

Cancer Research Application Note No. 3

保存組織サンプルを対象とした 高解像度融解曲線分析 (High Resolution Melting (HRM) Analysis) による 迅速で信頼性の高いメチル化検出

American Society for Investigative Pathologyの許可を得てJ Mol Diagn 2009, 11:102-108より転載。

原著: High quality assessment of DNA methylation in archival tissues from patients with colorectal cancer using quantitative high-resolution melting analysis " in the J Mol Diagn 2009, 11(2).

1 イントロダクション

プロモーター領域の高度メチル化は、癌の遺伝子転写抑制においてよくみられる機構であり、癌の特徴の1つと考えられています。DNAメチル化解析は、癌の早期検出、リスク評価、および治療効果の評価のための有望なツールです (1, 2)。

DNAメチル化検出では、ゲノムDNAのバイサルファイト処理が、汎用されています (3)。この処理では、シトシンがウラシルに変換されますが、5-メチル化シトシンは変換されません。この配列の変化と、次に行うPCR増幅により、メチル化シトシンを同定できます (4)。

最も正確なメチル化プロファイリング法は、バイサルファイト・シーケンシング (bisulfite sequencing) 法であり、この手法では単一のメチル化シトシンも検出できます。PCRをベースとしたより簡便な方法もいくつか開発されており、小規模な研究室にとっては特に重要な手法となっています。これらの新しく簡便な方法の1つが、溶液中でのDNAの「融解 (変性)」の特性を基盤とした高解像度融解曲線分析 (HRM分析) です (5)。本法の原理は、メチル化シトシン含量の異なるバイサルファイト処理したDNAテンプレートが、融解温度の差に基づく融解曲線解析によって判別できることに基づい

Marija Balic, Martin Pichler, Ellen Heitzer, Jasmin Strutz, Nadia Dandachi

Division of Oncology
Department of Internal Medicine
Medical University of Graz
Auenbruggerplatz 15, 8036, Graz, Austria



Marija
Balic

Martin
Pichler

Ellen
Heitzer

Jasmin
Strutz

Nadia
Dandachi

ています (6)。高価なプローブや標準化のためのリファレンス遺伝子アッセイが不要なため、HRMは比較的簡便で対費用効果の高い手法です。HRMにより、アンプリコン内の全CpGを解析でき、融解曲線の形状により、heterogeneousなメチル化と、homogeneousなメチル化を判別できます。プロモーターCpGアイランドのメチル化パターンは通常homogeneousではないため、この要素は重要となります (7, 8)。

保存組織は、重要なバイオマーカーを試験するための、貴重な試料です。多くの方法の有用性は、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織で試験されています。本研究の目的は、大腸癌患者由来の保存FFPE組織のプロモーターメチル化の検出のために、HRMアッセイを確立し評価することで

2 材料と方法

コントロールサンプルおよび試験サンプル

メチル化コントロールおよび非メチル化コントロールとして、CpGenome Universal Methylated DNA (Chemicon/Millipore社, Billerica, MA) および末梢血単核細胞 (PBMNC) 由来のDNAを使用しました。メチル化コントロールDNAを非メチル化PBMNC DNAで希釈し、メチル化標準品 (50%、25%、10%、5%、1%、0.1%) を作製しました。ヒト癌由来細胞株 (MCF-7, MDA-MB-231, SKBR3, T47D, MDA-MB-453, DU145, LNCAP, PC3) を評価対象とし、培養物を直接使用するか、あるいはKerstens Hらの方法 (9) で作製したホルマリン固定パラフィン包埋後に使用しました。HRMアッセイを最適化した後、大腸癌患者由来の保存組織サンプルを解析しました。

DNA抽出とバイサルファイト処理

健常ボランティアのPBMNC DNAと、培養した癌由来細胞株のDNAを、QIAamp® DNA Blood Midi Kit (キアゲン社, Hilden, Germany) を用いて、推奨プロトコルに従い分離しました。試験用の保存組織からのDNA分離には、腫瘍組織を含む厚さ10 μ mのFFPEブロックの切片を使用しました。High Pure PCR Template Preparation Kit (ロシュ社) を用いて、以下の点を変更してDNAを分離しました。(a) 組織標本を溶解バッファー200 μ Lに入れ98°Cで30分間インキュベート。(b) 65°Cで1時間プロテイナーゼK処理。(c) 溶解した標本を98°Cで10分間インキュベート。(d) 室温で20分間20,000 \times gで遠心分離。(e) 溶解物を新しいチューブに移し、室温でさらに15分間20,000 \times gで遠心分離。最後に (f) 溶解物を新しいチューブに移し、イソプロパノール200 μ Lを添加して、-20°Cで2時間以上沈殿。

した。まず、その原理を証明するため、メチル化DNA希釈マトリックス中の、O6-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ (MGMT)、大腸腺腫症 (APC)、グルタチオンS-トランスフェラーゼP1 (GSTP1) およびphosphatase and tensin homolog deleted on Chromosome 10 (PTEN) のプロモーターを用いたアッセイを行い、HRMがプロモーターメチル化検出に適用できることを実証しました。次に、ヒト癌由来細胞株の新鮮サンプルおよびFFPEサンプルから分離したDNAを用いて、MGMTとAPCのHRMアッセイを検討しました。最後に、このようにして確立したMGMTおよびAPCのHRMアッセイを、保存FFPE大腸腫瘍標本を用いて実施しました。

1 μ gのゲノムDNAを、EpiTect® Bisulfite kit (キアゲン社, Hilden, Germany) を用いて、プロトコルに従いバイサルファイト処理しました。バイサルファイト処理済みDNAを40 μ Lの容量で溶出した後、HRMおよびMethyLight分析に用いました。

MethyLightアッセイ

MGMTおよびAPCのMethyLightアッセイについては、既に報告されています (10-12)。概要は以下の通りです。LightCycler® 480 Instrumentを用いて、反応容量20 μ L (1 \times LightCycler® 480 Probes Master、各プライマー500nmol/L、プローブ200nmol/L、バイサルファイト処理DNA50ng) で、PCRを行いました。各反応は3重測定で行いました。PCR反応条件は、monocolor hydrolysis probe検出フォーマット、95°C10分 (1サイクル)、95°C10秒・60°C30秒・72°C1秒 (45サイクル) でした。COL2A1を用いて、使用したDNA量を標準化しました。

高解像度融解曲線分析 (HRM分析)

LightCycler® 480 Instrument (ロシュ社) を用いて、Wojdacz と Dobrovicが発表したプロトコル (5) に従い、PCR増幅とHRMを行いました。プライマーは、Wojdacz と Dobrovicに従って、1~2個のCpG部位が、5' 末端または5' 末端の隣接部位に位置するようにデザインしました。FFPE DNAは非常にフラグメント化されており、アンプリコンが大きいほど融解曲線の解像度が低くなることを考慮して、アンプリコンサイズは、200bp以下の長さになるようデザインしました。使用したHRMプライマーの概要は、表1に示します。

遺伝子名	プライマー配列 5'-3'	GenBank Accession Number	アンプリコンの 位置	アンプリコンサイズ (bp)	CpG/アンプリコン
APC	Fw AAGTAGTTGTGTAATTCGTTGGAT Rv CACCTCCATTCTATCTCCAATA	NT_034772	14488467- 14488615	149	11
M GMT	Fw GCGTTTCGGATATGTTGGGATAGT Rv AACGACCCAAACACTCACCAAA	X61657	1023-1132	110	15
GSTP1	Fw GTGAAGCGGGTGTGTAAGTTT Rv TAAACAAACAACAAAAAAAAAACC	X08058	862-981	120	13
PTEN	Fw TCGGTTGGGTTTTTGGGTAGAGG Rv CGCAAACCTACTACTAACATACCCAATAT	AF406618	1938-2093	156	11

表1:HRMプライマーとアンプリコン

PCRは最終反応容量20 μ L (1 \times LightCycler[®] 480 High Resolution Melting Master, MGMT, PTEN, GSTP1の各プライマー200nmol/L, APCのプライマー500nmol/L, バイサルファイト処理済DNAテンプレート50ng, MGMTとPTENではMgCl₂最終濃度3mmol/L, APCとGSTP1ではMgCl₂最終濃度4mmol/L)で行いました。各反応は3重測定で行いました。PCR反応条件は、SYBR Green I/ HRM Dye 検出フォーマット、95 $^{\circ}$ C 10分 (1サイクル)、95 $^{\circ}$ C 10秒・64 $^{\circ}$ Cから58 $^{\circ}$ Cへのタッチダウン (1 $^{\circ}$ C/サイクル)を10秒・72 $^{\circ}$ C 20秒 (50サイクル)にて行い、引き続いてHRMステップとして95 $^{\circ}$ C 1分・40 $^{\circ}$ C 1分・74 $^{\circ}$ C 5秒・90 $^{\circ}$ C (continuousモード、1 $^{\circ}$ Cあたり25回のデータ取得)としました。各プレートに複数の水ブランクを設け、健常者由来のPBMNC DNAをネガティブコントロールとしました。

各アッセイでは、メチル化混入比率が既知のスタンダードを用いた標準曲線を作成し、得られた結果を用いて各研究用腫瘍サンプルのメチル化比を推定しました。結果として得られた相対シグナル値 (%)は、非メチル化アレルとメチル化アレルの割合を反映します。

HRMデータは、Gene Scanning 及び TM Calling ソフトウェアモジュール (ロシュ社)で解析しました。PCR産物の融解を示す大きな蛍光の減少の前後の2つの標準化領域の蛍光値で補正することで、融解曲線を標準化しました。このアルゴリズムにより、最初の蛍光レベルが異なるサンプルを直接比較できます。標準化した後に、温度シフトして得られるプロットが、温度上昇に対する蛍光の低下の様子を示す融解曲線となります。

3 結果と考察

HRMアッセイの感度を、標準希釈シリーズで評価しました。全てのHRMアッセイ (APC, MGMT, GSPT1, PTEN)で、非メチル化DNAバックグラウンド中の1%のメチル化DNAを、再現性よく検出できました (図1A-D)。少量のメチル化DNAと混合した場合でも、われわれのデータにおいて3重測定の再現性が認められたことは重要です。まれなイベントを検出するなどの特定のアプリケーションにおいて、アッセイ感度

の高さは重要です。ただし、腫瘍組織での低レベルのメチル化の検出については、生物学的な意義がまだ確立されていません。これはメチル化の検出に用いる方法とは別に、今後研究する必要があります。DNAの由来に関わりなく、非メチル化DNAバックグラウンドのもとで少量のメチル化DNAを再現性高く検出できるHRMの能力により、低レベルのメチル化DNAの生物学的意義の評価が、今後進むと考えられます。

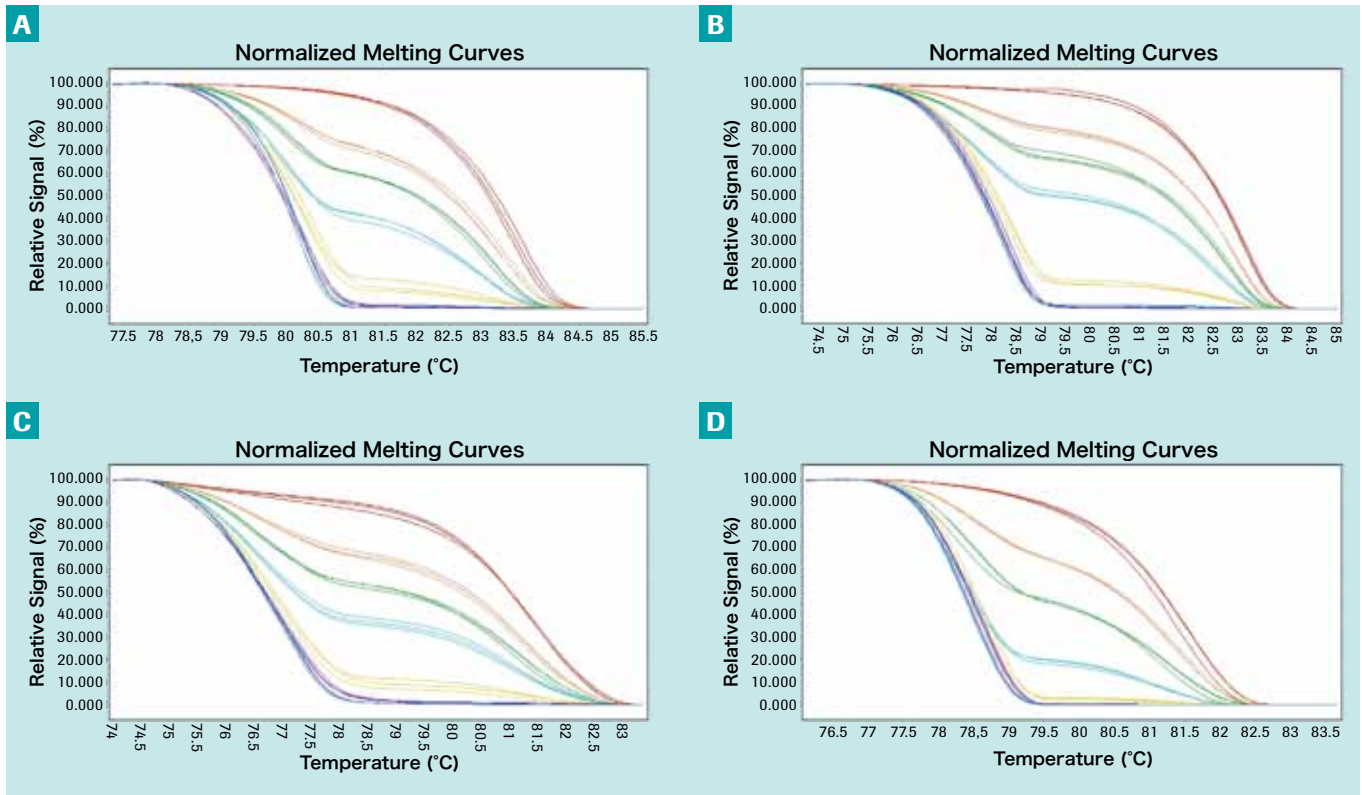


図1 MGMT(A)、APC(B)、GSTP1(C)、PTEN(D)のメチル化に関するHRMアッセイの感度

アッセイは、タッチダウンプロトコルを用いて、64°Cから58°Cのアニーリング温度で行いました。データは、“Gene Scanning”ソフトウェアモジュールで解析しました。メチル化標準品は3重測定として示します。標準品100%は赤、50%はオレンジ、25%は緑、10%は青緑、1%は黄色、0.1%は紫、0%は青色のラインで示します。

HRMアッセイのアッセイ間のばらつき (Inter-assay variability) を、バイサルファイト処理済みの同じメチル化標準品を4日間に分けて行った別々の4回のアッセイの結果を比較することで評価しました。結果として得られたデータから、ラン間のHRMアッセイのばらつきが小さく、再現性があることが明らかになりました。さらにわれわれは、バイサルファイト処理を行った日が異なるとHRMの結果に影響があるかどうか検討するため、4日間に分けて行った4回のバイサルファイト処理により調製したメチル化標準品を、同じHRMアッセイで解析して比較しました。データから、バイサルファイト処理を異なる日に行っても、良好な再現性が認められることが明らかになりました。図2は、APCおよびMGMTのHRMアッセイの標準偏差が小さく、バイサルファイト処理間のバラツキが小さいことを示しています。

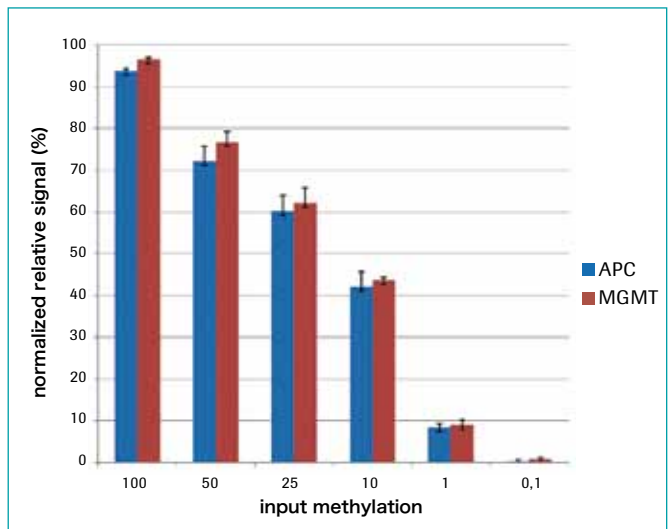


図2 メチル化の結果に対するバイサルファイト処理の影響

バイサルファイト処理を4日間に分けて行い、バイサルファイト処理メチル化標準品を同じHRMアッセイで解析しました。バーは、4回の独立した実験の平均値と、対応する標準偏差を示します。

次に、プロモーターの高度メチル化の検出における、ホルマリン固定パラフィン包埋の影響を評価しました。FFPE DNAのHRMアッセイの再現性をテストするため、新鮮な細胞株とFFPE細胞株のDNAについて、独立した実験を6回行いました。その結果、APCとMGMTのプロモーター高度メチル化を高い信頼性で検出できました。図3 (A-C)は、新鮮な細胞株とFFPE細胞株のDNAにおいて、APC HRMの結果が、ほぼ同じ再現性と一致度で得られたことを示しています。解析した細胞株8株のうち5株では、新鮮なDNAとFFPEのDNAで

検出されたAPCメチル化レベルがほぼ同じでした。図3AおよびBは、あるHRMアッセイの代表的な融解曲線です。図3Cは、新鮮な細胞株とFFPE細胞株のDNAにおける6回の独立した実験で得られたメチル化度の平均値と標準偏差を示します。MGMT HRMアッセイでも同様な結果が得られました(図4A、B、C)。全ての結果を、MethyLightアッセイと比較し、確認しました。図5に、HRMとMethyLightで検出されたAPCメチル化の一致度を示します。

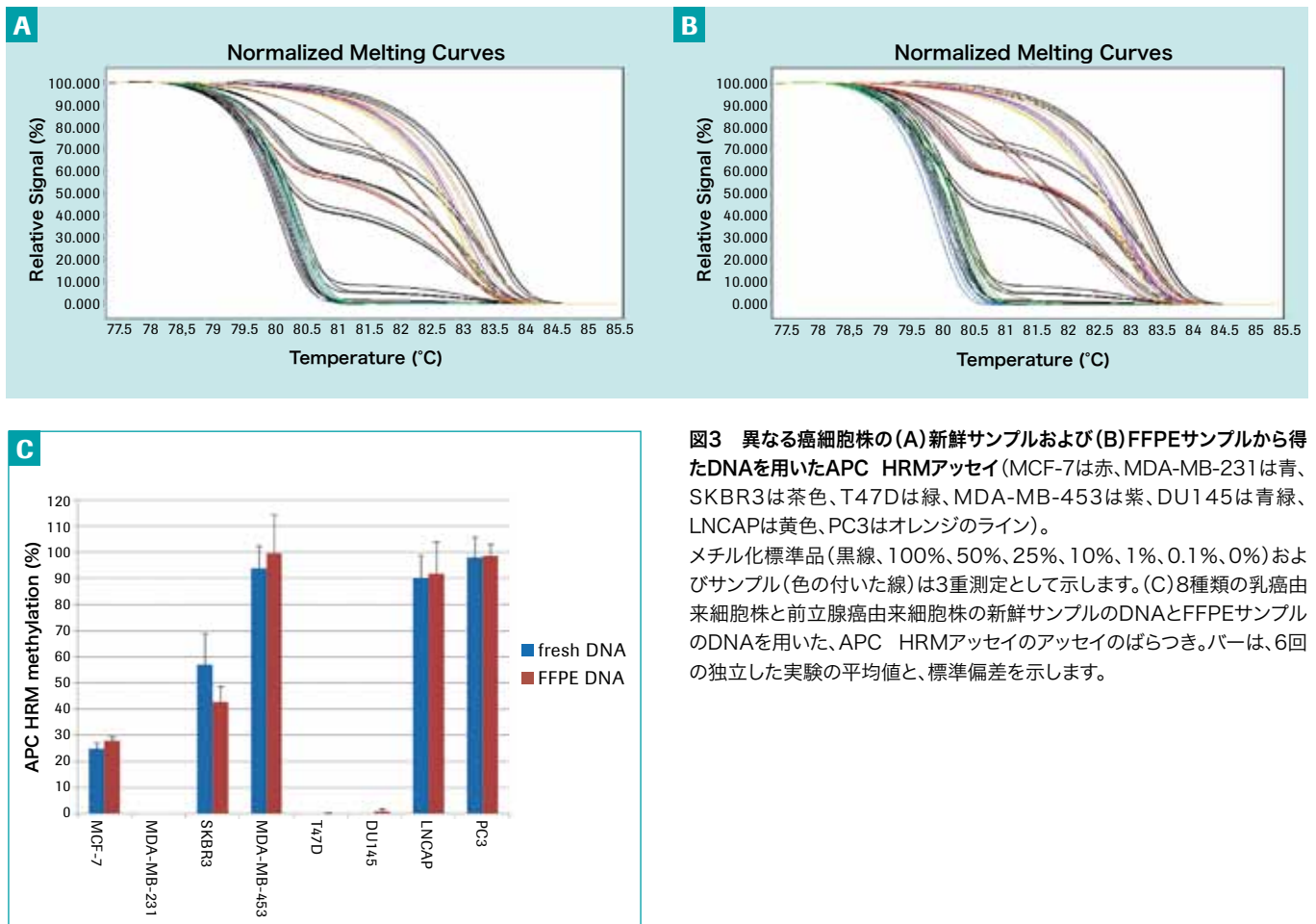


図3 異なる癌細胞株の(A)新鮮サンプルおよび(B)FFPEサンプルから得たDNAを用いたAPC HRMアッセイ(MCF-7は赤、MDA-MB-231は青、SKBR3は茶色、T47Dは緑、MDA-MB-453は紫、DU145は青緑、LNCAPは黄色、PC3はオレンジのライン)。メチル化標準品(黒線、100%、50%、25%、10%、1%、0.1%、0%)およびサンプル(色の付いた線)は3重測定として示します。(C)8種類の乳癌由来細胞株と前立腺癌由来細胞株の新鮮サンプルのDNAとFFPEサンプルのDNAを用いた、APC HRMアッセイのアッセイのばらつき。バーは、6回の独立した実験の平均値と、標準偏差を示します。

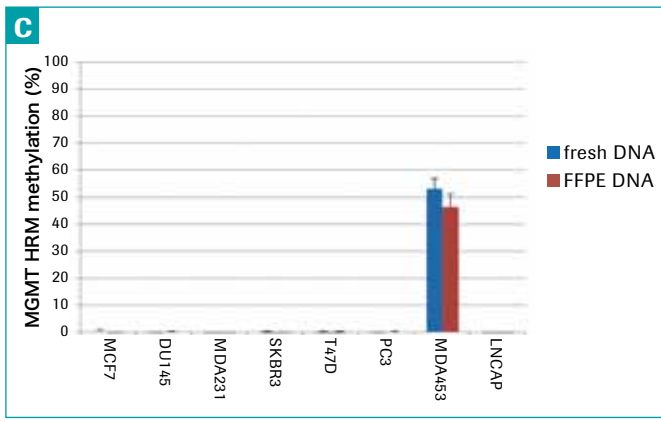
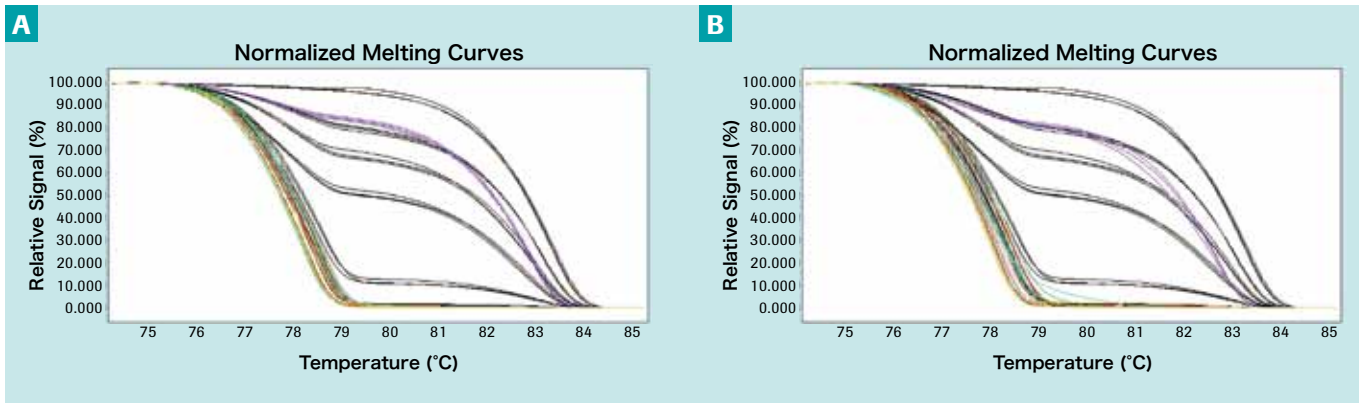


図4 異なる癌細胞株の(A)新鮮サンプルおよび(B)FFPEサンプルから得たDNAを用いたMGMT HRMアッセイ(MCF-7は赤、MDA-MB-231は青、SKBR3は茶色、T47Dは緑、MDA-MB-453は紫、DU145は青緑、LNCAPは黄色、PC3はオレンジのライン)。メチル化標準品(黒線、100%、50%、25%、10%、1%、0.1%、0%)およびサンプル(色の付いた線)は3重測定として示します。(C)8種類の乳癌由来細胞株と前立腺癌由来細胞株の新鮮サンプルのDNAとFFPEサンプルのDNAを用いた、MGMT HRMアッセイのアッセイのばらつき。バーは、6回の独立した実験の平均値と、標準偏差を示します。

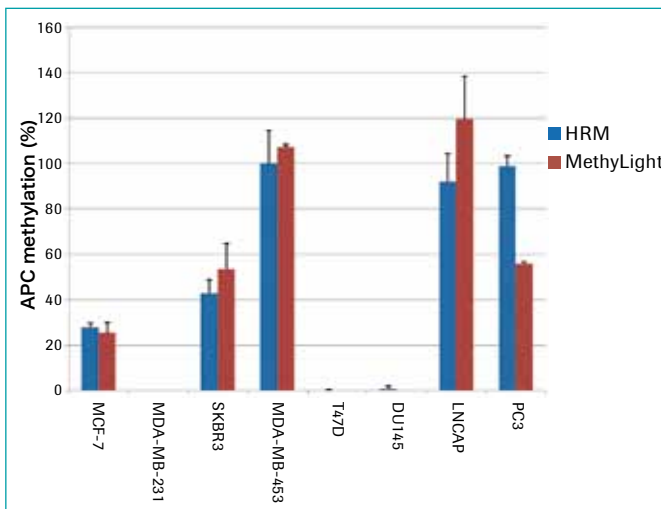


図5 異なる癌細胞株を用いたAPCメチル化検出の、HRMアッセイとMethyLightの比較。バーは、6回の独立した実験の平均値と標準偏差を示します。

興味深いことに、SKBR3細胞株は、他の癌由来細胞株とは異なるAPC融解プロファイルを示し(図6)、heterogeneousなメチル化であることが示されました。図6AおよびBに示すよ

うに、SKBR3は融解ピークがシフトしています。SKBR3のheterogeneousなメチル化は、直接バイサルファイト・シーケンシングで確認しました(図6C)。

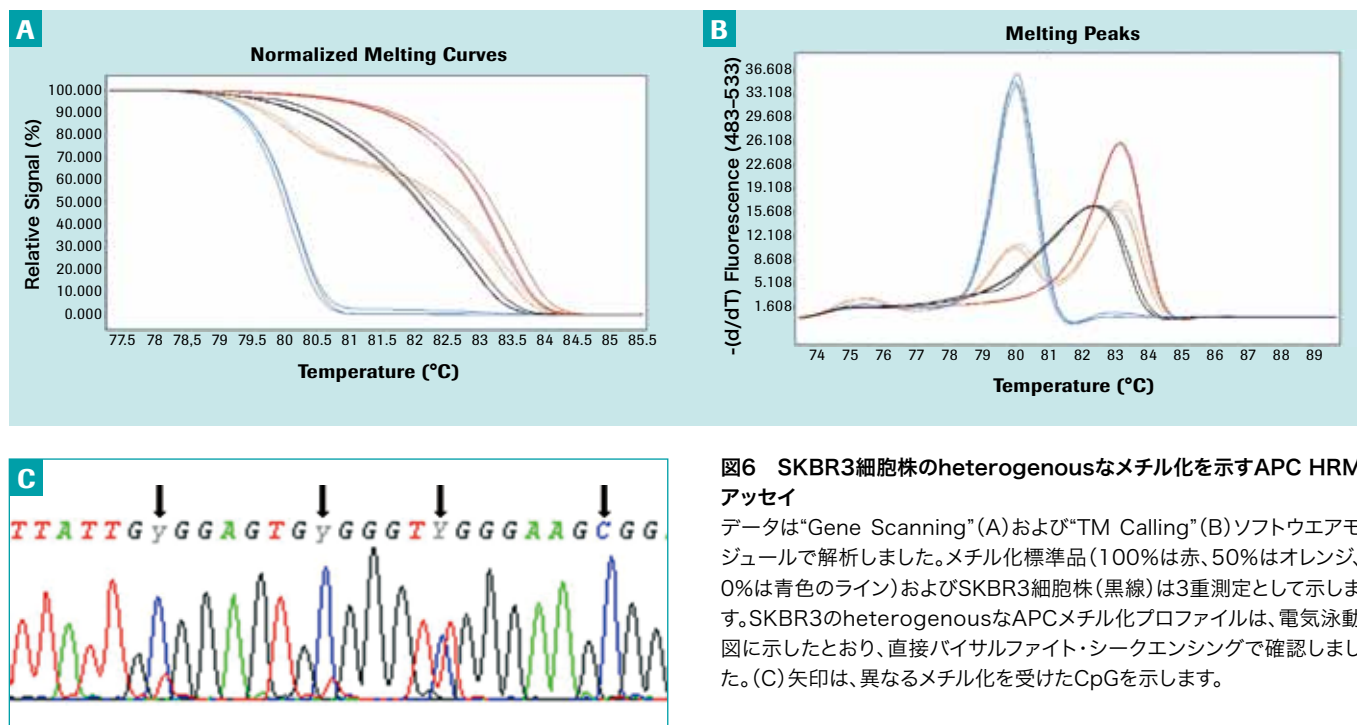


図6 SKBR3細胞株のheterogeneousなメチル化を示すAPC HRM アッセイ

データは“Gene Scanning”(A)および“TM Calling”(B)ソフトウェアモジュールで解析しました。メチル化標準品(100%は赤、50%はオレンジ、0%は青色のライン)およびSKBR3細胞株(黒線)は3重測定として示します。SKBR3のheterogeneousなAPCメチル化プロファイルは、電気泳動図に示したとおり、直接バイサルファイト・シーケンシングで確認しました。(C)矢印は、異なるメチル化を受けたCpGを示します。

次にわれわれは、MGMTおよびAPCプロモーターのメチル化検出にHRMを適用し、保存FFPE大腸腫瘍標本について検討しました。大腸癌組織のAPCおよびMGMTプロモーター領域のメチル化はすでに知られており、複数の独立した研究で発表されています(13-17)。われわれは、FFPE大腸癌組織およびメチル化DNA希釈マトリックスの両方から標準化した融解曲線を取得し、それらが同等の品質であることを示すことができました。大腸癌サンプルの42.4%にMGMTメチル化が、33.3%にAPCメチル化が同定されました。図7に、4個の代表的なFFPEサンプルのAPC(A)およびMGMT(B)のHRMアッセイの結果を示します。HRMをベースとしたメチ

ル化分析の評価を実証するため、全ての試験サンプルを同時にMethyLightでも分析しました。全体的な一致度は、MGMTについては91%、APCについては98.5%でした。6例では、MethyLightで検出されなかったMGMTプロモーターメチル化が、HRMのみで検出されました。また1例では、MethyLightでは検出できなかったAPCプロモーターメチル化が、HRMのみで検出されました。これらの融解曲線の不一致例は、HRMで検出できる低レベルのメチル化が存在することを示唆しました(12)。このような、少数の結果の不一致は、低レベルのメチル化が、HRMでは検出されたがMethyLightでは検出されなかったために生じたと考えられます。

FFPE組織におけるHRMに基づいたプロモーターメチル化分析には、将来適用可能なアプリケーションがいくつかあります。リンパ節転移および遠隔転移を伴う原発腫瘍のメチル化プロファイルの同定は、これらの疾患進行に関与するエピジェネティックイベントを明らかにするだけでなく、パラフィン包埋組織標本で簡単に評価できる予測マーカーパネルを決定するうえで有用と考えられます(18, 19)。このように、アプリケーションの1つとして、特定のマーカーのメチル化状態に基づく患者のリスク層別化が考えられます。このようなアプリケーションでは、われわれの研究で用いた、1%

というカットオフ値で、十分に区別が可能です。同じアッセイは腫瘍内の少量のメチル化細胞の検出にも利用可能で、また、リンパ節やその他の臓器で、非腫瘍細胞バックグラウンドでの少数の腫瘍細胞検出にも利用可能です。リンパ節微小転移は癌の重要なベンチマークであり、腫瘍進行の最も早い段階での徴候であることが、データから示されています(20, 21)。前述のように、プロトコルをこのようなアプローチに適応させれば、腫瘍量の少ない患者の選抜のために、さらに低いレベルのカットオフ値が使える可能性もあります。

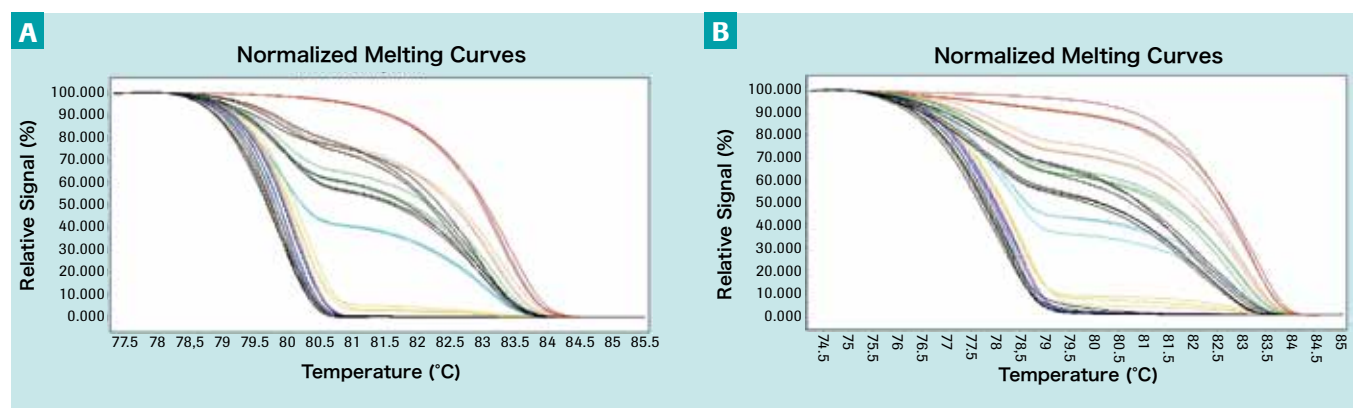


図7 さまざまな量のメチル化DNAを含むメチル化標準品(色つき線)および4種類のサンプル(メチル化サンプル2種類および非メチル化サンプル2種類、黒線)の(A)APCおよび(B)MGMT HRM曲線。メチル化標準品とサンプルは、3重測定として示します。標準品100%は赤、50%はオレンジ、25%は緑、10%は青緑、1%は黄色、0.1%は紫、0%は青色のラインで示します。

4 結論

今回、FFPE組織の解析における、プロモーターメチル化の定量的HRMの有用性と適用可能性を実証することができました。FFPE組織サンプルは、健常コントロール由来および疾患組織由来の最も大きな資源となっているため、その利用

には、研究において計り知れない価値があります。研究ツールとして確立し、将来的には日常的な検査として、利用できるようにするためにも、このアッセイの頑健性を証明する系統的評価は、非常に重要です。

オーダー情報

製品名	製品番号	包装単位
High Pure PCR Template Preparation Kit	1 796 828	1キット(100回精製)
LightCycler® 480 Probes Master (2x concentrated)	4 707 494 4 887 301	5×1mL(500×20μL反応) 10×5mL(5,000×20μL反応)
LightCycler® 480 High Resolution Melting Master	4 909 631	5×1mL(500×20μL反応)
LightCycler® 480 Gene Scanning Software	5 103 908	ソフトウェアパッケージ1個

1. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007 Apr;8(4):286-98.
2. Cote RJ, Laird PW, Datar RH. Promoter hypermethylation: a new therapeutic target emerges in urothelial cancer. *J Clin Oncol.* 2005 May 1;23(13):2879-81.
3. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Mar 1;89(5):1827-31.
4. Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer.* 2003 Apr;3(4):253-66.
5. Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(6):e41.
6. Dahl C, Guldborg P. High-resolution melting for accurate assessment of DNA methylation. *Clinical chemistry.* 2007 Nov;53(11):1877-8.
7. Nakagawa H, Chadwick RB, Peltomaki P, Plass C, Nakamura Y, de La Chapelle A. Loss of imprinting of the insulin-like growth factor II gene occurs by biallelic methylation in a core region of H19-associated CTCF-binding sites in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 16;98(2):591-6.
8. Song JZ, Stirzaker C, Harrison J, Melki JR, Clark SJ. Hypermethylation trigger of the glutathione-S-transferase gene (GSTP1) in prostate cancer cells. *Oncogene.* 2002 Feb 7;21(7):1048-61.
9. Kerstens HM, Robben JC, Poddighe PJ, Melchers WJ, Boonstra H, de Wilde PC, Macville MV, Hanselaar AG. AgarCyto: a novel cell-processing method for multiple molecular diagnostic analyses of the uterine cervix. *J Histochem Cytochem.* 2000 May;48(5):709-18.
10. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 2000 Apr 15;28(8):E32.
11. Widschwendter M, Siegmund KD, Muller HM, Fiegl H, Marth C, Muller-Holzner E, Jones PA, Laird PW. Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3807-13.
12. Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Cantor M, Kirkner GJ, Spiegelman D, Makrigiorgos GM, Weisenberger DJ, Laird PW, Loda M, Fuchs CS. Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time PCR (MethyLight) for quantitative DNA methylation analysis. *J Mol Diagn.* 2006 May;8(2):209-17.
13. Arnold CN, Goel A, Niedzwiecki D, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR. APC promoter hypermethylation contributes to the loss of APC expression in colorectal cancers with allelic loss on 5q. *Cancer Biol Ther.* 2004 Oct;3(10):960-4.
14. Prall F, Weirich V, Ostwald C. Phenotypes of invasion in sporadic colorectal carcinomas related to aberrations of the adenomatous polyposis coli (APC) gene. *Histopathology.* 2007 Feb;50(3):318-30.
15. Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao L, Hernandez NS, Vilaythong J, Houlihan PS, Krouse RS, Prasad AR, Einspahr JG, Buckmeier J, Alberts DS, Hamilton SR, Issa JP. MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Sep 21;97(18):1330-8.
16. Suehiro Y, Wong CW, Chirieac LR, Kondo Y, Shen L, Webb CR, Chan YW, Chan AS, Chan TL, Wu TT, Rashid A, Hamanaka Y, Hinoda Y, Shannon RL, Wang X, Morris J, Issa JP, Yuen ST, Leung SY, Hamilton SR. Epigenetic-Genetic Interactions in the APC/WNT, RAS/RAF, and P53 Pathways in Colorectal Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008 May 1;14(9):2560-9.
17. Hashimoto K, Shimizu Y, Suehiro Y, Okayama N, Hashimoto S, Okada T, Hiura M, Ueno K, Hazama S, Higaki S, Hamanaka Y, Oka M, Sakaida I, Hinoda Y. Hypermethylation status of APC inversely correlates with the presence of submucosal invasion in laterally spreading colorectal tumors. *Mol Carcinog.* 2008 Jan;47(1):1-8.
18. Bastian PJ, Ellinger J, Wellmann A, Wernert N, Heukamp LC, Muller SC, von Ruecker A. Diagnostic and prognostic information in prostate cancer with the help of a small set of hypermethylated gene loci. *Clin Cancer Res.* 2005 Jun 1;11(11):4097-106.
19. Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E, Han Y, Guo M, Ames S, Glockner S, Pian-tadosi S, Gabrielson E, Pridham G, Pelosky K, Belinsky SA, Yang SC, Baylin SB, Herman JG. DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N Engl J Med.* 2008 Mar 13;358(11):1118-28.
20. Cote RJ, Peterson HF, Chaiwun B, Gelber RD, Goldhirsch A, Castiglione-Gertsch M, Gusterson B, Neville AM. Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases in management of breast cancer. International Breast Cancer Study Group. *Lancet.* 1999 Sep 11;354(9182):896-900.
21. Pagliarulo V, Hawes D, Brands FH, Groshen S, Cai J, Stein JP, Lieskovsky G, Skinner DG, Cote RJ. Detection of occult lymph node metastases in locally advanced node-negative prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2006 Jun 20;24(18):2735-42.

LIGHTCYCLER and HRM are trademarks of Roche.

SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc.

Other brands or product names are trademarks of their respective holders.

License Disclaimer:

Parts of the Software used for the LightCycler® 480 System are licensed from Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT, USA. This product is covered by one or more of U.S. 6,197,520, 6,303,305, 6,387,621, 6,503,720, 6,730,501 and corresponding claims in their non-U.S. counterparts, owned by Roche Diagnostics GmbH and/or licensed from Idaho Technology, Inc. This LightCycler® 480 Real-Time PCR System is a real-time thermal cycler licensed for research use only under U.S. Patent No. 6,814,934 and corresponding claims in its non-U.S. counterparts, and under one or more of U.S. Patents Nos. 5,475,610, 5,602,756, 6,703,236, 7,238,517, 7,504,241, 7,537,377 or corresponding claims in their non-U.S. counterparts, owned by Applied Biosystems, LLC. No rights are conveyed expressly, by implication or estoppels to any other patent claims. The LightCycler® 480 Real-Time PCR System is not intended for *in vitro* diagnostic use in the U.S. For further information on purchasing additional rights, contact the Director of Licensing at Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California, 94404, USA.

No right is conveyed expressly, by implication, or by estoppels under any other patent claim, such as claims to apparatus, reagents, kits, or methods such as 5' nuclease methods. License rights to practice PCR methods under the foregoing Roche patents for research and other *non-in vitro* diagnostic applications may be purchased from Applied Biosystems or may be obtained by purchasing licensed reagents from Roche, Applied Biosystems, or other Authorized third party. For information on purchasing licenses for research and other *non-in vitro* diagnostic applications, contact the Director of Licensing at Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

A license to practice PCR methods with real-time detection under patents of F. Hoffmann-La Roche Ltd, and Roche Molecular Systems ("Roche") for *in vitro* diagnostic applications may be purchased from Roche or may be obtained by purchasing *in vitro* diagnostic reagents from Roche or any other Authorized third party. The LightCycler® 480 Real-Time PCR System is not intended for *in vitro* diagnostic use in the U.S.

This product is covered in-part by US 5,871,908 or any foreign equivalents, co-exclusively licensed from Evotec OAI AG. The purchase price includes a license to practice the methods covered by US 5,871, 908 by using the product. Purchase of this product, however, does not convey to the purchaser a license or right to (i) commercially make, have made or sell reagents and/or kits, or (ii) buy or use reagents and/or kits provided by a third party used in conjunction with the product or any other thermocycler to practice the methods covered by US 5,871,908 or any foreign equivalents.



お問い合わせは…

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
AS事業部 (研究用試薬・機器)

本社：〒105-0014 東京都港区芝2丁目6番1号

TEL.03-5443-5287 FAX.03-5443-7098

E-Mail: tokyo.biochemicals@roche.com

U R L : <http://www.roche-biochem.jp>