(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2021-502809
(P2021-502809A)
(43)公表日　令和3年2月4日(2021.2.4)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12Q	1/6809	(2018.01)	C12Q	1/6809	Z	4B063
C12Q	1/6883	(2018.01)	C12Q	1/6883	ZNAZ	
C12Q	1/04	(2006.01)	C12Q	1/04		
C12Q	1/6851	(2018.01)	C12Q	1/6851	Z	
C12Q	1/686	(2018.01)	C12Q	1/686	Z	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 17 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-524841 (P2020-524841)
(86)(22)出願日　平成30年11月6日 (2018.11.6)
(85)翻訳文提出日　令和2年5月7日 (2020.5.7)
(86)国際出願番号　PCT/EP2018/080235
(87)国際公開番号　WO2019/091942
(87)国際公開日　令和1年5月16日 (2019.5.16)
(31)優先権主張番号　102017126248.2
(32)優先日　平成29年11月9日 (2017.11.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
ドイツ(DE)

(71)出願人　511145937
エピオンティス　ゲーエムベーハー
ドイツ，１２４８９　ベルリン，バルバラ－ムリントック－シュトラーセ　６
(74)代理人　100088904
弁理士　庄司　隆
(74)代理人　100124453
弁理士　資延　由利子
(74)代理人　100135208
弁理士　大杉　卓也
(74)代理人　100163544
弁理士　平田　緑
(74)代理人　100183656
弁理士　庄司　晃

最終頁に続く

(54)【発明の名称】免疫細胞、特に単球性骨髄由来抑制細胞（ｍＭＤＳＣ）の同定のためのエピジェネティックマーカーとしてのＥＲＧＩＣ１

(57)【要約】
本発明は、特定の免疫細胞、特にMDSCを同定する方法、特にin vitroの方法に関し、該方法は、小胞体－ゴルジ体中間区画1（ERGIC1）の哺乳類遺伝子領域の少なくとも1つのCpG位置の修飾、好ましくはメチル化状態の解析を含み、非MDSCと比較して、上記遺伝子領域の脱メチル化、又はメチル化若しくは修飾の欠如はMDSCの指標である。本発明による解析は、MDSCの特定の亜集団、すなわち単球性MDSC（mMDSC）をエピジェネティックレベルで同定し、複雑なサンプル中の他の全ての細胞、例えば他の血液又は免疫細胞と区別することができる。本発明は更に、mMDSC、特に複雑なサンプル中のmMDSCを定量する改良された方法を提供する。この方法は、好ましくは全血及び／又は非トリプシン処理組織において、細胞の精製及び／又は濃縮工程を伴わずに行うことができる。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
哺乳類由来のサンプルにおいて単球性骨髄由来抑制細胞（mMDSC）を同定する方法であって、小胞体－ゴルジ体中間区画1（ERGIC1）の哺乳類遺伝子領域の少なくとも1つのCpG位置の修飾、好ましくはメチル化状態の解析を含み、解析される前記遺伝子領域が好ましくは配列番号1による配列を含み、非mMDSCと比較した場合の前記遺伝子領域の脱メチル化、又はメチル化若しくは修飾の欠如がmMDSCの指標である、方法。
【請求項２】
前記少なくとも1つのCpG位置が、解析される前記遺伝子領域の転写開始、プロモーター領域、5'又は3'非翻訳領域、エキソン、イントロン、エキソン／イントロン境界よりも上流の5'領域に存在する、及び／又は解析される前記遺伝子領域の転写停止よりも下流の3'領域に存在する、請求項1に記載の方法。
【請求項３】
前記少なくとも1つのCpG位置が、配列番号1によるアンプリコンにおけるCpG位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、及び15から選択されるCpGから選択され、又はアンプリコン番号2505のフラグメントであり、又は配列番号2若しくは3によるバイサルファイト変換された配列のフラグメントにおけるCpG位置3、4、5、6、7、8、及び9から選択される、請求項1又は2に記載の方法。
【請求項４】
バイサルファイト変換可能性の解析が、メチル化特異的酵素消化、バイサルファイトシークエンシングから選択される方法、プロモーターメチル化、CpGアイランドメチル化、MSP、HeavyMethyl、MethyLight、Ms-SNuPEから選択される解析、及び増幅DNAの検出に依存する他の方法を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
【請求項５】
解析される前記領域中の前記メチル化の頻度の相対量とコントロール遺伝子、又はGAPDHのメチル化頻度の相対量との比較に基づくmMDSCの相対量の定量を更に含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
【請求項６】
前記サンプルが、ヒト血液サンプルを含む哺乳類の体液、又は組織、器官、骨髄、若しくは細胞型の血液サンプル、血液リンパ球のサンプル又はそれらの画分から選択される、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。
【請求項７】
前記mMDSCと、CD19+B細胞；CD8+細胞傷害性T細胞；CD15+顆粒球；CD14+のみの細胞、CD14+CD124+細胞、CD14+HLADR-細胞、及びCD14CD15二重陽性細胞を含む様々なMDSC画分；CD56+NK細胞；並びにCD4+Tヘルパー細胞から選択される細胞型の全て又は少なくとも1つとの区別を更に含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。
【請求項８】
同定される前記細胞の精製及び／又は濃縮の工程を伴わずに、又は全血及び／又は非トリプシン処理組織を使用して行われる、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。
【請求項９】
前記哺乳類の免疫状態を、同定された前記mMDSCに基づき決定する工程を更に含む、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１０】
哺乳類においてmMDSCのレベルをモニタリングする方法であって、請求項5～9のいずれか1項に記載の方法を行うことと、さらに、同定された前記細胞の相対量を、以前に、又は並行して同じ哺乳類から採取されたサンプル、及び／又はコントロールサンプルと比較することとを含む、方法。
【請求項１１】
化学的及び／又は生物学的物質を前記哺乳類に与えるのに応じた、前記mMDSCの量を、測定及び／又はモニタリングすることを更に含む、請求項1～10のいずれか1項に記載の方

法。
【請求項１２】
前記哺乳類が、自己免疫疾患、移植拒絶、感染症、癌、及び／又はアレルギーを罹患している、又は罹患する可能性がある、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１３】
小胞体－ゴルジ体中間区画1（ERGIC1）の遺伝子領域中のCpG位置のバイサルファイト到達性の解析に基づき、哺乳類においてmMDSCを同定し、定量し、及び／又はモニタリングするためのキットであって、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法を行うための要素を含み、特にa)バイサルファイト試薬と、b)配列番号1による領域中のCpG位置から選択されるCpG位置のメチル化状態を解析するための材料、例えば配列番号4～11による配列から選択されるオリゴマーとを含む、キット。
【請求項１４】
配列番号4～11のいずれかによるオリゴマー、又は配列番号1～3によるアンプリコン。
【請求項１５】
哺乳類におけるmMDSCの同定、定量、及び／又はモニタリングへの請求項13に記載のキット、又は請求項14に記載のオリゴマー若しくはアンプリコンの使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、特定の免疫細胞、特にMDSCを同定する方法、特にin vitroの方法に関し、該方法は、小胞体－ゴルジ体中間区画（endoplasmatic reticulum-golgi intermediate compartment）1（ERGIC1）の哺乳類遺伝子領域の少なくとも1つのCpG位置の修飾、好ましくはメチル化状態の解析を含み、非MDSCと比較して、上記遺伝子領域の脱メチル化、又はメチル化若しくは修飾の欠如はMDSCの指標である。本発明による解析は、MDSCの特定の亜集団、すなわち単球性MDSC（mMDSC）をエピジェネティックレベルで同定し、複雑なサンプル中の他の全ての細胞、例えば他の血液又は免疫細胞と区別することができる。本発明は更に、mMDSC、特に複雑なサンプル中のmMDSCを定量する改良された方法を提供する。この方法は、好ましくは全血及び／又は非トリプシン処理組織において、細胞の精製及び／又は濃縮工程を伴わずに行うことができる。
【０００２】
さらに、本発明は、上述の方法を行うためのキット、及びその個々の使用に関する。哺乳類の任意の固形臓器若しくは組織中の血液、又は任意の他の体液のMDSCを定量的に検出及び測定する、新規の、よりロバストな手段を提供することが、本発明のねらいの1つである。
【背景技術】
【０００３】
MDSC（骨髄由来抑制細胞）は、骨髄幹細胞から生じる細胞ファミリーである骨髄系統由来の免疫細胞の異種群である。MDSCの或る特定の亜集団、すなわちmMDSCは、造血の変化の結果として慢性感染症及び癌等の病的状態において強く増殖する。MDSCは、免疫賦活特性ではなく強い免疫抑制活性を有する点において他の種類の骨髄細胞と区別される。他の骨髄細胞と同様に、MDSCは、T細胞、樹状細胞、マクロファージ、及びナチュラルキラー細胞を含む他の種類の免疫細胞と相互作用して、それらの機能を調節する。それらの作用機序は未だ明らかではないが、臨床及び実験証拠により、MDSCの高浸潤を伴う癌組織が患者の予後不良及び治療法耐性に関連していることが示唆される。
【０００４】
個体中のほぼ全ての細胞が全く同一の全数のDNAコードを含んでいるものの、高等生物は、様々な種類の組織において異なるパターンの遺伝子発現を定め、維持しなければならない。ほとんどの遺伝子調節は一過性であり、細胞の現在の状態及び外部刺激の変化に依存する。一方、持続的調節は、基本的なDNAの遺伝子コードを変更しない遺伝的調節パターンであるエピジェネティクスの主要な役割である。DNAメチル化はエピジェネティック

調節の原型であり、細胞の安定した記憶として働き、様々な種類の細胞の長期にわたる同一性の維持において決定的な役割を果たす。近年、他の型のエピジェネティック調節が発見された。「第5の塩基」5-メチルシトシン（mC）に加えて、第6の塩基（5-ヒドロキシメチルシトシン、hmC）、第7の塩基（5-ホルミルシトシン、fC）及び第8の塩基（5-カルボキシシトシン、cC）が見られる（非特許文献1）。

【０００５】

上述のDNA修飾の主要な標的は、2ヌクレオチドの配列シトシン－グアニン（「CpGサイト」）であり、この文脈においてシトシン（C）は単純な化学修飾を受けてホルミル化、メチル化、ヒドロキシメチル化、又はカルボキシル化することができる。ヒトゲノムにおいて、CG配列は、「CpGアイランド」と呼ばれる或る特定の比較的密であるクラスターを除き、予想よりも大幅に低頻度である。CpGアイランドは遺伝子プロモーターと関連することが多く、ヒト遺伝子の半分を超えるものがCpGアイランドを有すると推定されている（非特許文献2）。

【０００６】

異常なDNAメチル化は、健康な細胞から癌細胞への形質転換に関連することが多い。観察される作用には、ゲノムワイド低メチル化、腫瘍抑制遺伝子のメチル化の増加、及び多くの癌遺伝子の低メチル化がある（例えば非特許文献3、非特許文献4及び非特許文献5で概説される）。メチル化プロファイルは腫瘍特異的であると認識されており（すなわち、特定の遺伝子又は更には個々のCpGのメチル化パターンの変化は、特定の種類の腫瘍の診断となる）、今日では膀胱癌、乳癌、結腸癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、肺癌、及び前立腺癌の幅広い診断マーカーのコレクションが存在する（例えば非特許文献5にまとめられる）。

【０００７】

近年説明されたシトシンの修飾の1つとして、5-ヒドロキシメチル化があり、酸化的バイサルファイトシークエンシングを用いたCpGアイランドにおける5hmCマッピング及び定量が示された（非特許文献1）。転写調節因子に関連するCpGアイランド、及び長鎖散在反復配列（long interspersed nuclear elements）において高レベルの5hmCが見られた。これらの領域が胚性幹細胞においてエピジェネティックリプログラミングを受けるかもしれないことが示唆される。

【０００８】

非特許文献6は、前立腺癌の診断マーカーとしてのERGIC1に近接する領域を記載している。

【０００９】

非特許文献7は、MDCSにおけるエピジェネティック調節に関連するデータを要約している。

【００１０】

特許文献1は、バイオマーカーを同定する、特に早期診断、診断、病期、疾患の重症度、疾患のサブタイプ、治療法に対する応答、又は予後評価等の臨床評価を行うのに用いられるバイオマーカーを同定する方法及び装置を記載している。1つの特定の例では、この技法を適用することで、感染陰性SIRS又は感染陽性SIRSのいずれかであるSIRS（全身性炎症反応症候群）を罹患している、罹患している疑いがある、又はその臨床兆候を有する患者の評価が可能になる。EPIC1（ERGIC1）は、IRSバイオマーカー遺伝子として言及されている。

【００１１】

特許文献2は、細胞又は細胞の混合物を同定するため、及び血液中又は組織中の細胞の分布の変化を定量するため、及び疾患の状態、特に癌を診断し、予後判断し、治療するために、DNAメチル化アレイを使用する方法を記載している。この方法は、新鮮なサンプル及び保存されたサンプルを使用する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１２】
【特許文献１】米国特許出願公開第2016-0237493号
【特許文献２】国際公開第2012/162660号
【非特許文献】
【００１３】
【非特許文献１】Michael J. Booth et al. Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosineand 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution Science 18 May 2012, Vol.336 no. 6083 pp. 934-937
【非特許文献２】Antequera and Bird, Proc Natl Acad Sci USA 90: 11995-9, 1993
【非特許文献３】Jones and Laird, Nature Genetics 21:163-167, 1999
【非特許文献４】Esteller, Oncogene 21:5427-5440, 2002
【非特許文献５】Laird, Nature Reviews/Cancer 3:253-266, 2003
【非特許文献６】Kirby et al. (Genome-wide DNA methylation measurements in prostatetissues uncovers novel prostate cancer diagnostic biomarkers and transcription factor binding patterns. BMC Cancer 2017 (1): 273, pp 1-10)
【非特許文献７】Zhang et al. (Epigenetics in myeloid derived suppressor cells: a sheathed sword towards cancer. Oncotarget (2016) 7 (35): 57452-57463)
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１４】
上述の観点から、本発明の目的は、特定の免疫細胞、特にMDSCの或る特定の亜集団をより簡便に、かつ確実に検出し、同定し、区別し、定量するための優れたツールとしてのDNAメチル化解析に基づく、改善された、特にロバストな方法を提供することである。
【課題を解決するための手段】
【００１５】
本発明は、哺乳類由来のサンプルにおいて或る特定の骨髄由来抑制細胞（MDSC）を同定する方法であって、小胞体－ゴルジ体中間区画1（ERGIC1）の哺乳類遺伝子領域の少なくとも1つのCpG位置の修飾、好ましくはメチル化状態の解析を含み、解析される上記遺伝子領域が好ましくは配列番号1による配列であり、非MDSCと比較した場合の上記遺伝子領域の脱メチル化、又はメチル化若しくは修飾の欠如が単球性MDSCの指標である、方法を提供することで、上述の目的を解決する。本方法は、免疫抑制環境の重要な要素である単球性骨髄由来抑制細胞（mMDSC）を同定することが可能である。マウスでは、単球性MDSCは、高レベルのLy6C表面マーカーを発現し、Ly6Gマーカーの発現が低いか又はないが、顆粒球性MDSCと呼ばれる別の群は、Ly6C及び高レベルのLy6Gを発現する。本発明の目的上、ヒトmMDSCは、CD15-CD14+CD33+CD11b+HLADR+と規定される。ヒト顆粒球性MDSCは、CD15+である。第3の画分は、CD15+CD14+であると考えられるため、本発明は、非CD15 MDSCを検出する。
【００１６】
ヒトERGIC1の遺伝子はEnsemblで見ることができる。Ensembl-ID: ENSG00000113719。
【００１７】
本発明の文脈において、遺伝子領域は、ERGIC1に関連する、及びERGIC1をコードする全てのゲノム領域を含むものとする。したがって、ERGIC1に属するエンハンサー領域、プロモーター領域（複数の場合もある）、イントロン、エキソン、及び非コーディング領域（5'-及び／又は3'-領域）が含まれる。したがって、少なくとも1つのCpG位置が、解析される遺伝子の転写開始、プロモーター領域、5'又は3'非翻訳領域、エキソン、イントロン、エキソン／イントロン境界よりも上流の5'領域に存在する、及び／又は解析される遺伝子の転写停止よりも下流の3'領域に存在する、本発明による方法が好ましい。好ましくは、上記哺乳類は、マウス、ヤギ、イヌ、ブタ、ネコ、ウシ、ラット、サル又はヒトである。サンプルは必要であれば適切にプールすることができる。
【００１８】

本発明は更に、本発明者らが驚くべきことにERGIC1遺伝子の領域を、MDSCの同定、及びERGIC1遺伝子の解析の臨床ルーチンへの適用を可能にする、特異的なエピジェネティックマーカーとして同定したことに基づく。

【００１９】

本発明の文脈において、特に配列番号1による、ERGIC1のゲノム領域により、mMDSCの同定が可能になる。驚くべきことに、バイサルファイト変換可能及びバイサルファイト変換不可能シトシンのパターン分離（discriminatory pattern）は、配列番号1によるアンプリコンを用いて、特に配列番号2又は3によるバイサルファイト変換された配列に示されるように、特に、更には排他的に、mMDSCの配列番号1によるゲノム領域に限定されている。

【００２０】

本発明者らは、mMDSCにおいて、開示されるCpGモチーフはほぼ完全に脱メチル化し（すなわち70%より多く、好ましくは80%、好ましくは90%より多く、最も好ましくは95%より多く）、一方他の全ての免疫細胞において同じモチーフは完全にメチル化されることを示すことができた。

【００２１】

上述の領域内のCpGモチーフの示差的メチル化は、mMDSCを同定する有用なツールであり、例えば自己免疫疾患、移植拒絶、癌、アレルギー、一次及び二次免疫不全、例えばHIV感染及びAIDS、移植片対宿主（GvH）、血液悪性腫瘍、関節リウマチ、多発性硬化症、又は任意の想定され得る診断の状況における細胞傷害性T細胞に関連する免疫状態において上記細胞を同定及び定量するために不可欠、又は少なくとも幾らか価値のあるものとなるであろう。アッセイにより、精製又はいかなる染色工程も伴わずにmMDSCの測定が可能となる。

【００２２】

したがって、本発明による方法の別の好ましい態様は、解析される上記領域中の上記メチル化の頻度の相対量とコントロール遺伝子、例えばGAPDHのメチル化頻度の相対量との比較に基づくmMDSCの相対量の定量を更に含む。したがって、上記定量は、本明細書で記載され、解析される（例えば配列番号1の）ERGIC1の遺伝子領域におけるバイサルファイト変換可能なDNAと、バイサルファイト変換不可能なDNAとの比率に基づき達成される。mMDSCの相対量の定量が、ERGIC1の細胞特異的な領域のバイサルファイト変換可能なDNAの相対量、及び非細胞特異的な遺伝子（好ましくは指定の「コントロール遺伝子」又は「コントロール領域」、例えばGAPDHの遺伝子）のバイサルファイト変換可能なDNAの相対量の（好ましくは並行又は同時の）解析に基づくことが最も好ましい。

【００２３】

本発明による方法の更に好ましい実施の形態において、上記バイサルファイト変換可能性の解析は、配列番号1に基づき適切に設計され得る、適切なプライマー対の少なくとも1つのプライマー、好ましくは配列番号4～11のいずれかによるオリゴマーによる増幅を含む。

【００２４】

FACS及びmRNAの測定とは対照的に、本発明による方法を使用すると、測定（複数の場合もある）及び解析は、精製、保存、及び幾分は組織の品質に関わらず行うことができる。

【００２５】

例えばMSP、HeavyMethyl、Scorpion、MS-SNUPE、MethylLight、バイサルファイトシークエンシング、メチル特異的制限アッセイ、及び／又はデジタルPCR（例えばKristensen and Hansen PCR-BasedMethods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in CancerDiagnostics, Prognostics, and Response to Treatment Clinical Chemistry 55:81471-1483 (2009)を参照されたい）の状況における増幅は、ポリメラーゼ酵素、PCR若しくは化学的増幅反応、又は下記の当業者に知られる他の増幅方法を含むことが好ましい。

【００２６】

増幅により、本発明による方法（複数の場合もある）を行うのに特に好ましい「ツール

」であるERGIC1遺伝子領域のアンプリコンが生産される。結果として、配列番号4～11のいずれかによるオリゴマー、又は本明細書に記載のように配列番号4及び5、6及び7若しくは9及び10に基づくプライマー対により増幅されたアンプリコンが、本発明の好ましい実施の形態を構成する。したがって、配列番号1～3の配列（及び、必要であればそれらの相補配列）が、増幅のためのプライマーの設計に使用される、すなわち関連配列の「ビーコン」として働くことができる。同様に、追加のプライマー及びプローブを、配列番号1によるアンプリコンに基づき設計することができる。増幅は、ゲノムDNA配列及び／又はバイサルファイト（すなわち「変換」）DNA配列のいずれにおいても行うことができる。

【００２７】

当業者は更に、解析すべきサイトの量を最小限とするようにCpG位置の特定のサブセットを選択することができる。例えば、CpG位置の少なくとも1つは配列番号1によるアンプリコンにおけるCpG位置から選択され、好ましくは配列番号1によるアンプリコン番号2505におけるCpG位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、及び15から選択される。位置は、生成され、解析されるアンプリコンの5'-末端から数値的に数えられ、図1においてAMP2505:37、56、62、71、121、170、227、234、247、264、271、389、及び421のように命名される。3、4、5、6、7、8、9、又は10の位置の組み合わせが好ましく、それらの解析は本発明の状況において有益となるのに十分なデータ及び／又は情報をもたらす。

【００２８】

当業者は更に、解析すべきサイトの量を最小限とするようにCpG位置の特定のサブセット、例えばERGIC1特異的バイサルファイト変換可能領域のアンプリコン番号2505（配列番号1）のCpG位置62の少なくとも1つ、又は配列番号1によるバイサルファイト変換可能領域に存在する全てのサイトを選択することができる。234及び／又は37の位置の1つ以上を除外してもよい。

【００２９】

CpG位置のバイサルファイト変換可能性を解析するために、DNAメチル化を解析する任意の既知の方法を使用することができる。本発明による方法の好ましい実施の形態において、メチル化状態の解析は、メチル化特異的酵素消化、バイサルファイトシークエンシングから選択される方法、プロモーターメチル化、CpGアイランドメチル化、MSP、HeavyMethyl、MethyLight、Ms-SNuPEから選択される解析、又は増幅DNAの検出に依存する他の方法を含む。これらの方法は当業者によく知られており、個々の文献に見ることができる。

【００３０】

本発明による方法の好ましい実施の形態において、上記方法は日常的な適用、例えばDNAチップに適している。上述の情報及び個々の文献に基づき、当業者は上述のような方法をかかる状況に適合させることができるであろう。

【００３１】

本発明による方法の更に別の好ましい実施の形態において、上記方法は、同定すべき上記細胞の精製及び／又は濃縮の工程を伴わずに、好ましくは全血及び／又は非トリプシン処理組織を使用して行われる。

【００３２】

本発明による方法の別の好ましい実施の形態において、同定は、上記MDSCと、主要な全ての末梢血細胞型及び／又は非血液細胞、限定されないが好ましくはCD19+B細胞；CD8+細胞傷害性T細胞；CD15+顆粒球；CD14+のみの細胞、CD14+CD124+細胞、CD14+HLADR-細胞、及びCD14CD15二重陽性細胞を含む様々なMDSC画分；CD56+NK細胞；並びにCD4+Tヘルパー細胞との区別を含む。

【００３３】

本発明による方法の更に別の好ましい実施の形態において、サンプルは、哺乳類の血液サンプルを含む哺乳類の体液、又は組織、器官、若しくは白血球のサンプル、又はかかる組織、器官、若しくは白血球若しくは細胞型のサンプルの精製若しくは分離された画分から選択される。サンプルは必要であれば適切にプールすることができる。

【００３４】
したがって、本発明による方法の別の好ましい態様は、上記MDSCに基づき上記哺乳類の免疫状態を決定する工程を更に含む。MDSCは定量され、更に詳細なサブ集団を相対的に定量するベンチマークとして使用することができ、又は予測及び／又はスクリーニング及び／又は診断及び／又は予後判断及び／又は有害事象検出要素として使用することができ、又は最終的にMDSCの集団を検出することで全体的な免疫活性状態を決定するために使用することができる。
【００３５】
本発明による方法の更に別の好ましい実施の形態において、上記哺乳類は、自己免疫疾患、移植拒絶、感染症、癌、及び／又はアレルギー、例えば限定されるものではないが、クルーズトリパノソーマ感染症、マラリア及びHIV感染；血液悪性腫瘍、例えば限定されるものではないが慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、慢性リンパ性白血病、移植片対宿主病及び宿主対移植片病、菌状息肉腫、節外T細胞リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、退形成性大細胞リンパ腫、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫並びに他のT細胞、B細胞及びNK細胞新生物、T細胞不全、例えば限定されるものではないがリンパ球減少症、重症複合免疫不全（SCID）、オーメン症候群、軟骨毛髪低形成症、後天性免疫不全症候群（AIDS）、及び遺伝性状態、例えばディ・ジョージ症候群（DGS）、染色体切断症候群（CBS）、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、全身性硬化症、皮膚筋炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、乾癬、白斑、水疱性類天疱瘡、円形脱毛症、特発性拡張型心筋症、I型糖尿病、グレーブス病、橋本甲状腺炎、重症筋無力症、IgA腎症、膜性腎症及び悪性貧血；並びにB細胞及びT細胞混合障害、例えば限定されるものではないが毛細血管拡張性運動失調症（AT）及びウィスコット・アルドリッチ症候群（WAS）；並びに癌腫、例えば限定されるものではないが乳癌、結腸直腸癌、胃癌、膵癌、肝細胞癌、胆管細胞癌、黒色腫、及び頭頸部癌に罹患しているか、又は罹患している可能性がある。
【００３６】
したがって、本発明による方法の別の好ましい態様は、化学的及び／又は生物学的物質を上記哺乳類に与えるのに応じた、すなわち上記患者への治療に応じたmMDSCの量を、測定及び／又はモニタリングすることを更に含む、上述の方法に関する。上記方法は上述の工程と、同定された上記細胞の上記相対量を、以前に、又は並行して同じ哺乳類から採取されたサンプル、及び／又はコントロールサンプルと比較することとを含む。本発明の方法（複数の場合もある）がもたらす結果に基づき、担当医は患者の免疫状態を決定し、それに応じて基礎疾患の治療を調整することができるであろう。
【００３７】
上記方法は、細胞を精製及び／又は濃縮する工程を伴わず、好ましくは全血及び／又は非トリプシン処理組織、又は例えば患者に移植する細胞のサンプルとして他の任意の潜在的に上記mMDSCを含む生物学的サンプルにおいて行うことが好ましい。
【００３８】
したがって、本発明による方法の別の好ましい態様は、同定された上記mMDSCを、患者への移植のために製剤することを更に含む上述の方法に関する。これらの目的のための医薬調製物及びそれらの生産方法は、移植医療の技術分野で既知の方法で行われる。
【００３９】
本発明による方法の別の好ましい態様は、配列番号4～11のいずれかによるオリゴマー、又は配列番号1～3によるアンプリコンに関する。
【００４０】
したがって、本発明の更に別の好ましい態様は、ERGIC1遺伝子領域中のCpG位置のバイサルファイト到達性の解析に基づき、哺乳類においてMDSCを同定し、定量し、及び／又はモニタリングするためのキットに関する。該キットは、請求項1～12のいずれかによる方法を行うための要素を含み、特にa)バイサルファイト試薬と、b)配列番号1による領域中のCpG位置から選択されるCpG位置のメチル化状態を解析するための材料、例えば配列番号

4～11による配列から選択されるオリゴマーとを含む。

【００４１】

本発明は、本発明によるオリゴマー又はアンプリコン又はキットの、本明細書に記載のような哺乳類におけるMDSCを同定及び／又はモニタリングするための使用も包含する。

【００４２】

上述のように、近年3つの新規のシトシン修飾が発見された。それゆえ、将来の科学的発見により、過去に記載されたエピジェネティック修飾パターンが修正されることが期待される。これらの過去のシトシン修飾パターンは、バイサルファイト変換可能（非メチル化、非修飾）及びバイサルファイト変換不可能（メチル化、修飾）シトシンを包含する。説明したように、どちらの用語（termini）も修正が必要である。新規の科学的発見によると、(i)非バイサルファイト変換可能シトシンは、5-メチルシトシン（mC）及び5-ヒドロキシメチルシトシン（hmC）を包含し、(ii)バイサルファイト変換可能（すなわち、「バイサルファイト変換可能性」）シトシンは、5-ホルミルシトシン（fC）、5-カルボキシシトシン（cC）、及び非修飾シトシンを包含する。

【００４３】

加えて、過去の発明は、(i)クロマチン（細胞型に依存せず、100%バイサルファイト変換可能なDNA座）の全量に対するバイサルファイト変換可能シトシンの比率、又は(ii)非バイサルファイト変換可能シトシン（hmC及びmC）に対するバイサルファイト変換可能シトシン（fC、cC、非修飾シトシン）の比率に基づく。これらの比率は細胞型、細胞分化、細胞段階、及び病理学的細胞段階を特徴付ける。したがって、新たな技術により、新規の、より特異的な比率がもたらされ、現行の細胞特異的、細胞状態特異的、及び病理学的なエピジェネティック修飾パターンが補完され、それゆえ潜在的な新規のバイオマーカーが決定され得る。バイオマーカーとして発見されるべき新規の比率は以下のように定義することができる：

【数１】

$$\text{バイオマーカー比率}=a/b$$
$$a=\Sigma(\text{C及び／又はmC及び／又はhmC及び／又はfC及び／又はcC})$$
$$b=\Sigma(\text{C及び／又はmC及び／又はhmC及び／又はfC及び／又はcC})$$

（式中、a及びbは、1～4種類の修飾でそれぞれ異なる。新規のDNA修飾の発見によりこの列挙は拡張され得る）。

【００４４】

本願のための定義の目的で、DNA配列における「エピジェネティック修飾」は、(i)バイサルファイト変換可能シトシン（5-ホルミルシトシン（fC）及び／又は5-カルボキシシトシン（cC））及び(ii)非バイサルファイト変換可能シトシン（5-メチルシトシン（mC）、5-ヒドロキシメチルシトシン（hmC）を含む）の用語で称される。mC及びhmCの両方の種類のメチル化はバイサルファイト変換可能ではないため、これら2つを区別することができない。同様に、fC、cC及び非修飾シトシンはバイサルファイト変換可能であり、同様にそれぞれを区別することができない。「メチル化」DNAの用語は、mC及びhmCを包含する。「非メチル化」DNAの用語は、fC、cC、及び非修飾DNAを包含する。新規のDNA修飾の変形が将来発見されることが期待される。修飾の各型は、バイサルファイト変換可能であってもなくてもよい。しかしながら、本方法により2つの群を確実に区別しているため、これらの新規の修飾もマーカーとして使用可能であろう。

【００４５】

さらに、DNAの修飾とは別に、ヒストンも翻訳後修飾を受け、DNA及び核タンパク質との相互作用を変更する。修飾として、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、SUMO化、シトルリン化、及びADP-リボシル化が挙げられる。ヒストンH2A、H2B、及びH3のコアも修飾され得る。ヒストン修飾は様々な生物学的プロセス、例えば遺伝子調節、DNA修復、染色体凝縮（有糸分裂）、及び精子形成（減数分裂）で作用する。これらの修飾においても、特定の修飾パターンは、異なる細胞型、細胞段階、分化状態に特異的であり、かかるパターンをバイサルファイト変換可能性又は類似の方法で解析し、或る特定の細胞又

は細胞段階を同定することができる。本発明はこれらの修飾の使用も包含する。

【００４６】

まとめると、ERGIC1遺伝子領域、特に本明細書に記載のアンプリコンをマーカーとして使用することで、本発明者らはMDSCを非常に特異的に同定し、定量し、特にサンプル中の他の細胞型、例えば他の血液細胞との関連で区別した。

【００４７】

ここで、本発明は、以下の実施例に基づき、添付の図面及び配列リストを参照して更に説明されるが、それらに限定されない。本発明の目的で、本明細書に引用される全ての参照文献は、その全体が引用することにより本明細書の一部をなす。

【図面の簡単な説明】

【００４８】

【図１】本発明によるアンプリコン番号2505（配列番号1）のCpGサイトの解析を示す図である。表中の水平のボックスは、解析されるアンプリコン内のCpG位置（例えばCpG2、3、4等）と示される位置（CpG2、3等に対応する37、56、62、71、121、170、227、234、247、264、271、389、及び421）とに対応し、列は解析される細胞型に対応する。位置1（24）、及び位置15（431）も解析されているが、示していない。縦のボックス（列）は、解析される細胞画分に対応している。

【図２】本発明によるTpG特異的PCRシステムの線形性及び特異性についてのデータを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【００４９】

配列番号1は、本発明によるアンプリコンAMP2505のゲノム配列を表す。

【００５０】

配列番号2は、変換耐性CpG残基を有する、バイサルファイト変換され（b2F）、予め修飾された（CpG）配列を表す。

【００５１】

配列番号3は、変換耐性CpG残基を有しない、バイサルファイト変換され（b2F）、予め修飾されていない（TpG）配列を表す。

【００５２】

配列番号4～11は、本発明に使用されるオリゴマー（プライマー及びプローブ）を示す。

【実施例】

【００５３】

実施例1

標的mMDSC亜集団を同定するために、配列AMP2505、配列番号1によるヒトゲノム領域由来のバイサルファイト変換サンプルでqPCRを行った。関連するCpGを太字及び下線で示す。

【表Ａ】

GAGGGAATGAGTAGGTGAACAAA**CG**AGTGAGTTTTT**CG**CCTCACTCCCTGGCAC
T**CG**GCAC**CG**AGGGCTC**CG**ACAGGCTGGTGGCCAGGGCTGACCAGCCAGAGTTTC
ATCTAAAAGCCT**CG**ATGGCTATTTTTGGGACAAATGACCCACCACTTCCAATGAC
TTGCTC**CG**AAATGGCATCTAATTTCATTAAGCCTTGGAAACAGTGACATCACAAG
TGCCTGCC**CG**GTAGC**CG**CCCACATATGG**CG**AACCACAGAGTGATC**CG**AGATT**CG**
TCTGCAAGAACAGGGGAGAACTAAGGTCCCAAGCAGCAAAAGTTAAAATAGCAA
AGCTGAGGCATTCTGCTATGAAAAGAAATTACAGATGAAATCCATTAGTCAGACA
TTTCCAG**CG**GCAGTTTCCTTGCTTGGGAGCAGGGGAAGA**CG**TGTTTATT**CG**GGGT
TGGGCTCTGCAGCCATTCC

【００５４】

配列番号2は、変換耐性CpG残基を有する、バイサルファイト変換され（b2F）、予め修飾された（CpG）配列を表す。関連するCpGを太字及び下線で示す。

【表Ｂ】

AAAAAAATAAATAAATAAACAAA**CG**AATAAATTTTTT**CG**CCTCACTCCCTAACAC
T**CG**ACAC**CG**AAAACTC**CG**ACAAACTAATAACCAAAACTAACCAACCAAAATTTC
ATCTAAAAAACCT**CG**ATAACTATTTTTAAAACAAATAACCCACCACTTCCAATAAC
TTACTC**CG**AAATAACATCTAATTTCATTAAACCTTAAAAACAATAACATCACAAA
TACCTACC**CG**ATAAC**CG**CCCACATATAA**CG**AACCACAAAATAATC**CG**AAATT**CG**
TCTACAAAAACAAAAAAAAACTAAAATCCCAAACAACAAAAATTAAAATAACAA
AACTAAAACATTCTACTATAAAAAAAAATTACAAATAAAATCCATTAATCAAACA
TTTCCAA**CG**ACAATTTCCTTACTTAAAAACAAAAAAAAA**CG**TATTTATT**CG**AAAT
TAAACTCTACAACCATTCC

【００５５】

配列番号3は、変換耐性CpG残基を有しない、バイサルファイト変換され（b2F）、予め修飾されていない（TpG）配列を表す。関連する位置を太字及び下線で示す。

【表Ｃ】

AAAAAAATAAATAAATAAACAAA**CA**AATAAATTTTTT**CA**CCTCACTCCCTAACACT
CAACAC**CA**AAAACTC**CA**ACAAACTAATAACCAAAACTAACCAACCAAAATTTCA
TCTAAAAAACCT**CA**ATAACTATTTTTAAAACAAATAACCCACCACTTCCAATAACT
TACTC**CA**AAATAACATCTAATTTCATTAAACCTTAAAAACAATAACATCACAAAT
ACCTACCC**CA**TAAC**CA**CCCACATATAA**CA**AACCACAAAATAATC**CA**AAATT**CA**T
CTACAAAAACAAAAAAAAAACTAAAATCCCAAACAACAAAAATTAAAATAACAAA
ACTAAAACATTCTACTATAAAAAAAAATTACAAATAAAATCCATTAATCAAACAT
TTCCAA**CA**ACAATTTCCTTACTTAAAAACAAAAAAAAA**CA**TATTTATT**CA**AAATT
AAACTCTACAACCATTCC

【００５６】

実際の血液細胞サブタイプのアンプリコン領域のエピジェネティックプロファイリングについて、解析された免疫細胞集団は以下の通りであった（図1を参照されたい）：

1．標的集団として、CD15-CD14+CD33+CD11b+,HLADR+

2．CD19+B細胞；CD8+細胞傷害性T細胞；CD15+顆粒球；CD14+のみの細胞、CD14+CD124+細胞、CD14+HLADR-細胞、CD14CD15二重陽性細胞を含む様々なMDSC画分；CD56+NK細胞；及びCD4+Tヘルパー細胞。

【００５７】

以下のプライマー及びプローブがqPCRで使用された（TpG変異形；脱メチル（demethyl）特異的；CpG変異形；メチル特異的）：

【００５８】

【表１】

Forward amplification primer	2505-fwd	GAGGGAATGAGTAGGTGAATAA (SEQ ID No. 4)
Reverse amplification primer	2505-rev	AAAATAACTACAAAACCCAACC (SEQ ID No. 5)
Forward primer TpG-specific	2505_TpG-fwd	CCCTAACACTCAACACCA (SEQ ID No. 6)
Reverse primer TpG-specific	2505_TpG-rev	GGGTTATTTGTTTTAAAAATAGTTATTG (SEQ ID No. 7)
Probe TpG-specific	2505_TpG-pro	TGGTTATTAGTTTGTTGGAGTTTTTGGT (SEQ ID No. 8)
Forward primer CpG-specific	2505_CpG-fwd	CCCTAACACTCGACACCG (SEQ ID No. 9)
Reverse primer CpG-specific	2505_CpG-rev	GGGTTATTTGTTTTAAAAATAGTTATC (SEQ ID No. 10)
Probe CpG-specific	2505_CpG-pro	TTTTGGTTATTAGTTTGTCGGAGTTTTCGG (SEQ ID No. 11)

Forward amplification primer　フォワード増幅プライマー
SEQ ID No.　配列番号
Reverse amplification primer　リバース増幅プライマー
Forward primer TpG-specific　フォワードプライマーTpG特異的
Reverse primer TpG-specific　リバースプライマーTpG特異的
Probe TpG-specific　プローブTpG特異的
Forward primer CpG-specific　フォワードプライマーCpG特異的
Reverse primer CpG-specific　リバースプライマーCpG特異的

Probe CpG-specific　プローブCpG特異的

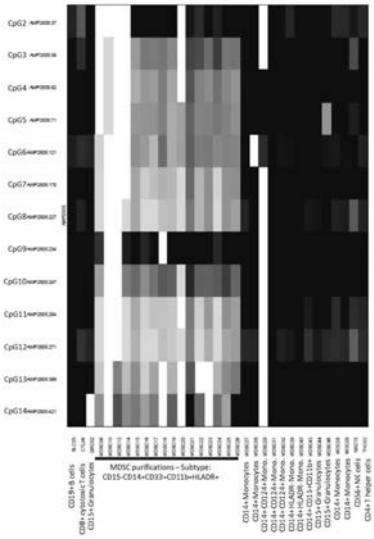
【００５９】
TpG特異的PCRシステムの線形性及び特異性は、in silicoで変換された配列のCpG又はTpG変異形のいずれかを含有する試験テンプレート（プラスミドDNA）を用いて実証された。実際に測定されたqPCR結果（算出メチル化）と、比較として調製された希釈物のもの（推定メチル化）との間の対応値を図2に示す。細胞型特異性（qPCRにより測定される）は以下のように見出された：
【００６０】
【表２】

Type of immune cell	qPCR-Detection [%]
Target subpopulation of MDSCs	68.5
CD8+ T-cells	0.9
CD56+ NK-cells	0.1
B-cells	0.1
CD14+ monocytes	0.1
CD4+ T-cells	0.5
CD15+ granulocytes	0.1

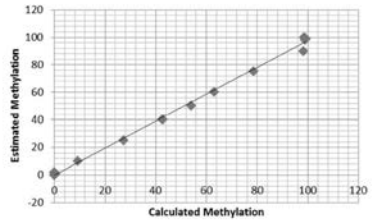
Type of immune cell　免疫細胞の型
qPCR-Detection　qPCR検出
Target subpopulation of MDSCs　MDSCの標的亜集団
CD8+ T-cells　CD8+T細胞
CD56+ NK-cells　CD56+NK細胞
B-cells　B細胞
CD14+ monocytes　CD14+単球
CD4+ T-cells　CD4+T細胞
CD15+ granulocytes　CD15+顆粒球
【符号の説明】
【００６１】
図面訳
図1
B cells　B細胞
cytotoxic T cells　細胞傷害性T細胞
Granulocytes　顆粒球
MDSCpurifications-Subtype　MDSC精製－サブタイプ
Monocytes　単球
NK cells　NK細胞
T helper cells　Tヘルパー細胞

図2
EstimatedMethylation　推定メチル化
CalculatedMethylation　算出メチル化

【図１】



【図２】



【配列表】

2021502809000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/080235

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/6883
ADD.

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)
C12Q

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)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/170497 A2 (EPIONTIS GMBH [DE]) 23 October 2014 (2014-10-23) abstract; claims 1-17, 26,27; table 4I page 101	1-15
X	WO 2015/159292 A2 (YISSUM RES DEV CO [IL]; HADASIT MED RES SERVICE [IL]) 22 October 2015 (2015-10-22)	13,14
A	abstract; claims 31,37; sequence 309	1-12

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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	Date of mailing of the international search report
7 December 2018	04/01/2019

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Costa Roldán, Nuria

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/080235

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHAO ZHANG ET AL: "Epigenetics in myeloid derived suppressor cells: a sheathed sword towards cancer", ONCOTARGET, vol. 7, no. 35, 30 August 2016 (2016-08-30), pages 57542-57463, XP55489801, DOI: 10.18632/oncotarget.10767 the whole document	1-15
A	KALLINTERIS N L ET AL: "Results of epigenetic-based quantitative PCR assisted immune cell counting analysis in bavituximab SUNRISE trial subgroup", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER 20171101 BIOMED CENTRAL LTD. NLD, vol. 5, no. Supplement 2, 1 November 2017 (2017-11-01), XP002787211, ISSN: 2051-1426 the whole document	1-15

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2018/080235

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014170497 A2	23-10-2014	CA 2904658 A1	23-10-2014
		CN 105189783 A	23-12-2015
		CN 107941681 A	20-04-2018
		EP 2986735 A2	24-02-2016
		EP 3327141 A1	30-05-2018
		JP 2016515397 A	30-05-2016
		JP 2018064570 A	26-04-2018
		US 2016024578 A1	28-01-2016
		US 2018291447 A1	11-10-2018
		WO 2014170497 A2	23-10-2014
WO 2015159292 A2	22-10-2015	CN 106574296 A	19-04-2017
		EP 3132055 A2	22-02-2017
		JP 2017511142 A	20-04-2017
		US 2017121767 A1	04-05-2017
		WO 2015159292 A2	22-10-2015
		WO 2015159293 A2	22-10-2015

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 15/11	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/11	Ｚ

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,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

(72)発明者 オレク，スフェン
ドイツ，１２２０７ ベルリン，ボオートシュトラーセ １６

Ｆターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QR08 QR32 QR55
QR62 QS10 QS14 QS25 QS28 QS34 QS39 QX02