

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-527868

(P2023-527868A)

(43)公表日 令和5年6月30日(2023.6.30)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/6886(2018.01)	C 1 2 Q 1/6886	Z 4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	Z N A

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全43頁)

(21)出願番号	特願2022-573626(P2022-573626)	(71)出願人	518221830 広州康立明生物科技股 フン 有限公司 中国広東省広州市広州高新技术産業開発 区科学城開源大道1 1号A 2棟第六層
(86)(22)出願日	令和2年9月29日(2020.9.29)	(74)代理人	100079108 弁理士 稲葉 良幸
(85)翻訳文提出日	令和5年1月30日(2023.1.30)	(74)代理人	100109346 弁理士 大貫 敏史
(86)国際出願番号	PCT/CN2020/118998	(74)代理人	100117189 弁理士 江口 昭彦
(87)国際公開番号	WO2021/243904	(74)代理人	100134120 弁理士 内藤 和彦
(87)国際公開日	令和3年12月9日(2021.12.9)	(72)発明者	呉孝林 中国広東省広州市広州高新技术産業開発 区科学城開源大道1 1号A 2棟第六層
(31)優先権主張番号	202010494245.X		
(32)優先日	令和2年6月3日(2020.6.3)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 遺伝子マーカー組成物及びその使用

(57)【要約】

本発明は、腫瘍遺伝子マーカー組成物、メチル化検出試薬、キット及びその使用を開示する。HOXB4、SRCIN1 遺伝子組み合わせのメチル化レベルを検出することにより、肺がんサンプルを区別することができる。本発明の試薬は、試験により、肺がんを検出及び診断できることが実証されており、臨床的応用価値を有する。

【選択図】 図2

AA 不同标志物组合在痰液样本中检测的ROC 曲线

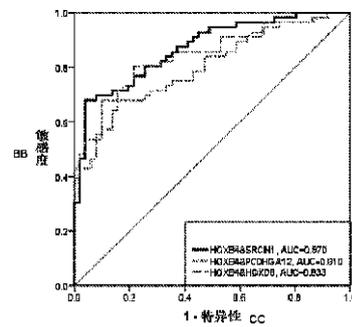


图2

AA ROC CURVE OF DIFFERENT MARKER COMBINATIONS FOR TESTING SPUTUM SAMPLE
BB SENSITIVITY
CC 1-SPECIFICITY

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

遺伝子マーカー組成物であって、

前記遺伝子マーカーは、H O X B 4 及び S R C I N 1 を含む、遺伝子マーカー組成物。

【請求項 2】

肺がん検出試薬又はキットの製造における多遺伝子のメチル化組合せ検出試薬の使用であって、前記遺伝子は、H O X B 4 及び S R C I N 1 を含む、使用。

【請求項 3】

H O X B 4 及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化検出試薬を含む、多遺伝子メチル化組合せ検出試薬 / キット。

【請求項 4】

前記多遺伝子メチル化組合せ検出試薬は、それぞれの遺伝子のメチル化検出プライマー及び / 又はプローブを含み、

選択的に、それぞれの遺伝子の C p G アイランドに対して得られるプライマー及び / 又はプローブを含み、

選択的に、それぞれの遺伝子の遺伝子本体、遺伝子間領域、プロモーター領域又は前記プロモーター領域の近傍領域の C p G アイランドに対して得られるプライマー及び / 又はプローブを含むことを特徴とする、請求項 2 に記載の使用又は請求項 3 に記載の試薬。

【請求項 5】

前記 H O X B 4 遺伝子のメチル化検出プライマーにおける上流プライマーは、

I : 配列番号 1、配列番号 16 及び配列番号 19 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 又は 100 % の同一性を有するヌクレオチド配列 ; 及び

II : I に示される配列の相補配列 ;

のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含み、

及び / 又は、前記 H O X B 4 遺伝子のメチル化検出プライマーにおける下流プライマーは、

III : 配列番号 2、配列番号 17 及び配列番号 20 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 又は 100 % の同一性を有するヌクレオチド配列 ; 及び

IV : III に示される配列の相補配列 ;

のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含み、

及び / 又は、前記 S R C I N 1 遺伝子のメチル化検出プライマーにおける上流プライマーは、

V : 配列番号 4 及び配列番号 22 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 又は 100 % の同一性を有するヌクレオチド配列 ; 及び

VI : V に示される配列の相補配列 ;

のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含み、

及び / 又は、前記 S R C I N 1 遺伝子のメチル化検出プライマーにおける下流プライマーは、

VII : 配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 又は 100 % の同一性を有するヌクレオチド配列 ; 及び

VIII : VII に示される配列の相補配列 ;

10

20

30

40

50

のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含み、

選択的に、前記H O X B 4 遺伝子のメチル化検出プライマーペアは、配列番号1及び配列番号2に示され、

選択的に、前記S R C I N 1 遺伝子のメチル化検出プライマーペアは、配列番号4及び配列番号5に示され、

選択的に、前記H O X B 4 遺伝子のメチル化検出プローブは、

I X : 配列番号3、配列番号18及び配列番号21に示されるヌクレオチド配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の同一性を有するヌクレオチド配列；及び

10

X : I X に示される配列の相補配列；

のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含み、

及び/又は、前記S R C I N 1 遺伝子のメチル化検出プローブは、

X I : 配列番号6に示されるヌクレオチド配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の同一性を有するヌクレオチド配列；及び

X I I : X I に示される配列の相補配列；

のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含むことを特徴とする、請求項2に記載の使用又は請求項3に記載の試薬。

20

【請求項6】

前記肺がんは、小細胞肺がん及び非小細胞肺がんから選択され、より好ましくは、前記非小細胞肺がんは、扁平上皮がん、腺がんから選択される請求項1に記載の遺伝子マーカー組成物、請求項2に記載の使用、又は請求項3に記載の試薬。

【請求項7】

前記検出試薬の対象となる検出サンプルは、肺胞洗浄液、組織、胸水、喀痰、血液、血清、血漿、尿液、前立腺液又は糞便から選択される少なくとも1種であり、

好ましくは、前記サンプルは、肺胞洗浄液、組織、喀痰から選択される少なくとも1種であり、

30

より好ましくは、前記サンプルは、肺胞洗浄液又は喀痰から選択される少なくとも1種である請求項1に記載の遺伝子マーカー組成物、請求項2に記載の使用、又は請求項3に記載の試薬。

【請求項8】

肺がん検出システムであって、

前記システムは、

(1) H O X B 4 及びS R C I N 1 遺伝子のメチル化組合せ検出部と、

(2) データ処理部と、

(3) 結果出力部と、

を含み、

40

好ましくは、前記メチル化検出部は、メチル化検出機器を含み、

好ましくは、前記メチル化検出機器は、蛍光定量P C R 装置、P C R 装置、シーケンサーのうちの1種又は複数種を含み、

好ましくは、前記データ処理部は、データ処理装置を含み、

好ましくは、前記データ処理装置は、計算器及びコンピュータのうちの1種又は複数種を含み、

好ましくは、前記コンピュータは、S P S S、S A S、E x c e l のうちの1種又は複数種のソフトウェアが搭載されたコンピュータを含み、

好ましくは、前記結果出力部は、結果出力装置を含み、

好ましくは、前記結果出力装置は、スクリーン及び紙報告書のうちの1種又は複数種を

50

含み、

好ましくは、前記メチル化検出部は、請求項 3 から 5 のいずれか 1 項に記載の多遺伝子のメチル化組合せ検出試薬をさらに含み、

好ましくは、前記データ処理部は、a . 検出サンプル及び正常対照サンプルのテストデータを受信し、b . 検出サンプル及び正常対照サンプルのテストデータを記憶し、c . 同じタイプの検出サンプルと正常対照サンプルのテストデータを比較し、d . 比較結果に基づいて被験体が肺がん罹患する確率又は可能性を判断するように構成され、

好ましくは、前記結果出力部は、被験体が肺がん罹患する確率又は可能性を出力するものであり、

好ましくは、前記データ処理部の判断標準では、結果に基づいて検出サンプルと正常サンプルとのメチル化結果を比較し、検出サンプルと正常サンプルとのメチル化に顕著な違い又は極めて顕著な違いがある場合、結果として検出サンプルの罹患リスクが高いと判断されることを特徴とする、肺がん検出システム。

【請求項 9】

前記肺がんは、小細胞肺がん及び非小細胞肺がんから選択され、より好ましくは、前記非小細胞肺がんは、扁平上皮がん、腺がんから選択されることを特徴とする、請求項 7 に記載の肺がん検出システム。

【請求項 10】

前記検出システムの対象となる検出サンプルは、肺胞洗浄液、組織、胸水、喀痰、血液、血清、血漿、尿液、前立腺液又は糞便から選択される少なくとも 1 種であり、

好ましくは、前記サンプルは、肺胞洗浄液、組織、喀痰から選択される少なくとも 1 種であり、

より好ましくは、前記サンプルは、肺胞洗浄液又は喀痰から選択される少なくとも 1 種であることを特徴とする、請求項 7 に記載の肺がん検出システム。

【請求項 11】

以下のステップ (1) から (3) を含む肺がんの診断方法であって、

ステップ (1) : 被験体に由来の検出サンプルにおける H O X B 4 及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化レベルを検出し、

ステップ (2) : 検出サンプルと正常対照サンプルとの H O X B 4 及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化レベルを比較し、

ステップ (3) : 検出サンプルと正常対照サンプルとのメチル化レベルのずれに基づいて肺がんを診断し、

選択的に、メチル化特異的定量 P C R (q M S P) により H O X B 4 及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化レベルを検出し、

選択的に、前記ステップ (1) において、前記検出は、被検体の検出サンプルと、H O X B 4 及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化レベルの検出試薬とを接触させることを含み、

選択的に、結果に基づいて検出サンプルと正常サンプルとのメチル化結果を比較し、検出サンプルと正常サンプルとのメチル化に顕著な違い又は極めて顕著な違いがある場合、結果として検出サンプルの罹患リスクが高いと判断され、

選択的に、前記検出サンプルは、肺胞洗浄液、組織、胸水、喀痰、血液、血清、血漿、尿液、前立腺液及び糞便から選択される少なくとも 1 種であり、

選択的に、前記サンプルは、肺胞洗浄液、喀痰、組織から選択される少なくとも 1 種であり、

選択的に、前記サンプルは、肺胞洗浄液又は喀痰から選択される少なくとも 1 種であり、

選択的に、前記肺がんは、小細胞肺がん及び非小細胞肺がんから選択され、

選択的に、前記非小細胞肺がんは、扁平上皮がん、腺がんから選択され、

選択的に、前記ステップ (1) において、多遺伝子メチル化組合せ検出試薬により H O X B 4 及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化レベルを検出し、前記組合せ検出試薬は、それぞれの遺伝子のメチル化検出プライマー及び / 又はプローブを含み、

10

20

30

40

50

選択的に、それぞれの遺伝子の C p G アイランドに対して得られるプライマー及び / 又はプローブを含み、

選択的に、それぞれの遺伝子の遺伝子本体、遺伝子間領域、プロモーター領域又は前記プロモーター領域の近傍領域の C p G アイランドに対して得られるプライマー及び / 又はプローブを含み、

選択的に、前記 H O X B 4 遺伝子のメチル化検出プライマーにおける上流プライマーは、

I : 配列番号 1、配列番号 1 6 及び配列番号 1 9 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % 又は 1 0 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列 ; 及び
I I : I に示される配列の相補配列 ;

10

のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含み、

及び / 又は、前記 H O X B 4 遺伝子のメチル化検出プライマーにおける下流プライマーは、

I I I : 配列番号 2、配列番号 1 7 及び配列番号 2 0 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % 又は 1 0 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列 ; 及び

20

I V : I I I に示される配列の相補配列 ;

のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含み、

及び / 又は、前記 S R C I N 1 遺伝子のメチル化検出プライマーにおける上流プライマーは、

V : 配列番号 4 及び配列番号 2 2 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % 又は 1 0 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列 ; 及び

V I : V に示される配列の相補配列 ;

のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含み、

30

及び / 又は、前記 S R C I N 1 遺伝子のメチル化検出プライマーにおける下流プライマーは、

V I I : 配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % 又は 1 0 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列 ; 及び

V I I I : V I I に示される配列の相補配列 ;

のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含み、

選択的に、前記 H O X B 4 遺伝子のメチル化検出プライマーペアは、配列番号 1 及び配列番号 2 に示され、

40

選択的に、前記 S R C I N 1 遺伝子のメチル化検出プライマーペアは、配列番号 4 及び配列番号 5 に示され、

選択的に、前記 H O X B 4 遺伝子のメチル化検出プローブは、

I X : 配列番号 3、配列番号 1 8 及び配列番号 2 1 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % 又は 1 0 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列 ; 及び

X : I X に示される配列の相補配列 ;

のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含み、

50

及び/又は、前記 S R C I N 1 遺伝子のメチル化検出プローブは、

X I : 配列番号 6 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % 又は 1 0 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列；及び

X I I : X I に示される配列の相補配列；

のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含むことを特徴とする、診断方法。

【請求項 1 2】

以下のステップ (1) から (4) を含む肺がんの治療方法であって、

(1) 被験体に由来の検出サンプルにおける H O X B 4 及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化レベルを検出し、

10

(2) 検出サンプルと正常対照サンプルとの H O X B 4 及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化レベルを比較し、

(3) 検出サンプルと正常対照サンプルとのメチル化レベルのずれに基づいて肺がんを診断し、

(4) 肺がんとして診断された被検体に肺がん治療薬を投与し、

選択的に、メチル化特異的定量 P C R (q M S P) により H O X B 4 及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化レベルを検出し、

選択的に、結果に基づいて検出サンプルと正常サンプルとのメチル化結果を比較し、検出サンプルと正常サンプルとのメチル化に顕著な違い又は極めて顕著な違いがある場合、結果として検出サンプルの罹患リスクが高いと判断され、

20

選択的に、メチル化特異的定量 P C R により遺伝子のメチル化レベルを検出し、

選択的に、前記検出サンプルは、肺胞洗浄液、組織、胸水、喀痰、血液、血清、血漿、尿液、前立腺液又は糞便から選択される少なくとも 1 種であり、

選択的に、前記サンプルは、肺胞洗浄液、喀痰、組織から選択される少なくとも 1 種であり、

選択的に、前記サンプルは、肺胞洗浄液又は喀痰から選択される少なくとも 1 種であり、

選択的に、前記肺がんは、小細胞肺がん及び非小細胞肺がんから選択され、

選択的に、前記非小細胞肺がんは、扁平上皮がん、腺がんから選択され、

30

選択的に、前記ステップ (1) において、多遺伝子メチル化組合せ検出試薬により H O X B 4 及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化レベルを検出し、前記組合せ検出試薬は、それぞれの遺伝子のメチル化検出プライマー及び/又はプローブを含み、

選択的に、それぞれの遺伝子の C p G アイランドに対して得られるプライマー及び/又はプローブを含み、

選択的に、それぞれの遺伝子の遺伝子本体、遺伝子間領域、プロモーター領域又は前記プロモーター領域の近傍領域の C p G アイランドに対して得られるプライマー及び/又はプローブを含み、

選択的に、前記 H O X B 4 遺伝子のメチル化検出プライマーにおける上流プライマーは

40

I : 配列番号 1、配列番号 1 6 及び配列番号 1 9 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % 又は 1 0 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列；及び

I I : I に示される配列の相補配列；

のうちのいずれか 1 つのヌクレオチド配列を含み、

及び/又は、前記 H O X B 4 遺伝子のメチル化検出プライマーにおける下流プライマーは、

I I I : 配列番号 2、配列番号 1 7 及び配列番号 2 0 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも

50

93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の同一性を有するヌクレオチド配列；及び

IV：IIIに示される配列の相補配列；

のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含み、

及び/又は、前記SRCIN1遺伝子のメチル化検出プライマーにおける上流プライマーは、

V：配列番号4及び配列番号22に示されるヌクレオチド配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の同一性を有するヌクレオチド配列；及び

10

VI：Vに示される配列の相補配列；

のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含み、

及び/又は、前記SRCIN1遺伝子のメチル化検出プライマーにおける下流プライマーは、

VII：配列番号5に示されるヌクレオチド配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の同一性を有するヌクレオチド配列；及び

VIII：VIIに示される配列の相補配列；

20

のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含み、

選択的に、前記HOB4遺伝子のメチル化検出プライマーペアは、配列番号1及び配列番号2に示され、

選択的に、前記SRCIN1遺伝子のメチル化検出プライマーペアは、配列番号4及び配列番号5に示され、

選択的に、前記HOB4遺伝子のメチル化検出プローブは、

IX：配列番号3、配列番号18及び配列番号21に示されるヌクレオチド配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の同一性を有するヌクレオチド配列；及び

30

X：IXに示される配列の相補配列；

のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含み、

及び/又は、前記SRCIN1遺伝子のメチル化検出プローブは、

XI：配列番号6に示されるヌクレオチド配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の同一性を有するヌクレオチド配列；及び

XII：XIに示される配列の相補配列；

のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含むことを特徴とする、治療方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物医学分野に属し、特に遺伝子マーカー組成物及びその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

肺がんは、気管支粘膜、腺、又は肺胞上皮に由来する肺の悪性腫瘍である。病理学的タイプによると、次のように分類することができる。1)小細胞肺がん(small cell lung cancer, SCLC)：特殊な病理学的タイプの肺がんであり、明らかに遠隔転移の傾向があり、予後が悪く、ほとんどの患者は放射線療法や化学療法に敏

50

感である。2) 非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) : 小細胞肺癌以外の他の病理学的タイプの肺癌であり、扁平上皮がん、腺がん、大細胞がんなどを含む。生物学的挙動と臨床経過にはある程度の違いがある。発生場所に依りて、次のように分類することができる。1) 中枢型肺癌 (central lung cancer) : 分節気管支開口内及びその上で増殖する肺癌である。2) 末梢型肺癌 (peripheral lung cancer) : 分節気管支開口から遠い位置で増殖する肺癌である。

【0003】

近年、人口の高齢化、大気汚染、喫煙などの要因の影響を受けて、中国の肺癌の発生率と死亡率は年々増加している。国立がんセンターが発表した「2017年中国がん登録年次報告書」によると、中国では毎分約7人ががんと診断されており、肺癌の発生率と死亡率は第1位となっている。中国は世界で最も多くの肺癌患者がいる国となっており、専門家は中国の肺癌患者の数が2025年まで100万人に達すると予測している。疫学的研究によると、喫煙は肺癌を引き起こす重要な要因である。世界では、肺癌の約80%~90%は、喫煙が原因である。非喫煙者と比較して、45~64歳で毎日1~19本と20本以上のタバコを吸う人の肺癌の罹患相対リスクは、それぞれ4.27と8.61であり、非喫煙者と比較して、毎日1~19本のタバコと20本以上のタバコの長期喫煙者の肺癌による死亡の相対リスクは、それぞれ6.14と10.73であった。肺癌の治療技術は日々進歩してきたが、5年生存率は4%からわずかに12%程度まで向上した。既存の抗悪性腫瘍薬は病気を軽減することしかできず、患者の無増悪生存期間の平均は3~5か月のみ延長されるが、ステージIの肺癌患者の場合、手術後の5年生存率は60%から70%と高い。したがって、肺癌の早期診断と早期手術は、肺癌の5年生存率を改善し、死亡率を下げる最も効果的な方法の1つである。

【0004】

現在の肺癌の臨床補助診断には、主に次の種類があるが、いずれも早期発見と早期診断を完全に達成することはできない。

(1) 血液生化学検査

原発性肺癌については、現在、特異的な血液生化学検査はない。肺癌患者の血中アルカリホスファターゼ又は血中カルシウムの上昇は、骨転移の可能性を考慮し、血中アルカリホスファターゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、乳酸脱水素酵素又はビリルビンの上昇は、肝転移の可能性を考慮する。

(2) 腫瘍マーカー検査

1) CEA : 肺癌患者の30%~70%は、血清中のCEAレベルが異常に高いが、主に進行した肺癌患者に見られる。現在、血清中のCEAの検査は、主に肺癌の予後を推定し、治療経過を監視するために使用されている。2) NSE : 小細胞肺癌の第一選択マーカーであり、小細胞肺癌の診断及び治療反応の監視に使用され、検出方法や使用する試薬によって基準値は異なる。3) CYFRA21-1 : 非小細胞肺癌の第一選択マーカーであり、肺の扁平上皮がんに対する診断感度は60%にも達することができ、検出方法や使用する試薬によって基準値は異なる。

(3) 画像検査

1) 胸部X線検査 : 胸部正面及び側面X線の線写真を含む必要がある。一次病院では、胸部正面及び側面のX線写真が依然として、肺癌の最初の診断のための最も基本的で好ましい画像診断方法である。肺癌が診断されるか又は疑われると、胸部CT検査を行う。2) CT検査 : 胸部CTは、肺癌の診断と鑑別診断、病期分類、治療後のフォローアップに使用される最も一般的で重要な肺癌の検査方法である。CTガイド下肺生検は、肺癌の重要な診断技術であり、対応可能な病院は、それを定性が困難な肺内病変の診断、肺癌の臨床診断に細胞診や組織診で検証する必要があるかつ他の方法では素材が入手困難である症例に適用することができる。近年、マルチスライスヘリカルCTと低線量CT (LDCT) は、肺癌の早期発見と死亡率の低下に効果的なスクリーニングツールである。国家肺癌検診研究 (NLST) により、LDCTは胸部X線スクリーニングと比較

10

20

30

40

50

して肺がん死亡率を20%減少できることが示されている。低線量ヘリカルCTは、肺がんの早期スクリーニングの重要な方法として推奨されているが、人的要因が多く、偽陽性率が非常に高い。3)超音波検査：主に腹部の重要臓器や腹腔、後腹膜リンパ節の転移の有無を調べるのに使用され、頸部リンパ節の検査にも使用されている。胸壁に隣接する肺内病変又は胸壁病変については、嚢胞性を識別し、超音波ガイド下生検を行うことができる。超音波は、胸水抜き的位置確定にもよく使用されている。4)骨スキャン：肺がんの骨転移の検出感度は高いが、ある程度の偽陽性率がある。肺がんの術前検査、局所症状を伴う患者に適用できる。

(4)他の検査

1)喀痰細胞診検査：現在、簡便な肺がんの非侵襲的診断法であり、連続塗抹検査で陽性率は約60%にも達することができ、肺がん疑い症例の一般的な診断法となっている。10

2)ファイバー気管支鏡検査：肺がん診断において最も重要な方法の一つであり、肺がんの質的・位置確定診断及び手術スキームの選択に対して重要な役割を果たし、手術治療を受ける患者にとって必要な一般的な検査項目である。気管支鏡穿刺生検(TBNA)は治療前の病期分類に有利であるが、技術的に困難でリスクが高いため、この検査を必要とする患者は、上級病院に転送してさらなる検査を受けるべきである。3)その他：経皮的肺生検、胸腔鏡下生検、縦隔鏡生検、胸水細胞診検査などは、適応がある場合、既存の条件に応じてそれぞれを使用して診断を支援することができる。

【0005】

画像検査におけるマルチスライスヘリカルCTと低線量CT(LDCT)は、肺がんの早期発見と死亡率の低下に効果的なスクリーニングツールである。国家肺がん検診研究(NLST)により、LDCTは胸部X線スクリーニングと比較して肺がん死亡率を20%減少できることが示されている。肺がんスクリーニング項目の成功又は失敗は、ハイリスク群の識別に依存することが臨床現場で証明されている。複数のハイリスク因子を統合したリスク予測モデルは、肺がんのハイリスク群を識別する方法の一つとして世界的に認知されている。リスクモデルは、臨床医に介入や治療の改善を支援することで、肺がん患者に対する治療効果をさらに改善することができる。ハイリスク群のスクリーニングが現在の高い肺がん死亡率を低下できることは世界的に認識されているが、ハイリスク群の同定は依然として解決が難しい問題である。肺がんスクリーニングのベネフィット・リスク比を最大化するために重要な問題は、第一にハイリスク群をどのように同定するかある。第二にどのような方法で集団をスクリーニングするかである。その方法は、ハイリスク因子の同定、総合リスクの定量化要約、及びスクリーニングベネフィット閾値の選択を含む。20 30

【0006】

技術の急速な発展に伴い、腫瘍マーカー検出は、画像診断と病理診断に続く腫瘍診断と治療の新しい分野になり、腫瘍の診断、検出、治療に大きな影響を与えることができる。腫瘍マーカーは、体液又は組織で検出でき、腫瘍の存在、分化度、予後推定、個別化医療及び治療効果などを反映することができる。早期肺がんの患者は明らかな症状がなく、医師や患者が気づきにくいに加え、血液や生化学項目には明らかな特異的マーカーが存在しないため、従来診断法では早期発見と早期診断が困難である。したがって、肺がんの早期診断、特に大規模な集団スクリーニングへの適用は比較的困難である。40

【0007】

ますます多くの研究により、腫瘍形成のプロセスに2種類のメカニズムが関与することが明らかである。一つは、DNAヌクレオチド配列の変化による変異、即ち、遺伝的メカニズムである。腫瘍は、遺伝子疾患として分子生物学の分野で実証されている。もう一つは、エピジェネティクス(epigenetics)メカニズムであり、即ち、DNA配列の変化に依存しない遺伝子発現レベルの変化であり、腫瘍形成のプロセスにおけるその役割はますます注目されている。遺伝学とエピジェネティクスの2つのメカニズムは交互に存在して共同で腫瘍の形成を促進する。遺伝子の異常なメチル化は、腫瘍形成の初期段階で現れ、遺伝子の異常なメチル化の程度は、腫瘍の進行中に増加する。よく見られる98種類の原発性ヒト腫瘍のゲノムを分析した結果、各腫瘍に少なくとも600個の異常に50

メチル化された CpG アイランドがあることを見出した。

【0008】

多くの研究により、プロモーターの異常なメチル化は多くの腫瘍の発生において頻発する初期イベントであることが示されているため、腫瘍関連遺伝子のメチル化状態は腫瘍形成の早期高感度指標であり、有望な腫瘍分子バイオマーカー (biomarker) と考えられている。さらに重要なことに、がん細胞は DNA を末梢血に放出することができる。正常人の末梢血には、ナノグラムレベルの遊離 DNA が存在する。研究により、腫瘍組織における腫瘍関連遺伝子のプロモーターの異常なメチル化は、末梢血血漿 / 血清、及び腫瘍関連臓器に関連する体液 (唾液、喀痰など) でも検出できることを見出した。これらの生物学的サンプルは、比較的入手が容易であり、それらのサンプルにある DNA を PCR 技術により大量に増幅した後、高感度で検出することができる。したがって、特定の腫瘍関連遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態を検出することにより、腫瘍の早期診断に非常に価値のある情報を提供することができる。他のタイプの腫瘍分子マーカーと比較して、プロモーターの異常なメチル化の検出にはより多くの利点がある。特定の遺伝子は、そのプロモーターの異常メチル化領域が異なるタイプの腫瘍において同じであるため、検出は比較的便利である。また、対立遺伝子欠失のようなマーカーと比較して、異常なメチル化は、陽性シグナルであり、正常組織の陰性バックグラウンドと容易に区別することができる。Estellerらは、22例の非小細胞肺癌 (NSCLC) の腫瘍組織及び血清中の p16、DAPK、GSTP1及びMGMTなどの遺伝子のプロモーター領域での異常なメチル化状態を検出した結果、68% (15/22) の腫瘍組織に少なくとも1種の遺伝子のプロモーターメチル化が存在することを見出し、15例の組織陽性症例のうち11例では、血清にもプロモーターの異常メチル化が検出された。また、多くの研究者は、肝臓がん、頭頸部がん、食道がん、及び結腸がん患者の腫瘍組織及び血清から特定の腫瘍関連遺伝子のプロモーターのメチル化を検出した。

【0009】

従来のがん検出技術は、主に感度が低く、偽陽性が多く、侵襲性が高いという問題がある。また、現在の一般的な検出技術では、早期がんを検出することは困難である。

【0010】

肺がんの非侵襲的検出、例えば喀痰検出はより困難である。肺がん患者の喀痰中の腫瘍マーカーについても研究されたが、他の腫瘍患者の血液サンプル中の腫瘍マーカーの検出及び評価と比較して、喀痰サンプルの成功率は非常に低い。これは主に次の理由によるものである。(1) 喀痰の組成は比較的複雑であり、異なる集団は、異なる疾患や環境下での喀痰の組成及び粘度に違いが大きい。(2) 喀痰には、気管上皮細胞、細菌、口腔粘膜細胞などの非肺がん細胞成分が多く含まれており、一般的なサンプル処理方法では、十分な数の肺がん由来 DNA を効果的にエンリッチメントすることはできない。(3) 多くの喫煙者は喀痰がでない。A J Hubersらは「Molecular sputum analysis for the diagnosis of lung cancer」において過去10件の文献を研究した結果、肺がん組織中のマーカーのメチル化程度の中央値は48%であるのに対し、喀痰でのメチル化程度の中央値は38%であり、メチル化マーカーは組織内での検出率が喀痰よりも明らかに高いことを示している。また、Rosalia Cirincioneの「Methylation profile in tumor and sputum samples of lung cancer patients detected by spiral computed tomography: A nested case-control」には、肺がんがん組織におけるRARbeta2、P16、RASSF1Aの検出率はそれぞれ65.5%、41.4%、51.7%に達するのに対し、喀痰における検出率は、わずか44.4%、5%であることが開示されている。

【発明の概要】

【0011】

本発明の目的の一つは、遺伝子マーカー組成物、及びこの遺伝子マーカー組成物を検出

する検出 / 診断試薬、並びにその使用を提供することにある。

【0012】

一方、本発明では、遺伝子マーカー組成物が提供される。前記遺伝子マーカーは、HOXB4及びSCRIN1を含む。

【0013】

本発明の遺伝子マーカー組成物は、各遺伝子マーカーにおける任意の長さの断片も含み、つまり、HOXB4、SCRIN1のそれぞれに由来する任意の断片（この断片の長さは任意である）の組み合わせは、いずれも本発明の保護範囲に含まれる。

【0014】

HOXB4遺伝子は、Antpホメオボックス遺伝子ファミリーのメンバーであり、17番染色体上のホメオボックスBクラスター遺伝子に属する。HOXB4遺伝子は、ホメオボックスDNA結合ドメインを持つ核タンパク質をコードし、コードされたタンパク質は発育に關与する配列特異的な転写因子として機能する。このタンパク質の細胞内又は異所性発現は、造血幹細胞及び前駆細胞をインビボ及びインビトロで増幅するため、治療性幹細胞増幅の潜在的な候補になる。

【0015】

SCRIN1 (SRC kinase signaling inhibitor 1) SRCキナーゼシグナル伝達阻害遺伝子1と呼ばれる。SCRIN1遺伝子とタンパク質は、SRCの負の調節因子として機能し、CSKを活性化することでSRC活性と下流のシグナル伝達を阻害し、細胞の拡散と移動を害するとともに、樹状突起スパインの形態を調節し、カルシウム依存性エキソサイトーシスに關与する。

【0016】

本発明は、肺がん検出試薬又はキットの製造における多遺伝子のメチル化組合せ検出試薬の使用をさらに提供する。前記遺伝子は、HOXB4及びSCRIN1を含む。

【0017】

現在、肺がんの見逃し率は比較的高い。特に、腺がんの場合では、喀痰の非侵襲的検出はさらに困難であり、検出率は非常に低い。これは、ほとんどの腺がんが小さい気管支から発生する末梢型肺がんであり、肺の深部にある脱落した細胞が喀痰により出るのがより困難であるためである。したがって、現在、肺がんの喀痰検出手段はほぼゼロである。

【0018】

早期腫瘍のスクリーニングでは、見逃し率の低減は非常に重要である。早期腫瘍スクリーニング製品がすべて又はほとんどの患者をスクリーニングできないと、見逃された患者は十分なリスク警告を得ることができない。そうすると、治療のタイミングが遅れてしまい、患者にとって大きな損失である。

【0019】

先行技術において肺がんに関連するいくつかの腫瘍マーカーが発見されたが、これらの腫瘍マーカーの検出試薬又は検出方法の制限により、これらの腫瘍マーカーの感度及び特異性は要求を満たすことができない。そのため、現在、当該技術分野では、肺がんに確実に適用できるスクリーニング手段をさらに研究する必要がある。しかし、非侵襲的スクリーニングは、サンプリング上で独特な利点を有するが、他の側面ではいくつかの制限がある。例えば、肺がんの中の腺がんについては、肺の深部にある脱落した細胞が喀痰により出るのが困難であるため、一般的には、当業者は、この種類の肺がんは非侵襲的スクリーニングに適さないと考えている。一方、他の種類の肺がんについても、現在報告されている非侵襲的スクリーニング方法では、臨床使用の要求を満たすことは困難である。関連研究は長年にわたって進められてきたが、臨床に適用可能な非侵襲的な肺がんのスクリーニング方法はまだない。

【0020】

本発明は、HOXB4及びSCRIN1遺伝子のメチル化検出試薬を含む多遺伝子メチル化組合せ検出試薬又はキットをさらに提供する。

【0021】

50

「メチル化検出試薬」は、前記遺伝子又は遺伝子内容のより小さい／短い任意の配列を検出する試薬を含む。つまり、前記遺伝子の中の任意部位（例えば、より小さい断片）に対する任意の検出及び検出試薬は、いずれも本発明の保護範囲に含まれる。

【0022】

本発明の遺伝子マーカーH O X B 4及びS C R I N 1は、組み合わせて検出され、つまり、本発明のいくつかの遺伝子マーカーは、同時に検出される。

【0023】

本明細書において、「検出」と「診断」は、同じであり、肺がんの早期診断に加えて、肺がんの中期及び晩期診断を含み、肺がんの選別、リスクの評価、予後、疾患の識別、病期の診断及び治療標的の選択も含む。

【0024】

肺がんマーカーであるH O X B 4及びS C R I N 1の組み合わせにより、肺がんの早期診断は可能となる。がん細胞におけるメチル化遺伝子が臨床的又は形態学的に正常に発現する細胞においてメチル化されたことが確定された場合、この正常に発現する細胞はがんを発展していることが示されている。そのため、肺がんは、正常に発現する細胞における肺がん特異性H O X B 4及びS C R I N 1遺伝子組み合わせのメチル化により早期に診断することができる。

【0025】

早期診断は、転移前、好ましくは組織又は細胞の形態学的変化の前にはがん罹患する可能性を発見することを含む。

【0026】

肺がんの早期診断に加え、本発明の試薬／キットは、肺がんの選別、リスクの評価、予後診断、疾患識別、病期での診断、及び治療標的の選択にも適用できる。

【0027】

病期で選択可能な実施形態として、肺がんの異なる段階又は時期での進行に応じてサンプルから得られるH O X B 4及びS C R I N 1遺伝子組み合わせのメチル化程度の測定により診断することができる。肺がんの各段階のサンプルから単離された核酸のH O X B 4及びS C R I N 1遺伝子組み合わせのメチル化程度と異常な細胞増殖がない組織のサンプルから単離された1つ又は複数の核酸のH O X B 4及びS C R I N 1遺伝子組み合わせのメチル化程度とを比較することにより、サンプルにおける肺がんの具体的な段階を確定することができる。

【0028】

一般的に、C p Gアイランドとは、C p Gジヌクレオチドが大量に含まれる領域を指し、通常、プロモーター及びその近傍の領域に位置する。本発明のメチル化の検出部位は、本発明のC p Gアイランドは、C p Gジヌクレオチドが大量に含まれるプロモーター及びその近傍領域のみならず、ヘテロメチル化のC p G部位、又は独立したC p G部位も含む。

【0029】

前記H O X B 4及びS C R I N 1遺伝子組み合わせのメチル化組合せ検出試薬は、従来技術におけるメチル化検出試薬であってもよい。従来技術には、標的遺伝子のメチル化を検出可能な方法が多くなり、例えば、メチル化特異性P C R (M S P)、メチル化特異的定量P C R (q M S P)、メチル化D N A特異的結合タンパク質のP C R、定量P C R及びD N Aチップ、メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼ、バイサルファイトシーケンシング法又はパイロシーケンシング法などがある。他のメチル化検出方法として、特許U S 6 2 0 0 7 6 8 7に記載の方法が挙げられる。それぞれの検出方法には、対応する試薬があり、これらの試薬はいずれも本発明のH O X B 4及びS C R I N 1遺伝子組み合わせのメチル化検出に適用できる。

【0030】

本発明は、H O X B 4及びS C R I N 1遺伝子組み合わせのメチル化組合せ検出試薬をさらに提供する。H O X B 4及びS C R I N 1遺伝子組み合わせにおけるそれぞれの遺伝

10

20

30

40

50

子に対するプライマー及び／又はプローブを含む。

【0031】

本発明のいくつかの具体的な実施形態において、H O X B 4及びS C R I N 1遺伝子組み合わせにおけるそれぞれの遺伝子のC p Gアイランドに対して得られるプライマー及び／又はプローブを含む。

【0032】

本発明のいくつかの具体的な実施形態において、プライマー及び／又はプローブは、定量的メチル化特異的PCR (qMSP)によりH O X B 4及びS C R I N 1遺伝子組み合わせにおけるそれぞれの遺伝子のメチル化を検出する。

【0033】

本発明のいくつかの具体的な実施形態において、本発明で提供されるメチル化検出試薬は、H O X B 4及びS C R I N 1遺伝子組み合わせにおけるそれぞれの遺伝子の遺伝子本体、遺伝子間領域又はプロモーター領域及びプロモーター領域の近傍領域のメチル化レベルを検出する。

【0034】

いくつかの実施形態において、本発明で提供されるメチル化検出試薬は、H O X B 4及びS C R I N 1遺伝子組み合わせにおけるそれぞれの遺伝子のプロモーター領域又は前記プロモーター領域の近傍領域のC p Gアイランドに対して得られるプライマー及び／又はプローブを含む。

【0035】

いくつかの実施形態において、本発明で提供されるメチル化検出試薬では、前記H O X B 4遺伝子のメチル化検出プライマーにおける上流プライマーは、

I : 配列番号1、配列番号16及び配列番号19に示されるヌクレオチド配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の同一性を有するヌクレオチド配列；及び

II : Iに示される配列の相補配列；

のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含み、

及び／又は、前記H O X B 4遺伝子のメチル化検出プライマーにおける下流プライマーは、

III : 配列番号2、配列番号17及び配列番号20に示されるヌクレオチド配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の同一性を有するヌクレオチド配列；及び

IV : IIIに示される配列の相補配列；

のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含み、

及び／又は、前記S R C I N 1遺伝子のメチル化検出プライマーにおける上流プライマーは、

V : 配列番号4及び配列番号22に示されるヌクレオチド配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の同一性を有するヌクレオチド配列；及び

VI : Vに示される配列の相補配列；

のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含み、

及び／又は、前記S R C I N 1遺伝子のメチル化検出プライマーにおける下流プライマーは、

VII : 配列番号5に示されるヌクレオチド配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも9

10

20

30

40

50

9 %又は100 %の同一性を有するヌクレオチド配列；及び
 V I I I : V I I に示される配列の相補配列；
 のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含む。

【0036】

いくつかの実施形態において、前記H O X B 4 遺伝子のメチル化検出プライマーペアは、配列番号1及び配列番号2に示される。

【0037】

いくつかの実施形態において、前記H O X B 4 遺伝子のメチル化検出プライマーペアは、配列番号16及び配列番号17に示される。

【0038】

前記H O X B 4 遺伝子のメチル化検出プライマーペアは、配列番号19及び配列番号20に示される。

【0039】

いくつかの実施形態において、前記S R C I N 1 遺伝子のメチル化検出プライマーペアは、配列番号4及び配列番号5に示される。

【0040】

いくつかの実施形態において、前記S R C I N 1 遺伝子のメチル化検出プライマーペアは、配列番号22及び配列番号5に示される。

【0041】

いくつかの実施形態において、前記H O X B 4 遺伝子のメチル化検出プローブは、
 I X : 配列番号3、配列番号18及び配列番号21に示されるヌクレオチド配列と少なくとも85 %、少なくとも90 %、少なくとも91 %、少なくとも92 %、少なくとも93 %、少なくとも94 %、少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、少なくとも99 %又は100 %の同一性を有するヌクレオチド配列；及び

X : I X に示される配列の相補配列；

のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含み、

及び/又は、前記S R C I N 1 遺伝子のメチル化検出プローブは、

X I : 配列番号6に示されるヌクレオチド配列と少なくとも85 %、少なくとも90 %、少なくとも91 %、少なくとも92 %、少なくとも93 %、少なくとも94 %、少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、少なくとも99 %又は100 %の同一性を有するヌクレオチド配列；及び

X I I : X I に示される配列の相補配列；

のうちのいずれか1つのヌクレオチド配列を含む。

【0042】

いくつかの実施形態において、前記肺がんは、小細胞肺がん及び非小細胞肺がんから選択される。

【0043】

いくつかの実施形態において、前記非小細胞肺がんは、扁平上皮がん、腺がんから選択される。

【0044】

本発明は、前記メチル化組合せ検出試薬を含む肺がんの検出キットをさらに提供する。

【0045】

いくつかの実施形態において、本発明で提供されるキットは、キットに一般的に使用される試薬をさらに含む。例えば、q M S P に一般的に使用される転換剤は、メチル化されていないシトシン塩基をウラシルに転換するが、メチル化されたシトシン塩基が変化しない。前記転換剤には特に制限がなく、従来技術に開示のシトシンからウラシルへの転換を実現できる試薬であればよく、例えば、ヒドラジン塩、重亜硫酸塩及び亜硫酸水素塩（例えば、ピロ亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素カリウム、亜硫酸水素セシウム、亜硫酸水素アンモニウムなど）のうちの1種又は複数種が挙げられる。また、遺伝子増幅に一般的に使

10

20

30

40

50

用されるDNAポリメラーゼ、dNTPs、Mg²⁺イオン及び緩衝液などがある。

【0046】

いくつかの実施形態において、前記試薬又はキットは、内部標準遺伝子の検出試薬をさらに含む。

【0047】

いくつかの実施形態において、前記内部標準遺伝子は、 - アクチンである。

【0048】

いくつかの実施形態において、前記内部標準遺伝子の検出試薬は、内部標準遺伝子に対するプライマー及びプローブである。

【0049】

いくつかの実施形態において、前記内部標準遺伝子の検出試薬は、配列番号13及び配列番号14に示されるプライマーペア及び配列番号15に示されるプローブである。

【0050】

本発明は、肺がん検出試薬又はキットの製造におけるH O X B 4及びS C R I N 1遺伝子のメチル化組合せ検出試薬の使用を提供する。

【0051】

本発明は、プライマーを提供する。前記プライマーは、配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号5、配列番号16、配列番号17、配列番号19、配列番号20、配列番号22に示される配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の同一性を有するヌクレオチド配列、又はその相補配列から選択される少なくともいずれか1つである。

【0052】

本発明は、プライマーを提供する。前記プライマーは、配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号5に示される配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の同一性を有するヌクレオチド配列、又はそれらの相補配列から選択される少なくともいずれか1つである。

【0053】

いくつかの実施形態において、前記プライマーは、配列番号1及び配列番号2、配列番号4及び配列番号5に示される少なくとも1対のプライマーペアから選択される。

いくつかの実施形態において、前記プライマーは、配列番号1及び配列番号2、配列番号4及び配列番号5に示されるプライマーペアから選択される。

【0054】

前記プライマーは、前記核酸断片を増幅するために使用される。当該技術分野では、プライマーを成功に設計するのは、PCRにとって極めて重要である。一般的なPCRに対して、メチル化の検出では、プライマー設計の影響はより重要である。これは、メチルチオール化がDNA鎖における「C」を「U」に変換させることでGCの含有量が減少し、PCR反応後に配列に長く連続した「T」が形成されるため、DNA鎖の断裂が引き起こされやすく、これによって、適切なTm値を有しかつ安定したプライマーを選択するのが困難であるためである。一方、チオール化処理されたDNA、チオール化処理されていないDNA、及び不完全に処理されたDNAを区別するためには、プライマーに十分な数の「C」がある必要がある。これによっても、安定したプライマーの選択はより困難になる。したがって、DNAメチル化検出では、プライマーに対する増幅断片の選択（例えば、増幅断片の長さ及び位置）及びプライマーの選択などは、いずれも検出の感度及び特異性に影響を与えている。本発明者らは、実験により異なる増幅目的断片及びプライマーの検出効果には違いがあることを見出した。多くの場合、特定の遺伝子又は核酸断片の腫瘍と非腫瘍における発現が違っていることを見出したが、腫瘍のマーカとして臨床応用するには

10

20

30

40

50

まだ長い道のりがある。最も主要な原因は、検出試薬に制限があることで、この潜在的な腫瘍マーカーの検出感度及び特異性が検出要求に満たしにくい、又は検出方法の操作が複雑でコストが高く、大規模な臨床応用が困難であることにある。

【0055】

別の態様では、本発明は、核酸プローブをさらに提供する。前記核酸プローブは、配列番号3、配列番号6、配列番号18及び配列番号21に示される配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の同一性を有するヌクレオチド配列、又はそれらの相補配列から選択される少なくともいずれか1つである。

10

【0056】

本発明の好ましい実施形態として、前記核酸プローブは、配列番号3及び配列番号6に示される配列から選択される。

【0057】

いくつかの実施形態において、本発明で提供されるキットは、増幅用のプライマーペアを含む第1容器と、プローブを含む第2容器とを含む。

【0058】

いくつかの実施形態において、前記キットは、説明書をさらに含む。

【0059】

いくつかの実施形態において、前記キットは、核酸抽出試薬をさらに含む。

20

【0060】

いくつかの実施形態において、前記キットは、サンプリング装置をさらに含む。

【0061】

本発明は、メチル化検出試薬若しくはキット又は肺がんの検出試薬若しくはキットの製造における前記メチル化検出試薬、キット、プライマー、プローブの使用を提供する。

【0062】

本発明は、メチル化検出又は肺がん検出における前記メチル化検出試薬、キット、プライマー、プローブの使用をさらに提供する。

【0063】

本発明は、肺がん検出システムをさらに提供する。前記システムは、
(1) HOXB4及びSRCIN1遺伝子のメチル化組合せ検出部と、
(2) データ処理部と、
(3) 結果出力部と、
を含む。

30

【0064】

いくつかの実施形態において、前記メチル化検出部は、メチル化検出機器を含む。

【0065】

いくつかの実施形態において、前記メチル化検出部は、前記メチル化組合せ検出試薬、キット、プライマー、プローブをさらに含む。

【0066】

いくつかの実施形態において、前記メチル化検出機器は、蛍光定量PCR装置、PCR装置、シーケンサーのうちの1種又は複数種を含む。

40

【0067】

いくつかの実施形態において、前記データ処理部は、データ処理装置を含む。

【0068】

前記データ処理装置は、当業者が使用できるデータ処理可能な任意の設備、機器又は装置を含む。

【0069】

いくつかの実施形態において、前記データ処理装置は、計算器、コンピュータのうちの1種又は複数種を含む。

50

【 0 0 7 0 】

前記コンピュータには、当業者が使用できるデータ処理又は統計分析可能な任意のソフトウェア又はプログラムが搭載されている。

【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態において、前記コンピュータは、SPSS、SAS、Excelのうちの1種又は複数種のソフトウェアが搭載されたコンピュータを含む。

【 0 0 7 2 】

いくつかの実施形態において、前記結果出力部は、結果出力装置を含む。

【 0 0 7 3 】

前記出力装置は、データ処理結果を読み取り可能なコンテンツとして表示可能な設備、機器又は装置を含む。 10

【 0 0 7 4 】

いくつかの実施形態において、前記メチル化検出部は、前記多遺伝子のメチル化組合せ検出試薬をさらに含む。

【 0 0 7 5 】

いくつかの実施形態において、前記結果出力装置は、スクリーン、紙報告書のうちの1種又は複数種を含む。

【 0 0 7 6 】

いくつかの実施形態において、前記データ処理装置は、a. 検出サンプル及び正常対照サンプルのテストデータを受信し、b. 検出サンプル及び正常対照サンプルのテストデータを記憶し、c. 同じタイプの検出サンプルと正常対照サンプルとのテストデータを比較し、d. 比較結果に基づいて被験体が肺がん罹患する確率又は可能性を判断するように構成される。 20

【 0 0 7 7 】

いくつかの実施形態において、前記結果出力部は、被験体の肺がん罹患確率又は可能性を出力するものである。

【 0 0 7 8 】

いくつかの実施形態において、データ処理部の判断標準は、限界値に基づいて肺がんサンプル及び正常サンプルを判断することである。

【 0 0 7 9 】

いくつかの実施形態において、本発明のHOXB4とSRCIN1の組合せ検出は、マルチプレックスPCRにより実現され得る。 30

【 0 0 8 0 】

いくつかの実施形態において、目的遺伝子であるHOXB4、SRCIN1のCp値及び/又はCp値(Cp値=Cp標的遺伝子-Cp内部標準遺伝子)に基づいてサンプルのメチル化レベルを判断する。

【 0 0 8 1 】

いくつかの実施形態において、そのうちの1つの遺伝子の前記組織サンプルにおけるCp値が前記Cp値の限界値よりも低くければ、肺がんサンプルとして判断され、2つの遺伝子の前記組織サンプルにおけるCp値がいずれも前記Cp値の限界値以上である場合、正常サンプルとして判断される。 40

【 0 0 8 2 】

いくつかの実施形態において、サンプルにおけるCp値の限界値の範囲は35~39であり、Cp値の限界値の範囲は4~12である。

【 0 0 8 3 】

いくつかの実施形態において、HOXB4とSRCIN1の組合せ検出では、組織サンプルにおいて、HOXB4のCp値の限界値は5.4であり、SRCIN1のCp値の限界値は6.5である。

【 0 0 8 4 】

いくつかの実施形態において、HOXB4とSRCIN1の組合せ検出では、喀痰サン 50

ブルにおいて、H O X B 4 及び S R C I N 1 の閾値線 C p 値は、それぞれ 3 6 . 9 及び 3 7 . 0 である。単一の遺伝子検出結果の中の 1 項が前記閾値よりも低い場合、陽性（即ち、肺がんサンプル）として判断され、検出結果の中の 2 項の結果がいずれも対応する閾値以上である場合、陰性（即ち、正常サンプル）として判断され得る。

【 0 0 8 5 】

いくつかの実施形態において、H O X B 4 と S R C I N 1 のマルチプレックス P C R 検出では、喀痰サンプルにおける C p 値の限界値は 3 6 . 7 であり、洗浄液サンプルにおける C p 値の限界値は 3 7 . 2 であり、 C p 値の限界値は 9 である。

【 0 0 8 6 】

いくつかの実施形態において、H O X B 4 と S R C I N 1 のマルチプレックス P C R 検出では、前記喀痰サンプルにおける C p 値が前記 C p 値の限界値よりも低い場合、肺がんサンプルとして判断され、前記喀痰サンプルの C p 値が前記 C p 値の限界値以上である場合、正常サンプルとして判断される。

10

【 0 0 8 7 】

いくつかの実施形態において、H O X B 4 と S R C I N 1 のマルチプレックス P C R 検出では、前記洗浄液サンプルにおける C p 値及び C p 値のいずれか前記 C p 値及び C p の限界値よりも低い場合、肺がんサンプルとして判断され、前記洗浄液サンプルの C p 値及び C p 値がいずれも前記 C p 値及び C p 値の限界値以上である場合、正常サンプルとして判断される。

【 0 0 8 8 】

いくつかの実施形態において、前記腫瘍は、肺がんである。

20

【 0 0 8 9 】

いくつかの実施形態において、前記腫瘍は、小細胞肺がん及び非小細胞肺がんである。

【 0 0 9 0 】

いくつかの実施形態において、前記非小細胞肺がんは、扁平上皮がん、腺がんから選択される。

【 0 0 9 1 】

いくつかの実施形態において、前記検出サンプル又はサンプルのタイプは、肺胞洗浄液、組織、胸水、喀痰、血液、血清、血漿、尿液、前立腺液又は糞便から選択される少なくとも 1 種である。

30

【 0 0 9 2 】

いくつかの実施形態において、本発明に記載のサンプルは、肺胞洗浄液、組織、喀痰から選択される少なくとも 1 種である。

【 0 0 9 3 】

いくつかの実施形態において、本発明に記載のサンプルは、肺胞洗浄液又は喀痰から選択される少なくとも 1 種である。

【 0 0 9 4 】

本発明は、肺がんの診断方法をさらに提供する。前記方法は、以下のステップ（ 1 ）から（ 3 ）を含む。

ステップ（ 1 ）：被験体に由来の検出サンプルの H O X B 4 及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化レベルを検出し、

40

ステップ（ 2 ）：検出サンプルと正常対照サンプルとの H O X B 4 及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化レベルを比較し、

ステップ（ 3 ）：検出サンプルと正常対照サンプルのメチル化レベルのずれに基づいて肺がんを診断する。

【 0 0 9 5 】

いくつかの実施形態において、本発明は、肺がんの診断方法を提供する。前記方法は、以下のステップ（ 1 ）から（ 3 ）を含む。ステップ（ 1 ）：被験体に由来の検出サンプル H O X B 4 及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化レベルを検出し、前記検出は、被検体の検出サンプルと H O X B 4 及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化レベルを検出する検出試薬と

50

を接触させ、ステップ(2)：検出サンプルと正常対照サンプルとのHOXB4及びSRCIN1遺伝子のメチル化レベルを比較し、ステップ(3)：検出サンプルと正常対照サンプルのメチル化レベルのずれに基づいて肺がんを診断する。

【0096】

いくつかの実施形態において、本発明は、肺がんの診断方法を提供する。前記方法は、以下のステップを含む。即ち、遺伝子のメチル化検出試薬を被検体に由来の検出サンプルに加え、この検出サンプルにおけるHOXB4及びSRCIN1遺伝子のメチル化レベルを検出し、検出サンプルと正常対照サンプルとのHOXB4及びSRCIN1遺伝子メチル化レベルと比較し、検出サンプルと正常対照サンプルのメチル化レベルのずれに基づいて肺がんを診断する。

10

【0097】

いくつかの実施形態において、前記ステップ(3)における前記ずれとは、HOXB4及びSRCIN1の2つの遺伝子のうちのいずれか1つのメチル化レベルのずれを指す。

【0098】

いくつかの実施形態において、前記ステップ(1)において、前記検出は、被検体の検出サンプルと、HOXB4及びSRCIN1遺伝子のメチル化レベルの検出試薬とを接触させることを含む。

【0099】

いくつかの実施形態において、メチル化特異的定量PCR(qMSP)によりHOXB4及びSRCIN1遺伝子のメチル化レベルを検出する。

20

【0100】

いくつかの実施形態において、結果に基づいて検出サンプルと正常サンプルとのメチル化結果を比較し、検出サンプルと正常サンプルとのメチル化に顕著な違い又は極めて顕著な違いがある場合、結果として検出サンプルの罹患リスクが高いと判断される。

【0101】

本発明の診断方法は、肺がん治療の前後に使用することができるか又は肺がん治療と併用することができる。治療後の使用として、例えば、治療成功の評価、又は治療後の肺がんの緩和、再発及び/若しくは進行(転移を含む)の監視がある。

【0102】

また、肺がんの治療方法をさらに提供する。前記方法は、以下のステップ(1)から(4)を含む。

30

ステップ(1)：被験体に由来の検出サンプルHOXB4及びSRCIN1遺伝子のメチル化レベルを検出し、

ステップ(2)：検出サンプルと正常対照サンプルとのHOXB4及びSRCIN1遺伝子のメチル化レベルを比較し、

ステップ(3)：検出サンプルと正常対照サンプルのメチル化レベルのずれに基づいて肺がんを診断し、

ステップ(4)：肺がんとして診断された被検体に肺がん治療薬を投与する。

【0103】

本発明の別の態様では、肺がんの治療方法が提供される。前記方法は、前記診断方法により肺がんとして診断された患者に対して、手術、化学療法、放射線療法、放射線化学療法、免疫療法、腫瘍溶解性ウイルス療法、当該技術分野で使用される他のタイプの肺がんの治療方法、又はこれらの治療方法の組み合わせを実施することを含む。

40

【0104】

本発明では、研究により、いくつかの具体的な実施形態において、HOXB4及びSRCIN1遺伝子の組み合わせを検出することにより、サンプルから肺がんサンプルを良好に区別することができる、肺がんに対する検出感度及び特異性は非常に高いことを見出した。

【図面の簡単な説明】

【0105】

50

【図1】組織サンプルにおいて異なるマーカー組成物を検出して得られたROC曲線である。

【図2】喀痰サンプルにおいて異なるマーカー組成物を検出して得られたROC曲線である。

【図3】洗浄液サンプルにおいてHOXB4とSRCIN1の組み合わせを検出して得られた増幅曲線である。

【発明を実施するための形態】

【0106】

以下、具体的な実施例により本発明の技術的手段をさらに説明する。具体的な実施例は、本発明の保護範囲を制限するものではない。当業者が本発明の思想に基づいて加えた非本質的な修正及び調整も本発明の保護範囲に含まれる。

【0107】

本発明において、「プライマー」又は「プローブ」とは、オリゴヌクレオチドを指し、標的分子（例えば、標的核酸断片）の少なくとも6つの連続したヌクレオチドの配列と相補的な領域を含む。いくつかの実施形態において、前記プライマー又はプローブの少なくとも一部の配列は、増幅される配列と相補的ではない。いくつかの実施形態において、プライマー又はプローブは、標的分子の少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19又は少なくとも20個の連続したヌクレオチドの配列と相補的な領域を含む。プライマー又はプローブが「標的分子の少なくともx個の連続したヌクレオチドと相補的」な領域を含む場合、前記プライマー又はプローブは、標的分子の少なくともx個の連続又は非連続のブロック化ヌクレオチドの少なくとも95%と相補的である。いくつかの実施形態において、プライマー又はプローブは、標的分子の少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%と相補的である。

【0108】

本発明において、「正常」サンプルとは、前記がん又は腫瘍がないと知られている個体から単離された同じタイプのサンプルを指す。

【0109】

本発明のメチル化検出サンプルは、DNA、RNA、mRNA含有DNA及びRNAサンプル、又はDNA-RNAハイブリッドを含むが、これらに限定されない。DNA又はRNAは、一本鎖又は二本鎖であってもよい。

【0110】

本発明において、前記「被験体」は、哺乳動物、例えば、ヒトである。

【0111】

本発明において、「メチル化レベル」は、「メチル化程度」と同義であり、通常、メチル化シトシンの百分率として表すことができ、メチル化シトシンの数をメチル化シトシンの数と非メチル化シトシンの数との和で割った値である。現在、一般的に、メチル化標的遺伝子の数を内部参照遺伝子の数で割る方法によりメチル化レベルを表している。従来技術においてメチル化レベルを表す他の方法を使用してもよい。

【0112】

本発明において、「サンプル」は、「検体」と同義である。

【0113】

本発明で使用されている用語「及び/又は」とは、是指并且涵盖1つ又は複数の関連する列挙項目の任意及び全ての可能な組み合わせを含むことを指す。2つ又は複数の項目のリストで使用される場合、用語「及び/又は」は、列挙項目のうちのいずれか1つを単独で使用することができ、又は2つ若しくは複数の列挙項目の任意の組み合わせを使用する

ことができることを示す。例えば、組成物、組み合わせ、構造などが成分 A、B、C 及び / 又は D を含む (又は包含する) として記述される場合、この組成物は、A 単独、B 単独、C 単独、D 単独、A と B の組み合わせ、A と C の組み合わせ、A と D の組み合わせ、B と C の組み合わせ、B と D の組み合わせ、C と D の組み合わせ、A と B と C の組み合わせ、A と B と D の組み合わせ、A と C と D の組み合わせ、B と C と D の組み合わせ、又は A と B と C と D の組み合わせを含んで使用することができる。

【 0 1 1 4 】

実施例 1

本発明者らは、組織サンプルにおいて、数百の遺伝子をスクリーニングし、 - アクチン遺伝子を内部標準遺伝子として HOXB4、SRCIN1、PCDHGA12、HOXD8 遺伝子の 2 つずつの組み合わせの検出結果を比較した。各遺伝子検出プライマー及びプローブは、以下の通りである。

【 0 1 1 5 】

HOXB4 の検出プライマー及びプローブ :

配列番号 1 HOXB4 - F1 プライマー F : T T C G T C G T T T T C G T T A T C A T T C

配列番号 2 HOXB4 - R1 プライマー R : T A C T A A C C G C C T C G C T A C

配列番号 3 HOXB4 - P1 プローブ P : F A M - C G G G T T T T T G C G T C G T T A T T C G T C - B Q 1

【 0 1 1 6 】

SRCIN1 の検出プライマー及びプローブ :

配列番号 4 SRCIN1 プライマー F : T C G T G T G T C G T C G T T C A G A C

配列番号 5 SRCIN1 プライマー R : G A A A T A C C C G C G A A A A T A C T G

配列番号 6 SRCIN1 プローブ P : F A M - A G T T T T A C G T T G G A G A A G C G T C G G - B Q 1

【 0 1 1 7 】

PCDHGA12 の検出プライマー及びプローブ :

配列番号 7 PCDHGA12 プライマー F : T T G G T T T T T A C G G T T T T C G A C

配列番号 8 PCDHGA12 プライマー R : A A A T T C T C C G A A A C G C T C G

配列番号 9 PCDHGA12 プローブ P : F A M - A T T C G G T G C G T A T A G G T A T C G C G C - B Q 1

【 0 1 1 8 】

HOXD8 の検出プライマー及びプローブ :

配列番号 10 HOXD8 プライマー F : T T A G T T T C G G C G C G T A G C

配列番号 11 HOXD8 プライマー R : C C T A A A A C C G A C G C G A T C T A

配列番号 12 HOXD8 プローブ P : F A M - A A A A C T T A C G A T C G T C T A C C C T C C G - B Q 1

【 0 1 1 9 】

- アクチンの検出プライマー及びプローブ :

配列番号 13 - アクチン プライマー F : G G A G G T T T A G T A A G T T T T T T G G A T T

配列番号 14 - アクチン プライマー R : C A A T A A A A C C T A C T C C T C C C T T A

配列番号 15 - アクチン プローブ P : F A M - T T G T G T G T T G G G T G G T G G T T - B Q 1

【 0 1 2 0 】

実験過程

10

20

30

40

50

1、DNA抽出

肺がんとして診断された患者のサンプル及び非肺がん患者のサンプル（それぞれパラフィン組織サンプル、喀痰サンプル、洗浄液サンプルを含む）を収集した。サンプルを前処理して細胞を分離した後、美基生物会社製のキット（HiPure FFPE DNA Kit (D3126-03)）の説明書に従ってDNAを抽出した。

【0121】

2、DNA修飾

ZYMO RESEARCH生物会社製のキット（EZ DNA Methylation™ KIT (D5002)）の説明書に従って亜硫酸水素塩修飾を行った。

【0122】

3、増幅と検出

【表1】

表1：反応液配合系

	HOXB4	SRCIN1	PCDHGA12	HOXD8	β-アクチン
反応成分	添加量 (μ l)				
上流プライマー (100 μ M)	0.125	0.125	0.125	0.05	0.125
下流プライマー (100 μ M)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
プローブ (100 μ M)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
マグネシウムイオン (25mM)	6	6	6	6	6
dNTPs (10mM)	1	1	1	1	1
Taq ポリメラーゼ (5 unit/ μ l)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
5X 緩衝液	6	6	6	6	6
滅菌水	11.2	11.2	11.2	11.275	11.2
テンプレート DNA	5	5	5	5	5
総体積	30	30	30	30	30

【0123】

増幅系：遺伝子を検出する増幅系を表2、表3に示す。

【0124】

【表2】

表2：HOXB4、SRCIN1及びβ-アクチンの増幅系

ステップ	温度と時間	サイクル数
予備変性	95°C 5分間	1
増幅	95°C 15秒	48
	58°C 30秒	
	72°C 30秒	
冷却	40°C 30秒	1

【0125】

【表3】

表3：PCDHGA12及びHOXD8の増幅系

ステップ	温度と時間	サイクル数
予備変性	95°C 5分間	1
増幅1	95°C 20秒	10
	60°C 30秒	
	70°C 30秒	
増幅2	95°C 20秒	45
	55°C 60秒	
	72°C 30秒	
冷却	40°C 30秒	1

10

20

30

40

50

【 0 1 2 6 】

4、検出結果

サンプル情報

肺組織サンプルは、合計 1 6 9 例あり、そのうち、正常組織サンプル 9 1 例、がん組織サンプル 7 8 例あり、7 8 例のがん群サンプルのうち、扁平上皮がん 2 7 例、腺がん 3 8 例、小細胞がん 3 例、大細胞がん 4 例、複合がん 1 例、明確に分類されていない肺がん 5 例あり、そのうち、腫瘍と腫瘍周辺対照サンプルが 7 7 対ある。

【 0 1 2 7 】

A C T B を内部標準遺伝子とし、標的遺伝子である H O X B 4、S R C I N 1 の C p 値 (C p 値 = C p 標的遺伝子 - C p A C T B) に基づいてサンプルのメチル化レベルを判断した。H O X B 4 及び S R C I N 1 の閾値線は、それぞれ C p 値 = 5 . 4、C p 値 = 6 . 5 であった。検出結果の中の 1 項が上記閾値よりも低い場合、陽性として判定され、検出結果の中の 2 項がいずれも対応する閾値以上である場合、陰性として判定され得る。

10

【 0 1 2 8 】

P C D H G A 1 2 の閾値線は、C p 値 = 2 5 . 9 であり、H O X D 8 の閾値線は、C p 値 = 2 7 . 4 であった。各マーカーの検出結果が対応する閾値線以上である場合、陰性として判定され、マーカーの検出結果が対応する閾値線よりも低い場合、陽性として判定され得る。

20

【 0 1 2 9 】

全ての組織サンプルにおいて H O X B 4 と S R C I N 1 の組み合わせ、H O X B 4 と P C D H G A 1 2 の組み合わせ、H O X B 4 と H O X D 8 の組み合わせを検出して得られた R O C 曲線を図 1 に示す。各遺伝子の組織における検出統計結果を表 3 に示す。

【 0 1 3 0 】

【表 4】

表 3 : 組織における検出結果

分析グループ	指標	HOXB4	SRCIN1	PCDHGA12	HOXD8
正常群と全部がん群との比較	特異性	100%	97.8%	97.8%	97.8%
	感度	73.1%	71.8%	50.0%	53.8%
正常群と扁平上皮がん群との比較	特異性	100%	97.8%	97.8%	97.8%
	感度	74.1%	51.9%	44.4%	81.5%
正常群と腺がん群との比較	特異性	100%	97.8%	97.8%	97.8%
	感度	78.9%	89.5%	50.0%	50%
正常群と小細胞がん群との比較	特異性	100%	97.8%	97.8%	97.8%
	感度	0%	33.3%	66.7%	33.3%
正常群と大細胞がん群との比較	特異性	100%	97.8%	97.8%	97.8%
	感度	50.0%	75.0%	50.0%	0%

30

表 3 (続き)

分析グループ	指標	HOXB4 と SRCIN1 の組み合わせ	HOXB4 と PCDHGA12 の組み合わせ	HOXB4 と HOXD8 の組み合わせ
正常群と全部がん群との比較	特異性	97.8%	97.8%	97.8%
	感度	89.7%	75.6%	78.2%
正常群と扁平上皮がん群との比較	特異性	97.8%	97.8%	97.8%
	感度	81.5%	74.1%	81.5%
正常群と腺がん群との比較	特異性	97.8%	97.8%	97.8%
	感度	100%	78.9%	81.6%
正常群と小細胞がん群との比較	特異性	97.8%	97.8%	97.8%
	感度	33.3%	66.7%	33.3%
正常群と大細胞がん群との比較	特異性	97.8%	97.8%	97.8%
	感度	75.0%	50.0%	50.0%

40

【 0 1 3 1 】

上記結果から分かるように、組織サンプルにおける H O X B 4 と S R C I N 1 の組合せ検出では、正常群と全部がん群とを比較した結果、特異性は 9 7 . 8 %、感度は 8 9 . 7 % であり、他の 2 群の組合せ検出と比較して、H O X B 4 と S R C I N 1 の組合せ検出は、特異性が一致した場合、感度がより高かった。また、H O X B 4 と S R C I N 1 の組合せ検出は、H O X B 4、S R C I N 1 の単独検出と比較して、予想外に感度を顕著に向上させた。

【 0 1 3 2 】

50

以上の結果から分かるように、HOXB4及びSRCIN1は組織サンプルにおいて、高特異性でありながら比較的高い感度を有した。特に組合せ検出により特異性にほぼ影響を与えずに感度を非常に大きく向上させた。喀痰は、非侵襲的な検出サンプルとして肺がんの診断上で重要な意味を持っている。そのため、本発明者らは、喀痰におけるHOXB4及びSRCIN1の2つのマーカーを検出した。

【0133】

実施例2：喀痰におけるHOXB4及びSRCIN1遺伝子の検出

サンプル情報：試験喀痰サンプルは、合計107例あり、そのうち、正常対照群サンプル51例、がん群サンプル56例あり、56例のがん群サンプルには扁平上皮がん20例、小細胞がん8例、腺がん20例、大細胞がん1例、巨細胞がん1例、明確に分類されていない肺がん6例がある。

10

【0134】

試験過程

a. 肺がんとして診断された患者及び非肺がん患者の喀痰サンプルを収集し、NaOHで減粘した後、遠心分離して沈殿した細胞を取り、PBSで2回洗浄し、その後、美基生物(Magen)会社のDNA抽出キット(HiPure FFPE DNA Kit, D3126-03)によりDNAを抽出した。

b. ZYMO RESEARCH生物会社のDNA変換キット(EZ DNA Methylation Kit, D5002)によりDNAの亜硫酸水素塩修飾を行った。

c. 各遺伝子マーカーのプライマー及びプローブ配列、反応液配合系、並びに増幅系は、実施例1と同様であった。

20

d. 標的遺伝子であるHOXB4、SRCIN1のCp値に基づいてサンプルのメチル化レベルを判断し、HOXB4及びSRCIN1の閾値線Cp値はそれぞれ36.9及び37.0であった。単一の遺伝子検出結果の中の1項が前記閾値よりも低い場合、陽性として判定され、検出結果の2つの結果がいずれも対応する閾値以上である場合、陰性として判定され得る。

PCDHGA12、HOXD8：PCDHGA12の閾値線は、Cp値=23.48であり、HOXD8の閾値線は、Cp値=26.4であった。各マーカーの検出結果が対応する閾値線以上である場合、陰性として判定され、マーカーの検出結果が対応する閾値線よりも低い場合、陽性として判定され得る。

30

e. 検出結果は以下に示される。

【0135】

【表5】

表4：喀痰における検出結果

分析グループ	指標	HOXB4	SRCIN1	PCDHGA12	HOXD8
正常群と全部がん群との比較	特異性	96.1%	96.1%	96.1%	96.1%
	感度	64.3%	48.2%	16.1%	23.2%
正常群と扁平上皮がん群との比較	特異性	96.1%	96.1%	96.1%	96.1%
	感度	80.0%	35.0%	25.0%	50.0%
正常群と腺がん群との比較	特異性	96.1%	96.1%	96.1%	96.1%
	感度	50.0%	40.0%	10.0%	5.0%
正常群と小細胞がん群との比較	特異性	96.1%	96.1%	96.1%	96.1%
	感度	50.0%	100%	12.5%	12.5%

40

表4 (続き)

分析グループ	指標	HOXB4 と SRCIN1 の組み合わせ	HOXB4 と PCDHGA12 の組み合わせ	HOXB4 と HOXD8 の組み合わせ
正常群と全部がん群との比較	特異性	92.2%	92.2%	94.1%
	感度	76.8%	64.3%	66.1%
正常群と全部扁平上皮がん群との比較	特異性	92.2%	92.2%	94.1%
	感度	85.0%	80.0%	85.0%
正常群と全部腺がん群との比較	特異性	92.2%	92.2%	94.1%
	感度	55.0%	50.0%	50.0%
正常群と全部小細胞がん群との比較	特異性	92.2%	92.2%	94.1%
	感度	100%	50.0%	50.0%

【0136】

50

喀痰サンプルにおいてHOXB4及びSRCIN1を検出して得られたROC曲線を図2に示し、統計結果を表4に示す。上記の結果から分かるように、喀痰サンプルにおいて、HOXB4とSRCIN1の組合せ検出では、正常群と全部がん群とを比較した結果、肺がんに対する感度は76.8%に達し、正常群と全部小細胞がん群と比較した結果、感度は100%に達した。単一の遺伝子マーカーに対して、HOXB4の検出率は64.3%であり、SRCIN1の検出率は48.2%であり、両者の組合せ検出では、肺がんに対する感度は76.8%まで向上し、両者は相乗効果を奏した。

【0137】

実施例3：HOXB4及びSRCIN1遺伝子のマルチプレックスPCR系の最適化

上記の結果により、HOXB4及びSRCIN1遺伝子の組合せ検出は、肺がんの検出率を顕著に向上できることが示されている。本発明者らは、マルチプレックスPCR方式によりPCR系を最適化することで検出プロセスを簡素化し、実施例2のサンプルをもとに検証した。各遺伝子の検出プライマー及びプローブは以下の通りである。

【0138】

HOXB4、SRCIN1及びβ-アクチンの検出プライマー及びプローブ配列は、実施例1と同様であった。

a. 喀痰サンプルの処理は実施例2と同様であった。

b. 反応液配合系を下表に示す。

【0139】

【表6】

表5：反応液配合系

反応成分	添加量 (μ l)
HOXB4-F1 (100 μ M)	0.125
HOXB4-R1 (100 μ M)	0.125
HOXB4-P1 (100 μ M)	0.05
SRCIN1-F1 (100 μ M)	0.125
SRCIN1-R1 (100 μ M)	0.125
SRCIN1-P1 (100 μ M)	0.05
β-アクチン-F1 (100 μ M)	0.125
β-アクチン-R1 (100 μ M)	0.125
β-アクチン-P2 (100 μ M)	0.05
マグネシウムイオン (25mM)	6
dNTPs (10mM)	1
Taqポリメラーゼ (5 unit/ μ l)	0.5
5X緩衝液	6
滅菌水	10.6
テンプレートDNA	5
総体積	30

【0140】

c. 増幅系は実施例1の表2に示される増幅系と同様であった。

d. 標的遺伝子であるHOXB4、SRCIN1のマルチプレックスPCRのCp値に基づいてサンプルのメチル化レベルを判断した。HOXB4及びSRCIN1のマルチプレックスPCRにより検出された閾値線Cp値は36.7であった。単一の遺伝子検出結果の中の1項が前記閾値よりも低い場合、陽性として判定され、検出結果が閾値以上である場合、陰性として判定され得る。

e. 検出結果を下表6に示す。

【0141】

10

20

30

40

50

【表 7】

表 6 : 検出結果

分析グループ	指標	HOXB4 と SRCIN1 の組合せ検出
正常群と全部がん群との比較	特異性	94.1%
	感度	78.6%
正常群と全部扁平上皮がん群との比較	特異性	94.1%
	感度	85.0%
正常群と全部腺がん群との比較	特異性	94.1%
	感度	60.0%
正常群と全部小細胞がん群との比較	特異性	94.1%
	感度	100%

10

【0142】

結果から分かるように、HOXB4 と SRCIN1 のマルチプレックス PCR 系の検出結果は、実施例 2 の検出結果とほぼ一致した。このマルチプレックス PCR 系の検出結果は、HOXB4 及び SRCIN1 遺伝子組み合わせによる肺がん検出結果の判定として適用できることを示している。

【0143】

実施例 4 : HOXB4 及び SRCIN1 遺伝子の洗浄液における検出サンプル情報

試験肺胞洗浄液サンプルは、合計 387 例あり、そのうち、正常対照群サンプル 303 例、がん群対照サンプル 84 例があり、84 例のがん群サンプルには、扁平上皮がん 21 例、腺がん 40 例、小細胞がん 10 例、不明な肺がんタイプ 13 例があった。

20

【0144】

HOXB4、SRCIN1、 β -アクチンの検出プライマー及びプローブ配列は実施例 1 と同様であった。

【0145】

試験過程

a. 肺がんとして診断された患者及び非肺がん患者の肺胞洗浄液サンプルを収集し、細胞を遠心分離し、その後、美基生物会社製の DNA 提取キット (HiPure FFPE DNA Kit, D3126-03) により DNA を抽出した。

30

b. ZYMO RESEARCH 生物会社の DNA 変換キット (EZ DNA Methylation Kit, D5002) により DNA の亜硫酸水素塩修飾を行った。

c. 反応液配合系及び増幅系は、実施例 3 と同様であった。

d. 検出結果は以下に示される。

ACTB を内部標準遺伝子として標的遺伝子である HOXB4、SRCIN1 の Cp 値及び Cp 値 ($Cp \text{ 値} = Cp \text{ 標的遺伝子} - Cp \text{ ACTB}$) に基づいてサンプルのメチル化レベルを判断した。HOXB4 及び SRCIN1 の閾値線は、Cp 値 = 37.2 であり、Cp 値 = 9 であった。検出結果の中の 1 項が上記閾値よりも低い場合、陽性として判定され、検出結果のうちの 2 項の結果がいずれも閾値以上である場合、陰性として判定された。387 例の洗浄液サンプルの検出結果を下表に示す。

40

【0146】

50

【表 8】

表 7：検出結果

分析グループ	指標	HOXB4 と SRCIN1 の組み合わせ
正常群と全部がん群との比較	特異性	96.0%
	感度	77.4%
正常群と全部扁平上皮がん群との比較	特異性	96.0%
	感度	71.4%
正常群と全部腺がん群との比較	特異性	96.0%
	感度	75.0%
正常群と全部小細胞がん群との比較	特異性	96.0%
	感度	90.0%

10

【0147】

全ての洗浄液サンプルにおいてHOXB4とSRCIN1の組み合わせを検出した増幅曲線を図3に示し、統計結果を表7に示す。上記の結果から分かるように、HOXB4とSRCIN1の組合せ検出は、96.0%の高特異性下で感度が77.4%に達した。肺がんのサブタイプに応じて比較分析した結果、扁平上皮がん群ではHOXB4とSRCIN1の組合せ検出の検出率は71.4%であった。特に、腺がんに対する検出効果では、HOXB4とSRCIN1の組合せ検出の感度は75.0%と高かった。これは、腺がんの検出に対して重大な意味を持っている。腺がんは、一般的に末梢型であり、気管支の木のような生理学的構造のため、肺胞洗浄液は、肺の深部にある肺胞又はがん組織に接触しにくい。

20

【0148】

実施例5：異なるマーカー組み合わせの喀痰サンプルにおける検出結果

本発明者らは、異なるマーカー組み合わせの喀痰サンプルにおける検出状況を比較した。比較のグループは以下の通りである。

組み合わせ1：HOXB4 + SRCIN1

組み合わせ2：HOXB4 + PCDHGA12

組み合わせ3：SRCIN1 + PCDHGA12

組み合わせ4：HOXB4 + HOXD8

組み合わせ5：SRCIN1 + HOXD8

組み合わせ6：SRCIN1 + PCDHGA12 + HOXD8

組み合わせ7：SRCIN1 + HOXB4 + HOXD8

30

【0149】

具体的な実験条件及び操作は実施例2と同様であった。

107例の喀痰サンプルにおいて異なるマーカーの組み合わせを検出した。正常対照群サンプルは51例、がん群サンプルは56例であり、各組み合わせの検出結果を表8に示す。

【0150】

【表 9】

表 8 (正常群 v s . 全部がん群)

	組み合わせ1	組み合わせ2	組み合わせ3	組み合わせ4	組み合わせ5	組み合わせ6	組み合わせ7
感度	76.8%	64.3%	46.4%	66.1%	53.6%	53.6%	76.8%
特異性	92.2%	92.2%	92.2%	94.1%	94.1%	90.2%	92.2%
AUC	0.870	0.810	0.848	0.833	0.883	0.832	0.892

40

【0151】

表8の結果から分かるように、異なるマーカーの組み合わせは喀痰サンプルの肺がん検出率に対して比較的大きい影響を与えた。組み合わせ1、組み合わせ2、組み合わせ3、組み合わせ4及び組み合わせ5を分析した結果、異なるマーカーのペアごとの組み合わせ間の検出結果には違いが大きく、組み合わせ1では、HOXB4とSRCIN1を組み合わせて検出することにより、特異性は92.2%、感度は76.8%であり、総合的な検

50

出性能は、他の4つの組み合わせよりも遥かに高かった。組み合わせ3、組み合わせ5、組み合わせ6又は組み合わせ1、組み合わせ7を分析した結果、マーカーを追加しても必ずしも検出率が向上するわけではなく、特異性の低下を招く可能性もある。結果から分かるように、いかなる遺伝子マーカーの組み合わせでも本発明の組み合わせ1のように感度、特異性及びAUCの3つ指標の最適な総合的效果を得ることができるわけではない。予想外に、目的遺伝子マーカーの数を増加させて組合せ検出（例えば、組み合わせ6,7）したとしても、特異性及び感度は対応して向上しなかった。

【0152】

実施例6：プライマー・プローブ組み合わせの選択

プライマー及びプローブも腫瘍マーカーの検出効果に対して極めて大きい影響を与える。本発明者らは、本発明の検出試薬が臨床検出に実際に適用できるように、検出感度及び特異性をできるだけ向上させるプローブ及びプライマーを探すために、研究の過程において複数ペアのプライマー及び対応するプローブを設計した。

40例の喀痰サンプルにおいて異なるプライマー・プローブ組み合わせを検出した。ここで、正常対照群サンプルは15例、がん群対照サンプルは25例あった。

【0153】

【表10】

表9：プライマーとプローブ

名称	配列番号	配列	作用
HOXB4-F1	配列番号1	TTCGTCGTTTTTCGTTATCATT	HOXB4 上流プライマー
HOXB4-R1	配列番号2	TACTAACCGCCTCGCTAC	HOXB4 下流プライマー
HOXB4-P1	配列番号3	FAM-CGGGTTTTTCGTCGTTATTCGTC-BQ1	HOXB4 検出プローブ
HOXB4-F2	配列番号16	ATTCGTTCCGGTATTACGTC	HOXB4 上流プライマー
HOXB4-R2	配列番号17	CCAAAATCCCGACAAACCG	HOXB4 下流プライマー
HOXB4-P2	配列番号18	FAM-CGGTTAGAGCGAGAGAGTAGTTT-BQ1	HOXB4 検出プローブ
HOXB4-F3	配列番号19	CGGGTTTCGGGCGCGCGC	HOXB4 上流プライマー
HOXB4-R3	配列番号20	CGAACGATAACGAAAACGACG	HOXB4 下流プライマー
HOXB4-P3	配列番号21	FAM-CGTGTATCGTGTAGCGTTACGCGG-BQ1	HOXB4 検出プローブ
SRCIN1-F1	配列番号4	TCGTGTGTCGTCGTTACAGAC	SRCIN1 上流プライマー
SRCIN1-R1	配列番号5	GAAATACCCGCGAAAATACTG	SRCIN1 下流プライマー
SRCIN1-P1	配列番号6	AGTTTTACGTTGGAGAAGCGTCGG	SRCIN1 検出プローブ
SRCIN1-F2	配列番号22	TATCGTGTATCGTCGTTCCGAC	SRCIN1 上流プライマー
SRCIN1-R1	配列番号5	GAAATACCCGCGAAAATACTG	SRCIN1 下流プライマー
SRCIN1-P1	配列番号6	AGTTTTACGTTGGAGAAGCGTCGG	SRCIN1 検出プローブ
A3-TqMF	配列番号13	GGAGGTTTAGTAAGTTTTTTGGATT	β-アクチン遺伝子上流プライマー
A3-TqMR	配列番号14	CAATAAAACTACTCCTCCCTTA	β-アクチン遺伝子下流プライマー
A3-TqP	配列番号15	FAM-TTGTGTGTTGGTGGTGGTT-BQ1	β-アクチン遺伝子検出プローブ

【0154】

各反応液配合系は一致し、反応液配合系、各増幅プロセスは一致し、増幅プロセスは実施例2と同様であった。

検出結果を表10、11に示す。

【0155】

【表11】

表10：喀痰サンプルにおけるHOXB4の検出結果（正常群 v s . 全部がん群）

グループ	特異性	感度
F1, R1, P1	93.3%	72.0%
F2, R2, P2	93.3%	44.0%
F3, R3, P3	93.3%	68.0%

【0156】

【表12】

表11：喀痰サンプルにおけるSRCIN1の検出結果（正常群 v s . 全部がん群）

グループ	特異性	感度
F1, R1, P1	93.3%	56.0%
F2, R1, P1	93.3%	52.0%

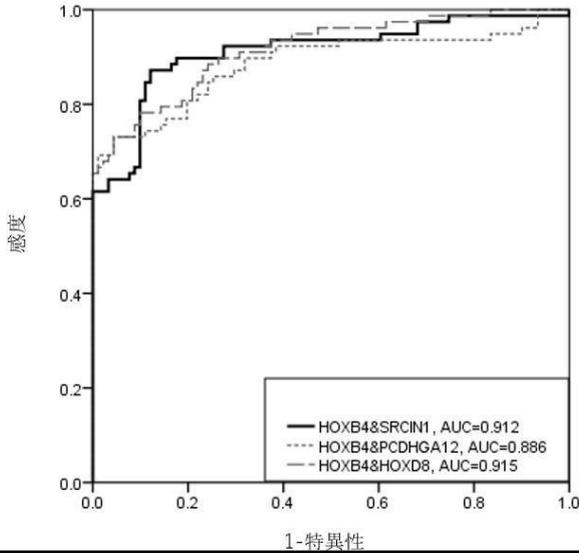
【0157】

上記の結果から分かるように、同一領域の異なるプライマーペアは、検出結果に影響を与える。特異性が一致する場合、HOXB-F1、HOXB-R1、HOXB-P1及びSRCIN1-F1、SRCIN1-R1、SRCIN1-P1のプライマーとプローブの組み合わせは、感度がより高かった。

【図面】

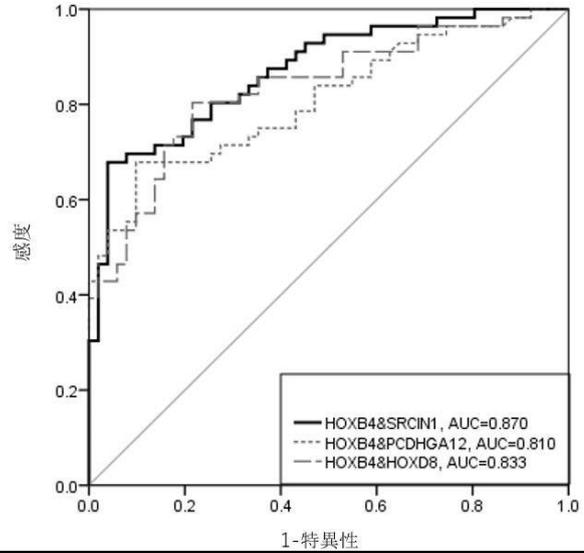
【図1】

組織サンプルにおいて異なるマーカー組み合わせを検出して得られたROC曲線



【図2】

喀痰サンプルにおいて異なるマーカー組み合わせを検出して得られたROC曲線

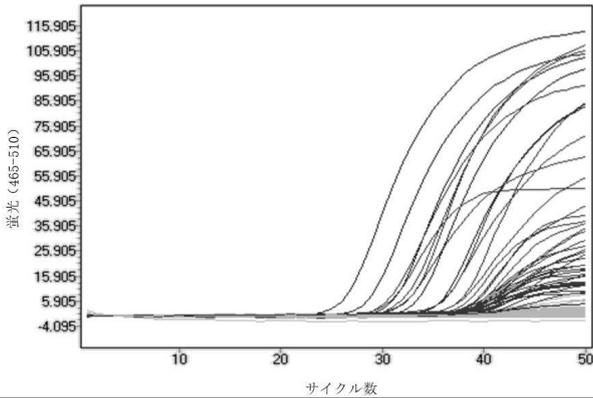


10

20

【図3】

増幅曲線



30

【配列表】

202352786800001.app

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和5年1月30日(2023.1.30)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

H O X B 4 遺伝子のメチル化検出試薬及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化検出試薬を含む多遺伝子メチル化組合せ検出キットであって、

前記 H O X B 4 遺伝子のメチル化検出試薬は、第 1 プライマーペア及び / 又は第 1 プロープを含み、

前記第 1 プライマーペアは、配列番号 1、配列番号 16 又は配列番号 19 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% 又は 100% の同一性を有するヌクレオチド配列を含む第 1 上流プライマーと、

配列番号 2、配列番号 17 又は配列番号 20 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% 又は 100% の同一性を有するヌクレオチド配列を含む第 1 下流プライマーと、を含み、

前記第 1 プロープは、配列番号 3、配列番号 18、配列番号 21 又はそれらの相補配列に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% 又は 100% の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、

前記 S R C I N 1 遺伝子のメチル化検出試薬は、第 2 プライマーペア及び / 又は第 2 プロープを含み、

前記第 2 プライマーペアは、配列番号 4 又は配列番号 22 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% 又は 100% の同一性を有するヌクレオチド配列を含む第 2 上流プライマーと、

配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% 又は 100% の同一性を有するヌクレオチド配列を含む第 2 下流プライマーと、を含み、

前記第 2 プロープは、配列番号 6 に示されるヌクレオチド配列又はその配列の相補配列と少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% 又は 100% の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、キット。

【請求項2】

前記第 1 上流プライマーのヌクレオチド配列は配列番号 1 に示され、且つ前記第 1 下流プライマーのヌクレオチド配列は配列番号 2 に示され、又は、

前記第 1 上流プライマーのヌクレオチド配列は配列番号 16 に示され、且つ前記第 1 下流プライマーのヌクレオチド配列は配列番号 17 に示され、又は、

前記第 1 上流プライマーのヌクレオチド配列は配列番号 19 に示され、且つ前記第 1 下

流プライマーのヌクレオチド配列は配列番号 20 に示される、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 3】

前記第 1 プローブのヌクレオチド配列は配列番号 3、配列番号 18、配列番号 21 又はそれらの相補配列に示される、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 4】

前記第 2 上流プライマーのヌクレオチド配列は配列番号 4 に示され、且つ前記第 2 下流プライマーのヌクレオチド配列は配列番号 5 に示され、

前記第 2 上流プライマーのヌクレオチド配列は配列番号 22 に示され、且つ前記第 2 下流プライマーのヌクレオチド配列は配列番号 5 に示される、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 5】

前記第 2 プローブのヌクレオチド配列は配列番号 6 又はその相補配列に示される、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 6】

前記第 1 プライマーペア及び前記第 1 プローブを含み、若しくは、前記第 2 プライマーペア及び前記第 2 プローブを含む、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 7】

前記第 1 プライマーペア及び前記第 2 プライマーペアを含み、若しくは、前記第 1 プローブ及び前記第 2 プローブを含む、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 8】

前記第 1 プライマーペア、前記第 1 プローブ、前記第 2 プライマーペア及び前記第 2 プローブを含む、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 9】

被験体の肺がんの検出に用いられる、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 10】

前記肺がんは小細胞肺がん又は非小細胞肺がんである、請求項 9 に記載のキット。

【請求項 11】

前記肺がんは扁平上皮がん又は腺がんである、請求項 9 に記載のキット。

【請求項 12】

インビトロで被験体の肺がんの罹患リスクを判定する方法であって、

請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の試薬又はキットにより、被験体に由来のサンプルにおける H O X B 4 及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化レベルを検出するステップと、前記サンプルと正常対照サンプルとの H O X B 4 及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化レベルを比較するステップと、

前記サンプルと正常対照サンプルとのメチル化レベルのずれに基づいて、前記被験体の前記肺がんの罹患リスクを判定するステップと、を含む、方法。

【請求項 13】

メチル化特異的定量 P C R (q M S P) により H O X B 4 及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化レベルを検出する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記サンプルは、肺胞洗浄液、組織、胸水、喀痰、血液、血清、血漿、尿液、前立腺液及び糞便から選択される少なくとも 1 種である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記サンプルは、肺胞洗浄液又は喀痰である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

被験体の肺がんの治療に用いられる、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 17】

前記治療では、被験体に由来のサンプルにおける H O X B 4 及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化レベルを検出し、

前記サンプルと正常対照サンプルとの H O X B 4 及び S R C I N 1 遺伝子のメチル化レベルを比較し、

10

20

30

40

50

検出サンプルと正常対照サンプルとのメチル化レベルのずれに基づいて、前記被験体の前記肺がんの罹患リスクを判定し、

前記被験体が肺がん罹患又は罹患リスクがある場合、肺がん治療薬を投与することを含む、請求項 16 に記載のキット。

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2020/118998
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/68(2018.01)i; C12N 15/11(2006.01)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 C12N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, ISI Web of Knowledge, GENBANK, EMBL, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System: 基因标准物, 癌症, 肺癌, 甲基化, 甲基化测定, SRC激酶, HOXB4, SRCIN1, kinase signaling inhibitor 1, CpG methylation, lung cancer, detect, SEQ ID NO: 1-5, 17-22		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 111676287 A (CREATIVE BIOSCIENCES (GUANGZHOU) CO., LTD.) 18 September 2020 (2020-09-18) entire document	1-10
Y	CN 104520442 A (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 15 April 2015 (2015-04-15) claims 1-17	3-5
Y	CN 103463621 A (UNIVERSITY OF TOLEDO) 25 December 2013 (2013-12-25) claims 5-21	3-5
Y	CN 110998319 A (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 10 April 2020 (2020-04-10) claims 1-14	3-5
Y	CN 107922941 A (CEPHEID) 17 April 2018 (2018-04-17) claims 1-70	3-5
A	CN 111182924 A (IOMX THERAPEUTICS AG) 19 May 2020 (2020-05-19) entire document	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 20 February 2020		Date of mailing of the international search report 05 March 2021
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/118998

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/118998

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.: **11-12**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] relates to methods for treatment of diseases, as well as diagnostic methods

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/118998

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111676287	A	18 September 2020	None			
CN	104520442	A	15 April 2015	WO	2013177265	A1	28 November 2013
				CA	2874035	A1	28 November 2013
				CN	104520442	B	01 May 2018
				US	2020190586	A1	18 June 2020
				EP	2852690	B1	26 August 2020
				AU	2013266341	B2	03 January 2019
				US	2015094222	A1	02 April 2015
				WO	2013177265	A8	16 January 2014
				JP	2015517321	A	22 June 2015
				AU	2013266341	A1	18 December 2014
				US	10450609	B2	22 October 2019
				EP	2852690	A1	01 April 2015
				JP	6543569	B2	10 July 2019
				EP	2852690	A4	13 January 2016
CN	103463621	A	25 December 2013	US	2010056446	A1	04 March 2010
				US	9663561	B2	30 May 2017
				CA	2667251	C	29 May 2018
				CN	101541319	A	23 September 2009
				EP	2086528	A4	04 December 2013
				US	8283441	B2	09 October 2012
				CN	101541319	B	18 September 2013
				EP	2086528	A2	12 August 2009
				WO	2008054792	A3	04 December 2008
				US	2013150294	A1	13 June 2013
				US	8981051	B2	17 March 2015
				WO	2008054792	A2	08 May 2008
				US	2015133389	A1	14 May 2015
				CN	103463621	B	06 January 2016
				WO	2008054792	A9	19 June 2008
				EP	2086528	B1	26 October 2016
				CA	2667251	A1	08 May 2008
CN	110998319	A	10 April 2020	IL	271202	D0	30 January 2020
				JP	2020524262	A	13 August 2020
				EP	3635396	A1	15 April 2020
				CA	3066350	A1	13 December 2018
				WO	2018226802	A1	13 December 2018
CN	107922941	A	17 April 2018	EP	3307885	A2	18 April 2018
				JP	2018524978	A	06 September 2018
				WO	2016205233	A2	22 December 2016
				WO	2016205233	A3	02 February 2017
				AU	2016277943	A1	01 February 2018
				EP	3307885	B1	21 October 2020
				US	2017137871	A1	18 May 2017
				CA	2989573	A1	22 December 2016
CN	111182924	A	19 May 2020	DK	3391907	T3	09 March 2020
				SG	11201909656Y	A	28 November 2019
				JP	2020517747	A	18 June 2020
				WO	2018193084	A8	15 November 2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/118998

A. 主题的分类		
C12Q 1/68(2018.01)i; C12N 15/11(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
C12Q C12N		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, ISI Web of Knowledge, GENBANK, EMBL, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System; 基因标准物, 癌症, 肺癌, 甲基化, 甲基化测定, SRC激酶, HOXB4, SRCIN1, kinase signaling inhibitor 1, CpG methylation, lung cancer, detect, SEQ ID NO:1-5, 17-22		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 111676287 A (广州市康立明生物科技有限责任公司) 2020年 9月 18日 (2020 - 09 - 18) 全文	1-10
Y	CN 104520442 A (约翰霍普金斯大学) 2015年 4月 15日 (2015 - 04 - 15) 权利要求1-17	3-5
Y	CN 103463621 A (托莱多大学) 2013年 12月 25日 (2013 - 12 - 25) 权利要求5-21	3-5
Y	CN 110998319 A (约翰霍普金斯大学) 2020年 4月 10日 (2020 - 04 - 10) 权利要求1-14	3-5
Y	CN 107922941 A (塞弗德公司) 2018年 4月 17日 (2018 - 04 - 17) 权利要求1-70	3-5
A	CN 111182924 A (艾欧麦克斯治疗股份公司) 2020年 5月 19日 (2020 - 05 - 19) 全文	1-10
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。		<input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2020年 2月 20日		2021年 3月 5日
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		李岚
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10) 62411619

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/118998

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

a. 作为国际申请的一部分提交的:

附件C/ST.25文本文件形式

纸件或图形文件形式

b. 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

附件C/ST.25文本文件形式(细则13之三.1(a))

纸件或图形文件形式(细则13之三.1(b)和行政规程第713段)

2. 另外,在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下,提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

10

20

30

40

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/118998

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

- 1. 权利要求: 11-12
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:
[1] 涉及疾病的诊断和治疗方法

10

- 2. 权利要求:
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:

- 3. 权利要求:
因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

20

30

40

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/118998

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	111676287	A	2020年 9月 18日	无			
CN	104520442	A	2015年 4月 15日	WO	2013177265	A1	2013年 11月 28日
				CA	2874035	A1	2013年 11月 28日
				CN	104520442	B	2018年 5月 1日
				US	2020190586	A1	2020年 6月 18日
				EP	2852690	B1	2020年 8月 26日
				AU	2013266341	B2	2019年 1月 3日
				US	2015094222	A1	2015年 4月 2日
				WO	2013177265	A8	2014年 1月 16日
				JP	2015517321	A	2015年 6月 22日
				AU	2013266341	A1	2014年 12月 18日
				US	10450609	B2	2019年 10月 22日
				EP	2852690	A1	2015年 4月 1日
				JP	6543569	B2	2019年 7月 10日
				EP	2852690	A4	2016年 1月 13日
CN	103463621	A	2013年 12月 25日	US	2010056446	A1	2010年 3月 4日
				US	9663561	B2	2017年 5月 30日
				CA	2667251	C	2018年 5月 29日
				CN	101541319	A	2009年 9月 23日
				EP	2086528	A4	2013年 12月 4日
				US	8283441	B2	2012年 10月 9日
				CN	101541319	B	2013年 9月 18日
				EP	2086528	A2	2009年 8月 12日
				WO	2008054792	A3	2008年 12月 4日
				US	2013150294	A1	2013年 6月 13日
				US	8981051	B2	2015年 3月 17日
				WO	2008054792	A2	2008年 5月 8日
				US	2015133389	A1	2015年 5月 14日
				CN	103463621	B	2016年 1月 6日
				WO	2008054792	A9	2008年 6月 19日
				EP	2086528	B1	2016年 10月 26日
				CA	2667251	A1	2008年 5月 8日
CN	110998319	A	2020年 4月 10日	IL	271202	DO	2020年 1月 30日
				JP	2020524262	A	2020年 8月 13日
				EP	3635396	A1	2020年 4月 15日
				CA	3066350	A1	2018年 12月 13日
				WO	2018226802	A1	2018年 12月 13日
CN	107922941	A	2018年 4月 17日	EP	3307885	A2	2018年 4月 18日
				JP	2018524978	A	2018年 9月 6日
				WO	2016205233	A2	2016年 12月 22日
				WO	2016205233	A3	2017年 2月 2日
				AU	2016277943	A1	2018年 2月 1日
				EP	3307885	B1	2020年 10月 21日
				US	2017137871	A1	2017年 5月 18日
				CA	2989573	A1	2016年 12月 22日
CN	111182924	A	2020年 5月 19日	DK	3391907	T3	2020年 3月 9日
				SG	11201909656Y	A	2019年 11月 28日
				JP	2020517747	A	2020年 6月 18日
				WO	2018193084	A8	2018年 11月 15日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/118998

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		EP 3391907 B1	2020年 1月 1日
		EP 3612224 A1	2020年 2月 26日
		AU 2018253937 A1	2019年 10月 24日
		EP 3391907 B8	2020年 3月 4日
		CA 3097212 A1	2018年 10月 25日
		WO 2018193084 A1	2018年 10月 25日
		EP 3391907 A1	2018年 10月 24日

10

20

30

40

50

フロントページの続き

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

(72)発明者 李仕良
中国広東省広州市広州高新技术産業開発区科学城開源大道 1 1 号 A 2 棟第六層

(72)発明者 張志偉
中国広東省広州市広州高新技术産業開発区科学城開源大道 1 1 号 A 2 棟第六層

(72)発明者 陳新周
中国広東省広州市広州高新技术産業開発区科学城開源大道 1 1 号 A 2 棟第六層

(72)発明者 吳幽治
中国広東省広州市広州高新技术産業開発区科学城開源大道 1 1 号 A 2 棟第六層

(72)発明者 古云娟
中国広東省広州市広州高新技术産業開発区科学城開源大道 1 1 号 A 2 棟第六層

(72)発明者 鄒鴻志
中国広東省広州市広州高新技术産業開発区科学城開源大道 1 1 号 A 2 棟第六層

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ42 QR08 QR32 QR55 QR62 QS25 QS28
QS34 QX02