明　細　書

発明の名称 ：

がんの診断のためのプローブ／プライマーライブラリー

技術分野

[0001] 本発明は、がんの診断方法に関する。より具体的には、本発明は、がん（特に、食道がん、胃がん、大腸がん）の再発の早期診断に有用な、TP53遺伝子における変異を検出するためのプローブおよびプライマーに関する。

背景技術

[0002] 末梢血中に含まれる腫瘍細胞由来の循環DNA（circulating tumor DNA：ctDNA）をがんの診断のために利用する試みが検討されている。例えば、非特許文献１は、大腸に腫瘍を有し、治癒的切除を受けた44人の個体からの手術前および手術後の血漿、原発腫瘍、ならびに抹梢血単核細胞（PBMC）を含むサンプルからDNAを抽出し、腫瘍特有の変異、腫瘍の変異スペクトル、および腫瘍の治癒的切除後のctDNAにおける変異のアレル頻度の変化等について検討している。また特許文献１および２は、腫瘍量をモニタリングするための方法において、患者の血液サンプル中の変異を有する遺伝子のDNAフラグメントのコピー数を測定し、該コピー数をその患者における腫瘍量の指標とすることを提案する。また特許文献３は、K-ras遺伝子変異の検出方法として、PNA-Clamping法とダイレクトシークエンスを組み合わせた方法を提案し、この方法に拠ればがん組織に代わる検査材料として血液を用いて、患者におけるK-ras遺伝子に対する分子標的薬の治療感受性を評価できると述べている。さらに特許文献４は、非侵襲的に卵巣明細胞腺がんを診断する方法として、いくつかの染色体DNA領域における増幅または欠失が卵巣明細胞腺がんの発症、悪性度、予後等と関連を有するとの知見に基づき、これらの増幅または欠失の検出を行うことを提案するが、患者から取得する染色体DNAは、血液から抽出してもよいことを記載している。

[0003] 一方、がん抑制遺伝子の一つとして知られるものの一つにTP53遺伝子があ

る。TP53遺伝子の変異をがんの診断・治療のためのバイオマーカーとして利用することが検討されている。例えば非特許文献２は、高悪性度漿液性卵巣がん（high-grade serious ovarian carcinoma: HGSOC）を有する患者において、治療開始時の末梢血中に含まれる腫瘍細胞由来の循環DNA（circulating tumor DNA：ctDNA）が腫瘍の体積と相関し、また化学療法の1サイクル後のTP53変異対立遺伝子画分（TP53 mutant allele fraction: TP53MAF）が治療前と比較して60％に満たない減少率であった場合、無増悪期間の短縮に関連することを報告し、これらの結果が、ctDNA のHGSOCにおける早期分子応答マーカーとしての可能性を示すものであると述べている。

[0004] 非特許文献１においては、ctDNAの検出にはデジタルPCR(dPCR)が用いられている。dPCRは、プライマーで増幅したDNA断片中の特異的配列（通常は１塩基）に相補的なプローブを使用して、特異的配列を高感度(0.01%-1%)で検出するものである。特異的配列の高感度検出は、医療分野、特にがん診断において注目されているが、診断に必要な感度、費用、検査時間、および繰り返し検査が必要であるという特性の面で対応できるほぼ唯一の技術がdPCRである。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表2011-529691号公報

特許文献2：特開2016-104010号公報

特許文献3：特開2012-135290号公報

特許文献4：特開2016-198027号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Sato et al, PLoS One, 2016: PMID: 26727500

非特許文献2：Parkinson et. al., PLoS Med 13(12), 2016: e1002198

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 従来、ctDNAの検出に際し、目的とする特異的配列は、先行するシークエンス解析、公的データベース、文献などから決定することができるが、dPCRによる高感度検出に際しては、まずプライマーとプローブを設計し、合成する必要がある。一般に、特異的配列は個人や病態によって異なるため、その種類は膨大である一方で集団での頻度が低く、合成したプローブが使用できる対象は限られている。実際に、市販のdPCRプローブは連続する塩基配列に対して飛び飛び、すなわち間歇的にデザインされており、一部の高頻度の特異的配列を対象としたもの以外では汎用性に乏しい。そのため、対象患者において腫瘍細胞由来の固有の変異が特定されても、既存のdPCRプローブが利用できず、迅速に診断することは困難である。

課題を解決するための手段

[0008] したがって、多くの変異に対応できるように、dPCRプローブが網羅的に準備されていることが望ましく、またあらゆる変異に対応できるようにdPCRプローブが非間歇的に準備されていることがさらに望ましい。

[0009] 一方、本発明者らは、およそ50%のヒトがんで確認されるTP53遺伝子の変異に着目した。TP53遺伝子の変異は、肺がん、胃がん、大腸がん、乳がんなどで特に高頻度で確認されているが、本発明者らの検討によると、日本人の食道がん、胃がん、大腸がんでは、87%に変異があることがわかっている。

[0010] また本発明者らは、実際に、個々の症例特異的変異を検出するためのTP53遺伝子を対象とした29組のdPCR用のプローブおよびプライマーセットを設計し、合成した。またこのようなプローブ／プライマーセットからなるライブラリーから幾つかのセットを選択し、がん患者の再発モニタリングに用いた。その結果、ctDNA分析により、再発を従来よりも早期に診断できる可能性があることを見出し、本発明を完成した。

[0011] 本発明は、以下を提供する。

［１］ TP53遺伝子のDNA結合ドメインをコードする領域における、がんに関連する遺伝子変異を検出するための、複数のプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対で構成されるライブラリーであって、

複数のプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対が、c.524G>A、c.743G>A、c.818G>A、c.817C>T、c.742C>T、c.844C>T、c.637C>T、c.733G>A、c.747G>T、およびc.659A>Gを検出するためのものを含む、ライブラリー。

［２］　さらに、c.586C>T、c.469G>T、c.536A>G、c.488A>G、c.527G>T、c.818G>T、c.853G>A、c.734G>A、c.722C>T、c.578A>G、c.535C>T、c.856G>A、c.584T>C、c.574C>T、c.701A>G、c.814G>A、c.711G>A、c.713G>A、c.743G>T、c.473G>A、c.646G>A、c.832C>T、c.422G>A、c.527G>A、c.455C>T、c.473G>T、c.725G>T、c.833C>T、c.614A>G、およびc.641A>Gを検出するための複数のプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を含む、１に記載のライブラリー。

［３］　さらに、c.734G>T、c.451C>T、c.797G>A、c.839G>A、c.839G>C、c.707A>G、c.733G>T、c.517G>T、c.404G>A、c.581T>G、c.796G>A、c.517G>A、c.380C>T、c.395A>G、c.824G>A、c.404G>T、c.730G>T、c.577C>T、c.638G>T、c.749C>T、c.772G>A、c.578A>T、c.824G>T、c.736A>G、c.797G>T、c.476C>T、c.725G>A、c.461G>T、c.481G>A、c.731G>A、c.638G>A、c.713G>T、c.715A>G、c.406C>T、c.493C>T、c.536A>T、c.811G>A、c.437G>A、c.438G>A、c.592G>T、c.430C>T、c.711G>T、c.730G>A、c.746G>T、c.610G>T、c.722C>G、c.329G>T、c.745A>T、c.814G>T、c.841G>C、c.396G>T、c.836G>A、c.838A>G、c.799C>T、c.830G>T、c.583A>T、c.832C>A、c.844C>G、c.452C>A、c.548C>G、c.569C>T、c.833C>G、c.396G>C、c.475G>C、c.499C>T、c.427G>A、c.644G>T、c.775G>T、c.700T>C、c.716A>G、c.745A>G、c.841G>A、c.298C>T、c.310C>T、c.820G>T、c.763A>T、c.821T>C、c.464C>A、c.467G>C、c.542G>A、c.580C>T、c.746G>C、c.818G>C、c.845G>A、c.772G>T、c.405C>G、c.541C>T、c.832C>G、c.856G>T、c.329G>C、c.413C>T、c.514G>T、c.584T>A、c.511G>T、c.811G>T、c.375G>T、c.523C>G、c.747G>C、c.394A>G、c.487T>A、c.800G>C、c.853G>T、c.738G>A、c.742C>G、c.785G>T、c.859G>T、c.375G>A、c.454C>T、c.487T>C、c.524G>T、c.725G>C、c.794T>C、c.839G>T、c.848G>C、c.388C>G、c.528

C>G、c.535C>A、c.596G>T、c.643A>G、c.722C>A、c.796G>T、c.374C>T、c.377A>G、c.517G>C、c.523C>T、c.530C>T、c.817C>A、c.434T>A、c.463A>C、c.503A>G、c.535C>G、c.658T>A、c.700T>A、c.743G>C、c.843C>G、c.380C>A、c.400T>C、c.412G>C、c.421T>C、c.472C>T、c.473G>C、c.587G>C、c.706T>A、c.526T>A、c.526T>C、c.537T>A、c.542G>C、c.659A>C、c.731G>T、c.733G>C、c.843C>A、c.845G>C、c.857A>G、c.661G>T、c.434T>C、c.451C>G、c.490A>G、c.613T>G、c.718A>G、c.808T>C、c.809T>C、c.313G>T、c.388C>T、c.559G>A、c.623A>T、c.645T>G、c.658T>C、c.796G>C、c.809T>G、c.823T>C、c.840A>T、c.841G>T、c.847C>T、c.854A>T、c.328C>T、c.423C>G、c.451C>A、c.472C>G、c.518T>C、c.596G>A、c.755T>C、c.830G>A、c.833C>A、c.842A>G、c.497C>G、c.395A>T、c.470T>G、c.530C>G、c.578A>C、c.632C>T、c.712T>C、およびc.746G>Aを検出するための複数のプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を含む、２に記載のライブラリー。

［４］　複数のプローブにより、TP53遺伝子のDNA結合ドメインにおける585箇所のすべての変異を検出できるものである、１～３のいずれか１項に記載のライブラリー。

［５］　がんの治療後の被験者における再発または予後の予測のための、１または２に記載のライブラリー。

［６］　腫瘍細胞由来の循環DNA（circulating tumor DNA：ctDNA）を検出するための、１～５のいずれか１項に記載のライブラリー。

［７］　プローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対が、デジタルPCR用である、１～６のいずれか１項に記載のライブラリー。

［８］　プローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対が、配列番号：1～116のいずれか１つの配列からなるオリゴヌクレオチド、またはその標識物を含む、１～７のいずれか１項に記載のライブラリー。

［９］　以下の（１）～（３）の工程を含む、被験者におけるTP53遺伝子のDNA結合ドメインをコードする領域における、がんに関連する遺伝子変異を分析する方法：

（１）複数のプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対で構成されるライブラリーであって、複数のプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対が、c.524G>A、c.743G>A、c.818G>A、c.817C>T、c.742C>T、c.844C>T、c.637C>T、c.733G>A、c.747G>T、およびc.659A>Gの変異を検出するためのものを含む、ライブラリーを準備する工程、

（２）準備したライブラリーから、一の変異を検出するためのプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を選択する工程；

（３）選択したプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を用いて、被験者から得た核酸中の変異をデジタルPCRで分析する。

［１０］　がんが、食道がん、胃がん、または大腸がんである、９に記載の方法。

［１１］　選択される一の変異が、治療前の被験者の原発巣で同定された変異であり、治療後の被験者の血液から得た腫瘍細胞由来の循環DNA（circulating tumor DNA：ctDNA）中の当該変異を分析する、９または１０に記載の方法。

［１２］　下記の工程を含む、１～８のいずれか１項に記載のライブラリーの製造方法：

TP53遺伝子のDNA結合ドメインにおけるがんに関連する一の変異を検出するための、プローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を準備する工程；

前記変異とは異なる、TP53遺伝子のDNA結合ドメインにおけるがんに関連する変異を検出するための、プローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を準備する工程。

［１３］　デジタルPCRに用いるための、下記の(1)～(9)のいずれか１組のプライマー対およびプローブ対のセット：

(1)配列番号:1、2の各々の配列からなるプライマー対、および

[化1]

CCTCTGTGCGCCG*GTCT(配列番号:3)
TCCTCTGTGCGCCA*GTCT(配列番号:4)

の各々の配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物であるプローブ対、

(2)配列番号:5、6の各々の配列からなるプライマー対、および

[化2]

ACCACCACACTATGTCG*AAAAG(配列番号:7)
ACCACCACACTATGTCA*AAAAG(配列番号:8)

の各々の配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物であるプローブ対、

(3)配列番号:9、10の各々の配列からなるプライマー対、および

[化3]

TGGTGCCCTA*TGAGCCG(配列番号:11)
TGGTGCCCTG*TGAGCC(配列番号:12)

の各々の配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物であるプローブ対、

(4)配列番号:13、14の各々の配列からなるプライマー対、および

[化4]

TTGTGAGGCGCTG*CCCC(配列番号:15)
TTGTGAGGCGCTA*CCCCC(配列番号:16)

の各々の配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物であるプローブ対、

(5)配列番号:17、18の各々の配列からなるプライマー対、および

[化5]

TGTAACAGTTCCTG*CATGGGC(配列番号:19)
TGTAACAGTTCCTT*CATGGGC(配列番号:20)

の各々の配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物であるプローブ

対、

(6)配列番号:21、22の各々の配列からなるプライマー対、および

[化6]

TGGAGTA*TTTGGATGACAGAAACA(配列番号:23)
TGGAGTG*TTTGGATGACAGAAAC(配列番号:24)

の各々の配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物であるプローブ対、

(7)配列番号:25、26の各々の配列からなるプライマー対、および

[化7]

CCTCCGTCATGTGCTG*TGA(配列番号:27)
ACCTCCGTCATGTGCTA*TGA(配列番号:28)

の各々の配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物であるプローブ対、

(8)配列番号:29、30の各々の配列からなるプライマー対、および

[化8]

CCCTGGTAGGTTTTCTG*GGAAG(配列番号:31)
TGCCCTGGTAGGTTTTCTA*GGAAG(配列番号:32)

の各々の配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物であるプローブ対、ならびに

(9)配列番号:33、34の各々の配列からなるプライマー対、および

[化9]

ACCTCAA*AGCTGTTCCGTCC(配列番号:35)
CCTCAC*AGCTGTTCCGTCC(配列番号:36)

の各々の配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物であるプローブ対（但し、囲んだ箇所は修飾ヌクレオチドであり、*は変異の位置に対応したヌクレオチドを示す。）。

［１４］　デジタルPCRに用いるための、下記のいずれか１組のオリゴヌクレオチド、またはその標識物からなる、プローブおよびプライマーのセット：

c.844の変異を検出するための配列番号:1～4の各々の配列からなるオリゴヌクレオチド、
c.637の変異を検出するための配列番号:5～8の各々の配列からなるオリゴヌクレオチド、
c.659の変異を検出するための配列番号:9～12の各々の配列からなるオリゴヌクレオチド、
c.527の変異を検出するための配列番号:13～16の各々の配列からなるオリゴヌクレオチド、
c.725の変異を検出するための配列番号:17～20の各々の配列からなるオリゴヌクレオチド、
c.614の変異を検出するための配列番号:21～24の各々の配列からなるオリゴヌクレオチド、
c.499の変異を検出するための配列番号:25～28の各々の配列からなるオリゴヌクレオチド、
c.298の変異を検出するための配列番号:29～32の各々の配列からなるオリゴヌクレオチド、および
c.809の変異を検出するための配列番号:33～36の各々の配列からなるオリゴヌクレオチド。

本発明はまた、以下を提供する。

［１］　TP53遺伝子のDNA結合ドメインにおける、がんに関連する変異を検出するための、複数のプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対で構成されるライブラリー。

［２］　がんに関連する変異が、c.298 、c.329、c.380、c.399_400 insert、c.475、c.499、c.524、c.527、c.536、exon5 splicesite_3、c.574、c.578、c.586、c.614、c.637、c.659、c.707、c.725、c.730、c.736、c.743、c.764、c.780、c.809、c.818、c.839、c.844、およびc.993からなる群から選択されるいずれかの位置の変異である、１に記載のライブラリー。

［３］　複数のプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対が

、c.524、c.527、 c.536、 c.578、 c.614、 c.637、 c.659、 c.725、 c.730、 c.743、 およびc.818からなる群より選択されるいずれかの位置の変異を検出するためのものを含む、１または２に記載のライブラリー。

［４］ 複数のプローブにより、非間歇的に変異を検出できるものである、１～３のいずれか１項に記載のライブラリー。

［５］ がんの治療後の被験者における再発または予後の予測のための、１または２に記載のライブラリー。

［６］ 腫瘍細胞由来の循環DNA（circulating tumor DNA：ctDNA）を検出するための、１～５のいずれか１項に記載のライブラリー。

［７］ プローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対が、デジタルPCR用である、１～６のいずれか１項に記載のライブラリー。

［８］ プローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対が、配列番号：１～１１６のいずれか１つの配列からなるポリヌクレオチド、またはその標識物である、１～７のいずれか１項に記載のライブラリー。

［９］ 以下の工程を含む、がんの治療後の被験者における再発または予後の予測を補助する方法 ：

１～６のいずれか１項に記載のライブラリーから、少なくとも一のプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を準備し、

準備したプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を用いて、被験者から得た核酸中の変異をデジタルPCRで分析 する。

［１０］ がんが、食道がん、胃がん、または大腸がんである、９に記載の方法。

［１１］ 治療前の被験者の原発巣で同定された変異を検出するためのプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を準備し、治療後の被験者の血液から得た腫瘍細胞由来の循環DNA（circulating tumor DNA：ctDNA）中の当該変異を分析する、

９または１０に記載の方法。

［１３］ 配列番号：1～36のいずれか１つの配列からなるオリゴヌクレオチ

ド、またはその標識物。

［１４］　下記のいずれか１組のオリゴヌクレオチド、またはその標識物からなる、プローブおよびプライマーのセット：

c.844の変異を検出するための配列番号:1～4のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチド、

c.637の変異を検出するための配列番号:5～8のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチド、

c.659の変異を検出するための配列番号:9～12のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチド、

c.527の変異を検出するための配列番号:13～16のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチド、

c.725の変異を検出するための配列番号:17～20のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチド、

c.614の変異を検出するための配列番号:21～24のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチド、

c.499の変異を検出するための配列番号:25～28のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチド、

c.298の変異を検出するための配列番号:29～32のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチド、および

c.809の変異を検出するための配列番号:33～36のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチド。

発明の効果

[0012]　本発明のライブラリーを用いることにより、消化管がん患者の約９割を診断できる。

[0013]　本発明により、治療後の再発の早期の検出が可能となる。

[0014]　本発明により、消化管がんの早期発見が期待できる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]食道がん、胃がん、または大腸がんの66例におけるTP53の変異アミノ酸

の位置。変異の位置はしばしば重複する。このような場合はデザインした一つのプローブ／プライマーセットで、複数の症例の解析が可能である。

[図2]食道がん、胃がん、または大腸がんの66例におけるTP53遺伝子の変異の位置。TP53遺伝子のExon 4～9を下線で示した。また実施例において検出のためのプローブおよびプライマーの合成をおこなった検出対象である変異位置を*でマークした。

[図3]合成した29組のプライマー／プローブについての動作確認結果。原発巣（まあるいは血漿）DNAに対し、dPCRを行った。いずれも変異アリル（青）、wild typeアリル（赤）が検出されている。

[図4]ctDNAモニタリング実験のフローチャート。原発巣の変異解析で検出された症変異に対し、wild type DNA、mutant DNAそれぞれに対するプローブを作成し、原発巣DNAを用いた動作を確認した後、患者からの治療経過中に血漿を採取して変異DNAの割合mutant allele frequency (%)を計測する。治療前血漿中の変異DNA (1) に比べ、治療後 (2) (3)では、変異DNA(青)の減少が見られる。

[図5]Stage I～Stage IVの食道がん症例における血漿中のTP53変異DNAのモニタリング。MAF, mutant allele frequency; CF, Cisplatin/5-FU; DCF, Docetaxel/Cisplatin/5-FU; CRT, chemoradiotherapy; PTX, paclitaxel。

[図6]Stage IIAの食道がんの再発症例におけるctDNAモニタリング。MAF, mutant allele frequency; CF, Cisplatin/5-FU; CRT, chemoradiotherapy。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明は、がんに関連する変異を検出するための、ライブラリーを提供する。

[0017] [ライブラリー]

ライブラリーは、複数箇所の変異を検出するための、複数のオリゴヌクレオチドの集合体をいう。複数とは、少なくとも2以上をいう。ライブラリーは、5箇所以上の変異を検出可能な集合体であることが好ましく、10箇所以上の変異を検出可能な集合体であることがより好ましく、20箇所以上の変異を検

出可能な集合体であることがさらに好ましい。TP53遺伝子のDNA結合ドメイン（195アミノ酸長）をコードする部分における変異を非間歇的に検出できるとの観点からは、ライブラリーは585箇所のすべての変異を検出できるものであることが好ましい。ライブラリーは複数箇所の変異を検出するために複数のオリゴヌクレオチドを備えるが、用い方は様々であり得る。一人の被験者について目的の変異（1箇所）を分析するために用いられる場合、例えばある患者について、治療前原発巣で検出された変異が、治療経過中に血液中に検出されるか否かを判断するために用いられる場合がある。またライブラリーは、一人の被験者について複数個所の変異を分析するために用いられる場合がある。ライブラリーはさらに、複数の被験者について目的の変異（1箇所）を分析するために用いられる場合、および複数の被験者それぞれについて複数個所の変異を分析するために用いられる場合等がある。なお本発明の説明において変異というときは、特に記載した場合を除き、塩基の（ヌクレオチドの、と表現されることもある。）変異を指す。

[0018] ライブラリーに含まれるオリゴヌクレオチドは、変異を含む部分をプライマーまたはプライマー対、および変異検出のためのプローブ等である。ライブラリーは、プライマーとして機能可能なオリゴヌクレオチドのみからなる場合もあり、プローブとして機能可能なオリゴヌクレオチドのみからなる場合もあり、双方を含む場合もある。変異を検出する際は、通常、核酸中のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により目的の変異を含む可能性のある部分をプライマーを用いて増幅し、かつ増幅産物に目的の変異があるかをプローブを用いて検出することにより行う。そのため、ライブラリーは、目的の変異に対するプローブとプライマー対とを、セットで含むことが好ましい。なお増幅産物とは、PCRにおいては、PCRで増幅されたDNAのことをいい、アンプリコン（Amplicon）と称されることもある。

[0019] ライブラリーに含まれるプローブはまた、目的の変異をしていない配列（wild type）を検出するためのものであってもよく、目的の変異後の配列（mutant）を検出するためのものであってもよい。ライブラリーは、双方のプロー

ブを備えていてもよい。

[0020] ライブラリーに含まれるプライマーは、サンプル中の核酸において、目的の変異の位置を含む部分を増幅するためのものであり、通常、プラス鎖に対応したフォワードプライマーと、マイナス鎖に対応したリバースプライマーとの対で、ライブラリーに含まれることが好ましい。

[0021] ライブラリーに含まれるプライマーおよびプローブは、がんに関連する変異を検出するためのものである。がんに関連する変異とは、がん患者の腫瘍部位由来のDNAにおいて、集団中高頻度で認められる変異をいう。変異が高頻度であるとは、がん患者の5%以上、好ましくは10%以上、より好ましくは30%以上において、当該変異が認められる場合を指す。

[0022] がんに関連する変異は、好ましくはTP53遺伝子上の変異であり、より好ましくはTP53遺伝子上の、DNA結合ドメインをコードする部分における変異である。

[0023] TP53遺伝子によってコードされるp53腫瘍抑制タンパク質（393アミノ酸からなる核内タンパク質）は、様々な細胞ストレス、例えば、DNA損傷、紫外線照射および低酸素に応答する重要な転写制御因子である。p53は、DNA修復、細胞周期進行、血管形成およびアポトーシスなどの生命維持に必要な細胞プロセスを制御しており、その活性化により、影響を受けた細胞中の様々な分子および下流経路が開始され得る。これらのp53依存性経路は、細胞周期停止またはアポトーシスを通して損傷された細胞の増殖を抑制する。p53の機能および活性の喪失または阻害は、がんの多くの症例において寄与する因子である。

[0024] ライブラリーは、好ましくは、TP53遺伝子において本発明者らの検討により高い頻度で見られることが判明している、c.298 、c.329、c.380、c.399_400 insert、c.475、c.499、c.524、c.527、c.536、exon5 splicesite_3、c.574、c.578(p.His193Argである場合とp.His193Leuである場合とを含む。）、c.586、c.614、c.637、c.659、c.707、c.725、c.730、c.736、c.743、c.764、c.780、c.809、c.818、c.839、c.844、およびc.993からなる群から選択され

るいずれかの位置の変異を検出するための、複数のプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を含む。より特定すると、ライブラリーは、TP53遺伝子において本発明者らの検討により高い頻度で見られることが判明している変異、すなわちc.298C>T、c.329G>T、c.380C>T、c.399_400 insert CAAGATG、c.475G>C、c.499C>T、c.524G>A、c.527G>A、c.536A>G、exon5splicesite_3、c.574G>A、c.578A>G、c.578A>T、c.586C>T、c.614A>G、c.637C>T、c.659A>G、c.707A>G、c.725G>T、c.730G>A、c.736A>T、c.743G>A、c.764T>C、c.780_780delC、c.809T>G、c.818G>A、c.839G>C、c.844C>T、およびc.993C>Tからなる群から選択されるいずれかの変異を検出するための、複数のプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を含む。なおいずれかという場合は、いずれか一つという場合と区別され、数についても任意であり、一つに限られず、複数であってもよい。

[0025] ライブラリーは、より好ましくは、少なくともc.524、c.527、c.536、c.578、c.614、 c.637、c.659、c.725、c.730、c.743、およびc.818からなる群より選択されるいずれかの位置の変異を検出するための、より特定するとこれらの位置における上記の特定の変異のいずれかを検出するための、複数のプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を含む。

[0026] ライブラリーは、さらに好ましくは、上述の11の位置の変異のすべてを検出するための、より特定するとこれらの位置における上記の特定の変異のすべてを検出するための、プローブおよびプライマー対のセットを含む。

[0027] p53は機能によりいくつかのドメインに分けられるが、変異が見られる頻度が最も高いのはDNA結合ドメインであり、全変異のおよそ86%を占める。本発明者らの検討によると、同定しえた40変異のうち、39変異(98%)がDNA結合ドメインに存在していた。一方、p53のDNA結合ドメインは196アミノ酸からなり、そのすべてで変異が報告されている。従って、DNA結合ドメインで起こりうる変異を網羅する、すなわちDNA結合ドメインで起こりえる変異を非間歇的に検出するためのオリゴヌクレオチドのライブラリーがあれば、相当数のがん患者に対して有効な診断を行うことができると考えられる。

[0028] したがって、特に好ましいライブラリーの一つは、DNA結合ドメインで起こりうる変異を非間歇的に検出することができるものである。このようなライブラリーは、195アミノ酸に対するコード領域の変異を対象とする。各セットが、プライマー対、wild typeに対するプローブ、mutantに対するプローブを含むとすれば、ライブラリーとしては、2,340の理論的検出対象塩基を含むこととなる。これらに対するプライマー・プローブ群を合成すれば、TP53変異を持つ90%近くのがん患者に対して有効な診断が行えるライブラリーとなり得る。したがって、特に好ましいライブラリーの一つは、p53のDNA結合ドメインで起こりうる変異を非間歇的に検出することができるものである。具体的には、2,340の理論的検出対象塩基を検出可能な、1755のプライマー・プローブのセットである。他の例は、消化器系がんで報告されている約800個の変異に対する、約800のプライマー・プローブセットである。また本発明者らの検討によると、全がんを対象とした場合（https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic）、1284種類のTP53の点突然変異のうち（のべ25,376変異）、報告数上位10種類の変異で30%のTP53変異（以下同）、20種類で40%、40種類で50%、80種類で60%、232種類で80%に対応が可能である。本発明者らは、現在、上位10種類中の4種類、上位20種類中の6種類を合成し、有用性を確認済みである。本発明者らがまとめた報告数順位を下記に示す。

[0029]

[表1]

Rank	CDS Mutation	Fraction(%)	Cumulative(%)	Rank	CDS Mutation	Fraction(%)	Cumulative(%)
1	c.524G>A	5.978	5.978	61	c.772G>A	0.276	56.529
2	c.743G>A	4.094	10.072	62	c.578A>T	0.272	56.801
3	c.818G>A	3.873	13.945	63	c.824G>T	0.268	57.069
4	c.817C>T	3.657	17.602	64	c.736A>G	0.264	57.333
5	c.742C>T	3.318	20.920	65	c.797G>T	0.264	57.597
6	c.844C>T	2.865	23.784	66	c.476C>T	0.260	57.857
7	c.637C>T	2.116	25.900	67	c.725G>A	0.260	58.117
8	c.733G>A	2.025	27.926	68	c.461G>T	0.256	58.373
9	c.747G>T	1.840	29.766	69	c.481G>A	0.256	58.630
10	c.659A>G	1.706	31.472	70	c.731G>A	0.256	58.886
11	c.586C>T	1.391	32.863	71	c.638G>A	0.252	59.138
12	c.469G>T	0.989	33.852	72	c.713G>T	0.252	59.390
13	c.536A>G	0.875	34.727	73	c.715A>G	0.248	59.638
14	c.488A>G	0.820	35.547	74	c.406C>T	0.248	59.887
15	c.527G>T	0.804	36.350	75	c.493C>T	0.244	60.131
16	c.818G>T	0.788	37.138	76	c.536A>T	0.240	60.371
17	c.853G>A	0.776	37.915	77	c.811G>A	0.240	60.612
18	c.734G>A	0.717	38.632	78	c.437G>A	0.240	60.852
19	c.722C>T	0.615	39.247	79	c.438G>A	0.225	61.077
20	c.578A>G	0.607	39.853	80	c.592G>T	0.221	61.297
21	c.535C>T	0.587	40.441	81	c.430C>T	0.217	61.514
22	c.856G>A	0.548	40.988	82	c.711G>T	0.213	61.727
23	c.584T>C	0.536	41.524	83	c.730G>A	0.213	61.939
24	c.574C>T	0.532	42.056	84	c.746G>T	0.213	62.152
25	c.701A>G	0.528	42.584	85	c.610G>T	0.213	62.365
26	c.814G>A	0.516	43.100	86	c.722C>G	0.209	62.574
27	c.711G>A	0.504	43.605	87	c.329G>T	0.205	62.779
28	c.713G>A	0.500	44.105	88	c.745A>T	0.197	62.976
29	c.743G>T	0.485	44.590	89	c.814G>T	0.197	63.173
30	c.473G>A	0.457	45.047	90	c.841G>C	0.197	63.370
31	c.646G>A	0.453	45.500	91	c.396G>T	0.189	63.559
32	c.832C>T	0.449	45.949	92	c.836G>A	0.189	63.748
33	c.422G>A	0.441	46.391	93	c.838A>G	0.189	63.937
34	c.527G>A	0.437	46.828	94	c.799C>T	0.185	64.122
35	c.455C>T	0.430	47.257	95	c.830G>T	0.185	64.308
36	c.473G>T	0.430	47.687	96	c.583A>T	0.181	64.489
37	c.725G>T	0.426	48.113	97	c.832C>A	0.181	64.670
38	c.833C>T	0.422	48.534	98	c.844C>G	0.181	64.851
39	c.614A>G	0.414	48.948	99	c.452C>A	0.177	65.029
40	c.641A>G	0.414	49.362	100	c.548C>G	0.177	65.206
41	c.734G>T	0.410	49.771	101	c.569C>T	0.173	65.379
42	c.451C>T	0.402	50.173	102	c.833C>G	0.173	65.553
43	c.797G>A	0.402	50.575	103	c.396G>C	0.169	65.722
44	c.839G>A	0.386	50.961	104	c.475G>C	0.169	65.892
45	c.839G>C	0.382	51.344	105	c.499C>T	0.169	66.061
46	c.707A>G	0.378	51.722	106	c.427G>A	0.165	66.227
47	c.733G>T	0.370	52.092	107	c.644G>T	0.165	66.392
48	c.517G>T	0.366	52.459	108	c.775G>T	0.165	66.558
49	c.404G>A	0.363	52.821	109	c.700T>C	0.162	66.719
50	c.581T>G	0.363	53.184	110	c.716A>G	0.162	66.881
51	c.796G>A	0.347	53.531	111	c.745A>G	0.162	67.042
52	c.517G>A	0.335	53.866	112	c.841G>A	0.162	67.204
53	c.380C>T	0.323	54.189	113	c.298C>T	0.162	67.365
54	c.395A>G	0.319	54.508	114	c.310C>T	0.158	67.523
55	c.824G>A	0.311	54.819	115	c.820G>T	0.154	67.677
56	c.404G>T	0.307	55.126	116	c.763A>T	0.150	67.826
57	c.730G>T	0.288	55.414	117	c.821T>C	0.150	67.976
58	c.577C>T	0.284	55.698	118	c.464C>A	0.146	68.122
59	c.638G>T	0.280	55.978	119	c.467G>C	0.146	68.268
60	c.749C>T	0.276	56.253	120	c.542G>A	0.146	68.414

Rank	CDS Mutation	Fraction(%)	Cumulative(%)
121	c.580C>T	0.146	68.559
122	c.746G>C	0.146	68.705
123	c.818G>C	0.146	68.851
124	c.845G>A	0.146	68.997
125	c.772G>T	0.146	69.143
126	c.405C>G	0.142	69.284
127	c.541C>T	0.138	69.422
128	c.832C>G	0.138	69.560
129	c.856G>T	0.138	69.698
130	c.329G>C	0.134	69.832
131	c.413C>T	0.134	69.966
132	c.514G>T	0.134	70.100
133	c.584T>A	0.130	70.230
134	c.511G>T	0.130	70.360
135	c.811G>T	0.130	70.490
136	c.375G>T	0.126	70.616
137	c.523C>G	0.126	70.742
138	c.747G>C	0.126	70.868
139	c.394A>G	0.122	70.991
140	c.487T>A	0.122	71.113
141	c.800G>C	0.122	71.235
142	c.853G>T	0.122	71.357
143	c.738G>A	0.118	71.475
144	c.742C>G	0.118	71.594
145	c.785G>T	0.118	71.712
146	c.859G>T	0.118	71.830
147	c.375G>A	0.114	71.944
148	c.454C>T	0.114	72.058
149	c.487T>C	0.114	72.173
150	c.524G>T	0.114	72.287
151	c.725G>C	0.114	72.401
152	c.794T>C	0.114	72.516
153	c.839G>T	0.114	72.630
154	c.848G>C	0.114	72.744
155	c.388C>G	0.110	72.854
156	c.528C>G	0.110	72.965
157	c.535C>A	0.110	73.075
158	c.596G>T	0.110	73.185
159	c.643A>G	0.110	73.296
160	c.722C>A	0.110	73.406
161	c.796G>T	0.110	73.516
162	c.374C>T	0.106	73.623
163	c.377A>G	0.106	73.729
164	c.517G>C	0.106	73.836
165	c.523C>T	0.106	73.942
166	c.530C>T	0.106	74.048
167	c.817C>A	0.106	74.155
168	c.434T>A	0.102	74.257
169	c.463A>C	0.102	74.360
170	c.503A>G	0.102	74.462
171	c.535C>G	0.102	74.565
172	c.658T>A	0.102	74.667
173	c.700T>A	0.102	74.769
174	c.743G>C	0.102	74.872
175	c.843C>G	0.102	74.974
176	c.380C>A	0.099	75.073
177	c.400T>C	0.099	75.171
178	c.412G>C	0.099	75.270
179	c.421T>C	0.099	75.368
180	c.472C>T	0.099	75.467

Rank	CDS Mutation	Fraction(%)	Cumulative(%)
181	c.473G>C	0.099	75.565
182	c.587G>C	0.099	75.664
183	c.706T>A	0.099	75.762
184	c.526T>A	0.095	75.857
185	c.526T>C	0.095	75.952
186	c.537T>A	0.095	76.046
187	c.542G>C	0.095	76.141
188	c.659A>C	0.095	76.235
189	c.731G>T	0.095	76.330
190	c.733G>C	0.095	76.424
191	c.843C>A	0.095	76.519
192	c.845G>C	0.095	76.614
193	c.857A>G	0.095	76.708
194	c.661G>T	0.095	76.803
195	c.434T>C	0.091	76.893
196	c.451C>G	0.091	76.984
197	c.490A>G	0.091	77.075
198	c.613T>G	0.091	77.165
199	c.718A>G	0.091	77.256
200	c.808T>C	0.091	77.347
201	c.809T>C	0.091	77.437
202	c.313G>T	0.087	77.524
203	c.388C>T	0.087	77.611
204	c.559G>A	0.087	77.697
205	c.623A>T	0.087	77.784
206	c.645T>G	0.087	77.871
207	c.658T>C	0.087	77.957
208	c.796G>C	0.087	78.044
209	c.809T>G	0.087	78.131
210	c.823T>C	0.087	78.217
211	c.840A>T	0.087	78.304
212	c.841G>T	0.087	78.391
213	c.847C>T	0.087	78.477
214	c.854A>T	0.087	78.564
215	c.328C>T	0.083	78.647
216	c.423C>G	0.083	78.730
217	c.451C>A	0.083	78.812
218	c.472C>G	0.083	78.895
219	c.518T>C	0.083	78.978
220	c.596G>A	0.083	79.061
221	c.755T>C	0.083	79.143
222	c.830G>A	0.083	79.226
223	c.833C>A	0.083	79.309
224	c.842A>G	0.083	79.392
225	c.497C>G	0.083	79.474
226	c.395A>T	0.079	79.553
227	c.470T>G	0.079	79.632
228	c.530C>G	0.079	79.711
229	c.578A>C	0.079	79.790
230	c.632C>T	0.079	79.868
231	c.712T>C	0.079	79.947
232	c.746G>A	0.079	80.026
233	c.379T>C	0.075	80.101
234	c.403T>C	0.075	80.176
235	c.482C>A	0.075	80.251
236	c.644G>A	0.075	80.325
237	c.706T>C	0.075	80.400
238	c.752T>G	0.075	80.475
239	c.776A>T	0.075	80.550
240	c.817C>G	0.075	80.625

[0030] このように、変異により出現（報告）頻度が大きく異なる。特に好ましいライブラリーの一つは、下記のうち、順位が高いものを複数種類、例えば2種

類以上、好ましくは4種類以上、より好ましくは6種類以上、さらに好ましくは10種類以上、さらに好ましくは20種類以上の変異を検出することができるように設計されたものである。本明細書の実施例の項で使用したプライマーとプローブのセットが対象とする変異の順位は以下の通り。

[0031] chr17:7579389 c.298C>T (p.Gln100Ter)、113位；
chr17:7579358 c.329G>T (p.Arg110Leu)、87位；
chr17:7578550 c.380C>T (p.Ser127Phe)、53位；
chr17:7578526 c.399_400 insert CAAGATG(p.Phe134fs) 、該当なし；
chr17:7578455 c.475G>C (p.Ala159Pro)、104位；
chr17:7578431 c.499C>T (p.Gln167Ter)、105位；
chr17:7578406 c.524C>T (p.Arg175His)、1位；
chr17:7578403 c.527G>A (p.Cys176Tyr)、34位；
chr17:7578394 c.536A>G (p.His179Arg)、13位；
chr17:7578370 exon5 splicesite_3 C>T、該当なし；
chr17:7578275 c.574G>A (p.Gln192Ter)、24位；
chr17:7578271 c.578A>G (p.His193Arg)、20位；
chr17:7578271 c.578A>T (p.His193Leu)、62位；
chr17:7578263 c.586G>A (p. Arg196Ter)、11位；
chr17:7578235 c.614A>G (p.Tyr205Cys)、39位；
chr17:7578212 c.637C>T (p.Arg213Ter)、7位；
chr17:7578190 c.659A>G (p.Tyr220Cys)、10位；
chr17:7577574 c.707A>G (p.Tyr236Cys)、46位；
chr17:7577556 c.725G>T (p.Cys242Phe)、37位；
chr17:7577551 c.730G>A (p.Gly244Ser)、83位；
chr17:7577545 c.736A>T (p.Met246Leu)、455位；
chr17:757753 c.743C>T (p.Arg248Gln)、2位；
chr17:7577517 c.764A>G (p.Ile255Thr)、278位；
chr17:7577500 c.780_780delC (p.Ser260fs)、該当なし；

chr17:7577129 c.809T>G (p.Phe270Cys)、209位；

chr17:7577120 c.818G>A (p.Arg273His)、3位；

chr17:7577099 c.839G>C (p.Arg280Thr)、45位

chr17:7577094 c.844G>A (p.Arg282Trp)、6位；および

chr17:7576853 c.993C>T (p.Gln331Ter)、該当なし（DNA結合ドメイン外）。

[0032] 出現頻度の順位に関し、高いとは、例えば10位以内（1～10位）、40位以内（1～40位）、または232位以内（1～232位）をいう。出現頻度の順位が10位以内の変異を対象とすれば、少なくとも30%のTP53変異の検出が可能なライブラリーを設計できる。さらに出現頻度の順位が40位以上の変異を対象とすれば、少なくとも50%のTP53変異の検出が可能なライブラリーを設計できる。さらに出現頻度の順位が232位以上の変異を対象とすれば、少なくとも80%のTP53変異の検出が可能なライブラリーを設計できる。

[0033] 報告数順位が高い変異を検出するためのライブラリーの具体例の一つは、以下の3セットのいずれか1セット、好ましくはいずれか2セット、さらに好ましくは3セットすべてを含む：

c.844の変異を検出するための配列番号:1～4のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチド、

c.637の変異を検出するための配列番号:5～8のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチド、および

c.659の変異を検出するための配列番号:9～12のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチド。これら3セットに代表される出現頻度が10位以内の変異の検出のためのセットをすべて含むライブラリーであれば、少なくとも30%のTP53変異の検出が期待できる。

[0034] ライブラリーは、上記の3セットに加えて、さらに以下の3セットのいずれか1セット、好ましくはいずれか2セット、さらに好ましくは3セットすべてを含む：

c.527の変異を検出するための配列番号:13～16のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチド、

c.725の変異を検出するための配列番号:17～20のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチド、

c.614の変異を検出するための配列番号:21～24のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチド。これら6セットに代表される出現頻度が40位以内の変異の検出のためのセットをすべて含むライブラリーであれば、少なくとも50%のTP53変異の検出が期待できる。

[0035] ライブラリーは、上記の6セットに加えて、さらに以下の3セットのいずれか1セット、好ましくはいずれか2セット、さらに好ましくは3セットすべてを含む：

c.499の変異を検出するための配列番号:25～28のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチド、

c.298の変異を検出するための配列番号:29～32のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチド、および

c.809の変異を検出するための配列番号:33～36のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチド。これら9セットに代表される出現頻度が232位以内の変異の検出のためのセットをすべて含むライブラリーであれば、少なくとも80%のTP53変異の検出が期待できる。

[0036] 上記の9セットの各々は、ある変異を検出するためのプローブおよびプライマーのセットとして、それ自体で有用である。また上記の9セットに含まれる特定の配列からなるオリゴヌクレオチド（プローブ、プライマー）は、それ自体で有用である。オリゴヌクレオチドはいずれも、検出しようとする変異の出現頻度の順位が、10位以内、40位以内、または232位以内である。出現頻度が10位以内の変異を検出するためのオリゴヌクレオチドはいずれも、少なくとも30%のTP53変異の検出のために有用である。出現頻度の順位が40位以内の変異を検出するためのオリゴヌクレオチドはいずれも、少なくとも50%のTP53変異の検出のために有用である。出現頻度の順位が232位以内の変異を検出するためのオリゴヌクレオチドはいずれも、少なくとも80%のTP53変異の検出のために有用である。

[0037] なお配列中の各ヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドであってもよい。修飾ヌクレオチドの例は、後述する。

[0038] 具体的な変異の位置と変異の内容、ならびにプローブおよびプライマーのヌクレオチド配列は、本明細書の実施例中の表、図２、および配列表中にも示されている。

[0039] ライブラリーに含まれるプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対は、がん患者の原発腫瘍サンプルから得た配列情報に基づき、設計することができる。後述するctDNA等の鋭敏な腫瘍マーカーの検査対象となる患者は進行ステージであることが多く、初期治療は手術である。そのため手術で得た固形材料を用いて配列情報を得ることは比較的容易である。

[0040] ライブラリーに含まれるプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対は、被験者から採取されたサンプル中の核酸中の変異を分析することができるように様々に設計しうるが、被験者の血液中に遊離して存在する、ctDNAを分析可能なように設計されていることが好ましい。血液中のctDNAが分析できれば、腫瘍固有の変異DNAを全身的に追跡することになるからである。また、治療後、患者の負担少なく長期間にわたり分析することが容易であり、治療後の「体内腫瘍量」増加をいち早くとらえて、二次治療へ迅速に移行することが期待できるからである。なお、分析は、検出すること、定量すること等を含む。また被験者は、がん患者、がんの疑いのある者等を含む。

[0041] 被験者のctDNAを分析するとの観点からは、ライブラリーに含まれるプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対は、大過剰なwild type（非変異配列、参照配列ということもある。）の存在下で低い割合のmutant（変異配列ということもある）を分析できる方法において用いることができるように設計される。がん診断ではctDNAの血中濃度（非変異配列に対する変異配列の存在比。アレル頻度ということもある）が1%以下のことが多く、高感度の分析が行えることが望ましいからである。このような高感度の分析方法の例は、dPCRである。

[0042] dPCR (Vogelstein and Kinzler, Proc. Natl. Acad. USA, 96, 9236-9241, 1999) は、従来のPCR法を発展させたものであり、標的核酸の量を直接、定量することができる。dPCRは、濃縮手順と組み合わせて用いて、極微量の変異を検出するのに適している。dPCRでは、DNAサンプルは単一分子まで希釈されるために、各PCR反応において出発物質はwild typeまたはmutantのいずれかである。濃縮は、一分子から実施され、何千もの平行濃縮反応が同時に行われる。同じ出発物質からの多数のPCR反応を実施した後、変異分子が単離され、検出される。PCR増幅後、PCRの最終産物を含むチャンバーを計数することで、核酸の絶対量を算出できる。本発明に使用可能な各種のdPCRベースのシステムが市販されている。dPCRの基本的な方法論は、例えばSykes et al., Biotechniques 13 (3): 444-449, 1992に記載されている。

[0043] ctDNAを分析するとの観点からは、プローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対は、比較的短い核酸断片を標的配列として増幅し、目的の変異を検出できるように設計されていることが好ましい。通常のPCRでの増幅産物のサイズは100～150bpであり、感度や精度が低下することが問題になる場合がある。分析性能を向上させるためには、増幅産物のサイズをできる限り短くすることが重要だと考えられている(Antonov J,et.al. Lab Invest. 2005 Aug;85(8):1040-50、Kong H,et.al. Sci Rep. 2014 Nov 28;4:7246、Florent Mouliere et.al. PLOS ONE September 2011 Volume 6 Issue 9 e23418)。しかし、例えば、プライマーやプローブのオリゴヌクレオチドにおいて修飾ヌクレオチドを含ませる等の手段により、比較的短い増幅産物、例えば70bp以下の増幅産物による分析を行う方法が開発されている。このような方法のためのプライマー、プローブは、Hypercool Primer & Probe™ (株式会社日本遺伝子研究所、仙台市宮城野区中野一丁目5番地の2) として知られており、そのための設計方法が公開されている (http://ngrl.co.jp/wp/wp-content/uploads/2015/01/eb3607d6c1eb4174f10bb3bde67844fe.pdf) 。また、大過剰な非変異配列の存在下で低い割合の変異配列を検出することに関しては、例えば特表2010-535031号公報を参照することができる。この技術は、反応混合物

は、臨界変性温度または非変異配列の融解温度Tmよりも低い温度で処理するプロトコルに基づくものである。

[0044] 好ましい態様の一つにおいては、ライブラリーに含まれるオリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド（修飾塩基と称されることもある。）を含む。修飾ヌクレオチドは、ジアミノ-プリン類似体（例えば、2'-O-メチル-2,6-ジアミノプリン）、ウラシル、ペプチド核酸類似体、ビオチン修飾類似体、フルオロフォア修飾類似体、イノシン、7-デアザグアニン、2'-デオキシ-2'-フルオロ-β-D-アラビノ核酸（2'F-ANA）ヌクレオチド、ロックド核酸（LNAs）、ENAs：2'-O,4'-C-エチレン架橋核酸等を含む。これらの修飾は、マッチまたはミスマッチした塩基間のTmの差異を増大させることができ、高精度の分析を可能とする。

[0045] ロックド核酸は、立体構造的に制限されたヌクレオチド類似体のクラスを意味する（例えば、WO99/14226、Koshkin, A.A., et al., Tetrahedron (1998), 54: 3607-3630、およびObika, S. et al., Tetrahedron Lett. (1998), 39: 5401-5404参照）。ロックド核酸をオリゴヌクレオチドに導入することは、相補配列の親和性を向上させ、融解温度を何段階か増加させる（Braasch, D.A. and D.R. Corey, Chem. Biol. (2001), 8:1-7)。

[0046] 特に好ましい修飾ヌクレオチドの例は、2-amino-dA(2aA)、5-Methyl-dC(5mC)である。

[0047] ライブラリーに含まれるオリゴヌクレオチドはまた、ミスマッチ（mismatched）塩基またはアンマッチ（unmatched）塩基を含むことができる。核酸技術における当業者であれば、例えば、オリゴヌクレオチドの長さ、オリゴヌクレオチドの塩基組成および配列、イオン強度、ならびにミスマッチ塩基の含有率等の多数の変数を考慮して、二本鎖安定性を決定することができる。核酸二本鎖の安定性は、融解温度（変成温度ということもある）。Tmによって表すことができる。

[0048] ライブラリー中のプローブは、分析が容易となるように、末端付近が修飾されていてもよい。修飾には蛍光物質を用いることができる。蛍光物質の例

としては、6FAM（単にFAMと表されることもある。）、 HEX、Tide Fluor™ 1、ATTO 390、ATTO 425、LC（登録商標）480Cyan500、ATTO 465、ATTO 488、Tide Fluor™ 2、ATTO 495、ATTO 514、ATTO 520、TET、JOE、CAL Fluor 540、Yakima Yellow、ATTO 532、ATTO Rho6G、LC（登録商標）Yellow555、CAL Fluor 560、ATTO 542、Quasar（登録商標）570、Cy3、ATTO 550、TAMRA、Tide Fluor™ 3、ATTO 565、ATTO Rho3B、ROX、ATTO Rho11、ATTO Rho12、Cy3.5、ATTO Thio12、ATTO Rho101、LC（登録商標）Red610、CAL Fluor 610、Tide Fluor™ 4、ATTO 590、TexasRed(SR101)、ATTO 594、ATTO Rho13、ATTO 610、LC（登録商標）Red670、ATTO 620、LC（登録商標）Red640、ATTO Rho14、ATTO 633、ATTO 647、ATTO 647N、Quasar（登録商標）670、Tide Fluor™ 5、Cy5、ATTO 655、ATTO Oxa12、ATTO 665、Tide Fluor™ 6、Cy5.5、ATTO 680、LC（登録商標）Red705、Quasar（登録商標）705、ATTO 700、ATTO 725、ATTO 740、Tide Fluor™ 7、Tide Fluor™8が挙げられる。wild typeのためのプローブと、mutantのためのプローブとで異なる蛍光物質を用いることにより、それぞれの同時分析が可能となる。

[0049] ライブラリー中のプローブはまた、末端付近が消光物質（クエンチャーということもある）で修飾されていてもよい。消光物質の例としては、Dabcyl、BHQ-0（登録商標）、BHQ-1（登録商標）、BHQ-2（登録商標）、BHQ-3（登録商標）、TQ™1、TQ™2、TQ™3、TQ™4、TQ™5、TQ™6、TQ™7、TAMRA、ATTO540Q、ATTO 575Q、ATTO 580Q、ATTO 612Q、BBQ-650（登録商標）が挙げられる。

[0050] 上述のプライマー、プローブを用いたdPCRは、従来のdPCR法と同様のスケールで実施することができる。用いるサンプル中の核酸の量、プライマー、プローブの量は、当業者であれば適宜設定できるが、例えば、dPCRの1チップあたり、核酸は0.5～50ng、プライマーは0.02～2.0μM、プローブは0.01～1.0μMの範囲で用いることができる。系の組成は、核酸、プライマーおよびプローブの量のほか、当業者には明らかであるように、4種のdNTP、緩衝剤、塩、界面活性剤、鎖伸長反応を触媒する酵素を含むことができる。

[0051] [ライブラリーの使用]

本発明のライブラリーは、がんの治療後の被験者における再発または予後の予測を補助する方法において用いうる。補助する方法は、医師以外の者、例えば臨床検査技師、看護師、保健師、被験者本人等によって行われる方法を指す。このような方法は、具体的には、予め準備されている本発明のライブラリーから、少なくとも一のプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を準備し、準備したプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を用いて、被験者から得た核酸中の変異を分析する工程を含む。このような方法に用いることのできるライブラリーについては、本明細書で既に述べたライブラリーについての説明がすべてあてはまる。

[0052] 本発明によって提供される方法は、食道がん、胃がん、または大腸がん等の消化管がんを含む、あらゆるがんに対して有効であると考えられる。

[0053] 好ましい態様においては、本発明の方法は、次のように実施することができる：

予め準備されている本発明のライブラリー中から、適切だと考えられるセット（例えば原発巣の変異解析で検出された症例特異的変異を分析するためのプライマーとプローブのセット）を得て、必要に応じ、被験者の原発巣DNAを用いた動作を確認した後、被験者から適宜採取したサンプル中の変異DNAの割合 mutant allele frequency (%)をモニタリングする。サンプルは、好ましくは血漿であり、変異はctDNAとして分析されうる。

[0054] 腫瘍細胞量の少ない被験者、例えばStage Iの被験者を対象とする場合、治療前、手術後、follow-up期間でctDNAが検出されないことがある。ある程度の腫瘍細胞量を有する被験者、例えばStage IIの被験者からは、治療前に検出されたctDNAが、術後に0%へと低下することが確認できる。また、術後補助化学療法を含めたfollow-up中において、ctDNAの有無または量を分析することにより、再発を予測することができる。本発明の方法により、被験者によっては、化学療法、放射線療法による腫瘍縮小に伴うctDNAの低下が確認できる。本発明の方法により、従来のCT診断に比較して、早期に再発が診断できる可能性がある。

[0055] ctDNAの分析は、腫瘍固有の変異DNAを全身的に追跡していると考えられる点でも優れている。また、これにより治療後、患者の負担少なく長期間にわたり分析することが容易であり、治療後の「体内腫瘍量」増加をいち早くとらえて、二次治療へ迅速に移行することが期待できる。

[0056] 本発明のライブラリーにより、ctDNAの検出に際して、被験者毎にプライマーとプローブを設計し、合成する必要がなくなる。汎用性の高いプライマーとプローブ、または非間歇的に変異を検出可能なように設計されたプライマーとプローブを含む本発明のライブラリーを用いることにより、がんの治療後の再発を早期に診断できる。また、がん患者において個別化した治療後経過観察を容易に実施することができる。

[0057] 本発明のライブラリーはまた、がんの早期発見や診断のための方法においても用いうる。

[0058] 以下に実施例を示してさらに詳細に説明するが、本発明は実施例により何ら限定されるものではない。

実施例

[0059] ［ライブラリーの作成］

Hypercool Primer&Probeで合成し、動作を確認したプライマーとプローブのセットのうち、代表的なものを下表に示した。合成は、株式会社日本遺伝子研究所（仙台市宮城野区中野一丁目5番地の2）に委託した。なお表に記載した塩基配列中、囲んだ箇所はTm上昇塩基挿入部位（修飾ヌクレオチド部位）であり、*は変異箇所を示す。

[0060]

[表2-1]

TP53 Primer/Probe sequence

全がんを対象とした 1,284 種類の TP53 の点突然変異（のべ 25,376 変異）で、その出現率が上位 10、40、232 種類に含まれるプライマー・プローブの例と理論上検出可能な TP53 変異の割合。

上位 10 種類に含まれるもの（30%の TP53 変異を検出可能）

chr17:7577094				
c.844C>T (p.Arg282Trp)	Sequence (5'->3')	Strand	Length	SEQ ID NO
Forward primer	GGGACGGAACAGCTTTGAG	Plus	19	1
Reverse primer	CCCCTTTCTTGCGGAGATTC	Minus	20	2
Probe Wt	HEX-CCTCTGTGCGCCG*GTCT-BHQ	Minus	17	3
Probe Mt	FAM-TCCTCTGTGCGCCA*GTCT-BHQ	Minus	18	4
Product length	-	-	86	

chr17:7578212				
c.637C>T (p.Arg213Ter)	Sequence (5'->3')	Strand	Length	SEQ ID NO
Forward primer	TGTGGAGTATTTGGATGACAGA	Plus	22	5
Reverse primer	AGTTGCAAACCAGACCTCA	Minus	19	6
Probe Wt	HEX-ACCACCACACTATGTCG*AAAAG-BHQ	Minus	22	7
Probe Mt	FAM-ACCACCACACTATGTCA*AAAAG-BHQ	Minus	22	8
Product length	-	-	82	

chr17:7578190				
c.659A>G (p.Tyr220Cys)	Sequence (5'->3')	Strand	Length	SEQ ID NO
Forward primer	TGTGGAGTATTTGGATGACAGA	Plus	22	9
Reverse primer	AGTTGCAAACCAGACCTCAG	Minus	20	10
Probe Wt	HEX-TGGTGCCCTA*TGAGCCG-BHQ	Plus	17	11
Probe Mt	FAM-TGGTGCCCTG*TGAGCC-BHQ	Plus	16	12
Product length	-	-	82	

[0061]

[表2-2]

上位 40 種類に含まれるもの(50%の TP53 変異を検出可能)

chr17:7578403				
c.527G>A (p.Cys176Tyr)	Sequence (5'->3')	Strand	Length	SEQ ID NO
Forward primer	GTCACAGCACATGACGGA	Plus	18	13
Reverse primer	CACCATCGCTATCTGAGCA	Minus	19	14
Probe Wt	HEX-TTGTGAGGCGCTG*CCCC-BHQ	Plus	17	15
Probe Mt	FAM-TTGTGAGGCGCTA*CCCCC-BHQ	Plus	18	16
Product length	-	-	68	

chr17:7577556				
c.725G>T (p.Cys242Phe)	Sequence (5'->3')	Strand	Length	SEQ ID NO
Forward primer	GTTGGCTCTGACTGTACCAC	Plus	20	17
Reverse primer	CCAGTGTGATGATGGTGAGG	Minus	20	18
Probe Wt	HEX-TGTAACAGTTCCTG*CATGGGC-BHQ	Plus	21	19
Probe Mt	FAM-TGTAACAGTTCCTT*CATGGGC-BHQ	Plus	21	20
Product length	-	-	100	

chr17:7578235				
c.614A>G (p.Tyr205Cys)	Sequence (5'->3')	Strand	Length	SEQ ID NO
Forward primer	AGTGGAAGGAAATTTGCGTG	Plus	20	21
Reverse primer	ACCACCACACTATGTCGAAAAG	Minus	22	22
Probe Wt	HEX-TGGAGTA*TTTGGATGACAGAAACA-BHQ	Plus	24	23
Probe Mt	FAM-TGGAGTG*TTTGGATGACAGAAAC-BHQ	Plus	23	24
Product length	-	-	66	

[0062] [表2-3]

上位 232 種類に含まれるもの(80%の TP53 変異を検出可能)

chr17:7578431				
c.499C>T (p.Gln167Ter)	Sequence (5'->3')	Strand	Length	SEQ ID NO
Forward primer	CCATGGCCATCTACAAGCA	Plus	19	25
Reverse primer	CTCACCATCGCTATCTGAGCA	Minus	21	26
Probe Wt	HEX-CCTCCGTCATGTGCTG*TGA-BHQ	Minus	19	27
Probe Mt	FAM-ACCTCCGTCATGTGCTA*TGA-BHQ	Minus	20	28
Product length	-	-	89	

chr17:7579389				
c.298C>T (p.Gln100Ter)	Sequence (5'->3')	Strand	Length	SEQ ID NO
Forward primer	GCCCCTGTCATCTTCTGTCC	Plus	20	29
Reverse primer	CCAGAATGCAAGAAGCCCAG	Minus	20	30
Probe Wt	HEX- CCCTGGTAGGTTTTCTG*GGAAG-BHQ	Minus	22	31
Probe Mt	FAM-TGCCCTGGTAGGTTTTCTA*GGAAG-BHQ	Minus	24	32
Product length	-	-	78	

chr17:7577129				
c.809T>G (p.Phe270Cys)	Sequence (5'->3')	Strand	Length	SEQ ID NO
Forward primer	TCCTGAGTAGTGGTAATCTACTG	Plus	23	33
Reverse primer	CCCAGGACAGGCACAAAC	Minus	18	34
Probe Wt	HEX-ACCTCAA*AGCTGTTCCGTCC-BHQ	Minus	20	35
Probe Mt	FAM-CCTCAC*AGCTGTTCCGTCC-BHQ	Minus	19	36
Product length	-	-	65	

[0063] [primer/probeの動作確認]

個々の症例特異的変異に対しデザイン・合成した29組のprimer/probeにつ

いて原発巣（あるいは十分量の血漿）DNAを用い、QuantStudio 3D Digital PCR System (Thermo Fisher Scientific社)にて動作確認を行った。いずれも変異アリル（青）、wild typeアリル（赤）が分離されている（図３）。

[0064] ［症例特異的TP53変異probeを用いた循環血漿中の変異DNA (Circulating tumor DNA)モニタリング］

治療前食道がん原発巣組織よりDNAを抽出し、末梢血単核球DNAを正常コントロールとし遺伝子変異スクリーニングを施行した。検出された遺伝子変異につきwild type allele（正常アリル）とmutant allele（変異アリル）を別々に標識するdigital PCR probeと変異部位を含む領域を増幅するprimerをデザイン、合成した（日本遺伝子研究所、HypercoolTMテクノロジーを用いた）。

[0065] 治療前、化学療法、手術、放射線療法などの治療後、また治療後のfollow-up期間に患者血液検体を採取、それぞれの検体より遠心分離により血漿を分離し、血漿中の遊離DNAを抽出した。血漿DNAの抽出はQIAamp（登録商標） Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN社)を用い行った。血漿中遊離DNA はそのほとんどが正常細胞由来のwild type DNAであり、がん細胞由来の変異DNAは通常1%以下であり検出されない場合も多いため、原発巣のDNAを用いて合成したprimer/probeのdigital PCRでの動作確認を行った。wild typeアリルとmutantアリルが分離され計測可能なことを確認後、血漿サンプルでの解析を行った。解析はQuantStudio 3D Digital PCR System (Thermo Fisher Scientific社)のプロトコールにしたがい、1チップあたりprimer 900nM、probe 250nMの最終濃度にPCR反応液を調整し、DNA量1～20ngを用いて行った。

[0066] ctDNAモニタリング実験のフローチャートを、図４に示す。原発巣の変異解析で検出された症例特異的変異に対しwild type DNA, mutant DNAをそれぞれ別々に蛍光標識 (wild type: HEX, mutant: FAM)するprobeを作成、原発巣DNAを用いた動作確認後、治療経過中に採取して血漿サンプル中の変異DNAの割合mutant allele frequency(%)を計測する。例：治療前血漿中の変異DNA（1）に比べ治療後（2）および（3）では変異DNA(青)の減少が見られる。

[0067] ［Stage I～Stage IVの食道がんの症例における血漿中のTP53変異DNAのモニタリング］

腫瘍細胞量の少ないStage I症例では、治療前、手術後、follow-up期間でctDNAは検出されなかった。Stage II症例では、治療前に検出されたctDNAが術後に0%へと低下し、術後補助化学療法を含めたfollow-up中にctDNAは検出されていない。これらの症例は現在まで再発は見られていない。Stage III症例では化学療法、放射線療法による腫瘍縮小に伴いctDNAの低下が見られたが、再増大とともにctDNAは上昇し、follow-up終了後短期間で死亡した（図５）。MAF, mutant allele frequency; CF, Cisplatin/5-FU; DCF, Docetaxel/Cisplatin/5-FU; CRT, chemoradiotherapy; PTX, paclitaxel

[0068] ［Stage IIA食道がんのctDNAモニタリング］

治療前原発巣の変異解析ではTP53変異p.Tyr220Cys（c.659 A>G）が検出された。同変異に対するprimer/probeを合成し、治療経過中に採取した血漿サンプルでctDNAの検出を行った。術前化学療法（CF: cisplatin/5-FU)によりctDNA量（MAF)の低下が見られた。術後１年半後（Day 615)に縦隔リンパ節の再発が確認されたが、CT検査では6か月前（Day 436)ではリンパ節は検出されず、3か月前(Day 527)でも3mmのリンパ節を認めるのみで再発診断には至らなかった。ctDNAはDay 438より上昇が見られており、ctDNA解析はCT診断に比べ再発を早期に診断できる可能性がある。再発病変に対し放射線化学療法を施行しComplete Response（完全奏効）が得られているが、ctDNAも0%と陰転化している（図６）。MAF, mutant allele frequency; CF, Cisplatin/5-FU; CRT, chemoradiotherapy

配列表フリーテキスト

[0069] SEQ ID NO.:1～36　dPCR用プライマーまたはプローブの配列

SEQ ID NO.:37　TP53のDNA結合ドメインの配列

請求の範囲

[請求項1] TP53遺伝子のDNA結合ドメインをコードする領域における、がんに関連する遺伝子変異を検出するための、複数のプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対で構成されるライブラリーであって、

複数のプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対が、c.524G>A、c.743G>A、c.818G>A、c.817C>T、c.742C>T、c.844C>T、c.637C>T、c.733G>A、c.747G>T、およびc.659A>Gを検出するためのものを含む、ライブラリー。

[請求項2] さらに、c.586C>T、c.469G>T、c.536A>G、c.488A>G、c.527G>T、c.818G>T、c.853G>A、c.734G>A、c.722C>T、c.578A>G、c.535C>T、c.856G>A、c.584T>C、c.574C>T、c.701A>G、c.814G>A、c.711G>A、c.713G>A、c.743G>T、c.473G>A、c.646G>A、c.832C>T、c.422G>A、c.527G>A、c.455C>T、c.473G>T、c.725G>T、c.833C>T、c.614A>G、およびc.641A>Gを検出するための複数のプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を含む、請求項１に記載のライブラリー。

[請求項3] さらに、c.734G>T、c.451C>T、c.797G>A、c.839G>A、c.839G>C、c.707A>G、c.733G>T、c.517G>T、c.404G>A、c.581T>G、c.796G>A、c.517G>A、c.380C>T、c.395A>G、c.824G>A、c.404G>T、c.730G>T、c.577C>T、c.638G>T、c.749C>T、c.772G>A、c.578A>T、c.824G>T、c.736A>G、c.797G>T、c.476C>T、c.725G>A、c.461G>T、c.481G>A、c.731G>A、c.638G>A、c.713G>T、c.715A>G、c.406C>T、c.493C>T、c.536A>T、c.811G>A、c.437G>A、c.438G>A、c.592G>T、c.430C>T、c.711G>T、c.730G>A、c.746G>T、c.610G>T、c.722C>G、c.329G>T、c.745A>T、c.814G>T、c.841G>C、c.396G>T、c.836G>A、c.838A>G、c.799C>T、c.830G>T、c.583A>T、c.832C>A、c.844C>G、c.452C>A、c.548C>G、c.569C>T、c.833C>G、c.396G>C、c.475G>C、c.499C>T、c.427G>A、c.644G>T、c.775G>T、c.700T>C、c.716A>G、c.745A>G、c.841G>A、c.298C>T、c.31

0C>T、c.820G>T、c.763A>T、c.821T>C、c.464C>A、c.467G>C、c.542G>A、c.580C>T、c.746G>C、c.818G>C、c.845G>A、c.772G>T、c.405C>G、c.541C>T、c.832C>G、c.856G>T、c.329G>C、c.413C>T、c.514G>T、c.584T>A、c.511G>T、c.811G>T、c.375G>T、c.523C>G、c.747G>C、c.394A>G、c.487T>A、c.800G>C、c.853G>T、c.738G>A、c.742C>G、c.785G>T、c.859G>T、c.375G>A、c.454C>T、c.487T>C、c.524G>T、c.725G>C、c.794T>C、c.839G>T、c.848G>C、c.388C>G、c.528C>G、c.535C>A、c.596G>T、c.643A>G、c.722C>A、c.796G>T、c.374C>T、c.377A>G、c.517G>C、c.523C>T、c.530C>T、c.817C>A、c.434T>A、c.463A>C、c.503A>G、c.535C>G、c.658T>A、c.700T>A、c.743G>C、c.843C>G、c.380C>A、c.400T>C、c.412G>C、c.421T>C、c.472C>T、c.473G>C、c.587G>C、c.706T>A、c.526T>A、c.526T>C、c.537T>A、c.542G>C、c.659A>C、c.731G>T、c.733G>C、c.843C>A、c.845G>C、c.857A>G、c.661G>T、c.434T>C、c.451C>G、c.490A>G、c.613T>G、c.718A>G、c.808T>C、c.809T>C、c.313G>T、c.388C>T、c.559G>A、c.623A>T、c.645T>G、c.658T>C、c.796G>C、c.809T>G、c.823T>C、c.840A>T、c.841G>T、c.847C>T、c.854A>T、c.328C>T、c.423C>G、c.451C>A、c.472C>G、c.518T>C、c.596G>A、c.755T>C、c.830G>A、c.833C>A、c.842A>G、c.497C>G、c.395A>T、c.470T>G、c.530C>G、c.578A>C、c.632C>T、c.712T>C、およびc.746G>Aを検出するための複数のプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を含む、請求項２に記載のライブラリー。

[請求項4] 複数のプローブにより、TP53遺伝子のDNA結合ドメインにおける585箇所のすべての変異を検出できるものである、請求項１～３のいずれか１項に記載のライブラリー。

[請求項5] がんの治療後の被験者における再発または予後の予測のための、請求項１または２に記載のライブラリー。

[請求項6] 腫瘍細胞由来の循環DNA（circulating tumor DNA：ctDNA）を検出するための、請求項１～５のいずれか１項に記載のライブラリー。

[請求項7] プローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対が、デジタルPCR用である、請求項１～６のいずれか１項に記載のライブラリー。

[請求項8] プローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対が、配列番号：1～116のいずれか１つの配列からなるオリゴヌクレオチド、またはその標識物を含む、請求項１～７のいずれか１項に記載のライブラリー。

[請求項9] 以下の（１）～（３）の工程を含む、被験者におけるTP53遺伝子のDNA結合ドメインをコードする領域における、がんに関連する遺伝子変異を分析する方法：

（１）複数のプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対で構成されるライブラリーであって、複数のプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対が、c.524G>A、c.743G>A、c.818G>A、c.817C>T、c.742C>T、c.844C>T、c.637C>T、c.733G>A、c.747G>T、およびc.659A>Gの変異を検出するためのものを含む、ライブラリーを準備する工程、

（２）準備したライブラリーから、一の変異を検出するためのプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を選択する工程；

（３）選択したプローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を用いて、被験者から得た核酸中の変異をデジタルPCRで分析する。

[請求項10] がんが、食道がん、胃がん、または大腸がんである、請求項９に記載の方法。

[請求項11] 選択される一の変異が、治療前の被験者の原発巣で同定された変異であり、治療後の被験者の血液から得た腫瘍細胞由来の循環DNA（circulating tumor DNA：ctDNA）中の当該変異を分析する、請求項９または１０に記載の方法。

[請求項12] 下記の工程を含む、請求項１～８のいずれか１項に記載のライブラリーの製造方法：

TP53遺伝子のDNA結合ドメインにおけるがんに関連する一の変異を検出するための、プローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を準備する工程；

前記変異とは異なる、TP53遺伝子のDNA結合ドメインにおけるがんに関連する変異を検出するための、プローブおよび／またはプライマーもしくはプライマー対を準備する工程。

[請求項13] デジタルPCRに用いるための、下記の(1)～(9)のいずれか１組のプライマー対およびプローブ対のセット：

(1)配列番号:1、2の各々の配列からなるプライマー対、および

[化1]

CCTCTGTGCGCCG*GTCT(配列番号:3)
TCCTCTGTGCGCCA*GTCT(配列番号:4)

の各々の配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物であるプローブ対、

(2)配列番号:5、6の各々の配列からなるプライマー対、および

[化2]

ACCACCACACTATGTCG*AAAAG(配列番号:7)
ACCACCACACTATGTCA*AAAAG(配列番号:8)

の各々の配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物であるプローブ対、

(3)配列番号:9、10の各々の配列からなるプライマー対、および

[化3]

TGGTGCCCTA*TGAGCCG(配列番号:11)
TGGTGCCCTG*TGAGCC(配列番号:12)

の各々の配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物であるプローブ対、

(4)配列番号:13、14の各々の配列からなるプライマー対、および

[化4]

TTGTGAGGCGCTG*CCCC(配列番号:15)
TTGTGAGGCGCTA*CCCCC(配列番号:16)

の各々の配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物であるプローブ対、

(5)配列番号:17、18の各々の配列からなるプライマー対、および

[化5]

TGTAACAGTTCCTG*CATGGGC(配列番号:19)
TGTAACAGTTCCTT*CATGGGC(配列番号:20)

の各々の配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物であるプローブ対、

(6)配列番号:21、22の各々の配列からなるプライマー対、および

[化6]

TGGAGTA*TTTGGATGACAGAAACA(配列番号:23)
TGGAGTG*TTTGGATGACAGAAAC(配列番号:24)

の各々の配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物であるプローブ対、

(7)配列番号:25、26の各々の配列からなるプライマー対、および

[化7]

CCTCCGTCATGTGCTG*TGA(配列番号:27)
ACCTCCGTCATGTGCTA*TGA(配列番号:28)

の各々の配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物であるプローブ対、

(8)配列番号:29、30の各々の配列からなるプライマー対、および

[化8]

CCCTGGTAGGTTTTCTG*GGAAG(配列番号:31)
TGCCCTGGTAGGTTTTCTA*GGAAG(配列番号:32)

の各々の配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物であるプ

ローブ対、ならびに

(9)配列番号:33、34の各々の配列からなるプライマー対、および

[化9]

ACCTCAA*AGCTGTTCCGTCC(配列番号:35)
CCTCAC*AGCTGTTCCGTCC(配列番号:36)

の各々の配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその標識物であるプローブ対（但し、囲んだ箇所は修飾ヌクレオチドであり、*は変異の位置に対応したヌクレオチドを示す。）。

[請求項14] デジタルPCRに用いるための、下記のいずれか１組のオリゴヌクレオチド、またはその標識物からなる、プローブおよびプライマーのセット：

c.844の変異を検出するための配列番号:1～4の各々の配列からなるオリゴヌクレオチド、

c.637の変異を検出するための配列番号:5～8の各々の配列からなるオリゴヌクレオチド、

c.659の変異を検出するための配列番号:9～12の各々の配列からなるオリゴヌクレオチド、

c.527の変異を検出するための配列番号:13～16の各々の配列からなるオリゴヌクレオチド、

c.725の変異を検出するための配列番号:17～20の各々の配列からなるオリゴヌクレオチド、

c.614の変異を検出するための配列番号:21～24の各々の配列からなるオリゴヌクレオチド、

c.499の変異を検出するための配列番号:25～28の各々の配列からなるオリゴヌクレオチド、

c.298の変異を検出するための配列番号:29～32の各々の配列からなるオリゴヌクレオチド、および

c.809の変異を検出するための配列番号:33～36の各々の配列からなる

オリゴヌクレオチド。