

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2010年3月4日(04.03.2010)



(10) 国際公開番号
WO 2010/024374 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/065041
- (22) 国際出願日: 2009年8月28日(28.08.2009)
- (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 2008-222223 2008年8月29日(29.08.2008) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 学校法人北里研究所(SCHOOL JURIDICAL PERSON THE KITASATO INSTITUTE) [JP/JP]; 〒1088641 東京都港区白金5丁目9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): ▲たか▼橋伸一郎(Shinichiro Takahashi) [JP/JP]; 〒2288555 神奈川県相模原市北里1丁目15番1号 学校法人北里研究所内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 大家 邦久(OHIE Kunihisa); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町二丁目14番6号 セルバ人形町6階 大家特許事務所 Tokyo (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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, 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(条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR DETECTING THE DRUG EFFECTS OF DNA METHYLATION-INHIBITORS

(54) 発明の名称: DNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法

(57) Abstract: Disclosed is a method for detecting the drug effects of DNA methylation inhibitors that detects the drug sensitivity of gene-expressing cells to DNA methylation inhibitors based on gene expression of a transcription factor (PU. 1) and/or gene expression of metallothionein (MT) that participates in differentiation to neutrophil and monocyte lines or based on DNA methylation in the metallothionein (MT) gene expression control region. Hematopoietic tumors can be treated effectively and specifically after predicting the effects of DNA methylation inhibitors on the hematopoietic tumor cells of myelodysplastic syndrome, acute myelocytic leukemia (AML), and other hematopoietic organ diseases, so therapeutic results are improved.

(57) 要約: 本発明は、好中球及び単球系列への分化決定に関与する転写因子(PU. 1)の遺伝子発現及び/またはメタロチオネイン(MT)の遺伝子発現に基づいて、またはメタロチオネイン(MT)遺伝子発現制御領域におけるDNAのメチル化に基づいて、前記遺伝子発現細胞に対するDNAメチル化阻害剤の薬剤感受性を検出するDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法に関する。本発明によれば、骨髓異形成症候群、急性骨髄性白血病(AML)、その他の造血器疾患を含む造血器腫瘍細胞に対するDNAメチル化阻害剤の効果を予測した上で、造血器腫瘍に対する有効かつ特異的な治療を行うことができるので治療成績が向上する。



WO 2010/024374 A1

明 細 書

発明の名称：DNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、造血器腫瘍に対する分子標的薬剤であるDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法に関する。さらに詳しく言えば、本発明は、好中球及び単球系列への分化決定に関与する転写因子（PU. 1）もしくはその標的遺伝子であるメタロチオネイン（MT）の発現、またはMT遺伝子発現制御領域のメチル化に基づいてDNAメチル化阻害剤に対する薬剤感受性を検出する方法に関する。

背景技術

[0002] 造血器腫瘍は、通常の抗癌剤のみの治療では、その成績は頭打ちで、抗癌剤以外の腫瘍特異的な分子標的薬剤の開発が待たれている。造血器腫瘍は細胞内異常DNAメチル化などがその病態の一端を担うと考えられ、DNAメチル化阻害剤は、今後の幅広い応用が期待されている薬剤である。

[0003] しかし、その効果は急性骨髄性白血病（AML）に対して単独で用いるのは不十分であった（特許文献1：特表2004-529104（米国特許第6,613,753号明細書）、特許文献2：特表2006-508119（欧州特許第1,575,582号明細書）参照）。そこで、このようなDNAメチル化阻害剤の薬剤感受性予測マーカーの開発が待たれていた。

[0004] 好中球及び単球系列への分化決定に関与する転写因子（PU. 1）発現の部分的な低下が急性骨髄性白血病（AML）を引き起こす（非特許文献1：2004, Nat. Gen. p624-30）。本発明者は、AML発症機序の解明のため、PU. 1をsiRNA（small interfering RNA）により発現低下させ、PU. 1発現低下細胞（K562 PU. 1 KD細胞）を用いて解析を行った。その結果、細胞増殖、薬剤耐性に関与しているメタロチオネイン（MT）遺伝子の発現が上昇していることを見出し、AML 42症例において、PU. 1とMTとの間に負の相関（ $R = -0.43$, $p = 0.0058$ ）が認められることを

報告している（2006年第68回日本血液学会（登録番号：PS-2-30）において発表）。

- [0005] 特許文献1：特表2004-529104（米国特許第6,613,753号明細書）
特許文献2：特表2006-508119（欧州特許第1,575,582号明細書）
非特許文献1：2004, Nat. Gen. p624-30
非特許文献2：2006年第68回日本血液学会（登録番号：PS-2-30）
講演予稿集（2006年8月30日発行）

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明の目的は、DNAメチル化阻害剤の薬剤感受性予測マーカーとなる新規で有用な薬剤効果検出方法の提供にある。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者は、今回、メタロチオネイン（MT）の遺伝子発現制御機構について解析した。最初に、好中球または単球系列への分化決定に関与する転写因子（PU.1）を恒常的に過剰発現した細胞株であるK562.PU.1OE細胞株を樹立し解析を行った。その結果、MTの発現が、PU.1の発現上昇に伴い逆に低下することが判明し、MT遺伝子がPU.1の真の標的遺伝子であることが証明された。
- [0008] クロマチン免疫沈降法により、K562.PU.1KD細胞では、MTプロモーター領域のヒストンH3のアセチル化の亢進が明らかになった。同領域はCpG配列に富む構造を有していることから、転写開始点上流427bpまでの領域のCpGメチル化について、バイサルファイト（bisulfite）DNAシーケンス法により解析を行った。その結果、メチル化は、コントロール細胞株では約40%程度であるのに対して、K562.PU.1KD細胞では12～16%程度まで減少し、それに反してK562.PU.1OE細胞では約60%程度まで上昇し、メチル化がその制御に重要であることが判明した。
- [0009] さらに、DNAメチルトランスフェラーゼ（Dnmt）の動員が阻害され

ていると考えられるK562PU.1KD細胞は、Dnmt阻害剤（DNAメチル化阻害剤）である5-アザシチジンや5-アザ-2'-デオキシシチジンに対して耐性であることが判明した。以上より、PU.1の発現低下がエピジェネティックな制御異常を引き起こしていることが明らかとなり、骨髄異形成症候群やAML、それ以外の造血器疾患を含む造血器腫瘍細胞へのDNAメチル化阻害剤の適応には、PU.1やMT発現、及び同プロモーター領域メチル化率の検討が治療効果の予測、検出に有用であることが見出された。

[0010] すなわち、本発明は、以下に示されるDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法を提供するものである。

1. 好中球または単球系列への分化決定に関与する転写因子（PU.1）の遺伝子発現及び／またはメタロチオネイン（MT）の遺伝子発現に基づいて、DNAメチル化阻害剤に対する前記遺伝子発現細胞の薬剤感受性を検出することを特徴とするDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。

2. メタロチオネイン（MT）の遺伝子発現制御領域におけるDNAのメチル化に基づいてDNAメチル化阻害剤に対する前記遺伝子発現細胞の薬剤感受性を検出することを特徴とするDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。

3. 好中球または単球系列への分化決定に関与する転写因子（PU.1）の遺伝子発現及び／またはメタロチオネイン（MT）の遺伝子発現が、前記遺伝子発現細胞のメタロチオネイン（MT）遺伝子発現制御領域のDNAのメチル化により制御されることに基いて、DNAメチル化阻害剤に対する前記遺伝子発現細胞の薬剤感受性を検出する前記1に記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。

4. 前記PU.1の遺伝子発現の低下及び／または前記MTの遺伝子発現の上昇に基いて、前記遺伝子発現細胞がDNAメチル化阻害剤耐性であることを検出する前記1または3に記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。

5. 前記PU. 1の遺伝子発現の上昇及び／または前記MTの遺伝子発現の低下に基いて、前記遺伝子発現細胞がDNAメチル化阻害剤高感受性であることを検出する前記1または3に記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。

6. 前記遺伝子発現細胞のMT遺伝子発現制御領域のDNAのメチル化の解除による前記PU. 1の遺伝子発現の低下及び／またはMTの遺伝子発現の上昇に基いて前記遺伝子発現細胞がDNAメチル化阻害剤耐性であることを検出する前記4に記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。

7. 前記遺伝子発現細胞の前記MT遺伝子発現制御領域のDNAのメチルによる前記PU. 1の遺伝子発現の上昇及び／またはMTの遺伝子発現の低下に基いて、前記遺伝子発現細胞がDNAメチル化阻害剤高感受性であることを検出する前記5に記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。

8. 遺伝子発現細胞が造血器腫瘍細胞である前記1～7のいずれかに記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。

9. DNAメチル化阻害剤として、5-アザシチジン及び／または5-アザ-2'-デオキシシチジンを用いる前記1～8のいずれかに記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。

10. 遺伝子発現細胞が造血器腫瘍細胞であり、DNAメチル化阻害剤として5-アザ-2'-デオキシシチジン(5-azadc)を用い、PU. 1/GAPDHが0.01未満及び／またはMT-1A/GAPDHもしくはMT-1G/GAPDHが0.002より大きいことに基いて前記5-azadcに対する前記造血器腫瘍細胞のDNAメチル化阻害剤耐性を検出する前記6に記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。

11. 遺伝子発現細胞が造血器腫瘍細胞であり、DNAメチル化阻害剤として5-アザ-2'-デオキシシチジン(5-azadc)を用い、PU. 1/GAPDHが0.1より大きいこと、及び／またはMT-1A/GAPDHもしくはMT-1G/GAPDHが0.002未満であることに基いて前記5-azadcに対する前記造血器腫瘍細胞のDNAメチル化阻害剤高感受性を検出する前記7に記

載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。

12. メタロチオネイン (MT) 遺伝子発現制御領域のDNAのメチル化率に基づいてDNAメチル化阻害剤に対する前記遺伝子発現細胞の薬剤耐性または薬剤高感受性を検出する前記2に記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。

13. 遺伝子発現細胞が造血器腫瘍細胞であり、DNAメチル化阻害剤として5-アザ-2'-デオキシシチジン (5-azadc) を用い、DNAのメチル化率が20%未満であることに基いて前記5-azadcに対する前記造血器腫瘍細胞のDNAメチル化阻害剤耐性を検出する前記6または12に記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。

14. 遺伝子発現細胞が造血器腫瘍細胞であり、DNAメチル化阻害剤として5-アザ-2'-デオキシシチジン (5-azadc) を用い、DNAのメチル化率が50%より大きいことに基いて前記5-azadcに対する前記造血器腫瘍細胞のDNAメチル化阻害剤高感受性を検出する前記7または12に記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。

発明の効果

[0011] 本発明は、DNAメチル化阻害剤の薬剤効果予測マーカーとなる薬剤効果検出方法を提供したものである。

本発明によれば、好中球及び単球系列への分化決定に関与する転写因子 (PU. 1) の遺伝子発現、その標的遺伝子であるメタロチオネイン (MT) の遺伝子発現、及び/またはMT遺伝子発現制御領域のメチル化率に基づいて、薬剤の感受性を検出した上で、骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病 (AML)、その他の造血器疾患を含む造血器腫瘍細胞に対してDNAメチル化阻害剤を適用できるため治療成績が向上する。

図面の簡単な説明

[0012] [図1] PU. 1 遺伝子発現低下細胞株 (K562 PU. 1 KD細胞) の樹立を示す。

[図2] K562 PU. 1 KD細胞においてMT-1ファミリーの遺伝子発現が

上昇することを示す。

[図3] P U. 1 遺伝子過剰発現細胞株 (K 5 6 2 P U. 1 O E 細胞) の樹立を示す。

[図4] K 5 6 2 P U. 1 O E 細胞における M T - 1 ファミリーの遺伝子発現が低下することを示す。

[図5] M T - 1 G に関する結果を示し、P U. 1 遺伝子発現低下細胞で M T 1 遺伝子発現制御領域のメチル化が解除されることを示す。

[図6] M T - 1 G に関する結果を示し、P U. 1 遺伝子過剰発現細胞で M T 1 遺伝子発現制御領域がメチル化されることを示す。

[図7] P U. 1 遺伝子発現低下細胞 (P U 2 - 1 0, P U 3 - 1 0) とコントロール細胞 (v e c 5, v e c 6) の 5-azadc に対する感受性 (薬剤投与後の死細胞率) の比較を示す。

[図8] P U. 1 遺伝子過剰発現細胞 (A 2, H 8) とコントロール細胞 (v e c 1, v e c 2) の 5-azadc に対する感受性 (薬剤投与後の死細胞率) の比較を示す。

発明を実施するための最良の形態

- [0013] 血液細胞は幹細胞から発生する。幹細胞は様々な系列へと分化し、最終的に様々な形態、機能を持つ血液細胞が産生される。このような分化 (枝分かれ) には、その分化系列を特異的に発現する遺伝子の発現を調節する転写因子と呼ばれる核内因子が重要な役割を果たしている。
- [0014] このような転写因子の中で、P U. 1 は好中球、単球系列への分化決定に重要な役割を果たす。すなわち、転写因子 P U. 1 については、マウスを用いた解析から、その発現を低下させるのみで、急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia; AML) を発症することが判明している。このように、成人において最も頻度の高いタイプの白血病である AML の発症には、造血系転写因子 P U. 1 の発現低下が中心的な役割を果たしている。
- [0015] AML の発症原因及びメカニズムを明らかにするために、白血病細胞 (K 5 6 2 細胞) で P U. 1 の発現を抑制する siRNA 法を用いて人工的に P U

． 1の発現のみを低下させた細胞株（K562 PU. 1 KD細胞）を作成した。そして、コントロール細胞と比較して、網羅的に遺伝子発現を解析するマイクロアレイ法を用い、PU. 1の発現低下に伴い発現が変動する遺伝子の同定を試みた。その結果、PU. 1の発現低下に伴い、一群のメタロチオネイン（MT）遺伝子（MT-1A、MT-1G等）の発現が増加することが判明した（図1、図2）。

[0016] 図1（a）及び（b）は、PU. 1発現低下株（K562 PU. 1 KD細胞）の樹立実験の結果を示す。すなわち、PU. 1 siRNA発現ベクター（Takara, Ohtsu, Japan）とそのコントロールベクター（Takara）を白血病細胞株であるK562細胞に、文献記載の方法（Takahashi S et al., British Journal of Haematology, 2005(130), p428-436）に従って導入した。具体的には、この方法はエレクトロポレーションを用いて、前記発現ベクターとそのコントロールベクターを白血病細胞株（K562細胞）に導入した。導入された細胞を $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ のピューロマイシン存在下RPMI培地で培養することにより恒常的にPU. 1 siRNAを発現する細胞を選択し、限界希釈法により単離した。単離したコントロール細胞（Control K562）（V5, V6）と、PU. 1発現低下細胞（2-10, 3-10）（K562 PU. 1 KD細胞）を用いて、常法に基づき調製した蛋白質をSDS-PAGEで電気泳動後、膜に転写し、PU. 1抗体及び蛋白量の目安となる β -アクチン（ β -actin）にてブロットした（図1（a））。

[0017] また、上記細胞から常法に基づき調製したRNAを用いてcDNA合成を行い、定量PCR（条件：実施例参照）を行った。PU. 1の発現量をハウスキーピング遺伝子であるGAPDH（glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase）の発現量で補正し、PU. 1/GAPDHとして図1（b）に示した。

PU. 1の発現はコントロール株（V5, V6）と比較してPU. 1低下細胞（K562 PU. 1 KD細胞）（2-10, 3-10）で低下していることが明らかになった。

[0018] 図2は、人工的にPU. 1の発現のみを低下させた細胞株（K562PU. 1KD細胞）においてMT-1ファミリー遺伝子の発現が上昇することを示す。

K562PU. 1KD細胞（PU2-10, PU3-10）及びそのコントロール細胞（Control K562）（V5, V6）より常法に基づき調製したRNAを用いてcDNA合成を行い、MT1A, MT1Gの発現を検討するため後述の実施例に記載の条件で定量PCRを行った。その結果、MT1A及びMT1Gの発現量をハウスキーピング遺伝子であるGAPDH（glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase）の発現量で補正し、MT1A/GAPDH, MT1G/GAPDHとして図2に示した。

K562PU. 1KD細胞においてMT1A, MT1Gいずれの遺伝子発現量も増加していることが判明した。

[0019] 上記とは逆に、人工的にPU. 1を過剰に発現する細胞（K562PU. 1OE細胞）を作製して、PU. 1遺伝子の発現を検討したところ、MT遺伝子の発現が低下することが確認され、このような遺伝子が真の標的遺伝子であることが分かった（図3, 図4）。

[0020] 図3（a）及び（b）に、PU. 1過剰発現細胞株（K562PU. 1OE細胞）の樹立実験の結果を示す。すなわち、PU. 1発現ベクターは文献記載のものを使用し（Inomata et al., Leukemia Research 30 (2006) p659-664）、これとそのコントロールベクター、pcDNA3. 1（Invitrogen, CA）を白血病細胞株であるK562細胞に、文献記載の方法に従って導入した（Takahashi S et al., British Journal of Haematology, 2005(130), p428-436）。導入された細胞を400 μ g/mLのネオマイシン存在下RPMI培地で培養し、恒常的にPU. 1を発現する細胞を選択し、限界希釈法により単離した。単離したコントロール細胞（Control K562）（V1, V2）と、PU. 1過剰発現細胞（K562PU. 1OE細胞）（A2, H8）を用いて、常法に基づき調製した蛋白質をSDS-PAGEで電気泳動後、膜に転写し、PU. 1抗体及び蛋白質の目安となる β -actinにてブロットした（

図3 (a)) 。

また、上記細胞から常法に基づき調製したRNAを用いてcDNA合成を行い、後述の実施例に記載の条件で定量PCR (条件：実施例参照) を行った。その結果を、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) の発現量で補正し、PU. 1/GAPDHとして図3 (b) に示した。

PU. 1の発現はコントロール株 (Control K562) (V1, V2) と比較してPU. 1過剰発現細胞 (K562 PU. 1 OE細胞) (A2, H8) で上昇していることが明らかになった。

[0021] 図4は、PU. 1を過剰に発現する細胞 (K562 PU. 1 OE細胞) においてMT-1ファミリー遺伝子の発現が低下することを示す。

K562 PU. 1 OE細胞 (A2, H8) 及びそのコントロール細胞 (Control K562) (V1, V2) より常法に基づき調製したRNAを用いてcDNA合成を行い、MT1A, MT1Gの発現を検討するため後述の実施例に記載の条件で定量PCRを行った。その結果をハウスキーピング遺伝子であるGAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) の発現量で補正し、MT1A/GAPDH, MT1G/GAPDHとして図4に示した。

K562 PU. 1 OE細胞においてMT1A, MT1Gいずれの遺伝子発現量も低下していることが判明した。

[0022] DNAからmRNAが合成される転写では、DNAが核内蛋白質ヒストンに密に巻き付けられているか、緩やかに巻き付けられているかで転写量が全く異なることが分かっている。このような核内のDNAと蛋白質の複合体であるクロマチン構造の変化が転写制御に重要であり、その中で着目すべきは、DNAメチル化機構である。DNAのメチル化が起こると転写が抑制される。

[0023] 本発明者は、前述のPU. 1遺伝子発現低下によるMT遺伝子の発現上昇が、このDNAメチル化機構により制御されていること、すなわち、MT遺

伝子発現制御領域のDNAのメチル化が低下して、その遺伝子発現上昇に關与していることを発見した（図5、図6）。このような遺伝子のメチル化はMT遺伝子だけでなく、PU. 1遺伝子発現低下細胞の複数の遺伝子発現制御領域においても低下している。このような結果から、PU. 1遺伝子発現低下による白血病においては、DNAメチル化阻害剤の薬剤効果が不十分であることが考えられる。

[0024] 図5（a）及び（b）は、MT-1Gに関する結果を示し、PU. 1遺伝子発現低下細胞ではMT-1遺伝子発現制御領域のメチル化が解除されることを示す。

MT-1G遺伝子の5'上流域を図5（a）の模式図に示す。矢印が文献報告されている転写開始点である（Huang et al., Int. J. Cancer: 104, p735-744 (2003)）。TATAボックスとCpGアイランド（白丸：○）を示した。番号は今回解析を行った転写開始点上流-427bpからのCpGアイランドの数を示す。

MT-1G遺伝子プロモーターのDNAメチル化塩基配列解析の結果を図5（b）に示した。図に示した細胞からゲノムDNAを調製し、バイサルファイト処理を行った後、後述の実施例に示すプライマーを用いてPCRで増幅し、PGEMT easy vector（Promega, Madison, WI）にクローニングし、シーケンス解析を行った。黒丸（●）がメチル化されたCpGアイランドで、白丸（○）が非メチル化CpGアイランドである。

PU. 1発現低下細胞（2-10：メチル化率15.79%，3-10：メチル化率29.47%）では、コントロール細胞（vec5：メチル化率28.68%，vec6：メチル化率40.53%）と比較してメチル化率が低下していることが明らかになった。

[0025] 図6（a）及び（b）は、MT-1Gに関する結果を示し、PU. 1遺伝子過剰発現細胞ではMT-1遺伝子発現制御領域がメチル化されることを示す。

MT-1G遺伝子の5'上流域を上記図5（a）と同様に図6（a）の模

式図に示す。

MT-1G遺伝子プロモーターのDNAメチル化塩基配列解析の結果を図6(B)に示した。図に示した細胞からゲノムDNAを調製し、バイサルファイト処理を行った後、後述の実施例に示すプライマーを用いてPCRで増幅し、PGEMT easy vector (Promega, Madison, WI)にクローニングし、シーケンス解析を行った。黒丸(●)がメチル化されたCpGアイランドで、白丸(○)が非メチル化CpGアイランドである。

PU.1遺伝子過剰発現細胞(H8:メチル化率59.47%)では、コントロール細胞(vec1:メチル化率36.05%)と比較してメチル化率が上昇していることが明らかになった。

[0026] そこで、PU.1の遺伝子発現を低下させた細胞(K562PU.1KD細胞)と、過剰発現させた細胞(K562PU.1OE細胞)を用いて、DNAメチル化阻害剤で、実際に臨床的に用いられている薬剤である5-アザ-2'-デオキシシチジン(5-aza-2'-deoxycytidine(5-azadcまたはAZAと略記することがある))をこれらの細胞に投与した。その結果、DNAメチル化活性の阻害されたPU.1遺伝子発現低下細胞は、5-azadcに対して耐性で感受性が低く(図7)、逆にPU.1遺伝子過剰発現細胞は感受性が高いことが判明した(図8)。

[0027] 2種類のPU.1遺伝子発現低下細胞(PU2-10, PU3-10)とコントロール細胞(vec5, vec6)について、5-azadc(AZA)に対する感受性(%effect:薬剤投与後の死細胞率)を比較した。すなわち、96ウェルプレートに、前記細胞をそれぞれ2000個/ウェルでまき、5-azadc(AZA)を0.2、1、3.9、15.6、62.5、250及び1000nMの濃度でウェル中に添加後、96時間後に細胞生存率アッセイを用いて行った。このアッセイでは、100μLの細胞培養液が入っているウェル中に、10μLのWST-8試薬(Dojindo, Japan)を添加し、37°Cで2時間、5%CO₂インキュベーターで培養後、490nmの波長でマイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定することにより細胞生存率を測定し、その結果を死細胞率(%effec

t) として図7に示した。

PU. 1 遺伝子発現低下細胞 (PU2-10, PU3-10) はコントロール細胞 (vec5, vec6) と比較し、約20%程度死細胞率が低いことが明らかになり、同細胞は薬剤耐性を持つことが判明した。

[0028] 2種類のPU. 1 遺伝子過剰発現細胞 (A2, H8) とコントロール細胞 (vec1, vec2) について、5-azadc (AZA) に対する感受性 (%effect: 薬剤投与後の死細胞率) を比較した。実験は上記図7の場合と同様に行った。その結果を図8に示した。PU. 1 遺伝子過剰発現細胞はコントロール細胞と比較し、約20%程度死細胞率が高いことが明らかになり、同細胞は薬剤に対して高感受性であることが判明した。

[0029] がんでは、がん抑制遺伝子発現制御領域の異常メチル化が高頻度に認められたことから、その発症機構としてメチル化の異常が関与しているのではないかと考えられてきた。抗癌剤と比較して副作用の少ないDNAメチル化阻害剤は、前白血病状態と考えられている骨髄異形成症候群でその効果が認められつつある。また、骨髄異形成症候群以外の造血器悪性疾患に対しても用いられ始めている。

[0030] 幹細胞の段階で発現しており、造血に重要な転写因子であるAML1 遺伝子は、一部のAML (急性骨髄性白血病) において、8番と21番目の染色体が部分的に置き換わる、相互転座と呼ばれる異常により、AML1-ETOと呼ばれる異常な融合産物となる。この異常融合転写因子が、造血細胞の分化に関わる遺伝子の発現を異常に制御することにより病態に関与すると考えられている。AML1-ETOを含むいくつかのAML特異的融合転写因子はDNAメチル化活性が高いと言われていることから、AMLに対してもメチル化阻害剤の投与の検討が行われている。しかし、その効果はまだ明らかではない。

[0031] すなわち、単純にDNAメチル化阻害剤が全てのAML細胞に著効という訳ではないと考えられる。実際本発明者の今回の発見でも、AMLを模した状態であるPU. 1 転写因子の発現低下により、細胞内メチル化が低下し、

薬剤耐性であることが判明した。

逆に、PU. 1 転写因子発現上昇により、細胞内メチル化が上昇し、薬剤感受性が高まることが判った。すなわち、本発明によれば、骨髓異形成症候群やAML等の造血器疾患において、PU. 1の発現、ならびにその標的遺伝子であるMTの発現の検討が、より効果的な、AMLに対するDNAメチル化阻害剤効果の予測、検出に用いられることが判った。

[0032] すなわち、(1) 転写因子PU. 1発現量、(2) MT (MT-1A、MT-1G等) 発現量、及び(3) MT (MT-1A、MT-1G等) 遺伝子発現制御領域のメチル化を検討することが、5-azadc等のDNAメチル化阻害剤効果を予測、検出する臨床的に有用なマーカーとなることが判った。

[0033] 実施例の結果から、PU. 1/GAPDHのレベルが0.01未満(図1)またはMT-1A またはG/GAPDHのレベルが0.002より大きい(図2)場合、5-azadcに対して感受性が低く、PU. 1/GAPDHのレベルが0.1より大きく(図3)またはMT-1AまたはG/GAPDHのレベルが0.002未満(図4)の場合、5-azadcに対して感受性が高いことが判った。また、メチル化率が20%未満だと5-azadcに対して耐性であることが判り(図5)、50%より大きいと感受性が高いことが判った(図6)。

[0034] 5-azadcはDNAメチル化阻害剤として注目されている薬剤であるが、AMLに対してこれのみで十分な治療効果が期待できる薬剤ではなかった。しかし、本発明により、薬剤投与前に、PU. 1あるいはその標的遺伝子であることが明らかとなったMTの遺伝子発現、遺伝子発現制御領域のDNAメチル化などを検討することにより、薬剤効果を予測、検出できることが判った。このような情報をもとに治療を行えば、抗癌剤のみに頼らずに、有効でかつ特異的なAML等の造血器腫瘍の治療が行え、その治療成績が向上する。

[0035] 本発明によれば、PU. 1 遺伝子低発現造血器腫瘍細胞に対しては5-azadc等のDNAメチル化阻害剤が耐性であり、PU. 1 遺伝子高発現造血器腫瘍細胞では5-azadc等のDNAメチル化阻害剤が高感受性であるという知見に基づいて、非常に特異性の高い薬剤効果予測マーカーが提供される。また、M

T-1A、MT-1G等のMT遺伝子のメチル化率がPU.1遺伝子の発現と相関することから、これら遺伝子群のメチル化率の検出も、5-azadC等のDNAメチル化阻害剤に対する薬剤効果予測マーカーとして有用である。

[0036] 本発明によれば、5-アザ-2'-デオキシシチジン(5-azadC)のほか、5-アザシチジン、またはこれと5-azadCとの混合物を含むDNAメチル化阻害剤の薬剤効果を効果的に予測、検出することができる。

実施例

[0037] 以下に実施例を挙げ、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0038] 実施例

[転写因子PU.1及び標的遺伝子MT-1発現量の検討]

同意が得られた、芽球比率が高い、骨髓血あるいは末梢血由来の患者検体からFicoll Hypaque(GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden)を用いた密度勾配遠心法により、常法に基づき単核球を分離した。分離した単核球から、Isogen(ニッポンジーン社)を用いてtotal RNAを常法に基づき調製した。得られたRNAを用いて、スーパースクリプトファーストストランドシステム(Invitrogen社、Carlsbad、CA)により常法に従ってcDNAを合成した。

[0039] 定量PCRに用いたプライマーは下記の通りである。

MT-1G forward;5'-CTTCTCGCTTGGGAAGCTCTA-3' (配列番号1)、
reverse;5'-AGGGGTCAAGATTGTAGCAAA-3' (配列番号2)、
MT-1A forward;5'-CTCGAAATGGACCCCAACT-3' (配列番号3)、
reverse;5'-ATATCTTCGAGCAGGGCTGTC-3' (配列番号4)、
PU.1 forward;5'-GTGCCCTATGACAACGGATCT-3' (配列番号5)、
reverse;5'-GAAGCTCTCGAACTCGCTGT-3' (配列番号6)。

[0040] これらプライマーを用い、Quantitect SYBR green PCR reagent(Qiagen社、Miami、FL)を説明書に従って、Opticon mini real-time PCR instrument(Bio-Rad、Hercules、CA)を使用し、定量PCRを行うことにより、発現量を検

出した。また、全ての遺伝子産物の発現量は下記に示すハウスキーピング遺伝子であるGAPDHの発現量で補正して算出した。

GAPDH forward;5' -GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3' (配列番号7)、
reverse;5' -GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3' (配列番号8)。

[0041] PCR条件は下記の通りである。

PU. 1 : step1, 95°C 15分;
step2, 95°C 15秒;
step3, 60°C 1分;
steps2-3を35回繰り返す。

MT-1A, G及びGAPDH :
step1, 95°C 15分;
step2, 95°C 30秒;
step3, 55°C 30秒;
step4, 72°C 30秒;
steps2-4を35回繰り返す。

発現量検出に必要なコピー数の計算は報告されている方法 (Takahashi Set al., Leukemia Research, 2005 (29), p893-899) に従って行った。なお、この方法は、具体的には、上記のプライマーで増幅したDNAを、PGEMT easy vector (Promega, Madison, WI) にクローニングすることで、その遺伝子特異的なプラスミドDNAを作成し、次に、その作成したプラスミドDNA質量に基づいたコピー数を計算して、プラスミドの希釈系列を作成し、測定するcDNAと同時に定量PCRを行い、その希釈系列による検量線から発現量検出に必要なコピー数を算出するものである。

[0042] 作成した培養細胞における結果から、上記方法で算出したPU. 1 / GAPDHのレベルが0.01未満 (図1) またはMT-1AまたはG / GAPDHのレベルが0.002より大きい (図2) 場合、5-azadclに対して耐性で感受性が低く、PU. 1 / GAPDHのレベルが0.1より大きく (図3) またはMT-1AまたはG / GAPDHのレベルが0.002未満 (図4) の場合、5-azadclに

対して感受性が高いことが判った。

[0043] [MT-1 遺伝子発現制御領域のメチル化の検討]

同意が得られた、芽球比率が高い、骨髓血あるいは末梢血由来の患者検体からFicoll Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) を用いた密度勾配遠心法により、常法に基づき単核球を分離した。前記分離した単核球からゲノムDNAをQiagen社 Blood & Cell Culture DNA mini kit (QIAGEN) を用いて調製した。そのDNAについてEZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research社、Orange, CA) で常法に基づきバイサルファイト処理を行なうと、メチル化シトシンは変換されず非メチル化シトシンのみがウラシルに変換される。得られたDNAを下記のプライマーにより増幅し、PGEMT easy vector (Promega, Madison, WI) にクローニングした。

MT-1G forward; 5' -TTTGGTAGATTTAGAAAAGTGGAGTATAAGA-3' (配列番号9)

reverse; 5' -CTCAAACCCAAAAACACTCTCTATAATATC-3' (配列番号10)

MT-1A forward; 5' -GGGATAGGAGTAGGAGGTTGTGGTTGTATT-3' (配列番号11)

reverse; 5' -ACACCTCTACTCCTAAAAACATCTATCCTATA-3' (配列番号12)。

[0044] ベクターにクローニング後、常法に基づいてBig Dye Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて、ABI Prism DNA sequencer 3130 (Applied Biosystems) によりシーケンス解析をし、シトシンからチミンへの変換を検討することで、メチル化率を算定した。シーケンス反応として、ウラシルはチミンとして表現され、バイサルファイト処理後で生じるシトシンとチミン (ウラシル) の配列上の表現はメチル化の有無により異なる。

[0045] 図5及び図6の結果から、メチル化率が20%未満だと5-azadCに対して耐性で感受性が低く (図5)、50%より多いと感受性が高いことが判った (

図6)。

産業上の利用可能性

[0046] 本発明は、骨髓異形成症候群、急性骨髄性白血病（AML）、その他の造血器疾患を含む造血器腫瘍細胞に対する分子標的薬剤であるメチル化阻害剤を有効に適用するための薬剤効果検出方法を提供したものである。

本発明によれば、好中球及び単球系列への分化決定に関与する転写因子（PU. 1）の遺伝子発現、その標的遺伝子であるメタロチオネイン（MT）の遺伝子発現、及び／またはMT遺伝子発現制御領域のメチル化率に基づいて、薬剤（メチル化阻害剤）の感受性を検出した上で、造血器腫瘍に対する有効かつ特異的な治療を行うことができる。

請求の範囲

- [請求項1] 好中球または単球系列への分化決定に関与する転写因子（P U. 1）の遺伝子発現及び／またはメタロチオネイン（MT）の遺伝子発現に基づいて、DNAメチル化阻害剤に対する前記遺伝子発現細胞の薬剤感受性を検出することを特徴とするDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。
- [請求項2] メタロチオネイン（MT）の遺伝子発現制御領域におけるDNAのメチル化に基づいてDNAメチル化阻害剤に対する前記遺伝子発現細胞の薬剤感受性を検出することを特徴とするDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。
- [請求項3] 好中球または単球系列への分化決定に関与する転写因子（P U. 1）の遺伝子発現及び／またはメタロチオネイン（MT）の遺伝子発現が、前記遺伝子発現細胞のメタロチオネイン（MT）遺伝子発現制御領域がDNAのメチル化により制御されることに基いてDNAメチル化阻害剤に対する前記遺伝子発現細胞の薬剤感受性を検出する請求項1に記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。
- [請求項4] 前記P U. 1の遺伝子発現の低下及び／または前記MTの遺伝子発現の上昇に基いて、前記遺伝子発現細胞がDNAメチル化阻害剤耐性であることを検出する請求項1または3に記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。
- [請求項5] 前記P U. 1の遺伝子発現の上昇及び／または前記MTの遺伝子発現の低下に基いて、前記遺伝子発現細胞がDNAメチル化阻害剤高感受性であることを検出する請求項1または3に記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。
- [請求項6] 前記遺伝子発現細胞のMT遺伝子発現制御領域のDNAのメチル化の解除による前記P U. 1の遺伝子発現の低下及び／またはMTの遺伝子発現の上昇に基いて前記遺伝子発現細胞がDNAメチル化阻害剤耐性であることを検出する請求項4に記載のDNAメチル化阻害剤の

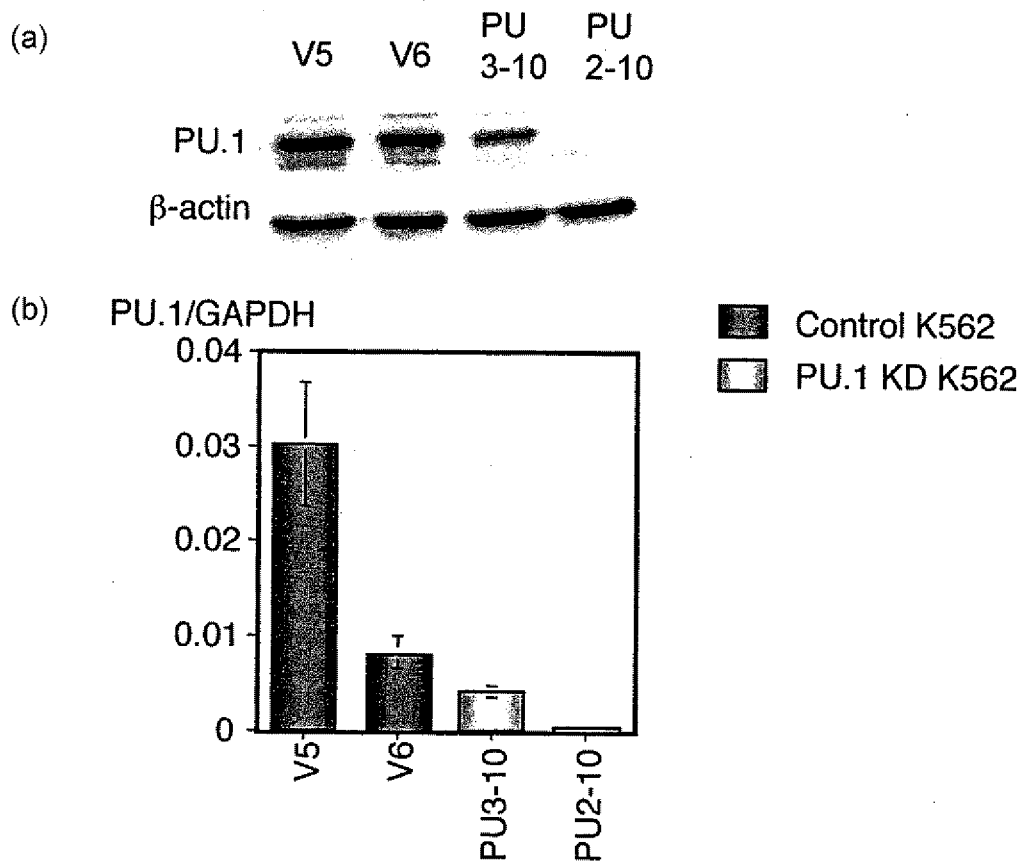
薬剤効果検出方法。

- [請求項7] 前記遺伝子発現細胞の前記MT遺伝子発現制御領域のDNAのメチル化による前記PU. 1の遺伝子発現の上昇及び／またはMTの遺伝子発現の低下に基いて、前記遺伝子発現細胞がDNAメチル化阻害剤高感受性であることを検出する請求項5に記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。
- [請求項8] 遺伝子発現細胞が造血器腫瘍細胞である請求項1～7のいずれかに記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。
- [請求項9] DNAメチル化阻害剤として、5-アザシチジン及び／または5-アザ-2'-デオキシシチジンを用いる請求項1～8のいずれかに記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。
- [請求項10] 遺伝子発現細胞が造血器腫瘍細胞であり、DNAメチル化阻害剤として5-アザ-2'-デオキシシチジン(5-azadc)を用い、PU. 1/GAPDHが0.01未満及び／またはMT-1A/GAPDHもしくはMT-1G/GAPDHが0.002より大きいことに基いて前記5-azadcに対する前記造血器腫瘍細胞のDNAメチル化阻害剤耐性を検出する請求項6に記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。
- [請求項11] 遺伝子発現細胞が造血器腫瘍細胞であり、DNAメチル化阻害剤として5-アザ-2'-デオキシシチジン(5-azadc)を用い、PU. 1/GAPDHが0.1より大きいこと、及び／またはMT-1A/GAPDHもしくはMT-1G/GAPDHが0.002未満であることに基いて前記5-azadcに対する前記造血器腫瘍細胞のDNAメチル化阻害剤高感受性を検出する請求項7に記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。
- [請求項12] メタロチオネイン(MT)遺伝子発現制御領域のDNAのメチル化率に基いてDNAメチル化阻害剤に対する前記遺伝子発現細胞の薬剤耐性または薬剤高感受性を検出する請求項2に記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。

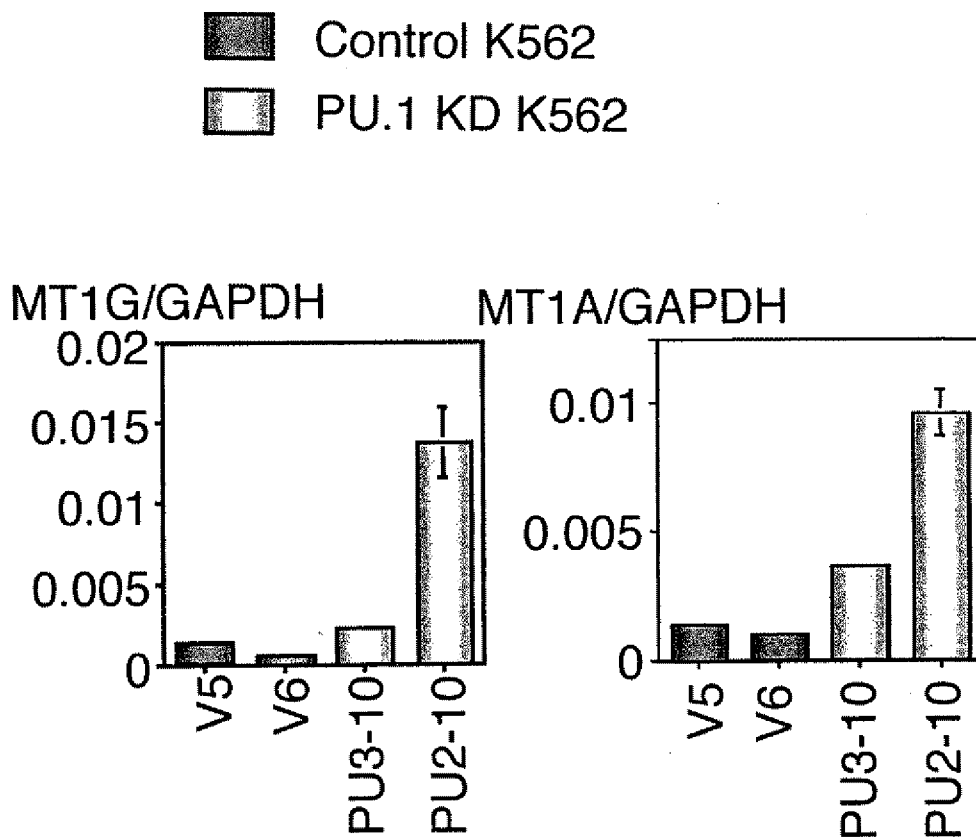
[請求項13] 遺伝子発現細胞が造血器腫瘍細胞であり、DNAメチル化阻害剤として5-アザ-2'-デオキシシチジン (5-azadc) を用い、DNAのメチル化率が20%未満であることに基いて前記5-azadcに対する前記造血器腫瘍細胞のDNAメチル化阻害剤耐性を検出する請求項6または12に記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。

[請求項14] 遺伝子発現細胞が造血器腫瘍細胞であり、DNAメチル化阻害剤として5-アザ-2'-デオキシシチジン (5-azadc) を用い、DNAのメチル化率が50%より大きいことに基いて前記5-azadcに対する前記造血器腫瘍細胞のDNAメチル化阻害剤高感受性を検出する請求項7または12に記載のDNAメチル化阻害剤の薬剤効果検出方法。

[Fig 1]

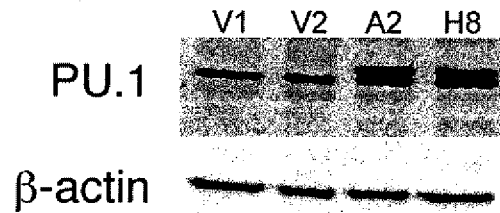


[Fig 2]

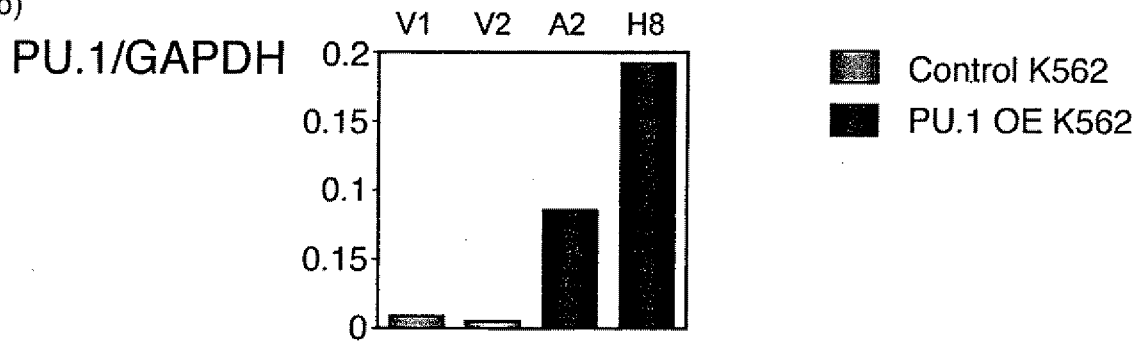


[図3]

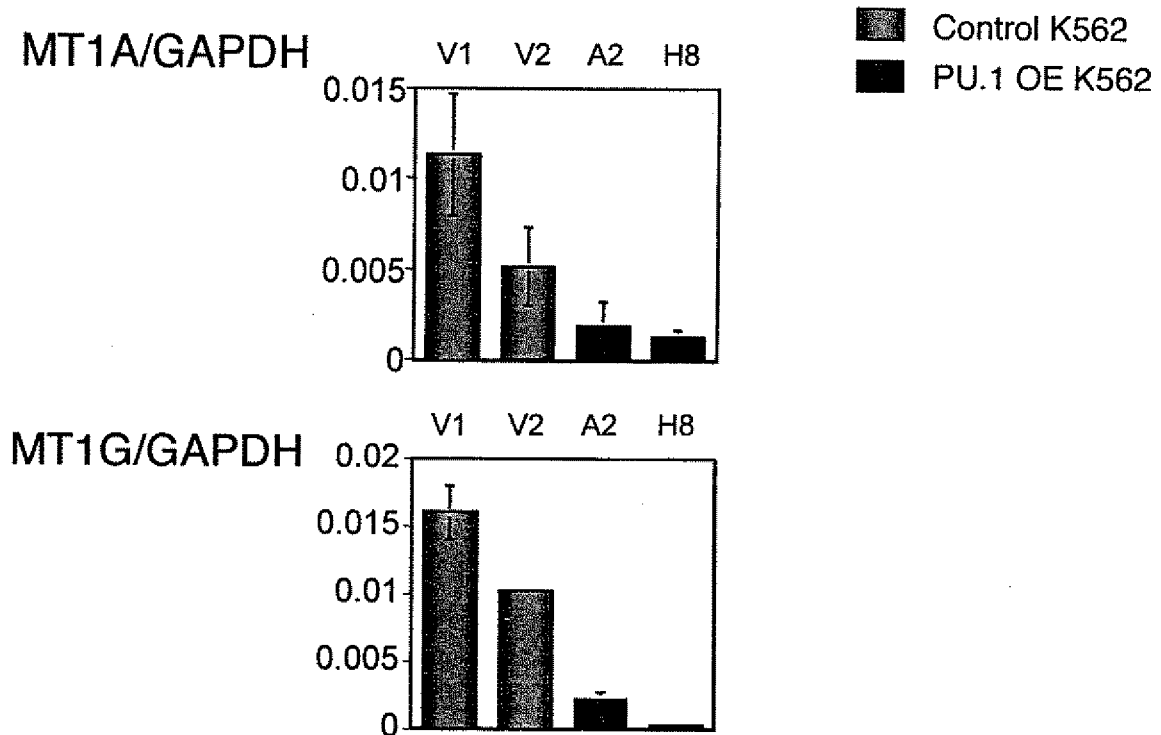
(a)



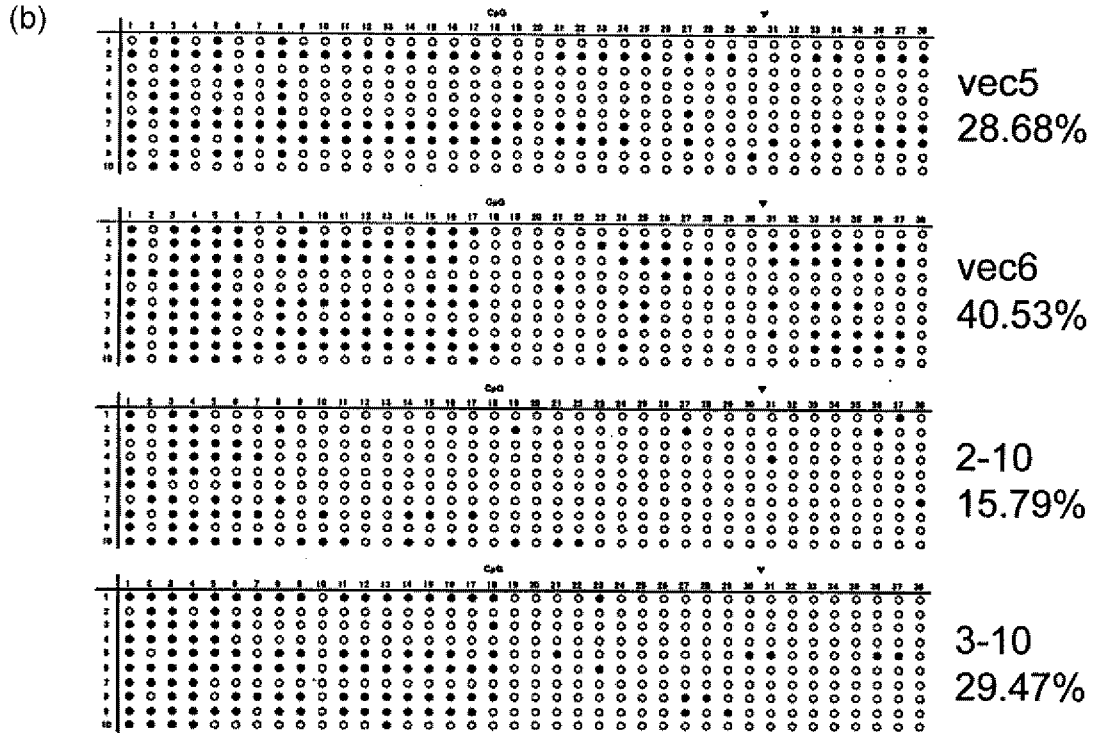
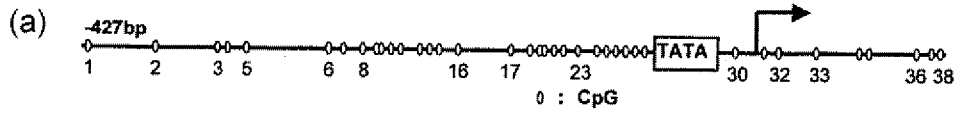
(b)



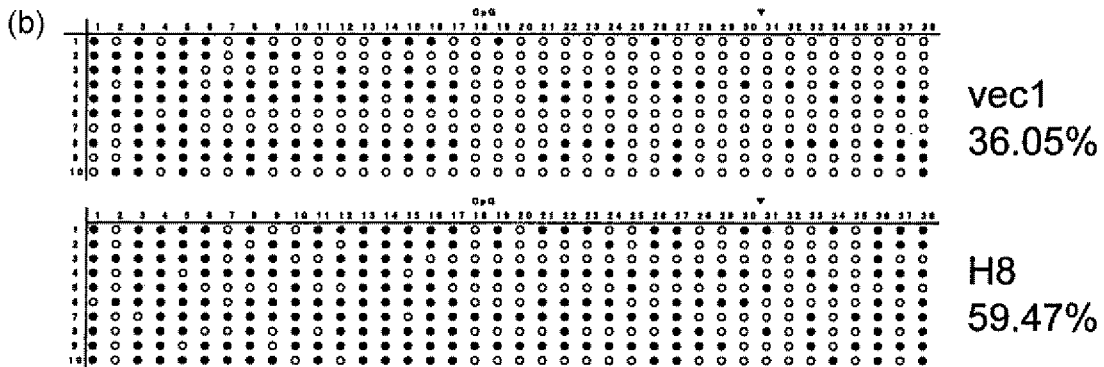
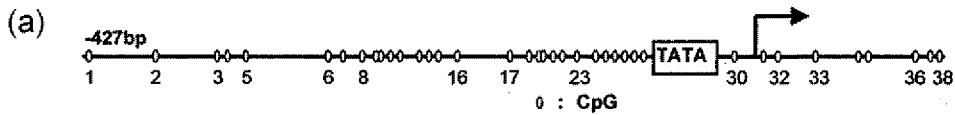
[図4]



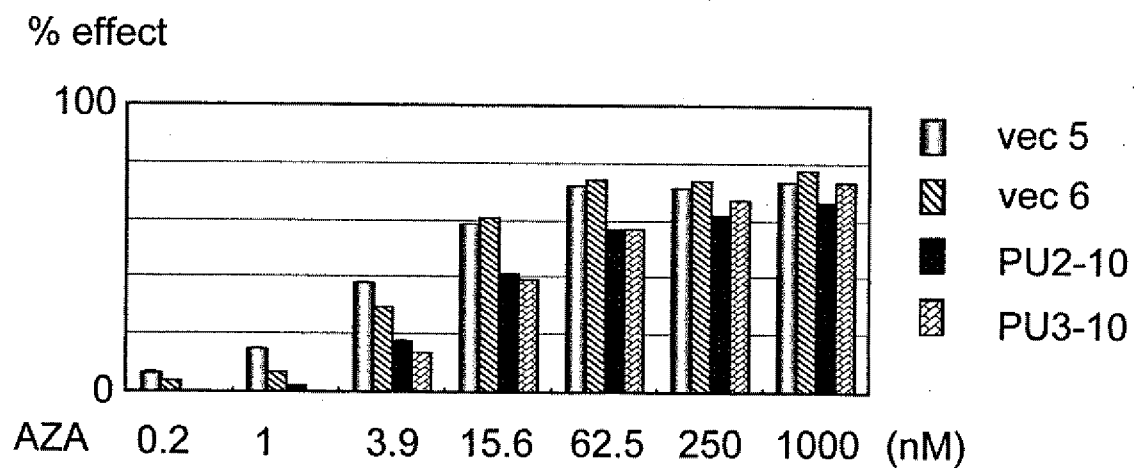
[圖5]



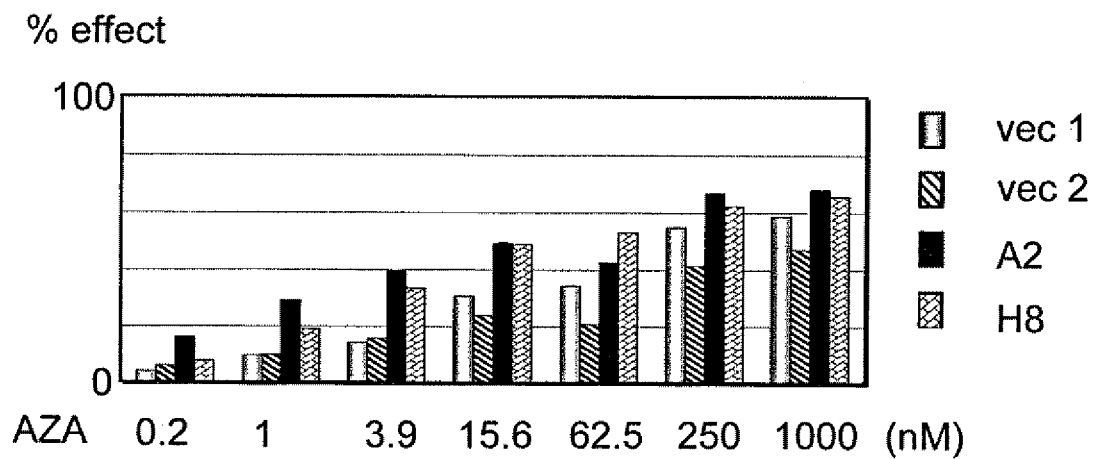
[圖6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/065041

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(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)

C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Shin'ichiro TAKAHASHI et al., "PU.1 Hatsugen Teika ni yoru Hakketsubyoka Kiko no Kaiseki", The Japanese Journal of Clinical Pathology (2006), vol.54 supplementary issue, page 260	1-14
Y	TAKETSU, H. et al., Down-regulation of PU.1 by methylation of distal regulatory elements and the promoter is required for myeloma cell growth. Cancer Res. (2007) Vol.67 pp.5328-5336	1-14
Y	GLASSPOOL, RM. et al., Epigenetics as a mechanism driving polygenic clinical drug resistance. Br J Cancer. (2006) Vol.94 pp. 1087-1092	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
13 November, 2009 (13.11.09)

Date of mailing of the international search report
01 December, 2009 (01.12.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/065041

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GROVDAL, M. et al., Negative effect of DNA hypermethylation on the outcome of intensive chemotherapy in older patients with high-risk myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia following myelodysplastic syndrome. Clin Cancer Res. (2007) Vol.13 pp.7107-7112	1-14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

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. C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50

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
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2009年
 日本国実用新案登録公報 1996-2009年
 日本国登録実用新案公報 1994-2009年

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)
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 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 請求項の番号
Y	高橋伸一郎 他, PU.1 発現低下による白血病化機構の解析 臨床病理 (2006) Vol.54 補冊 p.260	1-14
Y	TAKETSU, H. et al., Down-regulation of PU.1 by methylation of distal regulatory elements and the promoter is required for myeloma cell growth. Cancer Res. (2007) Vol.67 pp.5328-5336	1-14

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

<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、一般的な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</p>	<p>の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 「&」 同一パテントファミリー文献</p>
---	---

国際調査を完了した日 13.11.2009	国際調査報告の発送日 01.12.2009
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) 富永 みどり 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 請求項の番号
Y	GLASSPOOL, RM. et al., Epigenetics as a mechanism driving polygenic clinical drug resistance. Br J Cancer. (2006) Vol.94 pp.1087-1092	1-14
Y	GROVDAL, M. et al., Negative effect of DNA hypermethylation on the outcome of intensive chemotherapy in older patients with high-risk myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia following myelodysplastic syndrome. Clin Cancer Res. (2007) Vol.13 pp.7107-7112	1-14