

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-283947

(P2008-283947A)

(43) 公開日 平成20年11月27日(2008.11.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	
	GO1N 33/53 M	
	GO1N 33/53 G	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2007-138699 (P2007-138699)	(71) 出願人	504179255 国立大学法人 東京医科歯科大学 東京都文京区湯島1-5-45
(22) 出願日	平成19年5月25日 (2007.5.25)	(71) 出願人	591083336 株式会社ビー・エム・エル 東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目21番3号
(31) 優先権主張番号	特願2007-111033 (P2007-111033)	(74) 代理人	100103160 弁理士 志村 光春
(32) 優先日	平成19年4月19日 (2007.4.19)	(72) 発明者	稲澤 譲治 東京都練馬区東大泉5丁目43番地1-9 04号
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	井本 逸勢 東京都文京区本郷3丁目23番地3-40 6
特許法第30条第1項適用申請有り 2007年4月16日 インターネットアドレス「 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ 」に発表		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 食道癌の判別方法

(57) 【要約】

【課題】 食道癌に対する、遺伝子レベルの新たな検出方法を提供すること。

【解決手段】 食道上皮細胞における特定の103種類の遺伝子の変異、例えば、(1)当該遺伝子発現値の低値若しくは高値への偏り、(2)当該遺伝子のゲノムDNAのメチル化、又は、(3)当該遺伝子がコードする蛋白質レベルの低値若しくは高値への偏り、を指標として、当該食道上皮細胞の癌化を検出する、食道癌の検出方法を提供することにより、上記の課題を解決し得ることを見出した。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

食道上皮細胞における下記の遺伝子：

BARHL2遺伝子、NES遺伝子、CRABP2遺伝子、ISG20L2遺伝子、MRPL24遺伝子、HDGF遺伝子、PRCC遺伝子、SH2D2A遺伝子、NTRK1遺伝子、LHX9遺伝子、TARBP1遺伝子、RMND5A遺伝子、CD8A遺伝子、SLC2A9遺伝子、WDR1遺伝子、PCDH7遺伝子、FRAS1遺伝子、BTN1A1遺伝子、HMGN4遺伝子、ABT1遺伝子、ZNF184遺伝子、UNC5CL遺伝子、BZRPL1遺伝子、APOBEC2遺伝子、NFYA遺伝子、EYA4遺伝子、PHACTR2遺伝子、MEOX2遺伝子、PRR15遺伝子、TBX20遺伝子、FEZF1遺伝子、GATA4遺伝子、NEIL2遺伝子、FDFT1遺伝子、NFIB遺伝子、MELK遺伝子、PRUNE2遺伝子、FOXB2遺伝子、NIPSNAP3A遺伝子、NIPSNAP3B遺伝子、ADARB2遺伝子、ERCC6遺伝子、PGBD3遺伝子、COL13A1遺伝子、KCNMA1遺伝子、MPHOSPH遺伝子、PCGF5遺伝子、SEMA4G遺伝子、MRPL43遺伝子、PEO1遺伝子、BUB3遺伝子、HMX1遺伝子、FLJ46831遺伝子、CLRN3遺伝子、PTPRE遺伝子、TRIM68遺伝子、CYP2R1遺伝子、CALCA遺伝子、ZBTB3遺伝子、POLR2G遺伝子、TAF6L遺伝子、NXF1遺伝子、STX5遺伝子、WDR74遺伝子、SLC3A2遺伝子、CHRM1遺伝子、KRT2遺伝子、KRT1遺伝子、SPG20遺伝子、CCNA1遺伝子、EGLN3遺伝子、TITF1遺伝子、NKX2-8遺伝子、PAX9遺伝子、PTGDR遺伝子、PTGER2遺伝子、ONECUP1遺伝子、IQCH遺伝子、LBXCOR1遺伝子、ETFA遺伝子、ISL2遺伝子、DNAJA4遺伝子、WDR61遺伝子、IREB2遺伝子、NETO2遺伝子、JMJD5遺伝子、SALL1遺伝子、CMTM3遺伝子、LHX1遺伝子、AATF遺伝子、KRT33A遺伝子、KRT33B遺伝子、KRT34遺伝子、KRT31遺伝子、KRT37遺伝子、KRT38遺伝子、KRT32遺伝子、KRT35遺伝子、KRT36遺伝子、KRT13遺伝子、ONECUT2遺伝子、POU3F4遺伝子、及び、PCDH19遺伝子；

からなる群から選ばれる 1 種以上の遺伝子の変異を指標として、当該食道上皮細胞の癌化を検出する、食道癌の検出方法。

【請求項 2】

前記検出方法において、食道上皮細胞における前記遺伝子の変異が、食道上皮細胞における、当該遺伝子のゲノム DNA、当該遺伝子を鋳型として発現する mRNA、当該 mRNA を鋳型とする cDNA、又は、当該遺伝子がコードする蛋白質、を介して検出される、請求項 1 記載の食道癌の検出方法。

【請求項 3】

前記検出方法において、食道上皮細胞における前記遺伝子の変異が、(1) 当該遺伝子発現値の低値若しくは高値への偏り、(2) 当該遺伝子のゲノム DNA のメチル化、又は、(3) 当該遺伝子がコードする蛋白質レベルの低値若しくは高値への偏り、により検出される、請求項 1 又は 2 記載の食道癌の検出方法。

【請求項 4】

前記検出方法において、下記(1)～(3)の検出手段を行う、請求項 3 記載の食道癌の検出方法。

(1) 食道上皮細胞における前記遺伝子発現値の低値若しくは高値への偏りの検出手段が、DNA チップ法、ノーザンプロット法、又は、RT-PCR 法である。

(2) 前記遺伝子のゲノム DNA のメチル化の検出手段が、CGH 法、マスアレイ法、MethylLight 法、Methylation-specific PCR 法、サザンプロット法、Bisulfite シーケン
ス法、メチレーションチップ法、COBRA 法、又は、BAMCA 法である。

(3) 前記遺伝子がコードする蛋白質レベルの低値若しくは高値への偏りの検出手段が、免疫染色法である。

【請求項 5】

前記検出方法において、前記遺伝子のゲノム DNA のメチル化が、CpG アイランドのメチル化である、請求項 3 又は 4 記載の食道癌の検出方法。

【請求項 6】

前記検出方法において、CGH 法を前記遺伝子のゲノム DNA の CpG アイランドのメチル化の検出手段として用い、当該 CGH 法において用いる検出用基板に定着させる複数種類のゲノム DNA が、BAC DNA、YAC DNA、又は、PAC DNA の遺伝子増幅産物である、請求項

10

20

30

40

50

5 記載の食道癌の検出方法。

【請求項 7】

前記検出方法において、前記遺伝子のゲノム DNA の CpG アイランドのメチル化の検出手段として、マスアレイ法、Methylation-specific PCR 法、Bisulfite シーケンス法、メチレーションチップ法、COBRA 法、又は、BAMCA 法を用いる、請求項 5 記載の食道癌の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特定の癌関連遺伝子を指標として用いる癌の検出方法に関する発明である。より具体的には、食道上皮細胞を検体として用いて、当該検体における癌関連遺伝子のゲノム DNA のメチル化等の変異を検出して、食道癌を検出することを特徴とする食道癌の検出方法に関する発明である。

10

【背景技術】

【0002】

食道癌 (Esophageal carcinoma) は、食道に発生する上皮性由来の腫瘍 (癌) である。組織学的分類では、扁平上皮癌 (Esophageal Squamous-cell Carcinoma) と腺癌がある。前者は食道の粘膜上皮細胞が癌化するもので、全体の 90% 以上を占める。日本人では食道癌全体の 93% を占める。後者は食道腺の細胞が癌化するもので、両者を合わせると食道癌全体の 95% 以上を占める。診断法としては、食道造影、内視鏡、超音波内視鏡検査、CT (コンピュータトモグラフィ)、PET (ポジトロン放射断層撮影装置) 等の画像所見と SCC (扁平上皮癌関連抗原) 及び CEA (癌胎児抗原) 等の腫瘍マーカーに基づく方法が知られているが、精度が高いとはいえず、初期に悪性度を含めて診断する事は困難な状況である。一方、食道癌は初期の診断が困難である事も一因であるが、その予後が極めて悪く、手術或いは放射線・化学療法の奏効率が悪い癌である。これはリンパ節転移が多い事と、食道は他の消化器臓器と異なり、漿膜 (外膜) を有していないために、比較的周囲に浸潤しやすいことが上げられる。

20

【0003】

ごく最近、Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1B (LRP1B) の発現低下或いは当該ゲノム遺伝子の欠失が食道癌の診断に使用できることが報告された (非特許文献 1)。

30

【非特許文献 1】Sonoda I, Imoto I, Inoue J, Shibata T, Shimada Y, Chin K, Imamura M, Amagasa T, Gray J W, Hirohashi S, and Inazawa J: Frequent Silencing of Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein1B(LRP1B) Expression by Genetic and Epigenetic Mechanisms in Esophageal Squamous Cell Carcinoma, Cancer Research 64, 3741-3747, 2004

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

現状において、食道癌の遺伝子検査法については、非特許文献 1 の技術が公知となっているものの、さらに新たな遺伝子検査法を見出し、それらを用いた総合的な食道癌の検出手段の確立が要望されている状況である。すなわち、本発明が解決すべき課題は、食道癌に対する、さらに新たな遺伝子レベルの検出方法を提供することにある。

40

【課題を解決するための手段】

【0005】

一般に、癌細胞では、遺伝子の変異、例えば、ゲノム遺伝子の欠失及び増幅、CpG アイランドのメチル化による発現抑制、ヒストン蛋白質の脱アセチル化による遺伝子の発現抑制、遺伝子点突然変異等、が起こっている場合が多く例で報告されている。食道癌細胞において、染色体 DNA 及び遺伝子発現について詳細に検討し、食道癌の悪性度及び早期診断に結びつく遺伝子群を探索し、診断の決め手となる遺伝子を見出す事は極めて重要で

50

ある。さらに、食道癌細胞で特徴的な遺伝子の変化を見出し、遺伝子変化と癌の臨床病理学的所見との相関を解析することにより、食道癌の診断法を確立することができると考えられる。

【0006】

本発明者等は、ゲノム上での食道上皮細胞由来の癌細胞株でのメチル化の亢進を、BAMCA法を用いて網羅的に解析した。BAMCA法は、Bacterial Artificial chromosome array-based Methylated CpG island Amplificationの略称である。本方法の概略を示せば、まず、食道癌細胞と正常食道細胞よりDNAを調製し、制限酵素SmaI(メチル化感受性制限酵素)で消化する。SmaIサイトがメチル化されている場合には、SmaIで消化されないために、次のステップのXmaI(メチル化非感受性制限酵素)消化、アダプターライゲーション、PCRによる増幅の過程で特異的に標識される。その結果、食道癌細胞由来のゲノムDNAを蛍光色素Cy3で標識し、正常食道細胞に由来するDNAを蛍光色素Cy5で標識し、全染色体を網羅的に解析することが可能な4523種類のBAC(Bacterial Artificial Chromosome) DNAを搭載した高密度ゲノムアレイであるMCG Whole Genome Array-4500上で競合ハイブリダイゼーション(Comparative Genomic Hybridization: CGH)を行うと、食道癌細胞においてメチル化されたゲノムDNAが存在する場合に、Cy3/Cy5の比が上昇する。この値が特定値以上(例えば、1.5以上)であることを指標として、癌で特異的にメチル化されたDNA断片に一致する配列を含むBACクローンを同定することができる。この一連のBAMCA法の過程を図1に示す。

10

【0007】

本発明者等は、上記の要領による食道上皮細胞由来の癌細胞株の網羅的な解析の結果、食道癌細胞で、CpGアイランドがメチル化されている61種類のBAC DNAが同定され、その結果よりヒト染色体の24ヶ所の染色体座位を同定した。さらに、その領域に局在する遺伝子を調べた結果、103種類のゲノム遺伝子の同定に成功した。

20

【0008】

すなわち、RP11-99A8 (1p22.2)、RP11-82E1 (1p22.2)、RP11-66D17 (1q23.1)、RP11-180B22 (1q23.1)、RP11-73D7 (1q31.3)、RP11-123I5 (1q42.2)、RP11-81F3 (2q11.2)、RP11-17I9 (4p16.1)、RP11-205N12 (4p15.1)、RP11-17P19 (4q21.21)、RP11-81L1 (5q23.2)、RP11-183F3 (6p22.1)、RP11-451M2 (6p22.1)、RP11-71C20 (6p21.33)、RP11-79J5 (6p21.1)、RP11-177M14 (6q23.2)、RP11-436I24 (6p24.2)、RP11-89B15 (7p21.2)、RP11-34N11(7p15.1)、RP11-115G23 (7p14.3)、RP11-97P11 (7p11.2)、RP11-48O1 (7q31.32)、RP11-235I5 (8p23.1)、RP11-413C16 (9p22.3)、RP11-12P15 (9p13.2)、RP11-159H20 (9q21.13)、RP11-413C10 (9q31.1)、RP11-79H9 (10p15.3)、RP11-66F24 (10p12.31-12.2)、RP11-92I18 (10q11.23)、RP11-52K17 (10q21.3)、RP11-17O5 (10q22.3)、RP11-428P16 (10q22.3)、RP11-248C1 (10q23.3)、RP11-90B18(10q23.3)、RP11-37L21 (10q24.3)、RP11-162A23 (10q26.12)、RP11-88B12 (10q26.2)、RP11-90P9 (11p15.4)、RP11-91I5 (11p15.2)、RP11-49D19 (11q12.3)、RP11-97N16 (12q13.1)、RP11-91K18 (13q13.3)、RP11-105F9 (14q13.1)、RP11-458A21 (14q13.3)、RP11-262M8 (14q22.1)、RP11-209K10 (15q21.2)、RP11-85E15 (15q23)、RP11-207J8 (15q23)、RP11-79J21 (15q24)、RP11-10K12 (15q24)、RP11-215M5 (16q12.1)、RP11-209I14 (16q12.1)、RP11-424K7 (16q12.1)、RP11-3A9 (16q21)、RP11-81D5 (17q12)、RP11-29C11 (17q21.2)、RP11-79L5 (18q21.31)、RP11-124D1 (20q13.1)、RP11-246G22 (Xq21.1)、RP11-99E24 (Xq22.1)のBAC DNAが、上述した網羅的検討により見出された。

30

40

【0009】

そして、これらのBAC DNAの中に含まれる103種のゲノム遺伝子、具体的には、BARHL2遺伝子(GenBank番号:NM_020063.1)、NES遺伝子(GenBank番号:NM_006617.1)、CRABP2遺伝子(GenBank番号:NM_001878.2)、ISG20L2遺伝子(GenBank番号:NM_030980.1)、MRPL24遺伝子(GenBank番号:NM_145729.1)、HDGF遺伝子(GenBank番号:NM_004494.1)、PRCC遺伝子(GenBank番号:NM_199416.1)、SH2D2A遺伝子(GenBank番号:NM_003975.2)、NTRK1遺伝子(GenBank番号:NM_001007792.1)、LHX9遺伝子(GenBank番号:NM_00

50

1014434.1)、TARBP1遺伝子(GenBank番号:NM_005646.3)、RMND5A遺伝子(GenBank番号:NM_022780.2)、CD8A遺伝子(GenBank番号:NM_001768.5)、SLC2A9遺伝子(GenBank番号:NM_020041.2)、WDR1遺伝子(GenBank番号:NM_005112.4)、PCDH7遺伝子(GenBank番号:NM_032457.1)、FRAS1遺伝子(GenBank番号:NM_025074.4)、BTN1A1遺伝子(GenBank番号:NM_001732.1)、HMGN4遺伝子(GenBank番号:NM_006353.2)、ABT1遺伝子(GenBank番号:NM_013375.2)、ZNF184遺伝子(GenBank番号:NM_007149.1)、UNC5CL遺伝子(GenBank番号:NM_173561.1)、BZRPL1遺伝子(GenBank番号:NM_001010873.1)、APOBE C2遺伝子(GenBank番号:NM_006789.2)、NFYA遺伝子(GenBank番号:NM_021705.2)、EY A4遺伝子(GenBank番号:NM_172105.2)、PHACTR2遺伝子(GenBank番号:NM_014721.1)、MEOX2遺伝子(GenBank番号:NM_005924.4)、PRR15遺伝子(GenBank番号:NM_175887.2)、TBX20遺伝子(GenBank番号:NM_001077653.1)、FEZF1遺伝子(GenBank番号:NM_001024613.1)、GATA4遺伝子(GenBank番号:NM_002052.2)、NEIL2遺伝子(GenBank番号:NM_145043.1)、FDFT1遺伝子(GenBank番号:NM_004462.3)、NFIB遺伝子(GenBank番号:NM_005596.2)、MELK遺伝子(GenBank番号:NM_014791.2)、PRUNE2遺伝子(GenBank番号:NM_138818.2)、FOXB2遺伝子(GenBank番号:NM_001013735.1)、NIPSNAP3A遺伝子(GenBank番号:NM_015469.1)、NIPSNAP3B遺伝子(GenBank番号:NM_018376.2)、ADARB2遺伝子(GenBank番号:NM_018702.1)、ERCC6遺伝子(GenBank番号:NM_000124.1)、PGBD3遺伝子(GenBank番号:NM_170753.1)、COL13A1遺伝子(GenBank番号:NM_080814.2)、KCNA1遺伝子(GenBank番号:NM_002247.2)、MPHOSPH遺伝子(GenBank番号:NM_016195.2)、PCGF5遺伝子(GenBank番号:NM_032373.3)、SEMA4G遺伝子(GenBank番号:NM_017893.2)、MRPL43遺伝子(GenBank番号:NM_176792.1)、PEO1遺伝子(GenBank番号:NM_021830.3)、BUB3遺伝子(GenBank番号:NM_004725.2)、HMX1遺伝子(GenBank番号:NM_005519.1)、FLJ46831遺伝子(GenBank番号:NM_207426.1)、CLRN3遺伝子(GenBank番号:NM_152311.1)、PTPRE遺伝子(GenBank番号:NM_006504.3)、TRIM68遺伝子(GenBank番号:NM_018073.5)、CYP2R1遺伝子(GenBank番号:NM_024514.4)、CALCA遺伝子(GenBank番号:NM_001741.2)、ZBTB3遺伝子(GenBank番号:NM_024784.2)、POLR2G遺伝子(GenBank番号:NM_002696.1)、TAF6L遺伝子(GenBank番号:NM_006473.2)、NXF1遺伝子(GenBank番号:NM_006362.3)、STX5遺伝子(GenBank番号:NM_003164.3)、WDR74遺伝子(GenBank番号:NM_018093.1)、SLC3A2遺伝子(GenBank番号:NM_002394.4)、CHRM1遺伝子(GenBank番号:NM_000738.2)、KRT2遺伝子(GenBank番号:NM_000423.2)、KRT1遺伝子(GenBank番号:NM_006121.3)、SPG20遺伝子(GenBank番号:NM_015087.3)、CCNA1遺伝子(GenBank番号:NM_003914.2)、EGLN3遺伝子(GenBank番号:NM_022073.2)、TITF1遺伝子(GenBank番号:NM_001079668.1)、NKX2-B遺伝子(GenBank番号:NM_014360.2)、PAX9遺伝子(GenBank番号:NM_006194.1)、PTGDR遺伝子(GenBank番号:NM_000953.2)、PTGER2遺伝子(GenBank番号:NM_000956.2)、ONECUP1遺伝子(GenBank番号:NM_004498.1)、IQCH遺伝子(GenBank番号:NM_001031715.1)、LBXCOR1遺伝子(GenBank番号:NM_01031807.1)、ETF A遺伝子(GenBank番号:NM_000126.2)、ISL2遺伝子(GenBank番号:NM_145805.1)、DNAJA4遺伝子(GenBank番号:NM_018602.2)、WDR61遺伝子(GenBank番号:NM_025234.1)、IREB2遺伝子(GenBank番号:NM_004136.1)、NETO2遺伝子(GenBank番号:NM_018092.3)、JMJD5遺伝子(GenBank番号:NM_024773.1)、SALL1遺伝子(GenBank番号:NM_002968.2)、CMTM3遺伝子(GenBank番号:NM_181553.1)、LHX1遺伝子(GenBank番号:NM_005568.2)、AATF遺伝子(GenBank番号:NM_012138.3)、KRT33A遺伝子(GenBank番号:NM_004138.2)、KRT33B遺伝子(GenBank番号:NM_002279.3)、KRT34遺伝子(GenBank番号:NM_021013.3)、KRT31遺伝子(GenBank番号:NM_002277.2)、KRT37遺伝子(GenBank番号:NM_003770.4)、KRT38遺伝子(GenBank番号:NM_006771.3)、KRT32遺伝子(GenBank番号:NM_002278.3)、KRT35遺伝子(GenBank番号:NM_002280.4)、KRT36遺伝子(GenBank番号:NM_003771.4)、KRT13遺伝子(GenBank番号:NM_153490.1)、ONECUT2遺伝子(GenBank番号:NM_004852.2)、POU3F4遺伝子(GenBank番号:NM_000307.2)、及び、PCDH19遺伝子(GenBank番号:NM_020766.1)において、CpGアイランドが高頻度にメチル化されていることを見出した。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

これにより、食道癌細胞では、上記の遺伝子（以下、本明細書において、これらの遺伝子を「食道癌関連遺伝子」と記載する場合がある）のゲノムDNAのCpGアイランドが高頻度にメチル化される変異が認められ、当該ゲノムDNAのCpGアイランドにおけるメチル化を指標として、食道癌を検出することが可能であることが明らかになった。また、一般に、ゲノムDNAのCpGアイランドにおけるメチル化は、当該ゲノムDNAに係わる遺伝子の働きを不活性化することが知られており、CpGアイランドにおけるメチル化は、食道癌を示す指標となり得ることが明らかとなった。

【 0 0 1 1 】

すなわち、本発明は、食道上皮細胞における、上記の食道癌関連遺伝子から選ばれる1種以上における、当該遺伝子のゲノムDNAにおけるCpGアイランドのメチル化等の変異を指標として、当該食道上皮細胞の癌化を検出する食道癌の検出方法（以下、本検出方法ともいう）を提供する発明である。

10

【 0 0 1 2 】

本検出方法において、上記の食道癌関連遺伝子の変異を検出する対象となる食道上皮細胞は、検体提供者の生検組織細胞が好適である。この検体組織細胞は、健常人の食道細胞か、食道癌患者の当該食道癌組織であるかを問わないが、現実的には、1)内視鏡検査等の結果、食道に癌化が疑われる病変部が認められた場合の当該病変組織、または、2)食道癌であることが確定しているが、その悪性度や進行度を判定する必要がある食道癌の組織、等が主な対象となり得る。

20

【 0 0 1 3 】

後述するように、本検出方法における「食道癌関連遺伝子の変異」は、(1)食道上皮細胞における前記遺伝子発現値の低値若しくは高値への偏り、(2)食道癌関連遺伝子のゲノムDNAのメチル化、(3)食道癌関連遺伝子がコードする蛋白質レベルの低値若しくは高値への偏り、等として検出される。本検出方法により、「内視鏡検査等の結果、食道に癌化が疑われる病変部が認められた場合の当該病変組織」における、上記食道癌関連遺伝子の異常が認められた場合には、当該病変組織は癌化に向かって進行しているか或いは既に癌化の状態であり、かつ、悪性度が高くなりつつある可能性があることが判明し、早急な本格的治療（手術等による病変部の除去、本格的な化学療法等）を行う必要性が示される。また、「食道癌であることが確定しているが、その悪性度や進行度を判定する必要がある食道癌の組織」における、上記食道癌関連遺伝子の異常が認められた場合にも、当該食道癌組織の悪性度が高くなりつつあり、かつ、リンパ節転移が疑われる場合がある。よって、早急な本格的治療（手術等による病変部の除去、リンパ節隔清、本格的な化学療法等）を行う必要性が示される。検体として採取された食道細胞組織は、必要な処理、例えば、採取された組織からのDNA或いはRNAの調製を行い、本検出方法を行う対象とすることができる。

30

【 0 0 1 4 】

本検出方法において、上記の食道癌関連遺伝子の変異は、食道上皮細胞における、当該遺伝子のゲノムDNA、当該遺伝子を鋳型として発現するmRNA、当該mRNAを鋳型とするcDNA、又は、当該遺伝子がコードする蛋白質、を介して検出される。

40

【 0 0 1 5 】

そして、当該変異の検出は、CGH (Comparative Genomic Hybridization) 法、マスマレイ法、Methylation-specific PCR法、MethylLight法、サザンプロット法、Bisulfiteシーケンス法、COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) 法、BAMCA (Bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification) 法、メチレーションチップ法（以上、DNAのメチル化の検出に好適な手段）；DNAチップ法、ノーザンプロット法、RT-PCR法（以上、発現するmRNAレベルの検出に好適な手段）；免疫染色法（蛋白質レベルを検出）等の手段にて行うことができる。

【 0 0 1 6 】

50

本検出方法は、上述したように、食道上皮細胞における上記の食道癌関連遺伝子の異常を検出することにより、当該細胞の癌化を特定することが可能である。この食道癌関連遺伝子の異常の主要な原因の一つとして、当該遺伝子のゲノムDNAのCpGアイランドのメチル化が挙げられる。

【0017】

CpGアイランドのメチル化による不活性化については、CpGリッチプロモーター及びエクソン領域を密にメチル化すると転写不活化がおこることが報告されている (Bird, A.P. & Wolffe, A.P.: Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin, Cell 99, 451-454, 1999)。癌細胞では、CpGアイランドはそれ以外の領域と比較すると高い頻度で密にメチル化されており、プロモーター領域のHypermethylationは、ヒト癌での癌抑制遺伝子の不活化に深く関与している (Ehrlich, M., Jiang, G., Fiala, E., Dome, J.S., Yu, M.C., Long, T.I., Youn, B., Sohn, O.S., Widschwendter, M., Tomlinson, G.E., Chintagumpala, M., Champagne, M., Parham, D., Liang, G., Malik, K. & Laird, P.W.: Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors, Oncogene, 21, 6694-6702, 2002)。

10

【0018】

上記の食道癌関連遺伝子における変異が、ゲノムDNAのCpGアイランドのメチル化である場合には、CGH法を用いることは、本検出方法の有利な形態の一つであり、さらに、当該CGH法において用いる検出用基板に定着させる複数種類のゲノムDNAが、BAC DNA、YAC(Yeast Artificial Chromosome) DNA、又は、PAC(Phage Artificial Chromosome) DNA (以下、BAC DNA等ともいう) の遺伝子増幅産物であることが有利である。

20

【0019】

通常に得られるBAC DNA等は、ゲノムDNA定着基板を多数製造して実用化するには少量であるので、当該DNAを遺伝子増幅産物として得る必要がある (この遺伝子増幅行程を「無尽蔵化又は無尽資源化」ともいう)。無尽蔵化においては、まずBAC DNA等を、4塩基認識酵素、例えば、RsaI、DpnI、HaeIII等で消化した後、アダプターを加えてライゲーションを行う。アダプターは10~30塩基、好適には15~25塩基からなるオリゴヌクレオチドで、2本鎖は相補的配列を有し、アニーリング後、平滑末端を形成する側の3'-末端のオリゴヌクレオチドをリン酸化する必要がある。次に、アダプターの一方のオリゴヌクレオチドと同一配列部分を有するプライマーを用いて、PCR法により増幅し、無尽蔵化することができる。一方、各BAC DNA等に特徴的な50~70塩基のアミノ化オリゴヌクレオチドを、アレイ上にスポットし、検出基板上で使用することもできる。

30

【0020】

このようにして無尽蔵化したBAC DNA等を基板上、好適には固体基板上に定着させることにより、所望するDNA定着基板を製造することができる。固体基板としては、ガラス、プラスチック、メンブレン、3次元アレイ等があげられ、スライドガラス等のガラス基板が好ましい。ガラス等の固体基板は、ポリ-L-リジン、アミノシラン、金・アルミニウム等の凝着により基板をコートすることがより好ましい。

【0021】

上記の無尽蔵化したDNAを基板上にスポットして乾燥させることにより、無尽蔵化したBAC DNA等を基板上、好適には固体基板上に定着させることにより、所望するDNA定着基板を製造することができる。

40

【0022】

さらに、上記の食道癌関連遺伝子のゲノムDNAのCpGアイランドのメチル化の検出手段として、上記した遺伝子のメチル化の検出手段のうち、マスアレイ法、Methylation-specific PCR法、Bisulfiteシーケンス法、メチレーションチップ法、COBRA法、及び、BAMCA法等を好適に用いることができる。

【0023】

マスアレイ法は、塩基特異的切断反応とMALDI-TOF MSを組み合わせた定量的DNAメチル化解析システムで、200~600塩基対内の個々のCpGサイトのメチル化比率を定量

50

可能であり、メチル化プロファイルの作成ができる。

【0024】

Methylation-specific PCR法は、DNAに対してBisulfite処理を行い、メチル化されていないシトシン(C)をウラシル(U)に変換する。メチル化されたCは変換されないため、それを認識するプライマーを用いてPCRを行うと、メチル化された配列だけが増幅し検出できる。このMethylation-specific PCR法を改良し、リアルタイムPCRを用いて定量する方法としてMethylLight法が知られている。

【0025】

Bisulfiteシーケンス法は、DNAをBisulfite処理することにより、メチル化されていないシトシン(C)はウラシル(U)となり、処理後のDNAをPCRで増幅するとメチル化されていないCはチミン(T)となり、メチル化されたCはCのままとなるため、それをシーケンス解析により判定できる。

10

【0026】

メチレーションチップ法は、ターゲットDNAをBisulfite処理しビオチンを導入した試料をPCR法により作成し、異なる種類のDNAオリゴマーを多数固定した基板でハイブリダイズさせる。次に、ストレプトアビジン-山葵パーオキシダーゼおよび発色基質溶液を用いて、特異的にハイブリダイズしたターゲットDNAを発色反応により可視化する。これによりハイブリダイズする領域のメチルの程度を定量できる。

【0027】

COBRA(Combined Bisulfite Restriction Analysis)法は、Methylation-specific PCR法と制限酵素での消化を組み合わせたメチル化DNAの定量法である。Methylation-specific PCR法を行った後に制限酵素での消化を行いアガロースゲル電気泳動でDNA断片を分離する。制限酵素消化後の断片に含まれるCGCG配列のメチル化の定量について述べる。Cがメチル化されていない場合には、Bisulfite処理とその後のPCR反応によりTに変換されるため、CGCG配列はTGTG配列に変化する。CGCG配列を認識する制限酵素BstUIで消化するとメチル化されている場合は本断片が消化され短くなった断片が生成する。しかし、メチル化されていない場合には消化されないため元のサイズの断片のままであり、この断片の大きさの違いをアガロースゲル電気泳動による分離で検出し、各断片の量を、デンストメーター等にて定量する。また、BAMCA法の説明は図1に記載した。

20

【0028】

上記の食道癌関連遺伝子の変異の確認は、遺伝子の転写産物、すなわち、検体における、上記の食道癌関連遺伝子がコードする蛋白質の存在又は不存在、あるいは、増量又は減量、すなわち、食道癌関連遺伝子がコードする蛋白質レベルの低値若しくは高値への偏りを検出することにより行うことができる。代表的な方法として、免疫染色法を挙げることができる。すなわち、検体(代表的には食道癌組織の標本)における、上記の食道癌関連遺伝子がコードする蛋白質を、当該蛋白質に対して特異的な抗体(モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体:既知の食道癌関連遺伝子又は当該食道癌関連遺伝子がコードする蛋白質(通常は組換え蛋白)を用いて常法により調製することが可能であり、対象遺伝子の種類によっては市販もされている)を用いて直接的(標識された上記の食道癌関連遺伝子がコードする蛋白質に対する抗体を用いた直接抗体結合法)、又は、好適には間接的に(標識された第2若しくは第3抗体を用いた二重抗体法又は三重抗体法)検出することが可能である。かかる免疫染色法は常法に従い行うことができる。

30

40

【0029】

上記の食道癌関連遺伝子の欠失は、ゲノムDNAのCpGアイランドのメチル化に比べれば、頻度はそれほど多くない。遺伝子欠失の検出を直接的に行うことができる代表的な方法として、上記のCGH法とFISH法[蛍光in situ ハイブリダイゼーション(FISH: Fluorescence in situ hybridization): Yasui, K., Imoto, I., Fukuda, Y., Pimkahaokham, A., Yang, Z. Q., Naruto, T., Shimada, Y., Nakamura, Y., and Inazawa: Identification of target genes within an amplicon at 14q12-q13 in esophageal squamous cell carcinoma. Genes Chromosomes Cancer, 32, 112-118, 2001]を挙げることができる。

50

【 0 0 3 0 】

また、上記の食道癌関連遺伝子の欠失を直接的に検出する手段の一つとしてサザンプロット法を挙げることができる。サザンプロット法は、検体から得られるゲノムDNAを制限酵素消化し、それを電気泳動後、ニトロセルロース膜上に固定し、これと、食道癌関連遺伝子とのハイブリダイズを検出することにより、検体中の当該遺伝子の存在を検出する方法である。また、検体から得られるmRNAをニトロセルロース膜に固定するノーザンプロット法を用いることも可能である。

【 0 0 3 1 】

このノーザンプロット法等のmRNAを基に食道癌関連遺伝子の欠失等を検出する場合に用いるcDNAは、例えば、RT-PCR法により得られる遺伝子増幅産物を用いることができる。また、mRNAを基に食道癌関連遺伝子の欠失等の検出には、DNAチップ法も好適である。すなわち、食道上皮細胞における前記遺伝子発現値の低値若しくは高値への偏りの検出に好適な手段として、DNAチップ法、ノーザンプロット法、又は、RT-PCR法を挙げることができる。

10

【 発明の効果 】

【 0 0 3 2 】

本発明により、遺伝子解析による優れた食道癌の検出手段が提供される。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 3 3 】

[参考例 1] 多数の癌関連遺伝子を搭載した高密度CGHアレイの作製

20

National Cancer for Biotechnology Information及びUniversity of California Santa Cruz Biotechnologyのゲノムデータベースウェブサイト並びに選択されたDNAのBLAST検索の結果から、ヒトゲノムのユークロマチン領域に存在する4523種類のBAC/PACクローンを選択した。

【 0 0 3 4 】

BAC及びPAC DNAをDpnI、RsaI、HaeIIIで消化し、その後アダプター合成オリゴヌクレオチドとのライゲーションを行った。次に、アダプターの配列を有するプライマーを用いてPCRを2回行った。このプロセスを無尽蔵化といい、得られたDNAを無尽蔵化DNAと定義する。無尽蔵化DNAをインクジェットタイプのスポッター（GENESHOT、NGK Insulators、名古屋）を使用してDuplicateでアレイ上にスポットして、所望の高密度CGHアレイを作製した（MCG Whole Genome Array-4500）。

30

【 0 0 3 5 】

[実施例] 食道扁平上皮癌細胞のゲノムDNAメチル化の状況

食道扁平上皮癌細胞でどのような染色体遺伝子が高度にメチル化されているかを、BAMCA法を用いて調べた。図2は、BAMCA法を用いた解析の要約と結果の一部を示している。BAMCA法を用いた解析の実例は、[Misawa A., Inoue J., Sugino Y., Hosoi H., Sugimoto T., Hosoda F., Ohki M., Imoto I., Inazawa J.: Methylation-associated silencing of the nuclear receptor 112 gene in advanced-type neuroblastomas, identified by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification, Cancer Research 65, 10233-10242, 2005]に報告されている。

40

【 0 0 3 6 】

食道扁平上皮癌細胞株としてTE-4、TE-5、KYSE-150、KYSE-510を用いた。正常な食道上皮細胞として正常食道上皮由来細胞株NEK2を用いた。癌細胞と正常細胞からDNAを調製し、MCG Whole Genome Array-4500を用いてBAMCA法での解析を行った（図2の番号1と11を参照）。上記4種類の食道扁平上皮癌細胞でCy3(癌細胞)/Cy5(コントロール正常細胞)の比が1.5以上を示す高度にメチル化されている染色体DNAに相当するBACクローンは61種類でその中に103種類の遺伝子を含んでいた（図2の番号2を参照）。

【 0 0 3 7 】

表1-1~9に、上記の要領で選択した61種類のBACクローンとそれらのクローンに含まれる103種類の遺伝子群を表示する(No.(1st)で表示)。これらの103種類の遺

50

伝子は、全て、食道癌関連遺伝子であると認められる。

【 0 0 3 8 】

【 表 1 - 1 】

表1-1 BAMCA法を用いて選択されたBACクローン及びそれに含まれる遺伝子のリスト(1)

BAC			遺伝子							実験結果				
番号	BACクローン名	染色体座	No. ¹⁾ (1st)	遺伝子名	遺伝子のフルネーム(正式名)	Entrez ID 番号	塩基配列ID番号	機能	CpG island	SmaI 部位 ²⁾	癌での発現パターン ³⁾	No. ⁴⁾ (2nd)	ESCC細胞での 遺伝子発現の 減少 ⁵⁾	ESCC細胞での遺伝子 発現減少が認められた 遺伝子のCpG island の過剰メチル化の有無 ⁶⁾
1	RP11-99A8	1p22.2	1	<i>BARHL2</i>	<i>BarH-like 2</i>	343472	NM_020063.1	Transcription factor	yes	+	情報なし	1		
2	RP11-82E1	1p22.2		(<i>BARHL2</i>)										
3	RP11-66D17	1q23.1	2	<i>NES</i>	<i>nestin</i>	10763	NM_006617.1	Intermediate filament protein	yes	+		2		
			3	<i>CRABP2</i>	<i>cellular retinoic acid binding protein 2</i>	1382	NM_001878.2	Carrier proteins for members of the vitamin A family	yes	+		3		
			4	<i>ISG20L2</i>	<i>interferon stimulated exonuclease gene 20kDa-like 2</i>	81875	NM_030980.1	Exonuclease	yes	+		4		
			5	<i>MRPL24</i>	<i>mitochondrial ribosomal protein L24</i>	79590	NM_145729.1	Mitochondrial ribosomal proteins	yes	-				
			6	<i>HGDF</i>	<i>hepatoma-derived growth factor (high-mobility group protein 1-like)</i>	3068	NM_004494.1	Growth factor	yes	+		5		
			7	<i>PRCC</i>	<i>papillary renal cell carcinoma</i>	5546	NM_199416.1	Unknown	yes	-				
4	RP11-180B22	1q23.1	8	<i>SH2D2A</i>	<i>SH2 domain protein 2A</i>	9047	NM_003975.2	SH3/SH2 adaptor protein	no					
			9	<i>NTRK1</i>	<i>neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1</i>	4914	NM_001007792.1	Tyrosine kinase receptor	yes	+		6		
5	RP11-73D7	1q31.3	10	<i>LHX9</i>	<i>LIM homeobox 9</i>	56956	NM_001014434.1	Transcription factor	yes	+		7		
6	RP11-123I5	1q42.2	11	<i>TARBP1</i>	<i>TAR RNA binding protein 1</i>	6894	NM_005646.3	RNA binding protein	yes	+		8		
7	RP11-81F3	2p11.2	12	<i>RMND5A</i>	<i>required for meiotic nuclear division 5 homolog A</i>	64795	NM_022780.2	Cell cycle	yes	+		9		

10

20

【 0 0 3 9 】

【表 1 - 2】

表1-2 BAMCA法を用いて選択されたBACクローン及びそれに含まれる遺伝子のリスト(2)

BAC			遺伝子						実験結果					
番号	BACクローン名	染色体産位	No. ^a (1st)	遺伝子名	遺伝子のフルネーム(正式名)	Entrez ID 番号	塩基配列ID番号	機能	CpG island	SmaI 部位 ^b	癌での発現パターン ^c	No. ^d (2nd)	ESCC細胞での 遺伝子発現の 減少 ^e	ESCC細胞での遺伝子 発現減少が認められた 遺伝子のCpG island の過剰メチル化の有無 ^f
			13	CD8A	CD8 antigen alpha polypeptide isoform 1	925	NM_001768.5	Coreceptor	yes	+		10		
8	RP11-1719	4p16.1	14	SLC2A9	solute carrier family 2 member 9 protein	56606	NM_020041.2	Glucose transporter	no					
			15	WDR1	WD repeat-containing protein 1 isoform	9948	NM_005112.4	Disassembly of actin filaments	yes	+		11		
9	RP11-205N12	4p15.1	16	PCDH7	protocadherin 7 isoform c precursor	5099	NM_032457.1	Cell-cell recognition and adhesion	yes	+		12		
10	RP11-17P19	4q21.21	17	FRAS1	Fraser syndrome 1	80144	NM_025074.4	Extracellular matrix protein	yes	+		13		
11	RP11-81L1	5q23.2												
12	RP11-183F3	6p22.1	18	BTN1A1	butyrophilin subfamily 1 member A1	696	NM_001732.1	Cell surface receptor	no					
			19	HMGN4	high mobility group nucleosomal binding domain 4	10473	NM_006353.2	Chromatin structure	yes	+		14		
			20	ABT1	activator of basal transcription 1		NM_013375.2	Transcriptional coactivator	yes	+		15		
13	RP11-451M2	6p22.1	21	ZNF184	zinc finger protein 184 (Kruppel-like)	7738	NM_007149.1	Unknown	yes	+		16		
14	RP11-71C20	6p21.33												
15	RP11-79J5	6p21.1	22	UNC5CL	unc-5 homolog C-like	222843	NM_173561.1	Inhibitor of NF-kappaB activation	no					
			23	BZRPL1	benzodiazepine receptor (peripheral)-like 1	222842	NM_001010873.1	Membrane receptor	no					

10

20

【 0 0 4 0】

【表 1 - 3】

表1-3 BAMCA法を用いて選択されたBACクローン及びそれに含まれる遺伝子のリスト(3)

BAC			遺伝子						実験結果					
番号	BACクローン名	染色体産位	No. ^a (1st)	遺伝子名	遺伝子のフルネーム(正式名)	Entrez ID 番号	塩基配列ID番号	機能	CpG island	SmaI 部位 ^b	癌での発現パターン ^c	No. ^d (2nd)	ESCC細胞での 遺伝子発現の 減少 ^e	ESCC細胞での遺伝子 発現減少が認められた 遺伝子のCpG island の過剰メチル化の有無 ^f
			24	APOBEC2	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 2	10630	NM_006789.2	mRNA editing	no					
			25	NFYA	nuclear transcription factor Y alpha isoform 2	4800	NM_021705.2	Transcription factor	yes	+		17	no	
16	RP11-177M14	6q23.2	26	EYA4	eyes absent 4 isoform d	2070	NM_172105.2	transcriptional activator	yes	+		18		
17	RP11-436I24	6q24.2	27	PHACTR2	phosphatase and actin regulator 2	9749	NM_014721.1	Protein phosphatase inhibitor	no					
18	RP11-89B15	7p21.2	28	MEOX2	mesenchyme homeobox 2	4223	NM_005924.4	Transcription factor	no					
19	RP11-34N11	7p15.1	29	PRR15	proline rich 15	222171	NM_175887.2	Unknown	yes	+		19		
20	RP11-115G23	7p14.3	30	TBX20	T-box 20	57057	NM_001077653.1	Transcription factor	yes	+		20		
21	RP11-97P11	7p11.2												
22	RP11-48O1	7q31.32	31	FEZF1	zinc finger protein 312-like	389549	NM_001024613.1	Unknown	no					
23	RP11-235I5	8p23.1	32	GATA4	GATA binding protein 4	2626	NM_002052.2	Transcription factor	yes	+		21		
			33	NEIL2	nei-like 2	252969	NM_145043.1	DNA glycosylase	yes	+		22		
			34	FDFT1	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1	2222	NM_004462.3	Membrane-associated enzyme	yes	+		23		
24	RP11-413C16	9p22.3	35	NFIB	nuclear factor I/B	4781	NM_005598.2	Transcription factor	yes	+		24	no	

30

40

【 0 0 4 1】

50

【表 1 - 4】

表1-4 BAMCA法を用いて選択されたBACクローン及びそれに含まれる遺伝子のリスト(4)

BAC			遺伝子						実験結果					
番号	BACクローン名	染色体座	No. ^a (1st)	遺伝子名	遺伝子のフルネーム(正式名)	Entrez ID 番号	塩基配列ID番号	機能	CpG island	SmaI 部位 ^b	癌での発現パターン ^c	No. ^d (2nd)	ESCC細胞での遺伝子発現の減少 ^e	ESCC細胞での遺伝子発現減少が認められた遺伝子のCpG islandの過剰メチル化の有無 ^f
25	RP11-12P15	9p13.2	36	MELK	maternal embryonic leucine zipper kinase	9833	NM_014791.2	Protein kinase	yes	+	癌細胞 > 正常細胞			
26	RP11-159H20	9q21.13	37	PRUNE2	prune homolog 2	158471	NM_138818.2	Unknown	yes	+		25		
			38	FOXB2	forkhead box B2	442425	NM_001013735.1	Transcription factor	yes	+	情報なし	26		
27	RP11-413C10	9q31.1	39	NIPSNAP3A	nipsnap homolog 3A	25934	NM_015469.1	Vesicular trafficking	yes	-				
			40	NIPSNAP3B	nipsnap homolog 3B	55335	NM_018376.2	Vesicular trafficking	yes	+		27		
28	RP11-79H9	10p15.3	41	ADARB2	adenosine deaminase RNA-specific B2	105	NM_018702.1	RNA-editing	yes	+		28		
29	RP11-66F24	10p12.31-12.2												
30	RP11-92I18	10q11.23	42	ERCC8	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency	2074	NM_000124.1	Transcription-coupled excision repair	yes	+		29	no	
			43	PGBD3	piggyBac transposable element derived 3	267004	NM_170753.1	Transposase	no					
31	RP11-52K17	10q21.3	44	COL13A1	collagen, type XIII, alpha 1	1305	NM_080814.2	Alpha chain of one of the nonfibrillar collagens	yes	+		30		
32	RP11-17O5	10q22.3	45	KCNMA1	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1	3778	NM_002247.2	Potassium channels	yes	+		31	yes	no
33	RP11-428P16	10q22.3		(KCNMA1)										

10

20

【 0 0 4 2】

【表 1 - 5】

表1-5 BAMCA法を用いて選択されたBACクローン及びそれに含まれる遺伝子のリスト(5)

BAC			遺伝子						実験結果					
番号	BACクローン名	染色体座	No. ^a (1st)	遺伝子名	遺伝子のフルネーム(正式名)	Entrez ID 番号	塩基配列ID番号	機能	CpG island	SmaI 部位 ^b	癌での発現パターン ^c	No. ^d (2nd)	ESCC細胞での遺伝子発現の減少 ^e	ESCC細胞での遺伝子発現減少が認められた遺伝子のCpG islandの過剰メチル化の有無 ^f
34	RP11-248C1	10q23.31	46	MPHOSPH1	M-phase phosphoprotein 1	9585	NM_016195.2	Cell cycle	yes	+		32		
35	RP11-90B18	10q23.32	47	PCGF5	polycomb group ring finger 5	84333	NM_032373.3	Transcription factor	yes	+		33		
36	RP11-37L21	10q24.31	48	SEMA4G	semaphorin 4G	57715	NM_017893.2	Axon guidance ligands	yes	+		34		
			49	MRPL43	mitochondrial ribosomal protein L43	84545	NM_176792.1	Mitochondrial ribosomal protein	yes	+		35		
			50	PEO1	progressive external ophthalmoplegia 1	56652	NM_021830.3	Mitochondrial helicase	yes	+		36		
37	RP11-162A23	10q26.12	51	BUB3	BUB3 budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog	9184	NM_004725.2	Spindle checkpoint function	yes	+	癌細胞 > 正常細胞			
			52	HMX1	homeo box (H6 family) 2	3167	NM_005519.1	Transcription factor	yes	+		37		
38	RP11-88B12	10q26.2	53	FLJ46831	homolog of mouse Foxi2	39923	NM_207426.1	Transcription factor	yes	+		38		
			54	CLRN3	clarin 3	119467	NM_152311.1	Unknown	no					
			55	PTPRE	protein tyrosine phosphatase receptor type E	5791	NM_006504.3	Protein tyrosine phosphatase	yes	+		39		
39	RP11-90P9	11p15.4	56	TRIM68	tripartite motif-containing 68	55128	NM_018073.5	Unknown	yes	-				
40	RP11-91I5	11p15.2	57	CYP2R1	cytochrome P450, family 2, subfamily R, polypeptide 1	120227	NM_024514.4	The cytochrome P450 monooxygenase	yes	+		40		
			58	CALCA	calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	796	NM_001741.2	Hormone	yes	-				

30

40

【 0 0 4 3】

【表 1 - 6】

表1-6 BAMCA法を用いて選択されたBACクローン及びそれに含まれる遺伝子のリスト(6)

BAC			遺伝子						実験結果						
番号	BACクローン名	染色体産位	No. ^a (1st)	遺伝子名	遺伝子のフルネーム(正式名)	Entrez ID 番号	塩基配列ID番号	機能	CpG island	SmaI 部位 ^b	癌での発現パターン ^c	No. ^d (2nd)	ESCC細胞での 遺伝子発現の 減少 ^e	ESCC細胞での遺伝子 発現減少が認められた 遺伝子のCpG island の過剰メチル化の有無 ^f	
41	RP11-49D19	11q12.3	59	ZBTB3	zinc finger and BTB domain containing 3	79842	NM_024784.2	Transcription factor	yes	+		41			
			60	POLR2G	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G	5436	NM_002696.1	Subunit of RNA polymerase II	yes	-					
			61	TAF6L	TAF6-like RNA polymerase II, p300/CBP-associated factor (PCAF)-associated factor, 65kDa	10629	NM_006473.2	Transcription initiation	yes	-					
			62	NXF1	nuclear RNA export factor 1	10482	NM_006362.3	Nuclear RNA export factor	yes	-					
			63	STX5	syntaxin 5	6811	NM_003164.3	Maintenance of the Golgi structures	yes	-					
			64	WDR74	WD repeat domain 74	54663	NM_018093.1	Unknown		no					
			65	SLC3A2	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	6520	NM_002394.4	Integrin-dependent signaling	yes	+	癌細胞 > 正常細胞				
66	CHRM1	cholinergic receptor muscarinic 1	1128	NM_000738.2	G protein-coupled receptor		no								
42	RP11-97N16	12q13.13	67	KRT2	keratin 2	3849	NM_000423.2	Keratin		no					
			68	KRT1	keratin 1	3848	NM_006121.3	Keratin		no					
43	RP11-91K18	13q13.3	69	SPG20	spastic paraplegia 20, spartin	23111	NM_015087.3	Endosomal trafficking and microtubule dynamics	yes	-					
			70	CCNA1	cyclin A1	8900	NM_003914.2	Cell cycle	yes	+		42			
44	RP11-105F9	14q13.1	71	EGLN3	egl nine homolog 3	112399	NM_022073.2	Oxidoreductase	yes	+		43			

10

20

【 0 0 4 4 】

【表 1 - 7】

表1-7 BAMCA法を用いて選択されたBACクローン及びそれに含まれる遺伝子のリスト(7)

BAC			遺伝子						実験結果					
番号	BACクローン名	染色体産位	No. ^a (1st)	遺伝子名	遺伝子のフルネーム(正式名)	Entrez ID 番号	塩基配列ID番号	機能	CpG island	SmaI 部位 ^b	癌での発現パターン ^c	No. ^d (2nd)	ESCC細胞での 遺伝子発現の 減少 ^e	ESCC細胞での遺伝子 発現減少が認められた 遺伝子のCpG island の過剰メチル化の有無 ^f
45	RP11-458A21	14q13.3	72	TTF1	thyroid transcription factor 1	7080	NM_001079668.1	Transcription factor	yes	-				
			73	NKX2-8	NK2 transcription factor related, locus 8	26257	NM_014360.2	Transcription factor	yes	+		44		
			74	PAX9	paired box gene 9	5083	NM_006194.1	Transcription factor	yes	-				
46	RP11-262M8	14q22.1	75	PTGDR	prostaglandin D2 receptor	5729	NM_000953.2	Membrane receptor	yes	+		45		
			76	PTGER2	prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa	5732	NM_000956.2	Membrane receptor	yes	+		46		
47	RP11-209K10	15q21.2	77	ONECUT1	one cut domain family member 1	3175	NM_004498.1	Transcription factor	yes	+		47		
48	RP11-85E15	15q23	78	IQCH	IQ motif containing H	64799	NM_001031715.1	Kinase	yes	+		48		
49	RP11-207J8	15q23	79	LBXCOR1	LBXCOR1 homolog	390598	NM_001031807.1	Transcriptional corepressor	yes	-				
50	RP11-79J21	15q24	80	ETFA	electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide	2108	NM_000126.2	Mitochondrial fatty acid beta-oxidation	yes	+		49		
			81	ISL2	ISL2 transcription factor, LIM/homeodomain, (islet-2)	64843	NM_145805.1	Transcription factor	yes	+		50		
51	RP11-10K12	15q24	82	DNAJA4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4	55486	NM_018802.2	Protein folding	yes	+		51		
			83	WDR61	WD repeat domain 61	80349	NM_025234.1	Transcriptional regulation		no				
			84	IREB2	iron-responsive element binding protein 2	3658	NM_004136.1	Iron ion homeostasis	yes	-				

30

40

【 0 0 4 5 】

50

【表 1 - 8】

表1-8 BAMCA法を用いて選択されたBACクローン及びそれに含まれる遺伝子のリスト(8)

BAC			遺伝子						実験結果				
番号	BACクローン名	染色体座	No. ^a (1st)	遺伝子名	遺伝子のフルネーム(正式名)	Entrez ID 番号	塩基配列ID番号	機能	CpG island	SmaI 部位 ^b 産での発現パターン ^c	No. ^d (2nd)	ESCC細胞での遺伝子発現の減少 ^e	ESCC細胞での遺伝子発現減少が認められた遺伝子のCpG islandの過剰メチル化の有無 ^f
52	RP11-215M5	16q12.1	85	NETO2	neuropilin- and tolloid-like protein 2	81831	NM_018092.3	Unknown	yes	+	癌細胞 > 正常細胞		
53	RP11-309I14	16p12.1	86	JMJD5	jumonji domain containing 5	79831	NM_024773.1	Unknown	yes	+		52	
54	RP11-424K7	16q12.1	87	SALL1	sal-like 1	6299	NM_002968.2	Transcription factor	yes	+		53	
55	RP11-3A9	16q21	88	CMTM3	chemokine-like factor superfamily 3	123920	NM_181553.1	Chemokine-like factor	yes	+		54	
56	RP11-81D5	17q12	89	LHX1	LIM homeobox 1	3975	NM_005568.2	Transcriptional regulator	yes	+		55	
			90	AA7F	apoptosis antagonizing transcription factor	26574	NM_012138.3	Transcription factor	yes	-			
57	RP11-29C11	17q21.2	91	KRT33A	keratin 33A	3883	NM_004138.2	Keratin	no				
			92	KRT33B	keratin 33B	3884	NM_002279.3	Keratin	no				
			93	KRT34	keratin 34	3885	NM_021013.3	Keratin	no				
			94	KRT31	keratin 31	3881	NM_002277.2	Keratin	no				
			95	KRT37	keratin 37	8688	NM_003770.4	Keratin	no				
			96	KRT38	keratin 38	8687	NM_006771.3	Keratin	no				
			97	KRT32	keratin 32	3882	NM_002278.3	Keratin	no				

10

20

【 0 0 4 6】

【表 1 - 9】

表1-9 BAMCA法を用いて選択されたBACクローン及びそれに含まれる遺伝子のリスト(9)

BAC			遺伝子						実験結果				
番号	BACクローン名	染色体座	No. ^a (1st)	遺伝子名	遺伝子のフルネーム(正式名)	Entrez ID 番号	塩基配列ID番号	機能	CpG island	SmaI 部位 ^b 産での発現パターン ^c	No. ^d (2nd)	ESCC細胞での遺伝子発現の減少 ^e	ESCC細胞での遺伝子発現減少が認められた遺伝子のCpG islandの過剰メチル化の有無 ^f
			98	KRT35	keratin 35	3886	NM_002280.4	Keratin	no				
			99	KRT36	keratin 36	8689	NM_003771.4	Keratin	no				
			100	KRT13	keratin 13	3860	NM_153490.1	Keratin	no				
58	RP11-79L5	18q21.31	101	ONECUT2	one cut domain, family member 2	9480	NM_004852.2	Transcription factor	yes	+		56	
59	RP11-124D1	20q13.13											
60	RP11-246G22	Xq21.1	102	POU3F4	POU domain, class 3, transcription factor 4	5456	NM_000307.2	Transcription factor	yes	+		57	
61	RP11-99E24	Xq22.1	103	PCDH19	protocadherin 19	57526	NM_020766.1	Cell-cell adhesion	yes	+		58	

30

40

^a BAMCA法を用いて選択した103種類の遺伝子のID番号
^b 各々の遺伝子の転写開始部位近傍に少なくとも2ヶ所のSmaI制限酵素部位が検出されるケースを(+), 検出されないケースを(-)で表示した
^c 2種類の遺伝子発現データベースから各々の遺伝子の発現プロファイルを引用した (<http://www.lsbm.org/database/index.html> and <http://www.ncbi.nih.gov/index.html>)
^d ヒトゲノムデータベースを調べて103種類の遺伝子より選択した58種類の遺伝子のID番号
^e ESCC細胞株のバネルを用いてRT-PCR法により解析した遺伝子発現の状況
^f COBRA法を用いて解析したCpGアイランドにおける過剰メチル化の有無の状況

【 0 0 4 7】

また、図2の番号21と3に示すように、当該表1-1~9では、転写開始部位に近い領域におけるCpGアイランドの有無(有りはyes/無しはnoにて表示)と、当該近傍領域における制限酵素SmaI認識配列を有する遺伝子群の有無(有りは+/無しは-で表示)を解析した結果を示している。この解析は、<http://genome.ucsc.edu/>を使用して行った。さらに多数の組織及び癌での発現プロファイルを、<http://www.lsbm.org/database/index.html>及び<http://www.ncbi.nih.gov/index.html>を使用して検討し、食道扁平上皮癌細胞で高度

50

にメチル化されているために発現が著しく低下している58種類の遺伝子を選び出した(N o.(2nd)で表示)。上記表と重複するが、これら58種類の遺伝子群を、下記に示す。これらの遺伝子群は、特に、食道癌関連遺伝子として、強い感受性を有する遺伝子であり、本願発明を構成する食道癌関連遺伝子の中でも、特に好適なものである。

【0048】

「BARHL2遺伝子、NES遺伝子、CRABP2遺伝子、ISG20L2遺伝子、HDGF遺伝子、NTRK1遺伝子、LHX9遺伝子、TARBP1遺伝子、RMND5A遺伝子、CD8A遺伝子、WDR1遺伝子、PCDH7遺伝子、FRAS1遺伝子、HMGN4遺伝子、ABT1遺伝子、ZNF184遺伝子、NFYA遺伝子、EYA4遺伝子、PRR15遺伝子、TBX20遺伝子、GATA4遺伝子、NEIL2遺伝子、FDFT1遺伝子、NFIB遺伝子、PRUNE2遺伝子、FOXB2遺伝子、NIPSNAP3 B 遺伝子、ADARB2遺伝子、ERCC6遺伝子、COL13A1遺伝子、KCNMA1遺伝子、MPHOSPH遺伝子、PCGF5遺伝子、SEMA4G遺伝子、MRPL43遺伝子、PEO1遺伝子、HMX1遺伝子、FLJ46831遺伝子、PTPRE遺伝子、CYP2R1遺伝子、ZBTB3遺伝子、CCNA1遺伝子、EGLN3遺伝子、NKX2-8遺伝子、PTGDR遺伝子、PTGER2遺伝子、ONECUP1遺伝子、IQCH遺伝子、ETFA遺伝子、ISL2遺伝子、DNAJA4遺伝子、JMJD5遺伝子、SALL1遺伝子、CMTM3遺伝子、LHX1遺伝子、ONECUT2遺伝子、POU3F4遺伝子、PCDH19遺伝子」

10

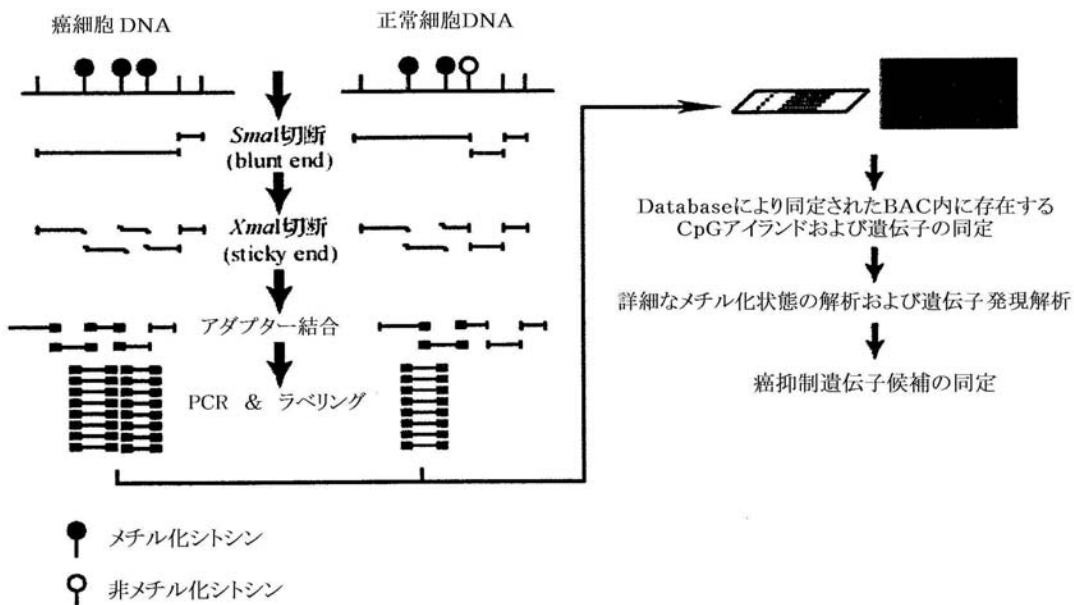
【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】BAMCA法の手順の概略を示した図面である。

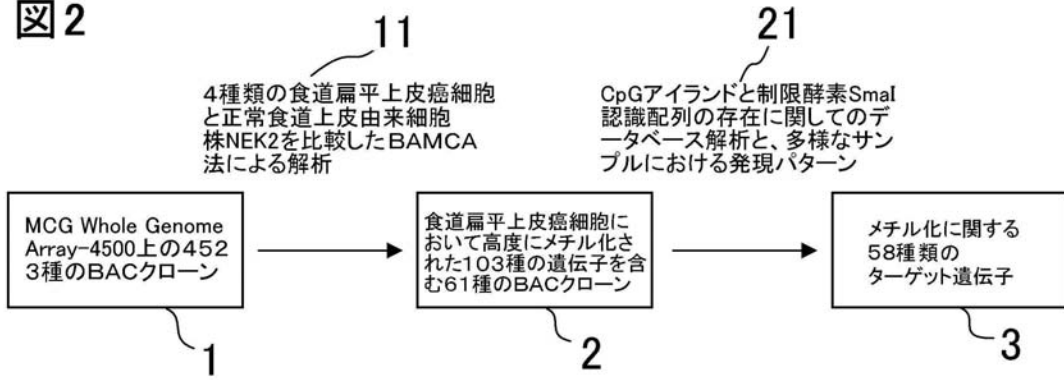
【図2】BAMCA法を用いた解析の要約と結果の一部を示した図面である。

【図1】



【 図 2 】

図 2



フロントページの続き

(72)発明者 田中 浩司

東京都文京区音羽 1 - 8 - 3 パークスクエア文京音羽 1 1 0 5

Fターム(参考) 4B024 AA12 CA02 CA12 HA14

4B063 QA01 QA17 QA18 QA19 QQ08 QQ43 QQ53 QR08 QR32 QR56
QR62 QR84 QS16 QS25 QS34 QS36 QX02

