

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005年3月24日 (24.03.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/026352 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, C12Q 1/68, 1/02, A61K 45/00, 48/00, A61P 35/00, 43/00, G01N 33/15, 33/50
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/013876
- (22) 国際出願日: 2004年9月15日 (15.09.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2003-322826 2003年9月16日 (16.09.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 住友化学株式会社 (SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1048260 東京都中央区新川二丁目27番1号 Tokyo (JP). 国立がんセンター総長が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY PRESIDENT OF NATIONAL CANCER CENTER) [JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地五丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 牛島 俊和 (USHIJIMA, Toshikazu) [JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地5-1-1、国立がんセンター築地宿舍1817号 Tokyo (JP). 萩原 淳司 (HAGIHARA, Atsushi) [JP/JP]; 〒5900144 大阪府堺市赤坂台1-31-1 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 榎本 雅之, 外(ENOMOTO, Masayuki et al.); 〒5418550 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号 住友化学知的財産センター株式会社内 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF EVALUATING CANCERIZATION DEGREE

(54) 発明の名称: 癌化度評価方法

(57) Abstract: A method of evaluating the degree of cancerization of a specimen originating in a mammal characterized by comprising: (1) the first step of measuring the methylation frequency in G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor gene contained in the mammal-origin specimen; and (2) the second step of judging the degree of cancerization of the above-described specimen based on the difference obtained by comparing the methylation frequency having been measured above with the data of a control; and so on.

(57) 要約: 本発明は、哺乳動物由来の検体の癌化度を評価する方法であって、(1) 哺乳動物由来の検体に含まれるG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のメチル化頻度を測定する第一工程、及び(2) 測定された前記メチル化頻度と、対照とを比較することにより得られる差異に基づき前記検体の癌化度を判定する第二工程を有することを特徴とする評価方法等に関する。



WO 2005/026352 A1

## 明細書

## 癌化度評価方法

## 技術分野

本発明は、哺乳動物由来の検体の癌化度を評価する方法等に関する。

5

## 背景技術

癌が遺伝子異常を原因とする疾病であること等が次第に明らかになりつつあるが、癌患者の死亡率は未だ高く、現在利用可能な診断方法や治療方法等が必ずしも十分に満足できるものではないことを示している。癌を早期に発見し、発見された癌に対す

10 る有効な治療方法を選択し、さらに、治療後には癌再発の有無確認等のアフターケアを行うことは、臨床的に重要である。

そこで、癌を早期に発見するための診断方法、癌に対する治療方法の有効性の評価、癌再発の有無確認等に適する、遺伝子異常の検出に基づいた哺乳動物由来の検体の癌化度評価方法の開発が切望されている。

15

## 発明の開示

本発明者らは、かかる状況の下、鋭意検討した結果、癌細胞株及び癌組織検体においてG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺

20 伝子（以下、SALPR遺伝子と記すこともある。）が、不死化正常細胞株及び正常組織検体と比較して有意に高い頻度でメチル化されていることを見出し、本発明に至った。

即ち、本発明は、

1. 哺乳動物由来の検体の癌化度を評価する方法であって、

25 (1) 哺乳動物由来の検体に含まれるG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のメチル化頻度を測定する第一工程、及び

(2) 測定された前記メチル化頻度と、対照とを比較することにより得られる差異に基づき前記検体の癌化度を判定する第二工程

を有することを特徴とする評価方法（以下、本発明評価方法と記すこともある。）；

2. 哺乳動物由来の検体が細胞であることを特徴とする前項 1 記載の評価方法；
3. 哺乳動物由来の検体が組織であることを特徴とする前項 1 記載の評価方法；
4. 哺乳動物由来の検体が細胞であって、かつ、当該検体の癌化度が哺乳動物由来の細胞の悪性度であることを特徴とする前項 1 記載の評価方法；
- 5 5. 哺乳動物由来の検体が組織であって、かつ、当該検体の癌化度が哺乳動物由来の組織における癌細胞の存在量であることを特徴とする前項 1 記載の評価方法；
6. 組織が膵臓組織であって、かつ、癌が膵臓癌であることを特徴とする前項 5 記載の評価方法；
7. 遺伝子のメチル化頻度が、当該遺伝子のプロモーター領域、非翻訳領域又は翻訳領域にある塩基配列内に存在する一つ以上の5'-CG-3'で示される塩基配列中のシトシンのメチル化頻度であることを特徴とする前項 1 記載の評価方法；
- 10 8. 組織が膵臓組織であって、かつ、癌が膵臓癌であることを特徴とする前項 7 記載の評価方法；
9. 遺伝子のメチル化頻度が、当該遺伝子のプロモーター領域にある塩基配列内に存在する一つ以上の5'-CG-3'で示される塩基配列中のシトシンのメチル化頻度であることを特徴とする前項 1 記載の評価方法；
- 15 10. 遺伝子のメチル化頻度が、当該遺伝子の非翻訳領域又は翻訳領域にある塩基配列内に存在する一つ以上の5'-CG-3'で示される塩基配列中のシトシンのメチル化頻度であることを特徴とする前項 1 記載の評価方法；
- 20 11. 遺伝子のメチル化頻度が、配列番号 1 で示される塩基配列内に存在する一つ以上の5'-CG-3'で示される塩基配列中のシトシンのメチル化頻度であることを特徴とする前項 1 記載の評価方法；
12. 組織が膵臓組織であって、かつ、癌が膵臓癌であることを特徴とする前項 11 記載の評価方法；
- 25 13. 癌マーカーとしての、メチル化されたG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子の使用；
14. 癌マーカーが膵臓癌マーカーであることを特徴とする前項 13 記載の使用；  
等を提供するものである。

## 図面の簡単な説明

図1は、ヒト由来の不死化（正常）膵管上皮細胞株（HPDE-4/E6E7及びHPDE6-E6E7 c7）及び膵臓癌細胞株7種（BXPc3、HPAF-II、Capan-2、MiaPaCa-2、Hs766T、PANC-1及びHPAC）から調製され、かつ、亜硫酸水素ナトリウム処理されたゲノムDNAをそれぞれ鋳型としてPCRを行い、PCR後のPCR反応液をアガロースゲル電気泳動で分析した結果を示した図である。使用した細胞の名前を上部に示した。なお、HPDE4/SssIと記載された図は、HPDE-4/E6E7のゲノムDNAをメチル化酵素SssIで処理して得られたDNAを示す。レーンU、非メチル化特異的プライマーを用いたPCRのPCR反応液；レーンM、メチル化特異的プライマーを用いたPCRのPCR反応液。

図2は、ヒト由来の膵臓癌組織及びその周辺の膵臓正常組織〔患者からインフォームドコンセントを得て入手〕各12検体から調製され、かつ、亜硫酸水素ナトリウム処理されたゲノムDNAをそれぞれ鋳型としてPCRを行い、PCR後のPCR反応液をアガロースゲル電気泳動で分析した結果を示した図である。Case1～Case12は、検体を示した。Cancerは膵臓癌組織、Normalはその周辺の膵臓正常組織のデータを示した。レーンU、非メチル化特異的プライマーを用いたPCRのPCR反応液；レーンM、メチル化特異的プライマーを用いたPCRのPCR反応液。

## 発明を実施するための最良の形態

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明は、癌マーカー（例えば、膵臓癌マーカー等）としての、メチル化されたG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子の使用等に関連する発明である。

本発明においてマーカー遺伝子として用いられるG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子としては、例えば、G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子の非翻訳領域及び翻訳領域（コーディング領域）とその5'上流に位置するプロモーター領域とを含むヒト由来の遺伝子をあげることができる。ヒト由来のG-protein coupled somat

ostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子の塩基配列とそれにコードされるアミノ酸配列は、例えば、Genbank Accession No. NM\_016568等に記載されている。また、ヒト由来のG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子の非翻訳領域及び翻訳領域（コーディング領域）を担うエクソンのうち、最も5'上流側に位置するエクソン（以下、エクソン1と記す。）と、その5'上流に位置するプロモーター領域とが含まれるゲノムDNAの塩基配列は、例えば、Genbank Accession No. AC008971等に記載されている。Genbank Accession No. AC008971に記載される塩基配列において、例えば、ヒト由来のG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のエクソン1の塩基配列は、塩基番号57369～59225に示されている。本発明において利用されるG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子には、上記の公知の塩基配列を有する遺伝子のほか、かかる塩基配列に、生物の種差、個体差若しくは器官、組織間の差異等により天然に生じる変異による塩基の欠失、置換若しくは付加が生じた塩基配列を有する遺伝子も含まれる。

15

哺乳動物では、遺伝子（ゲノムDNA）を構成する4種類の塩基のうち、シトシンのみがメチル化されるという現象がある。哺乳動物由来の、例えば、G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子では、当該遺伝子のゲノムDNAの一部のシトシンがメチル化されている。そして、DNAのメチル化修飾は、5'-CG-3'で示される塩基配列（Cはシトシンを表し、Gはグアニンを表す。以下、当該塩基配列をCpGと記すこともある。）中のシトシンに限られる。シトシンにおいてメチル化される部位は、その5位である。細胞分裂に先立つDNA複製に際して、複製直後は鋳型鎖のCpG中のシトシンのみがメチル化された状態となるが、メチル基転移酵素の働きにより即座に新生鎖のCpG中のシトシンもメチル化される。従って、DNAのメチル化の状態は、DNA複製後も、新しい2組のDNAにそのまま引き継がれることになる。

25

本発明評価方法の第一工程において「メチル化頻度」とは、例えば、調査対象とな

るCpG中のシトシンのメチル化の有無を複数のハプロイドについて調べたときの、当該シトシンがメチル化されているハプロイドの割合で表される。

本発明評価方法の第一工程における哺乳動物由来の検体としては、例えば、膵臓癌  
5 細胞等の癌細胞若しくはそれを含む組織、及び、膵臓癌細胞等の癌細胞由来のDNA  
が含まれる可能性のある、細胞、それを含む組織（ここでの組織とは、血液、血漿、  
血清、リンパ液、膵液等の体液、リンパ節等を含む広義の意味である。）若しくは体  
分泌物（尿や乳汁等）等の生体試料をあげることができる。具体的には、例えば、癌  
10 が膵臓癌である場合、被験動物から採取された膵臓組織（膵液を含む）等をあげること  
ができる。

これらの生体試料はそのまま検体として用いてもよく、また、かかる生体試料から  
分離、分画、固定化等の種々の操作により調製された生体試料を検体として用いても  
よい。

哺乳動物由来の検体が血液である場合には、定期健康診断や簡便な検査等での本発  
15 明評価方法の利用が期待できる。

本発明評価方法の第一工程において、哺乳動物由来の検体に含まれるG-protein c  
coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のメチル化頻  
度を測定する方法は、例えば、以下のように行えばよい。

20

第一の方法として、検体由来のDNAを、非メチル化シトシンを修飾する試薬と接  
触させた後、該DNAを鋳型とし、解析対象とするシトシンのメチル化の有無を識別  
可能なプライマーを用いてポリメラーゼチェーン反応（以下、PCRと記す。）を行  
い、得られる増幅産物の量を調べる方法をあげることができる。

25 まず哺乳動物由来の検体から、例えば、市販のDNA抽出用キット等を用いてDN  
Aを抽出する。

血液を検体として用いる場合には、血液から通常の方法に準じて血漿又は血清を調  
製し、調製された血漿又は血清を検体としてその中に含まれる遊離DNA（膵臓癌細

胞等の癌細胞由来のDNAが含まれる)を分析すると、血球由来のDNAを避けて膵臓癌細胞等の癌細胞由来のDNAを解析することができ、膵臓癌細胞等の癌細胞、それを含む組織等を検出する感度を向上させることができる。

次いで、抽出されたDNAを、非メチル化シトシンを修飾する試薬と接触させた後  
5、該DNAを鋳型として、解析対象とするシトシンのメチル化の有無を識別可能なプライマーを用いてPCRを行い、得られる増幅産物の量を調べる。解析対象とするシトシンは、G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のプロモーター領域、非翻訳領域又は翻訳領域(コーディング領域)の塩基配列中に存在する一つ以上のCpGで示される塩基配列中のシトシンの中から選ぶ  
10ことができる。

ここで、G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のプロモーター領域、非翻訳領域又は翻訳領域(コーディング領域)の塩基配列中に存在する一つ以上のCpGで示される塩基配列としては、ヒト由来のG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のエク  
15ソン1と、その5'上流に位置するプロモーター領域とが含まれるゲノムDNAの塩基配列をあげることができ、より具体的には、配列番号1で示される塩基配列(Genbank Accession No.AC008971に記載される塩基配列の塩基番号57001~60000で示される塩基配列の相補的配列に相当する。)があげられる。配列番号1で示される塩基配列においては、ヒト由来のG-protein coupled somatostatin and angiotensin-li  
20ke peptide receptor遺伝子のエクソン1の塩基配列は、塩基番号776~2632に示されている。配列番号1で示される塩基配列中に存在するCpGで示される塩基配列中のシトシンは、例えば、膵臓癌細胞等の癌細胞において高いメチル化頻度(即ち、高メチル化状態(hypermethylation))を示す。さらに具体的には、膵臓癌細胞においてメチル化頻度が高いシトシンとしては、例えば、配列番号1で示される塩基配列におい  
25て、塩基番号470、472、490、497、504、506、509、514、522、540、543、552、566、582、597、610、612等で示されるシトシンをあげるすることができる。

非メチル化シトシンを修飾する試薬としては、例えば、亜硫酸水素ナトリウム等の

重亜硫酸塩 (bisulfite) 等を用いることができる。因みに、原理的には、メチル化シトシンのみを特異的に修飾する試薬を用いても良い。

非メチル化シトシンを修飾する試薬と抽出されたDNAとを接触させるには、例えば、まず当該DNAをアルカリ溶液 (pH9~14) で変性した後、亜硫酸水素ナトリウム等の重亜硫酸塩 (bisulfite) (溶液中の濃度: 例えば、終濃度3M) 等で約10~16時間 (一晚) 程度、55℃で処理する。反応を促進するため、95℃での変性と、50℃での反応を10-20回繰り返すことも出来る。この場合、メチル化されていないシトシンはウラシルに変換され、一方、メチル化されているシトシンはウラシルに変換されず、シトシンのままである。

次いで、重亜硫酸塩等で処理されたDNAを鋳型とし、かつ、メチル化されたシトシンが含まれる場合の塩基配列 [メチル化される位置のシトシン (CpG中のシトシン) はシトシンのままであり、メチル化されていないシトシン (CpGに含まれないシトシン) はウラシルとなった塩基配列] とかかる塩基配列に対して相補的な塩基配列からそれぞれ選ばれる一対のメチル化特異的プライマーを用いるPCR (以下、メチル化特異的PCRとも記すこともある。) と、重亜硫酸塩等で処理されたDNAを鋳型とし、かつ、シトシンがメチル化されていない場合の塩基配列 (全てのシトシンがウラシルとなった塩基配列) とかかる塩基配列に対して相補的な塩基配列からそれぞれ選ばれる一対の非メチル化特異的プライマーを用いるPCR (以下、非メチル化特異的PCRとも記すこともある。) とを行う。

上記PCRにおいて、メチル化特異的プライマーを用いるPCRの場合 (前者) には、解析対象とするシトシンがメチル化されているDNAが増幅され、一方、非メチル化特異的プライマーを用いるPCRの場合 (後者) には、解析対象とするシトシンがメチル化されていないDNAが増幅される。これらの増幅産物の量を比較することにより、対象となるシトシンのメチル化の有無を調べる。このようにしてメチル化頻度を測定することができる。

ここで、プライマーとしては、メチル化を受けていないシトシンがウラシルに変換

され、かつ、メチル化を受けているシトシンはウラシルに変換されないことを考慮して、メチル化を受けているシトシンを含む塩基配列に特異的なPCRプライマー（メチル化特異的プライマー）を設計し、また、メチル化を受けていないシトシンを含む塩基配列に特異的なPCRプライマー（非メチル化特異的プライマー）を設計する。重亜硫酸塩処理により化学的に変換され相補的ではなくなったDNA鎖を基に設計することから、元来二本鎖であったDNAのそれぞれの鎖を基に、それぞれからメチル化特異的プライマーと非メチル化特異的プライマーとを作製することもできる。かかるプライマーは、メチル、非メチルの特異性を高めるために、プライマーの3'末端近傍にCpG中のシトシンを含むように設計することが好ましい。また、解析を容易にするために、プライマーの一方を標識してもよい。

より具体的には、G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のメチル化頻度をメチル化特異的PCRで測定するためのプライマーは、例えば、G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のプロモーター領域、非翻訳領域又は翻訳領域（コーディング領域）にある塩基配列内に存在するCpG中のシトシンを1以上含む塩基配列を基にして、上記のようにして設計することができる。例えば、配列番号1で示される塩基配列中に存在するCpG中のシトシン、具体的には、配列番号1で示される塩基配列において塩基番号470、472、490、497、504、506、509、514、522、540、543、552、566、582、597、610、612等で示されるシトシンを1以上含む塩基配列を基に設計することができる。かかるプライマーの例を以下に示す。

<非メチル化特異的プライマー>

U1 : 5' -GTGTGGTTGGGTTTAGTATTTT-3' (配列番号2)

U2 : 5' -TCTCCACAATTATCAACTCCA-3' (配列番号3)

<メチル化特異的プライマー>

M1 : 5' -CGCGGTTGGGTTTAGTATTTT-3' (配列番号4)

M2 : 5' -CCGCGATTATCAACTCCG-3' (配列番号5)

メチル化特異的PCRにおける反応液としては、例えば、鋳型とするDNAを50ngと、10pmol/ $\mu$ lの各プライマー溶液を各1 $\mu$ lと、2.5mM dNTPを4 $\mu$ lと、10 $\times$ 緩衝液(100mM Tris-HCl pH8.3、500mM KCl、20mM MgCl<sub>2</sub>)を2.5 $\mu$ lと、耐熱性DNAポリメラーゼ 5U/ $\mu$ lを0.2 $\mu$ lとを混合し、これに滅菌超純水を加えて液量を25 $\mu$ lとした反応液をあげることができる。

反応条件としては、例えば、前記のような反応液を、95 $^{\circ}$ Cにて10分間保温した後、95 $^{\circ}$ Cにて30秒間次いで55 $\sim$ 65 $^{\circ}$ Cにて30秒間さらに72 $^{\circ}$ Cにて30秒間を1サイクルとする保温を30 $\sim$ 40サイクル行う条件があげられる。

かかるPCRを行った後、得られた増幅産物の量を比較する。例えば、メチル化特異的プライマーを用いたPCRと非メチル化特異的プライマーを用いたPCRで得られた各々の増幅産物の量を比較することができる分析方法(変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動やアガロースゲル電気泳動)である場合には、電気泳動後のゲルをDNA染色して増幅産物のバンドを検出し、検出されたバンドの濃度を比較する。ここでDNA染色の代わりに予め標識されたプライマーを使用してその標識を指標としてバンドの濃度を比較することもできる。また、定量を必要とする場合には、PCR反応産物をリアルタイムでモニタリングしカイネティクス分析を行うことにより、例えば、遺伝子量に関して2倍程度のほんのわずかな差異をも検出できる高精度の定量が可能なPCR法であるリアルタイムPCRを用いて、それぞれの産物の量を比較することもできる。リアルタイムPCRを行う方法としては、例えば鋳型依存性核酸ポリメラーゼプローブ等のプローブを用いる方法又はサイバークリーン等のインターカレーターを用いる方法等が挙げられる。リアルタイムPCR法のための装置及び試薬としては、市販の装置及び試薬キットを利用することができる。

このような方法は、一般にメチル化特異的PCRとも呼ばれ、Hermanら(Herman et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 93, 9821-9826, 1996)等により報告されている方法であって、シトシンと5-メチルシトシンとの化学的性質の違いを利用する方法である。

第二の方法として、検体由来のDNAを非メチル化シトシンを修飾する試薬と接触させた後、該DNAを鋳型として解析対象とするシトシンを含むDNAをPCRで増幅し、得られる増幅産物の塩基配列を直接的に解析する方法をあげることができる。

まず哺乳動物由来の検体から、例えば、市販のDNA抽出用キット等を用いてDNAを抽出する。

血液を検体として用いる場合には、血液から通常の方法に準じて血漿又は血清を調製し、調製された血漿又は血清を検体としてその中に含まれる遊離DNA（膵臓癌細胞等の癌細胞由来のDNAが含まれる）を分析すると、血球由来のDNAを避けて膵臓癌細胞等の癌細胞由来のDNAを解析することができ、膵臓癌細胞等の癌細胞、それを  
10 含む組織等を検出する感度を向上させることができる。

次いで、抽出されたDNAを、非メチル化シトシンを修飾する試薬と接触させた後、該DNAを鋳型として、G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のプロモーター領域、非翻訳領域又は翻訳領域（コーディング領域）の塩基配列中に存在する一つ以上のCpGで示される塩基配列中のシトシンを含む塩基配列を基にして後述するように設計されるプライマーを用いてPCRを行うことにより、解析対象とするシトシンを含むDNAを増幅し、得られる増幅産物の塩基配列を直接的に解析する。

ここで、G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のプロモーター領域、非翻訳領域又は翻訳領域（コーディング領域）の塩基配列中に存在する一つ以上のCpGで示される塩基配列としては、ヒト由来のG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のエクソン1と、その5'上流に位置するプロモーター領域とが含まれるゲノムDNAの塩基配列をあげることができ、より具体的には、配列番号1で示される塩基配列（Genbank Accession No.AC008971に記載される塩基配列の塩基番号57001～60000で示される塩基配列の相補的配列に相当する。）があげられる。配列番号1で示される塩基配列においては、ヒト由来のG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のエクソン1の塩基配列は、塩基番号776～2632に示されている。配列番号1で示される塩基配列中に存在するCpGで示される塩基配列中のシ

トシン、とりわけ配列番号1で示される塩基配列においてCpGが密に存在する領域中に存在するCpG中のシトシンは、例えば、膵臓癌細胞等の癌細胞において高いメチル化頻度（即ち、高メチル化状態（hypermethylation））を示す。さらに具体的には、膵臓癌細胞においてメチル化頻度が高いシトシンとしては、例えば、配列番号1で示  
5 される塩基配列において、塩基番号470、472、490、497、504、506、509、514、522、540、543、552、566、582、597、610、612等で示されるシトシンをあげることができ  
る。

当該PCRに用いられるプライマーとしては、解析対象とするシトシンの5'上流  
10 の塩基配列と3'下流の塩基配列を基にして当該シトシンを含む塩基配列を有するDNAを増幅可能なプライマー対を設計するとよい。プライマー設計のための塩基配列は、解析対象とするCpG中のシトシンを含まないように選定する。そして、プライマー設計のために選定された塩基配列が、シトシンを全く含まない場合には、選定された塩基配列及びかかる塩基配列に対して相補的な塩基配列をそれぞれそのままプライ  
15 イマーの塩基配列とすることができる。また、プライマー設計のために選定された塩基配列が解析対象以外のシトシンを含むが当該シトシンはCpG中のシトシンでない場合には、これらシトシンがウラシルに変換されることを考慮してプライマーを設計する。即ち、全てのシトシンがウラシルとなった塩基配列とかかる塩基配列に対して相補的な塩基配列をそれぞれ有する一対のプライマーを設計する。さらに、プライマー  
20 設計のために選定された塩基配列が解析対象以外のシトシンを含み当該シトシンはCpG中のシトシンである場合には、メチル化を受けていないシトシンがウラシルに変換され、かつ、メチル化を受けているシトシンはウラシルに変換されないことを考慮してプライマーを設計する。即ち、メチル化されたシトシンが含まれる場合の塩基配列  
[メチル化される位置のシトシン（CpG中のシトシン）はシトシンのままであり、メ  
25 チル化されていないシトシン（CpGに含まれないシトシン）はウラシルとなった塩基配列]とかかる塩基配列に対して相補的な塩基配列からそれぞれ選定された一対のメチル化特異的プライマーと、シトシンがメチル化されていない場合の塩基配列（全てのシトシンがウラシルとなった塩基配列）とかかる塩基配列に対して相補的な塩基配

列をそれぞれ有する一对の非メチル化特異的プライマーとを設計する。この場合、上記のPCRには、メチル化特異的プライマー対と非メチル化特異的プライマー対とを等量ずつ混合して用いる。

- 5 非メチル化シトシンを修飾する試薬としては、例えば、亜硫酸水素ナトリウム等の重亜硫酸塩 (bisulfite) 等を用いることができる。因みに、原理的には、メチル化シトシンのみを修飾する試薬を用いても良い。

非メチル化シトシンを修飾する試薬と抽出されたDNAとを接触させるには、例えば、まず当該DNAをアルカリ溶液 (pH9~14) 中で亜硫酸水素ナトリウム等の重亜硫酸塩 (bisulfite) (溶液中の濃度: 例えば、終濃度3M) 等で約10~16時間 (一晚) 程度、55°Cで処理する。反応を促進するため、95°Cでの変性と、50°Cでの反応を10-20回繰り返すことも出来る。この場合、メチル化されていないシトシンはウラシルに変換され、一方、メチル化されているシトシンはウラシルに変換されず、シトシンの  
10 ままである。  
15

次いで、重亜硫酸塩等で処理されたDNAを鋳型とし、かつ、上述するように設計されるプライマーを用いるPCRを行う。得られた増幅産物の塩基配列を比較し当該比較からメチル化頻度を測定することができる。

- 20 より具体的には、G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のメチル化頻度を塩基配列の直接的解析で測定するためのプライマーは、例えば、G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のプロモーター領域、非翻訳領域又は翻訳領域 (コーディング領域) にある塩基配列内に存在するCpG中のシトシンを1以上含む塩基配列を基にして、  
25 上記のようにして設計することができる。例えば、配列番号1で示される塩基配列中に存在するCpG中のシトシン、具体的には、配列番号1で示される塩基配列において塩基番号887、890、905、939、957、966、970、975、977、985、987、1042、1046及び1051で示される1以上のシトシンを解析対象として設計することができる。例えば、

以下に示すプライマーB 1及びB 2を用いると、配列番号1の塩基番号864~1077で示される塩基配列を有するDNAのbisulfite処理後の塩基配列を有するDNA (214bp)が増幅される。該プライマー対は、配列番号1で示される塩基配列において塩基番号887、890、905、939、957、966、970、975、977、985、987、1042、1046及び1051で示されるシトシンのメチル化頻度を調べるためのプライマーとして用いることができる。

<プライマー>

B1 : 5' -AGTTTGGTTTGAGAATTTTGGGA-3' (配列番号6)

B2 : 5' -CCAATTTTATTACCAAATAACC-3' (配列番号7)

10

PCRにおける反応液としては、例えば、鋳型とするDNAを25ngと、20pmol/ $\mu$ lの各プライマー溶液を各1 $\mu$ lと、2mM dNTPを3 $\mu$ lと、10 $\times$ 緩衝液(100mM Tris-HCl pH 8.3、500mM KCl、15mM MgCl<sub>2</sub>)を2.5 $\mu$ lと、耐熱性DNAポリメラーゼ 5U/ $\mu$ lを0.2 $\mu$ lとを混合し、これに滅菌超純水を加えて液量を25 $\mu$ lとした反応液をあげることができる。反応条件としては、例えば、前記のような反応液を、95 $^{\circ}$ Cにて10分間保温した後、95 $^{\circ}$ Cにて30秒間次いで55 $^{\circ}$ Cにて30秒間さらに72 $^{\circ}$ Cにて30秒間を1サイクルとする保温を30~40サイクル行う条件があげられる。

かかるPCRを行った後、得られた増幅産物の塩基配列を比較し当該比較からメチル化頻度を測定する。

20 即ち、当該増幅産物の塩基配列を直接的に解析することにより、解析対象とするシトシンに相当する位置の塩基がシトシンであるかチミン(ウラシル)であるかを判定する。得られた増幅産物における塩基を示すピークのチャートにおいて、解析対象とするシトシンに相当する位置に検出されたシトシンを示すピークの面積とチミン(ウラシル)を示すピークの面積とを比較することにより、解析対象となるシトシンのメチル化の頻度を測定することができる。また、塩基配列を直接的に解析する方法として、PCRで得られた増幅産物を一旦大腸菌等を宿主としてクローニングして得られた複数のクローンから、それぞれクローニングされたDNAを調製し、当該DNAの塩基配列を解析してもよい。解析される試料のうちの解析対象とするシトシンに相当

25

する位置に検出された塩基がシトシンである試料の割合を求めることにより、解析対象となるシトシンのメチル化の頻度を測定することもできる。

5 第三の方法として、検体由来のDNAを非メチル化シトシンを修飾する試薬と接触させた後、該DNAと、解析対象とするシトシンのメチル化の有無を識別可能なプローブとをハイブリダイゼーションさせ、プローブの結合の有無を調べる方法をあげることもできる。

まず哺乳動物由来の検体から、例えば、市販のDNA抽出用キット等を用いてDNAを抽出する。

10 血液を検体として用いる場合には、血液から通常の方法に準じて血漿又は血清を調製し、調製された血漿又は血清を検体としてその中に含まれる遊離DNA（膵臓癌細胞等の癌細胞由来のDNAが含まれる）を分析すると、血球由来のDNAを避けて膵臓癌細胞等の癌細胞由来のDNAを解析することができ、膵臓癌細胞等の癌細胞、それを含む組織等を検出する感度を向上させることができる。

15 次いで、抽出されたDNAを、非メチル化シトシンを修飾する試薬と接触させた後、該DNAと、解析対象とするシトシンのメチル化の有無を識別可能なプローブとをハイブリダイゼーションさせ、前記DNAと当該プローブとの結合の有無を調べる。解析対象とするシトシンはG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のプロモーター領域、非翻訳領域又は翻訳領域（コーディング領域）の塩基配列中に存在する一つ以上のCpGで示される塩基配列中のシトシン  
20 の中から選ぶことができる。

ここで、G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のプロモーター領域、非翻訳領域又は翻訳領域（コーディング領域）の塩基配列中に存在する一つ以上のCpGで示される塩基配列としては、ヒト由来のG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のエクソン1と、その5'上流に位置するプロモーター領域とが含まれるゲノムDNAの塩基配列をあげることができ、より具体的には、配列番号1で示される塩基配列（Gen bank Accession No.AC008971に記載される塩基配列の塩基番号57001～60000で示さ  
25

れる塩基配列の相補的配列に相当する。)があげられる。配列番号1で示される塩基配列においては、ヒト由来のG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のエクソン1の塩基配列は、塩基番号776~2632に示されている。配列番号1で示される塩基配列中に存在するCpGで示される塩基配列中のシ  
5 トシン、とりわけ配列番号1で示される塩基配列においてCpGが密に存在する領域中に存在するCpG中のシトシンは、例えば、膵臓癌細胞等の癌細胞において高いメチル化頻度(即ち、高メチル化状態(hypermethylation))を示す。さらに具体的には、膵臓癌細胞においてメチル化頻度が高いシトシンとしては、例えば、配列番号1で示される塩基配列において、塩基番号470、472、490、497、504、506、509、514、522  
10 、540、543、552、566、582、597、610、612等で示されるシトシンをあげることができる。

当該ハイブリダイゼーションに用いられるプローブは、解析対象とするシトシンを含む塩基配列を基にして、メチル化を受けていないシトシンがウラシルに変換され、  
15 かつ、メチル化を受けているシトシンはウラシルに変換されないことを考慮して設計するとよい。

即ち、メチル化されたシトシンが含まれる場合の塩基配列[メチル化される位置のシトシン(CpG中のシトシン)はシトシンのままであり、メチル化されていないシトシン(CpGに含まれないシトシン)はウラシルとなった塩基配列]又はかかる塩基配列  
20 に対して相補的な塩基配列を有するメチル化特異的プローブと、シトシンがメチル化されていない場合の塩基配列(全てのシトシンがウラシルとなった塩基配列)又はかかる塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する非メチル化特異的プローブを設計する。尚、このようなプローブは、DNAとプローブとの結合の有無についての解析を容易にするために標識してから用いてもよい。またプローブを通常の方法に準じ  
25 て担体上に固定して用いてもよいが、この場合には、哺乳動物由来の検体から抽出されたDNAを予め標識しておくともよい。

非メチル化シトシンを修飾する試薬としては、例えば、亜硫酸水素ナトリウム等の

重亜硫酸塩 (bisulfite) 等を用いることができる。因みに、原理的には、メチル化シトシンのみを特異的に修飾する試薬を用いても良い。

非メチル化シトシンを修飾する試薬と抽出されたDNAとを接触させるには、例えば、まず当該DNAをアルカリ溶液 (pH9~14) で変性した後、亜硫酸水素ナトリウム等の重亜硫酸塩 (bisulfite) (溶液中の濃度: 例えば、終濃度3M) 等で約10~16時間 (一晚) 程度、55℃で処理する。反応を促進するため、95℃での変性と、50℃での反応を10-20回繰り返すことも出来る。この場合、メチル化されていないシトシンはウラシルに変換され、一方、メチル化されているシトシンはウラシルに変換されず、シトシンのままである。

必要に応じて、重亜硫酸塩等で処理されたDNAを鋳型として第二の方法と同様にPCRを行うことにより当該DNAを予め増幅させておいてもよい。

次いで、重亜硫酸塩等で処理されたDNA又は前記PCRで予め増幅されたDNAと、解析対象とするシトシンのメチル化の有無を識別可能なプローブとのハイブリダイゼーションを行う。メチル化特異的プローブと結合するDNAの量と、非メチル化特異的プローブと結合するDNAの量とを比較することにより、解析対象となるシトシンのメチル化の頻度を測定することができる。

より具体的には、G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のメチル化頻度を測定するためのプローブは、例えば、G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のプロモーター領域、非翻訳領域又は翻訳領域 (コーディング領域) にある塩基配列内に存在するCpG中のシトシンを1以上含む塩基配列を基にして、上記のようにして設計することができる。例えば、配列番号1で示される塩基配列中に存在するCpG中のシトシン、具体的には、配列番号1で示される塩基配列において塩基番号459、461、464、466、470、472、490、497、504、506、509、514、522、540、543、552、566、582、597、610、612、620等で示されるシトシンを1以上含む塩基配列を基に設計することができる。かかるプローブの例を以下に示す。

<セット1>

非メチル化特異的プローブ: 5'-TTGTGGTGTGGGTGTGGTTGGGTTAGTATTTG-3' (配列番号

8) メチル化特異的プローブ: 5'-TCGCGGCGCGGGCGCGGTTGGGTTAGTATTTG-3' (配列番号9)

5 <セット2>

非メチル化特異的プローブ: 5'-TTGAGTTGATAATTGTGGAGAGATGT-3' (配列番号10)

メチル化特異的プローブ : 5'-TCGGAGTTGATAATCGCGGAGAGACGT-3' (配列番号11)

ハイブリダイゼーションは、例えば、Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T. 10 著、モレキュラークローニング第2版 (Molecular Cloning 2nd edition)、コールドスプリング ハーバー ラボラトリー発行 (Cold Spring Harbor Laboratory press) 等に記載される通常の方法に準じて行うことができる。ハイブリダイゼーションは、通常ストリンジェントな条件下に行われる。ここで「ストリンジェントな条件下」とは、例えば、6×SSC (1.5M NaCl, 0.15M クエン酸三ナトリウムを含む溶液を10×SSCとする) を含む溶液中で45℃にてハイブリッドを形成させた後、2×SSCで50℃にて洗浄するような条件 (Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6) 等を挙げることができる。洗浄ステップにおける塩濃度は、例えば、2×SSCで50℃の条件 (低ストリンジェンシーな条件) から0.2×SSCで50℃までの条件 (高ストリンジェンシーな条件) から選択することができる。洗浄ステップにおける温度は、例えば、室温 (低ストリンジェンシーな条件) から65℃ (高ストリンジェンシーな条件) から選択することができる。また、塩濃度と温度との両方を変えることもできる。

かかるハイブリダイゼーションを行った後、メチル化特異的プローブと結合したDNAの量と、非メチル化特異的プローブと結合したDNAの量とを比較することにより、解析対象となるシトシン (即ち、プローブの設計の基となった塩基配列に含まれるCpG中のシトシン) のメチル化の頻度を測定することができる。

第四の方法として、検体由来のDNAに、解析対象とするシトシンのメチル化の有

無を識別可能な制限酵素を作用させた後、当該制限酵素による消化の有無を調べる方法をあげることできる。

まず哺乳動物由来の検体から、例えば、市販のDNA抽出用キット等を用いてDNAを抽出する。

5 血液を検体として用いる場合には、血液から通常の方法に準じて血漿又は血清を調製し、調製された血漿又は血清を検体としてその中に含まれる遊離DNA（膵臓癌細胞等の癌細胞由来のDNAが含まれる）を分析すると、血球由来のDNAを避けて膵臓癌細胞等の癌細胞由来のDNAを解析することができ、膵臓癌細胞等の癌細胞、それを含む組織等を検出する感度を向上させることができる。

10 次いで、抽出されたDNAに、解析対象とするシトシンのメチル化の有無を識別可能な制限酵素を作用させた後、当該制限酵素による消化の有無を調べる。解析対象とするシトシンは、G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のプロモーター領域、非翻訳領域又は翻訳領域（コーディング領域）の塩基配列中に存在する一つ以上のCpGで示される塩基配列中のシトシンの中から  
15 選ぶことができる。

ここで、G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のプロモーター領域、非翻訳領域又は翻訳領域（コーディング領域）の塩基配列中に存在する一つ以上のCpGで示される塩基配列としては、ヒト由来のG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のエク  
20 ソン1と、その5'上流に位置するプロモーター領域とが含まれるゲノムDNAの塩基配列をあげることができ、より具体的には、配列番号1で示される塩基配列（Genbank Accession No. AC008971に記載される塩基配列の塩基番号57001～60000で示される塩基配列の相補的配列に相当する。）があげられる。配列番号1で示される塩基配列においては、ヒト由来のG-protein coupled somatostatin and angiotensin-li  
25 ke peptide receptor遺伝子のエクソン1の塩基配列は、塩基番号776～2632に示されている。配列番号1で示される塩基配列中に存在するCpGで示される塩基配列中のシトシン、とりわけ配列番号1で示される塩基配列においてCpGが密に存在する領域中に存在するCpG中のシトシンは、例えば、膵臓癌細胞等の癌細胞において高いメチル

化頻度（即ち、高メチル化状態（hypermethylation））を示す。さらに具体的には、  
膵臓癌細胞においてメチル化頻度が高いシトシンとしては、例えば、配列番号1で示  
される塩基配列において、塩基番号470、472、490、497、504、506、509、514、522  
、540、543、552、566、582、597、610、612等で示されるシトシンをあげることがで  
5 きる。

当該方法で用いられる「シトシンのメチル化の有無を識別可能な制限酵素」（以下  
、メチル化感受性制限酵素と記すこともある。）とは、メチル化されたシトシンを含  
む認識配列を消化せず、メチル化されていないシトシンを含む認識配列を消化するこ  
10 とのできる制限酵素を意味する。認識配列に含まれるシトシンがメチル化されている  
DNAの場合、メチル化感受性制限酵素を作用させても当該DNAは切断されず、一方、認  
識配列に含まれるシトシンがメチル化されていないDNAの場合、メチル化感受性制限  
酵素を作用させれば当該DNAは切断される。メチル化感受性酵素の具体的な例として  
は、例えば、HpaII、BstUI、NarI、SacII等をあげることができる。

15

当該制限酵素による消化の有無を調べる方法としては、例えば、解析対象とするシ  
トシンを認識配列に含むメチル化感受性制限酵素を作用させたDNAを鋳型とし、解  
析対象とするシトシンが含まれる認識配列を含み、当該認識配列以外には前記制限酵  
素の認識配列を含まないDNAを増幅可能なプライマー対を用いてPCRを行い、D  
20 NAの増幅（増幅産物）の有無を調べる方法をあげることができる。解析対象とする  
シトシンがメチル化されている場合には、増幅産物が得られる。一方、解析対象とす  
るシトシンがメチル化されていない場合には、増幅産物が得られない。このようにし  
て、増幅されたDNAの量を比較することにより、解析対象となるシトシンのメチル  
化の頻度を測定することができる。定量を必要とする場合には、PCR反応産物をリア  
25 ルタイムでモニタリングしカイネティックス分析を行うことにより、例えば、遺伝子  
量に関して2倍程度のほんのわずかな差異をも検出できる高精度の定量が可能なPCR  
法であるリアルタイムPCRを用いて、それぞれの産物の量を比較することもできる。  
リアルタイムPCRを行う方法としては、例えば鋳型依存性核酸ポリメラーゼプローブ

等のプローブを用いる方法又はサイバークリーン等のインターカレーターを用いる方法等が挙げられる。リアルタイムPCR法のための装置及び試薬としては、市販の装置及び試薬キット等を利用することができる。

例えば、配列番号1で示される塩基配列において塩基番号610、612、810、812、2053、2055、2455、2457で示されるシトシンの場合には、当該シトシンはSacIIの認識配列に含まれており、上記方法により当該シトシンのメチル化頻度を測定することができる。

また、当該制限酵素による消化の有無を調べる他の方法としては、例えば、解析対象とするシトシンを認識配列に含むメチル化感受性制限酵素を作用させたDNAに  
10 対して、G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子に由来し、かつ、当該制限酵素の認識配列を含まないDNAをプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイズしたDNAの長さを調べる方法をあげることもできる。解析対象とするシトシンがメチル化されている場合には  
15 、当該シトシンがメチル化されていない場合よりも長いDNAが検出される。検出された長いDNAの量と短いDNAの量とを比較することにより、解析対象となるシトシンのメチル化の頻度を測定することができる。

以上のような各種方法を用いて、哺乳動物由来の検体に含まれるG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のメチル化頻度を測定する。

測定されたメチル化頻度と、例えば、膵臓癌細胞等の癌細胞を持たないと診断され得る健常な哺乳動物由来の検体に含まれるG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のメチル化頻度（対照）とを比較して、当該比較により得られる差異に基づき前記検体の癌化度を判定する。例えば、哺乳動物由来の検体に含まれるG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のメチル化頻度が対照と比較して高ければ（G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子が対照と比較の上

で高メチル化状態であれば)、当該検体の癌化度が対照と比較の上で高いと判定することができる。

ここで「癌化度」とは、一般に当該分野において使用される意味と同様であって、具体的には、例えば、哺乳動物由来の検体が細胞である場合には当該細胞の悪性度を意味し、また、例えば、哺乳動物由来の検体が組織である場合には当該組織における癌細胞の存在量等を意味している。

本発明評価方法における、G-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor 遺伝子のメチル化頻度を測定するための各種方法で使用し得るプライマー又はプローブは、膵臓癌細胞等の癌細胞の検出用キットの試薬として有用である。本発明は、これらプライマー又はプローブ等を試薬として含有する膵臓癌細胞等の癌細胞の検出用キットや、これらプライマー又はプローブ等が担体上に固定化されてなる膵臓癌細胞等の癌細胞の検出用チップも提供しており、本発明評価方法の権利範囲は、当該方法の実質的な原理を利用してなる前記のような検出用キットや検出用チップのような形態での使用ももちろん含むものである。

#### 実施例

以下に実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

20

実施例 1 (膵臓癌細胞株におけるG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor 遺伝子のメチル化状態の確認試験)

ヒト由来の膵臓癌細胞株 7 種 [BXPC3、HPAF-II、Capan-2、MiaPaCa-2、Hs766T、PANC-1及びHPAC (全てATCC製)] をATCC (American Type Culture Collection) のカタログに記載された、それぞれの細胞株のための専用培地でサブコンフルエントになるまで培養した後、各々約 $1 \times 10^7$ 細胞を集めた。一般的な不死化の方法 [Am. J. Pathol., 148, 1763-1770 (1996)] によって得られた不死化 (正常) 膵管上皮細胞株 2 種 (HPDE-4/E6E7及びHPDE6-E6E7c7) [これらは、Dr. Tsao (Ontario Cancer Institute

and Department of Pathology, University of Toronto) により、保存・管理され、当該研究者から譲受可能である]を、終濃度で50U/mLのペニシリン、及び、終濃度で50ug/mLのストレプトマイシンを加えたKeratinocyte-SFM, liquid (Invitrogen社製) を培地として、サブコンフルエントになるまで培養した後、各々約 $1 \times 10^7$ 細胞を集めた。集められた細胞に、SEDTAバッファー [10mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM EDTA (pH8.0)、100mM NaCl] を10倍容量加えた後、これをホモジナイズした。得られた混合物に、proteinase K (Sigma) を500 $\mu$ g/ml、ドデシル硫酸ナトリウムを1%(w/v)になるように加えた後、これを55°Cで約16時間振とうした。振とう終了後、当該混合物をフェノール [1M Tris-HCl (pH8.0)にて飽和]・クロロホルム抽出処理した。水層を回収し、これにNaClを0.5Nとなるよう加えた後、これをエタノール沈澱することにより沈澱を回収した。回収された沈澱をTEバッファー (10mM Tris、1mM EDTA、pH 8.0) に溶解し、これに40 $\mu$ g/mlになるようにRNase A (Sigma) を加えて37°Cで1時間インキュベートした。インキュベートされた混合物をフェノール・クロロホルム抽出処理した。水層を回収し、これにNaClを0.5Nとなるよう加えた後、これをエタノール沈澱することにより沈澱 (ゲノムDNA) を回収した。回収された沈澱を70%エタノールでリンスしてゲノムDNAを得た。

得られたゲノムDNAを、制限酵素BamHIにて消化後、Clark et al., Nucl. Acids. Res., 22, 2990-2997, 1994; Herman et al., Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 9821-9826, 1996に記載される方法に準じて亜硫酸水素ナトリウム処理した。即ち、制限酵素処理後のゲノムDNA (約500ng) を蒸留水に溶解して20 $\mu$ lのゲノムDNA溶液を調製し、これに6M水酸化ナトリウムを約1 $\mu$ l加えた後 (終濃度約0.3M)、当該混合物を37°Cで15分間保温した。この混合物に、0.6mMヒドロキノン (Sigma) を終濃度0.5mM、亜硫酸水素ナトリウム (Sigma) を終濃度3.1Mになるように加えた後、これを95°C30秒間、次いで50°Cで15分間を1サイクルとする保温を15サイクル行った。保温された液からWizard DNA clean-up system (Promega) を用いてDNAを精製した。精製されたDNAを50 $\mu$ lのTEバッファーに溶解し、これに水酸化ナトリウムを終濃度0.3Mになるように加えた後、当該混合物を室温で5分間放置した。次いで、放置された混合物をエタノール沈澱することにより沈澱 (DNA) を回収した。回収された沈澱を20 $\mu$ lのT

Eバッファーに懸濁した。

得られたDNAを鋳型とし、以下に示す非メチル化特異的プライマーU1とU2、又は、メチル化特異的プライマーM1とM2を用いてPCRを行った。非メチル化特異的プライマーU1とU2とを使用した場合には、配列番号1の塩基番号469～617で示される塩基配列を有するDNAをbisulfite処理した後の塩基配列を有する149bpのDNAが増幅され、一方、メチル化特異的プライマーM1とM2とを使用した場合には、配列番号1の塩基番号470～614で示される塩基配列を有するDNAをbisulfite処理した後の塩基配列を有する145bpのDNAが増幅される。

10 <非メチル化特異的プライマー>

U1 : 5'-GTGTGGTTGGGTTTAGTATTTT -3' (配列番号2)

U2 : 5'-TCTCCACAATTATCAACTCCA-3' (配列番号3)

<メチル化特異的プライマー>

M1 : 5'-CGCGGTTGGGTTTAGTATTTT-3' (配列番号4)

15 M2 : 5'-CCGCGATTATCAACTCCG-3' (配列番号5)

メチル化特異的プライマーおよび非メチル化特異的プライマーに、特異性があることを確認するため、まず、不死化(正常)臍管上皮細胞株(HPDE-4/E6E7)から通常の方法でゲノムDNA(DNA1)を抽出し、この一部をメチル化酵素SssI(NEB社)により処理しゲノムDNAの5'-CG-3'全てをメチル化した(DNA2)。これらDNA1およびDNA2についても、メチル化特異的PCRおよび非メチル化特異的PCRを行った。

PCRの反応液としては、鋳型とするDNAを25ngと、20pmol/ $\mu$ lの上記プライマー溶液を各1 $\mu$ lと、each 2mM dNTPを2.5 $\mu$ lと、10 $\times$ 緩衝液(100mM Tris-HCl pH8.3、500mM KCl、20mM MgCl<sub>2</sub>)を2.5 $\mu$ lと、耐熱性DNAポリメラーゼ 5U/ $\mu$ lを0.2 $\mu$ lとを混合し、これに滅菌超純水を加えて液量を25 $\mu$ lとしたものを用いた。上記の非メチル化特異的プライマーを使用した場合には、当該反応液を、95 $^{\circ}$ Cにて10分間保温した後、95 $^{\circ}$ Cにて30秒間次いで59 $^{\circ}$ Cにて30秒間さらに72 $^{\circ}$ Cにて30秒間を1サイクルとする保温を32サイクル行う条件でPCRを行った。また、上記のメチル化特異的プライマーを

使用した場合には、当該反応液を、95℃にて10分間保温した後、95℃にて30秒間次いで62℃にて30秒間さらに72℃にて30秒間を1サイクルとする保温を32サイクル行う条件でPCRを行った。いずれの場合も、PCRを行った後、増幅産物を含むPCRの反応液を2% アガロースゲル電気泳動に供した。

- 5 その結果を図2に示した。ヒト由来の不死化（正常）膵管上皮細胞株（HPDE-4/E6E7及びHPDE6-E6E7c）の場合において、非メチル化特異的プライマーを使用した場合（レーンU）には増幅されたDNAのバンドが認められ、メチル化特異的プライマーを使用した場合（レーンM）には増幅されたDNAのバンドが検出されなかった。従って、ヒト由来の不死化（正常）膵管上皮細胞株（HPDE-4/E6E7及びHPDE6-E6E7c）の場合にお
- 10 いて、少なくとも、配列番号1で示される塩基配列の塩基番号470、472、490、597、610及び612でそれぞれ示されるシトシンはメチル化されていないと判断された。また、膵臓癌細胞株7種（BXPc3、HPAF-II、Capan-2、MiaPaCa-2、Hs766T、PANC-1及びHPAC）のうち1種（PANC-1）は、不死化（正常）膵管上皮細胞株（HPDE-4/E6E7及びHPD
- 15 E6-E6E7c）と同様、メチル化されていなかった。他の6種（BXPc3、HPAF-II、Capan-2、MiaPaCa-2、Hs766T及びHPAC）は、非メチル化特異的プライマーを使用した場合（レーンU）には増幅されたDNAのバンドが検出されず、メチル化特異的プライマーを使用した場合（レーンM）には増幅されたDNAのバンドが認められた。従って、当該条件
- 20 においては、6種の細胞（BXPc3、HPAF-II、Capan-2、MiaPaCa-2、Hs766T及びHPAC）は、配列番号1で示される塩基配列の塩基番号470、472、490、597、610及び612でそれぞれ示されるシトシンはメチル化されていると判断された。

## 実施例2 （膵臓癌組織におけるG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のメチル化状態の確認試験）

- 25 ヒト由来の膵臓癌組織及びその周辺の膵臓正常組織[患者からインフォームドコンセントを得て入手] 各12検体（Case1～Case12）に、SEDTAバッファー [10mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM EDTA (pH8.0)、100mM NaCl] を10倍容量加えた後、これをホモジナイズした。得られた混合物に、proteinase K (Sigma) を500 µg/ml、ドデシル硫酸ナトリウムを1%(w/v)になるように加えた後、これを55℃で約16時間振とうした。

振とう終了後、当該混合物をフェノール [1M Tris-HCl (pH8.0) にて飽和] ・クロロホルム抽出処理した。水層を回収し、これにNaClを0.5Nとなるよう加えた後、これをエタノール沈澱することにより沈澱を回収した。回収された沈澱をTEバッファー (10mM Tris、1mM EDTA、pH 8.0) に溶解し、これに40  $\mu$ g/mlになるようにRNase A (Sigma) を加えて37°Cで1時間インキュベートした。インキュベートされた混合物をフェノール・クロロホルム抽出処理した。水層を回収し、これにNaClを0.5Nとなるよう加えた後、これをエタノール沈澱することにより沈澱 (ゲノムDNA) を回収した。回収された沈澱を70%エタノールでリンスしてゲノムDNAを得た。

得られたゲノムDNAを、制限酵素BamHIにて消化後、Clark et al., Nucl. Acids. Res., 22, 2990-2997, 1994; Herman et al., Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 9821-9826, 1996に記載される方法に準じて亜硫酸水素ナトリウム処理した。即ち、制限酵素処理後のゲノムDNA (約500ng) を蒸留水に溶解して20  $\mu$ lのゲノムDNA溶液を調製し、これに6M水酸化ナトリウムを約1  $\mu$ l加えた後 (終濃度約0.3M)、当該混合物を37°Cで15分間保温した。この混合物に、0.6mMヒドロキノン (Sigma) を終濃度0.5mM、亜硫酸水素ナトリウム (Sigma) を終濃度3.1Mになるよう加えた後、これを95°C30秒間、次いで50°Cで15分間を1サイクルとする保温を15サイクル行った。保温された液からWizard DNA clean-up system (Promega) を用いてDNAを精製した。精製されたDNAを50  $\mu$ lのTEバッファーに溶解し、これに水酸化ナトリウムを終濃度0.3Mになるよう加えた後、当該混合物を室温で5分間放置した。次いで、放置された混合物をエタノール沈澱することにより沈澱 (DNA) を回収した。回収された沈澱を20  $\mu$ lのTEバッファーに懸濁した。

得られたDNAを鋳型とし、以下に示す非メチル化特異的プライマーU1とU2、又は、メチル化特異的プライマーM1とM2を用いてPCRを行った。非メチル化特異的プライマーU1とU2とを使用した場合には、配列番号1の塩基番号469~617で示される塩基配列を有するDNAをbisulfite処理した後の塩基配列を有する149bpのDNAが増幅され、一方、メチル化特異的プライマーM1とM2とを使用した場合には、配列番号1の塩基番号470~614で示される塩基配列を有するDNAをbisulfite処理した後の塩基配列を

有する145bpのDNAが増幅される。

<非メチル化特異的プライマー>

U1 : 5' -GTGTGGTTGGGTTTAGTATTTT-3' (配列番号 2)

U2 : 5' -TCTCCACAATTATCAACTCCA-3' (配列番号 3)

5 <メチル化特異的プライマー>

M1 : 5' -CGCGGTTGGGTTTAGTATTTT-3' (配列番号 4)

M2 : 5' -CCGCGATTATCAACTCCG-3' (配列番号 5)

メチル化特異的プライマーおよび非メチル化特異的プライマーの特異性は、実施例  
10 1 に記載の通り、不死化 (正常) 膀胱上皮細胞株 (HPDE-4/E6E7) のゲノムDNA (1) および、この一部をメチル化酵素SssI (NEB社) により処理しゲノムDNA (2) において確認済みである。

PCRの反応液としては、鋳型とするDNAを25ngと、20pmol/ $\mu$ lの上記プライマー溶液  
15 を各1 $\mu$ lと、each 2mM dNTPを2.5 $\mu$ lと、10 $\times$ 緩衝液(100mM Tris-HCl pH8.3、500mM KCl、20mM MgCl<sub>2</sub>)を2.5 $\mu$ lと、耐熱性DNAポリメラーゼ 5U/ $\mu$ lを0.2 $\mu$ lとを混合し、これに滅菌超純水を加えて液量を25 $\mu$ lとしたものを用いた。上記の非メチル化特異的プライマーを使用した場合には、当該反応液を、95 $^{\circ}$ Cにて10分間保温した後、95 $^{\circ}$ Cにて30秒間次いで59 $^{\circ}$ Cにて30秒間さらに72 $^{\circ}$ Cにて30秒間を1サイクルとする保温  
20 を32サイクル行う条件でPCRを行った。また、上記のメチル化特異的プライマーを使用した場合には、当該反応液を、95 $^{\circ}$ Cにて10分間保温した後、95 $^{\circ}$ Cにて30秒間次いで62 $^{\circ}$ Cにて30秒間さらに72 $^{\circ}$ Cにて30秒間を1サイクルとする保温を32サイクル行う条件でPCRを行った。いずれの場合も、PCRを行った後、増幅産物を含むPCRの反応液を2% アガロースゲル電気泳動に供した。

25 その結果を図2に示した。ヒト由来の正常膀胱組織12検体では、非メチル化特異的プライマーを使用した場合 (レーンU) には増幅されたDNAのバンドが認められ、メチル化特異的プライマーを使用した場合 (レーンM) には増幅されたDNAのバンドが検出されなかった。従って、ヒト由来の正常膀胱組織の場合において、少なくとも、

配列番号 1 で示される塩基配列の塩基番号 470、472、490、597、610 及び 612 でそれぞれ示されるシトシンはメチル化されていないと判断された。膵臓癌組織 1 2 検体中 8 検体で、非メチル化特異的プライマーを使用した場合（レーン U）に増幅された DNA のバンドに加え、メチル化特異的プライマーを使用した場合（レーン M）にも増幅された DNA のバンドが認められた。従って、当該条件においては、少なくとも配列番号 1 で示される塩基配列の塩基番号 470、472、490、597、610 及び 612 でそれぞれ示されるシトシンは、組織の一部が癌化することによりメチル化されたものと判断された。

#### 産業上の利用の可能性

10 本発明により、哺乳動物由来の検体の癌化度を評価する方法等が提供可能となる。

#### 配列表フリーテキスト

##### 配列番号 2

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

##### 15 配列番号 3

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

##### 配列番号 4

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

##### 配列番号 5

##### 20 PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

##### 配列番号 6

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

##### 配列番号 7

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

##### 25 配列番号 8

プローブのために設計されたオリゴヌクレオチド

##### 配列番号 9

プローブのために設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 1 0

プローブのために設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 1 1

プローブのために設計されたオリゴヌクレオチド

## 請求の範囲

1. 哺乳動物由来の検体の癌化度を評価する方法であって、

(1) 哺乳動物由来の検体に含まれるG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子のメチル化頻度を測定する第一工程、及び

5 (2) 測定された前記メチル化頻度と、対照とを比較することにより得られる差異に基づき前記検体の癌化度を判定する第二工程

を有することを特徴とする評価方法。

2. 哺乳動物由来の検体が細胞であることを特徴とする請求項1記載の評価方法。

10

3. 哺乳動物由来の検体が組織であることを特徴とする請求項1記載の評価方法。

4. 哺乳動物由来の検体が細胞であって、かつ、当該検体の癌化度が哺乳動物由来の細胞の悪性度であることを特徴とする請求項1記載の評価方法。

15

5. 哺乳動物由来の検体が組織であって、かつ、当該検体の癌化度が哺乳動物由来の組織における癌細胞の存在量であることを特徴とする請求項1記載の評価方法。

6. 組織が膵臓組織であって、かつ、癌が膵臓癌であることを特徴とする請求項5記載の評価方法。

20

7. 遺伝子のメチル化頻度が、当該遺伝子のプロモーター領域、非翻訳領域又は翻訳領域にある塩基配列内に存在する一つ以上の5'-CG-3'で示される塩基配列中のシトシンのメチル化頻度であることを特徴とする請求項1記載の評価方法。

25

8. 組織が膵臓組織であって、かつ、癌が膵臓癌であることを特徴とする請求項7記載の評価方法。

9. 遺伝子のメチル化頻度が、当該遺伝子のプロモーター領域にある塩基配列内に存在する一つ以上の5'-CG-3'で示される塩基配列中のシトシンのメチル化頻度であることを特徴とする請求項1記載の評価方法。

5 10. 遺伝子のメチル化頻度が、当該遺伝子の非翻訳領域又は翻訳領域にある塩基配列内に存在する一つ以上の5'-CG-3'で示される塩基配列中のシトシンのメチル化頻度であることを特徴とする請求項1記載の評価方法。

10 11. 遺伝子のメチル化頻度が、配列番号1で示される塩基配列内に存在する一つ以上の5'-CG-3'で示される塩基配列中のシトシンのメチル化頻度であることを特徴とする請求項1記載の評価方法。

12. 組織が膵臓組織であって、かつ、癌が膵臓癌であることを特徴とする請求項1記載の評価方法。

15

13. 癌マーカーとしての、メチル化されたG-protein coupled somatostatin and angiotensin-like peptide receptor遺伝子の使用。

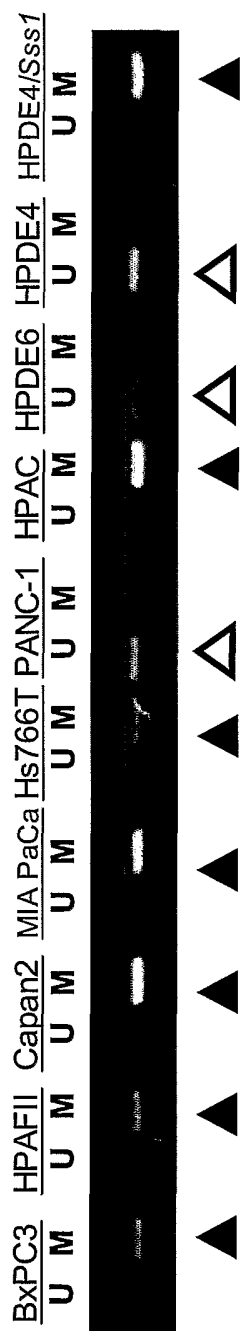
14. 癌マーカーが膵臓癌マーカーであることを特徴とする請求項13記載の使用。

20

1/2

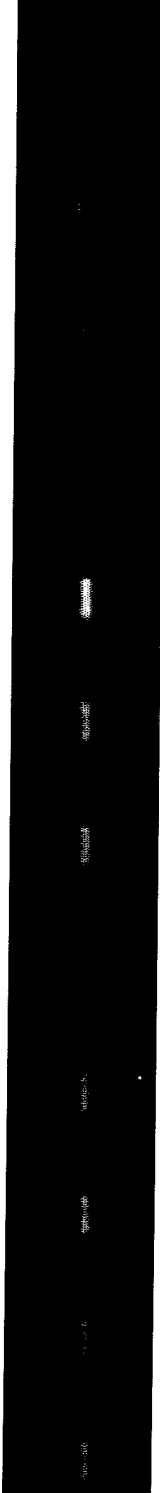
図面

図 1




2

Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6
<u>Normal Cancer</u>	<u>Normal Cancer</u>	<u>Normal Cancer</u>	<u>Normal Cancer</u>	<u>Normal Cancer</u>	<u>Normal Cancer</u>
U M U M	U M U M	U M U M	U M U M	U M U M	U M U M



▲      ▲      ▲      ▲      ▲

Case 7	Case 8	Case 9	Case 10	Case 11	Case 12
<u>Normal Cancer</u>	<u>Normal Cancer</u>	<u>Normal Cancer</u>	<u>Normal Cancer</u>	<u>Normal Cancer</u>	<u>Normal Cancer</u>
U M U M	U M U M	U M U M	U M U M	U M U M	U M U M



▲      ▲      ▲      ▲      ▲

## 配列表

## SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN as represented by PRESIDENT of NATIONAL CANCER CENTER

<110> SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED

<120> Method for evaluating the cancerous grade

<130> S10812W001

<150> JP 2003/322826

<151> 2003-09-16

<160> 11

<210> 1

<211> 3000

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gaatacatta aagtaggggc aacccttgag cccagacttc tgccatgtga agacccctttg   60
aaaatcctga caaacacagg tactgcgtaa gtggtcagct aattaaagag gggagggtgga  120
gctgtccttt gtgtatccaa taagtacceca ttatctcatt tgagcatgaa aagaggccac  180
tgttattact ttcaagaagg aaagtaagca ggatagctca tatittttaga accatttcctc  240
accaaatgga ataattccgg tgaaaagtgg gagtgaggaa gaaagaaaa aaaacttct  300
aatcataatg ttgggaata agaaaggaag aagaaactca cgtcaaagcc gactttctcc  360
tgcagctgta aaataaactc ttaagaccct tcttgcctgaa actctggaga ggaaactgg  420

```

agtggcgggt gggctttgcc tgcagctcaa ctctccctcg cggcgcgggc gcggctgggt 480  
tcagcacctc ggaaagcgcc cctcgcggcg ccccgggatt acgcatgctc cttggggccc 540  
gccgccttgg ccgtgcaagt gccaccgtaa ctggtgagag ccgctggcaa cccaccggga 600  
gttgacaacc gcggagagac gcagacaccc actgacctcc aggaagctga gcgtggtgga 660  
tggaactcta cgatctcttt ctctccaagg acggaaacct catccaagca gtcccagagg 720  
aaacggataa aggtatttga aaggagcgga gcggcccaaa atcgcaaat tgagcggctg 780  
ggggagttaa gcgccagtc cccagtgacc gcgggacacg gagaggggaa gtctgcgttg 840  
tacataagga cctagggact ccgagcttgg cctgagaacc cttggacgcc gagtgccttg 900  
cttacgggct gcactcctca actctgctcc aaagcagccg ctgagctcaa ctcttgcgtc 960  
cagggcgttc gctgcgcgcc aggacgcgct tagtaccag ttcctgggct ctctctcag 1020  
tagctgcttt gaaagctccc acgcacgtcc cgcaggctag cctggcaaca aaactggggt 1080  
aaaccgtgtt atcttaggtc ttgtcccca gaacatgacc tagaggtacc tgcgcatgca 1140  
gatggccgat gcagccacga tagccacat gaataaggca gcaggcgggg acaagctagc 1200  
agaactcttc agtctggctc cggaccttct ggaggcggcc aacacgagtg gtaacgcgtc 1260  
gctgcagctt cggacttgt ggtgggagct ggggctggag ttgccggacg gcgcgcgcc 1320  
aggacatccc ccgggcagcg gcggggcaga gagcgcggac acagaggccc ggtgcggat 1380  
tctcatcagc gtgggtact ggggtgtg cgccctgggg ttggcgggca acctgctggt 1440  
tctctacctg atgaagagca tgcaggctg gcgcaagtcc tctatcaacc tcttcgtcac 1500  
caacctggcg ctgacggact ttcagtttgt gctcaccctg cccttctggg cgggtggagaa 1560  
cgctcttgac ttcaaatggc ccttcggcaa ggccatgtgt aagatcgtgt ccatggtgac 1620  
gtccatgaac atgtaccca gcgtgttctt cctcactgcc atgagtgtga cgcgctacca 1680  
ttcggtggcc tcggctctga agagccaccg gaccgagga cacggccggg gcgactgctg 1740  
cggccggagc ctgggggaca gctgctgctt ctggccaag gcgctgtgtg tgtggatctg 1800  
ggctttggcc gcgtggcct cgctgccag tgccattttc tccaccacgg tcaaggtgat 1860  
gggcgaggag ctgtgcttg tgcgtttccc ggacaagtig ctgggcccgc acaggcagtt 1920  
ctggctgggc ctctaccact cgcagaaggt gctgctgggc ttcgtgctgc cgctgggcat 1980  
cattatcttg tctacctgc tgcgtgtgc ctctatgcc gaccgccgcg cggcggggac 2040  
caaaggaggg gccgcggtag ccggaggacg cccgaccgga gccagcgcgc ggagactgtc 2100

3/7

gaaggtcacc aatcagtga ccatcgttgt cctgtccttc ttctgtgtt ggctgcccaa 2160  
ccaggcgctc accacctgga gcatcctcat caagttcaac gcggtgcctt tcagccagga 2220  
gtatttctg tgccaggat acgcgttccc tgtgagcgtg tgcctagcgc actccaacag 2280  
ctgcctcaac cccgtcctct actgcctcgt gcgccgcgag ttccgcaagg cgctcaagag 2340  
cctgctgtgg cgcacgcgt ctccttcgat caccagcatg cgccttca cgcactac 2400  
caagccggag cacgaggatc aggggtgca gggccggcg cggccacg cggccggga 2460  
gccggacctg ctctactacc cacctggcgt cgtggtctac agcggggggc gctacgacct 2520  
gctgcccage agctctgct actgacgcag gcctcaggcc cagggcgcgc cgtcggggca 2580  
aggtggcctt ccccgggcgg taaagaggtg aaaggatgaa ggagggttg ggggggccc 2640  
atthaagaag taggtgggag gaggatgggc agagcatgga ggaggagcct gtggataggc 2700  
cgaggacctt ctctggagag gagatgcttc gaaatcaggt ggagagagga aattggcaaa 2760  
gggatagaga cgagccccac gggccagaca gccaacctcc gctccgcacc ccacagcctc 2820  
tccttactct tcccacgtg agtagtgtgg gggcgcccag aagcgaagac aagcagcaaa 2880  
aatgtagaga aattggcacg gggagcgggg cttagccaaa tgatgcacag acaattgtgc 2940  
cggttatc cagcacttc tgcggagagg gcagccgtcg gcacaaacac tcctttgct 3000

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 2

gtgtggttg gtttagtatt tt 22

<210> 3

4/7

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide primer for PCR

&lt;400&gt; 3

tctccacaat tatcaactcc a 21

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide primer for PCR

&lt;400&gt; 4

cgcggttggg tttagtattt c 21

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 5

ccgcgattat caactccg 18

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 6

agtttggttt gagaatttt gga 23

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 7

ccaattttat taccaaacta acc 23

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for probe

<400> 8

ttgtggtgtg ggtgtggttg ggttagtat ttg 34

<210> 9

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for probe

<400> 9

tcgcggcgcg ggcgcggttg ggttagtat ttcg 34

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for probe

<400> 10

ttggagttga taattgtgga gagatgt 27

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for probe

<400> 11

tcggagttga taatcgcgga gagacgt 27

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/013876

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68, C12Q1/02, A61K45/00, A61K48/00,  
A61P35/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

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)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68, C12Q1/02, A61K45/00, A61K48/00,  
A61P35/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

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)

GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Jansen, M. et al., Aberrant methylation of the 5' CpG island of TSLC1 is common in pancreatic ductal adenocarcinoma and is first manifest in high-grade PanINs. Cancer Biol.Ther., Vol.1(3), pages 293 to 296(2002)	1-14
Y	Ueki, T. et al., Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. Cancer Res., Vol.60(7), pages 1835 to 1839(2000)	1-14
Y	Esteller, M. et al., A gene hypermethylation profile of human cancer., Cancer Res., Vol.61(8), pages 3225 to 3229(2001)	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

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  
01 December, 2004 (01.12.04)

Date of mailing of the international search report  
14 December, 2004 (14.12.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013876

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Gerdes, B. et al., p16 <sup>INK4a</sup> alterations in chronic pancreatitis-indicator for high-risk lesions for pancreatic cancer. Surgery, Vol.129(4), pages 490 to 497(2001)	1-14
Y	Matsumoto, M. et al., The novel G-protein coupled receptor SALPR shares sequence similarity with somatostatin and angiotensin receptors. Gene, Vol.248(1-2), pages 183 to 189(2000)	1-14

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))                  Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68, C12Q1/02, A61K45/00, A61K48/00, A61P35/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50</p>		
<p>B. 調査を行った分野                  調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))                  Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68, C12Q1/02, A61K45/00, A61K48/00, A61P35/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50</p>		
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>		
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)                  GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq,                  WPI (DIALOG)、BIOSIS (DIALOG)、MEDLINE (STN)</p>		
<p>C. 関連すると認められる文献</p>		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Jansen, M. et al., Aberrant methylation of the 5' CpG island of TSLC1 is common in pancreatic ductal adenocarcinoma and is first manifest in high-grade PanINs. Cancer Biol. Ther., Vol. 1(3) pp. 293-296 (2002)	1-14
Y	Ueki, T. et al., Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. Cancer Res., Vol. 60(7) pp. 1835-1839 (2000)	1-14
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>		
<p>* 引用文献のカテゴリー                  「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの                  「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの                  「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)                  「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                  「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献                  「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの                  「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                  「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの                  「&amp;」 同一パテントファミリー文献</p>		
国際調査を完了した日	01.12.2004	国際調査報告の発送日
		14.12.2004
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 田村 明 照	4 N   8 4 1 2
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Esteller, M. et al., A gene hypermethylation profile of human cancer. Cancer Res., Vol. 61(8) pp. 3225-3229 (2001)	1-14
Y	Gerdes, B. et al., p16 <sup>INK4a</sup> alterations in chronic pancreatitis-indicator for high -risk lesions for pancreatic cancer. Surgery, Vol. 129(4) pp. 490-497 (2001)	1-14
Y	Matsumoto, M. et al., The novel G-protein coupled receptor SALPR shares sequence similarity with somatostatin and angiotensin receptors. Gene, Vol. 248(1-2) pp. 183-189 (2000)	1-14