

(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2011-217726
(P2011-217726A)

(43) 公開日 平成23年11月4日(2011.11.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 ZNAA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 M	
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 575	
GO1N 37/00 (2006.01)	GO1N 37/00 102	

審査請求 未請求 請求項の数 22 O L (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2010-139459 (P2010-139459)
 (22) 出願日 平成22年6月18日 (2010. 6. 18)
 (31) 優先権主張番号 特願2009-155926 (P2009-155926)
 (32) 優先日 平成21年6月30日 (2009. 6. 30)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)
 (31) 優先権主張番号 特願2010-68297 (P2010-68297)
 (32) 優先日 平成22年3月24日 (2010. 3. 24)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 390014960
 シスメックス株式会社
 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
 (74) 代理人 100065248
 弁理士 野河 信太郎
 (72) 発明者 酒井 綾子
 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
 シスメックス株式会社内
 (72) 発明者 田島 慶彦
 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
 シスメックス株式会社内
 (72) 発明者 梶田 昌裕
 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
 シスメックス株式会社内

最終頁に続く

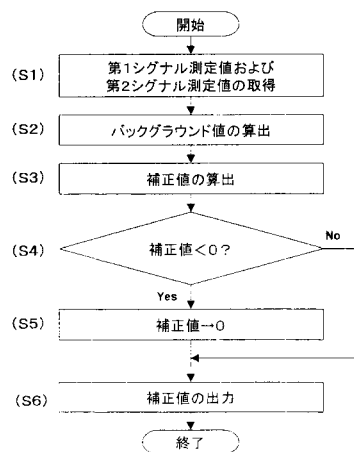
(54) 【発明の名称】 マイクロアレイを用いた核酸の検出方法およびマイクロアレイデータ解析用プログラム

(57) 【要約】

【課題】 検体試料から核酸結合タンパク質が結合する塩基配列を含む対象核酸を検出するマイクロアレイを用いた検出方法において、該対象核酸を高精度に検出できる方法を提供すること。

【解決手段】 核酸結合タンパク質が結合する塩基配列に相補的な配列を含まないプローブから得られるシグナルをバックグラウンドとして用いて、該対象核酸にハイブリダイズする検出用プローブから得られるシグナルを補正することにより、上記の課題を解決する。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(1) 核酸結合タンパク質が結合する塩基配列を含む対象核酸が含まれる疑いのある検体試料を、前記対象核酸にハイブリダイズする検出用プローブおよび前記核酸結合タンパク質が結合する塩基配列に相補的な配列を含まない補正用プローブが配置されたマイクロアレイに接触させる工程、

(2) 接触工程の後に、検出用プローブから得られる第1シグナルおよび補正用プローブから得られる第2シグナルを測定して、それぞれ第1シグナル測定値および第2シグナル測定値を取得する工程、

(3) 第2シグナル測定値に基づいて、バックグラウンド値を取得する工程、

(4) 第1シグナル測定値をバックグラウンド値により補正して、第1シグナルの補正値を取得する工程、および

(5) 補正値に基づいて、検体試料に含まれる対象核酸を検出する工程

を含む、マイクロアレイを用いた核酸結合タンパク質が結合する塩基配列を含む対象核酸の検出方法。

【請求項 2】

核酸結合タンパク質が結合する塩基配列とマイクロアレイに配置されたプローブの塩基配列に基づいて、マイクロアレイに配置されたプローブから、検出用プローブと補正用プローブとを選択する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

補正用プローブがマイクロアレイに複数配置され、

バックグラウンド値が、複数の補正用プローブから得られた第2シグナル測定値の最頻値である、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

工程(5)が、補正値と所定の閾値との比較結果に基づいて、検体試料から対象核酸を検出する工程である、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

(1) 核酸結合タンパク質が結合する塩基配列を含む対象核酸が含まれる疑いのある検体試料を、前記対象核酸にハイブリダイズする検出用プローブおよび前記核酸結合タンパク質が結合する塩基配列に相補的な配列を含まない補正用プローブが配置されたマイクロアレイAに接触させ、

前記マイクロアレイAと同じプローブが配置されたマイクロアレイBに、前記対象核酸が含まれる疑いのない対照試料を接触させる工程、

(2) 接触工程の後に、

マイクロアレイAの検出用プローブから得られる第1検体シグナルおよびマイクロアレイAの補正用プローブから得られる第2検体シグナルを測定して、それぞれ第1検体シグナル測定値および第2検体シグナル測定値を取得し、

マイクロアレイBの検出用プローブから得られる第1対照シグナルおよびマイクロアレイBの補正用プローブから得られる第2対照シグナルを測定して、それぞれ第1対照シグナル測定値および第2対照シグナル測定値を取得する工程、

(3) 第2検体シグナル測定値および第2対照シグナル測定値に基づいて、それぞれ検体バックグラウンド値および対照バックグラウンド値を取得する工程、

(4) 第1検体シグナル測定値を検体バックグラウンド値で補正して、第1検体シグナルの検体補正値を取得し、

第1対照シグナル測定値を対照バックグラウンド値で補正して、第1対照シグナルの対照補正値を取得する工程、

(5) 検体補正値および対照補正値に基づいて、解析値を取得する工程、および

(6) 解析値に基づいて、検体試料に含まれる対象核酸を検出する工程

を含む、マイクロアレイを用いた核酸結合タンパク質が結合する塩基配列を含む対象核酸の検出方法。

10

20

30

40

50

【請求項 6】

核酸結合タンパク質が結合する塩基配列に基づいて、マイクロアレイ A および B に配置されたプローブから、検出用プローブと補正用プローブとを選択する工程をさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

補正用プローブがマイクロアレイ A および B のそれぞれに複数配置され、
 検体バックグラウンド値が、マイクロアレイ A の複数の補正用プローブから得られた第 2 検体シグナル測定値の最頻値であり、
 対照バックグラウンド値が、マイクロアレイ B の複数の補正用プローブから得られた第 2 対照シグナル測定値の最頻値である、
 請求項 5 または請求項 6 に記載の方法。

10

【請求項 8】

検出用プローブがマイクロアレイ A および B のそれぞれに複数配置され、
 検体補正值が、マイクロアレイ A の複数の検出用プローブから得られた第 1 検体シグナル測定値から検体バックグラウンド値を減じて補正した値であり、
 対照補正值が、マイクロアレイ B の複数の検出用プローブから得られた第 1 対照シグナル測定値から対照バックグラウンド値を減じて補正した値であり、
 解析値が有意確率である、
 請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 9】

工程 (6) が、解析値と所定の閾値との比較結果に基づいて、検体試料から対象核酸を検出する工程である、請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

核酸結合タンパク質が DNA 結合タンパク質である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

DNA 結合タンパク質が、ポリコーム群、転写因子、メチル化 DNA 結合タンパク質、抗メチル化シトシン抗体または抗メチル化シチジン抗体である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

DNA 結合タンパク質が抗メチル化シトシン抗体または抗メチル化シチジン抗体であり、補正用プローブが CpG 配列を含まないプローブである、請求項 10 または請求項 11 に記載の方法。

30

【請求項 13】

(i) 生体試料から対象核酸を免疫沈降法により取得する工程、および
 (ii) 工程 (i) で得られた対象核酸を核酸増幅法により増幅して検体試料を調製する工程
 をさらに含む請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

工程 (ii) が核酸増幅法により増幅された核酸をさらに蛍光標識する工程であり、マイクロアレイに存在するプローブから得られるシグナルが蛍光強度である、請求項 13 に記載の方法。

40

【請求項 15】

コンピュータを
 核酸結合タンパク質が結合する塩基配列を含む対象核酸が含まれる疑いのある検体試料と接触させたマイクロアレイに配置された、前記対象核酸にハイブリダイズする検出用プローブから得られた第 1 シグナル測定値、および
 前記マイクロアレイに配置された、前記核酸結合タンパク質が結合する塩基配列に相補的な配列を含まない補正用プローブから得られた第 2 シグナル測定値
 を取得する手段；

50

第 2 シグナル測定値に基づいて、バックグラウンド値を取得する手段；

第 1 シグナル測定値をバックグラウンド値で補正して、第 1 シグナルの補正値を取得する手段；および

第 1 シグナルの補正値を出力する手段；

を含む手段として機能させるためのマイクロアレイデータ解析用プログラム。

【請求項 16】

コンピュータを、

核酸結合タンパク質が結合する塩基配列、検体試料と接触させたマイクロアレイに配置されたプローブの塩基配列および前記プローブから得られたシグナル測定値を受付ける手段；

10

核酸結合タンパク質が結合する塩基配列に基づいて、マイクロアレイのプローブから、補正用プローブを選択する手段；

をさらに含む手段として機能させる、請求項 15 に記載のプログラム。

【請求項 17】

補正用プローブがマイクロアレイに複数配置され、

バックグラウンド値が、複数の補正用プローブから得られた第 2 シグナル測定値の最頻値である、請求項 15 または請求項 16 に記載のプログラム。

【請求項 18】

検出用プローブがマイクロアレイに複数配置され、

補正値が、マイクロアレイの複数の検出用プローブから得られた第 1 シグナル測定値をバックグラウンド値で補正した値である、

20

請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のプログラム。

【請求項 19】

コンピュータを

核酸結合タンパク質が結合する塩基配列を含む対象核酸が含まれる疑いのある検体試料と接触させたマイクロアレイ A に配置された、前記対象核酸にハイブリダイズする検出用プローブから得られた第 1 検体シグナル測定値、

前記マイクロアレイ A に配置された、前記核酸結合タンパク質が結合する塩基配列に相補的な配列を含まない補正用プローブから得られた第 2 検体シグナル測定値、

前記対象核酸が含まれる疑いのない対照試料を接触させたマイクロアレイ B に配置された、前記検出用プローブから得られた第 1 対照シグナル測定値、および

30

前記マイクロアレイ B に配置された、前記核酸結合タンパク質が結合する塩基配列に相補的な配列を含まない補正用プローブから得られた第 2 対照シグナル測定値を取得する手段；

第 2 検体シグナル測定値および第 2 対照シグナル測定値に基づいて、それぞれ検体バックグラウンド値および対照バックグラウンド値を取得する手段；

第 1 検体シグナル測定値を検体バックグラウンド値で補正して、第 1 検体シグナルの検体補正値を取得し、第 1 対照シグナル測定値を対照バックグラウンド値で補正して、第 1 対照シグナルの対照補正値を取得する手段；

検体補正値および対照補正値に基づいて、解析値を取得する手段；および

40

解析値を出力する手段；

を含む手段として機能させるためのマイクロアレイデータ解析用プログラム。

【請求項 20】

コンピュータを、

核酸結合タンパク質が結合する塩基配列、検体試料と接触させたマイクロアレイ A に配置されたプローブの塩基配列および前記プローブから得られた検体シグナル測定値、ならびに対照試料と接触させたマイクロアレイ B に配置されたプローブの塩基配列および前記プローブから得られた対照シグナル測定値を受付ける手段；および

核酸結合タンパク質が結合する塩基配列に基づいて、マイクロアレイ A および B のプローブから、補正用プローブを選択する手段；

50

をさらに含む手段として機能させる、請求項 19 に記載のプログラム。

【請求項 21】

補正用プローブがマイクロアレイ A および B のそれぞれに複数配置され、
検体バックグラウンド値が、マイクロアレイ A の複数の補正用プローブから得られた第 2 検体シグナル測定値の最頻値であり、
対照バックグラウンド値が、マイクロアレイ B の複数の補正用プローブから得られた第 2 対照シグナル測定値の最頻値である、
請求項 19 または請求項 20 に記載のプログラム。

【請求項 22】

検出用プローブがマイクロアレイ A および B のそれぞれに複数配置され、
検体補正值が、マイクロアレイ A の複数の検出用プローブから得られた第 1 検体シグナル測定値から検体バックグラウンド値を減じて補正した値であり、
対照補正值が、マイクロアレイ B の複数の検出用プローブから得られた第 1 対照シグナル測定値から対照バックグラウンド値を減じて補正した値であり、
解析値が有意確率である、
請求項 19 ~ 21 のいずれか 1 項に記載のプログラム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マイクロアレイを用いた核酸の検出方法およびマイクロアレイデータ解析用プログラムに関する。より詳細には、マイクロアレイを用いた核酸結合タンパク質が結合する塩基配列を含む対象核酸の検出方法およびこの検出方法のためのマイクロアレイデータ解析用プログラムに関する。

【背景技術】

【0002】

マイクロアレイとは、核酸チップとも呼ばれ、プローブとしての核酸断片がプラスチックやガラスなどの基板上に高密度に配置されたものである。このマイクロアレイ上のプローブと検体試料中の核酸 (DNA、cDNA、RNA または cRNA) とをハイブリダイゼーションさせることにより、検体試料中の核酸に含まれる多数の遺伝子を定量的または定性的に解析できる。

例えば、マイクロアレイを RNA の解析に用いることにより遺伝子の発現解析を行うことが可能であり、ゲノム DNA の解析に用いることによりそのコピー数の測定 (CGH 解析)、転写因子の解析、DNA のメチル化領域の解析などが可能である。

【0003】

また、マイクロアレイを用いて、核酸結合タンパク質が結合する塩基配列を含む対象核酸の検出する方法も知られている。例えば、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法とマイクロアレイ解析とを組み合わせた「ChIP-on-chip 法」が知られている。この ChIP-on-chip 法では、まず、興味対象の核酸結合タンパク質を認識する抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、該タンパク質と結合する核酸を取得する。次いで、取得した核酸をマイクロアレイ上のプローブとハイブリダイズさせる。そして、核酸とハイブリダイズしたマイクロアレイ上のプローブを確認することにより、興味対象の核酸結合タンパク質が結合する核酸を解析できる。

【0004】

核酸結合タンパク質として、抗メチル化シトシン抗体または抗メチル化シチジン抗体を用いるメチル化 DNA 免疫沈降 (MeDIP) 法とマイクロアレイ解析とを組み合わせた「MeDIP-on-chip 法」も知られている。この MeDIP-on-chip 法では、メチル化 DNA 免疫沈降法で取得した DNA とハイブリダイズしたマイクロアレイ上のプローブを確認することにより、メチル化 DNA を解析できる。

さらに、マイクロアレイとして、全ゲノム領域または特定の領域から等間隔に抽出した塩基配列を有するプローブをタイル状に並べたタイリングアレイを用いて、核酸結合タン

10

20

30

40

50

パク質が結合する核酸やメチル化DNAを網羅的に解析することも行われている。

【0005】

マイクロアレイを用いる解析では、検体試料中の核酸は、通常、自己の塩基配列と相補的な配列を有するプローブと特異的にハイブリダイズするが、自己の塩基配列と非相補的な配列を有するプローブまたはマイクロアレイの基板表面と非特異的にハイブリダイズすることもある。核酸と各プローブとの間のこのような塩基配列に非特異的なハイブリダイゼーションにより得られたシグナル測定値には、生物学的根拠のないノイズ成分（以下、「バックグラウンド」という）が含まれ得る。このようなバックグラウンドは、測定の精度を下げる大きな要因となっている。

【0006】

したがって、マイクロアレイデータの解析においては、上記のような非特異的ハイブリダイゼーションによるバックグラウンドを除去してデータを補正する操作である、バックグラウンド補正が必要となる。

【0007】

このようなバックグラウンド補正の方法として、例えばAffymetrix社のGeneChip（登録商標）におけるミスマッチプローブを用いた方法が知られている。

Affymetrix社のGeneChip（登録商標）では、解析対象の配列と完全に相補的な配列を有するパーフェクトマッチ（PM）プローブに加えて、PMプローブの配列と1塩基だけ異なる配列を有するミスマッチ（MM）プローブが基板上に配置されている。そして、PMプローブから得られたシグナル値から、MMプローブから得られたシグナル値を減じることにより、プローブの配列に非特異的な結合により生じるバックグラウンドを除去して、測定データを補正できる。

しかし、この方法では、マイクロアレイにMMプローブを配置することが必須であるため、MMプローブが配置されていないマイクロアレイを用いる場合には、この方法は適用できない。また、PMプローブとMMプローブとでは非特異的ハイブリダイゼーションによる影響が大きく異なる場合が多いので、この方法では必ずしも該影響を除いた値を適切に反映しているわけではない（特許文献1参照）。

【0008】

MMプローブを用いる方法以外にも、バックグラウンド補正の方法が開発されている（特許文献1参照）。例えば、解析対象の測定用プローブを配置していない領域を利用したバックグラウンドの除去方法がある（特許文献1の背景技術の記載を参照されたい）。この方法では、各プローブが配置されている領域（スポット）の周囲領域またはプローブを配置していないブランクスポットから得られたシグナルをバックグラウンドとして、測定用プローブから得られたシグナルから減じることができる。つまり、検体試料中の核酸とマイクロアレイの基板表面との非特異的ハイブリダイゼーションにより生じるバックグラウンドを除去して、測定データを補正できる。

しかし、この方法では、検体試料中の核酸とプローブとの非特異的結合により生じるバックグラウンドを除去できないので、データの解析精度は高いとはいえない。

また、ブランクスポットを利用する方法では、解析対象の塩基配列と相補的な塩基配列を有するプローブとは別に、ブランクスポットを基板上にあらかじめ配置する必要があるため、ブランクスポットがないマイクロアレイを用いる場合には、この方法は適用できない。

【0009】

その他のバックグラウンド補正の方法として、ランダムプローブを用いる方法がある（特許文献2参照）。この方法では、解析対象の塩基配列と相補的な塩基配列を有するプローブ（計数プローブ）に加えて、解析対象の塩基配列に対応しないプローブ（ランダムプローブ）が基板上に配置されたマイクロアレイを用いる。そして、ランダムプローブから得られるシグナルに基づいてバックグラウンドの影響度を予測し、計数プローブから得られるシグナルから該影響度を除去する。

しかし、この方法においても、計数プローブとは別に、ランダムプローブを基板上にあ

10

20

30

40

50

らかじめ配置する必要があるため、マイクロアレイにランダムプローブが配置されていないマイクロアレイを用いる場合には、この方法は適用できない。また、この方法では、解析対象によっては、各ランダムプローブにおいて非特異的結合の影響が大きく異なり、十分なバックグラウンドの補正ができない場合がある。

【0010】

また、上記のバックグラウンド補正以外のデータの補正方法として、データの正規化による補正がある。

マイクロアレイを用いた実験において、測定されたシグナルのデータは、測定毎に異なったバイアス（偏り）を有することが多い。そのため、複数のマイクロアレイデータを比較する場合は、マイクロアレイ間のバイアスを数学的または統計学的手法により補正することが必要となる。このような補正操作は、正規化と呼ばれる。

データの正規化による補正は、マイクロアレイ間のバイアスのみならず、同一のマイクロアレイ内のスポット間の位置の相違によるバイアスに対しても用いることができる。

【0011】

Affymetrix社製のタイリングアレイには、そのアレイ上にバックグラウンド補正用プローブは配置されていないが、データを正規化する解析プログラムであるTiling Analysis Software（以下、「TAS」という）が同社から提供される。TASによる解析では、プローブから得られるシグナルのデータについて、バックグラウンドの除去による補正は行われず、数学的または統計学的手法を用いた正規化による補正がなされ、測定データ間の有意確率（p値）が算出される。

【0012】

ただし、データの正規化による補正では、マイクロアレイ上に配置されたプローブにおいて、次の2つの条件が成立することが前提となる：

- ・測定間で発現の変動が見られない遺伝子のプローブが大半を占める、
- ・測定間で発現が増大または減少する遺伝子のプローブが同程度含まれている。

そのため、これらの条件を満たさないような誤った正規化は、かえってバックグラウンドの原因となり得る。

また、データの正規化による補正では、バックグラウンド補正は行われないため、データの解析精度は高いとはいえない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】国際公開第03/070938号

【特許文献2】特開2008-39475号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

上記のような事情に鑑みて、本発明は、検体試料から核酸結合タンパク質が結合する塩基配列を含む対象核酸を、マイクロアレイを用いて検出する方法において、検体試料から前記対象核酸を高精度に検出できる方法を提供することを目的とする。

また、本発明は、マイクロアレイに上記のようなMMプローブやランダムプローブなどのバックグラウンド補正用の特別なプローブがあらかじめ配置されていない場合であっても、バックグラウンド補正ができる方法を提供することを目的とする。

【0015】

さらに、本発明は、上記の検出でのマイクロアレイデータの解析をコンピュータに実行させるためのプログラムを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明者らは、鋭意検討の結果、核酸結合タンパク質が結合する塩基配列（以下、「認識配列」ともいう）を含む対象核酸を、マイクロアレイを用いて検体試料から検出する方

10

20

30

40

50

法において、前記認識配列に相補的な配列を含まない補正用プローブから得られるシグナルをバックグラウンドとして用いて、前記対象核酸にハイブリダイズする検出用プローブから得られるシグナルを補正することにより、検体試料から対象核酸を高精度に検出できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0017】

さらに、本発明者は、認識配列に基づいて、マイクロアレイに配置されたプローブから、補正用プローブを選択することで、バックグラウンドを補正するためのプローブがあらかじめ配置されていないマイクロアレイにおいても、検体試料から対象核酸を高精度に検出できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0018】

すなわち、本発明は、

(1) 核酸結合タンパク質が結合する塩基配列を含む対象核酸が含まれる疑いのある検体試料を、前記対象核酸にハイブリダイズする検出用プローブおよび前記核酸結合タンパク質が結合する塩基配列に相補的な配列を含まない補正用プローブが配置されたマイクロアレイに接触させる工程、

(2) 接触工程の後に、検出用プローブから得られる第1シグナルおよび補正用プローブから得られる第2シグナルを測定して、それぞれ第1シグナル測定値および第2シグナル測定値を取得する工程、

(3) 第2シグナル測定値に基づいて、バックグラウンド値を取得する工程、

(4) 第1シグナル測定値をバックグラウンド値により補正して、第1シグナルの補正値を取得する工程、および

(5) 補正値に基づいて、検体試料に含まれる対象核酸を検出する工程

を含む、マイクロアレイを用いた認識配列を含む対象核酸の検出方法を提供する。

【0019】

また、本発明は、上記の検出方法において、前記認識配列に基づいて、前記マイクロアレイに配置されたプローブから、前記補正用プローブを選択する工程をさらに含む、マイクロアレイを用いた認識配列を含む対象核酸の検出方法を提供する。

【0020】

また、本発明は、コンピュータを

(1) 認識配列を含む対象核酸が含まれる疑いのある検体試料と接触させたマイクロアレイに配置された、前記対象核酸にハイブリダイズする検出用プローブから得られた第1シグナル測定値、および

前記マイクロアレイに配置された、前記認識配列に相補的な配列を含まない補正用プローブから得られた第2シグナル測定値を受付ける手段、

(2) 第2シグナル測定値に基づいて、バックグラウンド値を取得する手段、

(3) 第1シグナル測定値をバックグラウンド値で補正して、第1シグナルの補正値を取得する手段、および

(4) 第1シグナルの補正値を出力する手段、

を含む手段として機能させるためのマイクロアレイデータ解析用プログラムも提供する。

【0021】

また、本発明は、上記の手段(1)が、前記認識配列に基づいて、前記マイクロアレイに配置されたプローブから、前記補正用プローブを選択する処理をさらに含む、マイクロアレイデータ解析用プログラムを提供する。

【発明の効果】

【0022】

本発明の方法によれば、マイクロアレイを用いて検体試料から認識配列を含む対象核酸を高精度に検出することが可能になる。また、本発明の方法によれば、バックグラウンド補正のための特別なプローブがマイクロアレイにあらかじめ配置されていない場合であっても、バックグラウンド補正が可能になる。

【0023】

10

20

30

40

50

また、本発明のプログラムによれば、上記の検出方法でのマイクロアレイデータの解析をコンピュータに実行させることが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】本発明のプログラムを実行するマイクロアレイデータ解析装置を含む、マイクロアレイデータ解析システムの全体概要図である。

【図2】解析装置100のCPU110aによる、第1の実施形態のマイクロアレイデータ解析の処理を示すフローチャートである。

【図3】解析装置100のCPU110aによる、第2の実施形態のマイクロアレイデータ解析の処理を示すフローチャートである。

【図4】解析装置100のCPU110aによる、第3の実施形態のマイクロアレイデータ解析の処理を示すフローチャートである。

【図5】解析装置100のCPU110aによる、第4の実施形態のマイクロアレイデータ解析の処理を示すフローチャートである。

【図6】実施例1においてメチル化DNAを特異的に回収できたことを示すアガロースゲル電気泳動の写真である。

【図7】乳癌細胞株MCF-7を検体試料として用いたマイクロアレイの解析結果(S/N比および有意確率)のグラフである。

【図8】乳癌細胞株SK-BR-3を検体試料として用いたマイクロアレイの解析結果(S/N比および有意確率)のグラフである。

【図9】コントロールプローブを含む補正用プローブおよびCpG配列を含まない補正用プローブのそれぞれでバックグラウンド補正をした場合の有意確率のグラフである。

【図10】解析装置100のハードウェア構成を示すブロック図である。

【発明を実施するための形態】

【0025】

上記の「核酸結合タンパク質」とは、核酸が有する特定の塩基配列を認識して特異的に結合するタンパク質を意味する。核酸結合タンパク質は、好ましくはDNA結合タンパク質である。DNA結合タンパク質としては、例えば、ポリコーム群、転写因子、メチル化DNA結合タンパク質、抗メチル化シトシン抗体、抗メチル化シチジン抗体などが挙げられる。

「ポリコーム群」とは、クロマチンに結合する巨大なタンパク質複合体として細胞内に存在する分子群を意味する。「転写因子」とは、遺伝子の転写を調節している因子であって、RNAポリメラーゼ以外の分子群を意味する。転写因子としては、例えば、TATA結合タンパク質(TBP)、EGR2、c-Myc、ER、SOX6などが挙げられる。

【0026】

上記の「核酸結合タンパク質が結合する塩基配列」とは、上記の核酸結合タンパク質が認識して特異的に結合することが知られている塩基配列を意味し、認識配列とも呼ばれる。

そのような認識配列は、好ましくは1~15塩基程度、より好ましくは1~10塩基、さらに好ましくは1~7塩基、最も好ましくは1~5塩基の長さである。

核酸結合タンパク質がメチル化DNA結合タンパク質である場合、認識配列は、例えばCpG配列であり得る。また、核酸結合タンパク質が転写因子である場合、認識配列は、例えば、表1に示す塩基配列であり得る。

このような核酸結合タンパク質が結合する配列は、当業者に公知のデータベース、例えば、TESS-General Factor Search Form(<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess?RQ=FCT-FRMREQ-Search>)で検索できる。

【0027】

10

20

30

40

【表 1】

核酸結合タンパク質	認識配列
TATA結合タンパク質	① 5'-TATAAAA-3'
	② 5'-TATATAT-3'
	③ 5'-TATATAA-3'
EGR2	5'-CCGCCCCCGC-3'
c-Myc	5'-CAC(A/G)TG-3'
ER	5'-GGTCAnnnTGTTCT-3'
SOX6	5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3'

【0028】

10

上記の「CpG配列」とは、塩基配列中のシトシン（C）とグアニン（G）とが5'から3'への方向にこの順序で隣り合った配列を意味する。CpGの「p」の文字は、シトシンとグアニンの間のホスホジエステル結合を表わす。また、本明細書においては、「CpG配列」と「CG配列」は同義である。哺乳類のゲノムDNAでは、CpG配列においてメチル化修飾が行われることが知られている。

【0029】

上記の「核酸結合タンパク質が結合する塩基配列を含む対象核酸」（以下、単に「対象核酸」ともいう）は、その塩基配列中に上記の認識配列を含み、本発明において検出の対象となる核酸を意味する。対象核酸は、DNA、RNAなどのいずれであってもよいが、好ましくはDNAであり、より好ましくはゲノムDNAであり、さらに好ましくはCpG配列を含むゲノムDNAである。このような対象核酸を検出することにより、検体試料中のゲノムDNAがメチル化されているか否かを検出でき、また、メチル化されているゲノムDNAを検出することもできる。

20

【0030】

本発明の方法に用い得るマイクロアレイは、核酸プローブが基板上に配置されたものであれば特に限定されないが、好ましくはDNAマイクロアレイまたはDNAチップである。

また、そのようなマイクロアレイは、検出用プローブおよび補正用プローブが配置されたマイクロアレイが好ましい。しかし、マイクロアレイの中には、検出のためのプローブ数を多くするために、バックグラウンド補正のための特別なプローブがあらかじめ配置されていないものも存在する。このようなマイクロアレイを用いる場合、興味対象の核酸結合タンパク質が結合する塩基配列に基づいて、該マイクロアレイに配置されたプローブから補正用プローブを選択することにより、本発明の方法を実施できる。

30

【0031】

上記のマイクロアレイは、Affymetrix社のGeneChip（登録商標）のような市販のものであってもよく、当業者に公知の方法によって作製したものであってもよい。

【0032】

本発明において、検出用プローブは、上記の対象核酸とハイブリダイズするプローブであれば、特に制限されない。すなわち、対象核酸中の認識配列を含む領域と相補的な配列を有するプローブを、検出用プローブとして用いることができる。より具体的には、そのような検出用プローブは、認識配列に相補的な配列を有するプローブまたは対象核酸中の認識配列の近傍の領域と相補的なプローブである。特に、対象核酸中の認識配列の近傍の領域と相補的なプローブは、対象核酸中の認識配列から300塩基以内の領域と相補的なプローブが好ましい。

40

なお、「ハイブリダイズする」とは、ストリンジェントな条件下で、プローブと対象核酸とが二本鎖構造を形成することをいう。ここで、ストリンジェントな条件とは、マイクロアレイに配置されたプローブに対象核酸をハイブリダイゼーションする際に、当業者が一般的に用いる条件であれば、特に限定されない。

【0033】

本発明において、補正用プローブは、認識配列に相補的な配列を含まないプローブであ

50

れば、特に制限されない。例えば、核酸結合タンパク質が上記の抗メチル化シトシン抗体または抗メチル化シチジン抗体の場合、補正用プローブはC p G配列を含まないプローブである。好ましくは、補正用プローブは、対象核酸以外の核酸（以下、「非対象核酸」ともいう）とハイブリダイズするプローブである。ここで、非対象核酸は、その塩基配列において、プローブとハイブリダイズする領域のみならず、該領域の近傍においても認識配列を含まない核酸であることが好ましい。

しがたって、補正用プローブは、認識配列に相補的な配列を含まず、且つプローブがハイブリダイズする領域から300塩基以内の領域に認識配列を含まない非対象核酸とハイブリダイズするプローブであることがより好ましい。

【0034】

検出用プローブおよび補正用プローブは、本発明の方法に用いるマイクロアレイにそれぞれ1つずつであってもよいが、検出の精度をより高めるために、通常、それぞれ複数であることが好ましい。

【0035】

本発明の方法における第1工程では、上記の検出用プローブおよび補正用プローブが配置されたマイクロアレイに検体試料を接触させる。この接触は、マイクロアレイに検体試料を添加することにより行うことができる。

検体試料とマイクロアレイとの接触は、マイクロアレイの種類により異なるが、通常、周囲温度（約10～70）にて2～20時間行えばよい。

【0036】

上記の検体試料は、対象核酸を含む疑いがあるものである。

検体試料としては、生体試料から得られる核酸を含む試料が挙げられる。生体試料としては、例えば、培養細胞株、血液、血清、リンパ液、尿、乳頭分泌液、体液、手術や生検により採取した組織や細胞などが挙げられる。

検体試料は、これらの生体試料そのものであってもよいし、検体試料に含まれる対象核酸の濃度を上昇させるための処理を生体試料に行って得られるものであってもよい。対象核酸の濃度を上昇させる処理としては、対象核酸に対する抗体または対象核酸に結合するタンパク質に対する抗体を用いる免疫沈降法、対象核酸に対するプライマーを用いる核酸増幅法などが挙げられる。検体試料は、免疫沈降法および核酸増幅法をともに行うことにより得られるものがより好ましい。

検体試料に含まれる対象核酸は、認識配列を1つまたは複数含んでいてもよい。

【0037】

上記の免疫沈降法としては、対象核酸に対する抗体を用いて該核酸を沈降させる方法であれば特に限定されず、公知の方法に従って行うことができる。対象核酸が、メチル化修飾されたC p G配列を含むゲノムDNAである場合、免疫沈降法として、抗メチル化シトシン抗体または抗メチル化シチジン抗体を用いるMeDIP法を行うことができる。また、対象核酸が、転写因子が結合する塩基配列を含む核酸である場合、免疫沈降法として、種々の転写因子に対する抗体を用いるChIP法を行うことができる。

【0038】

核酸増幅法は、対象核酸に対するプライマーを用いて該核酸を増幅できる方法であれば特に限定されず、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法、in vitro transcription（IVT）増幅法やSPIA（商標）増幅法などの当業者に公知の増幅法を行うことができる。核酸増幅用プライマーは、対象核酸の塩基配列に応じて当業者が適宜設計し得るか、または市販されているものを用いることができる。

【0039】

上記の免疫沈降法および/または核酸増幅法の前後には、核酸を超音波または制限酵素により断片化してもよい。

【0040】

上記の検体試料中に含まれる対象核酸は、当該技術において公知の標識物質により標識されていることが好ましい。よって、本発明の方法は、対象核酸を標識する工程をさらに

10

20

30

40

50

含むことが好ましい。この標識工程は、検体試料中の全ての対象核酸を標識できるので、対象核酸を増幅する工程の後に行われるのが有利である。

標識物質としては、蛍光物質、ビオチンなどのハプテン、放射性物質などが挙げられる。蛍光物質としては、Cy3、Cy5、Alexa Fluor（商標）、FITCなどが挙げられる。このように検出対象の核酸を標識することにより、次工程でのシグナルの測定が容易になる。

核酸を上記の標識物質で標識する方法は、当該技術において公知である。

【0041】

本発明の方法の第2工程においては、検出用プローブから得られる第1シグナルおよび補正用プローブから得られる第2シグナルを測定して、それぞれ第1シグナル測定値および第2シグナル測定値を取得する。

第1シグナルおよび第2シグナルの測定値は、それぞれ1つの値であってもよいが、通常、マイクロアレイには複数の検出用プローブおよび補正用プローブが配置されているので、各シグナルの測定値は、それぞれ複数の値であってもよい。

上記のシグナルは、マイクロアレイの種類に応じて適切なシグナルであり得る。例えば、マイクロアレイの各プローブとハイブリダイズした核酸が存在する場合に発生する電気的シグナルであってもよいし、上記のように検出対象の核酸が標識されている場合は、標識物質から生じる蛍光、発光などのシグナルであってもよい。これらのシグナルは、好ましくは上記の標識物質により生じるシグナルであり、より好ましくは蛍光シグナルである。

【0042】

上記の各シグナルの検出は、通常のマイクロアレイ測定装置に備えられたスキャナーにより行うことができる。スキャナーとしては、例えば、GeneChip（登録商標）Scanner 3000 7G（Affymetrix社）などが挙げられる。

【0043】

補正用プローブから得られる第2シグナルは、0である（測定されない）はずであるが、上記のように、プローブおよび/またはマイクロアレイの基板への核酸の非特異的ハイブリダイゼーションにより、通常、ある程度の数値として測定され得る。

【0044】

本発明の第3工程では、第2シグナル測定値に基づいてバックグラウンド値を取得する。マイクロアレイに複数の補正用プローブが配置されている場合、バックグラウンド値は、複数の第2シグナル測定値から得られる統計的代表的値であってもよい。統計的代表的値としては、最大値、最小値、平均値、中央値または最頻値のいずれであってもよいが、好ましくは最頻値である。

【0045】

本発明の方法の第4工程では、上記の第1シグナル測定値を、上記のバックグラウンド値により補正して、第1シグナルの補正值を取得する。

また、上記のマイクロアレイに検出用プローブが複数配置されている場合は、各々の第1シグナル測定値をバックグラウンド値で補正して、各々の第1シグナルの補正值を取得する。

補正は、第1シグナル測定値をバックグラウンド値で除してもよく、第1シグナル測定値をバックグラウンド値で減じてもよい。好ましくは、第1シグナル測定値からバックグラウンド値を減じることにより、補正值を算出する。なお、減算によって得た補正值が負の値である場合は、該補正值を0とし得る。

【0046】

本発明の方法の第5工程では、第1シグナルの補正值に基づいて、検体試料に含まれる対象核酸を検出する。

本明細書において、「検出」とは、検体試料中の対象核酸の存否を検出すること、および/または対象核酸の検体試料中での存在量を測定することを意味する。好ましくは、対象核酸の存否を検出することである。

10

20

30

40

50

【0047】

この工程では、第1シグナルの補正值と所定の閾値とを比較して、第1シグナルの補正值が該閾値よりも高い場合に、検体試料中に対象核酸が存在すると判断でき、該閾値よりも低い場合に、検体試料中に対象核酸が存在しないと判断できる。

上記の所定の閾値は、検出対象の核酸の存在の有無があらかじめ確認されている試料を用いて、本発明の方法と同様の手順で測定された補正值のデータの蓄積から、経験的に導き出すことができる。例えば、検出対象の核酸の存在の有無があらかじめ確認されている試料から得られた補正值を、閾値として用いることができる。また、複数の試料から得られた補正值の平均値、中央値または最頻値などを閾値とすることもできる。

【0048】

本発明の方法は、検体試料と対照試料とを別々に複数のマイクロアレイに供して、上記の方法により各マイクロアレイから補正值を求め、これらに基づいて解析値を求めることにより、対象核酸を検出することもできる。

このような本発明の方法では、同一のマイクロアレイを2つ準備し、一方をマイクロアレイAとして、他方をマイクロアレイBとして用いることが好ましい。

【0049】

上記のような2つのマイクロアレイを用いる場合の本発明の方法は、次の工程を含む。

(1) 認識配列を含む対象核酸が含まれる疑いのある検体試料を、前記対象核酸にハイブリダイズする検出用プローブおよび前記認識配列に相補的な配列を含まない補正用プローブが配置されたマイクロアレイAに接触させ、

前記マイクロアレイAと同じプローブが配置されたマイクロアレイBに、前記対象核酸が含まれる疑いのない対照試料を接触させる工程、

(2) 接触工程の後に、マイクロアレイAの検出用プローブから得られる第1検体シグナルおよびマイクロアレイAの補正用プローブから得られる第2検体シグナルを測定して、それぞれ第1検体シグナル測定値および第2検体シグナル測定値を取得し、

マイクロアレイBの検出用プローブから得られる第1対照シグナルおよびマイクロアレイBの補正用プローブから得られる第2対照シグナルを測定して、それぞれ第1対照シグナル測定値および第2対照シグナル測定値を取得する工程、

(3) 第2検体シグナル測定値および第2対照シグナル測定値に基づいて、それぞれ検体バックグラウンド値および対照バックグラウンド値を取得する工程、

(4) 第1検体シグナル測定値を検体バックグラウンド値で補正して、第1検体シグナルの検体補正值を取得し、

第1対照シグナル測定値を対照バックグラウンド値で補正して、第1対照シグナルの対照補正值を取得する工程、

(5) 検体補正值および対照補正值に基づいて、解析値を取得する工程、および

(6) 解析値に基づいて、検体試料に含まれる対象核酸を検出する工程。

【0050】

上記の工程(1)では、マイクロアレイAに検体試料を接触させ、マイクロアレイBに対照試料を接触させる。

検体試料は、上記のとおり、対象核酸を含む疑いのあるものである。一方、対照試料は、対象核酸を含む疑いがないものである。このような対照試料は、例えば上記の生体試料に対して、対象核酸または対象核酸に結合するタンパク質を特異的に認識しない抗体(例えば、正常マウスIgG抗体など)を用いる免疫沈降を行って得ることができる。

接触は、上記の第1工程において述べたことと同様にして行うことができる。

【0051】

上記の工程(2)において、第1検体シグナル、第2検体シグナル、第1対照シグナルおよび第2対照シグナルの測定値は、それぞれ1つの値であってもよいが、通常、マイクロアレイAおよびBにはそれぞれ複数の検出用プローブおよび補正用プローブが配置されているので、各シグナルの測定値は、それぞれ複数の値であってもよい。

なお、上記のシグナルおよびその検出については、上記の第2工程で述べたことと同様

10

20

30

40

50

である。

【0052】

上記の工程(3)において、マイクロアレイAおよびBに複数の補正用プローブが配置されている場合、検体バックグラウンド値および対照バックグラウンド値は、それぞれ第2検体シグナル測定値および第2対照シグナル測定値のうちの最大値、最小値、平均値、中央値または最頻値のいずれであってもよいが、好ましくは最頻値である。

【0053】

上記の工程(4)において、マイクロアレイAおよびBに複数の検出用プローブが配置されている場合、検体補正值は、複数の第1検体シグナル測定値から検体バックグラウンド値を減じた値であり、対照補正值は、複数の第1対照シグナル測定値から対照バックグラウンド値を減じた値である。

なお、得られた各補正值が負の値である場合は、該補正值を0とし得る。

【0054】

上記の工程(5)において、解析値は有意確率として取得することができる。具体的には、解析値は、上記の検体補正值および対照補正值を一对の標本としてウィルコクソンの符号順位検定(Wilcoxon signed-rank test)により算出できる。あるいは、解析値は、検体補正值を対照補正值で除して算出されるシグナル/ノイズ(S/N)比であってもよい。

【0055】

本明細書において、「有意確率」とは、p値(p-value)とも呼ばれ、当該技術において一般的に用いられるものと同等の意味を有し、ある帰無仮説のもとで得られたデータから実際に計算された統計量よりも極端な統計量(帰無仮説に反する統計量)が観測される確率のことである。

【0056】

上記の工程(6)では、解析値と所定の閾値とを比較して、解析値が所定の閾値よりも低い場合に、対象核酸と検出用プローブとの特異的ハイブリダイゼーションにより、検体試料から対象核酸が検出されたと判断できる。解析値が有意確率である場合、所定の閾値は、当該技術において一般的に用いられる有意水準であり得る。例えば、得られた解析値が閾値0.05(5%)よりも低い場合は、検出対象ではない核酸が検出用プローブとの非特異的ハイブリダイゼーションにより誤って検出された可能性は5%以下であることを示す。

有意水準としての閾値は、通常、0.05(5%)であり、好ましくは0.01(1%)、より好ましくは0.008(0.8%)である。

【0057】

複数のマイクロアレイを用いる本発明の方法において、バックグラウンド補正のためのプローブがあらかじめ配置されていないマイクロアレイAおよびBを用いる場合は、それらのマイクロアレイに配置されたプローブから、認識配列に基づいて補正用プローブを選択することにより、上記の方法を実施できる。すなわち、マイクロアレイに配置されたプローブにおいて、認識配列に相補的な配列を含まないプローブを補正用プローブとして選択できる。

また、補正用プローブは、検体試料に含まれる核酸の由来となる生体のゲノムDNAの塩基配列の情報に基づいて選択することが好ましい。これは、補正用プローブがハイブリダイズする検体試料中の核酸も、認識配列を含まないことが好ましいからである。したがって、認識配列に相補的な配列を含まず、且つプローブがハイブリダイズする領域から300塩基以内の領域に認識配列を含まないゲノムDNAとハイブリダイズするプローブを、補正用プローブとして選択することが特に好ましい。

【0058】

また、上記の本発明の方法において、マイクロアレイに配置されたプローブから検出用プローブを選択してもよい。この場合、検出用プローブは、マイクロアレイに配置されたプローブの塩基配列、認識配列および検体試料に含まれる核酸の由来となる生体のゲノム

10

20

30

40

50

DNAの塩基配列に基づいて選択できる。すなわち、マイクロアレイに配置されたプローブから、認識配列に相補的な配列を有するプローブまたはゲノムDNAの塩基配列中の認識配列の近傍の領域と相補的なプローブを、検出用プローブとして選択できる。より具体的には、認識配列に相補的な配列を有するプローブまたはゲノムDNA中の認識配列から300塩基以内の領域と相補的なプローブを、検出用プローブとして選択することが好ましい。

【0059】

本発明の方法においては、データの正規化による補正工程をさらに含んでもよい。

【0060】

また、本発明の方法では、DNA結合タンパク質として抗メチル化シトシン抗体または抗メチル化シチジン抗体を用い、補正用プローブとしてCpG配列を含まないプローブを用いることにより、ゲノムDNAのメチル化状態を解析できる。

上記のメチル化の状態とは、解析したゲノムDNAの塩基配列に存在するCpG配列のシトシン残基がメチル化されているか否か、または該塩基配列に存在する全てのCpG部位の数に対する、メチル化されたCpG配列の数の割合を意味する。

【0061】

本発明のマイクロアレイデータ解析用プログラムについて、以下に説明する。

【0062】

図1に、本発明のプログラムを実行するマイクロアレイデータの解析装置100を含む、マイクロアレイデータ解析システムの全体概要図を示した。マイクロアレイデータ解析システムは、マイクロアレイの測定装置200と、解析装置100とを有し、これらはケーブル300で接続されている。測定装置200で測定されるマイクロアレイから得たシグナル測定値などのデータは、ケーブル300を介して解析装置100に送られる。なお、測定装置200と解析装置100とは、一体の装置として構成されてもよい。解析装置100のハードウェア構成を示すブロック図を、図10に示す。

【0063】

解析装置100は、本体110と、表示部120と、入力デバイス130とから主として構成されている。本体110において、CPU110aと、ROM110bと、RAM110cと、ハードディスク110dと、読出装置110eと、入出力インターフェース110fと、画像出力インターフェース110gとは、バス110hによって互いにデータ通信可能に接続されている。

【0064】

CPU110aは、ROM110bに記憶されているコンピュータプログラムおよびRAM110cにロードされたコンピュータプログラムを実行することが可能である。

【0065】

ROM110bは、マスクROM、PROM、EPROM、EEPROMなどによって構成されている。ROM110bには、CPU110aが実行するコンピュータプログラムおよびこれに用いるデータが記録されている。

【0066】

RAM110cは、SRAMまたはDRAMなどによって構成されている。RAM110cは、ROM110bおよびハードディスク110dに記録されているコンピュータプログラムの読み出しに用いられる。また、これらのコンピュータプログラムを実行するときに、CPU110aの作業領域として利用される。

【0067】

ハードディスク110dには、オペレーティングシステムおよびアプリケーションシステムプログラムなどのCPU110aに実行させるための種々のコンピュータプログラム、ならびにコンピュータプログラムの実行に用いるデータがインストールされている。後述するアプリケーションプログラム140aも、このハードディスク110dにインストールされている。ここで、アプリケーションプログラム140aの実行に用いるデータとしては、認識配列、マイクロアレイに配置されたプローブの塩基配列およびゲノムDNA

10

20

30

40

50

の塩基配列などが挙げられる。

【0068】

読出装置110eは、フレキシブルディスクドライブ、CD-ROMドライブ、またはDVD-ROMドライブなどによって構成されている。読出装置110eは、可搬型記憶媒体140に記録されたコンピュータプログラムまたはデータを読み出すことができる。また、可搬型記憶媒体140には、コンピュータがオペレーションを実行するためのアプリケーションプログラム140aが格納されている。CPU110aが可搬型記憶媒体140から当該アプリケーションプログラム140aを読み出し、アプリケーションプログラム140aをハードディスク110dにインストールすることも可能である。

【0069】

また、ハードディスク110dには、例えば米国マイクロソフト社が製造販売するWindows（登録商標）などのグラフィカルユーザインターフェース環境を提供するオペレーションシステムがインストールされている。以下の説明においては、上述した判定に係るアプリケーションプログラム140aは、当該オペレーティングシステム上で動作するものとしている。

【0070】

入出力インターフェース110fは、例えばUSB、IEEE1394、RS-232Cなどのシリアルインターフェース、SCSI、IDE、IEEE1284などのパラレルインターフェース、およびD/A変換器、A/D変換器などからなるアナログインターフェースなどから構成されている。入出力インターフェース110fには、キーボードおよびマウスからなる入力デバイス130が接続されている。ユーザが、入力デバイス130を使用することで、コンピュータ本体110にデータを入力することが可能である。

【0071】

また、入出力インターフェース110fには、ケーブル300を介して、マイクロアレイ測定装置200が接続されている。これにより、コンピュータ本体110は、マイクロアレイ測定装置200から入出力インターフェース110fを介して、マイクロアレイに配置されたプローブから得られたシグナル測定値を取得することが可能である。

【0072】

画像出力インターフェース110gは、LCDまたはCRTなどで構成された表示部120に接続されており、CPU110aから与えられた画像データに応じた映像信号を表示部120に出力するようになっている。表示部120は、入力された映像信号にしたがって、画像データを出力する。また、表示部120は、後述するCPU110aから与えられた補正值や解析値を出力する。

【0073】

本実施形態のアプリケーションプログラム140aは、解析装置100のCPU110aにマイクロアレイデータの解析を実行させるためのプログラムである。

【0074】

図2は、解析装置100のCPU110aによる、第1の実施形態のマイクロアレイデータ解析の処理を示すフローチャートである。

【0075】

測定対象の検体試料を接触させた検出用プローブおよび補正用プローブを備えたマイクロアレイを、マイクロアレイ測定装置200にセットし、検出用プローブから発せられる第1シグナルおよび補正用プローブから発せられる第2シグナルを測定する。

【0076】

解析装置100のCPU110aは、マイクロアレイ測定装置200から第1シグナル測定値および第2シグナル測定値を、入出力インターフェース110fを介して受信し（ステップS1）、受信した第1シグナル測定値および第2シグナル測定値をハードディスク110dに記憶させる。

【0077】

CPU110aは、ハードディスク110dから第2シグナル測定値を読み出して、第

10

20

30

40

50

2 シグナル測定値の統計的代表的値として最頻値を算出し（ステップ S 2）、この値をバックグラウンド値として解析装置 1 0 0 のハードディスク 1 1 0 d に記憶する。上記のマイクロアレイに補正用プローブが複数存在していた場合は、複数の第 2 シグナル測定値から統計的代表的値を算出する。

【 0 0 7 8 】

C P U 1 1 0 a は、ハードディスク 1 1 0 d から第 1 シグナル測定値およびバックグラウンド値を読み出し、第 1 シグナル測定値をバックグラウンド値で減じて、補正値を算出する（ステップ S 3）。上記のマイクロアレイに検出用プローブが複数存在していた場合は、複数の第 1 シグナル測定値をバックグラウンド値で減じることで、補正値を算出する。

10

【 0 0 7 9 】

C P U 1 1 0 a は、算出された補正値が負の値か否かを判断する（ステップ S 4）。

【 0 0 8 0 】

C P U 1 1 0 a は、ステップ S 4 において算出された補正値が負の値であると判定された場合、補正値を「0」とする（ステップ S 5）。なお、ステップ S 4 において算出された補正値が負の値ではないと判定された場合、算出された補正値がそのまま補正値となる。

【 0 0 8 1 】

C P U 1 1 0 a は、算出した補正値をディスプレイなどの表示部 1 2 0 に出力する（ステップ S 6）。

20

【 0 0 8 2 】

ここで、第 1 の実施形態では、C P U 1 1 0 a は、統計的代表的値として最頻値を算出したが、これに限られない。統計的代表的値としては、最大値、最小値、平均値、中央値または最頻値が挙げられ、好ましくは最頻値である。

【 0 0 8 3 】

また、第 1 の実施形態では、第 1 シグナル測定値をバックグラウンド値で減じることで補正値を算出したが、これに限られない。補正値は、第 1 シグナル測定値をバックグラウンド値で除して算出してもよい。好ましくは、第 1 シグナル測定値からバックグラウンド値を減じることにより、第 1 シグナルの補正値を算出する。

【 0 0 8 4 】

図 3 は、バックグラウンド補正のための特別なプローブがあらかじめ特定されていないマイクロアレイを用いた場合の、解析装置 1 0 0 の C P U 1 1 0 a による、第 2 の実施形態のマイクロアレイデータ解析の処理を示すフローチャートである。ここで、認識配列およびマイクロアレイに配置されたプローブの塩基配列のデータは、ハードディスク 1 1 0 d に予め記憶されている。

30

【 0 0 8 5 】

測定対象の検体試料を接触させたマイクロアレイを、マイクロアレイ測定装置 2 0 0 にセットし、プローブから発せられるシグナルを測定する。

【 0 0 8 6 】

解析装置 1 0 0 の C P U 1 1 0 a は、マイクロアレイ測定装置 2 0 0 からシグナル測定値を、入出力インターフェース 1 1 0 f を介して受信し（ステップ S a）、これらを解析装置 1 0 0 のハードディスク 1 1 0 d に記憶する。

40

【 0 0 8 7 】

C P U 1 1 0 a は、ハードディスク 1 1 0 d から認識配列およびマイクロアレイのプローブの塩基配列を読み出し、認識配列に相補的な塩基配列（以下、「相補配列」ともいう）を含まないプローブを補正用プローブとして選択し（ステップ S b）、選択したプローブを解析装置 1 0 0 のハードディスク 1 1 0 d に記憶する。この処理により、マイクロアレイのプローブから、補正用プローブが選択される。

【 0 0 8 8 】

C P U 1 1 0 a は、シグナル測定値をハードディスク 1 1 0 d から読み出し、検出用プ

50

ローブから得られた第1シグナル測定値、および選択された補正用プローブから得られた第2シグナル測定値を取得し(ステップS1)、これらの値を解析装置100のハードディスク110dに記憶する。

【0089】

ステップS1以降のCPU110aの処理手順は、第1の実施形態で述べたステップS2~ステップS6と同様である。

【0090】

ここで、第2の実施形態では、認識配列およびマイクロアレイに配置されたプローブの塩基配列のデータはハードディスク110dに予め記憶されていたが、これに限られない。例えば、CPU110aは、入力デバイスから入力された認識配列のデータを、入出力インターフェース110fを介して受信することもできる。また、CPU110aは、外部記憶装置に記憶されたマイクロアレイに配置されたプローブの塩基配列のデータを、インターネットに接続された入出力インターフェース110fを介して受信することもできる。さらに、CPU110aは、可搬型記憶媒体140に記録された認識配列およびマイクロアレイに配置されたプローブの塩基配列のデータを読み出す装置で読み出すことで、これらを受付けることもできる。

10

【0091】

また、ハードディスク110dには、検体試料に含まれる核酸の由来となる生体のゲノムDNAの塩基配列がさらに記憶されていてもよい。この場合、ステップSbにおいて、CPU110aは、認識配列およびゲノムDNAの塩基配列に基づいて、マイクロアレイのプローブから補正用プローブを選択する。

20

【0092】

上記のとおり、補正用プローブがハイブリダイズする検体試料中の核酸も、認識配列を含まないことが好ましい。そのため、ゲノムDNAの塩基配列の情報を用いれば、プローブがハイブリダイズする領域の近傍に認識配列を含まないゲノムDNAとハイブリダイズするプローブを、補正用プローブとして選択できる。

【0093】

また、第3の実施形態では、補正用プローブに加えて検出用プローブの選択を解析装置100のCPU110aに実行させることもできる。この場合、上記のステップSbにおいてCPU110aは、ハードディスク110dからゲノムDNAの塩基配列をさらに読み出し、認識配列およびゲノムDNAの塩基配列に基づいて、マイクロアレイのプローブから検出用プローブを選択する。

30

【0094】

本実施形態のアプリケーションプログラム140aは、検体試料と対照試料とを別々に複数のマイクロアレイに供して、対象核酸を検出する方法を解析装置100のCPU110aに実行させることもできる。

【0095】

図4は、2つの同一のマイクロアレイ(マイクロアレイAおよびB)を用いた場合の、解析装置100のCPU110aによる、第3の実施形態のマイクロアレイデータ解析の処理を示すフローチャートである。

40

【0096】

検体試料を接触させた検出用プローブおよび補正用プローブを備えたマイクロアレイAを、マイクロアレイ測定装置200にセットし、検出用プローブから発せられる第1検体シグナルおよび補正用プローブから発せられる第2検体シグナルを測定する。同様に、対照試料を接触させた検出用プローブおよび補正用プローブを備えたマイクロアレイBを、マイクロアレイ測定装置200にセットし、検出用プローブから発せられる第1対照シグナルおよび補正用プローブから発せられる第2対照シグナルを測定する。

【0097】

解析装置100のCPU110aは、マイクロアレイ測定装置200から、第1検体シグナル測定値、第2検体シグナル測定値、第1対照シグナル測定値および第2対照シグナ

50

ル測定値を、入出力インターフェース 110f を介して受信し（ステップ S 1' ）、これらシグナル測定値をコンピュータのハードディスク 110d に記憶する。

【0098】

CPU 110a は、ハードディスク 110d から第 2 検体シグナル測定値および第 2 対照シグナル測定値を読み出して、これらシグナル測定値の統計的代表値として最頻値を算出し（ステップ S 2' ）、これらの値をそれぞれ検体バックグラウンド値および対照バックグラウンド値として解析装置 100 のハードディスク 110d に記憶する。上記のマイクロアレイ A および B に補正用プローブが複数存在していた場合は、複数の第 2 検体シグナル測定値および第 2 対照シグナル測定値から、それぞれの統計的代表値として最頻値を算出する。

10

【0099】

CPU 110a は、ハードディスク 110d から第 1 検体シグナル測定値および検体バックグラウンド値を読み出し、第 1 検体シグナル測定値から検体バックグラウンド値を減じて検体補正值を算出する。同様に、CPU 110a は対照補正值も算出する（ステップ S 3' ）。上記のマイクロアレイ A および B に検出用プローブが複数配置されていた場合は、複数の第 1 検体シグナル測定値および第 1 対照シグナル測定値をそれぞれ検体バックグラウンド値および対照バックグラウンド値で減じて、それぞれ補正值を算出する。

【0100】

CPU 110a は、算出された補正值が負の値か否かを判断する（ステップ S 4' ）。

【0101】

CPU 110a は、ステップ S 4' において算出された補正值が負の値であると判定された場合、補正值を「0」とする（ステップ S 5' a ）。なお、ステップ S 4' において算出された補正值が負の値ではないと判定された場合、算出された補正值がそのまま補正值となる。

20

【0102】

CPU 110a は、検体補正值を対照補正值で除して S/N 比を算出し、検体補正值および対照補正值からウィルコクソンの符号順位検定によって有意確率を算出する（ステップ S 6' ）。これらの値は、上記の 2 つのマイクロアレイを用いる場合の本実施形態の方法の工程（5）において述べたことと同様にして取得される。

【0103】

CPU 110a は、算出した解析値をディスプレイなどの表示部 120 により出力する（ステップ S 7' ）。

30

【0104】

図 5 は、バックグラウンド補正のための特別なプローブがあらかじめ特定されていないマイクロアレイ A および B を用いた場合の、解析装置 100 の CPU 110a による、第 4 の実施形態のマイクロアレイデータ解析の処理を示すフローチャートである。ここで、認識配列およびマイクロアレイに配置されたプローブの塩基配列のデータは、ハードディスク 110d に予め記憶されている。

【0105】

検体試料を接触させたマイクロアレイを、マイクロアレイ測定装置 200 にセットし、プローブから発せられるシグナルを測定する。

40

【0106】

検体試料を接触させたマイクロアレイ A をマイクロアレイ測定装置 200 にセットし、プローブから発せられる検体シグナルを測定する。同様に、対照試料を接触させたマイクロアレイ B をマイクロアレイ測定装置 200 にセットし、プローブから発せられる対照シグナルを測定する。

【0107】

解析装置 100 の CPU 110a は、マイクロアレイ測定装置 200 から検体シグナル測定値および対照シグナル測定値を、入出力インターフェース 110f を介して受信し（ステップ S a' ）、これらを解析装置 100 のハードディスク 110d に記憶する。

50

【0108】

CPU110aは、ハードディスク110dから認識配列およびマイクロアレイのプロブの塩基配列を読み出し、相補配列を含まないプロブを補正用プロブとして選択し（ステップSb'）、選択したプロブを解析装置100のハードディスク110dに記憶する。この処理により、マイクロアレイのプロブから補正用プロブが選択される。

【0109】

CPU110aは、検体シグナル測定値および対照シグナル測定値をハードディスク110dから読み出し、検出用プロブから得られた第1検体シグナル測定値および第1対照シグナル測定値、ならびに選択された補正用プロブから得られた第2検体シグナル測定値および第2対照シグナル測定値を取得し（ステップS1'）、これらの値を解析装置100のハードディスク110dに記憶する。

10

【0110】

ステップS1'以降のCPU110aの処理手順は、第3の実施形態で述べたステップS2'～ステップS7'と同様である。

【0111】

また、第4の実施形態では、補正用プロブに加えて検出用プロブの選択を解析装置100のCPU110aに実行させることもできる。この場合、上記のステップSb'において、CPU110aは、ハードディスク110dからゲノムDNAの塩基配列をさらに読み出し、認識配列およびゲノムDNAの塩基配列に基づいて、マイクロアレイのプロブから検出用プロブを選択する。

20

【0112】

以下に、本発明について実施例を挙げて詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】

【0113】

核酸結合タンパク質が結合する塩基配列を含む対象核酸の検出を、本発明による解析方法と従来法としてのAffymetrix社のTASによる解析方法とで行った。本実施例では、核酸結合タンパク質は抗メチル化シトシン抗体であり、核酸結合タンパク質が結合する塩基配列はCpG配列である。

なお、本実施例での具体的な操作手順は、使用したキットおよび試薬類に添付のマニュアルの記載に従って行った。

30

（検体試料の調製）

（1）メチル化DNA免疫沈降法

乳癌由来細胞株MCF-7、MB-MDA231およびSK-BR-3、ならびに正常乳腺上皮細胞株HMECから抽出した各ゲノムDNA（4μg）を生体試料として、これらを制限酵素MseI（NEB社）と37℃で一晩反応させて300～1000bpになるように断片化した。次いで、反応後の各生体試料を95℃で10分間加熱して変性させ、一本鎖ゲノムDNAにした。

変性させた生体試料をChromatin Immunoprecipitationアッセイキット（Upstate biotechnology社）に付属の希釈用緩衝液で希釈した。次いで、得られた各希釈液にProtein G Sepharoseビーズ（GE Healthcare社）を添加し、4℃で30分間ローテーションした後、遠心分離することにより、該ビーズに非特異的に結合するタンパク質などを除いた。そして、遠心分離後に上清を回収し、各上清をそれぞれ二分して別々のチューブに移し、一方に抗メチル化シトシン抗体（検体試料用）を添加し、他方に正常マウスIgG抗体（Santa Cruz社；対照試料用）を添加して、4℃で一晩ローテーションした。

40

これらにProtein G Sepharoseビーズ（GE Healthcare社）を添加して4℃で1時間ローテーションして、上記の抗体とこれらが結合するゲノムDNAとの複合体をビーズに結合させた。その後、これらを遠心分離して、上清を除いてビーズを回収した。回収したビーズをアッセイキットに付属の洗浄用緩衝液で洗浄した後、免疫沈降させた複合体中のゲノムDNAを溶出用緩衝液で溶出した。

50

上記のメチル化 DNA 免疫沈降法で得たゲノム DNA を、プロテイナーゼ K と反応させた後、Qiaquick PCR purification キット (QIAGEN 社) を用いて精製して、検体試料および対照試料を得た。

【 0 1 1 4 】

(2) 検体試料の確認

上記 (1) のメチル化 DNA 免疫沈降法によりメチル化 DNA を特異的に回収できたかを確認するために PCR 法およびアガロース電気泳動法を行った。

(i) PCR 反応液の調製

下記の試薬を混合し、25 μ l の反応液を調製した。

2x fastStart SYBR Green Master Mix (ROCHE 社)	1 2 . 5 μ l	10
フォワード (F) - プライマー (1 0 μ M)	1 μ l	
リバーズ (R) - プライマー (1 0 μ M)	1 μ l	
ゲノム DNA (0 . 4 ng/ μ l)	1 μ l	
d H ₂ O	9 . 5 μ l	

【 0 1 1 5 】

用いたプライマーの配列は、下記のとおりである。

G S T P 1 のプライマーとして、

F: GAGGCCTTCGCTGGAGTT (配列番号 1)

R: GTACTCACTGGTGGCGAAGA (配列番号 2)

E R のプライマーとして、

F: GCCTACGAGTTCAACGCCG (配列番号 3)

R: AACGCCGCAGCCTCAGAC (配列番号 4)

c h 1 4 - c g f 1 のプライマーとして、

F: GGAGGAGTCAAGAGAAGTTGGAAGC (配列番号 5)

R: CCCACACTCCATTTCCATTCCTC (配列番号 6)

(ii) PCR 反応条件

上記の反応液を用い、下記の条件で PCR を行った。

9 5 で 1 0 分、

9 5 で 3 0 秒、6 6 で 1 5 秒、7 2 で 3 0 秒を 4 5 サイクル、

9 5 で 1 分、6 6 で 3 0 秒、9 5 で 3 0 秒を 1 サイクル。

(iii) アガロース電気泳動

上記の各 PCR 産物を、2% アガロースゲルを用いて電気泳動し、増幅した核酸を確認した。

【 0 1 1 6 】

G S T P 1 遺伝子は、そのプロモーター領域が M C F - 7 細胞においてメチル化修飾を受けるが、M B - M D A 2 3 1 細胞および H M E C 細胞ではメチル化修飾を受けないことが知られている遺伝子である。また、E R 遺伝子は、そのプロモーター領域が S K - B R - 3 細胞においてメチル化修飾を受けるが、M C F - 7 細胞ではメチル化修飾を受けないことが知られている遺伝子である。c h 1 4 - c g f 1 遺伝子は、メチル化修飾を受けないことが知られている遺伝子である。

【 0 1 1 7 】

これらの PCR により得られた増幅産物を、アガロース電気泳動に供したゲルの写真を図 6 に示す。

図 6 より、M C F - 7 細胞の G S T P 1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化 DNA が、抗メチル化シトシン抗体を用いた免疫沈降法により特異的に回収されたことが示された。

【 0 1 1 8 】

(3) 検体試料中の核酸の増幅および標識

上記検体試料および対照試料に含まれる核酸を、WT-Ovation (商標) Pico RNA Amplification System Version 1.0 (NuGEN 社) を用いて増幅した。次いで、各試料の吸光度 (2

10

20

30

40

50

60 nmおよび280 nm)を測定して増幅した核酸の濃度を確認した。

そして、上記で増幅した検体試料および対照試料に含まれる核酸を、FL-Ovation(商標)cDNA Biotin Module V2(NuGEN社)を用いて断片化およびビオチン標識を行った。

【0119】

(マイクロアレイ解析)

(1) 試料とマイクロアレイとの接触

上記で調製した検体試料および対照試料を、マイクロアレイとしてのGeneChip(登録商標)Human Promoter 1.0R Array(Affymetrix社)に接触させて、マイクロアレイのプロープとのハイブリダイゼーションを行った。検体試料および対照試料について、同種のマイクロアレイを1つずつ用いた。各試料の接触後の染色および洗浄を行った。洗浄後のマイクロアレイを、GeneChip(登録商標)AutoLoader(Affymetrix社)にセットし、GeneChip(登録商標)Scanner 3000 7G(Affymetrix社)を用いてスキャン(シグナルの測定)を行った。スキャンの結果は、Affymetrix社から提供されているコンピューターワークステーションで処理し、実験データとしてバイナリファイル(CELファイル)を取得した。なお、ハイブリダイゼーションから実験データ取得まで、Affymetrix社から提供されるマニュアルに従って行った。

10

【0120】

(2) 従来法(TAS)によるデータ解析

検体試料および対照試料から得たCELファイルに基づき、TAS(Affymetrix社)を用いてシグナル測定値および有意確率を取得した。得られた有意確率は、標準ブラウザであるIntegrated Genome Browser(IGB; Affymetrix社)を用いて棒グラフとして可視化することができる。IGBに表示される有意確率は、(変換値) = $-10 \log_{10}$ (有意確率)の式で変換されており、その変換値が20以上の場合に対象核酸を有意に検出できたと考えられる。

20

しかし、本実施例におけるTAS解析では、MCF-7細胞においてメチル化修飾を受けることが知られているGSTP1遺伝子のプロモーター領域のゲノムDNAについて、MCF-7細胞由来の検体試料からは、HMEC細胞およびMB-MDA231細胞と同様にメチル化DNAを有意に検出できなかった。

【0121】

(3) 本発明の方法によるデータ解析

本発明の方法によってマイクロアレイデータを解析した。なお、解析には、一般的なコンピュータを用いた。

30

まず、コンピュータに、以下のデータを入力した。

- ・核酸結合タンパク質が結合する塩基配列としての“CG”
- ・Human Promoter 1.0R Arrayに搭載されているプロープの塩基配列
- ・ヒトゲノムDNAの塩基配列
- ・検体試料および対照試料から得たCELファイル
- ・制限酵素MseIの認識配列“TACC”
- ・制限酵素MseIで断片化されたDNAの長さとしての「300」塩基

【0122】

ここで、Human Promoter 1.0R Arrayに搭載されているプロープの塩基配列は、Affymetrix社のウェブページ(http://www.affymetrix.com/Auth/analysis/downloads/lf/tiling/Hs_PromPR_v02-3_NCB1v36.bpmap.zip)より取得した。また、ヒトゲノムDNAの塩基配列はNCBIのftpサイト(ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/H_sapiens/April_14_2003)より取得した。

40

【0123】

ヒトゲノムDNAの塩基配列および制限酵素MseIの認識配列“TACC”から、ヒトゲノムDNAの制限酵素MseI処理で得られるDNA断片の塩基配列のデータを取得した。次いで、制限酵素MseIで断片化されたDNAの長さとしての「300」塩基および得られたDNA断片の塩基配列から、300塩基以上の塩基配列を有するDNA断片を抽出した。

50

さらに、核酸結合タンパク質が結合する塩基配列としての“CG”および抽出した300塩基以上の塩基配列を有するDNA断片から、塩基配列中に“CG”を含まないDNA断片の塩基配列を抽出した。ここで、抽出した「配列“CG”を含まない300塩基以上のDNA断片の塩基配列」を以下、「断片配列」ともいう。

【0124】

核酸結合タンパク質が結合する塩基配列としての“CG”およびHuman Promoter 1.0R Arrayに搭載されているプローブの塩基配列から、“CG”配列を含まないプローブを取得した。次に、取得した“CG”配列を含まないプローブおよび断片配列から、断片配列と相補的なプローブを、補正用プローブとして抽出した。なお、補正用プローブ以外のプローブは、検出用プローブとした。

10

【0125】

検体試料および対照試料から得たCELファイルから、Cell File Conversion Toolを用いて、シグナル測定値を取得した。ここで、Cell File Conversion Toolは、Yvert Labのウェブページ (http://www.ens-lyon.fr/LBMC/gisv/index.php?option=com_content&task=view&id=37&Itemid=27) から入手した。取得したシグナル測定値および検出用プローブの情報から、検体試料と接触させたHuman Promoter 1.0R Arrayの検出用プローブから得られた第1検体シグナル測定値を抽出した。同様に、対照試料と接触させたHuman Promoter 1.0R Arrayの検出用プローブから得られた第1対照シグナル測定値を抽出した。また、取得したシグナル測定値および補正用プローブの情報から、検体試料と接触させたHuman Promoter 1.0R Arrayの補正用プローブから得られた第2検体シグナル測定値を抽出した。同様に、対照試料と接触させたHuman Promoter 1.0R Arrayの補正用プローブから得られた第2対照シグナル測定値を抽出した。

20

【0126】

第2検体シグナル測定値の最頻値を、検体バックグラウンド値として算出した。また、第2対照シグナル測定値の最頻値を、対照バックグラウンド値として算出した。

【0127】

次に、第1検体シグナル測定値から検体バックグラウンド値を減じて、検体補正値を算出した。また、第1対照シグナル測定値から対照バックグラウンド値を減じて、対照補正値を算出した。

30

【0128】

算出した検体補正値が負の値であれば、検体補正値を0とした。検体補正値が負の値でなければ、そのままの値とした。同様に、算出した対照補正値が負の値であれば、対照補正値を0とした。対照補正値が負の値でなければ、そのままの値とした。

【0129】

検体補正値を対照補正値で除して、バックグラウンド補正後のS/N比を算出した。ただし、対照補正値が0の場合は、そのプローブについてはS/N比を算出しなかった。また、バックグラウンド補正をしていない場合のS/N比として、第1検体シグナル測定値を第1対照シグナル測定値で除した値を算出した。

さらに、検体補正値および対照補正値からウィルコクソンの符号順位検定によって、有意確率を算出した。

40

【0130】

図7および図8に、それぞれMCF-7細胞およびSK-BR-3細胞からの検体試料の解析結果(S/N比および有意確率)についてのグラフを示す。図7のグラフは、GSTP1遺伝子のプロモーター領域について連続する10プローブについてのS/N比および有意確率の平均値を示し、図8のグラフは、ER遺伝子のプロモーター領域について連続する7プローブについてのS/N比および有意確率の平均値を示す。

本発明の方法により算出した有意確率の平均値は、上記のいずれのプロモーター領域についても0.01以下であった。

図7および8より、本発明の方法は、従来法であるTAS解析よりもS/N比を向上させ、有意確率が顕著に低くなり、高精度にメチル化遺伝子を検出できることが明らかとな

50

った。

【実施例 2】

【0131】

GeneChip (登録商標) Human Promoter 1.0R Array (Affymetrix社) には、クオリティチェックコントロールプローブとしてPoly-Aコントロールおよびハイブリダイゼーションコントロールが複数配置されている。これらのコントロールプローブは、外部コントロールであり、動物由来の核酸とはハイブリダイゼーションしないことに基づいて配置されている。

そこで、コントロールプローブとしてのPoly-Aコントロールおよびハイブリダイゼーションコントロールプローブに本発明の方法を適用した。つまり、これらコントロールプローブから核酸結合タンパク質としての抗メチル化シトシン抗体が結合する CpG 配列を含まないプローブを抽出し、それらを補正用プローブとして用いることで、より高い精度で CpG 配列を含む対象核酸を検出できるか否かを検討した。

【0132】

検体試料および対照試料は、MCF-7細胞から実施例1と同様にして調製した。次いで、検体試料および対照試料を実施例1と同様にして、それぞれGeneChip (登録商標) Human Promoter 1.0R Array (Affymetrix社) に接触させ、各シグナル測定値を得た。

各マイクロアレイのプローブからPoly-Aコントロールおよびハイブリダイゼーションコントロールのプローブを抽出し、さらにこれらのプローブから、CpG配列を含まないプローブ(以下、「補正用プローブC」ともいう)を抽出した。なお、比較として、Poly-Aコントロールおよびハイブリダイゼーションコントロールからなるコントロールプローブを、補正用プローブDとした。

【0133】

検体試料を接触させたマイクロアレイにおいて、補正用プローブCから得られたシグナル測定値の最頻値をバックグラウンド値Cとした。また、補正用プローブDから得られたシグナル測定値の最頻値をバックグラウンド値Dとした。

次いで、第1検体シグナル測定値からバックグラウンド値Cを減じて、検体補正值Cを算出した。また、第1検体シグナル測定値からバックグラウンド値Dを減じて、検体補正值Dを算出した。

対照試料を接触させたマイクロアレイにおいても上記と同様にして、対照補正值Cおよび対照補正值Dを算出した。

【0134】

上記で算出した検体補正值Aおよび対照補正值A、ならびに検体補正值Bおよび対照補正值Bを、それぞれ一对の標本としてウィルコクソンの符号順位検定により有意確率をそれぞれ算出した。

【0135】

図9に、補正用プローブCおよびDのそれぞれでバックグラウンド補正した場合の有意確率をグラフで示した。グラフは、GSTP1の連続した10プローブについての有意確率の平均値である。

図9より、CpG配列を含む補正用プローブDによるバックグラウンド補正では有意確率が0.008よりも高いが、CpG配列を含まない補正用プローブCによるバックグラウンド補正では有意確率が0.008よりも低くなり、より精度の高い検出が可能となることが明らかとなった。

【0136】

マイクロアレイによる対象核酸の検出を創薬ターゲットの探索や疾患の診断などに応用する場合は、その検出結果には高い信頼性が求められる。したがって、データの有意確率はできる限り低い値であることが好ましい。

よって、検体試料中の核酸に相補的ではないプローブを補正用プローブとして用いるバックグラウンド補正よりも、そのプローブからさらにCpG配列を含まないプローブを抽出し、抽出したプローブを補正用プローブとして用いるバックグラウンド補正の方が有用

10

20

30

40

50

であることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0137】

本発明の方法は、検体試料から核酸結合タンパク質が結合する塩基配列を含む対象核酸を検出するマイクロアレイ実験において、高精度の検出結果を提供できるので、創薬ターゲットの探索や疾患の診断などの産業上の分野に利用可能である。

【符号の説明】

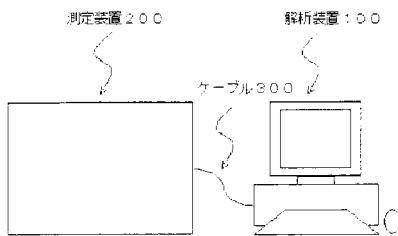
【0138】

- 100 解析装置
- 110 本体
- 110 a CPU
- 110 b ROM
- 110 c RAM
- 110 d ハードディスク (HD)
- 110 e 読出装置
- 110 f 入出インターフェース
- 110 g 画像出インターフェース
- 110 h バス
- 120 表示部
- 130 入力デバイス
- 140 可搬型記憶媒体
- 140 a アプリケーションプログラム
- 200 測定装置
- 300 ケーブル

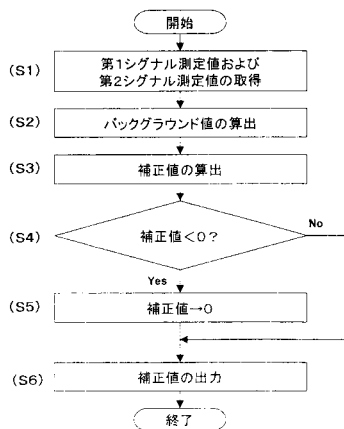
10

20

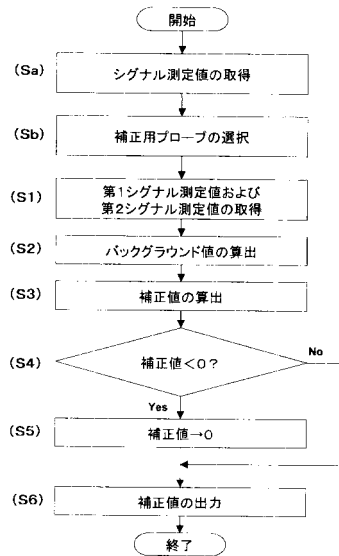
【図1】



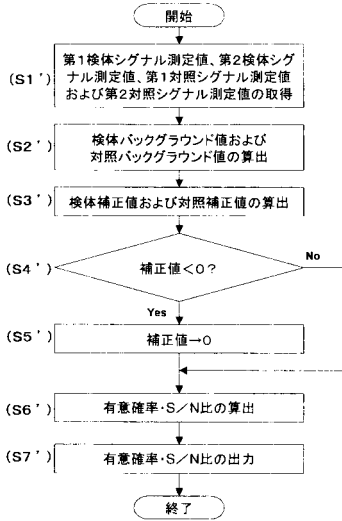
【図2】



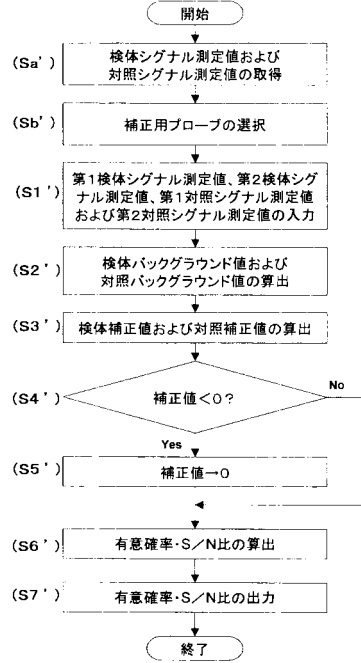
【図3】



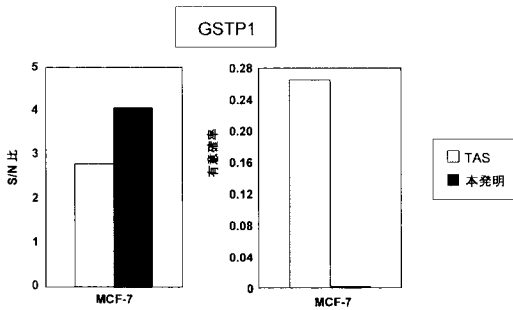
【 図 4 】



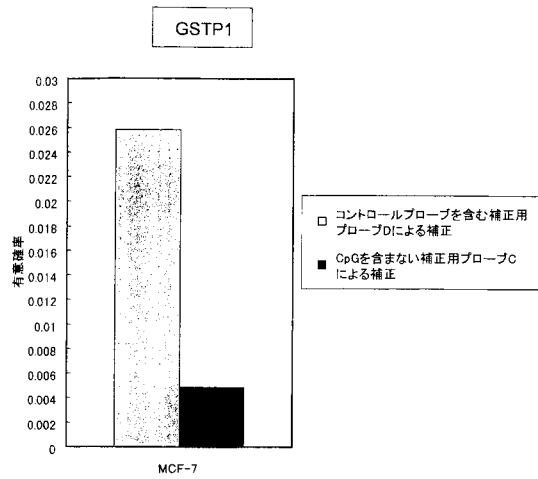
【 図 5 】



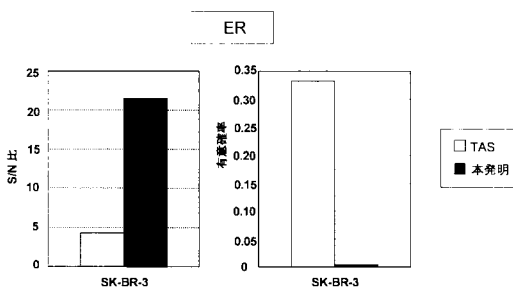
【 図 7 】



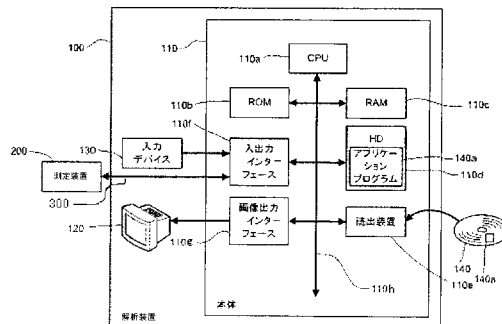
【 図 9 】



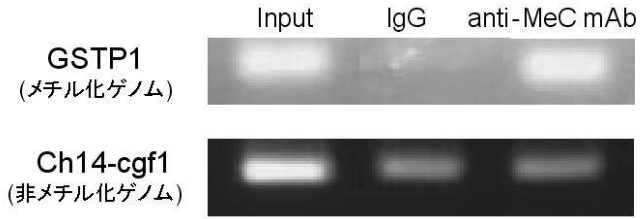
【 図 8 】



【 図 10 】



【 図 6 】



IgG: 標準マウス IgG
anti-MeCmAb: 抗メチル化シトシンモノクローナル抗体

【 配 列 表 】

2011217726000001 . app

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA09 CA20 HA14
4B063 QA01 QQ42 QR08 QR55 QR62 QS25 QS34

专利名称(译)	使用微阵列检测核酸的方法和用于微阵列数据分析的程序		
公开(公告)号	JP2011217726A	公开(公告)日	2011-11-04
申请号	JP2010139459	申请日	2010-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	希森美康公司		
[标]发明人	酒井綾子 田島慶彦 梶田昌裕		
发明人	酒井 綾子 田島 慶彦 梶田 昌裕		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/543 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6837 G16B20/00 G16B25/00		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/53.M G01N33/543.575 G01N37/00.102 C12M1/00.A C12N15/00.F C12N15/09.200 C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6837.C C12Q1/6837.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B029/AA07 4B029/BB20 4B029/CC02 4B029/CC08 4B029/FA12 4B029/FA15 4B029/GB06		
优先权	2009155926 2009-06-30 JP 2010068297 2010-03-24 JP		
其他公开文献	JP5698471B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种基于微阵列的方法，能够以高精度从分析物样品中检测含有核酸结合蛋白结合的碱基序列的靶核酸。解决方案：在该方法中，信号从不含任何与核酸结合蛋白结合的碱基序列互补的序列的探针获得，所述序列用作背景以校正从与靶核酸杂交的检测探针获得的信号。

