

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02014/156527

発行日 平成29年2月16日 (2017. 2. 16)

(43) 国際公開日 **平成26年10月2日 (2014. 10. 2)**

| | | |
|--------------------------------|----------------------|-------------|
| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| C 1 2 Q 1/68 (2006. 01) | C 1 2 Q 1/68 Z N A A | 4 B O 2 4 |
| C 1 2 N 15/00 (2006. 01) | C 1 2 N 15/00 | 4 B O 6 3 |

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)

| | | | |
|--------------|------------------------------|----------|--|
| 出願番号 | 特願2015-508225 (P2015-508225) | (71) 出願人 | 504157024 国立大学法人東北大学 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 |
| (21) 国際出願番号 | PCT/JP2014/055698 | (74) 代理人 | 110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所 |
| (22) 国際出願日 | 平成26年3月5日 (2014. 3. 5) | (72) 発明者 | 森 隆弘 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2013-68907 (P2013-68907) | Fターム(参考) | 4B024 AA12 CA04 CA20 4B063 QA01 QA19 QQ42 QR08 QR62 QS25 |
| (32) 優先日 | 平成25年3月28日 (2013. 3. 28) | | |
| (33) 優先権主張国 | 日本国 (JP) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 食道癌の発症リスクを判定する方法及びキット

(57) 【要約】

本発明が解決すべき課題は、遺伝子診断により被験者における食道癌の発症リスクを判定するための新規の指標を提供することである。本発明は、被験者の B A P 1 遺伝子における変異を検出し、該変異が検出された被験者を食道癌の発症リスクが存在すると判定する、食道癌の発症リスクを判定する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者の B A P 1 遺伝子における変異を検出し、該変異が検出された被験者を食道癌の発症リスクが存在すると判定する、食道癌の発症リスクを判定する方法。

【請求項 2】

前記変異が、B A P 1 遺伝子のイントロン 9 の塩基配列 ctct から塩基配列 ct または tc が欠失したものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 B A P 1 遺伝子の変異が、生殖細胞系列の遺伝子変異である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

B A P 1 遺伝子における変異を検出するための手段を含む、食道癌の発症リスクを判定するためのキット。

【請求項 5】

前記変異が、B A P 1 遺伝子のイントロン 9 内の塩基配列 ctct から塩基配列 ct または tc が欠失したものである、請求項 4 に記載のキット。

【請求項 6】

被験者の B A P 1 遺伝子における変異を検出し、該変異が検出された被験者を食道癌の発症リスクが存在すると判定する、食道癌の発症リスクを判定する工程、及び前記工程により、食道癌の発症リスクが存在すると判定された被験者に、食道癌を発見するための診断を行う工程を含む、食道癌の診断方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、食道癌の発症リスクを判定する方法及びそのキットに関する。

【背景技術】

【0002】

遺伝子診断は、癌、糖尿病等の疾患のリスクを判定するのに有用であり、疾患の予防、早期発見の観点から非常に重要である。

【0003】

BAP1 (BRCA1 associated protein-1) は細胞周期に關与する蛋白質であり、癌抑制遺伝子として知られている。特許文献 1 には、B A P 1 遺伝子の変異によって、癌になりやすい旨が記載されている。乳癌患者、腎臓明細胞癌患者、卵巣癌患者において、B A P 1 遺伝子のイントロン部分に生殖細胞系列変異が見つかった旨が開示されている。また、イントロン 6 の変異によって、スプライシング工程でエクソン 7 が転写されなくなる (スキップされる) ことが開示されている。しかし、BAP1 と悪性黒色腫、乳癌、腎臓明細胞癌、卵巣癌以外の癌との関連性については知られていない。

【0004】

一方、食道癌のリスクファクターとしてはアルコール等が知られており、アルコール分解酵素の活性が低いと食道癌のリスクが高くなることが知られている。

【0005】

しかし、食道癌は自覚症状があまりなく早期発見の困難な癌種であり、また現在知られている遺伝子診断法でも食道癌の十分なリスク評価はできず、例えば、複数の診断法を組み合わせることにより精度の高いリスク評価が可能となるため、食道癌のリスクを評価するための新たな指標の開発が所望されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献 1】W O 2 0 1 2 / 1 1 2 8 4 6

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明が解決すべき課題は、遺伝子診断により被験者における食道癌の発症リスクを判定するための新規の指標を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、上記のような状況の下、鋭意研究を重ねた結果、多種多様な遺伝子のなかから、BAP1遺伝子上の変異が食道癌のリスク判定の指標となり得ることを見出した。本発明は当該新規の知見に基づくものである。

10

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、これまで知られていた食道癌のリスク判定で用いられてきたものとは全く異なるBAP1遺伝子上の変異を指標として用いた、食道癌のリスク判定法を提供することができる。食道がんは初期症状に乏しく、早期発見が難しいため、本発明の方法は、非常に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】実施例1において発見されたBAP1遺伝子のイントロン領域にある2塩基欠失を示す

20

【図2】実施例3におけるReal time PCRの結果を示す

【図3】実施例5のfunctional splicing assay法におけるプラスミド設計の概略を示す

【図4】実施例5のfunctional splicing assay法の結果を示す。(ヒト293T細胞におけるファンクショナルスプライシングアッセイの結果(3つの独立した試験))

【図5】実施例5のfunctional splicing assay法の結果を示す。図5上：ファンクショナルスプライシングアッセイ及び各々の転写産物の予想されるサイズ。図5下：TaqMan probeを用いたエクソン10の転写の定量

【図6】図6～9は、BAP1遺伝子の塩基配列を示す(配列番号1)

【図7】図6～9は、BAP1遺伝子の塩基配列を示す(配列番号1)

【図8】図6～9は、BAP1遺伝子の塩基配列を示す(配列番号1)

30

【図9】図6～9は、BAP1遺伝子の塩基配列を示す(配列番号1)

【発明を実施するための形態】

【0011】

食道癌の発症リスクを判定する方法

本発明は、被験者のBAP1遺伝子における変異を検出し、該変異が検出された被験者を食道癌の発症リスクが存在すると判定する、食道癌の発症リスクを判定する方法を提供する。

【0012】

本発明において、「(食道癌の)発症リスクの判定」とは、将来食道癌を発症する可能性の有無の判定することを意味する。「判定」は、「検査」と換言することもできる。

40

【0013】

被験者(被験対象)は、特に限定されるものではないが、ヒトを含む哺乳類が例示される。非ヒト哺乳類としては、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ウマ等が挙げられる。本発明の判定方法の好ましい被験対象は、ヒトである。被験対象の性別、年齢、人種は特に限定されない。

【0014】

本発明において「遺伝子」とは、特に言及しない限り、2本鎖DNA、1本鎖DNA(センス鎖又はアンチセンス鎖)、及びそれらの断片が含まれる。また、本発明において「遺伝子」とは、特に言及しない限り、調節領域、コード領域、エクソン、及びイントロンを区別することなく示すものとする。

50

【 0 0 1 5 】

また、本明細書中において、「ヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」は、核酸と同義であって、DNAおよびRNAの両方を含むものとする。また、これらは2本鎖であっても1本鎖であってもよく、ある配列を有する「ヌクレオチド」（または「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド」）といった場合、特に言及しない限り、これに相補的な配列を有する「ヌクレオチド」（または「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」）も包括的に意味するものとする。さらに、「ヌクレオチド」（または「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」）がRNAである場合、配列表に示される塩基記号「T」は「U」と読み替えられるものとする。

【 0 0 1 6 】

本発明において、BAP1遺伝子としては、配列番号1で表される塩基配列が挙げられる（図6～9）。本発明において、食道癌の発症リスクの指標となるBAP1遺伝子の変異とは、配列番号1で表される塩基配列に対し少なくとも1個（好ましくは1～3個）の塩基が欠失、置換、付加及び/又は挿入されていること、好ましくは少なくとも1個（好ましくは1～3個）の塩基が欠失していることを意味する。食道癌の発症リスクの指標となるBAP1遺伝子の変異が2個以上の塩基の場合、それらの塩基は連続していることが好ましい。BAP1遺伝子の変異としては、将来の悪性腫瘍発生のリスク診断の観点からは生殖細胞系列の遺伝子変異を指標とすることが好ましい。

【 0 0 1 7 】

BAP1遺伝子は、17個のエクソン及び16個のイントロンを有し、本発明の好ましい実施形態において、当該BAP1遺伝子の変異としては、9番目のイントロンであるイントロン9における変異が挙げられる。本発明の好ましい実施形態において、当該BAP1遺伝子の変異としては、当該BAP1遺伝子のイントロン9内の塩基配列ctctから塩基配列ctまたはtcが欠失したものが挙げられる。また当該変異は、Human Genome variation societyが規定する表記（<http://www.hgvs.org/mutnomen/examplesDNA.html#del>）のうち、nucleotide numbering coding DNA Reference Sequenceに従えば、c.784-26～c.784-23の塩基配列ctctから塩基配列ctまたはtcが欠失したものと換言することができる。当該欠失は、塩基配列ctctの5'の塩基配列ctが欠失したものでも、塩基配列ctctの3'の塩基配列ctが欠失したものでも、塩基配列ctctの中央の塩基配列tcが欠失したものでよい。これらの欠失により、いずれの場合もBAP1遺伝子のイントロン9内の塩基配列ctctは、塩基配列ctとなる。

【 0 0 1 8 】

本発明において、特に明記しない限り、塩基配列及び遺伝子変異の記載法についてはHuman Genome Variation Societyが2013年1月26日に改訂したDescription of sequence changes: examples DNA-levelのnucleotide numbering coding DNA Reference Sequenceに従った。ここで、nucleotide numbering coding DNA Reference Sequenceの表記法に従うと、エクソンに含まれる塩基配列Xは、5'UTR及びイントロンを除いたコーディング領域の塩基のうちX番目であることを意味する。ここでBAP1遺伝子のコーディング領域は、配列番号1でいう116～152番目、251～280番目、386～440番目、1388～1520番目、1917～2036番目、2534～2595番目、2678～2820番目、3087～3165番目、3618～3741番目、4082～4229番目、4700～4884番目、5408～5541番目、6100～6578番目、6696～6856番目、7123～7215番目、7320～7392番目、及び7573～7706番目の塩基配列で表される。従って、例えば、エクソン3の最初の塩基（配列番号1でいう386番目の塩基g）は、nucleotide numbering coding DNA Reference Sequenceの表記法に従うと、c.68と表記される。イントロンの場合、直前のエクソンの最後の塩基よりいくつ後にあるか、または直後のエクソンの最初の塩基よりいくつ前にあるかで示される。例えば、イントロン2のうち最後から10個目の塩基（配列番号1でいう376番目の塩基c）は、c.68-10と表記される。

【 0 0 1 9 】

また、本発明において、BAP1遺伝子中の塩基は、特に明記しない限り、nucleotide

10

20

30

40

50

numbering coding DNA Reference Sequenceを参照配列として特定した塩基を示す。従って、被験者の検体におけるBAP1遺伝子に、本発明で食道癌の発症リスク判定の指標とする変異以外にも1個又は複数の塩基の付加、欠失、置換等の変異が存在する場合も、配列番号1を参照配列として特定した遺伝子座にある塩基に対応する塩基を示す。例えば、検体のBAP1遺伝子において配列番号1でいう4059~4081番目の塩基配列の領域に1個又は複数の塩基の付加、欠失等があっても、「検体のBAP1におけるnucleotide numbering coding DNA Reference Sequenceの表記法でc.784-26~c.784-23の塩基配列」とは、配列番号1でいう4056~4059番目のctctに対応する塩基配列を意味する(図6)。

【0020】

BAP1遺伝子のイントロン9内の塩基配列ctctとは、BAP1遺伝子のイントロン9内の塩基配列tttctcctctgagcc(配列番号2)における7~10番目の塩基配列ctctと換言できる。

【0021】

BAP1における変異を検出する方法としては、特に限定されず、例えば、サザンプロット法、ノーザンプロット法、PCRを使用する方法等が挙げられる。PCRを使用する方法としては、変異を含むオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる方法、PCRとシーケンスとを組み合わせる方法、PCR-SSCP法、PCR後に制限酵素を利用する方法、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブ(ASO)を利用する方法等が挙げられ、real time PCR法、PCRとシーケンスとを組み合わせる方法等が好ましい。

【0022】

変異を含むオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いるPCR法を用いる場合、BAP1遺伝子中における所定の変異部位を含むオリゴヌクレオチドをプライマーの一方に用いる。そして、当該プライマーを用い、BAP1遺伝子が所定の変異部位を有する場合に、BAP1遺伝子中の当該変異部位を含む部分が増幅され、かつ、BAP1遺伝子が所定の変異部位を有さない場合に当該部分が有意に増幅されないような条件をあらかじめ設定しておく。当該設定された条件で検体をPCRにかけ、BAP1遺伝子中の当該変異部位を含む部分が増幅されるか否かで変異の有無を決定する。当該方法においてreal time PCR法を用いると、短時間で評価ができ、簡便なため、特に初期のスクリーニング等として有効である。real time PCR法を用いる場合には、例えば、RFU(相対蛍光単位)等により示される目的のヌクレオチドの濃度が閾値を超えるまでのサイクル数を指標とし、当該サイクル数があらかじめ設定したcut off値よりも小さい場合に変異を有するとし、当該サイクル数があらかじめ設定したcut off値以上の場合もしくは目的のヌクレオチドの濃度が閾値を超えなかった場合に変異を無とする。

【0023】

PCRとシーケンスとを組み合わせる方法としては、所定の変異をはさむ位置にプライマーセットを設計し、当該プライマーを用いて検体をPCRにかけ、増幅したヌクレオチドの塩基配列をシーケンスにより決定する方法が挙げられる。

【0024】

本発明において、変異の検出に用いるプローブ又はプライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドの塩基数は、15~50塩基、好ましくは、15~40塩基、より好ましくは18~23塩基、より好ましくは19~22塩基である。

【0025】

各検出方法に用いる検体は、本発明の判定方法の被験対象に由来する。検体は被験対象に由来する血液検体を好適に使用することができ、血液検体には、例えば血液(全血)及び血液に由来する血清、血漿、白血球などが含まれる。本発明の好ましい態様の一つにおいて、検体は全血または白血球である。

【0026】

検体は、当業者に公知の方法で採取することができる。例えば、血液は、注射器などを用いた採血によって採取することができる。なお、採血は、医師、看護師などの医療従事

10

20

30

40

50

者が行うことが望ましい。血清は、血液から血球及び特定の血液凝固因子を除去した部分であり、例えば、血液を凝固させた後の上澄みとして得ることができる。血漿は、血液から血球を除去した部分であり、例えば、血液を凝固させない条件下で遠心分離に供した際の上澄みとして得ることができる。白血球は、血液から血清および血餅を除去した部分であり、例えば、全血を遠心分離し、中間層としてのbuffy coatとして得ることができる。検体はこれらのものに限られず、公知の方法により全血から抽出されたgenomic DNAも対象となり得る。検体は、被験対象の動脈由来、静脈由来、末梢血管由来のいずれであってもよい。

上記方法により、食道癌の発症リスクが存在すると判定された被験者には、上記BAP1遺伝子の変異を検出する方法以外の方法で食道癌の診断を行うことが有効である。例えば、上部消化管内視鏡検査、上部消化管透視（バリウム）検査等の診断方法を行うことが有効であり、これらの診断方法を定期的に行うことにより食道癌の早期発見が期待できる。

従って、本発明は、被験者のBAP1遺伝子における変異を検出し、該変異が検出された被験者を食道癌の発症リスクが存在すると判定する、食道癌の発症リスクを判定する工程、及び

前記工程により、食道癌の発症リスクが存在すると判定された被験者に、食道癌を発見するための診断を行う工程を含む、食道癌の診断方法も提供する。

【0027】

食道癌の発症リスクを判定するためのキット

本発明は、BAP1遺伝子における変異を検出するための手段を含む、食道癌の発症リスクを判定するためのキットを提供する。

【0028】

BAP1遺伝子における変異を検出するための手段としては、特に限定されないが、例えば、前述したサザンブロット法、ノーザンブロット法、PCRを使用する方法等に用いる手段を挙げることができる。好ましくは、当該BAP1遺伝子における変異を検出するための手段には、プライマー又はプローブとして、変異を有するBAP1遺伝子における当該変異部位を含むオリゴヌクレオチドが含まれ得る。

【0029】

また、本発明のキットには、必要に応じて他の成分を含めることができる。他の成分は、例えば検体を採取するための道具（例えば、注射器等）、ポジティブコントロール試料及びネガティブコントロール試料などが挙げられるが、これに限定されない。上記判定方法を行うための手順を書き記した書面等を含むこともできる。

【実施例】

【0030】

実施例1

本発明者は、倫理委員会承認の元に（承認番号；2005-124、2008-31、2011-80、2011-432、2012-442）食道扁平上皮癌患者69名の切除標本（腫瘍部および正常粘膜部）からgenomic DNAを抽出し研究を行ってきた。具体的には、直接シーケンス法により、上記末梢血白血球由来または切除標本中のBAP1遺伝子中の変異を調べた。

【0031】

この研究の結果、これまでに報告の無い、BAP1遺伝子のイントロン領域にある2塩基欠失を発見した（図1）。これはイントロン9に存在し、イントロン9とエクソン10のexon-intron junctionの上流23塩基のCTの欠失である。尚、25塩基上流のCTまたは24塩基上流のTCの欠失でも結果として同じ塩基配列になるため、これら3種類のいずれかの欠失が生じていることが分かる。

【0032】

実施例2 real time PCR法によるスクリーニング法の確立

real time PCR法（Biorad社）を応用した迅速で簡便なスクリーニング法を確立した。

具体的には、実施例 1 で示した 2 塩基欠失に特異的に反応する PCR プライマー (5' -GGGTC TACCCTTTCTCCTGA-3' (配列番号 3) 及び 5' -GTCCACAAGAGGTCCCAAAC-3' (配列番号 4)) を作成し、この変異を有する DNA (ポジティブコントロール、No. 122 の検体) 又はこの変異を有さない正常配列の DNA (No. 170 の検体) を template として、アニール温度を 60 から 75 まで変動させて、realtimePCR 解析をおこなった。その結果、RFU が閾値を超えるまでのサイクル数を 30 回で cut off とするとアニール温度が 69 で変異ありの DNA で陽性、変異無しの正常塩基配列の DNA で陰性の結果を得た。なお、このスクリーニング方法が有用であることは直接シーケンス法によって確認することが出来た。すなわち、下記実施例 3 において 2 例の PCR 陽性例ではいずれも当該 2 塩基欠失を確認し、PCR 陰性のうち、ランダムに抽出した 29 例はいずれも正常の塩基配列であった。

10

【0033】

なお、この RealtimePCR の詳細は以下の通りである：

反応液：10 μ l

反応液組成：テンプレート DNA 20 ng (ナノグラム)、プライマー DNA (20 μ M) 各々 0.25 μ L、SsoAdvanced SYBR Green Supermix 5 μ L (Bio-rad 社製)

温度設定：

1: 95.0 for 3:00

2: 95.0 for 0:01

3: 69.0 for 0:30

Plate Read

4: GOTO 2, 39 more times

20

実施例 3

上記条件に従い、実施例 1 及び 2 で検査したのとは別の食道扁平上皮癌患者 217 例 (各検体を ST1 ~ ST217 とする) の末梢血白血球由来の genomic DNA をスクリーニングした。Real time PCR の結果を図 2 に示す。その結果、上記ポジティブコントロールとした No. 122 の検体と、ほぼ同じサイクル数で ST28 と ST166 で陽性の結果を得た。尚、この 2 例については direct sequence 法により、2 塩基欠失を持つことを確認した。食道扁平上皮癌患者 217 例中、ST28 及び ST166 以外の 215 例については、Real time PCR の結果、陰性であった。陰性例はランダムに選択した 29 例で同様にシーケンスを行い、2 塩基欠失を持たないことを確認した。

30

【0034】

実施例 4

前述の実施例 1 ~ 3 に示すように、食道扁平上皮癌患者 286 名中、4 名において、イントロン 9 とエクソン 10 の exon-intron junction の上流 23 塩基の CT の欠失が見られた。

【0035】

一方、米国政府機関 (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA、以下 NCBI) の発行する遺伝子多型の検索サイト (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=SNP&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome) で検索したが、この変異の報告は正常人 1089 名ではない。この情報から統計学的解析を行うと Chi 二乗検定では $p < 0.001$ 、Fisher の正確法検定では $p = 0.002$ で有意に食道扁平上皮癌患者と相関があるとの結果であった。

40

【0036】

以上の結果から、この遺伝子変異 (あるいは多型) を上記に示した迅速かつ簡便な方法で末梢血白血球由来の genomic DNA で検出することにより、将来の食道扁平上皮癌発生のリスクを明らかにすることが出来ることが分かる。高リスクと診断されれば、内視鏡検査などにより早期発見が可能となり、その結果として、リスクが高く、また術後の愁訴も極めて多い食道切除術の回避、あるいは副作用のリスクも高く、そのための支持療法や抗がん薬や分子標的薬に代表される高額医薬品による医療費の高騰に繋がる放射線化学療法の

50

抑制も可能となる。個人および社会にとって、極めて意義の大きい発見であると考えられる。

【 0 0 3 7 】

実施例 5

前述のイントロン 9 における変異は、Genome における位置からは splicing に影響を与える可能性が予想される。これを直接、評価するために、functional splicing assay 法を使用し (図 3 および参考文献 ; Determination of splice-site mutations in Lynch syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer) patients using functional splicing assay Hiromu Naruse et al. Familial Cancer DOI 10.1007/s10689-009-9280-6)、このイントロン内の 2 塩基欠失の生物学的意義を評価した。上記文献に沿って、functional splicing assay を行い、電気泳動で評価したところ、2 塩基欠失を導入した場合、正常の塩基配列をもつプラスミドに比べて、エクソン 10 の転写効率が著しく低下することが示された (図 4 及び 5)。

10

以上から病的な意義、すなわち、2 塩基欠失ではエクソン 10 の転写効率が低下しているために食道扁平上皮癌発癌の可能性が高まっていると考えられる。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 3 8 】

食道癌を含め癌の早期発見に対する要望は非常に大きいところ、本発明は、新規な食道癌リスクの判定方法を提供するものであるため、産業利用上、非常に有用である。

【 配列表フリーテキスト 】

20

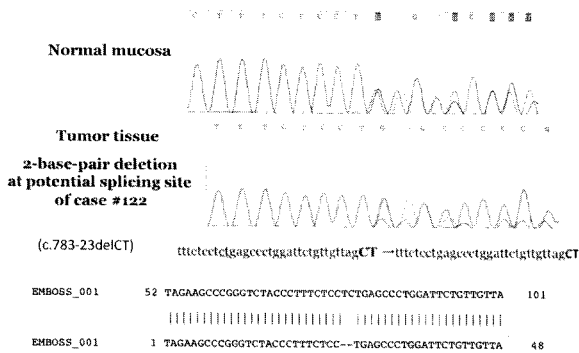
【 0 0 3 9 】

配列番号 3 はプライマーである。

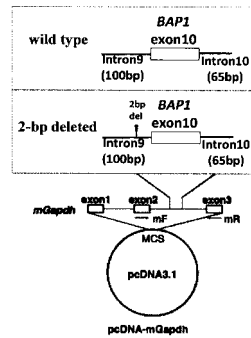
【 0 0 4 0 】

配列番号 4 はプライマーである。

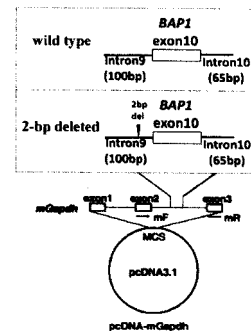
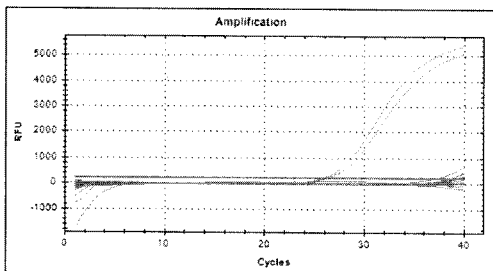
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 9 】

続き

```
8401 ctgtgaactg tcttccttgt tctagccagg ctgttcaaga ctgctctcca tagcaaggtt
8461 ctagggtctt tcgccctcag tgttgtggcc ctagctatgg gccataattg ggetctaggt
8521 ctctgtccct ggcgcttgag gctcagaaga gccctctgtcc agcccctcag tattaccatg
8581 tctccctctc aggggttagca gagacaggtt tgcttatagg aagctggcac cactcagcgc
8641 ttccctctac tccagtttcc tcagcctctg caagcactc aggggtggggg acaqcaqgat
8701 caagacaacc cgttggagcc cctgtgttcc agaggacctg atgccaaagg gtaatgggcc
8761 cagcagtgcc tetggagccc agcccacaac acagcccat gccctctgcc agatgclll
8821 gaaaaaggtg atccsagcag gccctttat ctgtacatag tgactgagtg gggggtgctg
8881 gcaagtgtgg cagctgctc tgggtgagc acagcttgac cctctagcc cctgtaata
8941 ctggatcaat gaatgaataa aactctcta agaactcct gagaaa
```

【 配列表 】

2014156527000001.app

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/JP2014/055698 |
|--|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/00(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) C12Q1/00-3/00, C12N15/00-15/90 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 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JdreamIII) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 2012/112846 A2 (FOX CHASE CANCER CENTER), 23 August 2012 (23.08.2012), claims; page 13, line 31 to page 14, line 2 (Family: none) | 1-5 |
| A | ABDEL-RAHMAN et al., Germline BAP1 mutation predisposes to uveal melanoma, lung adenocarcinoma, meningioma, and other cancers, Journal of Medical Genetics, 2011, Vol.48, p.856-859 | 1-5 |
| A | TESTA et al., Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma, Nature Genetics, 2011, Vol.43, No.10, p.1022-1025 | 1-5 |
| <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 16 May, 2014 (16.05.14) | | Date of mailing of the international search report 27 May, 2014 (27.05.14) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | | Authorized officer |
| Facsimile No. | | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/055698

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | PENA-LLOPIS et al., BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma, Nature Genetics, 2012, Vol.44, No.7, p.751-759 | 1-5 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/055698

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.: 6
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 6 pertains to a method for diagnosing esophageal cancer and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to 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.

| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 5 5 6 9 8 | | | | | | | | | |
|---|---|--|---------|-----------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| 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, C12N15/00(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. C12Q1/00-3/00, C12N15/00-15/90 | | | | | | | | | | | |
| 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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014年</td> </tr> </table> | | | | 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | 日本国公開実用新案公報 | 1971-2014年 | 日本国実用新案登録公報 | 1996-2014年 | 日本国登録実用新案公報 | 1994-2014年 |
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | | | | | | | | | | |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2014年 | | | | | | | | | | |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2014年 | | | | | | | | | | |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2014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) GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII) | | | | | | | | | | | |
| 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 | | | | | | | | | |
| X | WO 2012/112846 A2 (FOX CHASE CANCER CENTER) 2012.08.23, 請求の範囲、第13頁第31行-第14頁第2行 (ファミリーなし) | 1-5 | | | | | | | | | |
| A | ABDEL-RAHMAN et al., Germline BAP1 mutation predisposes to uveal melanoma, lung adenocarcinoma, meningioma, and other cancers, Journal of Medical Genetics, 2011, Vol. 48, p. 856-859 | 1-5 | | | | | | | | | |
| <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 | | の日の後に公表された文献 | | | | | | | | | |
| 「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 | | 「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 | | | | | | | | | |
| 「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 | | 「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 | | | | | | | | | |
| 「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) | | 「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 | | | | | | | | | |
| 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | | 「&」同一パテントファミリー文献 | | | | | | | | | |
| 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | | | | | | | | | | | |
| 国際調査を完了した日 16.05.2014 | | 国際調査報告の発送日 27.05.2014 | | | | | | | | | |
| 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) 中根 知大 | 4N 4047 | | | | | | | | |
| | | 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 | | | | | | | | | |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 5 5 6 9 8

| 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 |
| A | TESTA et al., Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma, Nature Genetics, 2011, Vol. 43, No. 10, p. 1022-1025 | 1 - 5 |
| A | PENA-LLOPIS et al., BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma, Nature Genetics, 2012, Vol. 44, No. 7, p. 751-759 | 1 - 5 |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 5 5 6 9 8

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 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6は、食道癌の診断方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
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こ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。

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。