

(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12月2日(02.12.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/137671 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/34 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/059049
- (22) 国際出願日: 2010年5月27日(27.05.2010)
- (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 2009-128323 2009年5月27日(27.05.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人秋田大学(National University Corporation Akita University) [JP/JP]; 〒0108502 秋田県秋田市手形学園町1番1号 Akita (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 本山 悟 (MOTOYAMA, Satoru) [JP/JP]; 〒0108543 秋田県秋田市本道一丁目1番1号 国立大学法人秋田大学医学部内 Akita (JP). 三浦 昌朋(MIURA, Masatomo) [JP/JP]; 〒0108543 秋田県秋田市本道一丁目1番1号 国立大学法人秋田大学医学部内 Akita (JP). 小川 純一(OGAWA, Junichi) [JP/JP]; 〒0108543 秋田県秋田市本道一丁目1番1号 国立大学法人秋田大学医学部内 Akita (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 もえぎ特許事務所 (MOEGI PATENT OFFICE); 〒1050001 東京都港区虎ノ門二丁目7番7号 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, TH, 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, LR, 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 (AL, 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))



WO 2010/137671 A1

(54) Title: METHOD FOR ASSESSING LYMPH NODE METASTASIS OF CANCER OR THE RISK THEREOF, AND RAPID ASSESSMENT KIT FOR SAID METHOD

(54) 発明の名称: ガンのリンパ節転移またはそのリスクを判定する方法及びそのための迅速判定キット

(57) Abstract: Provided are a method and means for rapidly and reliably assessing lymph node metastasis of cancer or the risk thereof. Specifically provided are a method and rapid assessment kit for assessing lymph node metastasis of cancer, or the risk thereof, by identifying specific gene polymorphism of human C-reactive protein genes. Since the provided method and kit can effectively predict and assess lymph node metastasis, which is a significant event in the progression of cancer, said method and kit are clinically extremely meaningful when it comes to deciding treatment strategies.

(57) 要約: 本発明は、ガンのリンパ節転移またはそのリスクを迅速かつ確実に判定する方法及び手段の提供を目的とする。具体的にはヒトC反応性タンパク質遺伝子の特定の遺伝子多型を同定することにより、ガンのリンパ節転移またはそのリスクを判定する方法及び迅速判定キットを提供するものであり、ガンの進展において重要な事象であるリンパ節転移を有効に予測・判定できるため、治療戦略を決定する上での臨床的意味は極めて大きい。

明 細 書

発明の名称：

ガンのリンパ節転移またはそのリスクを判定する方法及びそのための迅速判定キット

技術分野

[0001] 本発明は、ガンのリンパ節転移を判定する方法及びそれに用いる迅速判定キットに関する。

背景技術

[0002] ガン細胞は、原発巣を離れ、血管やリンパ管を經由して全身に転移する。ガンの手術では、できるだけ確実に病巣を取り除くことが必要であるため、転移を正確に検出し、転移の度合いに応じて適切な治療をすることが要求される。このため、ガン細胞のリンパ節転移の診断は適切な治療の選択に極めて重要な意義を有している。

[0003] ガン細胞のリンパ節転移の診断は、治療前に行う画像診断と治療（手術）後に行う病理学的診断に大別することができる。画像診断としては、CT (computed tomography : コンピュータ断層撮影)、PET (positron emission tomography : ポジトロン放出断層撮影法) ないしPETとCTを一体化した装置によるPET-CT、EUS (endoscopic ultrasoundscopy : 超音波内視鏡検査) などを使用する方法があり、ガンのリンパ節転移の検出（リンパ節転移の有無等の検査）に使用されているが、これらの画像診断では、微小なリンパ節転移の検出は困難であるか限定的にしか有効でない。一方、病理学的診断は、摘出された数多くのリンパ節組織より作成された標本を顕微鏡下で観察する方法であり、精度が高い確実な診断法であるが、摘出したリンパ節を使用してしか診断ができず、治療（手術）後の診断となるため、予め最適な治療を選択するためには使用できない。このように、治療前診断は画像診断に頼らざるを得ないが、現状では精度が低く、その一方、確実な診断は病理学的診断によりなされるがこれは治療（手術）後の診断である、という課題がガン細胞のリンパ節

転移の診断にはあった。

- [0004] このため、ガン細胞のリンパ節転移診断では分子マーカを用いた分子診断的手法が重要であり、幾つかの手法が公知である。従来公知のそうした分子診断的手法の多くは、正常細胞には発現しないか若しくは発現量が低く、ガン細胞には多く発現するタンパク質（標的タンパク質）または該標的タンパク質をコードする遺伝子に含まれる核酸（標的核酸：DNA、mRNA、cDNAなどの総称として）を分子マーカーとして検出する方法である。具体的には、生体から切除・摘出したリンパ節組織に含まれる標的タンパク質をイムノアッセイにより検出したり、標的核酸を、LAMP法(loop-mediated isothermal amplification method)やPCR(polymerase chain reaction)法などを用いて増幅し、該増幅産物を公知の方法により検出することでガン細胞の転移の診断（判定）を行っている。
- [0005] 分子診断的手法として、たとえば、特許文献1(特開2007-175021)は、PIGR、CLDN3、LGALS4、AGR2、TAGSTD1、GPX2、RAI3、TSPAN1、CKB、ELF3、FXD3、CDH1、REG4、GDF 15、CLDN4、OLFM 4、CD9、CDH17、SELENBP、LCN2、TMPRSS4、CFTR、TM4SF3、ID1、CYP2S1、TFF3、EHF、FAT、KLF5、SLC9A3R2、HOXB9、ATP1B1、PCK1、FCGBPからなる群より選択される少なくとも1つのタンパク質をコードする遺伝子のmRNAまたはその断片を含む、大腸ガンに由来のガン細胞のリンパ節転移の有無を判定するために用いられるリンパ節転移マーカーを提案しており、特許文献2(特開2007-037421)は、NM_003404(G1592)、NM_002128(G2645)、NM_052868(G3031)、NM_005034(G3177)、NM_001540(G3753)、NM_005722(G3826)、及びNM_015315(G4370)のデータベースのアクセス番号(シリアル番号)で表される遺伝子セットの発現量を特定の判別式に代入して大腸ガンのリンパ節転移を判定するものである。また、特許文献3(特開2008-020438)は、リンパ節組織を用いて調製された検出試料中のサイトケラチンに関連するポリペプチドを定量することで高い信頼性で乳ガンなどのリンパ節転移を判定できるとしている。
- [0006] 一方、最近、炎症反応がDNAを損傷し、血管新生や細胞増殖を刺激し、アポ

トーシスを阻害するなどしてガンの発生を促進することが知られてきている。これと関連して、血清中のCRP(G-reactive protein: C反応性タンパク質)が、大腸ガン(非特許文献1:Erlinger T.P. et al., JAMA 2004;291:585-590)、食道ガン(非特許文献2:Shimada H. et al., J. Surg. Oncol. 2003;83:248-252)、肝細胞ガン(非特許文献3:Hashimoto K. et al., Cancer 2005;103:1856-1864)、腎臓ガン(非特許文献4:Miyata Y. et al., Urology 2001;58:161-164)及び卵巣ガン(非特許文献5:Hefler L.A. et al., Clin. Cancer Res. 2008;14:710-714)の危険因子及び予後因子として検討されている。

[0007] また、血清中の高CRP濃度は高いガンの罹患リスクと関係するとされている。たとえば、非特許文献6(Nozoe T. et al., Am. J. Surg. 1998;176(4):335-8)には、大腸ガン患者について肝転移やリンパ節転移が血清中CRP値の術前での上昇と関係していることが記載され、非特許文献7(Nozoe T. et al., Am. J. Surg. 2001; 182(2), 197-201)には食道ガン患者について、リンパ節転移が血清中CRP値の術前での上昇と関係していることが記載されており、また、非特許文献8(Ines G. et al., World J. Gastroenterol. 2006;12(23), 3746-3750)には食道ガン患者の血清中CRP値の高値とリンパ節転移が関係していることが記載されている。

[0008] 一方で、その遺伝子多型が血清中のCRP濃度と強く関連しているとの報告もなされている(非特許文献9:Carlson C.S. et al., Am. J. Hum. Gen. 2005; 77:64-77、非特許文献10:Szalai A.J. et al., J. Mol. Med. 2005;83:440-447)。

[0009] 上記の状況の下、本発明者らは、食道ガン患者のCRP遺伝子多型がガン進展因子となるかどうかを検討した。その結果、CRP-717T>G遺伝子多型がリンパ節転移と関係する可能性を指摘したが(非特許文献11:本山他、「日本消化器外科学会雑誌」第41巻第7号1169頁、2008年7月)、CRP-717T>G遺伝子多型によるガン細胞のリンパ節転移の判定手法は判定精度が低く、有意差をもって転移が判定できず実用に至るものではなかった。

先行技術文献

特許文献

- [0010] 特許文献1：特開2007-175021
特許文献2：特開2007-037421
特許文献3：特開2008-020438

非特許文献

- [0011] 非特許文献1：Erlinger T.P. et al., JAMA 2004;291;585-590
非特許文献2：Shimada H. et al., J. Surg. Oncol. 2003;83;248-252
非特許文献3：Hashimoto K. et al., Cancer 2005;103;1856-1864
非特許文献4：Miyata Y. et al., Urology 2001;58;161-164
非特許文献5：Hefler L.A. et al., Clin. Cancer Res. 2008;14;710-714
非特許文献6：Nozoe T. et al., Am. J. Surg. 1998;176(4):335-8
非特許文献7：Nozoe T. et al., Am. J. Surg. 2001; 182(2), 197-201
非特許文献8：Ines G. et al., World J. Gastroenterol. 2006;12(23), 3746-3750
非特許文献9：Carlson C.S. et al., Am. J. Hum. Gen. 2005;77;64-77
非特許文献10：Szalai A.J. et al., J. Mol. Med. 2005;83;440-447
非特許文献11：本山他、「日本消化器外科学会雑誌」第41巻第7号1169頁、2008年7月

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0012] 従来公知の分子診断的手法によるガン細胞のリンパ節転移判定法では、特許文献1乃至3の方法に見られるように、リンパ節転移を確実に判定しようとすると、多数の分子マーカーを判定のための因子として総合的に検討する必要性や、患者への負担が大きく、かつ試料の調製に相当な時間と労力を必要とするリンパ節を試料とする必要があった。また、CRPは、そのタンパク濃度が、年齢や喫煙、他の炎症などの影響も受けて容易に変動する上、CRP-717T>C遺伝子多型がガン細胞のリンパ節転移と関係するとした非特許文献11の結果

も後に否定されている。したがって、ガン細胞のリンパ節転移を迅速かつ確実に判定する新たな分子マーカーとそれを用いた分子診断的手法が求められている。

課題を解決するための手段

- [0013] 上述の通り、血清中の高CRP濃度は特定のCRP遺伝子多型と関連している。しかるに、本発明者らは、血清中の高CRP濃度と関連するCRP遺伝子多型がガン進展因子となり得るという従来予想からは全く想定されない、SNP識別番号rs1205（本明細書においてCRP1846C>T(rs1205)と表記することがある）遺伝子多型を分子マーカーとして用いればガンのリンパ節転移の判定精度が飛躍的に向上し、極めて有用であるという予想外の事実を見出し、本発明を完成するに至った。ここで、SNP識別番号rs1205（CRP1846C>T(rs1205)）遺伝子多型は、CRP遺伝子の非転写領域における1塩基変異である一方、血清CRP濃度の減少と相関することが報告されている遺伝子多型である。
- [0014] 本発明は、以下の判定方法及び判定キットを提供する。
- [1] ヒトC反応性タンパク質遺伝子の遺伝子多型を同定することにより、ガンのリンパ節転移またはそのリスクを判定する方法。
 - [2] SNP識別番号rs1205の遺伝子多型を同定することにより、ガンのリンパ節転移またはそのリスクを判定する前記1に記載の方法。
 - [3] SNP識別番号rs1205の遺伝子多型がT/Tタイプであるときに高リスクと判定する前記2に記載の方法。
 - [4] 遺伝子多型の同定をRFLPまたは対応する相補鎖配列との結合により行なう前記1～3のいずれかに記載の方法。
 - [5] 遺伝子多型の同定をPCR-RFLPにより行なう前記4に記載の方法。
 - [6] PCRにおけるプライマーとして Forwardプライマー：5'-CTT ATA GAC CT G GGC AGT-3'（配列番号1）、Reverseプライマー：5'-GGA GTG AGA CAT CTT CTT G-3'（配列番号2）を用い、制限酵素としてBst4CIを用いる前記5に記載の方法。
 - [7] ガンが固形ガンである前記1～6のいずれかに記載の方法。

[8] ヒトC反応性タンパク質遺伝子の塩基配列のSNP識別番号rs1205を含む領域を増幅するためのプライマーとRFLPによりSNP識別番号rs1205の遺伝子多型を判定するための制限酵素を含むガンのリンパ節転移またはそのリスクを判定するためのPCR-RFLP用迅速判定キット。

[9] プライマー対としてForwardプライマー:5'-CTT ATA GAC CTG GGC AGT-3' (配列番号1)、Reverseプライマー:5'-GGA GTG AGA CAT CTT CTT G-3' (配列番号2)を含む前記8に記載の迅速判定キット。

[10] 制限酵素Bst4CIを含む前記9に記載の迅速判定キット。

[11] ヒトC反応性タンパク質遺伝子のSNP識別番号rs1205の塩基を解析するための核酸であって、ヒトC反応性タンパク質遺伝子のSNP識別番号rs1205の塩基を含み、かつ配列番号1及び配列番号2のプライマーを用いたPCR法によって増幅され得る領域に由来するDNA断片に対して特異的にハイブリダイズする核酸。

[12] ヒトC反応性タンパク質遺伝子の遺伝子多型を同定する際に使用する試料が、全血、白血球、ガン原発巣、リンパ管、リンパ節組織からなる群より選ばれる、前記1~7に記載の方法。

発明の効果

[0015] CRPの産生は、各種のサイトカイン(インターロイキン、腫瘍壊死因子、インターフェロン、形質転換増殖因子など)と関係していることも知られているが、本発明の方法は、各種サイトカイン濃度とも関係なく、そのみでガン細胞のリンパ節転移を有効に予測・判定できる。本発明のSNP識別番号rs1205 (GRP1846C>T (rs1205)) 遺伝子多型によるガンのリンパ節転移判定法は、従来の方法に比べて簡便であるにも関わらず、極めて精度が高い。すなわち、SNP識別番号rs1205 (GRP1846C>T (rs1205)) 遺伝子多型を用いることにより、有意差をもって判定することが可能になった。ガンの進展において重要な事象であるリンパ節転移を有効に予測・判定できるため、リンパ節郭清を伴う外科手術、リンパ節郭清を伴わない内視鏡的切除、化学放射線療法、化学療法、放射線療法などの選択肢の中から、最も確実かつ最も低侵襲的な治

療法を選択可能とするものであり、治療戦略を決定する上での臨床的意味は極めて大きい。

[0016] 本発明方法は、治療前診断は画像診断に頼らざるを得ないが、現状では精度が低く、その一方、確実な診断は病理診断によりなされるがこれは治療（手術）後の診断である、という現在のガン細胞のリンパ節転移の診断が有する課題を同時に解決することができる。

[0017] またさらに、本発明の方法では、SNP識別番号rs1205（CRP1846G>T（rs1205））遺伝子多型の検出用試料として、リンパ組織（リンパ節やリンパ管）であることが必須ではなく、末梢血等を使用することができるため、患者への負担が軽減するとともに試料調製が容易になり検査者側の負担も軽減できる。

発明を実施するための形態

[0018] A. リンパ節転移またはそのリスクの判定方法

本発明で用いるCRP遺伝子はCRP(C-reactive protein: C反応性タンパク質)に対応する遺伝子である。CRPは、炎症に反応して主として肝細胞によって産生される急性期タンパク質の一種であり、従来、その血清中濃度は、様々な急性または慢性の炎症性疾患のマーカーとして用いられている。その名称は肺炎双球菌のC多糖体と沈降反応を示す血清タンパク質(β グロブリン分画に存在する)であることに由来し、感染、炎症、組織損傷などによって血中濃度が $0.2\mu\text{g/mL}$ から数百倍から千倍に激増する。CRPは、分子量が約13万で、同一サブユニット5個からなる5量体であり、そのアミノ酸配列は血清アミロイドのPタンパク質、補体C1の一部と相同性がある。

[0019] CRP遺伝子は、全塩基配列が解明されており(Woo P, Korenberg JR, Whitehead AS, J. Biol. Chem., 260:13384-13388, 1985)、例えば、NCBIのwebサイトからAccession No. NG_013007として確認することができる ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_013007.1?report=gbwithparts&log\\$=seqview&from=5000&to=7300](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_013007.1?report=gbwithparts&log$=seqview&from=5000&to=7300))（当該全配列については表A参照）。

[表A]

1 taaggcaaga gatctaggac ttctagcccc tgaactttca gccgaataca tctt
ttccaa

61 aggagtgaat tcaggccctt gtatcactgg cagcaggacg tgaccatgga gaa
gctgttg

121 tgtttcttgg tcttgaccag cctctctcat gcttttggcc agacaggtaa ggg
ccacccc

181 aggctatggg agagatttga tctgaggtat ggggggtgggg tctaagactg cat
gaacagt

241 ctcaaaaaaaaa aaaaaaaaaag actgtatgaa cagaacagtg gagcatcctt cat
ggtgtgt

301 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtggtgtgta actggagaag ggg
tcagtct

361 gtttctcaat cttaaattct atacgtaagt gaggggatag atctgtgtga tct
gagaaac

421 ctctcacatt tgcttgtttt totggctcac agacatgtcg aggaaggctt ttg
tgtttcc

481 caaagagtcg gatacttct atgtatccct caaagcaccg ttaacgaagc ctc
tcaaagc

541 cttcactgtg tgcoctcact totacacgga actgtcctcg acccgtgggt aca
gtatttt

601 ctctgatgcc accaagagac aagacaatga gattctcata ttttggctca agg
atatagg

661 atacagtttt acagtgggtg ggtctgaaat attattcgag gttcctgaag tca
cagtagc

721 tccagtacac atttgtacaa gctgggagtc cgcctcaggg atcgtggagt tct
gggtaga

781 tgggaagccc agggtgagga agagtctgaa gaagggatac actgtggggg cag
aagcaag

841 catcatcttg gggcaggagc aggattcctt cggtagggaac tttgaaggaa gcc
agtcct

901 ggtgggagac attggaaatg tgaacatgtg ggactttgtg ctgtcaccag atg
agattaa

961 caccatctat cttggcgggc ccttcagtcc taatgtcctg aactggcggg cac
tgaagta

1021 tgaagtgcaa ggogaagtgt tcaccaaacc ccagctgtgg ccctgaggcc cag
ctgtggg

1081 tctgaaggt acctccggg tttttacacc gcatgggccc cacgtctctg tct
ctggtac

1141 ctcccgcttt tttacactgc atggttccca cgtctctgtc tctgggcctt tgt
tccccta

1201 tatgcattgc aggocgtgc caccctcctc agcgcctgag aatggaggta aag
tgtctgg

1261 tctgggagct cgtaaactat gctgggaaac ggtccaaaag aatcagaatt tga
ggtgttt

1321 tgttttcatt tttatttcaa gttggacaga tcttgagat aatttcttac ctc
acataga

1381 tgagaaaact aacaccaga aaggagaaat gatgttataa aaaactcata agg
caagagc

1441 tgagaaggaa gcgctgatct tctatttaat tccccacca tgacccccag aaa
gcaggag

1501 ggcattgccc acattcacag ggctcttcag tctcagaatc aggacactgg cca
ggtgtct

1561 ggtttgggtc cagagtgtc atcatcatgt catagaactg ctgggcccag gtc
tctgaa

1621 atgggaagcc cagcaatacc acgcagtccc tccactttct caaagcacac tgg
aaaggcc

1681 attagaattg cccagcaga gcagatctgc ttttttcca gagcaaatg aag
cactagg

1741 tataaatatg ttgttactgc caagaactta aatgactggt tttgtttgc ttg
cagtgc

1801 ttottaattt tatggctctt ctgggaaact cctccccctt tccacacgaa cct
tgtgggg

1861 ctgtgaattc tttcttcac cccgcattcc caatataccc aggccacaag agt
ggacgtg

1921 aaccacaggg tgtcctgtca gaggagcca tctcccatct cccagctcc cta
tctggag

1981 gatagttgga tagttactg ttcttagcag gaccaactac agtcttcca agg
attgagt

2041 tatggacttt gggagtgaga catottottg ctgctggatt tccaagctga gag
gacgtga

2101 acctgggacc accagtagcc atottgtttg ccacatggag agagactrtg agg
acagaag

2161 ccaaactgga agtggaggag ccaagggatt gacaaacaac agagccttga cca
cgtggag

2221 tctctgaatc agccttgtct ggaaccagat ctacacctgg actgcccagg tct
ataagcc

2281 aataaagccc ctgtttactt g

[0020] 遺伝子多型とは、遺伝学的には、人口中1%以上の頻度で存在している1遺伝子における特定の塩基の変化（変異）と一般的には定義されるが、CRP遺伝子における遺伝子多型は多数知られており、本発明ではSNP識別番号rs1205の遺伝子多型（本明細書において、CRP1846C>T（rs1205）遺伝子多型と記載することがある）を好適に利用できる。SNP識別番号rs1205の遺伝子多型は、前記表Aに記載されたCRP遺伝子の塩基配列上の2148番目の塩基（rで示される塩基）における多型である。尚、rはG（グアニン）又はA（アデニン）であること

を意味する。

[0021] また、前記表Aに記載されたCRP遺伝子の塩基配列の相補的な配列において、SNP識別番号rs1205における多型周辺の配列を次の表Bに示す。

[表B]

```
1   CTTTAGTTTT TGCTCCTCAA ATTGGAATAA TGATAGAATG AGAGTACTAA AACCCCC
ACA
61  ACTGGCCCTA CATGAATGGC CAGCTATCTC AAAAGAGGGA CTGTGCTTGT CAGAGGG
AAT
121 CCCTTCAGGG GACTCTTGGA CAGGTTAAAG TGCCATGGAT ATGTTGTGTA ATGGGAA
GTG
181 TAAACTTACA GGGACTTGAT TTCAAAGGTC ATTAGAGAAG TTAGCCACAA CTTCTAA
AGC
241 AACTATCAGA AAACAGCTTG GACTCACTCA AGTAAACAGG GGCTTTATTG GCTTATA
GAC
301 CTGGGCAGTC CAGGTGTAGA TCTGGTTCCA GACAAGGCTG ATTCAGAGAC TCCACGT
GGT
361 CAAGGCTCTG TTGTTTGTCA ATCCCTTGGC TCCTCCACTT CCAGTTTGGC TTCTGTC
CTC
421 AYAGTCTCTC TCCATGTGGC AAACAAGATG GCTACTGGTG GTCCCAGGTT CACGTCC
TCT
481 CAGCTTGAA ATCCAGCAGC AAGAAGATGT CTCACTCCCA AAGTCCATAA CTCAATC
CTT
541 GGAAGACTG TAGTTGGTCC TGCTAGGAAC ACGTAACTAT CCAACTATCC TCCAGAT
AGG
601 GAGCTGGGGA GATGGGAGAT GGGCTCCTCT GACAGGACAC CCTGTGGTTC ACGTCCA
CTC
661 TTGTGGCCTG GGTATATTGG GAATGCGGGG ATGAAGAAAAG AATTCACAGC CCCACAA
GGT
```

721 TCGTGTGGAA AAGGGGAGGA GTTTCCAGA AGAGCCATAA AATTAAGAAA GCACTGC
AAG

781 CAAACAAAAA CCAGTCATTT AAGTTCTTGG CAGTAACAAC ATATTTATAC CTAGTGC
TTC

841 ATTTTGCTCT GGAAAAAAG CAGATCTGCT CTGCTGGGGC AATTCTAATG GCCTTTC
CAG

901 TGTGCTTTGA GAAAGTGGAG G

[0022] SNP識別番号rs1205は、前記表Bに記載された塩基配列上の422番目の塩基（Yで示される塩基）における多型である。尚、Yは、C（シトシン）又はT（チミン）であることを意味する。

本発明はこの塩基の型が、C/C（ワイルド）、C/T（ヘテロ）、T/T（ホモ）のいずれのタイプであるかを同定することにより、ガンのリンパ節転移又はそのリスクを判定するものである。

SNP識別番号rs1205は、米国のNCBI（National Center for Biotechnology Information）のSNPデータベース（dbSNP）に登録されているSNPの識別番号であり、rs1205で登録されているSNPの情報はNCBIのサイト（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>）から入手することができる。

[0023] SNP識別番号rs1205（CRP1846C>T（rs1205））遺伝子多型の同定は、遺伝子多型の検出が可能な公知の種々の方法によって行うことができ特に限定されるものではない。例えば、PCR（polymerase chain reaction）法を利用したPCR-RFLP（restriction fragment length polymorphism：制限酵素断片長多型）法、PCR-SSCP（single strand conformation polymorphism：単鎖高次構造多型）法（Orita, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 86, 2766-2770（1989）等）、PCR-SSO（specific sequence oligonucleotide：特異的配列オリゴヌクレオチド）法、PCR-SSO法とドットハイブリダイゼーション法を組み合わせたASO（allele specific oligonucleotide：アレル特異的オリゴヌクレオチド）ハイブリダイゼーション法（Saiki, Nature, 324, 163-166（1986）等）、又はTaq-Man-PCR法（Livak, K.J., k, Genet Anal., 14, 143（1999

), Morris, T. et al., J. Clin. Microbiol., 34, 2933 (1996))、Invader法 (Lyamichev et al., Nat Biotechnol, 17, 292 (1999))、プライマー伸長法を用いたMALDI-TOF/MS (matrix) 法 (Haff LA, Smirnov IP Genome Res, 7, 378 (1997))、RCA (rolling circle amplification) 法 (Lizardi PM et al., Nat Genet 19, 225 (1998))、DNAチップ又はマイクロアレイを用いた方法 (Wang DG et al., Science 280, 1077 (1998)等)、プライマー伸長法、サザンブロットハイブリダイゼーション法、ドットハイブリダイゼーション法 (Southern, E., J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975))等、公知の解析方法を用いることができる。さらに、当該配列部分を直接シーケンスすることにより解析してもよい。尚、これらの方法は、任意に組み合わせて用いることもできる。また、上記の方法を実施するにあたり、表A又は表Bに記載された塩基配列から適宜プライマーやプローブなどを設計することができる。

[0024] 上記同定方法の実施にあたり、被験DNAが少量の場合には、PCR法を利用したPCR-RFLP法等により同定することが検出感度ないし精度の面から好ましい。また、PCR法又はPCR法に準じた遺伝子増幅方法により被験DNAを予め増幅した後、上記いずれかの同定方法を適用することもできる。一方、多数の被験DNAについて同定する場合には、特にDNAチップやマイクロアレイを用いた方法、Invader法、TaqMan-PCR法、プライマー伸長法を用いたMALDI-TOF/MS (matrix) 法又はRCA法を用いることが好ましい。

上述した同定方法のうち、被験DNAが少量の場合に好適な方法、および多数の被験DNAについて同定する場合に好適な方法についてそれぞれ代表的な方法を例に説明する。

[0025] 被験DNAが少量の場合には好適な方法は、当業者に周知の方法で患者からDNA試料を調製し、次いで、調製したDNA試料を制限酵素により切断し、次いで、DNA断片をその大きさに応じて分離を行い、次いで、検出されたDNA断片の大きさを対照と比較する方法である。一般的には、まず、患者からDNA試料を調製し、次いで、CRP遺伝子を含むDNAを増幅する。さらに、増幅したDNAを制限酵素により切断する。次いで、DNA断片をその大きさに応じて分離し、検出

されたDNA断片の大きさを対照と比較する。

[0026] このような方法としては、例えば、制限酵素断片長多型 (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) を利用する方法やPCR-RFLP法等が挙げられる。すなわち、制限酵素の認識部位に変異が存在する場合、あるいは制限酵素処理によって生じるDNA断片内に塩基挿入または欠失がある場合、制限酵素処理後に生じる断片の大きさが対照と比較して変化する。この変異を含む部分をPCR法によって増幅し、それぞれの制限酵素で処理することによって、これらの変異を電気泳動後のバンドの移動度の差として検出することができる。あるいは、患者からDNA試料（ゲノム（染色体）DNAが使用できる）を調製し、制限酵素によって処理し、電気泳動した後、標的核酸とハイブリダイズし得るプローブDNAを用いてサザンブロットィングを行うことにより、多型（変異）の有無を検出することができる。用いられる制限酵素は、それぞれの変異に応じて適宜選択することができる。この方法では、ゲノムDNA以外にも患者から調製したRNAを逆転写酵素でcDNAに変換し、これをそのまま制限酵素で切断した後、サザンブロットィングを行うことも可能である。また、このcDNAを鋳型としてPCRでGRP遺伝子を含むDNAを増幅し、それを制限酵素で切断した後、移動度の差を調べることも可能である。

[0027] 本発明において用いるプライマーには、GRP遺伝子を含むDNAを増幅し得るものがすべて含まれる。プライマーの塩基長としては10塩基以上が好ましく、15塩基以上がさらに好ましい。また、各プライマーは、単一のオリゴヌクレオチドであってもよく、複数のオリゴヌクレオチドの混合物であってもよい。PCRにおけるプライマーの例としてForwardプライマー: 5'-CTT ATA GAC CTG GGC AGT-3'（配列番号1）、Reverseプライマー: 5'-GGA GTG AGA CAT CTT CTT G-3'（配列番号2）が挙げられる。また、制限酵素としてBst4Clが挙げられる。PCRにおけるプライマー以外の材料や条件、制限酵素の適用、電気泳動や検出などは慣用の方法と同様でよい。

[0028] 上述したサザンブロットィングの際に使用するプローブDNAは、標的核酸にハイブリダイズし得ることを条件として、特に制限されない。標的核酸にハ

イブリダイズし得るプローブDNAの例として、ヒトGRP遺伝子のSNP識別番号rs1205の塩基を解析するための核酸であって、ヒトGRP遺伝子のSNP識別番号rs1205の塩基を含み、かつ配列番号1及び配列番号2のプライマーを用いたPCR法によって増幅され得る領域に由来するDNA断片に対して特異的にハイブリダイズする核酸が挙げられる。

[0029] GRP遺伝子は、患者の血液、末梢血白血球、皮膚細胞、粘膜細胞等の細胞、肝臓、腎臓、副腎、脳、子宮等の組織、毛髪等から公知の抽出方法、精製方法を用いて取得することができる。また、本発明において解析される塩基部分を含むものであれば、全長DNA又は部分DNAの別を問わず、本発明におけるCRP遺伝子として用いることができる。換言すれば、SNP識別番号rs1205の塩基を含む限り任意の長さのDNA断片を用いることができる。

[0030] 多数の被験DNAについて同定する場合に好適な方法は、患者から調製したCRP遺伝子を含むDNA、および該DNAとハイブリダイズするヌクレオチドプローブ（上述のプローブDNAと同義）が固定された基板を用意し、次いで、該DNAと該基板を接触させた後、さらに、基板に固定されたヌクレオチドプローブにハイブリダイズしたDNA（標的核酸）を検出することにより、PCR遺伝子多型を検出する方法である。

[0031] このような方法としては、DNAチップ法（マイクロアレイ法）が例示できる。患者からのCRP遺伝子を含むDNA試料の調製は、上述と同様、当業者に周知の方法で行うことができる。該DNA試料の調製の好ましい態様においては、上述と同様、患者の血液、末梢血白血球、皮膚細胞、粘膜細胞等の細胞、肝臓、腎臓、副腎、脳、子宮等の組織、毛髪等から抽出したゲノム（染色体）DNAを基に調製することができる。ゲノム（染色体）DNAから本方法のDNA試料を調製するには、例えばCRP遺伝子を含むDNAにハイブリダイズするプライマーを用いて、ゲノム（染色体）DNAを鋳型としたPCR等によってCRP遺伝子を含むDNAを調製することも可能である。調製したDNA試料には、必要に応じて、当業者に周知の方法によって検出のための標識を施すことができる。

[0032] DNAチップ法では、ガラスなどの基盤上に多種類のプローブDNAを整列化し

、固定し、その上で標識DNAのハイブリダイゼーションを行い、プローブ上の標識（蛍光など）シグナルを検出する方法を利用して、ハイブリダイゼーションで完全マッチと一塩基ミスマッチを分別検出することで、SNP等の遺伝子多型を検出する方法である。

[0033] 以下、多数の被験DNAについて同定する場合に好適な方法の概要を列記する。

TaqMan PCR法とは、蛍光標識したアレル特異的オリゴとTaq DNAポリメラーゼによるPCR反応とを利用した方法である。

[0034] Invader法とは、SNP等の遺伝子多型のそれぞれのアレルに特異的な2種類のレポータープローブ及び1種類のインベータープローブの鋳型DNAへのハイブリダイゼーションと、DNAの構造を認識して切断するという特殊なエンドヌクレアーゼ活性を有する酵素によるDNAの切断を組み合わせた方法である。

[0035] プライマー伸長反応を利用する方法として、例えばSniPer法を採用することもできる。SniPer法とは、RCA(rolling circle amplification)法と呼ばれる手法を基本原理とするものであり、環状の一本鎖DNAを鋳型としてDNAポリメラーゼがその上を移動しながら相補鎖DNAを連続して合成していくものである。この方法によれば、DNA増幅が起こった場合に生じる発色反応の有無を測定することによってSNP等の遺伝子多型を判定できる。

[0036] MALDI-TOF/MS法とは、質量分析機（mass spectrometer）を用いた方法で、基本的には異なる一塩基の質量の違いを利用してSNPをジェノタイピングする方法である。PCR増幅を利用した方法とmultiplexを利用した方法がある。

[0037] シークエンス法とは、遺伝子多型を含む領域をPCRにて増幅させ、Dye Terminatorなどを用いてDNA配列をシークエンスすることで、SNP等の遺伝子多型（特にSNP）の頻度を解析する方法である。

[0038] 本発明の判定方法は、様々な段階で適用可能であるが、特に治療戦略の決定において有用性を有する。たとえば、深達度が粘膜下層程度の食道ガン患者においては、従来の方法ではリンパ節転移の判定が難しい。これに対し、本発明では、高精度でリンパ節転移またはそのリスクを判定できるので、不

要なリンパ節郭清などを行なってQOLを低下させることも、必要なリンパ節郭清をせずにガンの進展を放置することも回避できる。

[0039] 本発明の方法が適用できるガンの種類は特に限定されないが、固形ガンにはすべて適用可能である。具体的には原発部位が食道、肺、乳腺、頭頸部、胃、大腸、胆道、膵、子宮、卵巣、膀胱、腎、尿路上皮、前立腺のガンに適用可能である。

[0040] B. リンパ節転移またはそのリスクの迅速判定キット

当業者に周知の方法によって本発明のリンパ節転移又はそのリスクの迅速判定キットを調製することができる。キットの形態として、例えば、本発明のプライマーを用いてCRP遺伝子多型の検出を行う際に必要な各種の試薬類は、予めパッケージングしてキット化することができる。具体的には、本発明のプライマーあるいはループプライマーとして必要な各種のオリゴヌクレオチド、核酸合成の基質となる4種類のdNTP(dATP、dCTP、dGTP及びdTTP)、鎖置換活性を有する上記の鋳型依存性核酸合成酵素、酵素反応に好適な条件を与える緩衝液、補助因子としての塩類(マグネシウム塩又はマンガン塩等)、酵素や鋳型を安定化する保護剤、さらに制限酵素、及び必要に応じて反応生成物の検出に必要な試薬類がキットとして提供される。また、標的核酸とハイブリダイズし得るプローブDNAを構成試薬としてキット化してもよい。

[0041] 本明細書の各用語は、通常使用されている意味を有するが、「ガンのリンパ節転移またはそのリスクを判定する方法」において、「リンパ節」とは「リンパ節」及び「リンパ管」を総称して用いる場合や「リンパ組織」を意味する場合が含まれ、また「リンパ節転移の判定」とは、リンパ節におけるガン細胞の存在の可能性の有無・高低を判定すること、「リンパ節転移のリスクの判定」とは、ある個体がガンを罹患した場合に、原発巣からリンパ節にガン細胞が転移する可能性の有無・高低を判定することが含まれる。

実施例

[0042] 以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。なお、以下の実験・検査などを含む研究は、秋

田大学医学部倫理委員会の承認を得て行なった。また、すべての患者には事前に説明の上、同意を得て行なった。

[0043] 実施例1

この例は、胸部食道扁平上皮(細胞)癌ガン患者113名(すべて日本人)について行なった。うち38名は、病理学的診断等により食道ガンを確認した上で2007年4月から1年間の間に食道切除を行なった。残る75名は2000年~2007年の間に食道切除術を施術し、その後の経過の観察を行なった者から無作為に抽出した。疾患の分類は国際対ガン協会による腫瘍リンパ節転移(TNM)分類第6版により行なった。

[0044] 各患者から末梢血を採取し、QIAamp Blood Kit(キアゲン社製)を用いてDNAを抽出し、分析まで -80°C で保存した。本発明の実施例であるCRP1846C>T(rs1205)のほか、CRP多型としては、CRP-717C>T(rs2794521)、CRP1059G>C(rs1800947)、CRP1444C>T(rs1130864)を、腫瘍壊死因子としてはTNF- α -238G>A、TNF- α -308G>A、TNF- α -1031T>C、TNF- β 250G>A、さらに、INF- γ 874A>T、TGF- β 1 29T>C、IL-1 β -31C>T、IL-1 β -511C>T、IL-1受容体アンタゴニスト、IL-2-330T>G、IL-4-590C>T、IL-6-634G>C、IL-6受容体48892A>C、IL-10-592A>C及びIL-12 β -1188A>Cの18種類の遺伝子多型についてもガンのリンパ節転移との関係を検討した。

[0045] 標的核酸増幅のためのPCRは、抽出したDNAを 95°C で15分間熱変性を行い、 95°C で30秒、 56°C で30秒、 72°C で30秒の反応を35サイクル行った後、 72°C で5分間加熱して行った。CRP1846C>T(rs1205)遺伝子多型増幅用のプライマーとしては、Forwardプライマー:5'-CTT ATA GAC CTG GGC AGT-3' (配列番号1)、Reverseプライマー:5'-GGA GTG AGA CAT CTT CTT G-3' (配列番号2)を用いた。この上述操作による得られたPCR増幅産物にBst4CIを添加し、 65°C で8時間インキュベートし、電気泳動にてRFLPを行なった。

対照として秋田大学病院内においてガン以外の疾病で処置を受けている139名(すべて日本人)のCRP多型(CRP1846C>T(rs1205)遺伝子多型及び上述の3種類の遺伝子多型の計4種類)も調べた。

多型の出現頻度は、ハーディ・ワインベルグ平衡にあると考えた場合と矛盾しない。また、国立がんセンターにおけるSNP500データベースとも同様の結果であった。

- [0046] 調べた113名の食道ガン患者のうち、62名(55%)はリンパ節転移をしており、51名(45%)ではリンパ節転移がなかった。病理学的にリンパ節転移が確認された患者においては、リンパ節転移がない患者に対して有意に($P < 0.05$)ガンの深達度が高かったが、年齢、性別、術前の栄養状態、腫瘍マーカー、腫瘍部位及び腫瘍の大きさ、扁平上皮細胞及び壁内転移とリンパ節転移の有無との間に有意の相関はなかった。(表1「リンパ節転移を伴う患者又は伴わない患者の臨床的特徴」参照)

[表1]

リンパ節転移を伴う患者又は伴わない患者の臨床的特徴

	リンパ節転移		P
	陰性 (N = 51)	陽性 (N = 62)	
年齢 (年)	65 ± 8	63 ± 8	0.106
性別			
男性	47	52	
女性	4	10	0.2538
ヘモグロビン (g/dL)	13.6 ± 1.5	13.7 ± 1.5	0.7718
アルブミン (g/L)	43 ± 3	43 ± 3	0.4647
SCC (ng/mL)	1.1 ± 2.9	1.1 ± 1.5	0.8970
CEA (ng/mL)	3.5 ± 2.1	4.3 ± 2.8	0.1022
術前血清中 CRP (mg/L)	4.0 ± 8.3	4.7 ± 8.1	0.6514
腫瘍部位			
上部3分の1	2	5	
中部3分の1	31	31	
下部3分の1	28	26	0.4305
腫瘍サイズ (mm)	49 ± 29	54 ± 25	0.3725
腫瘍浸潤の 深達度 (pT)			
T1	27	14	
T2	4	11	
T3	18	31	
T4	2	6	0.0078*
腫瘍分化度			
高い - 中程度	41	48	
低い	10	14	0.8184
リンパ管侵襲			
陽性	45	62	
陰性	6	0	0.0071*
静脈侵襲			
陽性	34	55	
陰性	17	7	
壁内転移			
陽性	4	8	
陰性	47	54	0.5422
関与するリンパ節の数	0	3.9 ± 4.9	<0.001*

SCC: 扁平上皮癌抗原, CEA: 癌胎児抗原, CRP: C反応性タンパク質

* 有意な差

[0047] 各種遺伝子多型と病理学的に確認されたリンパ節転移との関連を解析した結果、本発明の実施例であるCRP1846C>T(rs1205)遺伝子多型のみがリンパ節転移と有意に関連した(Fisherの正確検定, $P=0.0043$)。すなわちCRP1846C>T(rs1205)遺伝子多型においてC/CおよびC/T遺伝子タイプ患者でリンパ節転移を認めたのは25例、転移を認めなかったのは35例であるのに対し、T/T遺伝子タイプ患者ではリンパ節転移を認めたのは37例、転移を認めなかったのは16例であった。(表2「CRP遺伝子多型とリンパ節転移の相関」参照)

[表2]

CRP遺伝型とリンパ節転移の相関

CRP 遺伝型	リンパ節転移		P
	陰性 (N = 51)	陽性 (N = 62)	
CRP -717T/C (rs2794521) 遺伝型			
T/T	35	50	
T/C	15	12	
C/C	1	0	0.2302
T/T	35	50	
T/C + C/C	16	12	0.1891
CRP 1059G/C (rs1800947) 遺伝型			
G/G	48	58	
G/C	3	4	>0.9999
CRP 1444C/T (rs1130864) 遺伝型			
C/C	49	56	
C/T	1	6	
T/T	1	0	0.1350
C/C	49	56	
C/T + T/T	2	6	0.2906
CRP 1846C/T (rs1205) 遺伝型			
C/C	6	7	
C/T	29	18	
T/T	16	37	0.0068*
C/C + C/T	35	25	
T/T	16	37	0.0043*

* 有意な差

[0048] これに対し、CRP1059G>C(rs1800947)遺伝子多型では、G/G遺伝子タイプ患

者でリンパ節転移を認めたのは58例、転移を認めなかったのは48例であるのに対し、G/C遺伝子タイプ患者ではリンパ節転移を認めたのは4例、転移を認めなかったのは3例であった。また、非特許文献11(本山他、「日本消化器外科学会雑誌」第41巻第7号1169頁、2008年7月)で検討したGRP-717T>C(rs2794521)遺伝子多型では、GRP-717T/CおよびG/C遺伝子タイプ患者でリンパ節転移を認めたのは12例、転移を認めなかったのは16例であり、GRP1444C>T(rs1130864)遺伝子多型では、GRP1444C/G遺伝子タイプ患者でリンパ節転移を認めたのは56例、転移を認めなかったのは49例であった。(表2「GRP遺伝子多型とリンパ節転移の相関」参照)

[0049] また、GRP1846C>T(rs1205)遺伝子多型とリンパ節転移に関する様々な臨床因子を共変量として多変量ロジスティック解析を行った結果、患者のGRP1846(rs1205)遺伝子多型がT/Tタイプであればオッズ比3以上でリンパ節転移を伴うことが判明した。これに対し、術前血清中GRP、血清中SCC、腫瘍サイズ、年齢における同様の解析の結果は、それぞれオッズ比1前後であった。また、腫瘍の深達度での比較(T2~4対T1)ではオッズ比2.571でリンパ節転移を伴っていた。(表3「リンパ節転移の多変量ロジスティック回帰分析」参照)

[表3]

リンパ節転移の多変量ロジスティック回帰分析

	β	ワルド χ^2	P	オッズ比	95%信頼区間
GRP1846C/T(rs1205)遺伝型 (T/T 対 C/C+C/T)	1.112	5.615	0.0178	3.040	1.212-7.625
術前血清中GRP	-0.107	0.078	0.7799	0.898	0.423-1.907
血清中SCC	0.070	0.252	0.6160	1.072	0.816-1.409
腫瘍部位(上部対中部-下部)	0.608	0.297	0.5855	1.836	0.207-16.312
腫瘍サイズ	-0.005	0.209	0.6472	0.995	0.975-1.016
腫瘍浸潤の深達度 (T2-4 対 T1)	0.944	2.700	0.1004	2.571	0.833-7.929
腫瘍分化度(高い-中程度対低い)	-0.496	0.710	0.3995	0.609	0.192-1.930
静脈侵襲(陽性対陰性)	1.131	2.680	0.1016	3.099	0.800-12.003
壁内転移(陽性対陰性)	0.219	0.085	0.7705	1.245	0.285-5.439
年齢	-0.049	2.246	0.1340	0.952	0.893-1.015
性別(男性対女性)	-0.821	1.278	0.2582	0.440	0.106-1.826

尤度比 χ^2 検定, $\chi^2 = 23.241$ (df = 11), $P = 0.0163$

さらに、術前血清中GRP濃度(mg/L)については、0~5mg/Lは、GRP1846C>T(rs1205)遺伝子多型においてC/CおよびC/T遺伝子タイプ患者では43例、T/T遺伝子タイプ患者でも43例であり、5mg/L超は、GRP1846C>T(rs1205)遺伝子多型においてC/CおよびC/T遺伝子タイプ患者では16例、T/T遺伝子タイプ患者で

は8例であった。(表4「CRP1846C/T (rs1205) 遺伝子型と術前血清CRPレベル、腫瘍浸潤の深達度、及び関与するリンパ節の数との相関」参照)

[表4]

CRP 1846C/T (rs1205) 遺伝子型と術前血清中CRPレベル、腫瘍浸潤の深達度、及び関与するリンパ節の数との相関

	CRP 1846C/T (rs1205) 遺伝子型			P	CRP 1846C/T (rs1205) 遺伝子型		P
	C/C (N = 13)	C/T (N = 47)	T/T (N = 53)		C/C + C/T (N = 60)	T/T (N = 53)	
術前血清中CRP (mg/L) ^a	5.7 ± 5.8	4.6 ± 10.6	3.8 ± 6.0	0.737	4.8 ± 9.7	3.8 ± 6.0	0.0537
0-5 mg/L	6	37	43		43	43	
>5 mg/L	7	9	8	0.0107*	16	8	0.1706
腫瘍浸潤の深達度 (pT)							
T1	2	24	15		26	15	
T2-4	11	23	38	0.0153 ^b	34	38	0.1184
関与するリンパ節の数	1.4 ± 1.9	1.8 ± 3.7	2.7 ± 4.9	0.4605	1.7 ± 3.7	2.7 ± 4.9	0.2284
0-2	11	39	35		50	35	
>3	2	8	18	0.1038	10	18	0.0487*

^a 術前血清中CRPレベルは、C/T遺伝子型群における1患者又はT/T遺伝子型群における2患者において測定されなかった。

[0050] 対象をリンパ節転移診断が特に難しく、また治療前のリンパ節転移の有無が治療法を大きく左右する粘膜下層食道癌患者(33例)に限定した場合、その診断能は極めて高かった。最新鋭の画像診断装置(CT及び超音波断層法)を用いたリンパ節転移診断の感度が50%、特異度が79%、陽性予測値が54%、陰性予測値が68%であるのに対し、CRP1846C>T(rs1205)遺伝子多型を用いた診断では感度が64%、特異度が79%、陽性予測値が69%、陰性予測値が75%とより良好であった(表5「CRP1846C>T(rs1205)遺伝子多型又は通常の方法(CT及び超音波断層法)を用いた場合の粘膜下層食道癌におけるリンパ節の関与の予測」参照)。

[表5]

CRP 1846C>T (rs1205) 多型又は通常の方法(CT及び超音波断層法)を用いた場合の粘膜下層食道癌におけるリンパ節の関与の予測

	感度 (%)	特異度 (%)	陽性予測値 (%)	陰性予測値 (%)
CRP 1846C>T (rs1205) 多型	64	79	69	75
通常の方法	50	79	54	68

[0051] 実施例2

同様に152例の肺癌手術患者(すべて日本人)に関してCRP1846C>T(rs1205)遺伝子多型と病理学的リンパ節転移の関連を検討した結果、食道癌同様に有意な関連を認めた(Fisherの正確検定, P=0.0312)。

[0052] 以上の結果に示されるように、本発明によれば、高精度にリンパ節転移またはそのリスクの判定ができる。また、CRP1846C>T (rs1205) 遺伝子多型によれば、CRPの産生に関与する多数のサイトカインの多型と比較して顕著に高精度でリンパ節転移またはそのリスクの判定が可能である。

[0053] 実施例3

実施例1の患者113名中、壁深達度がpT1-2である64名についてCRP1846C>T (rs1205) 遺伝子多型とリンパ節転移との関係を解析した。CRP1846C>T (rs1205) 遺伝子多型においてC/CおよびC/T遺伝子タイプ患者でリンパ節転移を認めめたのは6例、転移を認めなかったのは35例であるのに対し、T/T遺伝子タイプ患者ではリンパ節転移を認めめたのは18例、転移を認めなかったのは5例であり、CRP1846C>T (rs1205) 遺伝子多型とリンパ節転移とは有意に関連した (Fisherの正確検定, $P=0.0001$)。このように本発明方法では、従来の画像診断方法では見落とされる可能性が考えられる、より早期の癌においても確実にリンパ節転移を判定することができるため、臨床の要求に応え得ることが確認された。

[0054] 実施例4

実施例2の患者152名中、リンパ管侵襲に関する所見記載のあった144名についてCRP1846C>T (rs1205) 遺伝子多型とリンパ管侵襲との関係を解析した。CRP1846 (rs1205) 遺伝子多型においてC/CおよびC/T遺伝子タイプ患者でリンパ管侵襲を認めめたのは36例、リンパ管侵襲を認めなかったのは42例であるのに対し、T/T遺伝子タイプ患者ではリンパ管侵襲を認めめたのは45例、リンパ管侵襲を認めなかったのは21例であり、CRP1846C>T (rs1205) 遺伝子多型とリンパ管侵襲とは有意に関連した (Fisherの正確検定, $P=0.008$)。「リンパ管侵襲」は原発部位のリンパ管にガン細胞の存在が観察された状態を指し、現に「リンパ節転移」がない場合でも、将来の「リンパ節転移」の可能性を示唆している。従って、「リンパ節転移」のリスク判定 (より早期の予知) にCRP1846C>T (rs1205) 遺伝子多型の同定は有用である。

請求の範囲

- [請求項1] ヒトC反応性タンパク質遺伝子の遺伝子多型を同定することにより、ガンのリンパ節転移またはそのリスクを判定する方法。
- [請求項2] SNP識別番号rs1205の遺伝子多型を同定することにより、ガンのリンパ節転移またはそのリスクを判定する請求項1に記載の方法。
- [請求項3] SNP識別番号rs1205の遺伝子多型がT/Tタイプであるときに高リスクと判定する請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 遺伝子多型の同定をRFLPまたは対応する相補鎖配列との結合により行なう請求項1～3のいずれかに記載の方法。
- [請求項5] 遺伝子多型の同定をPCR-RFLPにより行なう請求項4に記載の方法。
- [請求項6] PCRにおけるプライマーとして Forwardプライマー:5'-CTT ATA GAC C TG GGC AGT-3' (配列番号1)、Reverseプライマー:5'-GGA GTG AGA CAT CTT CTT G-3' (配列番号2)を用い、制限酵素としてBst4Clを用いる請求項5に記載の方法。
- [請求項7] ガンが固形ガンである請求項1～6のいずれかに記載の方法。
- [請求項8] ヒトC反応性タンパク質遺伝子の塩基配列のSNP識別番号rs1205を含む領域を増幅するためのプライマーとRFLPによりSNP識別番号rs1205の遺伝子多型を判定するための制限酵素を含むガンのリンパ節転移またはそのリスクを判定するためのPCR-RFLP用迅速判定キット。
- [請求項9] プライマー対としてForwardプライマー:5'-CTT ATA GAC CTG GGC AGT-3' (配列番号1)、Reverseプライマー:5'-GGA GTG AGA CAT CTT CTT G-3' (配列番号2)を含む請求項8に記載の迅速判定キット。
- [請求項10] 制限酵素Bst4Clを含む請求項9に記載の迅速判定キット。
- [請求項11] ヒトC反応性タンパク質遺伝子のSNP識別番号rs1205の塩基を解析するための核酸であって、ヒトC反応性タンパク質遺伝子のSNP識別番号rs1205の塩基を含み、かつ配列番号1及び配列番号2のプライマーを用いたPCR法によって増幅され得る領域に由来するDNA断片に対して特異的にハイブリダイズする核酸。

[請求項12] ヒトC反応性タンパク質遺伝子の遺伝子多型を同定する際に使用する試料が、全血、白血球、ガン原発巣、リンパ管、リンパ節組織からなる群より選ばれる、請求項1～7に記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/059049

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/34(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53
(2006.01)n

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)

C12N15/09, C12Q1/34, C12Q1/68, G01N33/53

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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/A	Satoru MOTOYAMA et al., "Shokudogan Kanja no CRP Idenshi Tagata wa Shokudogan Shinten Inshi to naru", Japanese Journal of Gastroenterological Surgery, vol.41, no.7, 01 July 2008 (01.07.2008), page 1169 (O-1-134)	1, 4, 5, 7, 11, 12/2, 3, 6, 8-10
Y/A	GOCKEL, I., et al., Significance of preoperative C-reactive protein as a parameter of the perioperative course and long-term prognosis in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the oesophagus., World J. Gastroenterol., 2006, vol.12, no.23, p.3746-3750	1, 4, 5, 7, 11, 12/2, 3, 6, 8-10

 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
09 August, 2010 (09.08.10)Date of mailing of the international search report
17 August, 2010 (17.08.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/059049

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	CARLSON, C.S., et al., Polymorphisms within the C-reactive protein (CRP) promoter region are associated with plasma CRP levels., Am. J. Hum. Genet., 2005, vol.77, no.1, p.64-77	1, 4, 5, 7, 11, 12/2, 3, 6, 8-10
Y/A	SZALAI, A.J., et al., Single-nucleotide polymorphisms in the C-reactive protein (CRP) gene promoter that affect transcription factor binding, alter transcriptional activity, and associate with differences in baseline serum CRP level., J. Mol. Med., 2005, vol.83, no.6, p.440-447	1, 4, 5, 7, 11, 12/2, 3, 6, 8-10
P,X	MOTOYAMA, S., et al., CRP genetic polymorphism is associated with lymph node metastasis in thoracic esophageal squamous cell cancer., Ann. Surg. Oncol., 2009.09, vol.16, no.9, p.2479-2485	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/34(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)n

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. C12N15/09, C12Q1/34, C12Q1/68, G01N33/53

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 1971-2010年
 日本国実用新案登録公報 1996-2010年
 日本国登録実用新案公報 1994-2010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/A	本山悟, 他, 食道癌患者のCRP遺伝子多型は食道癌進展因子となる., 日本消化器外科学会雑誌, vol.41, no.7, 2008.07.01, p.1169(0-1-134)	1,4,5,7,11,12 / 2,3,6,8-10
Y/A	GOCKEL, I., et al., Significance of preoperative C-reactive protein as a parameter of the perioperative course and long-term prognosis in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the oesophagus., World J. Gastroenterol., 2006, vol.12, no.23, p.3746-3750	1,4,5,7,11,12 / 2,3,6,8-10

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。

* 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
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 09.08.2010	国際調査報告の発送日 17.08.2010
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) 小暮 道明 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/A	CARLSON, C.S., et al., Polymorphisms within the C-reactive protein (CRP) promoter region are associated with plasma CRP levels., Am. J. Hum. Genet., 2005, vol.77, no.1, p.64-77	1、4、5、7、11、12 /2、3、6、8-10
Y/A	SZALAI, A.J., et al., Single-nucleotide polymorphisms in the C-reactive protein (CRP) gene promoter that affect transcription factor binding, alter transcriptional activity, and associate with differences in baseline serum CRP level., J. Mol. Med., 2005, vol.83, no.6, p.440-447	1、4、5、7、11、12 /2、3、6、8-10
P, X	MOTOYAMA, S., et al., CRP genetic polymorphism is associated with lymph node metastasis in thoracic esophageal squamous cell cancer., Ann. Surg. Oncol., 2009.09, vol.16, no.9, p.2479-2485	1-12