

(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2021-502806

(P2021-502806A)

(43) 公表日 令和3年2月4日(2021.2.4)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/11 (2006.01)	C 12 N 15/11	Z 4 B 0 6 3
C 12 Q 1/6881 (2018.01)	C 12 Q 1/6881	Z N A Z
C 12 Q 1/02 (2006.01)	C 12 Q 1/02	
C 12 Q 1/6851 (2018.01)	C 12 Q 1/6851	Z
C 12 Q 1/686 (2018.01)	C 12 Q 1/686	Z
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)		
(21) 出願番号	特願2020-523795 (P2020-523795)	(71) 出願人 511145937
(86) (22) 出願日	平成30年10月26日 (2018.10.26)	エピオンティス ゲーエムベーハー
(85) 翻訳文提出日	令和2年6月17日 (2020.6.17)	ドイツ, 12489 ベルリン, バルバラ
(86) 國際出願番号	PCT/EP2018/079406	ムリントックーシュトラーセ 6
(87) 國際公開番号	W02019/081707	(74) 代理人 100088904
(87) 國際公開日	令和1年5月2日 (2019.5.2)	弁理士 庄司 隆
(31) 優先権主張番号	102017125335.1	(74) 代理人 100124453
(32) 優先日	平成29年10月27日 (2017.10.27)	弁理士 資延 由利子
(33) 優先権主張国・地域又は機関	ドイツ(DE)	(74) 代理人 100135208
		弁理士 大杉 阜也
		(74) 代理人 100163544
		弁理士 平田 緑
		(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
最終頁に続く		

(54) 【発明の名称】免疫細胞、特に非古典的单球の同定のためのエピジェネティックマーカーとしての単位複製配列領域

(57) 【要約】

本発明は、非古典的单球を同定する方法、特に *invitro* 方法であって、該方法が、単位複製配列を含む哺乳動物のゲノム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、古典的单球又は非单球細胞と比較した場合の該領域の脱メチル化又はメチル化の欠失が非古典的单球の指標となる、方法に関する。本発明による分析によって、非古典的单球をエピジェネティックレベルで同定するとともに、複合サンプルにおいて、それらの細胞と、例えば他の血液細胞又は免疫細胞等の他の全ての細胞とを区別することができる。本発明はさらに、非古典的单球を、特に複合サンプルにおいて定量する改善された方法を提供する。該方法は、好ましくは全血及び/又は非トリプシン処理組織中の、細胞を精製及び/又は富化する工程なしに行われ得る。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

サンプルにおいて非古典的単球を同定する方法であって、該方法が、2213番単位複製配列内の哺乳動物のゲノム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又は配列番号1に記載の配列内の哺乳動物のゲノム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、古典的単球または非単球細胞と比較した場合の該領域の脱メチル化又はメチル化の欠失が非古典的単球の指標となる、方法。

【請求項 2】

前記少なくとも1つのCpG位置が、分析される前記2213番単位複製配列内の任意の遺伝子の転写開始、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。 10

【請求項 3】

前記少なくとも1つのCpG位置が、配列番号1による単位複製配列のCpG位置30、89、123、169、206、242および248から選択されるCpGから選択され、又は、単位複製配列2213番のフラグメント若しくは配列番号2又は配列番号3によるバイサルファイト変換配列のフラグメントにおけるCpG位置30、169、206及び242から選択される、請求項1又は2に記載の方法。 20

【請求項 4】

バイサルファイト転換性の分析が、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から選択される分析、及び増幅DNAの検出に基づく他の方法を含む、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

非古典的単球の相対量を、分析される2213番単位複製配列におけるメチル化頻度の相対量と、対照遺伝子又はGAPDHにおけるメチル化頻度の相対量との比較に基づいて定量することを更に含む、請求項1~4のいずれか一項に記載の方法。

【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、血液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1~5のいずれか1項に記載の方法。 30

【請求項 7】

前記非古典的単球と、濾胞性ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、顆粒球、古典的単球、B細胞、NK細胞及びヘルパーT細胞、並びに血液以外の器官に由来する他の細胞型から選択される細胞型の全て又は少なくとも1つとを区別することを更に含む、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

同定される前記細胞を、全血及び/若しくは非トリプシン処理組織を使用して精製及び/若しくは富化する工程なしに行われる、又は、

同定される前記細胞を、精製及び/若しくは富化する工程なしに行われる、
請求項1~7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

同定される前記非古典的単球に基づいて前記哺乳動物の免疫状態を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。

10

20

30

40

50

【請求項 10】

哺乳動物において非古典的単球のレベルをモニタリングする方法であって、請求項5～9のいずれか一項に記載の方法を行うことと、さらに、同定される前記細胞の前記相対量を、同じ哺乳動物から先に又は並行して採取したサンプルと、及び／又は対照サンプルと比較することとを含む、方法。

【請求項 11】

前記哺乳動物に与える化学物質及び／又は生物学的物質に応じて前記非古典的単球の量を測定及び／又はモニタリングすることを更に含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 12】

前記哺乳動物が自己免疫疾患、移植片拒絶反応、感染性疾患、癌及び／又はアレルギーを患っているか、又はそれらを患う可能性がある、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

哺乳動物において非古典的単球を、2213番単位複製配列内のゲノム領域におけるCpG位置のバイサルファイト接近性の分析に基づいて同定、定量及び／又はモニタリングするキットであって、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法の実行用の成分を含む、又は、a)バイサルファイト試薬、及びb)配列番号1による領域のCpG位置から選択されるCpG位置のメチル化状態の分析用の材料又は配列番号4～配列番号11による配列から選択されるオリゴマーを含む、キット。

20

【請求項 14】

配列番号4～配列番号11のいずれかによるオリゴマー、又は配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3による単位複製配列。

【請求項 15】

哺乳動物における非古典的単球の同定、定量及び／若しくはモニタリング用の請求項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単位複製配列の使用。

30

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、単位複製配列を含む哺乳動物のゲノム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、前記領域の脱メチル化又はメチル化の欠失が古典的単球又は非単球細胞と比較したときに非古典的単球の指標となる、非古典的単球を同定するための方法、特にin vitro方法に関する。本発明による分析はエピジェネティックレベルで非古典的単球を同定し、そして複合サンプルにおける他の全ての細胞、例えば他の血液細胞又は免疫細胞等から非古典的単球を区別することができる。本発明は、特に複合サンプルにおける非古典的単球を定量する改良された方法をさらに提供する。該方法は、好ましくは全血及び／又は非トリプシン処理組織中の細胞を精製及び／又は富化する工程なしに行われ得る。

40

【0002】

さらに、本発明は、上記の方法を実施するためのキット及びそのそれぞれの使用に関する。本発明の一目的は、哺乳動物の任意の固形臓器若しくは組織内の血液又は任意の他の体液の非古典的単球を定量的に検出及び測定する、新規かつより確実な手段を提供することである。

【背景技術】

50

【0003】

単球は、最も大きなタイプの白血球細胞（白血球）である。単球は、人体中の全ての白血球の2~10%を構成し、そしてその約半数が脾臓に貯蔵されている。単球は、すべての哺乳動物（ヒトを含む）、鳥類、爬虫類及び魚類を含む脊椎動物の自然免疫系の一部であり、適応免疫の過程に影響を及ぼすことができる。単球は、マクロファージや骨髄系樹状細胞に分化して免疫応答を引き起こすことができる。単球は、免疫機能において複数の役割を果たす。そのような役割には、（1）正常な状態で常在マクロファージを補充すること、及び（2）炎症シグナルに応答して、単球が組織内の感染部位に速やかに移動できることが含まれる。

【0004】

ヒト血液中には少なくとも3種類の単球が存在し、それらは細胞表面受容体の発現が異なる。「古典的」単球は、CD14細胞表面受容体（CD14++CD16単球）の高レベルの発現を特徴とする。対照的に、「非古典的」単球は、CD14を発現し、そしてさらにCD16受容体を共発現する。「非古典的」単球は、CD14の低レベルの発現及びCD16の高い共発現を示す単球（CD14+CD16++単球）にさらに細分され得る。「中間的」単球は、高レベルのCD14及び低レベルのCD16（CD14++CD16+単球）を発現する。

【0005】

高等生物は、個体のほとんど全ての細胞がDNAコードの全く同じ相補体を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、そして維持しなければならない。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、そして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（epigenetic regulation:エピジェネティック調節）の典型的な形態であり、安定な細胞記憶として機能し、そして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。近年、後成的調節の他の形態が発見された。「5番目の塩基」である5-メチルシトシン（mC）に加えて、6番目の塩基（5-ヒドロキシメチルシトシン、h mC）、7番目の塩基（5-ホルミルシトシン、fC）及び8番目の塩基（5-カルボキシシトシン、cC）を見出すことができる（非特許文献1）。

【0006】

上述のDNA修飾の主要な標的は、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、このでシトシン（C）は簡単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し得る。ヒトゲノムにおいては、CG配列は、「CpGアイランド」と呼ばれる或る特定の比較的密なクラスター以外については予想されるよりもはるかに稀である。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、及び半数を超えるヒト遺伝子がCpGアイランドを有すると推定されている（非特許文献2）。

【0007】

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、ゲノム全体での低メチル化、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（例えば非特許文献3、非特許文献4及び非特許文献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、特定の遺伝子又は更には個々の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、そして現在では、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）。

【0008】

近年記載されているシトシンの修飾の1つである5-ヒドロキシメチル化については、CpGアイランドの5hmCをマッピング及び定量する酸化バイサルファイトシーケンシングの有用性が示されている（非特許文献1）。高レベルの5hmCが、転写調節因子と関連するCpGアイランド及び長鎖散在反復配列（long interspersed nuclear elements）に見られた。これらの領域が胚性幹細胞において後成的リプログラミングを受ける可能性があることが示

10

20

30

40

50

唆されている。

【0009】

特許文献1には、細胞又は細胞の混合物を同定し、そして血液又は組織中の細胞の分布の変化を定量し、そして疾患状態、特に癌を診断、予後判定、及び治療するためにDNAメチル化アレイを使用する方法が記載されている。この方法には、新鮮なサンプル及び保存(archival)サンプルを使用する。

【0010】

Zawada et al. (非特許文献6にて)は、次世代メチルシークエンシング (Methyl-Sequencing) を用いて、単球の異なるサブセットのDNAメチローム内の差異を開示している。

彼らは、異なる免疫過程に関連付けられる単球中の示差的にメチル化された領域プロモーター領域を有する遺伝子についてさらに述べている。2213番単位複製配列 (2213 ampicon) 内のゲノム領域は言及されていない。

【0011】

Illingworth et al. (非特許文献7にて)は、血液サンプルに由来する顆粒球と比較した、単球における3つの異なるCpGアイランドのメチル化パターン内の変異を開示している。2213番単位複製配列については示唆されていない。

【0012】

Accomando et al. (非特許文献8にて)は、細胞系統特異的DNAメチル化パターンが正常ヒト白血球サブセットを区別し、並びに末梢血中のこれらのサブセットを検出及び定量するために使用され得ることを開示している。彼らはDNAメチル化を用いて、複数の白血球サブセットを同時に定量し、並びにヒトT細胞、B細胞、NK細胞、単球、好酸球、好塩基球及び好中球を区別する細胞系列特異的DNAメチル化シグネチャーを同定した。単位複製配列2213番については言及されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】国際公開第2012/162660号

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】Michael J. Booth et al. Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 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】Zawada et al. DNA methylation profiling reveals differences in the 3 human monocyte subsets and identifies uremia to induce DNA methylation changes during differentiation. *Epigenetics*. 2016 Apr 2;11(4):259-72. doi: 10.1080/15592294.2016.1158363. Epub 2016 Mar 28

【非特許文献7】Illingworth et al. A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biol.* 2008 Jan;6(1):e22. doi: 10.1371/journal.pbio.0060022

【非特許文献8】Accomando et al. Quantitative reconstruction of leukocyte subsets using DNA methylation. *Genome Biol.* 2014 Mar 5;15(3)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

上記に鑑みると、本発明の目的は、非古典的単球をより好都合かつ確実に検出、同定、識別、及び定量する優れたツールとしてのDNAメチル化分析に基づく改善されたそして特

10

20

30

40

50

に確実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】

【0016】

本発明は、サンプルにおいて非古典的単球を同定する方法では、該方法が、2213番単位複製配列（アンプリコン：AMP 2213）配列を含む哺乳動物（例えば、ヒト）ゲノム領域における少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態（バイサルファイト転換性）を分析することを含み、好ましくは、分析される前記領域が、配列番号1に基づいて／に従って位置しており、古典的単球又は非単球細胞と比較した場合の該領域の脱メチル化が非古典的単球の指標となる、方法を提供することにより上記の課題を解決する。

【発明を実施するための形態】

【0017】

2213番単位複製配列内の哺乳動物領域は、特定の遺伝子と関連していない。本発明の文脈において、領域は、2213番単位複製配列内の任意の遺伝子に関連し及び2213番単位複製配列内の任意の遺伝子をコードするゲノム領域全体を含むものとする。このため、領域には、2213番単位複製配列内の任意の遺伝子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、エクソン、及び非コード領域（5'領域及び／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、転写開始部位、プロモーター領域、5'又は3'非翻訳領域、エクソン、イントロン、エクソン／イントロン境界より上流の5'領域、及び／又は2213番単位複製配列内の任意の遺伝子の転写停止部位の下流の3'領域に存在する、本発明による方法が好ましい。

【0018】

本発明はさらに、本発明者らによる特異的エピジェネティックマーカーとしての2213番単位複製配列の驚くべき同定に基づいており、非古典的単球の同定及び上記分析の臨床上の日常的な適用を可能にする。

【0019】

本発明の文脈において、2213番単位複製配列内のゲノム領域（特に配列番号1の配列の領域）により、非古典的単球を同定することができる。驚くべきことに、バイサルファイト変換性及び非変換性シトシンの識別パターン（discriminatory pattern）は、配列番号1による単位複製配列を用いて、特に配列番号2及び／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、好塩基性顆粒球の配列番号1によるゲノム領域に限定されている。

【0020】

本発明者らは、非古典的単球において、開示されるCpGモチーフがほぼ完全に脱メチル化され（すなわち、70%超、好ましくは80%、好ましくは90%超及び最も好ましくは95%超）、その一方で、全ての他の免疫細胞の同じモチーフは、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。

【0021】

上記の領域内のCpGモチーフのメチル化の違いは、非古典的単球を同定するための貴重なツールであり、例えば自己免疫疾患、移植片拒絶反応、癌、アレルギー、原発性及び続発性免疫不全、例えばHIV感染及びAIDS、移植片対宿主病（GvH）、造血器悪性腫瘍、関節リウマチ、多発性硬化症又は細胞傷害性T細胞関連の免疫状態等における、何らかの予測可能な（envisionable）診断において上記細胞を同定及び定量するために必要となり／又は少なくとも何らかの基準（value）となる。このアッセイは、精製又は任意の染色手順なしに非古典的単球の測定を可能にする。

【0022】

次いで、本発明による方法の別の好ましい態様は、上記の分析する2213番単位複製配列中のメチル化頻度の相対量と、例えばGAPDH等の対照遺伝子中のメチル化頻度の相対量との比較に基づいて非古典的単球の相対量を定量することを更に含む。したがって、上記定量化は、本明細書において記載及び分析された、2213番単位複製配列（例えば、配列番号1の）内の領域におけるバイサルファイト変換性DNAと非変換性DNAとの比に基づいて行わ

10

20

30

40

50

れる。非古典的単球の相対量の定量化は、2213番単位複製配列内の細胞特異的領域のバイサルファイト変換性DNAの相対量と、細胞非特異的遺伝子（好ましくは「対照遺伝子」又は「対照領域」と呼ばれ、例えばGAPDHの遺伝子等である）のバイサルファイト変換性DNAの相対量との（好ましくは並行又は同時の）分析に基づいている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では、上記バイサルファイト転換性の分析は、配列番号1に基づいて好適に設計され得る好適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～配列番号11のいずれかによるオリゴマーを用いた増幅を含む。

【0024】

FACS及びmRNA測定とは対照的に、本発明による方法を用いることで、精製、貯蔵、更には相当程度に組織の品質とは無関係に測定（複数の場合もある）及び分析が行われ得る。

【0025】

好ましくは、例えばMSP、HeavyMethyl、Scorpion、MS-SNUPE、MethylLight、バイサルファイトシーケンシング、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-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics, and Response to Treatment Clinical Chemistry 55:8 1471-1483 (2009)を参照されたい）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、又は下記に記載されるような当業者に既知の他の増幅方法が含まれる。

10

20

30

40

【0026】

増幅によって、本発明による方法（複数の場合もある）を行うための特に好ましい「ツール」である、2213番単位複製配列が生成される。結果として、配列番号4及び配列番号5、又は配列番号6及び配列番号7、又は配列番号9及び配列番号10のいずれかに記載のオリゴマー、又は本明細書で言及されるような配列番号4及び配列番号5、又は配列番号6及び配列番号7、又は配列番号9及び配列番号10に基づくプライマー対により増幅される単位複製配列は、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～配列番号3の配列（及び、必要な場合、その相補的配列）が、増幅用のプライマーを設計するため、すなわち、関連の配列の「ビーコン」として作用させるために使用され得る。同様に、追加のプライマー及びプローブが、配列番号1による単位複製配列に基づいて設計され得る。増幅は、ゲノム及び/又はバイサルファイト（すなわち、「変換された」）DNA配列のいずれかにおいて行うことができる。

30

【0027】

当業者であれば更に、分析される部位の量を最小限にするために、CpG位置の特定のサブセット、例えば、配列番号1による単位複製配列におけるCpG位置から選択されるCpG位置の少なくとも1つを選択することができ、そして配列番号1による単位複製配列2213番におけるCpG位置30、89、123、169、206、242及び248から選択されることが好ましい。該位置は、生成及び分析される単位複製配列の5'末端から数値的にカウントされ、そして例えば、図1におけるAMP2213:30として示される。3、4、5、6又は7個の位置の組み合わせが好ましく、それらの分析は、本発明の文脈において有益であるために十分なデータ及び/又は情報を生成する。

【0028】

当業者であれば更に、分析する部位の量を最小限するためにCpG位置の特定のサブセット、例えば特定のバイサルファイト変換性領域（配列番号1）の単位複製配列2213番におけるCpG位置30、169、206及び242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性領域に存在する全ての部位を選択することができる。89位、123位及び248位の1つ以上、好ましくは123位が排除され得る。

【0029】

CpG位置のバイサルファイト転換性を分析するために、DNAメチル化を分析する任意の既知の方法が使用され得る。本発明による方法の好ましい実施の形態では、メチル化状態の

50

分析は、メチル化特異性酵素消化、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から選択される分析、又は増幅DNAの検出に基づく他の方法を含む。これらの方法は当業者に既知であり、そしてそれぞれの文献中に見出すことができる。

【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。

10

【0032】

本発明による方法の別の好ましい実施形態では、同定には、上記非古典的単球を全ての主要な末梢血細胞型及び／又は非血液細胞、限定されないが好ましくは濾胞性ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、顆粒球、古典的単球、B細胞、NK細胞、及びヘルパーT細胞、並びに血液以外の器官に由来する他の細胞型から区別することが含まれる。

【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、ヒト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。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。

20

【0034】

本発明による方法の別の好ましい態様は次に、上記B細胞に基づいて、上記哺乳動物の免疫状態を決定する工程を更に含む。B細胞は定量され得、そして更に詳細な亜集団を相対的に定量するための基準として使用されるか、又は予測因子及び／又はスクリーニング因子及び／又は診断因子及び／又は予後因子及び／又は有害事象検出因子として使用され得るか、又は最終的にこの集団を検出して、全体的な免疫活性状態を決定するために使用され得る。

30

【0035】

本発明による方法の更に別の好ましい実施の形態では、哺乳動物はクルーズトリパノソーマ (Trypanosoma cruzi) 感染、マラリア及びHIV感染、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、節外性T細胞リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、及び他のT細胞腫瘍、B細胞腫瘍及びNK細胞腫瘍（これらに限定されない）のような血液悪性腫瘍、リンパ球減少症、重症複合免疫不全 (SCID)、オーメン症候群、軟骨毛髪形成不全症、後天性免疫不全症候群 (AIDS)（これらに限定されない）等のT細胞欠損、並びにディジョージ症候群 (DGS)、染色体切断症候群 (CBSS)、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症、原発性硬化性胆管炎、潰瘍性大腸炎、クローアン病、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、1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等の遺伝性病態、並びに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)（これらに限定されない）等のB細胞とT細胞との複合障害、並びに乳癌、大腸癌、胃癌、膵臓癌、肝細胞癌、胆管癌、黒色腫及び頭頸部癌（これらに限定されない）等の癌（これらに限定されない）のような自己免疫疾患、移植片拒絶反応、感染性疾患、癌及び／又はアレルギーを患っているか、又はそれらを患う可能性がある。

40

【0036】

本発明による方法の別の好ましい態様は次に、非古典的単球の量を、上記哺乳動物に与

50

える化学物質及び／又は生物学的物質に応じて、すなわち上記患者の治療に応じて測定及び／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。上記方法は上記のような工程と、同定された上記細胞の上記相対量を、同じ哺乳動物から先に又は同時に採取されたサンプル及び／又は対照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）によって得られる結果に基づき、主治医は患者の免疫状態を決定し、そしてそれに応じて基礎疾患の治療を調整することが可能である。

【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非古典的単球を含む生物学的サンプルにおいて行なうことが好ましい。

10

【0038】

本発明による方法の別の好ましい態様は次に、同定される上記非古典的単球を患者への移植用に配合することを更に含む、上記の方法に関する。これらの目的での医薬調製物及びその製造方法は、移植医学の技術分野で既知の方法に従って行われる。

【0039】

本発明による方法の別の好ましい態様は、配列番号4～配列番号11のいずれかによるオリゴマー又は配列番号1～配列番号3による単位複製配列に関する。

【0040】

本発明の更に別の好ましい態様は次に、哺乳動物の非古典的単球を、2213番単位複製配列内のゲノム領域におけるCpG位置のバイサルファイト接近性（到達性）の分析に基づいて同定、定量及び／又はモニタリングするキットであって、本明細書に記載されるような本発明による方法の実行用の成分、特にa)バイサルファイト試薬、及びb)配列番号1の領域におけるCpG位置から選択されるCpG位置のメチル化状態の分析用の材料、例えば配列番号4～配列番号11による配列から選択されるオリゴマーを含む、キットに関する。

20

【0041】

本発明は、本発明によるオリゴマー又は単位複製配列又はキットの、本明細書に記載のような哺乳類における非古典的単球を同定及び／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。

30

【0043】

加えて、以前の発明は、(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：

40

バイオマーカー比率=a/b

a= (C及び／又はmC及び／又はhmC及び／又はfC及び／又はcC)

50

b= (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例挙は拡張され得る)。

【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。

10

【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。

20

【0046】

まとめると、マーカーとして本明細書に記載の2213番単位複製配列を使用することにより、本発明者らは非古典的単球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】

本発明は、次に以下の実施例に基づいて更に説明され、また添付の図表及び配列表を参照するが、それらに限定されない。本発明の目的のために、本明細書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。

30

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】図1は、本発明による単位複製配列2213番(配列番号1)におけるCpG部位の分析を示す。図中の列は、分析される単位複製配列におけるCpG位置(例えば、CpG 1、2等)に対応するものであり、その位置を示しており、及び横のボックスは、分析される細胞型に対応するものである。

【図2】図2は、本発明のアッセイの直線性を表(A)及び図(B)として示す。

40

【0049】

配列番号1は、本発明による単位複製配列AMP2213のゲノム配列を示す。

【0050】

配列番号2及び配列番号3は、本発明の好ましいqPCRアッセイシステムのバイサルファイト変換される標的領域の配列を示し、これにより、バイサルファイト変換後の4つの可能性のある鎖のうちの1つのみが示される。4つの鎖は全て、特定のアッセイの設計のために好ましい標的である。バイサルファイト鎖2フォワード鎖(bisulfite strand 2 forward strand)(b2f)と名付けられた所与のバイサルファイト鎖は、プライマー及びプローブ設計のための例として使用される1つの好ましい標的にすぎない。リバース鎖(b2r)は、相補的プライマーに使用される。鎖b1f及びb1rは、示されていないが、好ましい用途である。

50

【0051】

配列番号4～配列番号11は、本発明による特異的なオリゴマー（プライマー及びプローブ）の配列を示す。

【実施例】

【0052】

実施例1

非古典的単球を同定するために、qPCRは、以下の配列（AMP2213、配列番号1）によるヒトゲノム領域に由来するバイサルファイト変換型サンプルに行われ、関連するCpGは下線で以下に示す：

CCCTTCCTCTGACTCAGTGGAAAGGGCAGGAGAGT_{CCCC}CGAGGAGCTGCCACATCCCTGGCTGAGTGCCTCACCCCCAG
GGCCTCCAC_GAGGGAGCAGCTCCACAGGGTGCCTGT_{GGG}GCTCGTTCCCTGGATGCTTTCCCTTGCTGTGAATGCCT
CTGGGGCAC_GAAATATGGCCCTTGGTCTAGGCCTAGGGCTCCGGTGACCAGGATAGGAAGTGTGCAGGCCCTGCC
CC_GAGGGCGGCATTAGCTTTCCCCACT

【0053】

血液細胞亜型における単位複製配列領域の実際のエピジェネティックプロファイリングについて、分析された免疫細胞集団は図1に示される通りであった。

【0054】

開発された好ましいqPCRアッセイシステムのバイサルファイト変換される標的領域は以下の通りとした：

TpG特異的（配列番号2）：

（b2F）

CCCTTCCTCTAACTCAATAAAAAACAAAAAAATACCCCAAAAAACTACCCACATCCCTAACTAAATACCTCACCCCCAA
AACCTCCACAAAAACAACTTCCACAAAATACCTATAAAACTCATTCCCTCTAAATACTTTCCCTTACTATAATACCT
CTAAAACACAAATATATAACCCCTAAATCTAAACCTAAAACCTCCAAATAACCAAAATAAAAATATTACAAACCTACC
CCAAAAACACACATTAACCTTTCCCCACTACTTCATCTACCCATCTCACCAAATTCC

【0055】

CpG特異的：（配列番号3）：

（b2F）

CCCTTCCTCTAACTCAATAAAAAACAAAAAAATACCCCGAAAAACTACCCACATCCCTAACTAAATACCTCACCCCCAA
AACCTCCACGAAAAACAACTTCCACAAAATACCTATAAAACTCGTTCCCTCTAAATACTTTCCCTTACTATAATACCT
CTAAAACACGAATATATAACCCCTAAATCTAAACCTAAAACCTCCGATAACCAAAATAAAAATATTACAAACCTACC
CCGAAAACGACGCATTAACCTTTCCCCACTACTTCATCTACCCATCTCACCAAATTCC

【0056】

以下のプライマー及びプローブがqPCRに使用された：

【0057】

10

20

30

【表1】

Forward amplification primer フォワード増幅プライマー	2213-fwd	CCCTTCCTCTAACTCAATAAAA (SEQ ID No. 4) 配列番号4
Reverse amplification primer リバース増幅プライマー	2213-rev	AGTGGGGAAAAGTTAATG (SEQ ID No. 5) 配列番号5
Forward primer TpG-specific フォワードプライマー-TpG特異的	2213-TpG-fwd	CC CTTAAATCTAACCTTAAACTTCCA A (SEQ ID No. 6) 配列番号6
Reverse primer TpG-specific リバースプライマー-TpG特異的	2213-TpG-rev	TAGTGGGGAAAAGTTAATGTGTT (SEQ ID No. 7) 配列番号7
Probe TpG-specific プローブTpG特異的	2213-TpG-pro	ACAAACCCTACCCCAAAAACAAACAC (SEQ ID No. 8) 配列番号8
Forward primer CpG-specific フォワードプライマー-CpG特異的	2213-CpG-fwd	CCTTAAATCTAACCTTAAACTTCCGA (SEQ ID No. 9) 配列番号9
Reverse primer CpG-specific リバースプライマー-CpG特異的	2213-CpG-rev	GTGGAGGAAAAGTTAATGCGTC (SEQ ID No. 10) 配列番号10
Probe CpG-specific プローブCpG特異的	2213-CpG-pro	CAAACCCTACCCCGAAAACGACGC (SEQ ID No. 11) 配列番号11

【0058】

TpG特異的PCRシステムの特異性は、図2に示されるように試験テンプレート（プラスミドDNA）を用いて実証された。細胞型特異性（qPCRにより測定）は以下の通りに見出された：

【0059】

【表2】

細胞型 Cell type	説明 Description	GAPDHコピー GAPDH-copies	TpGコピー TpG-copies	脱メチル化 Demethylation (%)
顆粒球 Granulocytes	CD15+	15433.3	60.9	0.4
单球 Monocytes	CD14+	3370.0	4.4	0.1
单球(II) Monocytes (II)	CD14+	4406.7	10.9	0.3
Nc单球 Nc Monocytes	CD14-CD16+	3510.0	2880.0	83.0
Nc单球(II) Nc Monocytes (II)	CD14-CD16+	3110.0	2360.0	76.7
c单球 cMonocytes	CD14+	4216.7	7.1	0.2
c单球(II) cMonocytes (II)	CD14+	4000.0	5.3	0.1
ヘルパーT細胞 T helper cells	CD3+CD4+	3893.3	10.3	0.3
細胞傷害性T細胞 Cytotoxic T cells	CD3+CD8+	1920.0	3.2	0.2
NK細胞 NK cells	CD56+	3306.7	5.7	0.2
B細胞 B cells	CD19+	3203.3	12.4	0.4

【符号の説明】

【0060】

10

20

30

40

50

図1

B cells B細胞
 Granulocytes 顆粒球
 Monocytes 単球
 NK cells NK細胞
 T helper ヘルパーT
 Non classical monos 非古典的単球

図2

Theoretical 理論上
 TpG Copies TpGコピー
 Measured Demethylation 測定された脱メチル化
 Theoretical Demethylation 理論上の脱メチル化

10

【図1】

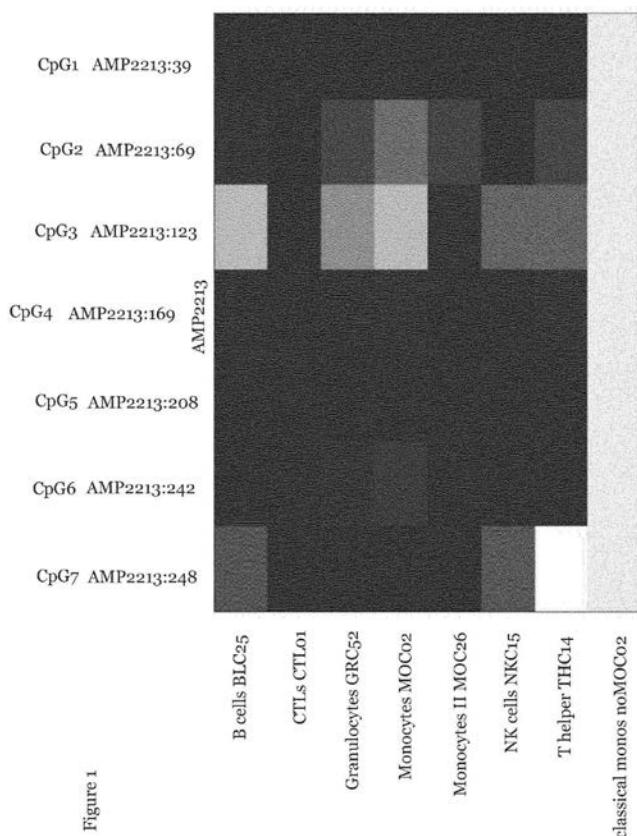
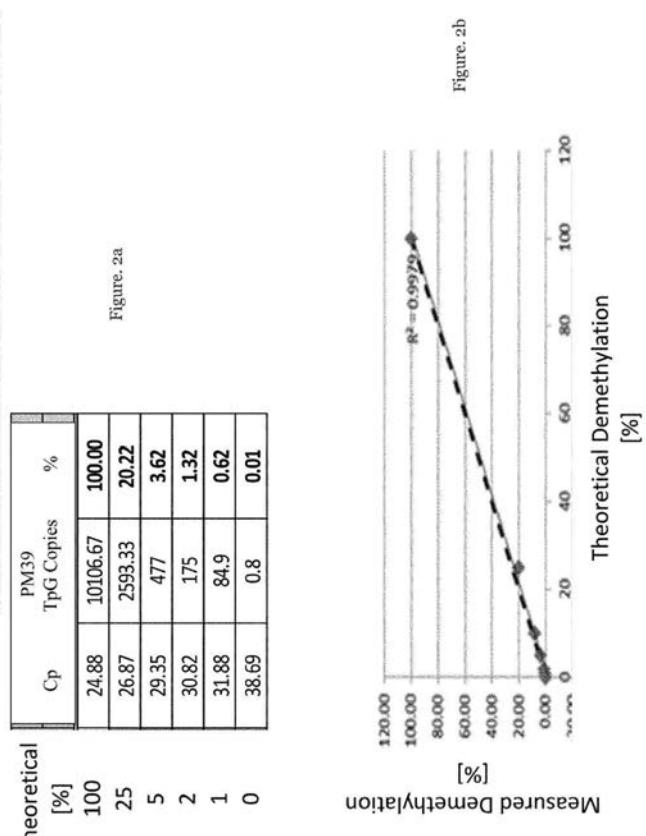


Figure 1

【図2】



【配列表】

2021502806000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2018/079406

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/6881 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, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/050925 A1 (EPIONTIS GMBH [DE]) 30 March 2017 (2017-03-30) claim 13 abstract the whole document -----	3,13-15
A	claim 13 abstract the whole document	1,2,4-12
X	WO 2014/170497 A2 (EPIONTIS GMBH [DE]) 23 October 2014 (2014-10-23) claim 26 page 18, paragraph 7 - page 19, paragraph 1 abstract the whole document -----	3,13-15
A	claim 26 page 18, paragraph 7 - page 19, paragraph 1 abstract the whole document	1,2,4-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

19 November 2018

28/11/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Helliot, Bertrand

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2018/079406

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017050925	A1	30-03-2017	CA 2999614 A1 CN 108026590 A EP 3353319 A1 JP 2018529346 A US 2018216184 A1 WO 2017050925 A1	30-03-2017 11-05-2018 01-08-2018 11-10-2018 02-08-2018 30-03-2017
WO 2014170497	A2	23-10-2014	CA 2904658 A1 CN 105189783 A CN 107941681 A EP 2986735 A2 EP 3327141 A1 JP 2016515397 A JP 2018064570 A US 2016024578 A1 US 2018291447 A1 WO 2014170497 A2	23-10-2014 23-12-2015 20-04-2018 24-02-2016 30-05-2018 30-05-2016 26-04-2018 28-01-2016 11-10-2018 23-10-2014

フロントページの続き

(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,R0,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

F ターム(参考) 4B063 QA13 QA18 QQ02 QQ03 QQ08 QQ34 QQ42 QQ52 QR14 QR32
QR35 QR55 QR62 QR72 QR77 QS25 QS34 QS36 QX01