

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6010037号
(P6010037)

(45) 発行日 平成28年10月19日 (2016.10.19)

(24) 登録日 平成28年9月23日 (2016.9.23)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 Q 1/06 (2006.01)

C 1 2 Q 1/06

G O 1 N 33/49 (2006.01)

G O 1 N 33/49 A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

G O 1 N 33/574 (2006.01)

G O 1 N 33/574 D

請求項の数 12 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2013-532230 (P2013-532230)
 (86) (22) 出願日 平成23年10月10日 (2011.10.10)
 (65) 公表番号 特表2013-544502 (P2013-544502A)
 (43) 公表日 平成25年12月19日 (2013.12.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/067660
 (87) 国際公開番号 W02012/045888
 (87) 国際公開日 平成24年4月12日 (2012.4.12)
 審査請求日 平成26年10月6日 (2014.10.6)
 (31) 優先権主張番号 10187046.7
 (32) 優先日 平成22年10月8日 (2010.10.8)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 511145937
 エピオンティス ゲーエムベーク
 ドイツ, 1 2 4 8 9 ベルリン, ルードア
 ー ショッセ 2 9
 (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 100152319
 弁理士 曾我 亜紀
 (72) 発明者 オレク, スフェン
 ドイツ, 1 2 2 0 7 ベルリン, ポオート
 ストラッセ 1 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍浸潤全Tリンパ球の分析に基づいて、がん患者の生存指標を測定する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

がん患者の生存指標を測定する方法であって、前記がん患者に由来する腫瘍サンプル中の C D 3⁺、C D 3⁺ 及び C D 3⁺ の遺伝子の 1 つ又は複数における少なくとも 1 つの C p G 位置のメチル化状態に基づいて、腫瘍浸潤全 T リンパ球 (o T L) の数及び / 又は量を分析することを含み、高い o T L の数及び / 又は量が、非乳がんのがん、気管支がん、結腸直腸がん若しくは卵巣がん患者におけるより良好な生存及び / 又はより良好な無進行生存の指標となるとともに、高い o T L の数及び / 又は量が、乳がん患者における生存の不良及び / 又は無進行生存の不良の指標となる、がん患者の生存指標を測定する方法。

【請求項 2】

前記サンプルにおける少なくとも 1 つの C p G 位置の少なくとも 9 0 % の脱メチル化が、C D 3⁺ T リンパ球細胞、C D 3⁺ C D 4⁺ T リンパ球細胞及び / 又は C D 3⁺ C D 8⁺ T リンパ球細胞の指標となる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記サンプルにおける T r e g 対 o T L 比を決定する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記少なくとも 1 つの C p G 位置が、C D 3 遺伝領域内の転写開始部位、プロモーター領域、イントロン及び / 又はエクソン / イントロン境界より上流の 5 ' 領域に存在する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

10

20

メチル化状態の分析がメチル化特異的酵素消化、バイサルファイトシーケンシングから選択される方法、プロモーターメチル化、CpG島メチル化、MSP、Heavy Methyl、Methylight、Ms-SNuPEから選択される分析、若しくは増幅DNAの検出に基づく他の方法、又はCD3特異的qPCRを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

GAPDHで代表されるハウスキーピング遺伝子における少なくとも1つのCpG位置のメチル化分析を更に含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

CD4⁺及び/又はCD8、CD8の遺伝子、又はFOXP3、CD25、CD127、CTLA4、GITR、CD45RA、CD103、GNGT2、CRTAM、IL2RB及びZBTB32、若しくはFLJ00060、FLJ38379、PPP6C、CD226、ZBTB7B及びTNFAIP8の遺伝子、又はFOXP3遺伝子内のTSDRにおける少なくとも1つのCpG位置のメチル化分析を更に含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項8】

前記がんが、結腸直腸がん、気管支がん、乳がん及び/又は卵巣がんから選択される、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記サンプルが、固形腫瘍サンプル、ヒト血液サンプルを含む哺乳動物の体液、又は組織、器官若しくは細胞型の血液サンプル、血中リンパ球のサンプル若しくはその画分から選択される、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項10】

前記哺乳動物がマウス、ラット、サル又はヒトである、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記がん患者に与える化学物質及び/又は生物学的物質に応じた前記OTLの数及び/又は量を測定及び/又はモニタリングすることを更に含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

30

請求項1～11のいずれか一項に記載の方法を行うためのキットであって、がん患者におけるOTLの数及び/又は量を、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法に従い、遺伝子CD3内のCpG位置のメチル化状態の分析に基づいて同定、測定及び/又はモニタリングするための材料を含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法を行うためのキットの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、in vitro又はin vivoでがん患者の生存指標を測定する方法であって、上記がん患者に由来する腫瘍サンプル中のCD3、CD3及びCD3の遺伝子の1つ又は複数における少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態に基づいて、腫瘍浸潤全Tリンパ球(OTL)の数及び/又は量を分析することを含み、高いOTLの数及び/又は量が、非乳がんにおける上記がん患者のより良好な生存の指標となり、乳がんにおいては、高いOTLの数及び/又は量が上記患者の生存の不良の指標となる、in vitro又はin vivoでがん患者の生存指標を測定する方法に関する。本発明は、本発明の方法で使用されるそれぞれのキットにも関する。

40

【背景技術】

【0002】

悪性腫瘍の確立は、腫瘍細胞の好ましい成長速度、及び免疫学的監視から逃れる腫瘍戦略に左右される。最近まで、治療的抗腫瘍戦略は悪性細胞の根絶に焦点を合わせていたが

50

、ほとんどの場合、それだけでは後期疾患を治癒させることができない。免疫系は、一方で宿主保護を示し、他方で腫瘍成長を促進するその曖昧な役割のために、付加的な標的として認識されていた。

【 0 0 0 3 】

抗原特異的な宿主保護は、Bリンパ球及びTリンパ球からなる適応免疫系によって達成される。Tリンパ球は、T細胞表面糖タンパク質CD3を含むT細胞受容体(TCR)複合体の発現によって集合的に規定される。腫瘍細胞は特異的な抗原を発現し、それによりT細胞媒介性免疫応答の標的となる。マウス実験から、がんの免疫監視におけるT細胞の役割が確認され、腫瘍浸潤全Tリンパ球(CTL)が結腸直腸がん及び卵巣がんにおける腫瘍成長を阻害する。また、腫瘍におけるCD3 mRNA発現レベルの増大は、転帰の改善と相関し、結腸直腸がんにおいて腫瘍再発を防止する(非特許文献1)。

10

【 0 0 0 4 】

調節性T細胞(Treg)の機能は、エフェクターTリンパ球の役割とは逆である。TregはエフェクターT細胞の応答を制御し、寛容を媒介する。免疫寛容とは、或る特定の抗原を免疫的攻撃から免れさせ、過剰な免疫反応に対抗する適応免疫系の能力を指す。Tregは一般的にCD3、CD4、CD25及び転写因子FOXP3の発現によって同定される。特異性を増大させるために、CD127、CTLA4、GITR、CD45RA又はCD103を含む更なるマーカーのアレイがTregの単離及び特性化に用いられる。

20

【 0 0 0 5 】

高等生物は、個体のほとんどの細胞がDNAコードの全く同じ相補体含有するにもかかわらず、様々な組織型において異なるパターンの遺伝子発現を行い、維持する必要がある。大抵の遺伝子調節は細胞の現状に応じた一時的なものであり、外部刺激によって変化する。一方で、持続的な調節は、エピジェネティクス(DNAの基本的な遺伝コードを変更しない遺伝的な調節パターン)の基本的法則(role)である。DNAメチル化は後成的調節の典型的な形態であり、安定な細胞記憶として機能し、様々な細胞型の長期同一性を維持するうえで重要な役割を果たす。

【 0 0 0 6 】

メチル化の主要な標的は、2ヌクレオチド配列であるシトシン-グアニン(「CpG部位」)であり、この状況でシトシン(C)は簡単な化学修飾を受けて5-メチル-シトシンとなる場合がある。ヒトゲノムにおいては、CG配列は或る特定の比較的密なクラスター(「CpG島」と呼ばれる)以外については予想されるよりもはるかに稀である。CpG島は遺伝子プロモーターと関連することが多く、半数を超えるヒト遺伝子がCpG島を有すると推定されている(非特許文献2)。

30

【 0 0 0 7 】

異常なDNAメチル化は、しばしば健常細胞から癌性細胞への形質転換を伴う。観察される影響には、ゲノム規模での低メチル化、腫瘍抑制遺伝子のメチル化の増大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3、非特許文献4、非特許文献5に概説される)。メチル化プロファイルは腫瘍特異的である(すなわち、特定の遺伝子又はさらには個々のCpGのメチル化パターンの変化は、特定の腫瘍型の診断に用いられる)ことが認識されており、現在では、膀胱がん、乳がん、結腸がん、食道がん、胃がん、肝臓がん、肺がん及び前立腺がんの大規模な診断マーカー群が存在する(例えば非特許文献5に要約される)。

40

【 0 0 0 8 】

Hamerman et al.(非特許文献6)は、CD4 Tリンパ球とCD8 Tリンパ球とを区別している。

【 0 0 0 9 】

特許文献1には、細胞、組織又は核から単離したDNAのメチル化パターンについての情報を収集することと、得られた情報を分析することを含む、細胞、組織又は核を同定する方法が記載されている。

50

【 0 0 1 0 】

特許文献 2 は、T 細胞の亜群を記載しており、それらを調節性 T 細胞として規定する特徴に関する。該出願には、かかる T 細胞、それらを含む組成物及び免疫応答調節の際にそれらを動員するケモカインの使用も記載されている。

【 0 0 1 1 】

特許文献 3 には、遺伝子 *foxp3*、又はそのオーソログ遺伝子若しくはパラログ遺伝子中の少なくとも 1 つの CpG 位置のメチル化状態を分析することを含む、哺乳動物の *FoxP3* 陽性調節性 T 細胞、好ましくは $CD25^+CD4^+$ 調節性 T 細胞を同定する方法、特に *in vitro* 方法と、調節性 T 細胞の検出及び品質保証及び制御のための、転写因子 *FoxP3* の遺伝子の DNA メチル化分析の使用とが記載されている。

10

【 0 0 1 2 】

最後に、特許文献 4 は、 $CD3^-CD4^+$ 遺伝子、特にそれらの「上流」調節領域、特に $CD3$ 遺伝子のプロモーター領域及び他の保存領域における少なくとも 1 つの CpG 位置のメチル化状態を分析することを含み、分析されたサンプルにおける少なくとも 1 つの CpG の少なくとも 90% の脱メチル化が記憶 $CD4^+$ T リンパ球及びナイーブ $CD4^+$ T リンパ球、並びに記憶 $CD8^+$ T リンパ球及びナイーブ $CD8^+$ T リンパ球の指標となる、哺乳動物の $CD3^+CD4^+$ 陽性 T リンパ球及び / 又は $CD3^+CD8^+$ 陽性 T リンパ球を同定する方法を記載している。

【 0 0 1 3 】

腫瘍浸潤全 T リンパ球 (o T L) 等の T リンパ球の臨床的役割のより詳細な理解の不足は、主に組織浸潤免疫細胞の分析における mRNA 分析、免疫組織化学 (I H C) 又はフローサイトメトリーに伴う技術的困難に起因する。これら 3 つの技術全てが、固形組織において定量的に適用する場合に制限を受ける。mRNA 発現の分析は、サンプル中の或る特定の転写産物の全量を決定するものであるため、細胞数と関連付けることはできない。フローサイトメトリー分析は、単一細胞懸濁液への解離が分析に必要とされるため固形組織に関して問題があり、IHC は良くて半定量的でしかない。

20

【 0 0 1 4 】

腫瘍成長が $CD4^+CD25^+$ と推定される T r e g 細胞のレベルの上昇によって促進されることが、肝細胞がん、胃がん及び食道がんにおいて、これらの細胞の数の増大が観察されたことから提唱されている。また、報告によると、より低い腫瘍内 $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ 細胞のレベルが、卵巣がんにおけるより良好な転帰及び I 期非小細胞肺がん患者におけるより低い再発リスクと関連付けられている。

30

【 0 0 1 5 】

腫瘍浸潤 T r e g の数が患者の予後と逆相関するという説得力のある考えが、マウス腫瘍モデルにおいて $CD4^+CD25^+$ T 細胞を除去した際の免疫不応答の解消を示すデータによって支持されている。

【 0 0 1 6 】

しかしながら、他の研究では、予後の重要性は確認されないどころか、T r e g のレベルが増大した患者について好ましい予後が予示されている (非特許文献 7)。既知の T r e g 発現マーカーは全て、活性化エフェクター T 細胞のサブセットによっても提示されるため、T r e g の正確な定量化は不明確であり、腫瘍における $CD25^+CD4^+$ 細胞カウントの上昇が、ナチュラル T r e g ではなく、一時的に *FOXP3* を発現する $CD25^+$ エフェクター T 細胞を少なくとも部分的に反映するかどうかは不確かなままである。この曖昧さは、疾患の転帰における T r e g の影響に関して報告された矛盾する結果の理由となり得る。

40

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 7 】

【 特許文献 1 】 欧州特許第 1 2 1 3 3 6 0 号

【 特許文献 2 】 国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 0 7 0 6 号

50

【特許文献 3】欧州特許第 1 8 2 6 2 7 9 号

【特許文献 4】欧州特許第 2 1 9 9 4 1 1 号

【非特許文献】

【 0 0 1 8 】

【非特許文献 1】Galon, J., et al., Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science, 2006.313(5795): p. 1960-4

【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】Hamerman JA, Page ST, Pullen AM. Distinct methylation states of the CD8 beta gene in peripheral T cells and intraepithelial lymphocytes. J Immunol. 1997 Aug 1;159(3):1240-6

【非特許文献 7】Tzankov, A., et al., Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. Haematologica, 2008. 93(2): p. 193-200

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 9 】

C D 4 細胞及び C D 8 細胞の測定及び決定は概して容易であり、通常は細胞表面上の上記抗原の発現を分析することによって臨床的に達成されるが、一般的に使用される F A C S 分析については、細胞の構成要素 (entities) を無傷に維持するには細胞サンプルを新たに単離するか、又は即座に固定する必要があるため、これらの細胞型を決定するのは依然として困難である。したがって、T リンパ球の検出は所望されているが、特に日常的適用にとって問題をはらんでいる。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 2 0 】

上記を鑑みると、腫瘍浸潤 T リンパ球の検出に基づきがん患者の生存指標を測定するための D N A メチル化分析に基づく改善された、特に確実な方法を提供することが本発明の一目的である。別の目的は、腫瘍浸潤 T リンパ球の検出に基づいて、患者におけるがん治療の転帰を予測する改善された方法を提供することであり得る。

【 0 0 2 1 】

本発明の第 1 の態様において、本発明は、がん患者の生存指標を測定する方法であって、上記がん患者に由来する腫瘍サンプル中の C D 3⁺、C D 3⁺ 及び C D 3⁺ の遺伝子の 1 つ又は複数における少なくとも 1 つの C p G 位置のメチル化状態に基づいて、腫瘍浸潤全 T リンパ球 (o T L) の数及び / 又は量を分析することを含み、高い o T L の数及び / 又は量が、非乳がんにおける上記がん患者のより良好な生存及び / 又はより良好な無進行生存の指標となる、がん患者の生存指標を測定する方法を提供することにより上記目的を解決する。

【 0 0 2 2 】

全てではないが多くの分析された他のがんサンプルにおける状況とは対照的に、(本明細書中に記載されるものと同じのアッセイによって) 乳がんサンプルを用いて得られたデータは、腫瘍浸潤 T リンパ球の存在下での無進行生存の顕著な減少を示した。したがって、検査される腫瘍対象物 (entity) に応じて (乳がん対他のがん)、腫瘍部位において T リンパ球が多数存在することは、このように無進行生存に有益である場合も、又は有害である場合もある。

【 0 0 2 3 】

固形腫瘍は、V E G F 及び F G F のような血管新生促進因子 (proangiogenic factors

10

20

30

40

50

）を時期依存的に高度に発現するようである。したがって、腫瘍がより進行すると、血流量及び血液細胞の蓄積が高くなり、転帰が不良となる。腫瘍が最初から高い血流量を有する場合（例えば結腸直腸がんの場合）、血管新生は正常組織に対して又は時期依存的に腫瘍における血流量を実質的に変化させず、予後が o T L の数と正に相関することとなる。

【 0 0 2 4 】

本発明との関連で、「高い o T L の数及び / 又は量」とは、T r e g 対 o T L 比の中央値を健常組織と腫瘍組織とで比較した場合に、増大した o T L の数及び / 又は量を意味するものとする。一例では健常組織の 3 % ~ 8 % に対して腫瘍対象物で 1 8 % ~ 2 5 % であり、すなわち少なくとも 2 倍 ~ 1 0 倍、好ましくは少なくとも 5 倍 ~ 1 0 倍に増大する。

【 0 0 2 5 】

本発明は、特異的な後成的マーカーとしての C D 3 遺伝子の同定が、上記の状況の分析の日常的臨床応用を著しく促進することができるという本発明者らの驚くべき発見に基づく。詳細には、全 T リンパ球 (o T L) に対する後成的イムノフェノタイピングの概念が本発明との関連で用いられる。この手段によって、少なくとも F A C S 分析と同等の精度の免疫細胞定量化が可能となり、これは血液及び固形組織の分析に採用可能である。

【 0 0 2 6 】

本発明者らのデータから、遺伝子内の C D 3 G 領域及び C D 3 D 領域が、C D 3 + T 細胞におけるバイサルファイト変換にしか利用可能でないことが更に実証される。この特有の性質に基づいて、T リンパ球の高感度定量化のための特異的 q P C R アッセイを設計した。このアッセイは、任意で F O X P 3 q P C R アッセイとともに、o T L 及び T r e

【 0 0 2 7 】

g の定量化に好適な技術的アプローチとなる。

好ましい実施の形態では、全ての細胞型においてバイサルファイトが反応可能な (a c c e s s i b l e) ハウスキーピング遺伝子、好ましくは G A P D H の C p G 島内の領域を用いて総細胞カウントを決定することができる。等モルの定量標準として F O X P 3、C D 3 及び G A P D H の対応する標的領域を単一プラスミド (特許文献 4 を参照) にクローニングすることは、任意の所与のサンプルにおける指定の細胞型の完全に同等な分析を可能にする。凍結又はパラフィン包埋したサンプルに対して測定を行うことができ、結果が新たなサンプルを用いた F A C S 分析によって得られた細胞カウントと良好に相関するため (図 2)、この技術は、サンプルの管理が未だ中核的な課題である臨床試験及び日常診断の用途

【 0 0 2 8 】

この方法に基づいて、本発明者らは、一部ドナーをマッチさせた 6 1 6 個のサンプルを用いて、卵巣、結腸直腸、乳房及び気管支の健常組織及び腫瘍組織の独立コホートにおいて、T r e g の頻度、o T L 及びそれらの比率を分析した。本発明者らは、T r e g 対 o T L 比の中央値が、健常組織の 3 % ~ 8 % から全ての腫瘍対象物の 1 8 % ~ 2 5 % までシフトすることを見出した。重要なことには、後成的に決定された o T L カウントが、結腸直腸がん及び卵巣がんの転帰と相関していた。したがって、このデータは、腫瘍微小環境における免疫細胞の組成を後成的測定によって定量的に評価することができることを示している。この組成は固形腫瘍において乱され、腫瘍免疫回避の基本的機構が示される。免疫組織化学とは対照的に、T リンパ球の後成的定量化は、転帰予測の独立した臨床的パラメータとなる。

【 0 0 2 9 】

本発明による方法の別の好ましい実施の形態では、上記サンプルにおける少なくとも 1 つの C p G 位置の少なくとも 9 0 % の脱メチル化が、C D 3 + T リンパ球細胞、特に C D 3 + C D 4 + T リンパ球細胞、及び / 又は C D 3 + C D 8 + T リンパ球細胞の指標となる。好ましくは、上記サンプルにおける上記少なくとも 1 つの C p G 位置は、9 1 % 超、好ましくは 9 2 % 超、最も好ましくは 9 5 % 超脱メチル化されている。

【 0 0 3 0 】

好ましい 1 つの実施の形態では、非常に良好な領域の 1 つは、プロモーターであるか、

10

20

30

40

50

又は例えばバイサルファイトシーケンシング方法を使用する場合、 $CD4^{+}$ 細胞若しくは $CD8^{+}$ 細胞のいずれかにおいて $CD3$ を発現する細胞を、 $CD3$ を発現しない他の全ての細胞と比較した際に、差次的 (differential) メチル化状態を示す多くの CpG モチーフを含有する、例えば特許文献 4 等に記載されるようなヌクレオチド配列を有する T L S D R である。

【0031】

本発明者らは、 $CD3^{+}$ 細胞において CpG モチーフがほぼ完全に (すなわち 70% 超、好ましくは 80%、好ましくは 90% 超、最も好ましくは 95% 超) 脱メチル化されている一方で、全ての $CD3^{-}$ 細胞においては同じモチーフが完全にメチル化されていることを実証することができた。上述の領域内の CpG モチーフの差次的メチル化は、 $CD3$ 発現と相関する。したがって、 $CD3$ 遺伝子座のメチル化状態の決定は、Tリンパ球を同定するうえで有益な手段となり得る、例えば記載のように、がんにおいてTリンパ球を測定するのに必要とされるか、又は少なくとも幾らか有用であるとされる。このアッセイは、精製又は任意の染色手順なしにTリンパ球の測定を可能にする。固形腫瘍又は他の固形組織において、上記領域で脱メチル化される細胞の数もさらに報告され、それにより $CD3$ 陽性腫瘍浸潤Tリンパ球の総量が示される。

【0032】

本発明者らは、Tリンパ球における $CD3$ の構成的発現が、後成的調節、すなわちDNAメチル化に基づく調節と同時に起こる可能性を示した。DNAメチル化は生物学的かつ化学的に安定な後成的修飾であり、長期の遺伝子発現変化をもたらす。本発明者らは、全ての主要な末梢血細胞型について試験し、様々な腫瘍細胞株を含む非血液細胞を選択したところ、ヒトの $CD3$ 遺伝子座での脱メチル化がTリンパ球に限定されることを見出した。これらのデータによって、 $CD3$ 遺伝子座における後成的修飾が、特異的な副鎖 (sub-chains) 又は副鎖の発現にかかわらず、Tリンパ球の表現型を有する細胞の同定に対する有益なマーカーとなることが示された。

【0033】

上記サンプルにおける T r e g 対 o T L 比を、マーカー (それぞれ T r e g 特異的対非 T r e g 特異的) 及び本明細書に記載の方法に基づいて決定することが、本発明による方法との関連で更に好ましい。

【0034】

本発明による方法の別の好ましい実施の形態では、上記少なくとも1つの CpG 位置は、 $CD3$ 遺伝子又は遺伝領域内の転写開始部位、プロモーター領域、イントロン、及び/又はエクソン/イントロン境界より上流の 5' 領域に存在する。本発明はまた、 $CD3$ 遺伝子の特に好ましい領域、いわゆる「T L S D R」(特許文献 4 に記載のTリンパ球特異的脱メチル化領域)において CpG モチーフがほぼ完全に (すなわち 90% 超、好ましくは 91%、好ましくは 92% 超、最も好ましくは 95% 超) 脱メチル化されている一方で、全ての非Tリンパ球においては同じモチーフが完全にメチル化されているという驚くべき発見を提示する。したがって、これらの領域及びその診断用途は、本発明による診断分析に対して有益かつ確実な手段を提供するものでもある。

【0035】

CpG 位置のメチル化状態を分析するために、DNAメチル化を分析する任意の既知の方法を用いることができる。本発明による方法の別の好ましい態様では、メチル化状態の分析は、メチル化特異的酵素消化、バイサルファイトシーケンシングから選択される方法、プロモーターメチル化、CpG 島メチル化、MSP、Heavy Methyl、Methylight、Ms-SNUPe から選択される分析、又は増幅DNAの検出に基づく他の方法、好ましくは $CD3$ 特異的 qPCR を含む。これらの方法は当業者に既知であり、それぞれの文献中に見ることができる。

【0036】

好ましくは、例えばMSP、Heavy Methyl、Scorpion、MS-SNUPe、Methylight、バイサルファイトシーケンシング、メチル特異的制限

10

20

30

40

50

アッセイの状況における増幅には、ポリメラーゼ酵素、PCR増幅反応若しくは化学的増幅反応、又は当業者に既知の他の増幅方法が含まれる。増幅によって、本発明による方法（複数可）を行うための特に好ましい「手段」である、CD3遺伝子又は例えば特許文献4に記載されるような任意のパラログ若しくはオーソログ中のTSDR又は任意の他の領域のアンプリコンが生成される。

【0037】

当業者であれば、分析すべき部位の量を最小限にするために、CpG位置の特異的サブセット、例えば分析対象の任意のアンプリコン、例えば特許文献4に記載のアンプリコンのCpG位置1、2、3、4、5、6、7、8、9及び10の少なくとも1つ、又はCD3遺伝子座内の他の配列を更に選択することが可能である。これらの位置は、生成及び分析されるアンプリコンの5'末端から数値的に数えられる。位置4、5、6又は7の組合せが好ましく、これらは本発明との関連で情報を提供するのに十分な情報を生み出す。

【0038】

本発明による方法の好ましい実施の形態では、上記方法は例えばDNAチップ上での日常的適用に好適である。当業者であれば、上記の情報及びそれぞれの文献に基づいて上記の方法をかかる状況に適応させることができる。

【0039】

本発明による方法の別の好ましい実施の形態では、ハウスキーピング遺伝子、例えばGAPDH内の少なくとも1つのCpG位置の更なるメチル化分析を、上記サンプル中のCTLの量及び/又は数を正規化するために行うことができる。ハウスキーピング遺伝子は、典型的には基本的な細胞機能の維持に必要とされ、全てのヒト細胞に見られる構成遺伝子である。他の好適なハウスキーピング遺伝子は当業者にとって既知であり、例えばHuggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. Genes Immun. 2005 Jun;6(4):279-84、又はRomanowski T, Markiewicz A, Bednarski N, Bielawski KP. Housekeeping genes as a reference in quantitative real-time RT-PCR Postepy Hig Med Dosw(Online). 2007 Sep 28;61:500-10に記載されている。

【0040】

本発明による方法の別の好ましい態様では、CD4⁺及び/又はCD8、特にCD8の遺伝子、又はFOX P3、CD25、CD127、CTLA4、GITR、CD45RA、CD103、GNGT2、CRTAM、IL2RB及びZBTB32、若しくはFLJ00060、FLJ38379、PPP6C、CD226、ZBTB7B及びTNFAIP8の遺伝子、好ましくはFOX P3遺伝子内のTSDRにおける少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態を、CD3についての本明細書中の記載と同様にして分析する。したがって、これらの遺伝子は全てのCD3陽性Tリンパ球の明確な同定も可能にする。したがって、本発明による方法の好ましい実施の形態では、上記少なくとも1つのCpG位置は、CD3陽性Tリンパ球において遺伝子（複数の場合もあり）FOX P3、GNGT2、CRTAM、IL2RB及びZBTB32内の転写開始部位、プロモーター領域、イントロン及び/又はエクソン/イントロン境界より上流の5'領域に存在する。これらのマーカーによって、CD8陽性細胞とCD4陽性細胞とを分離することが可能である。この分析は、Tリンパ球のCD3表現型についての分析と同時に、又はそれに続いて行うのが好ましい。

【0041】

同様に、FLJ00060、FLJ38379、PPP6C、CD226、ZBTB7B及びTNFAIP8によって、全血においてCD4陽性細胞を確実に同定し、CD4陽性CD3陽性細胞とCD8陽性CD3陽性細胞とを分離することが可能である。

【0042】

本発明による方法は、好ましくは原発性又は続発性（転移）の固形腫瘍に由来する材料に対して行われる。更に好ましいのは、前記がんが、結腸直腸がん、子宮内膜がん、膵臓がん、食道がん、前立腺がん、気管支がん、乳がん及び/又は卵巣がん、及び/又は黒色

10

20

30

40

50

腫及び／又は非小細胞気管支癌から選択される、本発明による方法である。

【 0 0 4 3 】

本発明による方法の別の好ましい態様は、前記決定に基づく予後診断を更に含み、（任意で健常組織又は非悪性組織と比較して）高い腫瘍浸潤 o T L の数及び／又は量が、上記非乳がん患者に対するより良好な予後の指標となる。より良好な予後は、がん患者についてのより長期の全生存、無再発期間、無進行期間及び転移がないことの少なくとも 1 つを含むものとする。乳がんにおいては、（任意で健常組織又は非悪性組織と比較して）高い腫瘍浸潤 o T L の数及び／又は量が、上記乳がん患者についての予後不良の指標となる。

【 0 0 4 4 】

本発明による方法の更に別の好ましい態様では、より良好な予後が、例えば 7 % という健常組織の中央値よりも高い o T L カウントと関連する。

10

【 0 0 4 5 】

本発明による方法の更に別の好ましい実施の形態では、サンプルは、固形腫瘍サンプル、ヒト血液サンプルを含む哺乳動物の体液、又は組織、器官若しくは細胞型の血液サンプル、血中リンパ球のサンプル若しくはその画分から選択される。好ましくは、上記がん患者はマウス、ラット、サル又はヒトである。サンプルは必要に応じて好適にプールすることができる。

【 0 0 4 6 】

次に、本発明による方法の別の好ましい態様は、例えば抗がん治療、例えば結腸直腸がん、子宮内膜がん、膵臓がん、食道がん、前立腺がん、気管支がん、乳がん及び／又は卵巣がん、及び／又は黒色腫及び／又は非小細胞気管支癌、好ましくは結腸がん又は卵巣がんに対する化学療法として、上記がん患者に与える化学物質及び／又は生物学的物質に応じた上記 o T L の数及び／又は量を測定及び／又はモニタリングすることを更に含む上記の方法に関する。

20

【 0 0 4 7 】

次に、本発明の更に別の好ましい態様は、抗がん治療、例えば結腸がん又は卵巣がんに対する化学療法として、本明細書の記載の本発明の方法を用いて与えられる化学物質及び／又は生物学的物質に応じた上記 o T L の数及び／又は量を測定及び／又はモニタリングすることを含む、がん、例えば結腸直腸がん、子宮内膜がん、膵臓がん、食道がん、前立腺がん、気管支がん、乳がん及び／又は卵巣がん、及び／又は黒色腫及び／又は非小細胞気管支癌、特に結腸がん、乳がん、気管支がん又は卵巣がんを治療する方法に関し、この場合、任意で未治療のがん患者と比較して高い o T L の数及び／又は量が、上記非乳がんの治療の指標となる。

30

【 0 0 4 8 】

次に、本発明の更に別の好ましい態様は、例えば抗がん治療、例えば結腸直腸がん、子宮内膜がん、膵臓がん、食道がん、前立腺がん、気管支がん、乳がん及び／又は卵巣がん、及び／又は黒色腫及び／又は非小細胞気管支癌、特に (in particular) 結腸がん、乳がん、気管支がん又は卵巣がんに対する化学療法として、上記がん患者に与える化学物質及び／又は生物学的物質に応じた上記 o T L の数及び／又は量を測定及び／又はモニタリングすることと、上記がん患者に与えられる化学物質及び／又は生物学的物質に応じた上記 o T L の数及び／又は量の変化に基づいて、上記抗がん治療、例えば結腸直腸がん、子宮内膜がん、膵臓がん、食道がん、前立腺がん、気管支がん、乳がん及び／又は卵巣がん、及び／又は黒色腫及び／又は非小細胞気管支癌、特に結腸がん又は乳がん、気管支がん又は卵巣がんに対する上記化学療法の変更、継続又は中止を決定することを含む、がん、例えば結腸直腸がん、子宮内膜がん、膵臓がん、食道がん、前立腺がん、気管支がん、乳がん及び／又は卵巣がん、及び／又は黒色腫及び／又は非小細胞気管支癌、特に結腸がん、乳がん、気管支がん又は卵巣がんを治療する改善された方法に関する。

40

【 0 0 4 9 】

次に、本発明の更に別の好ましい態様は、上記に記載の本発明による方法に従って、遺伝子 C D 3 内の C p G 位置のメチル化状態の分析に基づいて、がん患者における o T L の

50

数及び／又は量を同定、測定及び／又はモニタリングするための材料を含む、上記に記載の本発明による方法を行うためのキットに関する。好ましくは、上記キットは、a) バイサルファイト試薬と、b) 上記に記載の本発明による方法に従う遺伝子CD3内のCpG位置のメチル化分析のための材料とを含む。

【0050】

最後に、本発明は、がん患者におけるoTLを同定及び／又はモニタリングするための本発明によるキットの使用も包含する。

【0051】

本発明のデータから、遺伝子内のCD3G領域及びCD3D領域が、CD3+T細胞におけるバイサルファイト変換にしか利用可能でないことが実証される。この特有の性質に基づいて、Tリンパ球の高感度定量化のための特異的qPCRアッセイを設計した。このアッセイは、FOXP3 qPCRアッセイとともに、oTL及びTregの定量化に好適な技術的アプローチとなる。全ての細胞型においてバイサルファイトが反応可能なハウスキーピング遺伝子GAPDHのCpG島内の領域を用いて総細胞カウントを決定することができる。等モルの定量標準としてFOXP3、CD3及びGAPDHの対応する標的領域を単一プラスミドにクローニングすることは、任意の所与のサンプルにおける指定の細胞型の完全に同等な分析を可能にする。凍結又はパラフィン包埋したサンプルに対して測定を行うことができ、結果が新たなサンプルを用いたFACS分析によって得られた細胞カウントと良好に相関するため(図2)、この技術は、サンプルの管理が未だ中核的な課題である臨床試験及び日常診断の用途に適している。

【0052】

本発明では、固形の卵巣腫瘍、気管支腫瘍及び結腸直腸腫瘍を有する患者の罹患組織における免疫細胞の役割を解明するためにこの技術を適用した。データから、分析した他の組織と比較して、顕著に低いTreg浸潤及びoTLが健常卵巣組織において示された。本発明者らは、この観察結果を組織特異的なレベルの灌流によるものと考えた。ただし、Treg対oTL比の平均は、全ての健常組織において安定して3.5%~7%の範囲であり(図3C)、これは末梢血において測定される比率に相当し(図2)、FACS分析を用いて別項に報告した。このことは、Tリンパ球の10分の1までが抑制表現型を示す場合に健常な免疫バランスが得られることを示している。本発明者らは、試験した全ての腫瘍対象物において、より高頻度のTregを観察した(図3A)。oTLカウントは肺腫瘍及び結腸直腸腫瘍のサンプルでは低減したが、卵巣腫瘍サンプルでは増大した(図3B)。健常卵巣組織におけるTリンパ球カウントが、他の組織よりも低い値を示したことから(より低い組織灌流に起因する可能性が高い)、本発明者らは、Tregレベルの著しい上昇及びoTLレベルの顕著な増大が、腫瘍によって媒介される灌流の増大のためであると仮定する。他の健常組織では、腫瘍組織及び健常組織における灌流の差があまり明白でないことから、この影響は顕著には観察されない。

【0053】

灌流関連因子を除く免疫状態を利用するために、Treg対oTL比を決定した。本発明者らは、腫瘍中の組織浸潤免疫T細胞の総サブセットにおいて少なくとも抑制性T細胞の中央値レベルの倍増を観察した。とりわけ、このシフトは全ての腫瘍対象物にわたって観察された。この研究の信頼性を、2つの独立したCRCコホートによるデータを比較する際の仮想結果の合同(congruence)によって更に高くした(図3)。

【0054】

さらに、本発明によるマッチドペア(matched-pair)分析から、177人のうち153人(86%)の患者においてTregの相対的な富化が示された。この傾向の例外は主に結腸直腸サンプルにおいて観察された。組織学的な組織割り当てがこれらのサンプルにいて特に要求されるため、本発明者らは組織選択の技術的課題を外れ値の適切な解釈であると考えた。

【0055】

CD25+FOXP3+細胞は、腫瘍組織において上方調節を示す。CD25+CD4

10

20

30

40

50

+ F O X P 3 + 細胞の数の低さ及び C D 3 m R N A の数の高さは、より良好ながん患者の生存と関連していた。しかしながら、ヒト研究には、C D 2 5 + F O X P 3 + 細胞が活性化エフェクター T 細胞を含み、m R N A、I H C 又は F A C S 分析のいずれかを用いた組織分析が、限られた精度の絶対的定量及び相対的定量しかもたらさないという問題がある。ここで、本発明者らは、異なる技術的アプローチを用いて、不均衡な (dysbalanced) T r e g 対 o T L 浸潤比が、固形腫瘍において高頻度で顕著に観察されるということを示した。F O X P 3 及び C D 3 の後成的分析は T r e g 及び o T L のみに関連したものであり、正確かつ完全に定量的なデータを提供する。様々な腫瘍対象物にわたって一様な不均衡が、以前の報告とともに (joint with)、この影響が固形腫瘍に関連する免疫状態の恒常的欠如であることを示唆している。本発明者らは、この不均衡が腫瘍確立に対抗する身体の病理学的な不能に寄与し、永続的な腫瘍確立の必須条件であり得ると仮定する。しかしながら、後成的分析は、その記述的な (descriptive) 性質のために、かかる仮説を正式に証明するには不十分である。

【 0 0 5 6 】

主要なヒト組織では、機能的重要性の評価の近似として生存分析が使用される。したがって、本発明者らは患者の生存に対する腫瘍における T リンパ球浸潤の役割を試験した。本発明者らのデータは、状況が逆である乳がんを除いて、腫瘍内 o T L の数の増大がより良好な予後につながることを示す以前の報告を裏付けるものである。この傾向は、無進行生存 (P F S) 分析及び関連の全生存 (O S) 分析についての 3 回の独立研究の全てにおいて観察される。P F S 及び O S の両方についての全てのコホートにわたるデータの定性的同等性は、この観察結果の高い関連性を示している。したがって、日常的適用のための後成的予測手段の開発が可能である。o T L のプラスの影響は、腫瘍浸潤 T リンパ球の即応性、したがって T r e g 対 o T L 比が腫瘍の展開に直接影響するという仮説と一致する。これは全 T リンパ球が主にエフェクター T 細胞に相当するためである。

【 0 0 5 7 】

要約すると、本発明者らは、免疫細胞の後成的分析が血液、場合によっては、更に重要なことには固形組織におけるイムノフェノタイピングを容易にする新規の方法であるという証拠を示す。示したデータは、腫瘍確立における T r e g 対 o T L 比の重要な役割を強く確立するものである。正式に証明されていないにもかかわらず、このデータは、抑制性 T r e g とエフェクター T リンパ球との不均衡が腫瘍免疫回避と同時に起こり、腫瘍確立の固有の特徴であり得るという見解を確かに広めるものである。したがって、寛容原性免疫系対エフェクター免疫系の細胞の比率の変化が抗腫瘍戦略の強い標的となり得る。患者の予後に対する腫瘍内 T リンパ球カウントのプラスの影響は、免疫細胞の存在及び均衡が、抗腫瘍応答が機能していない身体の重要な要素であるという見解を更に支持する。

【 0 0 5 8 】

本発明をここで、以下の実施例に基づき、添付の図面及びシーケンシングプロトコルを参照して (これらに限定されない) 更に説明する。本発明の目的上、本明細書中に引用される全ての参考文献は、引用することによりその全体が本明細書の一部をなすものとする。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 9 】

【 図 1 】 C D 3 遺伝子座及び G A P D H 遺伝子座の後成的プロファイリングを示す図である。A) 遺伝子のゲノム局在性及び構成。転写産物は、それらの配向に応じて染色体バーの上又は下に示す。後成的分析に使用されるアンプリコンを赤色のボックスとして示す。B) A に示すアンプリコンのバイサルファイトシーケンシングによって得られた後成的プロファイリングのマトリックス。各々のラインは、左側に示す精製細胞型に対して試験したアンプリコン中に存在する C p G のバイサルファイト変換状態を表す。個々の四角は各々、単一のゲノム C p G 位置を表す。青色の四角は、バイサルファイト変換に利用不可能であり、C p G として検出されるゲノム C p G に対応する (C p G 変異体)。黄色の四角は、バイサルファイト変換に利用可能であり、T p G としてシーケンシングされる C

p Gに対応する (T p G 変異体)。灰色の陰影によるコードを右側に示す。 C) バイサル
 ファイト変換に特異的な q P C R アッセイの増幅プロファイル。上パネルは、 T p G 変異
 体に特異的な P C R システムを、 T p G 鋳型変異体 (薄い灰色) 及び C p G 鋳型変異体 (濃い灰色) を示す 1 2 5 0 0 個、 2 5 0 0 個、 5 0 0 個、 1 0 0 個及び 2 0 個というブラ
 スミドコピーの段階希釈物に対して試験したものである。下パネルは、同じ実験を C p G
 変異体に特異的な P C R システムを用いて行ったものである。各々のグラフにおいて、使
 用した鋳型の l o g 濃度に対して測定された C P 値をプロットすることによって、全ての
 P C R システムの直線性が示される。

【図 2】後成的 q P C R 及び F A C S を用いた C D 3 + 細胞及び F O X P 3 + 細胞の計数
 を示す図である。末梢血を 1 7 人のドナーから採取し、細胞数を 4 時間 ~ 8 時間以内に F
 A C S によって (X 軸)、また 1 年以内に q P C R 分析によって (Y 軸) 測定した。 A)
 F A C S によって計数した細胞数は、全ての有核細胞に対する C D 3 + 細胞のパーセンテ
 ージを表す。 C D 3 特異的 q P C R システムを適用して q P C R 分析を行った。 B) F A
 C S によって計数した細胞数は、全ての有核細胞に対する C D 4 + C D 2 5 + C D 1 2 7
 - 細胞のパーセンテージを表す。 F O X P 3 特異的 q P C R システムを用いて q P C R 分
 析を行った。 C) F A C S によって計数した細胞数は、 C D 3 + 細胞中の C D 4 + C D 2
 5 + C D 1 2 7 - 細胞のパーセンテージを表す。 R は、後成的測定と比較した各々の F A
 C S 分析についてのスピアマンの順位相関係数を示す。統計的有意性は以下のように示さ
 れる： 2 つのアスタリスク (* *) $p < 0.01$ 及び 3 つのアスタリスク (* * *) $p <$
 0.001 。

【図 3】健常組織及びがん性組織における組織浸潤リンパ球の頻度を示す図である。ボッ
 クスプロットは、健常組織及びがん性組織における A) T r e g、 B) C D 3 + T 細胞、
 C) C D 3 + T 細胞中の T r e g のパーセンテージを示す。 O T、 B T 及び C T は、それ
 ぞれ健常な卵巣、気管支及び結腸直腸の組織を示す。 O v C a、 B C a 及び C R C は、が
 ん性の卵巣、気管支及び結腸直腸の組織を示す。 N は各々のプロットに含まれる患者の数
 を示す。ボックスは分布の中央 5 0 % を表す。ボックス内のラインは分布の中央値を表し
 、ひげは全ての測定データの 9 5 % をカバーするように伸びる。この分布からの外れ値は
 丸によって示される。統計的有意性は以下のように示される： 1 つのアスタリスク (*)
 は $p < 0.05$ 、 2 つのアスタリスク (* *) は $p < 0.01$ 、 3 つのアスタリスク (*
 * *) は $p < 0.001$ を表す。

【図 4】結腸直腸がん及び卵巣がんを有する患者の累積生存率を示す図である。各々の腫
 瘍対象物に由来するサンプルを、 C D 3 特異的 q P C R によって測定されるそれらの腫瘍
 浸潤全 T リンパ球 (o T L) の中央値で 2 つのグループに分けた。中央値を超えるレベル
 (高い o T L 数) は薄い灰色によって表され (上ライン)、中央値未満のレベル (低い o
 T L 数) はより濃い灰色のライン (下ライン) によって表される。 A) 無進行生存 (P F
 S)。左パネル (C R C - I ; 中央値 = 2 6 . 1 % ; N h i g h = 7 ; N l o w = 1 2)
 及び中央パネル (C R C - I I ; 中央値 = 2 3 . 9 % ; N h i g h = 1 7 ; N l o w = 2
 2) には結腸直腸がんサンプルを示す。右パネルは卵巣がんサンプルを示す (O v C a ;
 中央値 = 7 . 7 6 % ; N h i g h = 2 3 ; N l o w = 2 3)。 B) 全生存 (O S)。左パ
 ネルは C R C - I コホートを示し (N h i g h = 3 ; N l o w = 7)、中央パネルは C R
 C - I I コホートを示し (N h i g h = 1 1 ; N l o w = 1 9)、右パネルは O v C a コ
 ホートを示す (N h i g h = 1 4 ; N l o w = 1 8)。

【図 5】実施例 2 による A) 卵巣組織における T r e g、 B) 卵巣組織における全 T リン
 パ球、及び C) 卵巣組織における C D 3 中の T r e g の比率を示す図である。

【図 6】乳がん患者の累積生存率を示す図である。サンプルを、 C D 3 特異的 q P C R に
 よって測定される腫瘍浸潤全 T リンパ球 (o T L) の中央値 (1 5 . 7 %) で 2 つのグル
 ープに分けた。中央値を超えるレベル (高い o T L 頻度) は緑色で示す。中央値未満のレ
 ベル (低い o T L 頻度) は青色である。左側には無進行生存 (N h i g h = 1 4 ; N l o
 w = 4)、右側には全生存 (N h i g h = 8 ; N l o w = 7) を示す。サンプルの数は、
 N _ o v e r a l l (P F S) = 1 2 4、 N _ o v e r a l l (O S) = 1 3 5 であった

10

20

30

40

50

。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0060】

実施例 1

本発明者らは、o T L の同定のための特異的マーカーとして遺伝子間 C D 3 G / C D 3 D 領域の後成的パターンを決定した。本発明者らは、高感度の定量的リアルタイム P C R ベースアッセイを開発した。また、グリセルアルデヒド (glyceraldehyde) - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (G A P D H) 遺伝子の調節領域内の C p G 島に基づいた同様の後成的アッセイを確立することによって、総細胞計数のための全般的な基準系を提供する。これらの後成的アッセイ系を適用することによって、本発明者らは、気管支、結腸直腸及び卵巣起源の健常組織及び腫瘍組織における組織浸潤 T r e g 及び o T L を分析した。

10

【0061】

データは、腫瘍における o T L 浸潤の頻度が患者の予後と相関すること、及び T r e g 対 o T L 比が腫瘍では不均衡であり、そのことが腫瘍確立に不可欠であり得ることを明らかに示している。

【0062】

細胞及び組織

F F P E サンプルについては、ベルリン大学附属シャリテ病院のベンジャミンフランクリンキャンパス (ChariteBerlin, Campus Benjamin Franklin) の病理学研究所のアーカイブから検索した。対応する正常実質を含む結腸直腸癌又は気管支癌の標本の組織マイクロアレイ (T M A) を、直径 1 m m のコアを用いて構築した。新鮮な卵巣組織及び血液については、ベルリン大学附属シャリテ病院のウィルヒョーキャンパス (Campus Virchow) の卵巣がん腫瘍バンクから検索した。

20

【0063】

ゲノム DNA の単離及びバイサルファイト変換

ゲノム DNA の精製のために、D N e a s y B l o o d a n d T i s s u e K i t (Qiagen) を使用した。F F P E サンプルからのゲノム DNA は、Q I A a m p D N A F F P E T i s s u e K i t (Qiagen) を用いて単離した。パラフィンブロックをトリミングして余分なパラフィンを除去し、組織切片の厚さを 1 0 μ m に調整した。各々の反応は 1 0 個の組織切片を用いて行った。バイサルファイト変換は、E p i T e c t B i s u l f i t e K i t (Qiagen) を用いて行った。0 . 5 μ g ~ 1 μ g のゲノム DNA を用いて反応を行った。

30

【0064】

オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド (フォワードプライマー (f p) 及びリバープライマー (r p) 、並びにプローブ (p)) は、ヒトゲノム G R C h 3 7 (e!Ensemble release 56 ; 2 0 0 9 年 9 月) のアセンブリに対するそれらの染色体位置によって表される。

バイサルファイトシーケンシング用オリゴヌクレオチド :

a) 遺伝子間 C D 3 G (E N S G 0 0 0 0 0 1 6 0 6 5 4) / C D 3 D (E N S G 0 0 0 0 0 1 6 7 2 8 6) 領域 :

40

アンプリコン番号 1、f p : 1 1 : 1 1 8 2 1 3 2 0 0 - 2 1 : 1、r p : 1 1 : 1 1 8 2 1 3 6 1 6 - 3 7 : 1 ;

アンプリコン番号 2、f p : 1 1 : 1 1 8 2 1 4 2 7 1 - 9 2 : 1、r p : 1 1 : 1 1 8 2 1 4 6 8 5 - 7 0 5 : 1 ;

アンプリコン番号 3、f p : 1 1 : 1 1 8 2 1 4 7 0 2 - 2 3 : 1、r p : 1 1 : 1 1 8 2 1 5 1 5 1 - 7 3 : 1 ;

b) G A P D H (E N S G 0 0 0 0 0 1 1 1 6 4 0)

C p G 島 : アンプリコン番号 3、f p : 1 2 : 6 6 4 4 1 1 9 - 3 5 : 1、r p : 1 2 : 6 6 4 4 6 3 5 - 5 6 : 1 ;

50

アンブリコン番号4、f p : 1 2 : 6 6 4 3 5 8 6 - 6 0 4 : 1、r p : 1 2 : 6 6 4 3 9 9 0 - 4 0 1 1 : 1。

R T - P C R用オリゴヌクレオチド：

a) F O X P 3 (E N S G 0 0 0 0 0 0 4 9 7 6 8) T S D R : C p G特異的：f p : X : 4 9 1 1 7 2 1 9 - 4 6 : 1、r p : X : 4 9 1 1 7 2 8 3 - 3 0 7 : 1、p : X : 4 9 1 1 7 2 5 6 - 7 3 : 1 ; T p G特異的：7 f p : X : 4 9 1 1 7 2 1 9 - 4 6 : 1、r p : X : 4 9 1 1 7 2 8 3 - 3 0 7 : 1、p : X : 4 9 1 1 7 2 5 6 - 7 8 : 1。

b) C D 3 : C p G特異的：f p : 1 1 : 1 1 8 2 1 3 6 3 3 - 5 3 : 1、r p : 1 1 : 1 1 8 2 1 3 6 8 6 - 7 0 7 : 1、p : 1 1 : 1 1 8 2 1 3 6 7 0 - 8 7 : 1 ; T p G特異的：f p : 1 1 : 1 1 8 2 1 3 6 3 2 - 5 3 : 1、r p : 1 1 : 1 1 8 2 1 3 6 8 6 - 7 0 9 : 1、p : 1 1 : 1 1 8 2 1 3 6 6 4 - 9 0 : 1。

c) G A P D H : T p G特異的：f p : 1 2 : 6 6 4 4 3 7 8 - 9 9 : 1、r p : 1 2 : 6 6 4 4 4 5 6 - 7 6 : 1、p : 1 2 : 6 6 4 4 4 2 9 - 5 7 : 1。

【 0 0 6 5 】

バイサルファイトシーケンシング

P C Rを7 n gのDNA、1 × P C Rバッファー、1 UのT a q DNAポリメラーゼ (Qiagen)、2 0 0 u M d N T P、1 2 . 5 p m o lのプライマーを含有する2 5 u l中で行った (熱サイクリング条件：1 × 9 5 、1 5 分；4 0 × (9 5 、1 分；5 5 、4 5 秒；7 2 、1 分)；1 × 7 2 、1 0 分)。P C R産物をE x o S A P - I T (USB Corp.)を用いて精製し、増幅プライマー及びB i g D y e T e r m i n a t o r v 1 . 1 c h e m i s t r y (Applied Biosystems)を用いてシーケンシングした。産物をエタノール沈殿し、1 Mベタイン (betaine)に溶解させ、A B I 3 1 0 0 遺伝子分析装置でキャピラリー電気泳動を行った。E S M Eを用いてA B Iファイルを解釈した (Lewin, J., et al., Quantitative DNA methylation analysis based on four-dye trace data from direct sequencing of PCR amplificates. Bioinformatics, 2004. 20(17): p. 3005-12.)。

【 0 0 6 6 】

リアルタイムP C R (q P C R)

q P C Rは、3 0 p m o lの各プライマー、5 p m o lのプロブ、5 0 n gのファージDNA (New England Biolabs)、及び6 0 n gのDNA鋳型又は対応量のプラスミド標準を含有する2 0 μ l中で、RocheのL i g h t C y c l e r 4 8 0 P r o b e s M a s t e r c h e m i s t r y又はE p i t e c t - M S P (Qiagen)を用いて行った。各々のサンプルを三連で分析した。全てのアッセイについて、サイクリング条件は1 × 9 5 、1 0 分；5 0 × (9 5 、1 5 秒；6 1 、1 分)であった。C P (「クロッシングポイント (crossing point)」)を、二次導関数最大値 (second derivative maximum)法 (L C 4 8 0ソフトウェア)によってコンピュータで計算した。コピー数を線形回帰による (プラスミドベース標準の段階希釈を用いた) 検量線から算出した。

【 0 0 6 7 】

プラスミド標準

様々なリアルタイムP C Rベースアッセイのためのバイサルファイト変換されたメチル化標的領域及びバイサルファイト変換された脱メチル化標的領域をコンピュータ内で設計し、合成し (Genscript Inc.)、断片をプラスミドp U C 5 7に挿入した。組み換えプラスミドを線状化し、1 0 n g / μ lのファージDNA (New England Biolabs)中で段階希釈して、リアルタイムP C Rベースアッセイのための標準を、1回の反応当たりの鋳型コピー数が1 2 5 0 0、2 5 0 0、5 0 0、1 0 0及び2 0という最終濃度で得た。

【 0 0 6 8 】

主要末梢血白血球集団の細胞選別

末梢血サンプルを、地方倫理委員会の承認に従って健常ドナーから得た。顆粒球 (C D 1 5 +)、単球 (C D 1 4 +)、C D 4 + T細胞 (C D 3 + C D 4 +)、T r e g (C D 4 + C D 2 5 h i g h C D 4 5 R A -)、B細胞 (C D 1 9 +)、N K細胞 (C D 5 6 +

10

20

30

40

50

、CD56bright、CD56dim)、ナイーブCD8+T細胞(CD3+CD8+CD45RA+CD127+)、及び記憶CD8+T細胞(CD3+CD8+CD45RA-CD127+/-)等の異なる白血球集団への血液サンプルの分画を、以前に記載されるように行った(Baron, U., et al., DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. Eur J Immunol, 2007. 37(9): p. 2378-89)。選別した細胞の純度はフローサイトメトリーによって求められるように97%超であり、生存度は常に99%超であった。

【0069】

統計分析

鋳型コピー数を、二次導関数最大値法によるクロッシングポイントでの線形回帰による検量線から推定した(Rasmussen, R., Quantification on the LightCycler, in Rapid cyclereal-time PCR, methods and applications. W.t.C. Meuer S, Nakagawara K, Editor. 2001, Springer Press: Heidelberg. p. 21-34)。中央値を使用して試験サンプルの三連の測定値を統合した。遺伝子特異的DNAの割合を、遺伝子特異的(specific)TpG変異体DNAと、この遺伝子のTpG変異体とCpG変異体との合計、又はGAPDH TpG変異体コピーの数との比率としてコンピュータで計算した。累積生存率はカプランマイヤー法によって算出した(Kaplan, E.G., Civic Hospital; a report of its first year of operation. J Am Podiatry Assoc, 1958. 48(3): p. 112-3)。単変量比較については、統計的有意性をコックス・マンテル検定を用いて評価した(Mantel, N., Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. Cancer Chemother Rep, 1966. 50(3): p.163-70)。相関分析については、スピアマンの順位相関統計を使用した。差の中央値は、サンプリング方法に応じて、ウイルコクソンの順位和検定(OTコホート及びOVCaコホートに対する)又はウイルコクソンの符号付き順位検定(BTコホート、BCaコホート、並びにCTコホート及びCRCコホートの両方に対する)を用いて試験した。全てのP値は両側とした。分析については、統計ソフトウェアSAS 9.2(TS2M2)(SAS Institute Inc., Cary NC, USA)を使用した。

【0070】

完全バイサルファイト変換の影響を受けやすい細胞型特異的遺伝子領域

本発明者らは、CD3D遺伝子及びCD3G遺伝子の遺伝子間制御領域内のCpGジヌクレオチド、並びにGAPDH遺伝子内のCpG島のバイサルファイト変換性を、バイサルファイトシーケンシングを用いて試験した(図1A)。本発明者らは、分析したCD3領域の全てのシトシンがナイーブCD4+(ナチュラルTregを含む)において完全に変換され、CD8+Tリンパ球がTpG変異体のみを生じることを見出した(図1B)。顆粒球、単球、Bリンパ球及びNK細胞を含む他の細胞型におけるバイサルファイト変換は、この遺伝子領域においてCpG変異体を生じた。本発明者らは、全ての試験した細胞型においてGAPDHのTpG変異体のみを見出し(図1B)、様々な複合組織においてこれを確認した。これらのデータに基づいて、本発明者らは、CD3及びGAPDHの分析される遺伝子座に対する定量的リアルタイムPCRアッセイ(qPCR)を設計した。各々の領域について、本発明者らは、各々のアッセイに対する変異体特異的な蛍光標識検出プローブを含む、TpG鋳型のみを認識する1つのqPCRシステム、及びCpG鋳型に特異的な1つのqPCRシステムを開発した(図1C)。コピー数の定量標準を提供するために、本発明者らは、TpG変異体及びCpG変異体に相当する両方の遺伝子座に対するプラスミド系を構築した。本発明者らは、3桁にわたる増幅の直線性を示し(増幅効率は1.95~2の範囲であった)、本発明者らは、互いに対する鋳型変異体を用いた、TpG変異体及びCpG変異体の各々に特異的なPCRシステムの交差反応性を検出しなかった(図1C)。

【0071】

CD3及びGAPDHに特異的な後成的qPCRアッセイの特性化

CD3及びGAPDHのqPCRを、文献(Baron, U., et al., DNA demethylation in

the human FOXP3 locus discriminates regulatoryT cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. Eur J Immunol, 2007.37(9): p. 2378-89) に従って精製した分離血液細胞画分について分析した。標準と同等のバイサルファイト変換された T p G D N A 又は C p G D N A の標的領域を含有するプラスミドの段階希釈物を用いて、本発明者らは D N A コピー数を決定した。T p G / (T p G + C p G) のコピーの比率を、各々の遺伝子領域について算出した (表 1)。結果から、C D 8 + T 細胞及び C D 4 + T 細胞が、C D 3 遺伝子座について 99% を超える T p G 変異体を含有する一方で、C D 19 + B 細胞、C D 15 + 顆粒球、C D 14 + 単球及び C D 3 - C D 56 + ナチュラルキラー細胞が実質的に (99% 超) C p G 変異体のみからなることが示される。G A P D H 遺伝子座の標的化によって、C p G 変異体の増幅は起こらなかったが、T p G 変異体が全ての細胞型において効率的に増幅されることが示された (表 1)。したがって、G A P D H 脱メチル化の定量的分析は、所与のサンプル中の全ての細胞の総 D N A コピー数を検出する細胞型独立マーカーをもたらす。両方の q P C R アッセイの技術的精度を更に実証するために、D N A スパイク (spiking) 実験を行った。そこで本発明者らは、C D 3 遺伝子座及び F O X P 3 遺伝子座の両方においてバイサルファイト変換された D N A が 99.5% 超の T p G 変異体からなる F A C S 精製した調節性 T 細胞及び顆粒球 (99.7% 超の C p G 変異体からなる) を選択した。

【0072】

C D 3 内の領域の T p G 変異体及び C p G 変異体と同一の配列を含有するプラスミド、並びに陽性対照として F O X P 3 の T S D R、並びに正規化のために G A P D H の T p G 変異体を用いて、本発明者らは全細胞カウントと比較した C D 3 及び F O X P 3 の T p G 変異体の相対量を定量した。そこで、本発明者らは 40%、20%、10%、5%、3%、2% 及び 1% の T r e g D N A を、顆粒球 D N A のバックグラウンドに人工的にスパイクした。G A P D H 及び相対的定量のための D N A 系の特異的 T p G 変異体を用いて、本発明者らは、スパイクしたサンプルについて理論的に推定された値と、C D 3 及び F O X P 3 q P C R の測定値との間に厳密な相関を見出した (F O X P 3 及び C D 3 の両方についてピアソン $R = 0.998$)。

【0073】

全血サンプル中の T r e g 及び全 T リンパ球の分析

T r e g 及び全 T リンパ球 (o T L) に対する後成的マーカーを、17 個の全血サンプルについて試験し、その結果を、T r e g については系統特異的表面分子 C D 4 及び C D 25、o T L については C D 3 を用いて、同じ 17 個のサンプルについて測定された、フローサイトメトリー分析によって得られたデータと比較した。F A C S 分析によって決定された C D 3 + 細胞の割合は、C D 3 q P C R によって決定された T p G 変異体の割合と厳密に相関する (スピアマン $R = 0.78$; $p = 2.0E-4$) (図 2 A)。同様に、F A C S 測定によって得られた C D 4 + C D 25 + C D 127 細胞の割合と、F O X P 3 の T S D R 遺伝子座に対して見られた T p G D N A との比較は、強い相関を示した (スピアマン $R = 0.74$ 、 $p = 7.0E-4$)。F A C S 又は後成的分析による F O X P 3 対 C D 3 比の測定値も、強く相関していた (スピアマン $R = 0.7$ 、 $p = 1.8E-3$)。コルモゴロフ (Kolmogorov) ・スミルノフによる適合度検定から、F A C S 分析の正規分布からの有意な偏差が明らかとなり、一方で後成的測定の正規分布が認められたため、スピアマンの順位相関を比較のために使用した。この発見から F A C S 分析についての外れ値のより高い頻度が示唆される。T r e g は o T L の部分群であるため、これら 2 つの細胞集団の相互依存性についても調査した。本発明者らは、全血において、o T L カウント及び T r e g カウントが顕著なスピアマンの相関係数 ($R = 0.47$ 、 $p = 3.8E-8$) で互いに相関することを観察した。

【0074】

固形健常組織及び腫瘍組織における F O X P 3 の T S D R 及び C D 3 の q P C R 分析

固形組織における組織浸潤 F O X P 3 + 調節性 T 細胞 (T r e g) 及び全 C D 3 + T リンパ球 (o T L) の完全に定量的な評価を提供するために、本発明者らは、卵巣、気管支

10

20

30

40

50

及び結腸直腸起源の健常組織及び腫瘍組織から単離したDNAを比較した(図3A~図3C)。健常卵巣組織(OT)における浸潤免疫細胞の量の中央値は、Treg及びoTLのそれぞれについて0.12%及び4.27%である。病理学的に確認された卵巣がんのサンプル(OvCa)については、本発明者らは1.28%のTreg及び7.76%のoTLという中央値を観察した。独立したサンプルに対するノンパラメトリックなウイルコクソンの順位和検定によると、健常組織(OT)と比較して腫瘍における両方のパラメータの上昇が統計的に極めて有意である($p_{Treg} = 2.34E-11$; $p_{oTL} = 0.0066$; 図3A及び図3B)。健常気管支組織(BT)では、2.0%のTreg及び29.6%のoTLが観察された。隣接する腫瘍病変(BCa)を試験したところ、本発明者らは4.2%のTreg及び22.3%のoTLを観察した。腫瘍における、健常組織と比較してより高いTregカウント及びより低いoTLカウントの両方が、対応のある(paired)サンプルについてのウイルコクソンの符号付き検定によって統計的に有意である($p = 0.0024$ 及び $p = 0.0015$; 図3A及び図3B)。2つの独立した結腸直腸がんコホートをを用いて同じ分析を行い、健常な腫瘍に隣接する組織(CT)と腫瘍組織(CRC)とを比較した。第1のコホートでは、本発明者らは、健常サンプル(CT-I)において、それぞれ1.9%及び33.5%というTregカウント及びoTLカウントの中央値、腫瘍組織(CRC-I)において、それぞれ3.8%のTreg及び26.1%のoTLを観察した(図3A及び図3B)。ウイルコクソンの符号付き検定から、腫瘍におけるより高い割合のTreg($p = 3.80E-4$; 図3A)及び低下した割合のoTL($p = 1.0E-4$; 図3B)が統計的に有意であることが示される。全ての統計分析が多重検定のための補正後も有意なままである。第2のCRCコホートからのデータによって、腫瘍サンプル(CRC-II)における4.3%のTreg及び23.9%のoTLとは対照的に、健常組織(CT-II)における1.8%のTreg及び32.3%のCD3細胞を示すこの観察結果を確認した(Treg及びoTLについて、それぞれ $p = 1.0E-4$ 及び $p = 0.0296$)。

【0075】

CRC-IIコホートにおける健常な及び腫瘍性のTreg及びoTLの間の差異を多重検定について補正すると、oTL値は正式に統計的有意性を下回るが($p = 0.1$)、本発明者らの見解では傾向の関連性が明らかなままである。

【0076】

4つ全てのコホートについて、本発明者らはTreg対oTL比を分析した(図3C)。健常組織では、oTLにおける相対Treg量の中央値は3%~8%の範囲であった(OTの中央値: 3.4%、BTの中央値: 7.6%、CT-Iの中央値: 5.9%、CT-IIの中央値: 7.8%)。腫瘍対象物では、この比率はTregの割合の増大へとシフトする(OvCaの中央値: 19.7%、BCaの中央値: 18.3%、CRC-Iの中央値: 17.5%、CRC-IIの中央値: 21.6%)。全ての変化は統計的に極めて有意である($p_{OvCa \text{ 対 } OT} = 8.06E-07$ 、 $p_{BCa \text{ 対 } BT} = 1.59E-14$ 、 $p_{CRC-I \text{ 対 } CT} = 3.05E-13$ 、 $p_{CRC-II \text{ 対 } CT-II} = 5.10E-7$)。気管支がん患者及び結腸直腸がん患者のコホートについては、腫瘍及び隣接する健常組織のドナーをマッチさせたペアを使用したため、本発明者らは、ドナー間変動による影響を受けずに、ドナーをマッチさせた分析においてTreg対oTLカウントを直接比較した。本発明者らは、93.5%(46個のうち43個)のペアが、健常隣接組織(BT)と比較して気管支腫瘍(BCa)におけるTreg対oTL比の増大を示すことを見出した。CRC-Iコホートでは、本発明者らは81%(48個のうち39個)の症例において同等の増大を見出し、CRC-IIコホートではこの増大が86%(83個のうち71個)のペアにおいて観察される。

【0077】

本発明者らはまた、Treg及びoTLの相互依存性を調査した。全血サンプルで見られる相関と同様に、本発明者らは健常気管支組織(スピアマン $R = 0.68$ 、 $p = 8.6E-08$)及び結腸組織(RCT-I $=0.55$ 、 $p = 4.4E-5$ 、RCT-II $=0$

10

20

30

40

50

．54、 $p = 2.1 \times 10^{-8}$ ）において、Treg浸潤とoTL浸潤との間に顕著な相関を観察した。限定数の卵巣組織サンプル（ $N = 13$ ）を用いた同じ分析は、有意な相関を示さなかった（ $R = 0.15$ 、 $p = 0.6$ ）。病変組織におけるこの相互依存性を試験したところ、本発明者らは卵巣がん組織における強い相関（ $ROVCA = 0.77$ 、 $p = 3.5 \times 10^{-21}$ ）、並びにBCa及びCRCにおける顕著な相関（ $RBCa = 0.48$ 、 $p = 3.25 \times 10^{-8}$ ； $RCRC - I = 0.37$ 、 $p = 0.02$ ； $RCRC - II = 0.58$ 、 $p = 1.2 \times 10^{-10}$ ）を観察した。

【0078】

患者の生存と腫瘍内免疫細胞カウントとの関連付け

結腸直腸がん患者及び卵巣がん患者について、追跡調査データが利用可能であった。したがって、本発明者らは腫瘍浸潤oTLの数が患者の予後と相関するか否かについて試験した（図4）。oTL数によって示される影響を検出するために、本発明者らはoTLカウントの中央値で患者を2つのグループに分けた。このグループ分けは任意であるが、バランスの取れたサンプリングサイズを提供する。CRCコホート-Iでは、20例の再発（無進行生存（PFS）の終点が報告される）及び10例の死亡（全生存（OS）の終点）が、それぞれ77個及び90個の打ち切りデータ点によって報告された。これらの事象数は、統計的に有意な生存分析に十分ではないが、高いoTLの数を有する患者についてPFS及びOSの改善傾向が観察された。高いoTLカウントを有する患者の10%未満及び低いoTLカウントを有する患者のおよそ25%で、20ヶ月後に再発が起こった。高いoTLの数を有する患者の5%及び低いoTLの数を有する患者の15%が、診断から40ヶ月後に死亡した（図4）。次いで、本発明者らは、I期疾患患者を除く独立した結腸直腸がんコホート（CRC-II）を用いて、観察された傾向を確認した。このコホートでは、80人の患者が十分な追跡調査を受け、39例の再発及び30例の死亡が報告された。このコホートにおけるoTLカウントの中央値は23.9%であった（4.9%～72.1%の範囲）。PFSについての単変量カプラン・マイヤー（Meier）分析では、高いoTLカウントを有する患者のより良好な生存の明白な傾向（40ヶ月に対して82ヶ月という中央値）が見出された。高いoTLを有する患者についてはOSの中央値に到達せず、低いoTLカウントで80ヶ月であり、統計的に有意な生存率の改善（survival advantage）が示された（ $p = 0.039$ ）。このコホートでは、本発明者らはIHCを用いることによってoTL数を決定した。これらのデータは、より良好な予後又は後成的分析において見られるデータとは相関しなかった。OVCAコホートでは、67人の患者からのデータがPFS分析に含まれ、45例の再発が報告された。OS分析については、79人の患者が含まれ、30例の再発事象が報告された。OVCAコホートにおける単変量分析から、（この場合）7.76%という中央値よりも高いoTLカウントを有する患者について、より良好な予後が示唆される（図4）。PFSの中央値は、高いoTLの数を有する患者については40ヶ月、低いoTLの数を有する患者については25ヶ月であった。同様に、OSの中央値は、低いoTLカウントを有する患者（52ヶ月）と比較して、高いoTLカウントを有する患者でより良好であった（70ヶ月）。

【0079】

3つ全てのコホートのPFS及びOSについて、本発明者らはコックス回帰モデルを算出した。連続的に増加するoTLの影響は全ての分析にわたって、年齢、悪性度（grading）、病期及び他のコホート特異的パラメータについて調節した後も保護的であった。PFSに関するハザード率はOVCA及びCRC-IIのそれぞれについて0.966及び0.998、OSに関してはOVCA及びCRC-IIのそれぞれについて0.98及び0.987であった。CRC-Iについては、小数の事象によって確実なモデリングが無効となるが、暫定的なハザード率はPFS及びOSのそれぞれについて0.995及び0.972であり、Tリンパ球数の上昇によって媒介される腫瘍応答の改善傾向が更に確認される。まとめると、コックス回帰分析から、腫瘍環境におけるoTL含量の1%の増加毎に、再発又は死亡のリスクがおよそ0.2%～3.4%減少することが示される。

【0080】

実施例 2

本実施例は、腫瘍発生における免疫系の悪化の理解に寄与することを目的とする。そこで、本発明者らは以下のコホートを使用した：

- a) 良性卵巢組織成長を表す卵巢嚢胞、
- b) 卵巢の全ての悪性疾患の同等に最良の転帰を有する(半)悪性腫瘍を表す非浸潤性境界型腫瘍、
- c) 幾らかより危険であるが、依然として半悪性の形態の卵巢腫瘍を表す浸潤性境界型腫瘍、並びに、
- d) 異なる進行の病期で見られる最も悪性の形態の卵巢腫瘍を表す早期及び後期の卵巢がん。

10

【0081】

本発明による後成的試験を用いて、これらの種々の卵巢疾患における調節性T細胞及び全T細胞の頻度及び比率を決定した。15人のドナーのコホートでは、健常(良性)卵巢組織において0.12%という調節性T細胞(Treg)の中央値が、0.01%の最小値及び0.71%の最大値で見られた。非浸潤性境界型腫瘍(n=23)では、0.35%(最小値=0.06%、最大値=1.48%)という平均が見られた。浸潤性境界型腫瘍の患者(n=24)では、この平均値は更に0.57%まで増大した(最小値=0.06%、最大値=3.96%)。早期卵巢がん患者では、0.8%というTregレベルの中央値(最小値=0.11%、最大値=8.16%)が観察され、後期卵巢がんでは、Tregレベルの中央値は更に1.32%まで増大した(最小値=0.05%、最大値=11.95%)。

20

【0082】

早期卵巢がん対後期卵巢がんの比較を除く全ての比較が、ノンパラメトリック両側t検定において試験した場合に統計的に有意であった。次に、本発明者らは全Tリンパ球(oTL)の数を分析した。これらの細胞の頻度は所与の組織における免疫系の「活性」を示すものとする。健常卵巢組織(4.27%、n=15)、非浸潤性境界型腫瘍(2.93%、n=25)、及び早期卵巢がん(3.47%、n=40)の間で比較的安定なoTLカウントが観察された。同等により良好な転帰を有する形態の疾患(すなわち、非浸潤性境界型腫瘍、卵巢組織及び早期卵巢がん)と比較して、浸潤性境界型腫瘍(5.71%、n=25)及び後期卵巢がん(7.94%、n=77)の増大が観察された。

30

【0083】

最後に、種々の腫瘍対象物におけるTregとoTLとの間の比率を、上記に記載の実験において得られたデータに基づいて決定した。調節性T細胞の活性がエフェクターT細胞を標的とし、エフェクターT細胞の活性がそれらの存在度だけでなく、腫瘍を攻撃するそれらの能力によっても決定されるため、これは全てのアプローチの中で最も重要である。この能力は、抑制性Tregの存在によって大きく損なわれる。本発明者らは、非悪性卵巢組織ではこの比率はおよそ3.5%であることを観察した。この値は血液及び他の健常組織における比率と一致する。この比率は、半悪性非浸潤性腫瘍(9.58%)及び浸潤性境界型腫瘍(10.51%)ではおよそ10%にまで増大する。同じ傾向が更に悪性腫瘍にも当てはまり、oTL集団におけるTregの保有率(prevalence)が更に早期腫瘍において17.22%、後期腫瘍において20.22%にまで増大する。

40

【0084】

要約すると、悪性度の増大及びTregカウントの増大、並びにoTL、すなわち腫瘍微小環境におけるエフェクターT細胞コンパートメントの占有率の減少は密接に関連している。本発明者らはここで、Treg及びoTLの保有率が、身体の応答に打ち勝ち、回避する腫瘍の能力の重要な決定因子であるという更なる証拠を提供する。免疫細胞濃度に影響を与える腫瘍細胞の能力が、腫瘍の悪性度プロファイルの極めて重要な特徴であることが推測され得る。

【0085】

表1 実施例2によるデータ：OT=卵巢組織；non-invBOT=非浸潤性境界

50

型腫瘍、inv BOT = 浸潤性境界型腫瘍、OvCa = 卵巣がん、early OvCa = 早期卵巣がん、late OvCa = 後期卵巣がん、Level = レベル、median = 中央値、mean = 平均、min = 最小値、max = 最大値、S.D. = 標準偏差、T-Test (p-Value); 2-sided = t検定 (p値); 両側、vs = 対

【表 1】

Treg					
	OT	non-inv. BOT	inv. BOT	early OvCa	late OvCa
N	15	23	24	36	78
Level (%)					
median	0.12	0.35	0.57	0.80	1.32
mean	0.18	0.41	0.89	1.28	2.00
min	0.01	0.06	0.06	0.00	0.05
max	0.71	1.48	3.96	8.16	11.95
S.D	0.17	0.30	0.99	1.73	2.08
T-Test (p-Value); 2-sided					
vs OT		0.00477	0.00196	0.00057	0.00000
vs non-inv. BOT			0.03032	0.00544	0.00000
vs early OvCa					0.05560
vs BOT				0.00000	

10

oTL					
	OT	non-inv. BOT	inv. BOT	early OvCa	late OvCa
N	15	25	25	40	77
Level (%)					
median	4.27	2.93	5.71	3.47	7.94
mean	3.53	4.72	8.13	6.48	9.71
min	0.60	0.94	0.74	0.00	0.38
max	5.51	25.53	29.43	34.90	46.43
S.D	1.48	5.15	7.83	7.53	9.19
T-Test (p-Value); 2-sided					
vs OT		0.28683	0.00817	0.02265	0.00000
vs non-inv. BOT			0.07575	0.26832	0.00109
vs early OvCa					0.05560
vs BOT				0.09416	

20

Treg in oTL					
	OT	non-inv. BOT	inv. BOT	early OvCa	late OvCa
N	15	23	24	32	77
Level (%)					
median	3.38	9.58	10.51	17.22	20.22
mean	6.68	12.90	11.14	22.51	23.93
min	0.61	1.14	0.46	0.93	2.61
max	36.75	50.97	31.75	89.78	65.52
S.D	9.05	10.35	7.51	20.31	14.27
T-Test (p-Value); 2-sided					
vs OT		0.05908	0.12325	0.00060	0.00000
vs non-inv. BOT			0.50814	0.02624	0.00016
vs early OvCa					0.05560
vs BOT				0.00000	

30

40

【符号の説明】

【0086】

図 1

forwardstrand フォワード鎖

reversestrand リバース鎖

CpG Island CpG 島

Granulocytes 顆粒球

Monocytes 単球

50

NK cells NK細胞
 Th cells Th細胞
 CytotoxicT-cells 細胞傷害性T細胞
 B-Lymphocytes Bリンパ球
 Amplicon アンプリコン
 Methylationrate メチル化率
 Genomic CpG amplified to TpG TpGに増幅されたゲノムCpG
 Genomic CpG amplified to CpG CpGに増幅されたゲノムCpG
 CD3 PCRSys tem CD3 PCRシステム
 GAPDH PCRSys tem GAPDH PCRシステム
 Fluorescence 蛍光
 Cycle No サイクル数
 CP value CP値
 log conc. log濃度

10

図 2

% TpG content of CD3 locus CD3遺伝子座のTpG含量(%)
 % CD3+ T cells per total cell count 総細胞カウントに対するCD3+T細胞の%
 Spearman R スピアマンR
 % TpG content of TSDR locus TSDR遺伝子座のTpG含量(%)
 % Treg per total cell count 総細胞カウントに対するTregの%
 % TpG cont. of TSDR / TpG cont. of CD3 locus TSDRのTpG含量 / CD3遺伝子座のTpG含量(%)
 % Treg per CD3+ cell count CD3+細胞カウントに対するTregの%

20

図 3

% Treg Tregの%
 % Overall T lymphocytes 全Tリンパ球の%
 % Treg per overall T lymphocytes 全Tリンパ球に対するTregの%

30

図 4

Survival probability 生存確率
 Progression free survival (months) 無進行 (Progression free) 生存 (月数)
 Overall survival (months) 全生存 (月数)

図 5

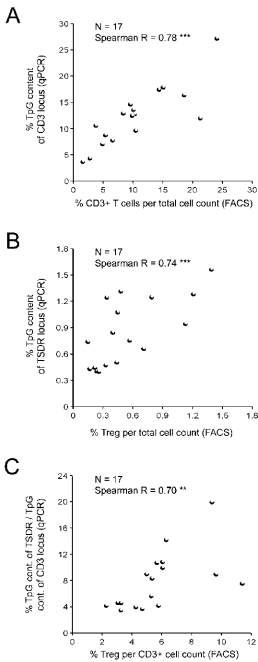
Tregs in CD3 CD3におけるTreg
 Tissue 組織
 early OvCa 早期OvCa
 late OvCa 後期OvCa

40

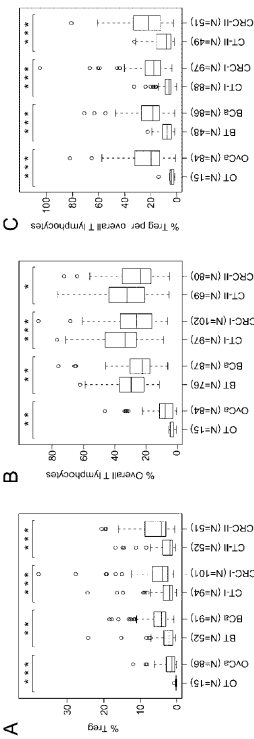
図 6

Survival probability 生存確率
 Progression free survival (month) 無進行生存 (月数)
 Overall survival (month) 全生存 (月数)

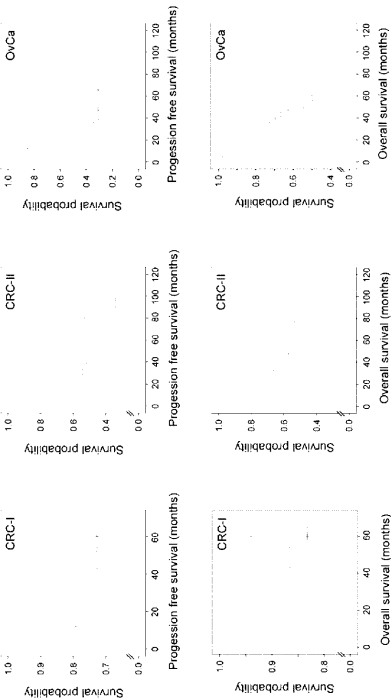
【図 2】



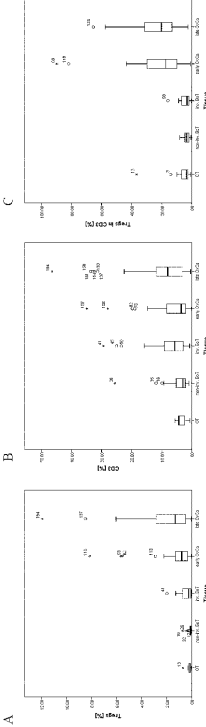
【図 3】



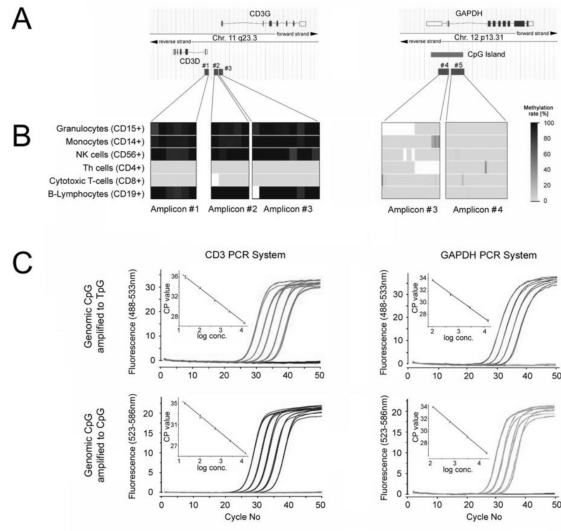
【図 4】



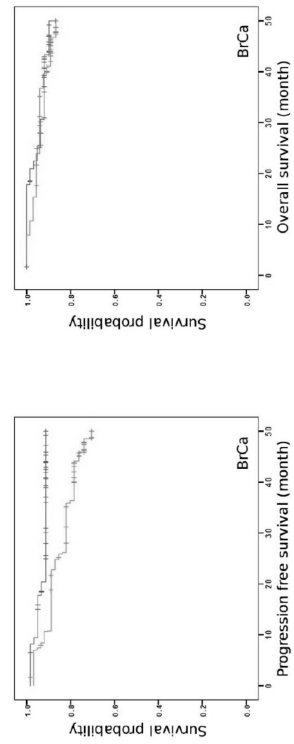
【図 5】



【 図 1 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(72)発明者 シュバツハウラ, ティム

ドイツ, 10247 ベルリン, ニーダーバルニムエステーエル . 16

(72)発明者 バロン, ウド

ドイツ, 10245 ベルリン, ボックスハーゲナー ストラッセ 88

審査官 長部 喜幸

(56)参考文献 国際公開第2010/069499(WO, A1)

Jane S. BLAKE-MORTIMER, The Breast Journal, 2004年, Vol.10, No.3, Pages 195-199

Bohuslav MELICHAR, Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2001年, Vol.23, No.2, Pages 163-173

Lin ZHANG, The New England Journal of Medicine, 2003年, Vol.348, No.3, Pages 203-213

Blaise CLARKE, Modern Pathology, 2009年, Vol.22, Pages 393-402

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)