	1.239883
グルタミン酸受容体 メタボトロピック 5	GRM5	D60132	2915	1.234105
三部分モチーフ含有 4	TRIM4	BE501464	89122	1.233475
転写遺伝子座	---	AW271932	---	1.233033
転写遺伝子座	---	AI808830	---	1.232386
プロモドメイン及びWD 反復ドメイン含有 1	BRWD1	AI638279	54014	1.227435
転写遺伝子座	---	AI821085	---	1.22535
転写遺伝子座	---	AI659426	---	1.225214
RAD9 ホモログ B (S. cerevisiae)	RAD9B	NM_152442	144715	1.219942
シアリダーゼ 2 (細胞管ノル シアリダーゼ)	NEU2	NM_005383	4759	1.218876
ネクディン様 2	NDNL2	AA627644	56160	1.21764

10

20

30

40

【 0 1 3 6 】

【表 4 - 3】

CDNA FLJ11975 fis, クローン HEMBB1001249	---	AK022037	---	1.214013
線維芽細胞増殖因子 12	FGF12	AL119322	2257	1.204025
COBL- 様 1	COBLL1	NM_014900	22837	1.194374
シンプレキン	SYMPK	Y10931	8189	1.193895
Wilms 腫瘍1関連 タンパク質	WTAP	NM_004906	9589	1.190418
転写遺伝子座	---	AA251561	---	1.189774
テナスシン XB	TNXB	NM_019105	7148	1.188202
アンギオポエチン様2	ANGPTL2	NM_012098	23452	1.185842
CDNA FLJ36107 fis, clone TESTI2021819	---	AW629387	---	1.183773
CDNA FLJ36457 fis, クローン THYMU2014500	---	H23431	---	1.183173
カリウムチャンネル 四量体化ドメイン含有5	KCTD5	AA872593	54442	1.179654
---	---	AV650953	---	1.175211
転写遺伝子座	---	AI732331	---	1.17038
仮説タンパク質 LOC339978	LOC339978	BC043566	339978	1.168337
CTAGE ファミリー, メンバー5	CTAGE5	NM_005930	4253	1.164094
Rap グアニンヌクレオチド 交換因子 (GEF) 1	RAPGEF1	NM_005312	2889	1.160436
コリン受容体, ニコチン性, アルファ 3	CHRNA3	BC006114	1136	1.158333
MOCO スルフラゼ C末端ドメイン含有2	MOSC2	NM_017898	54996	1.156247
ケラチン関連タンパク質 3-3 /// 仮説タンパク質 LOC100132276	KRTAP3-3 /// LOC100132276	AJ406933	1001322 76 /// 85293	1.155302
貫膜プロテイン9	TMEM9	AF151020	252839	1.151528
KIAA0467	KIAA0467	AB007936	23334	1.140189
活性化転写因子6	ATF6	NM_007348	22926	1.139882
ジンクフィンガー プロテイン404	ZNF404	AA084273	342908	1.138368
ジャンクトフィリン3	JPH3	AI680727	57338	1.138319

10

20

30

40

【 0 1 3 7 】

【表 4 - 4】

コイルドコイル及び C2 ドメイン含有 2A	CC2D2A	BE893129	57545	1.136331
嗅覚受容体, ファミリー1, サブファミリーA, メンバー2	OR1A2	NM_012352	26189	1.131217
配列類似性をもつファミリー 90, メンバーA1	FAM90A1	NM_018088	55138	1.130777
染色体4 オープン リーディングフレーム 42	C4orf42	AL390154	92070	1.129559
ヌクレオポリン(GYLZ- RCC18) mRNA, GYLZ- RCC18-NUP2 対立遺伝子	---	AY064415	---	1.127627
仮説タンパク質 LOC729178	LOC729178	BC035182	729178	1.12651
転写遺伝子座	---	AI288796	---	1.124611
ジンクフィンガー プロテイン79	ZNF79	X65232	7633	1.124606
インターロイキン1 ファミリーメンバー8(イータ)	IL1F8	NM_014438	27177	1.124428
KATプロテイン/// 仮説タンパク質 LOC100134860	hCG_20857 /// RP11- 544M22.4	AI814545	1001311 87 /// 1001348 60	1.121303
仮説タンパク質 LOC285370	LOC285370	AI357576	285370	1.120968
染色体1 オープン リーディングフレーム 74	C1orf74	AW295407	148304	1.120949
CD2 (細胞質テイル) 結合タンパク質2	CD2BP2	NM_006110	10421	1.120897
異種核リボ核タンパク質 R	HNRNPR	BC001449	10236	1.112295
Na ⁺ /H ⁺ 交換ドメイン 含有 2	NHEDC2	BF433180	133308	1.112154
SH2 ドメイン含有 4B	SH2D4B	AK091518	387694	1.109436
溶質輸送体ファミリー4, 炭酸水素ナトリウム 共輸送体, メンバー5	SLC4A5	AF453528	57835	1.109098
ヘアリー アンド エンハンサー オブスプリット7(Drosophila)	HES7	AB049064	84667	1.105084
セリン/トレオニン キナーゼ 35	STK35	AW292935	140901	1.102551
アリスタレス様 ホメオボックス 4	ALX4	NM_021926	60529	1.102434
核受容体サブファミリー2, グループF, メンバー6	NR2F6	BF000629	2063	1.102388
テロメア反復結合因子2, 相互作用タンパク質	TERF2IP	NM_018975	54386	1.102095
貫膜タンパク質 87A	TMEM87A	BC005335	25963	1.097199
ジヒドロピリミジン デヒドロゲナーゼ	DPYD	BC008379	1806	1.09698

10

20

30

40

【 0 1 3 8 】

【表 4 - 5】

HEAT 反復含有 3	HEATR3	BC033077	55027	1.096173
CDNA FLJ39333 fis, クローン OCBBF2017306	---	AK025002	---	1.089562
ジンクフィンガー プロテイン 132	ZNF132	NM_003433	7691	1.088678
カリウム電位ゲート チャンネル, シェーカー関連 サブファミリー, メンバー6	KCNA6	NM_002235	3742	1.08425
Meis ホメオボックス 2	MEIS2	NM_020149	4212	1.080438
カルシウム調節型熱安定 タンパク質 1, 24kDa	CARHSP1	NM_014316	23589	1.077448
sparc/オステオネクチン, cwcv 及び kazal 様ドメインプロテオ グリカン(テストイカン)2	SPOCK2	AI952009	9806	1.076532
仮説 LOC642757	FLJ32756	BC041833	642757	1.075501
溶質輸送体ファミリー2 (促進型グルコース輸送体), メンバー9	SLC2A9	NM_020041	56606	1.069368
染色体3 オープン リーディングフレーム 62	C3orf62	BC032616	375341	1.067068
線維芽細胞増殖因子 12	FGF12	NM_004113	2257	1.066428
ジンクフィンガー及びBTB ドメイン含有 47	ZBTB47	AL133062	92999	1.065563
CDNA クローン IMAGE:5294477	---	BC031274	---	1.065299
染色体8 オープン リーディングフレーム 31	C8orf31	NM_173687	286122	1.064842
コーディン	CHRD	AF209929	8646	1.06252
仮説タンパク質 LOC284865	LOC284865	AK092552	284865	1.060695
免疫グロブリンラムダ ジョイニング 3	IGL@	D87016	3535	1.057531
CDNA FLJ13557 fis, clone PLACE1007737	---	AU157438	---	1.056414
フィブロネクチンタイプ III 及びSPRYドメイン含有 1 様	FSD1L	AI970348	83856	1.0517
シグナル調節タンパク質 デルタ	SIRPD	AL049634	128646	1.046758
転写遺伝子座	---	AI732305	---	1.043952
ヘモグロビン, イプシロン 1	HBE1	AA115963	3046	1.043912
---	---	AI969784	---	1.043734
RUN ドメイン含有 3A	RUNDC3A	NM_006695	10900	1.036916

10

20

30

40

【 0 1 3 9 】

【表 4 - 6】

転写遺伝子座, 強く類似: NP_060631.2 NAD シンセターゼ 1 [Homo sapiens]	---	BC015237	---	1.036842
ジンクフィンガー, SWIM タイプ含有 4	ZSWIM4	AK024452	65249	1.032107
キラー細胞 免疫グロブリン様受容体, 2ドメイン, 長い細胞質テイル, 4	KIR2DL4	NM_002255	3805	1.031994
ATPase, アミノリン脂質id 輸送体 (APLT) クラス I, タイプ 8A, メンバー 1	ATP8A1	BC020943	10396	1.029996
染色体 9 オープン リーディングフレーム 44	C9orf44	BF591554	158314	1.028594
アラキドン酸 15- リボキシゲナーゼ, タイプ B	ALOX15B	AF468053	247	1.02354
菱形, veinlet 様 2 (Drosophila)	RHBDL2	NM_017821	54933	1.016638
仮説 LOC255031	FLJ35390	BC024303	255031	1.015271
ケラチン 6A /// ケラチン 6B /// ケラチン 6C	KRT6A /// KRT6B /// KRT6C	AL569511	286887 /// 3853 /// 3854	1.014761
仮説タンパク質 MGC3196	MGC3196	AI760124	79064	1.014488
配列類似性をもつ ファミリー 36, メンバー A	FAM36A	AV694386	116228	1.0105
MRNA; cDNA DKFZp434A2111(クローン DKFZp434A2由来)	---	AL137596	---	1.005173
二重特異性 ホスファターゼ 12	DUSP12	NM_007240	11266	-1.00293
仮説遺伝子 AK056507 により支持	FLJ31945	AI911996	440137	-1.01104
CDNA FLJ36291 fis, クローン THYMU2004003	---	AK093610	---	-1.01273
CDNA FLJ11818 fis, クローン HEMBA1006424	---	AK021880	---	-1.01378
溶質輸送体ファミリー 26, メンバー 3	SLC26A3	NM_000111	1811	-1.01479
イズロニダーゼ, アルファ- γ	IDUA	AI762782	3425	-1.02249
CDNA クローン IMAGE:3920493	---	BC016176	---	-1.02256
RIB43A ドメイン コイルドコイル付き 1	RIBC1	NM_144968	158787	-1.02633
DET1 及び DDB1 関連 1	DDA1	AB046843	79016	-1.02796

【 0 1 4 0 】

10

20

30

40

【表 4 - 7】

---	---	AW242763	---	-1.02872
ニネイン(GSK3B相互作用タンパク質)	NIN	AF223937	51199	-1.03046
CDNA FLJ11662 fis, クローン HEMBA1004629	---	AU145365	---	-1.03369
---	---	AL833072	---	-1.03543
転写遺伝子座	---	AI760944	---	-1.03574
ATリッチ相互作用ドメイン 1B (SWI1-様)	ARID1B	Y08266	57492	-1.03865
仮説タンパク質 LOC100129792	LOC100129792	BF432331	1E+08	-1.0404
DiGeorge症候群 決定領域遺伝子 6 /// DiGeorge症候群 決定領域遺伝子 6 様 ...	DGCR6 /// DGCR6L	NM 005675	8214 /// 85359	-1.04304
ユビキチンタンパク質リガーゼ E3A(ヒトパピローマ ウイルスE6関連 タンパク質, Angelman 症候群)	UBE3A	AF037219	7337	-1.04342
溶質輸送体ファミリー12 (塩化カリウム輸送体), メンバー5	SLC12A5	AF208159	57468	-1.04431
膜会合リングフィンガー (C3HC4) 11	MARCH11	AA383208	441061	-1.05134
---	---	AW984341	---	-1.05212
仮説タンパク質 LOC338579	LOC338579	BC031237	338579	-1.05648
Homo sapiens, クローン IMAGE:5575984, mRNA	---	BC035649	---	-1.05814
ペンタトリコペプチド 反復ドメイン1	PTCD1	AB014532	26024	-1.06376
全長挿入 cDNA クローン ZD58F01	---	AF088044	---	-1.06778
仮説タンパク質 LOC284352	LOC284352	AC005757	284352	-1.06893
---	---	AU150926	---	-1.07019
JTV1遺伝子	JTV1	AF116615	7965	-1.07128
仮説タンパク質 LOC100132891	LOC100132891	AI948599	1E+08	-1.07645
シトクロムP450, ファミリー4, サブファミリー-F, ポリペプチド 2	CYP4F2	D26480	8529	-1.07856
HCG1732469	hCG_1732469	NM 017624	729164	-1.07929

10

20

30

40

【 0 1 4 1 】

【表 4 - 8】

CDNA FLJ12204 fis, クローン MAMMA1000921	---	AK022266	---	-1.08062
プロメラニン濃縮ホルモン	PMCH	NM_002674	5367	-1.08286
転写遺伝子座	---	BE220224	---	-1.08358
ジヒドロ葉酸レダクターゼ	DHFR	AI144299	1719	-1.0836
CDNA FLJ35054 fis, クローン OCBBF2018380	---	BF678148	---	-1.08411
Homo sapiens, クローン IMAGE:5171167, mRNA	---	BC043545	---	-1.0845
CDNA クローン IMAGE:5311357	---	BC042007	---	-1.08983
---	---	BE327552	---	-1.09536
脂質蓄積滴タンパク質 5	LSDP5	BC033570	440503	-1.09813
転写遺伝子座	---	AI288679	---	-1.09816
ムチン	---	BF476613	---	-1.09898
---	---	AJ242956	---	-1.10143
ピリン及びHINドメイン ファミリー, メンバー1	PYHIN1	AI827431	149628	-1.1053
類似: hCG2038397	LOC100130264	AK097497	1E+08	-1.10606
KIAA1305	KIAA1305	NM_025081	57523	-1.10626
転写遺伝子座	---	AI668649	---	-1.10773
MRNA; cDNA DKFZp761B0218(クローン DKFZp761B0218由来)	---	AL831948	---	-1.10859
P143	---	AF334792	---	-1.10946
---	---	AK000293	---	-1.11212
転写遺伝子座	---	BF432946	---	-1.11417
タビーホモログ(マウス)	TUB	AK022297	7275	-1.11822
転写遺伝子座	---	AI023133	---	-1.12015
ATP シンターゼ, H ⁺ 輸送, ミトコンドリア F0 複合体, サブユニット E	ATP5I	NM_007100	521	-1.12194
CDNA クローン IMAGE:4861280	---	BC015784	---	-1.1287
転写遺伝子座, 強く類似:	---	AI912965	---	-1.13484

10

20

30

40

【 0 1 4 2 】

【表 4 - 9】

XP_001102524.1 推定:類似: 嗅覚受容体 2I1 [Macaca mulatta]				
骨格付着因子B	SAFB	AI761858	6294	-1.13835
貫膜タンパク質 183A /// 貫膜タンパク質 183B	TMEM183A /// TMEM183B	AF070537	653659 /// 92703	-1.14637
CDNA FLJ33813 fis, クローン CTONG2002744	---	AW376955	---	-1.14739
転写遺伝子座, 弱く類似: XP_524364.2 推定:ジンクフィンガータン パク質 649 [Pan troglodytes]	---	AA861192	---	-1.14786
溶質輸送体ファミリー6 (神経伝達物質輸送体, GABA), メンバー1	SLC6A1	AI003579	6529	-1.14947
チューブリン チロシンリガーゼ	TTL	BG115434	150465	-1.1509
転写遺伝子座	---	AW015319	---	-1.15215
---	---	AK026890	---	-1.16401
仮説タンパク質 LOC338667	LOC338667	BC043578	338667	-1.16948
CDNA FLJ25946 fis, クローン JTH14258	---	AK098812	---	-1.1715
転写遺伝子座	---	BE889628	---	-1.17156
GLB2 遺伝子, 上流調節領域	---	AF091526	---	-1.17286
FK506結合タンパク質8, 38kDa	FKBP8	L37033	23770	-1.17332
ST8 アルファ-N-アシル ノイラミニドアルファ-2,8- シアリルトランスフェラーゼ3	ST8SIA3	NM_015879	51046	-1.17723
染色体1オープン リーディングフレーム116	Clorf116	NM_024115	79098	-1.20692
脂肪酸結合タンパク質7, 脳	FABP7	AL512688	2173	-1.22273
転写遺伝子座	---	AI990286	---	-1.22525
サイトカインシグナル伝達 サブレッサー1	SOCS1	AA877218	8651	-1.22717
CDC14 細胞分裂サイクル 14 ホモログB (S. cerevisiae) /// CDC14 細胞 分裂サイクル14 ホモログ	CDC14B /// CDC14C /// LOC100131447	NM_152627	1001314 47 /// 168448 /// 8555	-1.23322

10

20

30

40

【 0 1 4 3 】

【表4 - 10】

C (<i>S. cerevisiae</i>) /// 仮説 LOC100131447				
転写遺伝子座	---	BE222041	---	-1.23323
RUN及びSH3 ドメイン含有1	RUSC1	NM 014328	23623	-1.24197
染色体16オープン リーディングフレーム72	C16orf72	BG495327	29035	-1.24528
C-タイプ-レクチン様1	CLECL1	BC042176	160365	-1.26061
アルギナーゼ, タイプII	ARG2	NM 001172	384	-1.26369
眼不在ホモログ3 (<i>Drosophila</i>)	EYA3	BC041667	2140	-1.26724
アクアポリン3(G111血液 グループ)	AQP3	N74607	360	-1.27083
cDNA FLJ39819 fis, クローン SPLEN2010534	---	BM676963	---	-1.27232
Gタンパク質共役型受容体 110	GPR110	AA746038	266977	-1.27246
イノシトール 1,4,5- 三リン酸 3-キナーゼB	ITPKB	NM 002221	3707	-1.27508
類似:発生多分化能関連5; 胚性幹細胞特異的遺伝子1	LOC341912	AF111167	341912	-1.27998
カルシウムチャンネル, 電位依存性, アルファ2/デルタ サブユニット2	CACNA2D2	NM 006030	9254	-1.28016
---	---	AF361491	---	-1.28916
CXXCフィンガー4	CXXC4	R41728	80319	-1.29067
仮説遺伝子 AK123662により支持	LOC388692	AA713827	388692	-1.30283
---	---	AI191591	---	-1.31547
cDNA FLJ33029 fis, クローン THYMU2000162	---	AW954539	---	-1.31899
仮説遺伝子 BC040060により支持	LOC387895	AI138766	387895	-1.32544
仮説タンパク質 FLJ39743	FLJ39743	AK097062	283777	-1.33788
CCR4-NOT 転写複合体, サブユニット6様	CNOT6L	NM 144571	246175	-1.34995
コイルドコイルドメイン 含有 64B	CCDC64B	AW139399	146439	-1.35553
ヌクレオポリン 133kDa	NUP133	AU146738	55746	-1.36092
転写遺伝子座	---	AL832727	---	-1.37903

10

20

30

40

【0144】

【表 4 - 1 1】

プレ-B 細胞性白血病 ホメオボックス 4	PBX4	AJ300182	80714	-1.39029
ジンクフィンガー タンパク質 93	ZNF93	NM_031218	81931	-1.39104
unc-93 ホモログ A (C. elegans)	UNC93A	AL021331	54346	-1.39988
コロニン, アクチン結合 タンパク質, 1B	CORO1B	AI341234	57175	-1.40703
仮説タンパク質 FLJ37396	FLJ37396	NM_173671	285754	-1.45559
染色体 14 オープン, リーディングフレーム 166B	C14orf166B	AF111169	145497	-1.45812
仮説タンパク質 BC009862	LOC90113	BC001200	90113	-1.4584
仮説タンパク質 LOC284926	LOC284926	BG828817	284926	-1.49174
転写遺伝子座	---	AI565624	---	-1.56866
ロイシンリッチ, リピート含有 3B	LRR3B	AW027879	116135	-1.61032
仮説遺伝子座 LOC401237	FLJ22536	H14782	401237	-1.70566

(S. cerevisiae) サッカロミセス・セレビスエ, (Drosophila) ショウジョウバエ
[Homo sapiens] ヒト, [Macaca mulatta] アカゲザル
[Pan troglodytes] コモンチンパンジー, (C. elegans) シー・エレガンス (線虫)

【 0 1 4 5 】

表 5 : 差示発現データを検証するために用いたヒト遺伝子

【 0 1 4 6 】

【表 5 - 1】

差示発現マイクロアレイデータ
結果の検証に用いた遺伝子

遺伝子記号	TLDA アッセイ ID
<u>CLDN1</u>	Hs01076359_m1
<u>PDE7B</u>	Hs01054008_m1
<u>CAMK2N1</u>	Hs00218591_m1
<u>DKFZp547J222</u>	Hs00298862_s1
<u>C1orf180</u>	Hs03026345_u1
<u>SNCB</u>	Hs00608185_m1
<u>C15orf41</u>	Hs01029993_m1
<u>MEGF11</u>	Hs00260981_m1
<u>DDIT4</u>	Hs01111686_g1
<u>TGFB2</u>	Hs00234244_m1
<u>MAG</u>	Hs01114387_m1

【 0 1 4 7 】

【表 5 - 2】

<u>PTPRM</u>	<u>Hs00267809 m1</u>
<u>DTWD1</u>	<u>Hs00737889 m1</u>
<u>DUSP1</u>	<u>Hs00610257 g1</u>
<u>TRIM10</u>	<u>Hs00232497 m1</u>
<u>GPR137B</u>	<u>Hs00162803 m1</u>
<u>RTN4RL2</u>	<u>Hs00604888 m1</u>
<u>PPP1R15B</u>	<u>Hs00262481 m1</u>
<u>GRM5</u>	<u>Hs00168275 m1</u>
<u>TRIM4</u>	<u>Hs00263522 m1</u>
<u>BRWD1</u>	<u>Hs00219111 m1</u>
<u>RAD9B</u>	<u>Hs00332650 m1</u>
<u>NEU2</u>	<u>Hs00193573 m1</u>
<u>NDNL2</u>	<u>Hs00328952 s1</u>
<u>FGF12</u>	<u>Hs00374427 m1</u>
<u>COBLL1</u>	<u>Hs00208564 m1</u>
<u>SYMPK</u>	<u>Hs00191361 m1</u>
<u>WTAP</u>	<u>Hs00374488 m1</u>
<u>TNXB</u>	<u>Hs00372889 g1</u>
<u>ANGPTL2</u>	<u>Hs00765775 m1</u>
<u>KCTD5</u>	<u>Hs00368026 m1</u>
<u>ATP8A1</u>	<u>Hs00323527 m1</u>
<u>RAPGEF1</u>	<u>Hs00178409 m1</u>
<u>CHRNA3</u>	<u>Hs01095115 m1</u>
<u>MOSC2</u>	<u>Hs00215486 m1</u>
<u>KRTAP3-3</u>	<u>Hs00953462 s1</u>
<u>TMEM9</u>	<u>Hs00212825 m1</u>
<u>KIAA0467</u>	<u>Hs00390302 m1</u>
<u>ATF6</u>	<u>Hs00232586 m1</u>
<u>JPH3</u>	<u>Hs00221053 m1</u>
<u>OR1A2</u>	<u>Hs00360084 s1</u>
<u>FAM90A1</u>	<u>Hs00216400 m1</u>
<u>C4orf42</u>	<u>Hs00364580 s1</u>
<u>LOC729178</u>	<u>Hs01384704 m1</u>
<u>ZNF79</u>	<u>Hs00287927 m1</u>
<u>IL1F8</u>	<u>Hs00758166 m1</u>
<u>F11R</u>	<u>Hs00375889 m1</u>

10

20

30

40

【 0 1 4 8 】

【表 5 - 3】

<u>C1orf74</u>	<u>Hs00331881 m1</u>
<u>CD2BP2</u>	<u>Hs00272036 m1</u>
<u>HNRNPR</u>	<u>Hs00195167 m1</u>
<u>NHEDC2</u>	<u>Hs00604979 m1</u>
<u>SH2D4B</u>	<u>Hs02575381_s1</u>
<u>SLC4A5</u>	<u>Hs01121579 m1</u>
<u>HES7</u>	<u>Hs00261517 m1</u>
<u>STK35</u>	<u>Hs00369871 m1</u>
<u>ALX4</u>	<u>Hs00222494 m1</u>
<u>NR2F6</u>	<u>Hs00172870 m1</u>
<u>TERF2IP</u>	<u>Hs00430292 m1</u>
<u>TMEM87A</u>	<u>Hs01064936_m1</u>
<u>DPYD</u>	<u>Hs02510591 s1</u>
<u>ARRDC1</u>	<u>Hs00326522 m1</u>
<u>ZNF132</u>	<u>Hs01036387 m1</u>
<u>KCNA6</u>	<u>Hs00266903 s1</u>
<u>CARHSP1</u>	<u>Hs00183933 m1</u>
<u>SPOCK2</u>	<u>Hs00360339 m1</u>
<u>TBC1D22A</u>	<u>Hs00378709 m1</u>
<u>SLC2A9</u>	<u>Hs00417125 m1</u>
<u>C3orf62</u>	<u>Hs00737144 m1</u>
<u>ZBTB47</u>	<u>Hs00378996 m1</u>
<u>C8orf31</u>	<u>Hs00543617 m1</u>
<u>CHRD</u>	<u>Hs01000656_g1</u>
<u>LOC284865</u>	<u>Hs01376340_m1</u>
<u>FSD1L</u>	<u>Hs00736434 m1</u>
<u>SIRPD</u>	<u>Hs00988049 m1</u>
<u>MTUS1</u>	<u>Hs00826834 m1</u>
<u>HBE1</u>	<u>Hs00362216 m1</u>
<u>EHD4</u>	<u>Hs00248124 m1</u>
<u>RUNDC3A</u>	<u>Hs00198594 m1</u>
<u>ZSWIM4</u>	<u>Hs00397653 m1</u>
<u>KIR2DL4</u>	<u>Hs00427106 m1</u>
<u>ALOX15B</u>	<u>Hs00153988 m1</u>
<u>RHBDL2</u>	<u>Hs00384848 m1</u>
<u>KRT6A</u>	<u>Hs01699178_g1</u>

10

20

30

40

【 0 1 4 9 】

【表 5 - 4】

<u>FAM36A</u>	Hs00831105 s1
<u>DUSP12</u>	Hs00170898 m1
<u>SLC26A3</u>	Hs00995363 m1
<u>IDUA</u>	Hs00164940 m1
<u>RIBC1</u>	Hs00330280 m1
<u>DDA1</u>	Hs00610984 m1
<u>NIN</u>	Hs00794913 m1
<u>FOXP1</u>	Hs00415004 m1
<u>ARID1B</u>	Hs00368175 m1
<u>DGCR6</u>	Hs00606390 mH
<u>UBE3A</u>	Hs00166580 m1
<u>SLC12A5</u>	Hs01110928 m1
<u>PTCD1</u>	Hs00248918 m1
<u>MVK</u>	Hs00176077 m1
<u>CYP4F2</u>	Hs00426608 m1
<u>PMCH</u>	Hs00173595 m1
<u>CTTNBP2</u>	Hs00364312 m1
<u>DHFR</u>	Hs00758822 s1
<u>LSDP5</u>	Hs00965990 m1
<u>PYHIN1</u>	Hs00378651 m1
<u>LOC100130264</u>	Hs01382384 m1
<u>KIAA1305</u>	Hs00830469 s1
<u>BARD1</u>	Hs00184427 m1
<u>PDSS2</u>	Hs00220614 m1
<u>TUB</u>	Hs00163231 m1
<u>ATP5I</u>	Hs00273015 m1
<u>SAFB</u>	Hs00161495 m1
<u>TMEM183A</u>	Hs02577166 g1
<u>SESN3</u>	Hs00376220 m1
<u>SLC6A1</u>	Hs01104469 m1
<u>TTL</u>	Hs00542266 m1
<u>ERAP2</u>	Hs01073631 m1
<u>FKBP8</u>	Hs00273319 m1
<u>ST8SIA3</u>	Hs00288761 s1
<u>FABP7</u>	Hs00361426 m1
<u>SOCS1</u>	Hs00705164 s1

10

20

30

40

【 0 1 5 0 】

【表 5 - 5】

TDP1	Hs00217832 m1
RUSC1	Hs00204904 m1
C16orf72	Hs00415599 m1
CLECL1	Hs00416849 m1
ARG2	Hs00982837 m1
EYA3	Hs00157443 m1
AQP3	Hs00185020 m1
GPR110	Hs00228100 m1
ITPKB	Hs00176666 m1
CACNA2D2	Hs01021049 m1
CXXC4	Hs00228693 m1
DGKE	Hs00177537 m1
FLJ39743	Hs00753595 s1
CNOT6L	Hs00375913 m1
NUP133	Hs00217272 m1
FYB	Hs01061561 m1
PBX4	Hs00257935 m1
ZNF93	Hs01656246 s1
UNC93A	Hs00219157 m1
CORO1B	Hs00252726 m1
C14orf166B	Hs00332462 m1
LRRC3B	Hs00364791 m1
PTPRA	Hs00160751 m1
OLFML3	Hs00220180 m1
CXCL2	Hs00601975 m1
NCAM1	Hs00941821 m1
LSAMP	Hs00158884 m1
HNF4A	Hs01023298 m1
KANK2	Hs00795260 m1
ADAMTS2	Hs00247980 m1
CTNND1	Hs00931670 m1
FCHSD2	Hs00207952 m1
SDF4	Hs00275083 m1
EGFR	Hs01076086 m1
THOC1	Hs00192903 m1
CRP	Hs00265044 m1

10

20

30

40

【 0 1 5 1 】

【表 5 - 6】

IFT140	Hs00206938 m1
GPC6	Hs00170677 m1
TPM4	Hs01861627 g1
ABCA6	Hs00365329 m1
TAS1R2	Hs01027711 m1
CRIM1	Hs00212750 m1
RBM6	Hs00172915 m1
THBS1	Hs00962914 m1
CADM3	Hs01003862 m1
SOX4	Hs00268388 s1
CDR2L	Hs00412746 m1
B3GNTZ	Hs01912656 s1
DAAM1	Hs00323674 m1
RWDD2B	Hs00213555 m1
SFRP4	Hs00180066 m1
CBX6	Hs00204726 m1
PTBP1	Hs00243060 m1
C6orf145	Hs00406043 m1
DNAJC15	Hs00387763 m1
RENBP	Hs00234138 m1
C15orf43	Hs00415148 m1
KRAS	Hs00270666 m1
BMPR1B	Hs00176144 m1
STXBP2	Hs00199557 m1
DTNB	Hs00222463 m1
MYOD1	Hs00159528 m1
ZAN	Hs00361830 m1
NTS	Hs00175048 m1
MAPK8IP2	Hs00183753 m1
LOC55908	Hs00218820 m1
PTPRS	Hs00161009 m1
DGCR7	Hs01561390 s1
RUFY2	Hs00396174 m1
TK2	Hs00936918 m1
XYLT2	Hs01048792 m1
SLC35F2	Hs00213850 m1

10

20

30

40

【 0 1 5 2 】

【表 5 - 7】

PUM2	Hs01093540 m1
LPP	Hs00194400 m1
IQWD1	Hs00251184 m1
DMRTB1	Hs00380834 m1
APCDD1L	Hs00542128 m1

【 0 1 5 3 】

10

[00167] 表 4 に示すように、本発明者らは I V F 成功の指標となる 2 2 7 の遺伝子および 4 1 2 8 の差示発現する遺伝子を同定した。T L D A チップ上にこれらの遺伝子のうち 1 9 9 を呈示し、1 9 6 のユニークなものを呈示した (B 3 G N T 7、A T P 8 A 1 および D N A J C 1 5 は 2 プローブセットにより呈示される)。これら 1 9 6 のうち 1 4 1 は予測セットに属し (E x c e l ファイルの “ g r o u p (グループ)” の欄に P により呈示する)、5 5 は差示発現セットに属する (差示発現遺伝子を見出すために全試料を用いたので、“ A 1 1 ” にちなんで A により呈示する)。

【 0 1 5 4 】

[00168] T L D A 実験の出力は閾値サイクル (C t) 値であり、これは “ 蛍光が閾値を通過する分画サイクル数 (fractional cycle number) ” である。これらの値は対数尺度 (底 2) であり、発現と反比例する。たとえば、遺伝子 X および Y に関する C t 値をそれぞれ 1 8 および 1 9 とする。これは X を 1 8 サイクル目で “ 良好に ” “ 検出する ” ことを意味し、これは Y (1 9 サイクル目で良好に検出される) と比較して 2 倍大きい発現レベルとなる。したがって、X と Y の間の古典的变化倍率 (X / Y) を計算するためには X を Y から差し引いてそれを 2 の冪数とする必要がある。

20

【 0 1 5 5 】

[00169] アレイ全体にわたる正規化を提供するスパイクイン対照 (spike-in control) はない。おおよその正規化を行なうために、全遺伝子の C t 値を試料全体について考慮し、最も安定な発現を選択する。 “ 安定な ” 遺伝子 (そのプレート内で) の C t 値を各遺伝子の C t 値から差し引くことにより、プレート (試料) 内の各遺伝子についてデルタ C t (d C t) 値を計算する。S t a t m i n e r 分析により、“ 安定な ” 遺伝子は G A P D H であることが見出された。

30

【 0 1 5 6 】

[00170] 本発明者らの “ 予測分析に用いた古い ” 試料から T L D A に用いた試料を下記の表 6 に挙げる。表中の “ * ” は、先の分析で不適正予測された試料に相当する。

[00171] 表 6 . 先の分析から T L D A 実験に用いた試料

【 0 1 5 7 】

【表 6】

試料名	グループ	試料名	グループ
10_062906*	N	1_072407	F
1a_030206	N	1_092308	F
1a_092308	N	15_100908	F
1C_101408	N	1A_100908	F
3A_101408	N	1A_101408	F
4C_100908	N	1b_032306	F
5a_030206	N	2a_013007	F
5B_101408	N	3b_091406	F
5C_100908	N	6_072407	F
7_100908	N	6_092308	F
9_100908	N	6A_100908	F
PE5	N	6A_101408	F
PM1	N	8_100908	F
PM2	N	9_072407	F
X6	N	9_092308	F
CQ2	N	5b-100908*	F
		2a-030206*	F
		4a-030206*	F
		3b-101408*	F

10

20

【0158】

したがって、19のF試料および16のN試料、合計35がある。14の新しい試料についても実験した：表7に示す11のN、3のF。

表7：T L D A実験に用いた新しい試料

【0159】

【表 7】

試料名	グループ	試料名	グループ
42-082609-2	N	54-072909-9	F
MAC#4 092308	N	SMG#10 111609	F
MAC#5 092308	N	17-100709-22	F
BJP#9 111709	N		
JRC#1 111708	N		
CMA#3 090208	N		
JRC#2 111708	N		
AMP#2 021609	N		
BAS#1 030309	N		
CMA#2 090208	N		
MAC#6 092308	N		

30

40

【0160】

【00172】 データの質

【00173】 “検出”呼出しの遺伝子について分布を検査した。遺伝子の発現レベルが決定されなければ、それに40の数値を指定する。図5に、各遺伝子について40の数値を伴う試料の数を、本発明者らの遺伝子（“Hasan遺伝子”と表示した196の遺伝子）およびT L D A上の全379遺伝子（“全遺伝子”と表示）に対して個別にプロットしたものを示す。この図には、各遺伝子についてその遺伝子が40の数値をもつ試料の数を示す。この図では、全試料について結果を計算している。

【0161】

50

[00174] 本発明の遺伝子について全体として、6860(196*35)の数値のうち2237の数値が40であり、これは32.6%の測定で検出されない遺伝子があることを示す。若干の遺伝子は若干の試料中にほとんど存在しないと予想されるので、本発明の定量分析では40の数値をもつ遺伝子があっても許容される。これに対し、本発明方法では35試料すべてに検出されない遺伝子があることは許容されない。たとえば、本発明の遺伝子について、30以上の試料に検出されない遺伝子が62ある。全遺伝子を考慮すると、40の数値を伴う測定の割合は約27.4%である：13230(378*35)のうち3631。

【0162】

[00175] 図6に、40と呼び出された遺伝子の数を各試料について示す。これは、ある意味において、各試料について得た検出レベルを示す。この図に、40の数値を伴う117のHasan遺伝子および212の全遺伝子をもつ9_072407のように、最適下の全体的検出を伴う若干の試料がみられる。試料全体において40と呼び出された遺伝子の数の平均±標準偏差値は、Hasan遺伝子については63.9±14.5、全遺伝子については103.7±28.6である。

10

【0163】

[00176] さらに、14の“新しい”試料について同様な分析を行なった。その際、Hasan遺伝子においては2744(14*196)の数値のうち541が40であり(測定の19.7%に相当)、全遺伝子においては5292(14*378)の数値のうち896が40である(測定の16.9%に相当)ことが認められる。これらは“古い”試料においてみられるものより10%以上良好である。図7および8に、それぞれ遺伝子および試料に関してデータを分析した場合の、40の数値を伴う試料の数および遺伝子の数を示す。

20

【0164】

[00177] 図7は、各試料について、遺伝子が40の数値をもつ試料の数を示す。結果は14の試料について計算されている。

[00178] 本発明の遺伝子リストについて、40の数値をもつ試料が12以上ある25の遺伝子がある。図8に、各試料について40の数値をもつ遺伝子の数を示す；結果は14の“新しい”試料について計算されている。

【0165】

[00179] その際、全体的検出が不良である1試料17_100709_22がみられる；これは、古いデータセットにおいて40の数値をもつ、卵丘細胞に差示発現する“Hasan遺伝子”と呼ぶ85のヒト遺伝子のセットおよび140の遺伝子をもつ。新しいデータセット中では、試料全体において40と呼び出された遺伝子の数の平均±標準偏差値は、Hasan遺伝子については38.6±13.7、全遺伝子については64.0±22.8であり、これは前のデータセットと比較して改良されている。

30

【0166】

[00180] これらの結果は、新しい試料についてのTLDA検出は古い試料と比較して改良されており、遺伝子に対するある種のフィルタリングが必要であることを示唆する。このフィルタリングは、遺伝子が40の発現値をもつ、すなわち検出されない試料の数を基礎とすることができる。前記に述べたように、たとえば前の試料については試料のグループに関係なく85%を超える試料においてその遺伝子が検出されない多数の遺伝子がある。

40

【0167】

[00181] データ分析

[00182] 40の発現値をもつデータ点の取扱い、変化倍率の計算、および対数化した値を用いるか用いないかなど、考慮すべきさまざまなことがある。以下においてそのようなことに対処して、有望な解決策を提示する。

【0168】

[00183] スケーリング：2セットの出力が得られる：Ct値(対数化した発現レベル

50

）および dCt 値；その際、与えられた試料について、各遺伝子の dCt 値は $GAPDH$ の Ct 値をその遺伝子の Ct から差し引くことにより計算される。 Ct 値は対数であるので、これは各遺伝子の発現値を $GAPDH$ の発現値で割ることに相当する。言い換えると、それはある遺伝子と $GAPDH$ の間の変化倍率である。これらの数値を用いて進めることは、 $GAPDH$ に対する遺伝子の変化倍率に基づいてグループ間の変化倍率を計算することを意味する。 $GAPDH$ はアレイに用いる内在対照のひとつではないので、 $TLD A$ に用いるスパイクイン対照はなく、対数目盛りでの小さな変動が実際の数値において大きな差を示す場合があり、ある程度注意してこれを調べる。それにもかかわらず、スケーリングした数値とスケーリングしていない数値の両方を用いた分析を提示する。このレポートの残りの部分について、スケーリングしていない数値は増幅ファイルで得た Ct 値を表わし、スケーリングした数値は $GAPDH$ を差し引くことにより得た dCt 値を表わす。

10

【0169】

[00184] 変化倍率：

[00185] 2つの試料 A および B があり、これらの試料における遺伝子 X の発現値がそれぞれ aX および bX とする。 $TLD A$ 出力においてみられるもの (Ct 値) は、 $\log(aX)$ および $\log(bX)$ である。これら2つの試料間の変化倍率を計算したい場合、 Ct 値を引算し、それを2の冪数とする。すなわち、 $FC = 2^{\log(aX) - \log(bX)}$ 。その理由は、下記の規則である： $\log p - \log q = \log(p/q)$ 、および $2^{\log p} = p$ 。ただし、 Ct 値は逆転しており、すなわち小さい数値ほど大きい表示を意味するので、この FC は変化倍率 B/A を与える。たとえば、Aにおいて10.8、Bにおいて12.3の Ct 値がみられるとすれば、これはこの遺伝子がAにおいてアップレギュレートされており、 B/A の変化倍率は $2^{10.8 - 12.3} = 2^{-1.5} = 0.35$ であることを意味する。言い換えると、この遺伝子はAにおいて $1/0.35 = 2.8$ 倍、アップレギュレートされている。この点に到達するもうひとつの方法は、まず Ct 値を対数解除し (unlog)、次いで既知の方法で FC を計算する；ただし、方向が逆転しており、すなわち Ct ワールドでは小さいほど大きいことを意味する。したがって、Aについての発現レベル $= 2^{10.8} = 1782$ 、Bについての発現レベル $= 2^{12.3} = 5042$ 、および FC は $B/A = 1782/5042 = 0.35$ となる。

20

【0170】

[00186] 1未満の FC 値は解釈が難しいので、行なうことはそれらを逆転させ、負の記号を付けることである。上記の例については、 B/A についての FC が 0.35 であると言う代わりに、 B/A についての FC が $-1/0.35 = -2.8$ であると言う。すべての計算において、常に F 値を N 値から差し引く (\log 目盛りを用いたとすれば) か、あるいは N 値を F 値で割って (\log 解除した値を用いたとすれば) FC を F/N について計算した。上記に例示したように、1未満の FC を表現するためには負の数値を用いた。

30

【0171】

[00187] 単純な FC を計算することはさほど複雑ではないとしても、さらに考慮すべきことがある。上記の例は2つの試料のみを含み、すなわちそれは各グループに1つの試料があるとみることができる。本発明の場合のように各グループに1つより多い試料があればどうであろうか ($16N, 19F$)？ Ct 値を平均すれば、実際に発現レベルの幾何平均が得られる。次いで2グループの Ct 値の平均を引算し、次いで2の冪数とすると、これは2グループの幾何平均を割ることにより FC を計算することを意味する。その理由は、下記の規則である： $a \log X = \log X^a$ および $\log p + \log q = \log(pq)$ 。

40

【0172】

[00188] 一例をあげると、発現レベル a 、 b および c がグループ N にあり、 d 、 e 、 f および g がグループ F にあると仮定する。 $TLD A$ 出力にみられるのは $\log a$ 、 $\log b$ などである。 $FC (F/N)$ を計算するために、 F における平均値を N における平均値から差し引き、次いで2の冪数とすると、下記が得られる。

50

【 0 1 7 3 】

[00189] Nにおける平均値 = $1/3 [\log a + \log b + \log c] = 1/3 \log[abc] = \log(abc)^{1/3}$

[00190] Fにおける平均値 = $1/4 [\log d + \log e + \log f + \log g] = 1/4 \log[defg] = \log(defg)^{1/4}$

[00191] FC (F/N) = $2^{\log(abc)^{1/3} - \log(defg)^{1/4}} = 2^{\{\log[(abc)^{1/3} / (defg)^{1/4}]\}} = (abc)^{1/3} / (defg)^{1/4}$

[00192] 数字の幾何平均はそれらの積の n 乗根であることを思い起こされたい。したがって、我々は常に対数解除した数値を用いて作業することを選択している。すなわち、本発明者らはまず Ct 値を 2 の冪数とし、次いで分析を行なった。

10

【 0 1 7 4 】

[00193] 40 : 40 は、検出されなかった遺伝子を呈示するのに十分なほど高いとみなされた任意 Ct 値である。しかし、それを 40 ではなく 42 に設定すれば、結果はすべて変化するであろう。したがって、本発明者らはまず 40 ではないすべての数値を調べてそれらをランク付けすることによりこれを解決した。Hasan 遺伝子について、これは 4623 の数値をランク付けすることに相当する。次いでこれらの遺伝子のうち底 2 %、すなわち最底の 92 遺伝子を調べた；それらの平均および標準偏差を計算すると、37.9 および 0.8 となった。次いで各 40 を区間 $[37.9 - 0.8, 37.9 + 0.8]$ 間でランダムに選択した数字に置き換えた。

20

【 0 1 7 5 】

[00194] 異常値：発現レベルを手動で調べる場合、与えられた遺伝子について異常値として行動する試料がしばしばみられる。これを克服するために、FC を計算する際にグループ (N または F) において最高および最低の発現レベルを除外した。同様に、各グループにおいて最高 2 つおよび最低 2 つを除外することによりこの操作を繰り返した。

【 0 1 7 6 】

[00195] 結論として、以上の統計的方法を用いることにより、本発明者らは、卵丘細胞による表 4 中の遺伝子 (この遺伝子セットは ABCA6、DDIT4、DUSP1、GPR173B、IDUA、KCTD5、NDNL2、SLC26A3 および TERF2IP、ならびにさらに 6 つの遺伝子 KRAS、NCAM1、OLFML3、PTPRA および SDF4 を含む) の発現レベルは、それに随伴する卵母細胞または同じ女性ドナーからの卵母細胞が生存可能な妊娠を生じる能力と相関することを見出した。したがって、卵丘細胞によるこれらの遺伝子のうち 1 以上の発現を検出する方法は、それに随伴する卵母細胞または同じ女性ドナーからの卵母細胞が IVF 法に使用するのに適切であるかどうかを判定するために使用できる。

30

【 0 1 7 7 】

[00196] これらの結果を確認するために、以下に記載するように 14N 対 17F の比較および 12N と 15F の比較を行なった。

[00197] 遺伝子のフィルタリング：大部分の試料中に検出されない若干の遺伝子がある。極端な場合、35 試料すべてにおいて 40 の Ct 値を与えられる “Hasan 遺伝子” と表示される 20 の遺伝子がある。これらの遺伝子を採用すると予測値にはならない。一般的方法として、本発明者らは 25 以上の試料中に検出されない遺伝子を除外した。

40

【 0 1 7 8 】

[00198] 結果

[00199] 以上の方法を用いて、本発明者らは異常値の除外に基づいて 3 つのデータセットを作成した；ここで異常値は、ある遺伝子について、与えられたあるグループにおいて最高または最低の発現を伴う試料 (単数または複数) である：i) 試料を除外しなかった (Excel ファイル名に “除外なし” により表示)、ii) 各グループ (N および F) において最高および最低の発現値を伴う試料を除外し、すなわち 14N および 17F の試料を用いて FC を計算する (Excel ファイル名に “1 つを除外” により表示)、iii) 各グループ (N および F) において最高のトップ 2 つおよび最低のトップ 2 つの発

50

現値を除外し、すなわち 1 2 N および 1 5 F の試料を用いて F C を計算する (E x c e l ファイル名に “ 2 つを除外 ” により表示) 。

【 0 1 7 9 】

[00200] 各データセットについて、4 0 を前記に説明したように扱った ; すなわち、それらを、検出したすべての値の最低 2 % の平均値 ± それらの数値の標準偏差のうちのランダムな数値で置き換えた。次いで発現レベルを対数解除し、各データセットについて 2 つのファイルを作成した : スケーリングしたもの (与えられた試料について、各遺伝子の発現レベルをその試料中の G A P D H の発現レベルで割る) およびスケーリングしていないもの (G A P D H または他の何らかのスケールを適用しない) 。

【 0 1 8 0 】

[00201] 各 E x c e l ファイル (合計 6 ; 3 データセットそれぞれについて 2 つ) につき、下記の欄も含めた : “ グループ ” : P (遺伝子は予測シグナチャーからのもの) A (遺伝子は差示発現分析からのもの) トレーニング試料および検証試料、すなわちマイクロアレイ分析のすべての試料を使用 ; “ カウント 4 0 ” : 遺伝子が数値 4 0 と推定される試料の数を示す ; “ F C T L D A ” : F C を平均の比として計算 ; “ F C A f f y ” : F C はマイクロアレイから得られる ; “ 一致 ” : 増加の方向が T L D A と A f f y で同じであるかどうかを示す ; 一致の指標として 1 0 、そうでなければ - 1 0 を用いた。

【 0 1 8 1 】

[00202] 図 9 に、T L D A とマイクロアレイの間で一致する遺伝子の分布を示す。これらの結果を表にしたものが表 8 にあり、その際、一致レベルをマイクロアレイ結果からの遺伝子のアップ / ダウンレギュレーションに基づいて分ける。ここにはすべての遺伝子を用いる ; すなわち遺伝子が 4 0 であることが示された試料の数に基づくフィルタリングを適用していない。

【 0 1 8 2 】

[00203] 下記の表 8 に、アップレギュレーションの方向が T L D A とマイクロアレイ分析の間で一致を示す遺伝子の数を示す ; T L D A とマイクロアレイ分析の間のアップレギュレーションの方向。S : スケーリングしたもの , U : スケーリングしていないもの . P : 予測遺伝子リスト . A : 全試料を一緒に分析した際に得られたマイクロアレイデータセット中の遺伝子 . T : 総遺伝子 . 遺伝子をフィルタリングしなかった。

【 0 1 8 3 】

[00204] 表 8

【 0 1 8 4 】

10

20

30

【表 8】

除外	GAPDH	一致全	一致 F 中のアップ	一致 F 中のダウン
なし	S	P: 73/141 (52%) A: 32/55 (58%) T: 105/196 (54%)	P: 39/78 (50%) A: 17/30 (57%) T: 56/108 (52%)	P: 34/63 (54%) A: 15/25 (60%) T: 49/88 (56%)
	U	P: 77/141 (55%) A: 23/55 (42%) T: 100/196 (51%)	P: 43/78 (55%) A: 13/30 (43%) T: 56/108 (52%)	P: 34/63 (54%) A: 10/25 (40%) T: 44/88 (50%)
1	S	P: 84/141 (60%) A: 36/55 (65%) T: 120/196 (61%)	P: 43/78 (55%) A: 19/30 (63%) T: 62/108 (57%)	P: 41/63 (65%) A: 17/25 (68%) T: 58/88 (66%)
	U	P: 77/141 (55%) A: 33/55 (60%) T: 110/196 (56%)	P: 60/78 (77%) A: 24/30 (80%) T: 84/108 (78%)	P: 17/63 (27%) A: 9/25 (36%) T: 26/88 (30%)
2	S	P: 83/141 (59%) A: 37/55 (67%) T: 120/196 (61%)	P: 40/78 (51%) A: 18/30 (60%) T: 58/108 (54%)	P: 43/63 (68%) A: 19/25 (76%) T: 62/88 (70%)
	U	P: 78/141 (55%) A: 32/55 (58%) T: 110/196 (56%)	P: 61/78 (78%) A: 24/30 (80%) T: 85/108 (79%)	P: 17/63 (27%) A: 8/25 (32%) T: 25/88 (28%)

10

20

【0185】

【00205】 これらの結果は、各グループにおいてトップの1または2つの異常値を除外すると、スケーリングしたデータを用いて最良の全体的な一致が61%で達成されることを示唆する。さらに、25以上の試料において“検出されない”遺伝子をフィルタリングで除去することによりこの分析を繰り返した。11以上の試料において検出される遺伝子を用いてAffyとTLDAの間の一貫性の分布を示す結果を表9にまとめる。

【0186】

【表 9】

除外	GAPDH	一致全	一致 F 中のアップ	一致 F 中のダウン
なし	S	P: 53/101 (52%) A: 26/43 (60%) T: 78/144 (54%)	P: 38/57 (67%) A: 17/24 (71%) T: 56/81 (69%)	P: 15/44 (54%) A: 9/19 (60%) T: 24/63 (38%)
	U	P: 50/101 (50%) A: 17/43 (40%) T: 67/144 (47%)	P: 30/57 (53%) A: 10/24 (42%) T: 40/81 (49%)	P: 20/44 (45%) A: 7/19 (37%) T: 27/63 (43%)
1	S	P: 65/101 (64%) A: 30/43 (70%) T: 95/144 (66%)	P: 43/57 (75%) A: 19/24 (79%) T: 62/81 (77%)	P: 22/44 (50%) A: 11/19 (58%) T: 33/63 (52%)
	U	P: 54/101 (53%) A: 24/43 (56%) T: 78/144 (54%)	P: 47/57 (82%) A: 19/24 (79%) T: 66/81 (81%)	P: 7/44 (16%) A: 5/19 (26%) T: 12/63 (19%)
2	S	P: 64/101 (63%) A: 31/43 (71%) T: 95/144 (66%)	P: 40/57 (70%) A: 18/24 (75%) T: 58/81 (72%)	P: 24/44 (55%) A: 13/19 (68%) T: 37/63 (59%)
	U	P: 55/101 (54%) A: 29/43 (67%) T: 84/144 (60%)	P: 52/57 (91%) A: 24/24 (100%) T: 76/81 (94%)	P: 3/44 (7%) A: 5/19 (26%) T: 8/63 (13%)

30

40

【0187】

【00206】 両グループにおいていずれの側にもトップの1または2つの異常値を除外し、かつスケーリングした数値を用いた場合は、全体として66%が一致するので、これら

50

の結果はさらに最適化される。同様に興味深いのは、スケーリングしていない数値では、Fグループにおいてほぼすべての遺伝子がアップレギュレーションを示すことである。

【0188】

[00207] 予測

[00208] 予測分析には、25以上の試料において“検出されない”遺伝子をフィルタリングで除去した場合、AffyとTLDAの間で一致する遺伝子(表9)を用いた。本発明者らは、重み付き投票法を用いる1点排除交差検証法(leave one out cross validation)を適用した。スケーリングしていないデータを用いた場合、6遺伝子で最良の結果が得られた(27/35=77%の予測精度)。スケーリングしたデータの場合、最良の予測精度は(22/35=63%)であった。これらの遺伝子を、35試料を用いたTLDAにおけるそれらの変化倍率値(F/N)およびAffy、ならびに“新しい”14試料におけるこれらの遺伝子の変化倍率値(F/N)と共に表10に示す。

10

【0189】

【表10】

遺伝子	FC TLDA (F/N) 35 試料	FC Affy	FC TLDA (F/N) 14 試料
DUSP1	4.61	6.10	11.49
TGFB2	3.60	1.50	1.40
SDF4	3.52	1.84	5.83
SYMPK	2.60	1.57	6.30
NCAMI	2.51	2.12	5.41
IDUA	2.49	1.56	2.34

20

【0190】

[00209] 35試料についての予測結果を表11に示す。不適正に予測された試料に影を付けてある。合計で3つのNおよび5つのF試料が不適正に予測された。

【0191】

【表11】

試料	真の クラス	予測 クラス	試料	真の クラス	予測 クラス
CQ2	N	N	8_100908	F	F
PE5	N	N	1_072407	F	F
PM1	N	N	1_092308	F	F
PM2	N	N	15_100908	F	F
10_062906	N	N	1A_100908	F	F
1a_030206	N	N	1A_101408	F	F
1a_092308	N	N	1b_032306	F	N
1C_101408	N	F	2a_013007	F	N
3A_101408	N	F	2a_030206	F	F
4C_100908	N	N	3b_091406	F	N
5a_030206	N	N	3B_101408	F	F
5B_101408	N	F	4a_030206	F	F
5C_100908	N	N	5B_100908	F	F
X6	N	N	6_072407	F	N
7_100908	N	N	6_092308	F	F
9_100908	N	N	6A_100908	F	F
			6A_101408	F	F
			9_072407	F	N
			9_092308	F	F

30

40

50

【 0 1 9 2 】

【 表 1 2 】

試料名	真の クラス	予測 クラス	試料名	真の クラス	予測 クラス	予測 遺伝子	FC Affy	FC TLDA	
CQ2	N	N	8_100908	F	F	ABCA6	1.73201	2.266364	
PE5	N	N	1_072407	F	F	DDIT4	1.431242	3.590461	
PM1	N	N	1_092308	F	F	DUSP1	6.097665	3.859997	
PM2	N	N	15_100908	F	F	GPR137B	1.351784	2.580321	
10_062906	N	N	1A_100908	F	F	IDUA	1.155538	1.877405	
1a_030206	N	N	1A_101408	F	F	KCTD5	1.18101	1.543389	10
1a_092308	N	N	1b_032306	F	N	KRAS	1.313773	1.686065	
1C_101408	N	F	2a_013007	F	N	NCAM1	2.121727	2.729792	
3A_101408	N	N	2a_030206	F	F	NDNL2	1.339368	3.989482	
4C_100908	N	N	3b_091406	F	N	OLFML3	4.039102	1.926399	
5a_030206	N	N	3B_101408	F	F	PTPRA	3.192034	2.282193	
5B_101408	N	F	4a_030206	F	N	SDF4	1.84401	3.262687	
5C_100908	N	N	5B_100908	F	N	SLC26A3	1.097162	2.022467	
X6	N	N	6_072407	F	N	TERF2IP	1.123738	2.363746	
7_100908	N	N	6_092308	F	F				
9_100908	N	N	6A_100908	F	F				
10_100908	N	N	6A_101408	F	F				20
11_101408	N	N	9_072407	F	N				
1b_092308	N	N	9_092308	F	N				
X4	N	N	4_072407	F	F				
			08_092308C						
5_101408	N	F	HP	F	F				
5C_101408	N	N	12_100908	F	F				
6_100908	N	N	1B_100908	F	F				
8_101408	N	F	4_100908	F	N				
			5a_013007	F	N				

【 0 1 9 3 】

30

[00210] 結論として、以上の統計的方法を用いて、本発明者らは、卵丘細胞による表4中の1以上の遺伝子、より好ましくはABCA6、NCAM1、OLFML3、PTPRA、SDF4、GPR137B、DDIT4、DUSP1、GPR137B、IDUA、KCTD5、NDNL2、SLC26A3、およびTERF2IPからなる群から選択される14の遺伝子のうち1以上の発現レベルは、それに随伴する卵母細胞または同じ女性ドナーからの卵母細胞が生存可能な妊娠を生じる能力と相関することを見出した。したがって、卵丘細胞によるこれらの遺伝子のうち1以上の発現を検出する方法は、それに随伴する卵母細胞または同じ女性ドナーからの卵母細胞がIVF法に使用するのに適切であるかどうかを判定するために、またIVF法に使用するのに不適切な卵母細胞を生じる状態を伴う個体を同定するために、また受精処置の成功をモニターするために使用できる。

40

【 0 1 9 4 】

[00211] 参考文献

[00212] 本明細書全体を通して、種々の参考文献が本発明に係る技術水準について記載している。これらの参考文献の開示内容を本発明の開示に引用することにより本明細書に援用する。

【 図 1 a 】

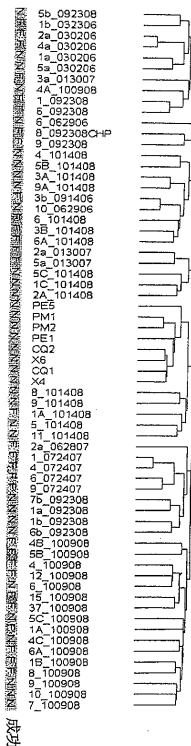


図 1 : 全遺伝子を用いた N および F 試料のクラスタリング (a : 全試料, b : トレーニングセット, c : 検証セット)

【 図 1 b 】

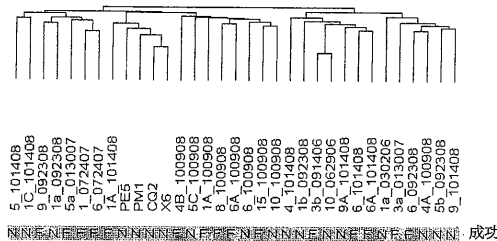


図 1 : 全遺伝子を用いた N および F 試料のクラスタリング (a : 全試料, b : トレーニングセット, c : 検証セット)

【 図 1 c 】

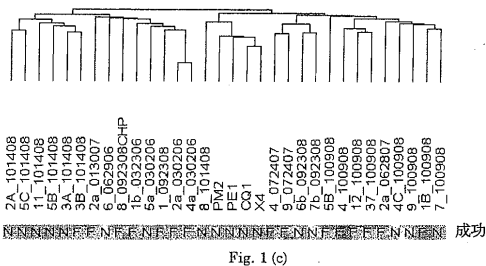
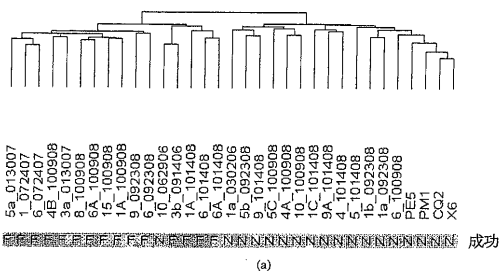


図 1 : 全遺伝子を用いた N および F 試料のクラスタリング (a : 全試料, b : トレーニングセット, c : 検証セット)

【 図 2 】



(a)

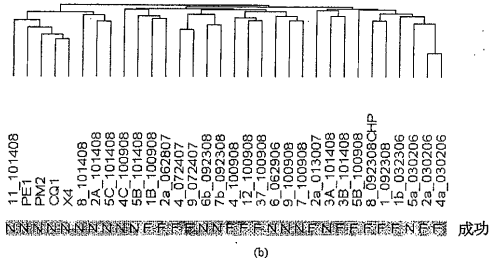
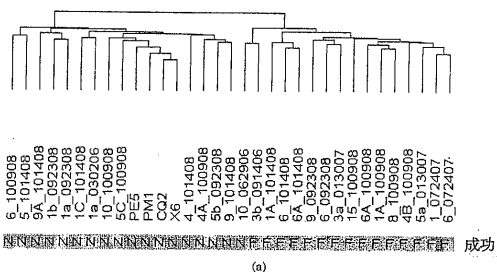


図 2 : 1180 の記述遺伝子を用いた N および F 試料のクラスタリング (a : トレーニングセット, b : 検証セット)

【 図 3 】



(a)

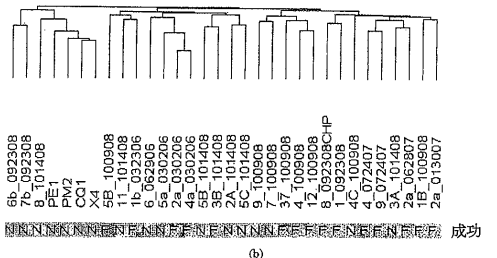


図 3 : 227 の予測遺伝子を用いた N および F 試料のクラスタリング (a : トレーニングセット, b : 検証セット)

【 図 4 】

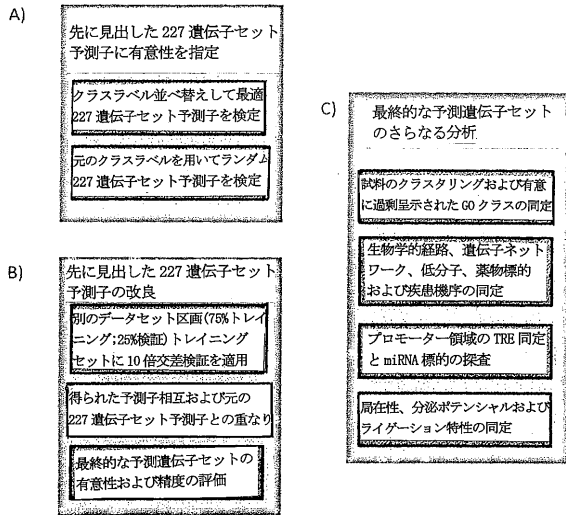
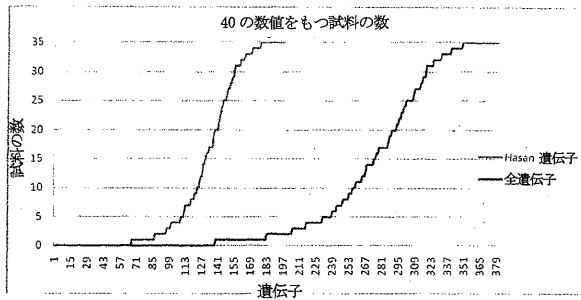


図4：A) PG's に有意性を指定する、B) PG's を改良する、およびC) 最終的な予測遺伝子セットをさらに分析するために用いる全作業流れのまとめ

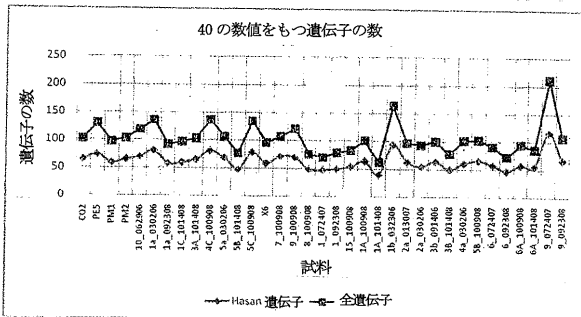
【 図 5 】

図5：各遺伝子について、その遺伝子が40の値をもつ試料の数を示す。結果は“古い”35試料について計算されている。図5には、各遺伝子について40の値をもつ試料の数を、本発明の遺伝子(“Hasan 遺伝子”と表示した196の遺伝子、左側の曲線)およびT LDA上の全379遺伝子(“全遺伝子”と表示、右側の曲線)について個別にプロットしたものを示す



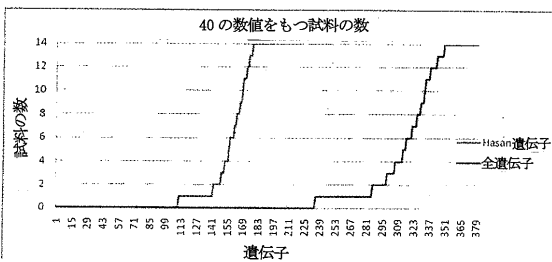
【 図 6 】

図6：40の値をもつ遺伝子の数を各試料について示す。結果は“古い”35試料について計算されている。上側のデータ線(四角記号)は“全遺伝子”、下側のデータ線(菱形記号)は“Hasan 遺伝子”である



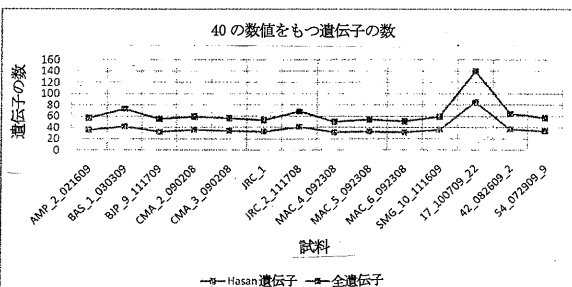
【 図 7 】

図7：各遺伝子について、その遺伝子が40の値をもつ試料の数を示す。結果は“新しい”14試料について計算されている。左側のデータ線は“Hasan 遺伝子”、右側のデータ線は“全遺伝子”である



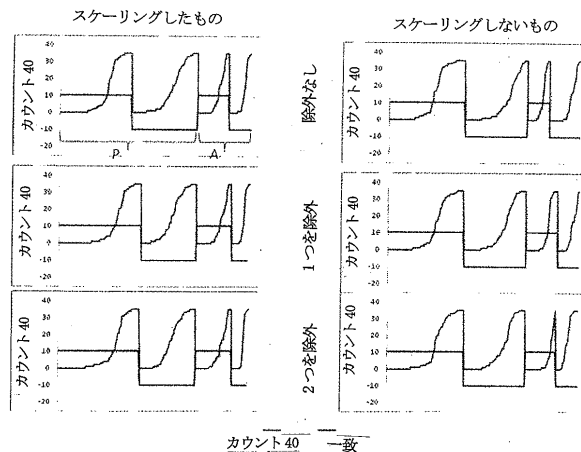
【 図 8 】

図8：40の値をもつ遺伝子の数を各試料について示す。結果は“新しい”14試料について計算されている。上側のデータ線は“全遺伝子”、下側のデータ線は“Hasan 遺伝子”である



【 図 9 】



図9：下記の因子に基づく遺伝子の分布を示す：その遺伝子が属するグループ(PまたはA)；T LDAとマイクロアレイにおけるその遺伝子のアップ/ダウンレギュレーションの一致(方向が同じであれば10、そうでなければ-10)；その遺伝子が40の値をもつ試料の数。この分析は、種々の個数の異常値を除外して、スケールした数値およびスケールしていない数値について個別に実施される。部分的に弯曲したデータ線は“カウント40”を示し、数字および四角い波形をもつデータ線は“一致”値である



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/056252

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/12(2006.01)i, C12N 5/075(2010.01)i, G01N 33/15(2006.01)i</i>		
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 1/68; C12Q 1/02; C07H 21/00; G01N 33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: oocyte, cumulus cell, pregnancy, biomarker, female donor, expression, fertilization, implantation		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008-066655 A2 (Yale University) 05 June 2008 See Abstract, Claims 1-17, 25, 37, Page 3 line 11- page 4 line 2, SEQ ID NOs. 21, 37, 51	1-30,34,36-37,47 ,48
A	US 7572601 B2 (Xingqi Zhang et al.) 11 August 2009 See Abstract, Claims 1-3, Table 1	1-30,34,36-37,47 ,48
A	WO 2007-130673 A2 (Beth Israel Deaconess Medical Center) 15 November 2007 See Abstract, Claims 1-20, 24, Figures 1, 2	1-30,34,36-37,47 ,48
A	WO 2008-031226 A1 (Universite Laval) 20 March 2008 See Abstract, Claims 1-5, 13	1-30,34,36-37,47 ,48
A	Aafke P.A. van Montfoort et al., 'Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis', Mol Hum Reprod., Vol. 14(3), pp.157-168 (18 January 2008) See Abstract, Figures 2, 3	1-30,34,36-37,47 ,48
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* "A" "E" "L" "O" "P"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance earlier application or patent but published on or after the international filing date document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" "X" "Y" "&"
Date of the actual completion of the international search 21 SEPTEMBER 2011 (21.09.2011)		Date of mailing of the international search report 21 SEPTEMBER 2011 (21.09.2011)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer PARK, Yeong-Gwan  Telephone No. 82-42-481-8407

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/056252

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	L.J. McKenzie et al., 'Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF', Hum Reprod., Vol. 19(12), pp. 2869-2874, (7 October 2004) See Abstract	1-30,34,36-37,47 ,48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/056252

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:

2. Claims Nos.: 54-58, 60 and 63-65
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:
Because claims 54-58, 60 and 63-65 directly or indirectly refer to claims 53, 59 and 62 which are not drafted in accordance with the second and/or third sentence of Rule 6.4(a), this international search report of the claims has not been established.

3. Claims Nos.: 53, 59, 61 and 62
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:

Claims 1-30, 34, 36-37(partially), 47, 48, 53-65(partially) (Group 1), Claims 31-33, 35, 36-37(partially), 53-65(partially) (Group 2), Claims 38-46, 53-65(partially) (Group 3), Claims 49, 52-65(partially) (Group 4), Claims 50, 52-65(partially) (Group 5), Claims 51, 52-65(partially) (Group 6).

The only common technical feature between Groups 1-6 is the method using genetic marker of PTPRM, DUSP1, NEU2, etc. However, this feature lacks novelty and/or inventive step with respect to document of WO 2008-066655 A2 (5 June, 2008) cited in this ISR.

Thus, there is no technical relationship over the prior art among the claimed inventions leaving the claims without a single general inventive concept. Hence there is lack of unity "a posteriori" (PCT Rules 13.1 and 13.2).

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 any additional fee.

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.:
Group 1 : Claims 1-30, 34, 36-37(partially), 47, 48 and 53-65(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 SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2010/056252

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008-066655 A2	05.06.2008	AU 2007-325931 A1	05.06.2008
		CA 2668235 A1	05.06.2008
		EP 2092074 A2	26.08.2009
		EP 2092074 A4	09.06.2010
		JP 2010-508815 A	25.03.2010
		JP 2010-508815 T	25.03.2010
		US 2010-0120624 A1	13.05.2010
		WO 2008-066655 A3	27.11.2008
US 7572601 B2	11.08.2009	US 2006-0147900 A1	06.07.2006
WO 2007-130673 A2	15.11.2007	US 2010-0055730 A1	04.03.2010
		WO 2007-130673 A3	27.12.2007
WO 2008-031226 A1	20.03.2008	CA 2666819 A1	20.03.2008
		EP 2064343 A1	03.06.2009
		EP 2064343 A4	12.05.2010
		JP 2010-503385 A	04.02.2010
		JP 2010-503385 T	04.02.2010
		US 2010-0021898 A1	28.01.2010

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
A 6 1 B 10/00 N

(31)優先権主張番号 61/387,286

(32)優先日 平成22年9月28日(2010.9.28)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 61/388,296

(32)優先日 平成22年9月30日(2010.9.30)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(74)代理人 100162455

弁理士 辻本 典子

(72)発明者 シベリ, ホセ・ビー

アメリカ合衆国ミシガン州4 8 8 2 3, イースト・ランシング, ローズウッド・アベニュー 4 6
3

(72)発明者 イアガー, エイミー・イー

アメリカ合衆国ミシガン州4 9 3 0 1, エイダ, サウスイースト, ブリッジ・クレスト・ドライブ
1 0 1 4

(72)発明者 オツ, ハサン・ヘ

トルコ国 3 4 7 3 6 イスタンブール, カドゥキョイ, コジャターイ, スムコ・シト メ7ア
ブロック・ナンバー 2 9

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA09 CA12 CA20 HA08 HA11

4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ53 QQ79 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25

QS36 QX02

专利名称(译)	用于鉴定由卵丘细胞和具有使用它们接受妊娠的能力的卵母细胞差异表达的基因的测定		
公开(公告)号	JP2013510575A	公开(公告)日	2013-03-28
申请号	JP2012538952	申请日	2010-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	杰玛诊断公司		
申请(专利权)人(译)	杰玛诊断公司		
[标]发明人	シベリホセビー イアガーエイミーイー オツハサンハ		
发明人	シベリ,ホセ・ビー イアガー,エイミー・イー オツ,ハサン・ハ		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 C12N15/09 A61B10/00		
CPC分类号	G01N33/689 C12Q1/6881 C12Q2600/158 G01N2800/52		
FI分类号	C12Q1/68.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/53.Y C12N15/00.A A61B10/00.N		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/HA08 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	小林 泰 星野 修		
优先权	61/259783 2009-11-10 US 61/360556 2010-07-01 US 61/387313 2010-09-28 US 61/387286 2010-09-28 US 61/388296 2010-09-30 US		
其他公开文献	JP2013510575A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

它提供了一种遗传工具，可识别“妊娠称职”卵母细胞。这些手段包括检测一种或多种在具有妊娠能力的卵母细胞的卵丘细胞中以特征水平表达（上调或下调）的基因的表达水平。此特征性基因表达水平（在本文中称为“妊娠特征”）用于引起预防或阻止可行妊娠发展的疾病，例如绝经前疾病，其他荷尔蒙功能障碍，还可以鉴定患有诸如卵巢功能障碍，卵巢囊肿，癌症或其他细胞增殖性疾病，自身免疫性疾病的病症的受试者。在一个优选的实施方案中，妊娠特征将包括ABCA6，NCAM1，OLFML3，PTPRA，SDF4，GPR137B，DDIT4，DUSP1，GPR137B，IDUA，KCTD5，NDNL2，SLC26A3和TERF2IP中的一种或多种。 [选型图]图1

