

(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  
2011年10月6日(06.10.2011)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 2011/122021 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/001905
- (22) 国際出願日: 2011年3月30日(30.03.2011)
- (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 2010-079801 2010年3月30日(30.03.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人山口大学(YAMAGUCHI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7538511 山口県山口市吉田 1 6 7 7-1 Yamaguchi (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 恒富 亮一 (TSUNEDOMI, Ryouichi) [JP/JP]; 〒7558505 山口県宇部市南小串 1 丁目 1-1 国立大学法人山口大学医学部内 Yamaguchi (JP). 岡 正朗 (OKA, Masaaki) [JP/JP]; 〒7558505 山口県宇部市南小串 1 丁目 1-1 国立大学法人山口大学医学部内 Yamaguchi (JP). 飯塚 徳男 (IIZUKA, Norio) [JP/JP]; 〒7558505 山口県宇部市南小串 1 丁目 1-1 国立大学法人山口大学医学部内 Yamaguchi (JP).
- (74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号若林ビル 3 階 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, RS, 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: MARKER FOR PREDICTION OF RECURRENCE OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA

(54) 発明の名称: 肝細胞癌の再発予測用マーカー

(57) Abstract: Disclosed is a marker for the onset or recurrence of hepatocellular carcinoma (HCC), said marker specifying the methylated region of genomic DNA involved in the onset and recurrence of HCC, and making detection possible using a simplified process. Genomic DNA is extracted from liver tissue collected from a HCC patient infected with the hepatitis C virus, and the methylation rate of the transcriptional regulatory region of the ABCB6 gene is detected. The risk of HCC recurrence is estimated using as an index the inverse correlation between the amount of methylation of the cytosine in the transcriptional regulatory region of a non-tumorous part of the tissue and the risk of HCC recurrence, and the positive correlation between the amount of methylation of the cytosine in the transcriptional regulatory region of a tumorous part of the tissue and the risk of HCC recurrence. Furthermore, the methylation rate in the transcriptional regulatory region of the ABCB6 gene in the liver tissue is detected and HCC is diagnosed.

(57) 要約: 肝細胞癌の発症又は再発に関与するゲノムDNAのメチル化領域を特定し、より簡単な操作で検出することが可能な、HCCの発症又は再発のマーカーを提供することを課題とした。解決手段として、C型肝炎ウイルスに感染している肝細胞癌患者より採取された肝臓組織からゲノムDNAを抽出してABCB6遺伝子の転写制御領域メチル化率を検出し、非癌部においては上記転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度と、肝細胞癌の再発リスクとが逆の相関関係にあること、癌部においては上記転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度と、肝細胞癌の再発リスクとが正の相関関係にあることを指標として肝細胞癌の再発リスクを予測する。また、肝臓組織におけるABCB6遺伝子の転写制御領域メチル化率を検出し、肝細胞癌を診断する。

WO 2011/122021 A1

## 明 細 書

**発明の名称**：肝細胞癌の再発予測用マーカー

### 技術分野

[0001] 本発明は、肝細胞癌の発症又は再発リスクを予測する方法や、肝細胞癌の発症又は再発リスクを予測するためのキットに関する。

### 背景技術

[0002] 肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma ; 以下、「HCC」ということもある) は、世界中で最も頻出の高い固形癌のひとつであり、癌による死亡原因の中で三番目である (非特許文献1)。HCCは、その殆どがウイルス感染に起因する慢性肝炎や、慢性肝炎から進行した肝硬変を背景として発症することが知られており、HCC患者の中で、C型肝炎ウイルス (HCV) に陽性である人の割合は約70%、B型肝炎ウイルス (HBV) に陽性である人の割合は約20%にのぼる (非特許文献2)。これらの肝炎ウイルスがHCCを引き起こすメカニズムの詳細は明らかにされていないが、ウイルスの持続感染が慢性肝炎や肝硬変等を引き起こす過程で、肝細胞の癌化が起こると考えられている。

[0003] 現在のところ、HCC治療法としては外科的な摘除手術が有効であるとされているが、術後の再発率はきわめて高く、予後不良であることが知られている (非特許文献3)。癌部切除後の残肝におけるHCCの再発は、初発HCCと同様のメカニズムであると考えられるが、その詳細については不明である (非特許文献4)。以上のように、HCCの治療には、高い再発の危険性が伴っており、外科手術後の再発を予測するためのバイオマーカーの開発は、HCC患者のQOL (quality of life) の観点から非常に重要である。

[0004] 最近、マイクロアレイ解析等の網羅的解析方法を用いて、癌細胞における遺伝子発現解析が盛んに行われ、癌と関わりのある遺伝子が多数同定されており、HCCについても、HCC特異的な遺伝子発現プロファイルの解析結果に基づいて、様々な早期検出・分類・予後予測方法が開発されている (特

許文献 1 及び非特許文献 5～10)。しかし、これらの早期検出・分類・予後予測方法は、いずれも mRNA の発現を指標としたものであり、RNA の不安定性から実際に臨床に応用するのは困難であると考えられている。また、上記の従来技術においては、非常に多数の遺伝子発現を組み合わせる指標としているため、複雑な計算式を用いて診断する必要がある。このため、より簡単な操作で検出が可能な、DNA を用いたマーカーの開発が求められている。

- [0005] ATP-binding cassette トランスポーター (ABC トランスポーター) は、物質の ATP に依存する細胞外輸送に関与するタンパク質である。特許文献 2 は、ABC B 6 遺伝子発現と他の遺伝子発現とを組み合わせる HCC の予後判定方法を開示している。また、特許文献 3 は、ABC トランスポーター及び BCL 1 2 ファミリー遺伝子の増加を指標とする癌の薬剤耐性検出方法を開示している。しかし、ABC トランスポーター遺伝子のメチル化と癌との関連についてはこれまで知られていない。

### 先行技術文献

#### 特許文献

- [0006] 特許文献 1 : 国際公開第 2005/017150 号パンフレット  
特許文献 2 : 特表 2009-517064 号公報  
特許文献 3 : US 2009/0143236 号公報

#### 非特許文献

- [0007] 非特許文献 1 : Bosch FX. et al., *Semin Liver Dis* 19, 271-85 (1999)  
非特許文献 2 : Kiyosawa K. et al., *Gastroenterology* 127, S17-26 (2004)  
非特許文献 3 : Makuuchi M. et al., *Hepatogastroenterology* 45, S1267-1274 (1998)  
非特許文献 4 : Poon RT. et al., *Cancer* 89, 500-507 (2000)  
非特許文献 5 : Chen et al., *Mol Biol Cell*. 13(6): 1929-1939 (2002)  
非特許文献 6 : Qin et al., *J Cancer Res Clin Oncol*. 130(9): 497-513 (2004)

非特許文献7: Ye et al., Nat Med. Apr, 9(4): 416-23 (2003)

非特許文献8: Kurokawa et al., J Hepatol. 41(2): 284-291 (2004)

非特許文献9: Lizuka et al., Lancet. 15, 361(9361): 923-929 (2003)

非特許文献10: Lee et al., Hepatology. 40(3): 667-76 (2004)

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明の課題は、肝細胞癌（HCC）の発症又は再発に關与するゲノムDNAのメチル化領域を特定し、より簡単な操作で検出することが可能な、HCCの発症又は再発のマーカーを提供することにある。

### 課題を解決するための手段

- [0009] 本発明者らは、HCC患者より切除された癌部及び／又は非癌部肝臓組織における遺伝子発現を網羅的に解析し、1年以内に再発が認められた患者由来の肝臓組織（再発有り肝臓組織）におけるABC B6 mRNA発現量が、1年以内に再発が認められた患者由来の肝臓組織（再発無し肝臓組織）と比較して有意に高いことを見出した（図9）。一般的に遺伝子発現は、プロモータ領域のDNAメチル化により抑制されることが知られていることから、発明者らは、再発有り肝臓組織におけるABC B6遺伝子の発現の増加に、プロモータ領域の低メチル化が関与している可能性があると考え、ABC B6遺伝子に関するメチル化解析を行った。本発明者らは、ABC B6遺伝子近傍のDNA配列を解析してABC B6遺伝子のプロモータ領域にCpGアイランドの存在することを明らかにし、該CpGアイランドにおけるメチル化率を調べた。また、非癌部においてはABC B6 mRNA発現とメチル化率との相関は見られなかったが、癌部においてはmRNA発現とメチル化率との間に逆相関関係が見られた（図4）。しかしながら、再発の有無に基づいて解析を行った結果は予想外なことに、C型肝炎ウイルスキャリア由来の再発有り肝臓組織の癌部においてはメチル化率が高いことが明らかとなった。さらに、該CpGアイランドのメチル化率は、C型肝炎ウイルスキャリア由来の再発無し肝臓組織の非癌部においては低いこと、B型肝炎ウイルス

キャリア由来の肝臓組織においては癌部及び非癌部のいずれのメチル化率も、再発の有無との関連が認められないことを見出し、本発明を完成するに至った。

[0010] すなわち、本発明は（１）（ａ）被検者より採取された肝臓組織からゲノムDNAを抽出する工程；（ｂ）上記ゲノムDNAのABC B6遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出する工程；（ｃ）上記転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度と、肝細胞癌の発症リスクとが正の相関関係にあることを指標として前記被検者における肝細胞癌の発症リスクを予測する工程；の工程（ａ）～（ｃ）を順次備えることを特徴とする肝細胞癌の発症リスクを予測する方法や、（２）（ａ）C型肝炎ウイルスに感染している肝細胞癌患者より採取された非癌部肝臓組織からゲノムDNAを抽出する工程；（ｂ）上記ゲノムDNAのABC B6遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出する工程；（ｃ）上記転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度と、肝細胞癌の再発リスクとが逆の相関関係にあることを指標として前記肝細胞癌患者における肝細胞癌の再発リスクを予測する工程；の工程（ａ）～（ｃ）を順次備えることを特徴とする肝細胞癌の再発リスクを予測する方法や、（３）（ａ）C型肝炎ウイルスに感染している肝細胞癌患者より採取された癌部肝臓組織からゲノムDNAを抽出する工程；（ｂ）上記ゲノムDNAのABC B6遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出する工程；（ｃ）上記転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度と、肝細胞癌の再発リスクとが正の相関関係にあることを指標として前記肝細胞癌患者における再発リスクを予測する工程；の工程（ａ）～（ｃ）を順次備えることを特徴とする肝細胞癌の再発リスクを予測する方法や、（４）転写制御領域が、ABC B6遺伝子の転写開始点より上流の-723bpから、下流の+500bpまでの領域であることを特徴とする上記（１）～（３）のいずれかに記載の方法や、（５）転写制御領域が、（i）ABC B6遺伝子の転写開始点より下流の+183bpから+309bpまでのMSP1領域；（ii）ABC B6遺伝

子の転写開始点より上流の-50bpから下流の+71bpまでのMSP2領域；(iii) ABCB6遺伝子の転写開始点より上流の-50bpから下流の+57bpまでのMSP3領域；(iv) ABCB6遺伝子の転写開始点より上流の-268bpから-173bpまでのMSP4領域；(v) ABCB6遺伝子の転写開始点より上流の-433bpから-330bpまでのMSP5領域；の(i)～(v)から選択される1以上の領域であることを特徴とする上記(1)～(4)のいずれかに記載の方法や、(6)(i)配列番号5及び6に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号7に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ；(ii)配列番号8及び9に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号10に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ；(iii)配列番号11及び12に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号13に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ；(iv)配列番号14及び15に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号16に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ；(v)配列番号17及び18に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号19に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ；の(i)～(v)から選択される1以上のプライマーセットとプローブとの組合せを用いて、ABCB6遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出することを特徴とする上記(1)～(5)のいずれかに記載の方法や、(7) ABCB6遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出するためのプライマーセットとプローブとを備えることを特徴とする肝細胞癌の発症リスク予測用のキットや、(8) ABCB6遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出するためのプライマーセットとプローブとを備えることを特徴とする肝細胞癌の再発リスク予測用のキットや、(9) プライマーセットとプローブとが、(i) 配列番号5及び6に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号7に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ；(ii) 配列番号8及び9に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号10に示

される塩基配列を含むプローブとの組合せ；(iii) 配列番号 11 及び 12 に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号 13 に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ；(iv) 配列番号 14 及び 15 に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号 16 に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ；(v) 配列番号 17 及び 18 に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号 19 に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ；の (i) ~ (v) から選択される 1 以上のプライマーセットとプローブとの組合せであることを特徴とする上記 (7) 又は (8) のいずれかに記載のキットに関する。

### 発明の効果

[0011] 本発明によると、C型肝炎ウイルスキャリアのHCC患者より採取された肝臓組織を用いて、HCCの再発リスクを予測することが可能となり、術後の治療方針を決定する上で有用な情報を提供することができる。また、本発明によると、C型肝炎ウイルスキャリアの被検者より採取された肝臓組織を用いて、HCC発症リスクを予測することができ、該被検者におけるHCCの予防及び早期発見のために有用な情報を提供することができる。

### 図面の簡単な説明

[0012] [図1] ABCB6 遺伝子の転写制御領域における、CpGアイランド領域、及びCpG配列の位置を示す図である。

[図2] 6種の肝癌細胞株（HLE、SK-HEP-1、Hep 3B、HuH-6、HuH-7、Hep G2）におけるABCB6 遺伝子の転写制御領域のメチル化の程度について調べた結果を示す図である。細胞株名下の括弧表記は、脱メチル化剤処理による発現上昇の程度である。

[図3] ABCB6 遺伝子の転写制御領域における、5箇所のメチル化解析領域（MSP 1～5）の位置を示す図である。

[図4] 癌患者から採取した肝臓組織におけるABCB6 遺伝子mRNA発現量、及びABCB6 遺伝子の転写制御領域におけるメチル化率を解析した結果を示す図である。

[図5] 癌患者から採取した肝臓組織における ABCB6 遺伝子 mRNA 発現量（左側）、又は ABCB6 遺伝子転写制御領域の DNA メチル化率（右側）を指標とした、癌の 1 年以内の再発予測診断能について Receiver operating characteristic (ROC) 曲線解析の結果を示す図である。mRNA 発現量については、非癌部肝臓組織における発現量を基準として、癌部肝臓組織における発現量を示した。また、メチル化率については、MSP5 に対する MSP2 及び MSP3 のメチル化率の比を求め、非癌部肝臓組織におけるメチル化率と癌部肝臓組織におけるメチル化率の差を示した。

[図6] 非癌部肝臓組織における、ABCB6 遺伝子転写制御領域の DNA メチル化率を指標とした 1 年以内の再発予測診断能についての Receiver operating characteristic (ROC) 曲線における Area Under the Curve (AUC) の比較を示す図である。

[図7] 癌部肝臓組織における、ABCB6 遺伝子転写制御領域の DNA メチル化率を指標とした 1 年以内の再発予測診断能についての Receiver operating characteristic (ROC) 曲線における Area Under the Curve (AUC) の比較を示す図である。

[図8] 非癌部肝臓組織及び癌部肝臓組織における、ABCB6 遺伝子 mRNA 発現量またはメチル化率の組合せを指標とした 1 年以内の再発予測診断能についての Receiver operating characteristic (ROC) 曲線における Area Under the Curve (AUC) の比較を示す図である。

[図9] 癌患者から採取した肝臓組織における ABCB6 遺伝子 mRNA 発現量（上段）、又は ABCB6 遺伝子転写制御領域の DNA メチル化率（下段）を、再発無しの群と、再発有りの群でそれぞれ解析した結果を示す図である。メチル化率は、MSP5 に対する MSP2 及び MSP3 のメチル化率の比を求めて示した。箱ひげ図 (box and whiskers plot) の箱の中の線は中央値 (median) を表す。

[図10] 癌患者から採取した肝臓組織における ABCB6 遺伝子 mRNA 発現量、又は ABCB6 遺伝子転写制御領域の DNA メチル化率を、1 年以内の



再発無しの群（白いカラム）と、1年以内の再発有りの群（黒いカラム）でそれぞれ解析した結果を示す図である。左上図及び左下図はA B C B 6 遺伝子mRNA発現量を、右上図及び右下図はA B C B 6 遺伝子転写制御領域のDNAメチル化率をそれぞれ示す。

[図11] 癌患者から採取した非癌部の肝臓組織におけるA B C B 6 遺伝子転写制御領域のDNAメチル化率を、癌の1年以内（上段）又は2年以内（下段）の再発無しの群と、再発有りの群でそれぞれ解析した結果を示す図である。メチル化率は、R P P H 1 遺伝子領域のDNAのメチル化率に対するA B C B 6 遺伝子転写制御領域のDNAメチル化率（M S P 5）の比を示した。全サンプルの群（左側）、C型肝炎ウイルス（H C V）キャリアの群（中央）と、C型肝炎ウイルスキャリアではない群（右側）でそれぞれ解析した結果を示す。箱ひげ図（box and whiskers plot）の箱の中の線は中央値（median）を表す。

[図12] 癌患者から採取した癌部の肝臓組織におけるA B C B 6 遺伝子転写制御領域のDNAメチル化率を、癌の1年以内（上段）又は2年以内（下段）の再発無しの群と、再発有りの群でそれぞれ解析した結果を示す図である。メチル化率は、R P P H 1 遺伝子領域のDNAのメチル化率に対するA B C B 6 遺伝子転写制御領域のDNAメチル化率（M S P 5）の比を示した。全サンプルの群（左側）、C型肝炎ウイルス（H C V）キャリアの群（中央）と、C型肝炎ウイルスキャリアではない群（右側）の結果を示す。箱ひげ図（box and whiskers plot）の箱の中の線は中央値（median）を表す。

[図13] C型肝炎ウイルス（H C V）キャリア群（左側）と、C型肝炎ウイルスキャリアではない群（右側）の癌患者から採取した非癌部の肝臓組織におけるA B C B 6 遺伝子転写制御領域のDNAメチル化率を指標とした、癌の1年以内（上段）又は2年以内（下段）の再発予測診断能について示す図である。メチル化率は、R P P H 1 遺伝子領域のDNAのメチル化率に対するA B C B 6 遺伝子転写制御領域のDNAメチル化率（M S P 5）の比を示した。

[図14] C型肝炎ウイルス（HCV）キャリア群（左側）と、C型肝炎ウイルスキャリアではない群（右側）の癌患者から採取した肝臓組織におけるABC B6遺伝子mRNA発現量とABC B6遺伝子転写制御領域のDNAメチル化率を組合せてマーカーとした、癌の1年以内（上段）又は2年以内（下段）の再発予測診断能についてReceiver operating characteristic（ROC）曲線解析の結果を示す図である。mRNA発現量については、非癌部肝臓組織における発現量を基準として、癌部肝臓組織における発現量を示した。また、メチル化率については、非癌部肝臓組織におけるRPPH1遺伝子領域のDNAのメチル化率に対するABC B6遺伝子転写制御領域のDNAメチル化率（MSP5）の比を求め、メチル化率とした。

[図15] 癌患者から採取した癌部及び非癌部の肝臓組織におけるABC B6遺伝子転写制御領域のDNAメチル化率（上段）、ALU配列のDNAメチル化率（中段）、又はALU配列のDNAメチル化率に対するMSP5領域のDNAメチル化率の比（下段）を、C型肝炎ウイルス（HCV）キャリアの群（左側）と、C型肝炎ウイルスキャリアではない群（右側）でそれぞれ解析した結果を示す図である。

[図16] 全ての癌患者群（左側）、C型肝炎ウイルス（HCV）キャリア群（中央）と、C型肝炎ウイルスキャリアではない群（右側）の癌患者から採取した癌部の肝臓組織におけるABC B6遺伝子転写制御領域のDNAメチル化率を指標とした、癌の診断マーカーとしての性能を示す図である。メチル化率は、MSP5領域のDNAメチル化率（上段）、ALU配列のDNAメチル化率（中段）、又はALU配列のDNAメチル化率に対するMSP5領域のDNAメチル化率の比（下段）を指標とした結果を示す。

### 発明を実施するための形態

[0013] 本発明の肝細胞癌の発症リスクを予測する方法としては、（a）被検者より採取された肝臓組織からゲノムDNAを抽出する工程；（b）上記ゲノムDNAのABC B6遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出する工程；（c）上記転写制御領域におけるシトシンのメチル化の

程度と、肝細胞癌の発症リスクとが正の相関関係にあることを指標として前記被検者における肝細胞癌の発症リスクを予測する工程；の工程（a）～（c）を順次備える方法（以下、「発症リスク予測方法」ということもある）であれば特に制限されず、また、本発明の肝細胞癌の再発リスクを予測する方法としては、（a）C型肝炎ウイルスに感染している肝細胞癌患者より採取された非癌部肝臓組織からゲノムDNAを抽出する工程；（b）上記ゲノムDNAのABC B6遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出する工程；（c）上記転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度と、肝細胞癌の再発リスクとが逆の相関関係にあることを指標として前記肝細胞癌患者における肝細胞癌の再発リスクを予測する工程；の工程（a）～（c）を順次備える方法（以下、「再発リスク予測方法（I）」ということもある）や、（a）C型肝炎ウイルスに感染している肝細胞癌患者より採取された癌部肝臓組織からゲノムDNAを抽出する工程；（b）上記ゲノムDNAのABC B6遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出する工程；（c）上記転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度と、肝細胞癌の再発リスクとが正の相関関係にあることを指標として前記肝細胞癌患者における再発リスクを予測する工程；の工程（a）～（c）を順次備える肝細胞癌の再発リスクを予測する方法（以下、「再発リスク予測方法（II）」ということもある）であれば特に制限されず、ここで、「発症」とは、癌化していない肝細胞、若しくは前癌状態にある肝細胞が癌化して癌組織を形成することを意味し、「再発」とは、治療のために癌部を除去した後の非癌部肝臓組織において、癌化していない肝細胞、若しくは前癌状態にある肝細胞が新たに癌化することや、癌部より転移した癌細胞が非癌部肝臓組織中で増殖して新たに癌組織が形成されることを意味する。

[0014] 本発明の発症リスク予測方法の工程（a）における「C型肝炎ウイルスに感染している被検者」としては、C型肝炎ウイルス（HCV）に感染しているHCVキャリアであれば特に制限されず、肝炎の臨床的症候のない持続的なHCVウイルスキャリアであっても、HCVによる慢性肝炎及び／又は肝

硬変を発症しているHCVウイルスキャリアであってもよい。また、本発明の再発リスク予測方法（I）の工程（b）、及び再発リスク予測方法（II）の工程（b）における「C型肝炎ウイルスに感染している肝細胞癌患者」としては、C型肝炎ウイルス（HCV）に感染しているHCVキャリアであって、且つ、肝細胞癌を発症している肝細胞癌患者であれば特に制限されないが、HCVによる慢性肝炎及び／又は肝硬変を発症しているHCVウイルスキャリアであることが特に好適である。

[0015] 上記本発明の発症リスク予測方法の工程（b）、再発リスク予測方法（I）の工程（b）、及び再発リスク予測方法（II）の工程（b）において、ゲノムDNAのABC B6遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出する方法としては、ABC B6遺伝子の転写制御領域の全部又は一部に含まれるCpG配列のシトシンのうち、メチル化されているシトシンを定量又は半定量的に検出する方法であれば特に制限されず、上記転写制御領域としては、例えば、ABC B6遺伝子の転写開始点より上流の723bp（-723bp）から、下流の500bp（+500bp）までの領域を好適に例示することができるが、なかでも、ABC B6遺伝子の転写開始点より下流の+183bpから+309bpまでのMSP1領域や、ABC B6遺伝子の転写開始点より上流の-50bpから下流の+71bpまでのMSP2領域や、ABC B6遺伝子の転写開始点より上流の-50bpから下流の+57bpまでのMSP3領域や、ABC B6遺伝子の転写開始点より上流の-268bpから-173bpまでのMSP4領域や、ABC B6遺伝子の転写開始点より上流の-433bpから-330bpまでのMSP5領域等であることが好ましく、ABC B6遺伝子の転写開始点より上流の-50bpから下流の+71bpまでのMSP2領域や、ABC B6遺伝子の転写開始点より上流の-50bpから下流の+57bpまでのMSP3領域であることがさらに好ましい。また、上記シトシンのメチル化の程度の検出方法としては、定量的又は半定量的なメチル化検出方法であれば特に制限されず、具体的には、Methylight法、バイサルファイトシーケンス法、メチ

ル化特異的PCR法（MSP法）、Combined bisulfite restriction assay（COBRA）法、High Resolution Melting（HRM）法等を例として好適に挙げることができるが、なかでも、Methylight法を特に好適に挙げることができる。上記本発明の方法において、Methylight法を用いてABC B6遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出する場合には、例えば、（i）配列番号5及び6に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号7に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ、（ii）配列番号8及び9に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号10に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ、（iii）配列番号11及び12に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号13に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ、（iv）配列番号14及び15に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号16に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ、（v）配列番号17及び18に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号19に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ等を用いることができる。

[0016] 本発明の肝細胞癌の発症リスク予測用のキットとしては、ABC B6遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出するためのプライマーセットとプローブとを備えるものであれば特に制限されず、また、本発明の肝細胞癌の再発リスク予測用のキットとしては、ABC B6遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出するためのプライマーセットとプローブとを備えるものであれば特に制限されず、上記ABC B6遺伝子の転写制御領域としては、上記転写制御領域としては、例えば、ABC B6遺伝子の転写開始点より上流の723bp（-723bp）から、下流の500bp（+500bp）までの領域の全部又は一部を好適に例示することができるが、なかでも、ABC B6遺伝子の転写開始点より下流の+183bpから+309bpまでのMSP1領域や、ABC B6遺伝子の転写開始点より上流の-50bpから下流の+71bpまでのMSP2領域や、ABC B6遺伝子の転写開始点より上流の-50bpから下流の+57

b p までのMSP 3 領域や、A B C B 6 遺伝子の転写開始点より上流の- 2 6 8 b p から- 1 7 3 b p までのMSP 4 領域や、A B C B 6 遺伝子の転写開始点より上流の- 4 3 3 b p から- 3 3 0 b p までのMSP 5 領域等であることが好ましく、A B C B 6 遺伝子の転写開始点より上流の- 5 0 b p から下流の+ 7 1 b p までのMSP 2 領域や、A B C B 6 遺伝子の転写開始点より上流の- 5 0 b p から下流の+ 5 7 b p までのMSP 3 領域であることがさらに好ましい。また、上記プライマーセットとプローブとしては、A B C B 6 遺伝子の転写制御領域のシトシンのメチル化の程度を検出するためのものであれば特に制限されないが、具体的には、( i ) 配列番号 5 及び 6 に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号 7 に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ、( ii ) 配列番号 8 及び 9 に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号 1 0 に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ、( iii ) 配列番号 1 1 及び 1 2 に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号 1 3 に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ、( iv ) 配列番号 1 4 及び 1 5 に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号 1 6 に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ、( v ) 配列番号 1 7 及び 1 8 に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号 1 9 に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ等を例として好適に挙げることができる。また、A B C B 6 遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出するためのプライマーセットとプローブとを備えるキットを、肝細胞癌の発症リスクの予測又は肝細胞癌の再発リスクの予測に使用する方法も本発明の実施の変形とすることができる。

[0017] また、本発明は、( a ) C 型肝炎ウイルスに感染している被検者より採取された肝臓組織からゲノムDNAを抽出する工程；( b ) 上記ゲノムDNAのA B C B 6 遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出する工程；( c ) 上記転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度と、肝細胞癌の発症リスクが正の相関関係にあることを指標として前記被検者における肝細胞癌の発症リスクを予測する工程；の工程( a ) ~ ( c ) を順

次備える肝細胞癌の発症リスクを予測するためのデータを収集する方法（以下、「発症リスク予測データ収集方法」ということもある）や、（a）C型肝炎ウイルスに感染している肝細胞癌患者より採取された非癌部肝臓組織からゲノムDNAを抽出する工程；（b）上記ゲノムDNAのABC B6遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出する工程；（c）上記転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度と、肝細胞癌の再発リスクが逆の相関関係にあることを指標として前記肝細胞癌患者における肝細胞癌の再発リスクを予測する工程；の工程（a）～（c）を順次備える肝細胞癌の再発リスクを予測するためのデータを収集する方法（以下、「再発リスク予測データ収集方法（I）」ということもある）や、（a）C型肝炎ウイルスに感染している肝細胞癌患者より採取された癌部肝臓組織からゲノムDNAを抽出する工程；（b）上記ゲノムDNAのABC B6遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出する工程；（c）上記転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度と、肝細胞癌の再発リスクが正の相関関係にあることを指標として前記肝細胞癌患者における再発リスクを予測する工程；の工程（a）～（c）を順次備える肝細胞癌の再発リスクを予測するためのデータを収集する方法（以下、「再発リスク予測データ収集方法（II）」ということもある）を実施の変形として含むことがある。本発明の発症リスク予測データ収集方法、再発リスク予測データ収集方法（I）、及び再発リスク予測データ収集方法（II）を実施する際の操作は、データを収集することを除き、上記本発明の発症リスク予測、再発リスク予測方法（I）、及び再発リスク予測方法（II）を実施する際の操作と同様である。

[0018] 以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

### 実施例 1

[0019] [ABC B6遺伝子のメチル化解析]

ABC B6遺伝子の転写調節領域付近をコンピュータ解析した結果、Cp

Gアイランドが存在することが明らかとなった。図1に、A B C B 6 遺伝子領域における、C p G配列の位置、及びC p Gアイランド領域を示す。このC p Gアイランドにおけるシトシンのメチル化について、6種の肝癌細胞株（H L E、S K - H E P - 1、H e p 3 B、H u H - 6、H u H - 7、H e p G 2）を用いて解析を行った。図2に、バイサルファイトシーケンスの結果を示す。以上の解析結果に基づいて、Methylight法による解析に用いる5箇所のメチル化解析領域（M S P 1 ~ 5）を決定した（図3）。

## 実施例 2

### [0020] [肝臓組織におけるA B C B 6 遺伝子のメチル化解析]

#### 1. サンプル

肝臓癌患者より外科的に切除して得られた肝臓組織から、非癌部及び癌部（H C C）組織を採取した。得られた非癌部及び癌部（H C C）サンプルは $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存し、R N A及び／又はD N Aの抽出に用いた。

### [0021] 2. R N A及びゲノムD N A抽出

上記の48例（再発なし：35例、再発有り：13例）のサンプルから、T R i z o l R e a g e n t（インビトロジェン社製）とP u r e L i n k M i c r o - t o - M i d i T o t a l R N A P u r i f i c a t i o n K i t（インビトロジェン社製）を用いてt o t a l R N Aを抽出した。また、46例（再発なし：35例、再発有り：11例）のサンプルから、U l t r a C l e a n T i s s u e D N A S p i n K i t（M O B I O社製）を用いてD N A抽出を行った。上記サンプルのうち、33例のサンプルはR N AとD N Aの両方の抽出に用いた。

### [0022] 3. 逆転写反応とA B C B 6 発現レベルの算出

上記のようにして抽出されたt o t a l R N Aから、P r i m e S c r i p t R T r e a g e n t K i t（タカラバイオ社製）を用いてc D N Aを合成し、リアルタイムP C RによりA B C B 6 m R N A発現レベルを調べた。リアルタイムP C Rの反応は、c D N A（10 n gのinitial R N Aに相当）、プライマー（10 p m o l）、及び加水分解プローブ（2 p m o l）を含む20  $\mu$  Lの反応液を用い、L i g h t C y c l e r 4 8 0 I I（ロシュ社製）によって行った。 $\Delta \Delta C q$ 法（ $\Delta$



$\Delta C t$ 法)により、非癌部サンプルにおけるABC B6 mRNA発現量の平均値(N=48)を1.0として、癌部サンプルにおけるABC B6 mRNA発現レベルを相対値として示した。また、リファレンス遺伝子としてGAPDH遺伝子の発現レベルを確認した。リアルタイムPCRに用いたプライマー及び加水分解プローブの配列を以下に示す。

<ABC B6>

センスプライマー(配列番号1): 5'-GGACCAAGATGTGGAAAGGA-3'

アンチセンスプライマー(配列番号2): 5'-CCAAAATCTCGCCAGGTAGA-3'

プローブ: Universal Probe Library #66 (Roche Diagnostics社製)

<GAPDH>

センスプライマー(配列番号3): 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'

アンチセンスプライマー(配列番号4): 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'

プローブ: Universal Probe Library #60 (Roche Diagnostics社製)

[0023] 4. バイサルファイト処理とABC B6 遺伝子領域のメチル化率の算出

各サンプルにおけるABC B6 遺伝子領域のメチル化率を検討する目的で以下の実験を行った。上記1で抽出したDNAをEZ DNA Methylation-Gold Kit (ZYMO RESEARCH社製)によりバイサルファイト処理した。これによって、ゲノムDNA中のメチル化されていないシトシンはチミンへと変換され、メチル化されているシトシンは変換されずに残る。メチル化率の測定はMethylight法を若干改変し、リアルタイムPCR装置とプライマー(10 pmol)及び加水分解プローブ(2 pmol)を用いて20  $\mu$ L反応系でのメチル化特異的PCR(MSP)によって行った。鑄型には100 ngのバイサルファイト処理したゲノムDNAを用いた。ABC B6 遺伝子領域のメチル化率は、 $\Delta\Delta C q$ 法( $\Delta\Delta C t$ 法)によりMSP5のメチル化率に対する相対値としてMSP1~4について求めた。あるいは、ABC B6 遺伝子領域のメチル化率をRPPH1(ribonuclease P RNA component H1 (NR\_002312.1, X15624))又はALU(Alu repeat (The most plentiful short interspersed nucleotide element (SINE) in human DNA))配列のメチル化率に対する

相対値としてMSP5について求めた。また、全ての実験においてコントロールとして100%メチル化コントロールDNA（QIAGEN社製）を鋳型に用いた。リアルタイムPCRに用いたプライマー及び加水分解プローブの配列を以下に示す。

<MSP1>

センスプライマー（配列番号5）：5'-TAAGGTATTCCGGATGTTCCGC-3'

アンチセンスプライマー（配列番号6）：5'-TCGACCTCGCAATAATTACC-3'

プローブ（配列番号7）：5'-FAM-AGTGTTGTTAGTTTCGGTCGGCGTTT-BHQ-3'

<MSP2>

センスプライマー（配列番号8）：5'-GGGGTTATAGTCGTGGAGC-3'

アンチセンスプライマー（配列番号9）：5'-AAAACACGTACGCCGTCT-3'

プローブ（配列番号10）：5'-FAM-GTGGGTTTGTAGTTGGTAGGAGGGTT-BHQ-3'

<MSP3>

センスプライマー（配列番号11）：5'-GGGGTTATAGTCGTGGAGC-3'

アンチセンスプライマー（配列番号12）：5'-GTCTCAACACGACCCCG-3'

プローブ（配列番号13）：5'-FAM-GTGGGTTTGTAGTTGGTAGGAGGGTT-BHQ-3'

<MSP4>

センスプライマー（配列番号14）：5'-GTGTTTTGTTTCGAGTTAGGATTTTC-3'

アンチセンスプライマー（配列番号15）：5'-GAAAAATCTAACGACCAAACCG-3'

プローブ（配列番号16）：5'-FAM-TTTCGAGTTACGATTTTCGTGGAGG-BHQ-3'

<MSP5>

センスプライマー（配列番号17）：5'-TAGATTTTTTGTGTTTCCGC-3'

アンチセンスプライマー（配列番号18）：5'-TCTAAACGACGACCTAAACA-3'

プローブ（配列番号19）：5'-FAM-AAGAGAAATGGGATGGGGATTTTG-BHQ-3'

<RPPH1>

センスプライマー（配列番号20）：5'-AATGAGGTGTAGAAGGTTGATGGT-3'

アンチセンスプライマー（配列番号21）：5'-CATAATTAATCACTTCCCACCAA-

3'

プローブ : Universal ProbeLibrary #10 (Roche diagnostics社製)

<ALU>

センスプライマー (配列番号 2 2) : 5'-GCGCGGTGGTTTACGTTT-3'

アンチセンスプライマー (配列番号 2 3) : 5'-AACCGAACTAATCTCGAACTCCTAAC  
-3'

プローブ (配列番号 2 4) : 5'-6FAM-AAATAATCGGCCGCGCTCGACCT-BHQ-3'

[0024] 5. 再発・無再発診断能の評価

MSP 5に対する相対値としてMSP 1~4について求めたABC B6 遺伝子領域のメチル化率を用いて解析した。非癌部においてはABC B6 mRNA発現とメチル化率との相関は見られなかったが、癌部においてはmRNA発現とメチル化率との間に逆相関関係が見られた(図4)。また、再発の有無に基づいて、Receiver operating characteristic (ROC) 曲線におけるArea Under the Curve (AUC) を用いて比較した(図5~10)。感度・特異度はROC曲線において最区分点の最大値での値を示した。C型肝炎ウイルスキャリア由来の1年以内再発有り肝臓組織の癌部においてはメチル化率が高いことが明らかとなった。さらに、該 CpG アイランドのメチル化率は、C型肝炎ウイルスキャリア由来の1年以内再発無し肝臓組織の非癌部においては低いこと、B型肝炎ウイルスキャリア由来の肝臓組織においては癌部及び非癌部のいずれのメチル化率も、1年以内再発の有無との関連が認められないことが示された。

[0025] 次に、RPPH 1に対する相対値としてMSP 5について求めたABC B6 遺伝子領域のメチル化率を用いて解析した結果を図11、12に示す。癌の2年以内の再発については、全体及びC型肝炎ウイルスキャリアの群で非癌部の肝臓組織におけるABC B6 遺伝子領域のメチル化率に有意差が認められた。また、非癌部の肝臓組織におけるABC B6 遺伝子領域のメチル化率からReceiver operating characteristic (ROC) 曲線を作成して再発予測性能を評価した結果により、C型肝炎ウイルスキャリアの群で癌の2年以内の再発予測精度が高いことが示された(図13)。

[0026] さらに、癌患者から採取した肝臓組織における ABCB6 遺伝子 mRNA 発現量を ABCB6 遺伝子転写制御領域の DNA メチル化率で除した値を用いて Receiver operating characteristic (ROC) 曲線を作成して再発予測性能を評価した (図 14)。ABCB6 遺伝子 mRNA 発現量と ABCB6 遺伝子転写制御領域の DNA メチル化率を組合せてマーカーとすると、C 型肝炎ウイルスキャリアの群で、癌の 1 年以内及び 2 年以内の高い再発予測精度を得られることが示された。

[0027] 6. 癌の診断マーカーとしての性能の解析

癌患者から採取した癌部及び非癌部の肝臓組織において、ALU 配列に対する相対値として MSP5 について求めた ABCB6 遺伝子転写制御領域の DNA メチル化率は、C 型肝炎ウイルスキャリアの有無に係らず癌部において高いことが示された (図 15)。また、Receiver operating characteristic (ROC) 曲線を作成して診断マーカーとしての性能を評価した結果、ALU 配列に対する相対値として MSP5 について求めた ABCB6 遺伝子転写制御領域の DNA メチル化率は、C 型肝炎ウイルスキャリアの有無に係らず、高性能に診断マーカーとして用いることができることが示された (図 16)。

## 請求の範囲

[請求項1] 以下の工程（a）～（c）を順次備えることを特徴とする肝細胞癌の発症リスクを予測する方法。

（a）被検者より採取された肝臓組織からゲノムDNAを抽出する工程；

（b）上記ゲノムDNAのABC B6遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出する工程；

（c）上記転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度と、肝細胞癌の発症リスクとが正の相関関係にあることを指標として前記被検者における肝細胞癌の発症リスクを予測する工程；

[請求項2] 以下の工程（a）～（c）を順次備えることを特徴とする肝細胞癌の再発リスクを予測する方法。

（a）C型肝炎ウイルスに感染している肝細胞癌患者より採取された非癌部肝臓組織からゲノムDNAを抽出する工程；

（b）上記ゲノムDNAのABC B6遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出する工程；

（c）上記転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度と、肝細胞癌の再発リスクとが逆の相関関係にあることを指標として前記肝細胞癌患者における肝細胞癌の再発リスクを予測する工程；

[請求項3] 以下の工程（a）～（c）を順次備えることを特徴とする肝細胞癌の再発リスクを予測する方法。

（a）C型肝炎ウイルスに感染している肝細胞癌患者より採取された癌部肝臓組織からゲノムDNAを抽出する工程；

（b）上記ゲノムDNAのABC B6遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出する工程；

（c）上記転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度と、肝細胞癌の再発リスクとが正の相関関係にあることを指標として前記肝細胞癌患者における再発リスクを予測する工程；

[請求項4] 転写制御領域が、A B C B 6 遺伝子の転写開始点より上流の-723 bp から、下流の+500 bp までの領域であることを特徴とする請求項1~3のいずれかに記載の方法。

[請求項5] 転写制御領域が、以下の(i)~(v)から選択される1以上の領域であることを特徴とする請求項1~4のいずれかに記載の方法。

(i) A B C B 6 遺伝子の転写開始点より下流の+183 bp から+309 bp までのMSP1領域；

(ii) A B C B 6 遺伝子の転写開始点より上流の-50 bp から下流の+71 bp までのMSP2領域；

(iii) A B C B 6 遺伝子の転写開始点より上流の-50 bp から下流の+57 bp までのMSP3領域；

(iv) A B C B 6 遺伝子の転写開始点より上流の-268 bp から-173 bp までのMSP4領域；

(v) A B C B 6 遺伝子の転写開始点より上流の-433 bp から-330 bp までのMSP5領域；

[請求項6] 以下の(i)~(v)から選択される1以上のプライマーセットとプローブとの組合せを用いて、A B C B 6 遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出することを特徴とする請求項1~5のいずれかに記載の方法。

(i) 配列番号5及び6に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号7に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ；

(ii) 配列番号8及び9に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号10に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ；

(iii) 配列番号11及び12に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号13に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ；

(iv) 配列番号14及び15に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号16に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ；

せ；

(v) 配列番号 17 及び 18 に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号 19 に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ；

[請求項7] ABCB6 遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出するためのプライマーセットとプローブとを備えることを特徴とする肝細胞癌の発症リスク予測用のキット。

[請求項8] ABCB6 遺伝子の転写制御領域におけるシトシンのメチル化の程度を検出するためのプライマーセットとプローブとを備えることを特徴とする肝細胞癌の再発リスク予測用のキット。

[請求項9] プライマーセットとプローブとが、以下の (i) ~ (v) から選択される 1 以上のプライマーセットとプローブとの組合せであることを特徴とする請求項 7 又は 8 のいずれかに記載のキット。

(i) 配列番号 5 及び 6 に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号 7 に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ；

(ii) 配列番号 8 及び 9 に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号 10 に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ；

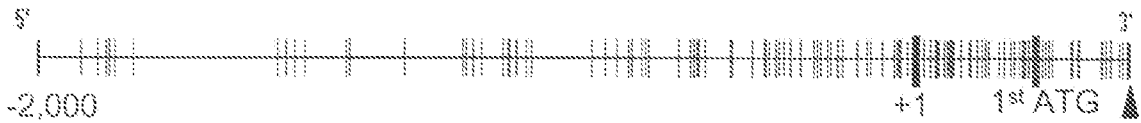
(iii) 配列番号 11 及び 12 に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号 13 に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ；

(iv) 配列番号 14 及び 15 に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号 16 に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ；

(v) 配列番号 17 及び 18 に示される塩基配列からなるプライマーセットと、配列番号 19 に示される塩基配列を含むプローブとの組合せ；

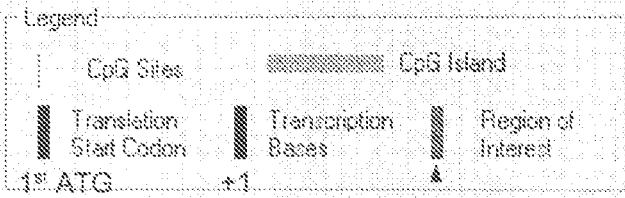
[図1]

*ABCB6*



```

Length of DNA:3500
Parameters used to find CpG islands:
Minimum length of Island:300
Maximum length of Island:2000
C+Gs/Total bases > 60%
CpG observed/CpG expected > 0.7
CpG Islands found:1
    
```



CpG island

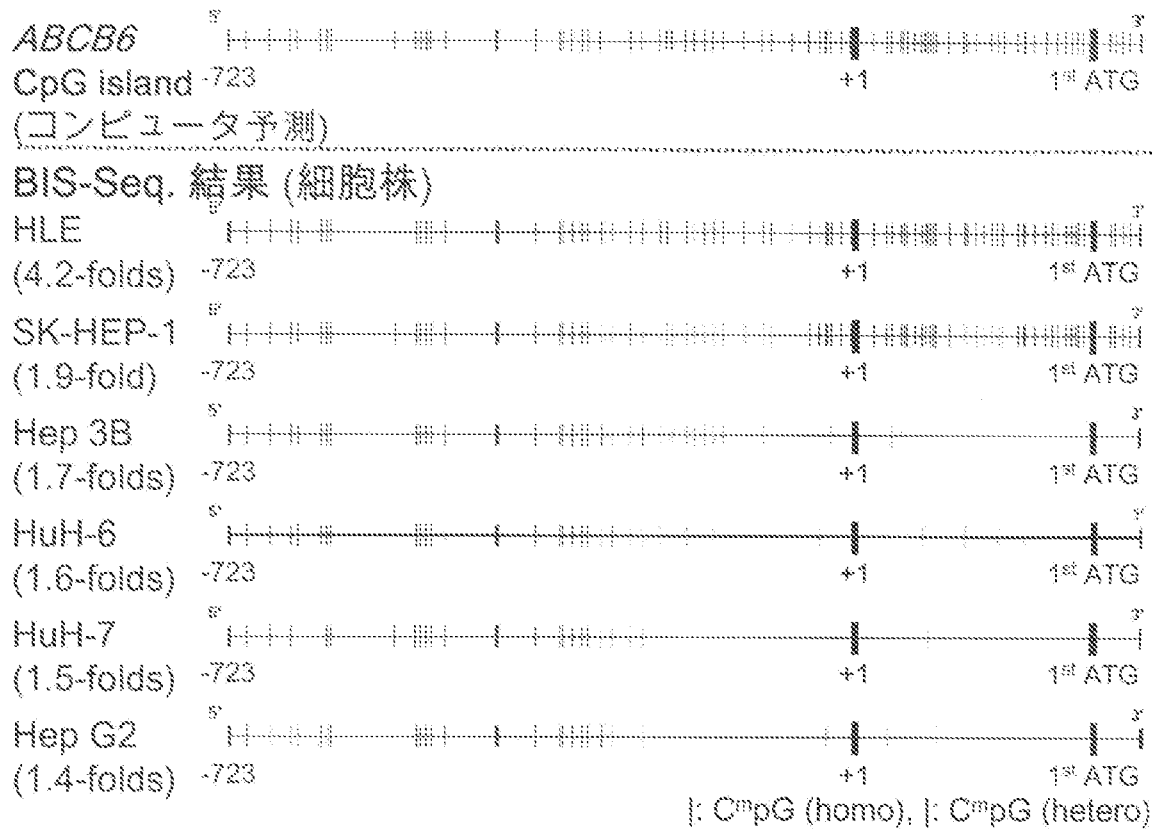


Bisulfite sequence  
(6 hepatoma cell lines)



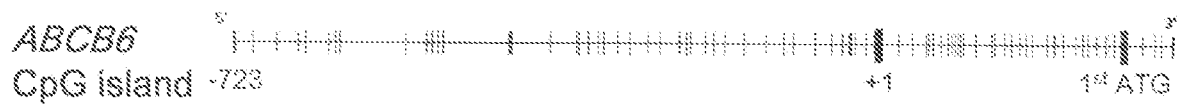
MSPの  
プライマー・プローブ設計

[図2]

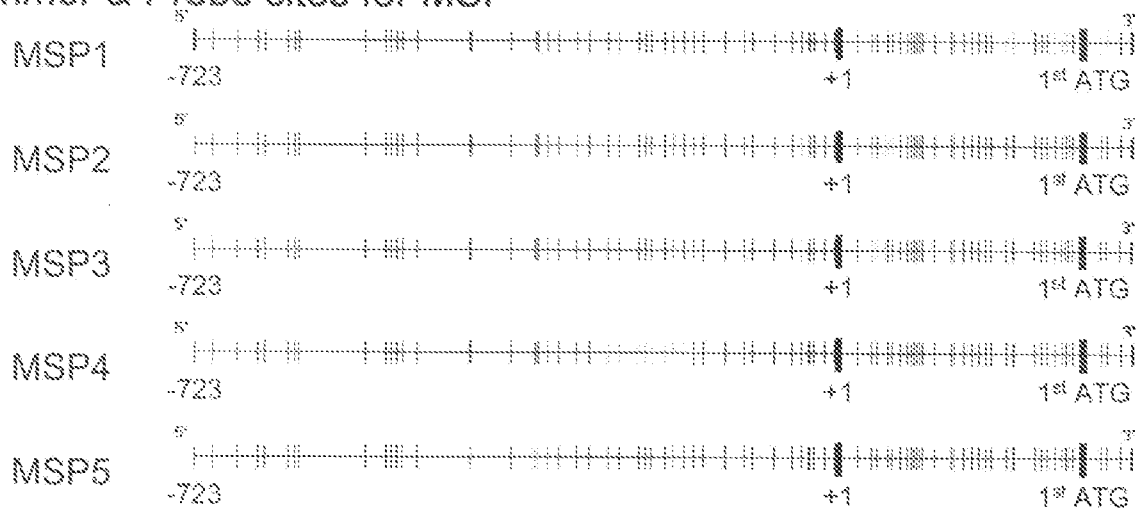




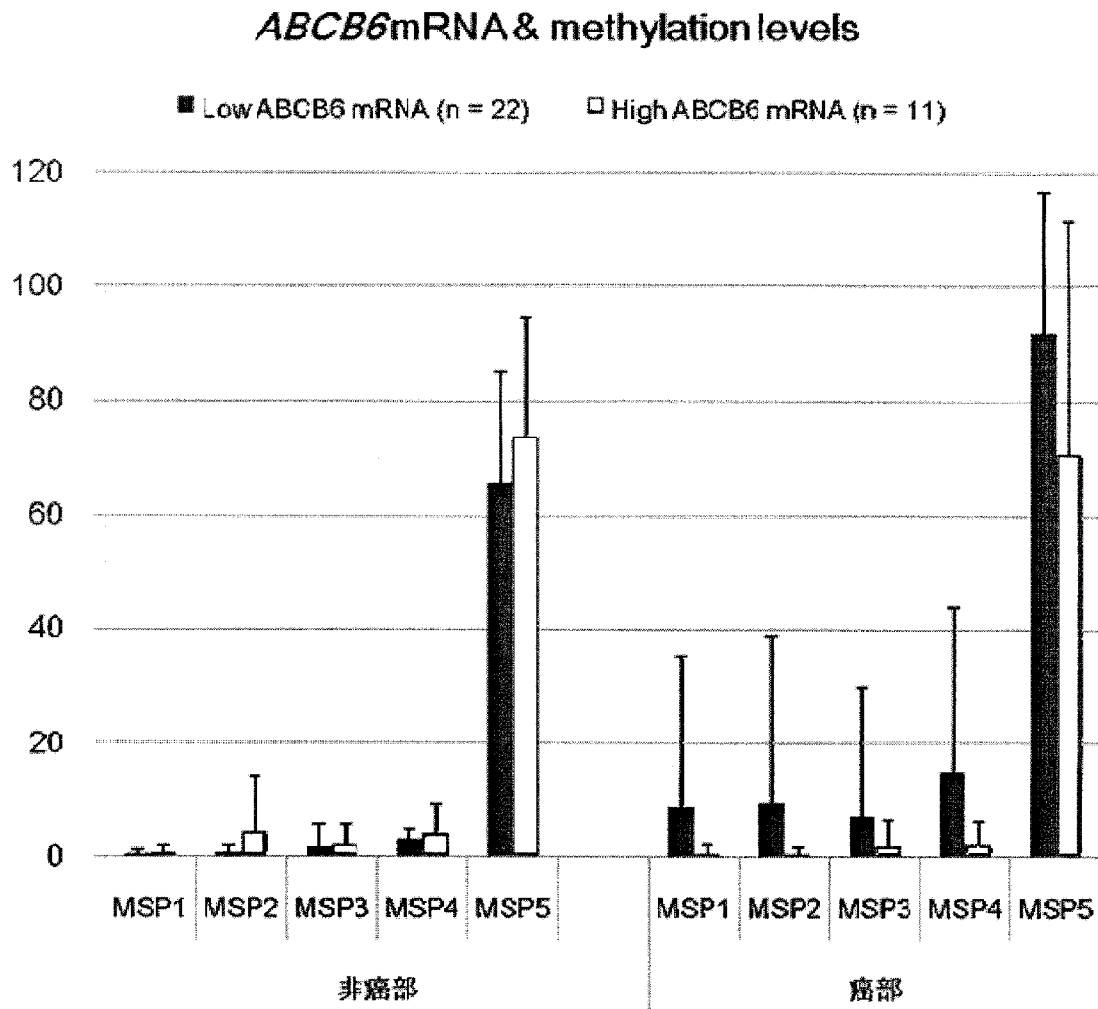
[圖3]



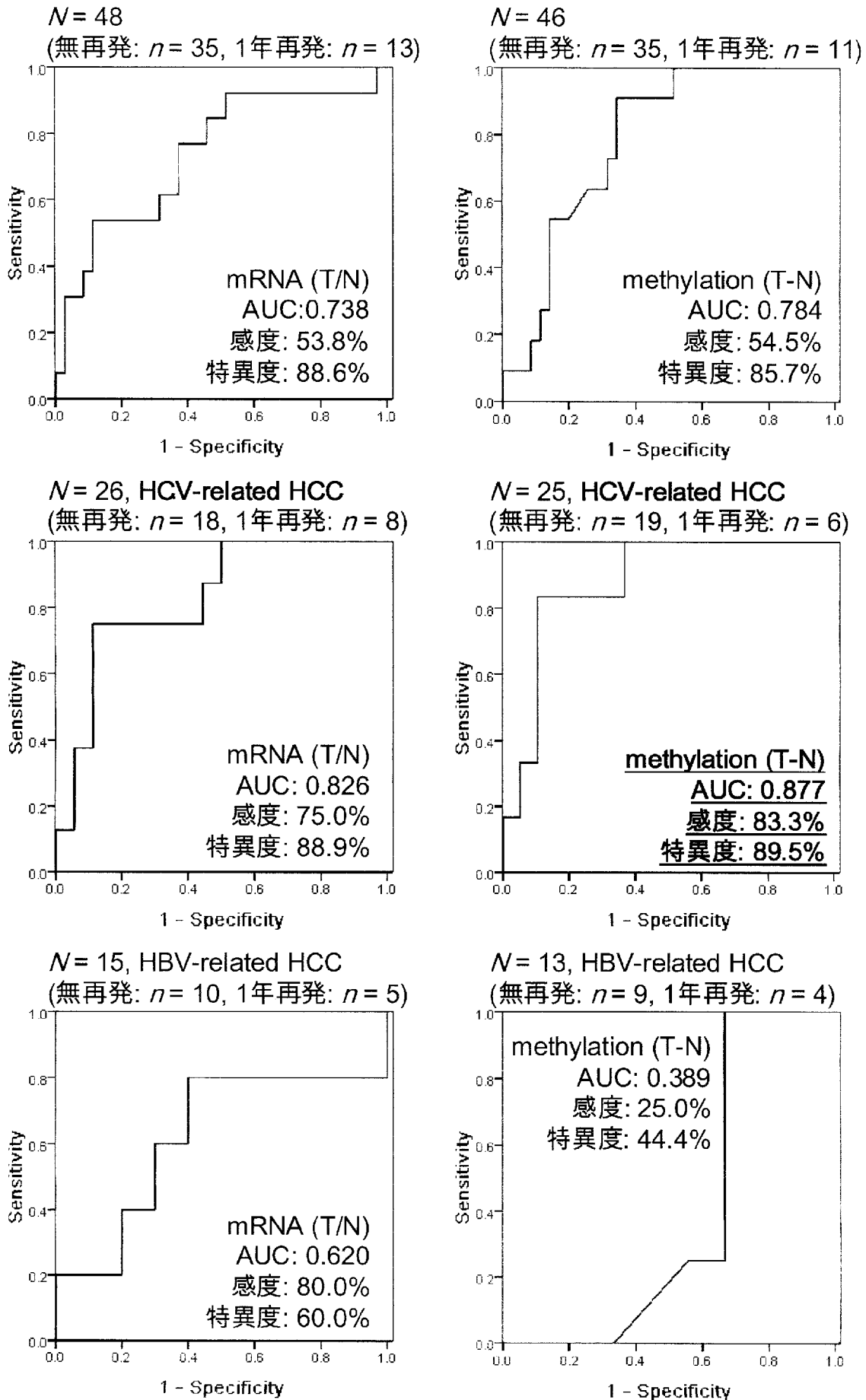
## Primer &amp; Probe sites for MSP

|: C<sup>m</sup>pG on the Primer or Probe sites

[図4]



[図5]



[図6]

	All	HCV	HBV	non-virus
非癌部	N=48 (13例再発)	n=26 (8例再発)	n=15 (5例再発)	n=7 (0例再発)
mRNA	0.675	0.688	0.720	
mRNAレベルが小さいほど再発と診断				
	All	HCV	HBV	non-virus
非癌部	N=46 (11例再発)	n=25 (6例再発)	n=13 (4例再発)	n=8 (1例再発)
単独				
MSP1	0.592	0.675	0.472	0.786
MSP2	0.658	0.623	0.583	0.857
MSP3	0.614	0.632	0.611	0.571
MSP4	0.627	0.588	0.583	0.857
組合せ (平均値を使用)				
MSP1,2	0.678	<u>0.763</u>	0.444	1.000
MSP1,3	0.625	<u>0.737</u>	0.472	0.786
MSP1,4	0.587	0.675	0.389	0.857
MSP2,3	0.687	0.675	0.583	0.857
MSP2,4	0.674	0.614	0.708	0.857
MSP3,4	0.684	0.675	0.611	0.857
MSP1,2,3	0.696	<u>0.781</u>	0.444	1.000
MSP1,2,4	0.634	0.684	0.500	0.857
MSP1,3,4	0.629	<u>0.737</u>	0.417	0.857
MSP2,3,4	<u>0.721</u>	0.693	0.708	0.857
MSP1,2,3,4	0.673	<u>0.737</u>	0.500	0.857
メチル化レベルが小さいほど再発と診断				
non-virusは再発例が1例しかないので考慮しない				

[図7]

癌部	All N = 48 (13例再発)	HCV n = 26 (8例再発)	HBV n = 15 (5例再発)	non-virus n = 7 (0例再発)
mRNA	0.679	<u>0.813</u>	0.420	
mRNAレベルが大きいほど再発と診断				
癌部	All N = 46 (11例再発)	HCV n = 25 (6例再発)	HBV n = 13 (4例再発)	non-virus n = 8 (1例再発)
単独				
MSP1	0.532	0.640	0.778	0.286
MSP2	0.549	<u>0.702</u>	0.889	0.000
MSP3	0.619	0.697	0.611	0.000
MSP4	0.525	0.596	0.667	0.286
組合せ (平均値を使用)				
MSP1,2	0.532	<u>0.719</u>	1.000	0.000
MSP1,3	0.566	<u>0.702</u>	0.778	0.000
MSP1,4	0.539	0.605	0.667	0.143
MSP2,3	0.578	<b>0.763</b>	0.889	0.000
MSP2,4	0.534	0.596	0.667	0.143
MSP3,4	0.548	0.640	0.667	0.143
MSP1,2,3	0.551	<u>0.746</u>	1.000	0.000
MSP1,2,4	0.538	0.605	0.667	0.143
MSP1,3,4	0.552	0.640	0.667	0.143
MSP2,3,4	0.555	0.649	0.667	0.143
MSP1,2,3,4	0.553	0.649	0.667	0.143
メチル化レベルが大きいほど再発と診断				
non-virusは再発例が1例しかないので考慮しない				

[図8]

mRNA Combination	All N = 48 (13例再発)	HCV n = 26 (8例再発)	HBV n = 15 (5例再発)	non-virus n = 7 (0例再発)
T-N	<u>0.725</u>	<u>0.778</u>	0.680	
T+1/N	<u>0.738</u>	<u>0.806</u>	0.660	
T/N	<b>0.738</b>	<b>0.826</b>	0.620	

non-virusは再発例が1例しかないので考慮しない。

T: tumor, NT: non-tumor

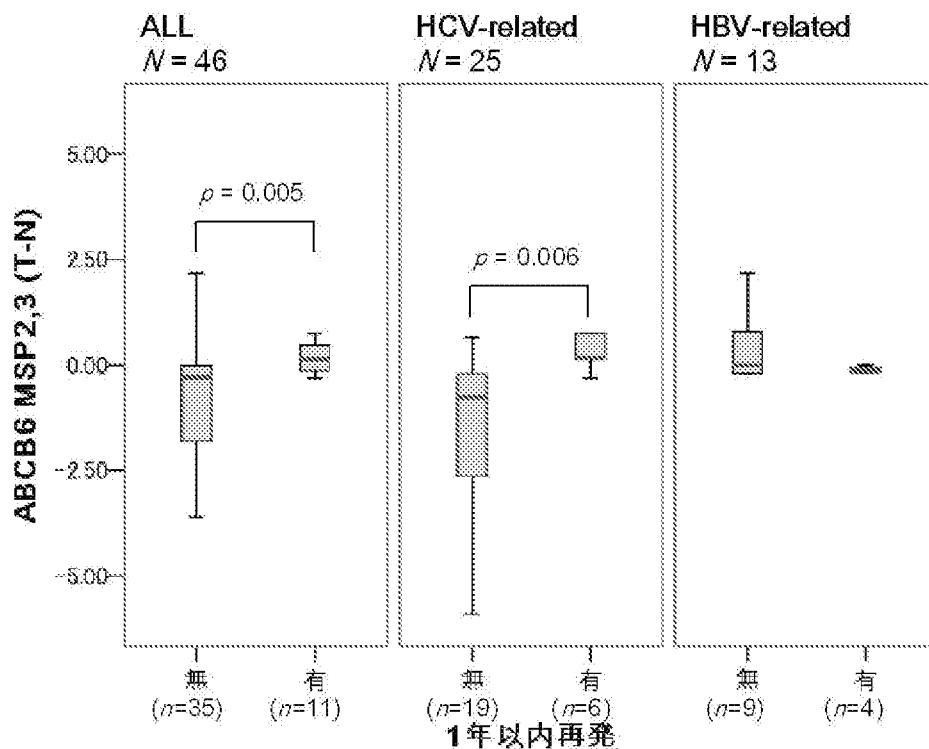
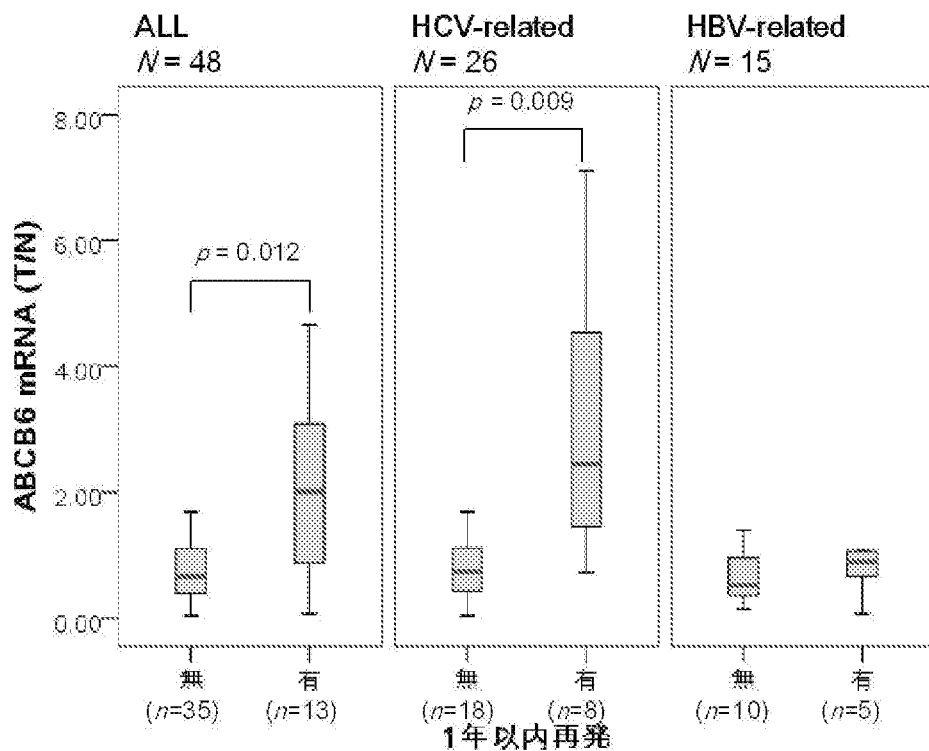
Methylation Combination (T-NT)	All N = 46 (11例再発)	HCV n = 25 (6例再発)	HBV n = 13 (4例再発)	non-virus n = 8 (1例再発)
MSP1	0.564	<u>0.702</u>	0.306	0.857
MSP2	0.678	0.693	0.417	1.000
MSP3	0.695	<u>0.785</u>	0.444	1.000
MSP4	0.577	<u>0.623</u>	0.389	0.857
MSP1,2	0.644	<u>0.772</u>	0.333	1.000
MSP1,3	0.639	<u>0.789</u>	0.306	1.000
MSP1,4	0.545	0.675	0.278	0.857
<b>MSP2,3</b>	<u>0.784</u>	<b>0.877</b>	0.389	1.000
MSP2,4	0.618	0.640	0.500	0.857
MSP3,4	0.655	<u>0.719</u>	0.417	0.857
MSP1,2,3	<u>0.730</u>	<u>0.860</u>	0.333	1.000
MSP1,2,4	0.574	0.693	0.333	0.857
MSP1,3,4	0.603	<u>0.746</u>	0.278	0.857
MSP2,3,4	0.673	<u>0.711</u>	0.500	0.857
MSP1,2,3,4	0.629	<u>0.754</u>	0.333	0.857

メチル化率は0を示すサンプルもあるので、

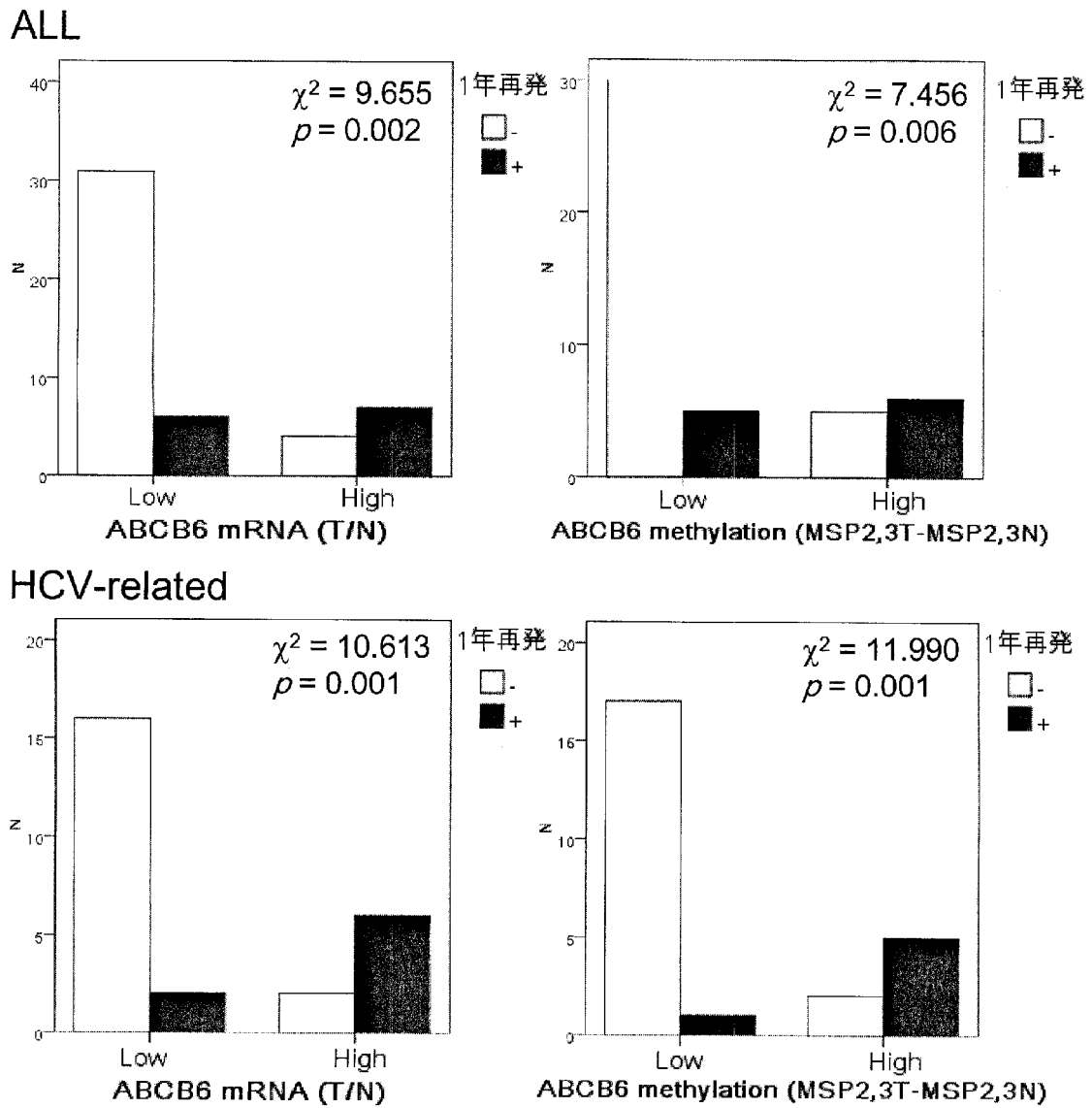
非癌部・癌部の比較は差をとることとした。

non-virusは再発例が1例しかないので考慮しない。

[図9]



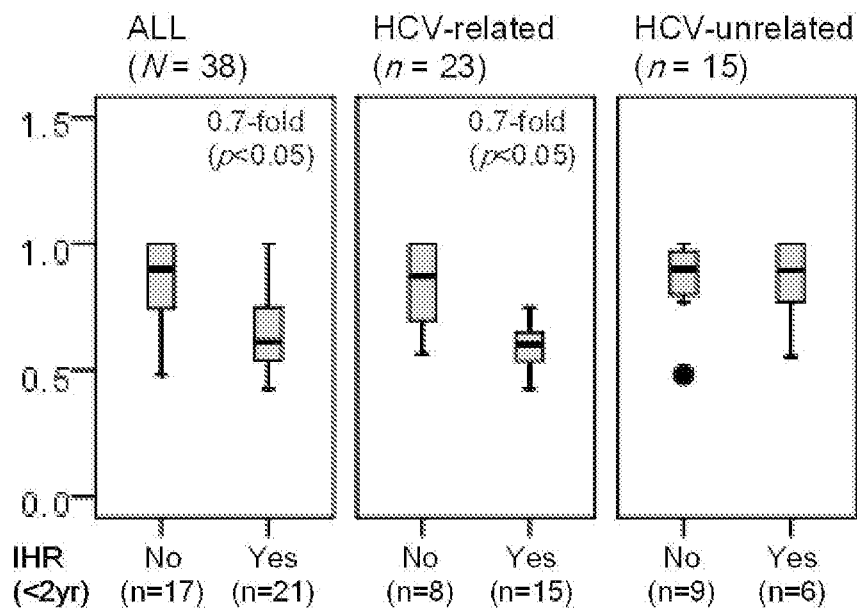
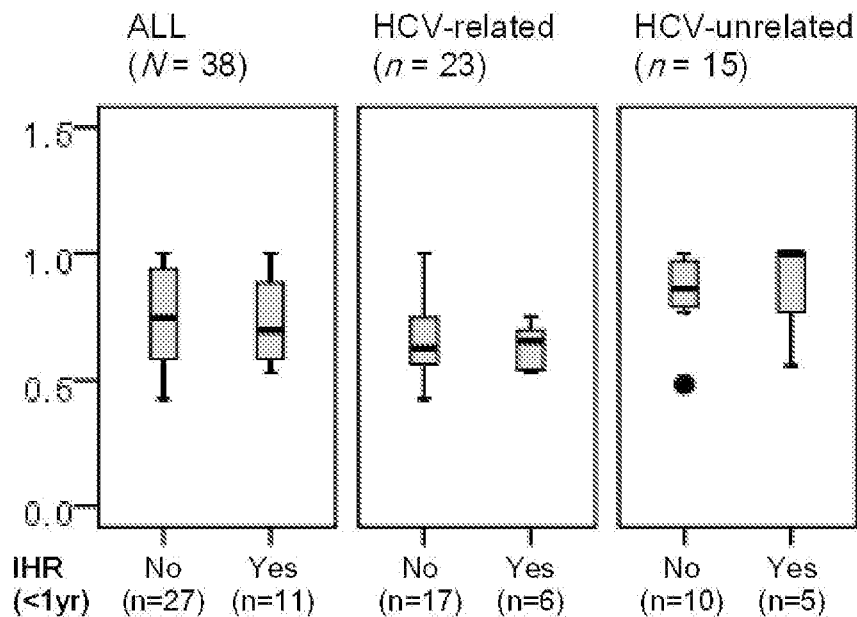
[図10]





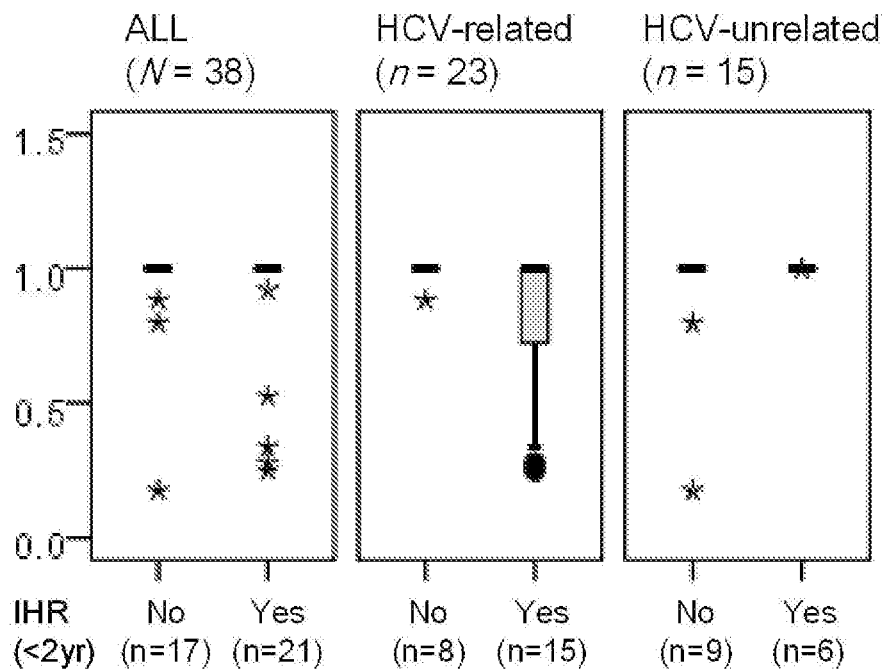
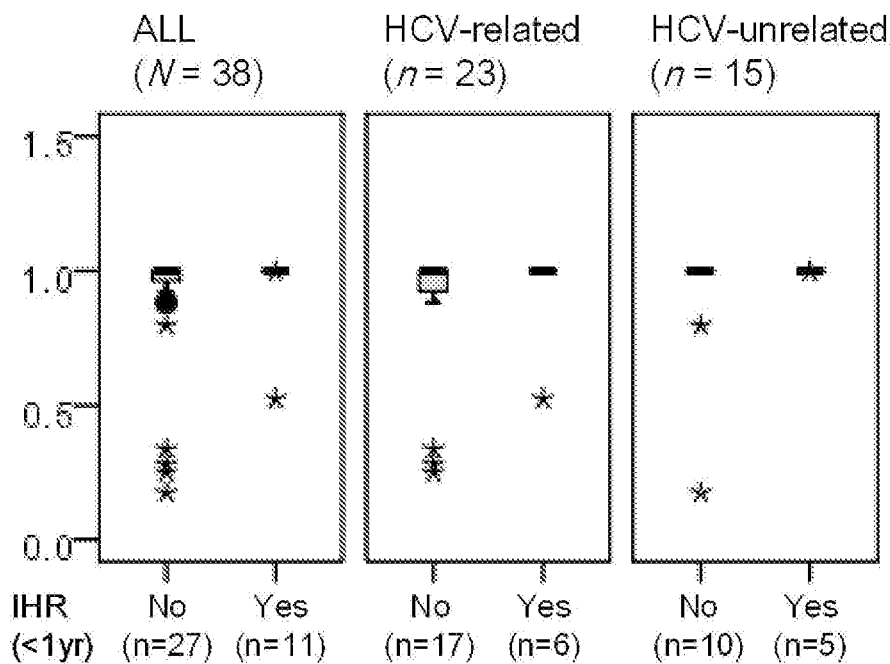
[図11]

## Non-tumorous liver tissues



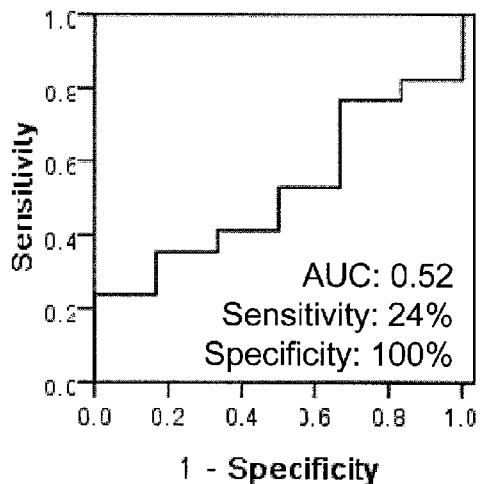
[圖12]

HCC tissues

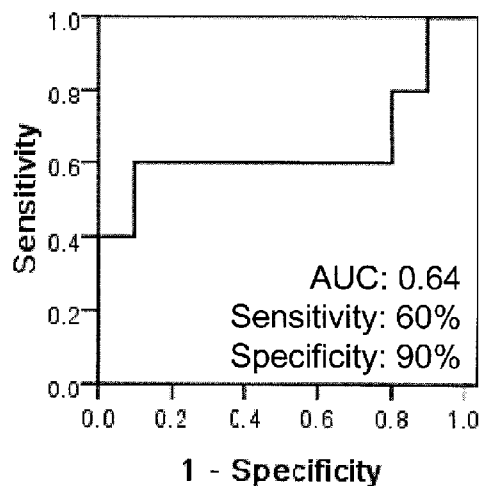


[図13]

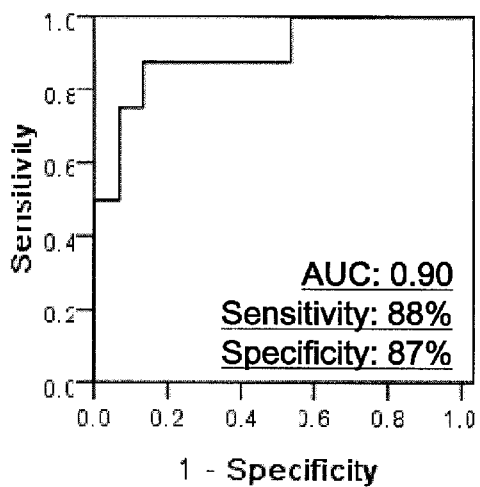
ROC curve for IHR  
within a year after surgery  
HCV-related samples ( $n = 23$ )



ROC curve for IHR  
within a year after surgery  
HCV-unrelated samples ( $n = 15$ )

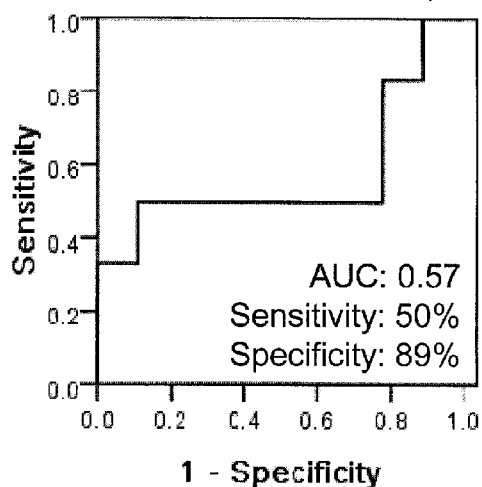


ROC curve for IHR  
within 2 years after surgery  
HCV-related samples ( $n = 23$ )



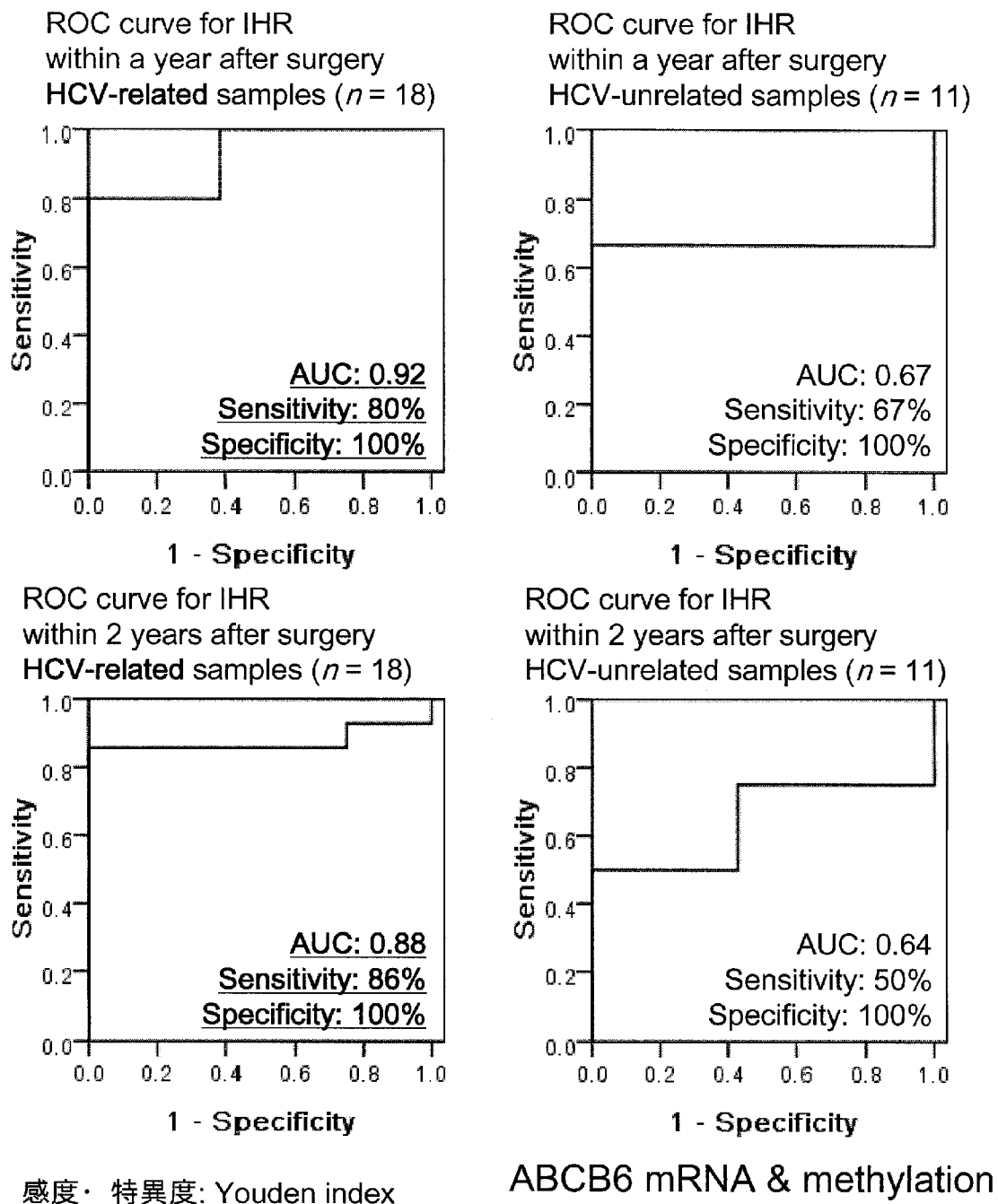
感度・特異度: Youden index

ROC curve for IHR  
within 2 years after surgery  
HCV-unrelated samples ( $n = 15$ )

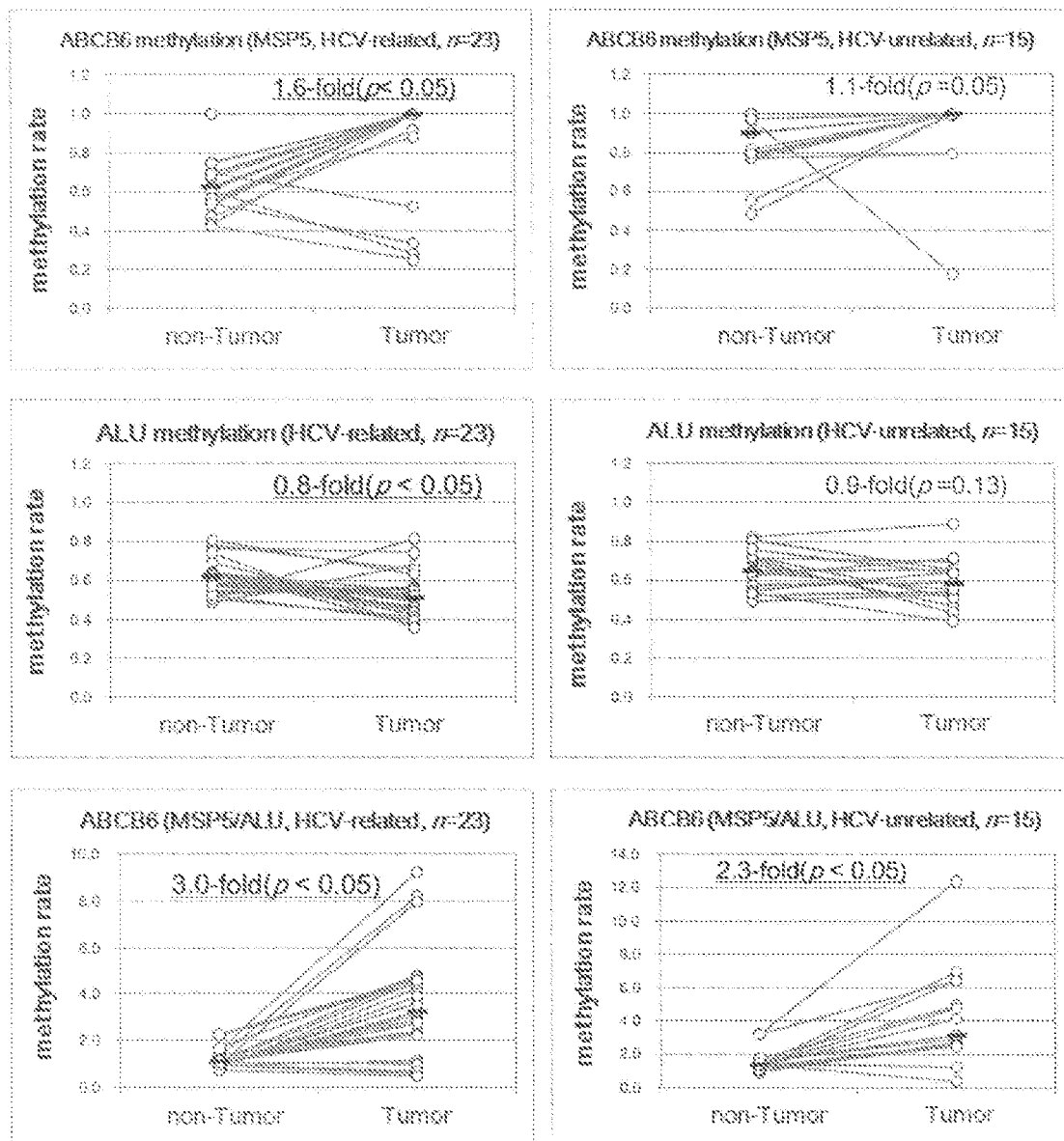


ABCB6 methylation

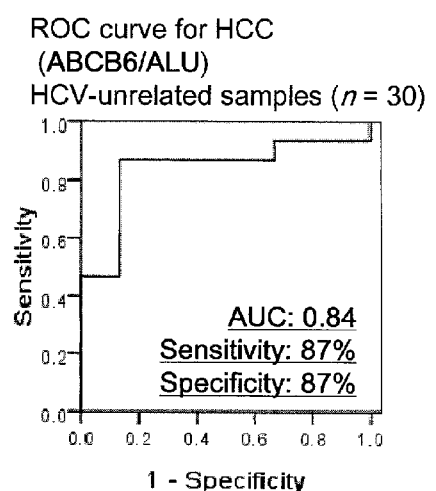
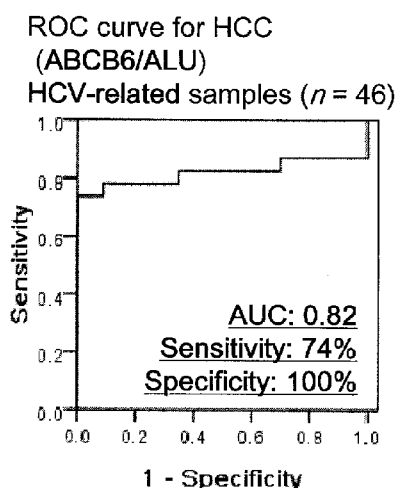
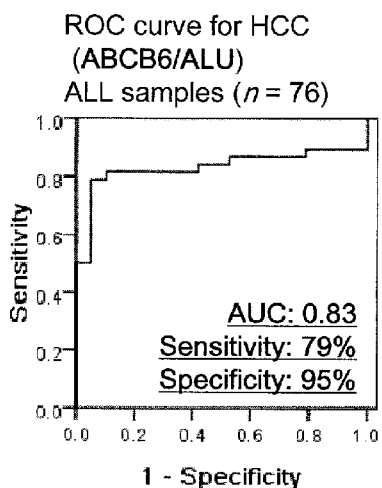
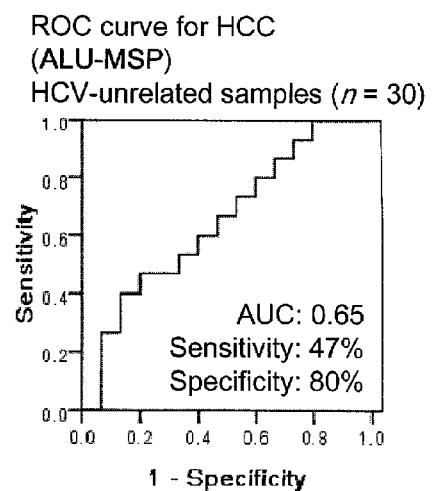
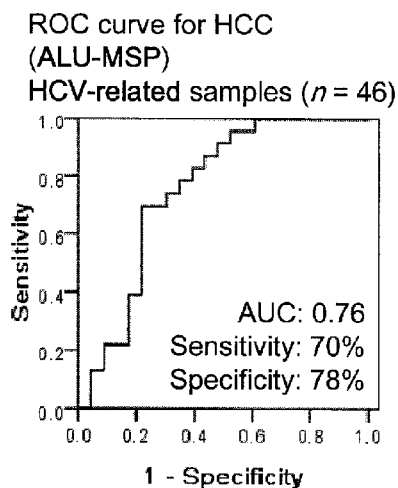
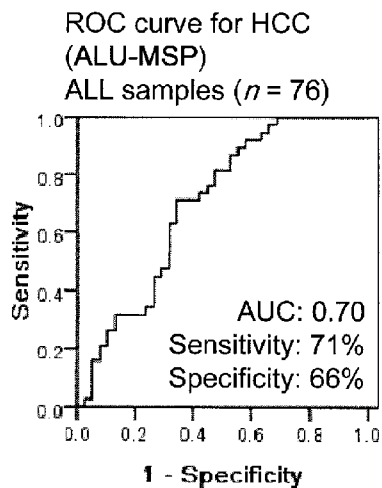
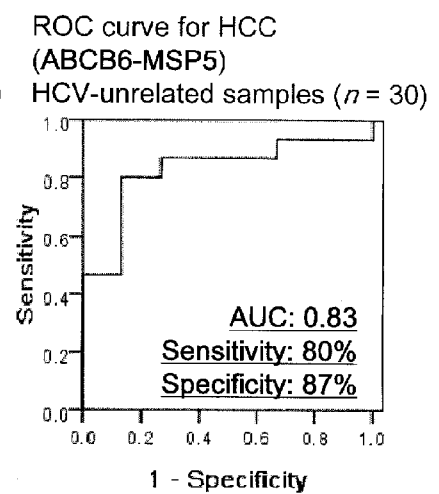
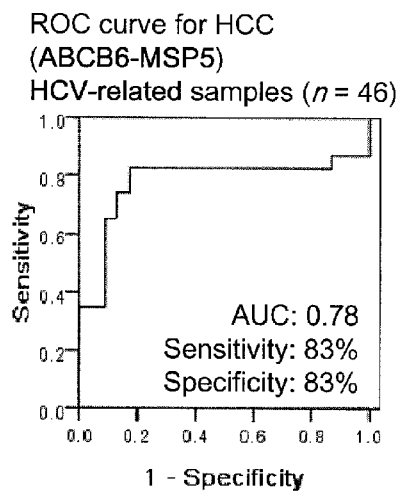
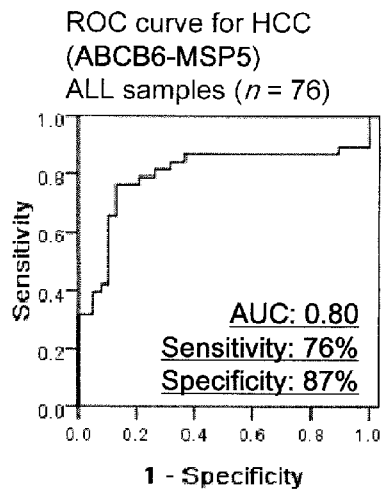
[図14]



[圖15]



[16]



ABCB6 methylation

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/001905

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/68(2006.01) i, C12N15/09(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		
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) CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EMADI-KONJIN, H. et al., Isolation of a genomic clone containing the promoter region of the human ATP binding cassette (ABC) transporter, ABCB6, Biochimica et Biophysica Acta, 2001, Vol.1574, pp.117-130	7-9
Y	JP 2009-517064 A (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICAL (INSERM)), 30 April 2009 (30.04.2009), claims; table 7 & WO 2007/063118 A1 & US 2010/0015605 A1 & EP 1830289 A1	7-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 May, 2011 (11.05.11)		Date of mailing of the international search report 24 May, 2011 (24.05.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/001905

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

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KUWANO, M. et al., The basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-1) and angiogenesis-related factors in human malignancies, Cancer Sci., 2003, Vol.94, No.1, pp.9-14	7-9
Y	TO, K. K. W. et al., Aberrant Promoter Methylation of the ABCG2 Gene in Renal Carcinoma, Molecular and Cellular Biology, 2006, Vol.26, pp.8572-8585	7-9
Y	Morimasa WADA et al., "Boko Gan no DNA methyl-ka Ijo to Rinsho Oyo", Gendai Iryo, 2003, vol.35, no.5, pages 1061 to 1072	7-9
P,X	Ryoichi TSUNETOMI et al., "ABCB6 Idenshi ni Motozuku HCV Kanren Kan Saibo Gan no Yogo Yosoku", Yamaguchi Medical Journal, 2010.12, vol.59, no.5/6, page 248	7-9
P,X	TSUNEDOMI, R. et al., Methylation levels of ABCB6 gene might serve as a useful predictive biomarker for early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma, Journal of Japanese Biochemical Society, 2010.12, BMB2010 Shoroku CD, #4P-0958	7-9



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2011/001905

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 1-6  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The inventions set forth in claims 1 to 6 pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

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		
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		
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		
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) CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
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	EMADI-KONJIN, H. et al., Isolation of a genomic clone containing the promoter region of the human ATP binding cassette (ABC) transporter, ABCB6, Biochimica et Biophysica Acta, 2001, Vol. 1574, pp. 117-130	7-9
Y	JP 2009-517064 A (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICAL (INSERM)) 2009.04.30, 特許請求の範囲、表 7 & WO 2007/063118 A1 & US 2010/0015605 A1 & EP 1830289 A1	7-9
<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。		
* 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 11.05.2011	国際調査報告の発送日 24.05.2011	
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) 藤井 美穂 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 4 4 3 4

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	KUWANO, M. et al., The basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-1) and angiogenesis-related factors in human malignancies, <i>Cancer Sci.</i> , 2003, Vol.94, No.1, pp.9-14	7-9
Y	TO, K. K. W. et al., Aberrant Promoter Methylation of the ABCG2 Gene in Renal Carcinoma, <i>Molecular and Cellular Biology</i> , 2006, Vol.26, pp.8572-8585	7-9
Y	和田守正 他, 膀胱癌のDNAメチル化異常と臨床応用, <i>現代医療</i> , 2003, Vol.35, No.5, pp.1061-1072	7-9
P, X	恒富亮一 他, ABCB6 遺伝子に基づくHCV関連肝細胞癌の予後予測, <i>山口医学</i> , 2010.12, Vol.59, No.5/6, p.248	7-9
P, X	TSUNEDOMI, R. et al., Methylation levels of ABCB6 gene might serve as a useful predictive biomarker for early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma, <i>生化学</i> , 2010.12, <i>BM B 2 0 1 0 抄録CD</i> , #4P-0958	7-9

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 1-6 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項1-6に係る発明は、人体の診断方法に関するものであるから、国際調査をすることを要しない。
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。