(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2017-511142
(P2017-511142A)
(43)公表日　平成29年4月20日(2017.4.20)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B029
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	ZNAZ	4B063
C12Q 1/04	(2006.01)	C12Q	1/04		
C12M 1/34	(2006.01)	C12M	1/34	B	
		C12M	1/34	Z	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 78 頁）

(21)出願番号　特願2016-562026 (P2016-562026)
(86)(22)出願日　平成27年4月14日 (2015.4.14)
(85)翻訳文提出日　平成28年12月6日 (2016.12.6)
(86)国際出願番号　PCT/IL2015/050403
(87)国際公開番号　WO2015/159292
(87)国際公開日　平成27年10月22日 (2015.10.22)
(31)優先権主張番号　61/979,233
(32)優先日　平成26年4月14日 (2014.4.14)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　598025706
イッスム・リサーチ・デベロプメント・カムパニー・オブ・ザ・ヘブリュー・ユニバシティー・オブ・エルサレム　リミテッド
イスラエル国　エルサレム　９１３９０　ピー．オー．ボックス３９１３５　ギバラム　エドモンド　ジェイ．サフラ　キャンパスハイテクパーク
(71)出願人　500545311
ハダシット　メディカル　リサーチ　サービシーズ　アンド　ディベロップメント　リミテッド
イスラエル国　エルサレム　９１１２０　キリャット　ハダサー　ピーオービー　１２０００

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＤＮＡの組織または細胞起源を決定するための方法およびキット

(57)【要約】
対象における細胞型または組織の死を検出するための方法を開示する。本方法は、対象の体液試料中に含まれる無細胞ＤＮＡが細胞型由来または組織由来であるか否かの決定を含み、決定は、無細胞ＤＮＡの連続配列上の少なくとも４箇所のメチル化部位のメチル化状態の確認によって行い、前記配列はヌクレオチド数３００以下であり、細胞型または組織に特徴的なＤＮＡの連続配列上の少なくとも４箇所のメチル化部位のそれぞれのメチル化状態を、細胞型または組織の死の指標とする方法である。細胞死を検出するためのキットも開示する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象における細胞型または組織の死を検出するための方法であって、対象の体液試料中に含まれる無細胞ＤＮＡが細胞型由来または組織由来であるか否かの決定を含み、前記決定は、無細胞ＤＮＡの連続配列上の少なくとも４箇所のメチル化部位のメチル化状態の確認によって行い、前記配列はヌクレオチド数３００以下であり、前記細胞型または組織に特徴的なＤＮＡの前記連続配列上の前記少なくとも４箇所のメチル化部位のそれぞれのメチル化状態を、前記細胞型または組織の死の指標とする方法。
【請求項２】
目的の細胞型または組織に固有のメチル化を同定するための方法であって、前記目的の細胞型のＤＮＡ中から、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を同定することを含み、各メチル化部位は、第２の非同一の細胞型または組織とは異なる様式でメチル化されており、前記連続配列の同定によって、前記目的の細胞型または組織に固有のメチル化を同定する方法。
【請求項３】
ＤＮＡが、試料中の目的の細胞型由来または組織由来であるか否かを決定するための方法であって、
前記ＤＮＡ中の連続配列上の少なくとも４箇所のメチル化部位のメチル化状態を確認することを含み、前記配列はヌクレオチド数３００以下であり、前記細胞型または組織に特徴的なＤＮＡの前記連続配列上の前記少なくとも４箇所のメチル化部位のそれぞれのメチル化状態を、前記目的の細胞型由来または組織由来であることの指標とする方法。
【請求項４】
前記メチル化状態は、目的の非疾患性の細胞型または組織の特徴である、請求項１または３に記載の方法。
【請求項５】
前記配列は５０～２５０ヌクレオチドを含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記細胞型の死が病理学的プロセスと関連し、前記方法は、前記病理学的プロセスの診断をさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記ＤＮＡは無細胞ＤＮＡである、請求項２または３に記載の方法。
【請求項８】
前記ＤＮＡは細胞性ＤＮＡである、請求項２または３に記載の方法。
【請求項９】
前記決定の前に、前記細胞性ＤＮＡを含む細胞の溶解をさらに含む、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記少なくとも４箇所のメチル化部位は、少なくとも５箇所のメチル化部位を含む、請求項１～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記目的の細胞型は体液中に含まれる、請求項２に記載の方法。
【請求項１２】
前記試料は体液を含む、請求項３に記載の方法。
【請求項１３】
前記体液は、血液、血漿、精子、乳、尿、唾液および脳脊髄液からなる群より選択される、請求項１、１１および１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
前記確認を、少なくとも１種のメチル化依存性オリゴヌクレオチドを用いて行う、請求項１および３～１３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５】
前記メチル化依存性オリゴヌクレオチドは、前記４箇所のメチル化部位の少なくとも１箇所にハイブリダイズし、ハイブリダイズした部位はメチル化部位である、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記メチル化依存性オリゴヌクレオチドは、前記４箇所のメチル化部位の少なくとも１箇所にハイブリダイズし、ハイブリダイズした部位は非メチル化部位である、請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
前記確認を、メチル化非依存性オリゴヌクレオチドを用いて行う、請求項１および３～１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
前記確認を、少なくとも２種のメチル化非依存性オリゴヌクレオチドを用いて行う、請求項１および３～１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
（ａ）前記試料中の前記ＤＮＡを亜硫酸水素塩と接触させて、前記ＤＮＡ中の脱メチル化シトシンをウラシルに変換し、
（ｂ）ＤＮＡの前記連続配列上の前記少なくとも４箇所のメチル化部位の１箇所目に隣接する核酸配列と、最後の箇所に隣接する核酸配列とのそれぞれにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いて、前記ＤＮＡ中の前記連続配列を増幅し、そして
（ｃ）ＤＮＡの前記連続配列のシーケンシングを行う
ことによって前記確認を実施する、請求項１、３～１３、１７および１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
前記試料は、前記細胞型または組織と非同一である第２細胞に由来の無細胞ＤＮＡを含む、請求項１または７に記載の方法。
【請求項２１】
前記細胞型由来または組織由来の無細胞ＤＮＡ量と、前記第２細胞由来の無細胞ＤＮＡ量との比の分析をさらに含む、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記細胞型由来または組織由来の無細胞ＤＮＡ量と、前記試料中の無細胞ＤＮＡの総量との比の分析をさらに含む、請求項２０に記載の方法。
【請求項２３】
前記細胞型は、膵臓ベータ細胞、膵臓外分泌細胞、肝細胞、脳細胞、肺細胞、子宮細胞、腎臓細胞、乳房細胞、脂肪細胞、結腸細胞、直腸細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、前立腺細胞および甲状腺細胞からなる群より選択されるものである、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
前記組織は、膵臓組織、肝臓組織、肺組織、脳組織、子宮組織、腎臓組織、乳房組織、脂肪、結腸組織、直腸組織、心臓組織、骨格筋組織、前立腺組織および甲状腺組織からなる群より選択されるものである、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
前記試料は血液試料である、請求項１、１２および１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６】
前記細胞型由来または組織由来の無細胞ＤＮＡの定量をさらに含む、請求項１または７に記載の方法。
【請求項２７】
試料中のＤＮＡの由来を同定するためのキットであって、核酸配列中の少なくとも４箇所のメチル化部位のメチル化状態を検出し得るオリゴヌクレオチドを含み、前記核酸配列は３００塩基対以下であり、且つ少なくとも４箇所のメチル化部位を含み、各メチル化部

位は、目的の第１細胞において、第１細胞とは非同一である第２細胞とは異なる様式でメチル化されている部位である、キット。
【請求項２８】
試料中のＤＮＡの由来を同定するためのキットであって、３００塩基対以下の核酸配列を有するＤＮＡを増幅し得る少なくとも２種のオリゴヌクレオチドを含み、前記核酸配列は、少なくとも４箇所のメチル化部位を含み、各メチル化部位は、目的の第１細胞において、第１細胞とは非同一である第２細胞とは異なる様式でメチル化されている部位である、キット。
【請求項２９】
前記配列は５０～２５０ヌクレオチドを含む、請求項２７または２８に記載のキット。
【請求項３０】
前記ＤＮＡは無細胞ＤＮＡである、請求項２７または２８に記載のキット。
【請求項３１】
前記ＤＮＡ配列は、配列番号１～１４８４のいずれか１種に含まれる配列である、請求項２７～３０のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３２】
前記ＤＮＡ配列のシーケンシングのための少なくとも１種の薬剤をさらに含む、請求項２７～３１のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３３】
前記核酸配列を有するＤＮＡをさらに含み、前記ＤＮＡが目的の既知の細胞由来である、請求項２７～３２のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３４】
病理学的プロセスを診断するための、請求項２７～３３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３５】
病理学的プロセスに対する処置をモニタリングするための、請求項２７～３３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３６】
細胞型または組織の死をモニタリングするための、請求項２７～３３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３７】
亜硫酸水素塩をさらに含む、請求項２７～３３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３８】
前記少なくとも２種のオリゴヌクレオチドの少なくとも１種は、バーコード配列をコードする、請求項２７に記載のキット。
【請求項３９】
前記少なくとも２種のオリゴヌクレオチドの少なくとも１種は、同定可能な部分で標識されている、請求項２８に記載のキット。
【請求項４０】
前記少なくとも１種のオリゴヌクレオチドは、検出可能な部分で標識されている、請求項２７に記載のキット。
【請求項４１】
前記少なくとも２種のオリゴヌクレオチドの少なくとも１種は、バーコード配列をコードする、請求項２８に記載のキット。
【請求項４２】
前記２種のオリゴヌクレオチドは、フローセル表面への結合を可能せしめる配列をコードする、請求項２８または４１に記載のキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】

本発明は、いくつかの実施形態においては、無細胞ＤＮＡの由来を決定するための方法、ならびに細胞死と関連する病理学的プロセスの診断、細胞死の変化を意図した薬物などの治療レジメのモニタリング、および細胞死レベルに影響するプロセスの臨床および研究目的での検討のためのその使用に関する。

【背景技術】

【０００２】

血漿が、死滅した細胞由来の無細胞循環ＤＮＡ（ｃｆＤＮＡ）の小断片（１ｍｌあたり平均５０００個のゲノム等価物）を含有することは、数十年前から知られていた。ｃｆＤＮＡの放出および消失の根本的なメカニズムは不明確なままであるが、この現象は、臨床に関連した様々な適用のために急速に活用されている。胎児ＤＮＡの断片が母体循環系において一時的に循環するという知見は、胎児トリソミーおよび他の遺伝子異常を同定するための次世代シーケンシング（ＮＧＳ）に基づく出生前診断への道を開き、羊水穿刺の代替となる可能性が高い。がん生物学においては、腫瘍は（腫瘍特異的体細胞変異を含む）ＤＮＡを循環中に放出することが知られており、腫瘍動力学およびゲノム進化をモニタリングするための液体生検のための手段を提供する。さらに、ｃｆＤＮＡは、ドナーのＤＮＡとレシピエントのＤＮＡとを識別する一塩基多型（ＳＮＰ）に基づいて、腎臓、肝臓または心臓移植後の移植片細胞死を検出するために用いられてきた。これらの全ての事例において、目的の組織（胎児、腫瘍または移植片）のＤＮＡ配列と、宿主のそれとの間に遺伝的差異が存在し、高度に特異的なアッセイのための基礎を提供する。

【０００３】

ｃｆＤＮＡの血中レベルは、外傷的脳傷害、心血管疾患、敗血症および集中運動などの複数のさらなる条件下で増大することが知られている。しかしながら、これらの事例において、上昇したｃｆＤＮＡの由来は未知であり、診断または予後診断手段としてのｃｆＤＮＡの実用性を大きく損なわせている。例えば、ｃｆＤＮＡは、損傷した組織の実質細胞を起源とするが、死に瀕した炎症細胞からも生じる。

【０００４】

同一のヌクレオチド配列を有するにもかかわらず、身体におけるそれぞれの細胞型のＤＮＡは、その遺伝子発現プロファイルと相関する独自のエピジェネティックなマークを有する。特に、非転写遺伝子を抑制するように働くＤＮＡのメチル化は、組織の識別性の基本的な性質である。メチル化パターンはそれぞれの細胞型に特徴的なものであり、同一個体中の同型の細胞間および個体間で保存されており、生理的または病理的な条件下においても高度に安定である。したがって、ｃｆＤＮＡのＤＮＡメチル化パターンを用いて、その起源となる組織を決定し、そして由来となる臓器における細胞死を推測することができる。

【０００５】

理論的には、そのような手法は、ｃｆＤＮＡの総量、目的組織に由来する画分、およびｃｆＤＮＡの推定半減期（１５～１２０分）を考慮することで、目的組織における細胞死の速度を同定することができる。この手法は細胞識別のための正常で安定なマーカーに依拠するため、病理の性質を同定すること（例えば、同じ組織中の外傷または炎症のために死滅した腫瘍細胞または死滅した野生型細胞に由来するｃｆＤＮＡを識別すること）はできないことに留意されたい。組織特異的細胞死に関する高感度であり、侵襲性が最小限であるアッセイの利用可能性は、早期の正確な診断ならびに臨床および薬物開発の現場の両方における療法に対する応答のモニタリングを含む。

【０００６】

組織特異的ＤＮＡメチル化の古典的な例は、インスリン産生性膵臓β細胞中で非メチル化され、他の場所ではメチル化されている、インスリン遺伝子プロモーターによって提供される。最近の研究により、新しく診断されたＴ１Ｄ患者の循環ならびに膵島移植片レシピエントから非メチル化インスリンプロモーターＤＮＡが同定され、これはβ細胞の自己免疫性および同種免疫性の破壊の両方を反映する可能性がある（非特許文献１、非特許文献２、非特許文献３および非特許文献４）。

【０００７】
さらなる背景技術は、特許文献１、特許文献２および特許文献３を含む。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００８】
【特許文献１】国際特許出願公開ＷＯ２０１３１３１０８３
【特許文献２】国際特許出願公開ＷＯ２０１４１３８１３３
【特許文献３】国際特許出願公開ＷＯ２０１１０１７２８
【特許文献４】米国特許第４，６８３，２０２号
【特許文献５】米国特許第４，６８３，１９５号
【特許文献６】米国特許第４，８００，１５９号
【特許文献７】米国特許第５，３２２，７７０号
【特許文献８】米国特許第５，６１２，４７３号
【特許文献９】米国特許第５，６０２，７５６号
【特許文献１０】米国特許第５，５３８，８７１号
【特許文献１１】米国特許第５，４７５，６１０号
【特許文献１２】米国特許第６，２７４，３２０号
【特許文献１３】米国特許第６，２５８，５６８号
【特許文献１４】米国特許第６，２１０，８９１号
【特許文献１５】米国特許第４，４５８，０６６号
【特許文献１６】米国特許出願第２０１３００８４５７１号
【特許文献１７】米国特許出願第２０１２０００３６３４号
【特許文献１８】米国特許第４，６６６，８２８号
【特許文献１９】米国特許第４，６８３，２０２号
【特許文献２０】米国特許第４，８０１，５３１号
【特許文献２１】米国特許第５，１９２，６５９号
【特許文献２２】米国特許第５，２７２，０５７号
【特許文献２３】米国特許第３，７９１，９３２号
【特許文献２４】米国特許第３，８３９，１５３号
【特許文献２５】米国特許第３，８５０，７５２号
【特許文献２６】米国特許第３，８５０，５７８号
【特許文献２７】米国特許第３，８５３，９８７号
【特許文献２８】米国特許第３，８６７，５１７号
【特許文献２９】米国特許第３，８７９，２６２号
【特許文献３０】米国特許第３，９０１，６５４号
【特許文献３１】米国特許第３，９３５，０７４号
【特許文献３２】米国特許第３，９８４，５３３号
【特許文献３３】米国特許第３，９９６，３４５号
【特許文献３４】米国特許第４，０３４，０７４号
【特許文献３５】米国特許第４，０９８，８７６号
【特許文献３６】米国特許第４，８７９，２１９号
【特許文献３７】米国特許第５，０１１，７７１号
【特許文献３８】米国特許第５，２８１，５２１号
【非特許文献】
【０００９】
【非特許文献１】Akirav E.M.et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108, 19018-19023 (2011)
【非特許文献２】Lebastchi J et al., Diabetes 62, 1676-1680 (2013)
【非特許文献３】Husseiny M. I. Plos one 9 e94591 (2014)
【非特許文献４】Herold K.C. et al., J Clin Invest. Doi:10.1172/jc178142 (2015)

【非特許文献５】J. Sambrook et al., 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、1989, 2nd Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press: New York, N.Y.
【非特許文献６】P. Sunnucks et al., Genetics, 1996, 144: 747-756
【非特許文献７】S. M. Aljanabi and I. Martinez, Nucl. Acids Res. 1997, 25: 4692-4693
【非特許文献８】S. Gustincich et al., BioTechniques, 1991, 11: 298-302
【非特許文献９】J. B. W. Hammond et al., Biochemistry, 1996, 240: 298-300
【非特許文献１０】K. B. Mullis and F. A. Faloona, Methods Enzymol., 1987, 155: 350-355
【非特許文献１１】「PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications」、M. A. Innis (Ed.), 1990, Academic Press: New York
【非特許文献１２】「PCR Strategies」、M. A. Innis (Ed.), 1995, Academic Press: New York
【非特許文献１３】「Polymerase chain reaction: basic principles and automation in PCR: A Practical Approach」、McPherson et al. (Eds.), 1991, IRL Press: Oxford
【非特許文献１４】R. K. Saiki et al., Nature, 1986, 324: 163-166
【非特許文献１５】Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 5463-5467 (1977)
【非特許文献１６】Maxam, A. M. & Gilbert, W. Proc Natl Acad Sci USA 74, 560-564 (1977)
【非特許文献１７】Ronaghi, M. et al., Science 281, 363, 365 (1998)
【非特許文献１８】Lysov, l. et al., Dokl Akad Nauk SSSR 303, 1508-1511 (1988)
【非特許文献１９】Bains W. & Smith G. C. J. Theor Biol 135, 303-307 (1988)
【非特許文献２０】Drnanac, R. et al., Genomics 4, 114-128 (1989)
【非特許文献２１】Khrapko, K. R. et al., FEBS Lett 256.118-122 (1989)
【非特許文献２２】Pevzner P. A. J Biomol Struct Dyn 7, 63-73 (1989)
【非特許文献２３】Southern, E. M. et al., Genomics 13, 1008-1017 (1992)
【非特許文献２４】P. Tijssen 「Hybridization with Nucleic Acid Probes--Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (Parts I and II)」、1993, Elsevier Science
【非特許文献２５】「Short Protocols in Molecular Biology」、2002, F. M. Ausubel (Ed.), 5.sup.th Ed., John Wiley & Sons: Secaucus, N.J.
【非特許文献２６】S. A. Narang et al., Meth. Enzymol. 1979, 68: 90-98
【非特許文献２７】E. L. Brown et al., Meth. Enzymol. 1979, 68: 109-151
【非特許文献２８】E. S. Belousov et al., Nucleic Acids Res. 1997, 25: 3440-3444
【非特許文献２９】D. Guschin et al., Anal. Biochem. 1997, 250: 203-211
【非特許文献３０】M. J. Blommers et al., Biochemistry, 1994, 33: 7886-7896
【非特許文献３１】K. Frenkel et al., Free Radic. Biol. Med. 1995, 19: 373-380
【非特許文献３２】J. D. Pearson and F. E. Regnier (J. Chrom., 1983, 255: 137-149)
【非特許文献３３】G. D. McFarland and P. N. Borer, Nucleic Acids Res., 1979, 7: 1067-1080
【非特許文献３４】A. M. Maxam and W. Gilbert, Methods of Enzymology, 1980, 65: 499-560
【非特許文献３５】U. Pieles et al., Nucleic Acids Res., 1993, 21: 3191-3196
【非特許文献３６】H. Wu and H. Aboleneen, Anal. Biochem., 2001, 290: 347-352
【非特許文献３７】E. S. Mansfield et al., Mol. Cell. Probes, 1995, 9: 145-156
【非特許文献３８】L. J. Kricka, Ann. Clin. Biochem. 2002, 39: 114-129
【非特許文献３９】R. P. van Gijlswijk et al., Expert Rev. Mol. Diagn. 2001, 1: 81-91

【非特許文献４０】S. Joos et al., J. Biotechnol. 1994, 35: 135-153
【非特許文献４１】L. M. Smith et al., Nucl. Acids Res., 1985, 13: 2399-2412
【非特許文献４２】B. A. Connoly and O. Rider, Nucl. Acids. Res., 1985, 13: 4485-4502
【非特許文献４３】T. R. Broker et al., Nucl. Acids Res. 1978, 5: 363-384
【非特許文献４４】E. A. Bayer et al., Methods of Biochem. Analysis, 1980, 26: 1-45
【非特許文献４５】R. Langer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78: 6633-6637
【非特許文献４６】R. W. Richardson et al., Nucl. Acids Res. 1983, 11: 6167-6184
【非特許文献４７】D. J. Brigati et al., Virol. 1983, 126: 32-50
【非特許文献４８】P. Tchen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81: 3466-3470
【非特許文献４９】J. E. Landegent et al., Exp. Cell Res. 1984, 15: 61-72
【非特許文献５０】A. H. Hopman et al., Exp. Cell Res. 1987, 169: 357-368
【非特許文献５１】J. Temsamani and S. Agrawal, Mol. Biotechnol. 1996, 5: 223-232
【非特許文献５２】R. J. Heetebrij et al., Cytogenet. Cell. Genet. 1999, 87: 47-52
【非特許文献５３】C. Levenson et al., Methods Enzymol. 1990, 184: 577-583
【非特許文献５４】C. Pfannschmidt et al., Nucleic Acids Res. 1996, 24: 1702-1709
【非特許文献５５】C. Neves et al., Bioconjugate Chem. 2000, 11: 51-55
【非特許文献５６】M. G. Sebestyen et al., Nat. Biotechnol. 1998, 16: 568-576
【非特許文献５７】「The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products」、9th Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg
【非特許文献５８】「Molecular Cloning: A laboratory Manual」、Sambrook et al., (1989)
【非特許文献５９】「Current Protocols in Molecular Biology」Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994)
【非特許文献６０】Ausubel et al., 「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)
【非特許文献６１】Perbal, 「A Practical Guide to Molecular Cloning」、John Wiley & Sons, New York (1988)
【非特許文献６２】Watson et al., 「Recombinant DNA」、Scientific American Books, New York
【非特許文献６３】Birren et al. (eds) 「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」、Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998)
【非特許文献６４】「Cell Biology: A Laboratory Handbook」、Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994)
【非特許文献６５】「Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique」by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition
【非特許文献６６】「Current Protocols in Immunology」Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994)
【非特許文献６７】Stites et al. (eds), 「Basic and Clinical Immunology」(8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994)
【非特許文献６８】Mishell and Shiigi (eds), 「Selected Methods in Cellular Immunology」、W. H. Freeman and Co., New York (1980)
【非特許文献６９】「Oligonucleotide Synthesis」、Gait, M. J., ed. (1984)
【非特許文献７０】「Nucleic Acid Hybridization」、Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985)
【非特許文献７１】「Transcription and Translation」、Hames, B. D., and Higgins S

. J., eds. (1984)
【非特許文献７２】「Animal Cell Culture」、Freshney, R. I., ed. (1986)
【非特許文献７３】「Immobilized Cells and Enzymes」、IRL Press, (1986)
【非特許文献７４】「A Practical Guide to Molecular Cloning」、Perbal, B., (1984)
【非特許文献７５】「Methods in Enzymology」Vol. 1-317, Academic Press
【非特許文献７６】「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」、Academic Press, San Diego, CA (1990)
【非特許文献７７】Marshak et al.,「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」CSHL Press (1996)
【非特許文献７８】Mortberg E et al., Resuscitation 2011;82:26-31
【非特許文献７９】J et al., Diabetes 62, 1676-1680 (2013)

【発明の概要】

【００１０】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、対象における細胞型または組織の死を検出するための方法であって、対象の体液試料中に含まれる無細胞ＤＮＡが細胞型由来または組織由来であるか否かの決定を含み、前記決定は、無細胞ＤＮＡの連続配列上の少なくとも４箇所のメチル化部位のメチル化状態の確認によって行い、前記配列はヌクレオチド数３００以下であり、前記細胞型または組織に特徴的なＤＮＡの前記連続配列上の前記少なくとも４箇所のメチル化部位のそれぞれのメチル化状態を、前記細胞型または組織の死の指標とする方法が提供される。

【００１１】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、目的の細胞型または組織に固有のメチル化を同定するための方法であって、前記目的の細胞型のＤＮＡ中から、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を同定することを含み、各メチル化部位は、第２の非同一の細胞型または組織とは異なる様式でメチル化されており、前記連続配列の同定によって、前記目的の細胞型または組織に固有のメチル化を同定する方法が提供される。

【００１２】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、ＤＮＡが、試料中の目的の細胞型由来または組織由来であるか否かを決定するための方法であって、

前記ＤＮＡ中の連続配列上の少なくとも４箇所のメチル化部位のメチル化状態を確認することを含み、前記配列はヌクレオチド数３００以下であり、前記細胞型または組織に特徴的なＤＮＡの前記連続配列上の前記少なくとも４箇所のメチル化部位のそれぞれのメチル化状態を、前記目的の細胞型由来または組織由来であることの指標とする方法が提供される。

【００１３】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、試料中のＤＮＡの由来を同定するためのキットであって、核酸配列中の少なくとも４箇所のメチル化部位のメチル化状態を検出し得るオリゴヌクレオチドを含み、前記核酸配列は３００塩基対以下であり、且つ少なくとも４箇所のメチル化部位を含み、各メチル化部位は、目的の第１細胞において、第１細胞とは非同一である第２細胞とは異なる様式でメチル化されている部位である、キットが提供される。

【００１４】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、試料中のＤＮＡの由来を同定するためのキットであって、３００塩基対以下の核酸配列を有するＤＮＡを増幅し得る少なくとも２種のオリゴヌクレオチドを含み、前記核酸配列は、少なくとも４箇所のメチル化部位を含み、各メチル化部位は、目的の第１細胞において、第１細胞とは非同一である第２細胞とは異なる様式でメチル化されている部位である、キットが提供される。

【００１５】

本発明のいくつかの実施形態によれば、メチル化状態は、目的の非疾患性の細胞型また

は組織の特徴である。
【００１６】
本発明のいくつかの実施形態によれば、配列は５０～２５０ヌクレオチドを含む。
【００１７】
本発明のいくつかの実施形態によれば、細胞型の死は病理学的プロセスと関連し、前記方法は、前記病理学的プロセスの診断をさらに含む。
【００１８】
本発明のいくつかの実施形態によれば、ＤＮＡは無細胞ＤＮＡである。
【００１９】
本発明のいくつかの実施形態によれば、ＤＮＡは細胞性ＤＮＡである。
【００２０】
本発明のいくつかの実施形態によれば、方法は、決定の前に、細胞性ＤＮＡを含む細胞の溶解をさらに含む。
【００２１】
本発明のいくつかの実施形態によれば、少なくとも４箇所のメチル化部位は、少なくとも５箇所のメチル化部位を含む。
【００２２】
本発明のいくつかの実施形態によれば、目的の細胞型は、体液中に含まれる。
【００２３】
本発明のいくつかの実施形態によれば、試料は、体液を含む。
【００２４】
本発明のいくつかの実施形態によれば、体液は、血液、血漿、精子、ミルク、尿、唾液および脳脊髄液からなる群より選択される。
【００２５】
本発明のいくつかの実施形態によれば、確認は、少なくとも１種のメチル化依存性オリゴヌクレオチドを用いて行う。
【００２６】
本発明のいくつかの実施形態によれば、メチル化依存性オリゴヌクレオチドは、４箇所のメチル化部位の少なくとも１箇所にハイブリダイズし、ハイブリダイズした部位はメチル化部位である。
【００２７】
本発明のいくつかの実施形態によれば、４箇所のメチル化部位の少なくとも１箇所にハイブリダイズし、ハイブリダイズした部位は非メチル化部位である。
【００２８】
本発明のいくつかの実施形態によれば、確認を、メチル化非依存性オリゴヌクレオチドを用いて行う。
【００２９】
本発明のいくつかの実施形態によれば、確認を、少なくとも２種のメチル化非依存性オリゴヌクレオチドを用いて行う。
【００３０】
本発明のいくつかの実施形態によれば、
（ａ）試料中のＤＮＡを亜硫酸水素塩と接触させて、ＤＮＡ中の脱メチル化シトシンをウラシルに変換し、
（ｂ）ＤＮＡの連続配列上の少なくとも４箇所のメチル化部位の１箇所目に隣接する核酸配列と、最後の箇所に隣接する核酸配列とのそれぞれにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いて、ＤＮＡ中の連続配列を増幅し、そして
（ｃ）ＤＮＡの連続配列のシーケンシングを行う
ことによって確認を実施する。
【００３１】
本発明のいくつかの実施形態によれば、試料は、細胞型または組織と非同一である第２

細胞に由来の無細胞ＤＮＡを含む。
【００３２】
本発明のいくつかの実施形態によれば、細胞型由来または組織由来の無細胞ＤＮＡ量と、第２細胞由来の無細胞ＤＮＡ量との比の分析をさらに含む。
【００３３】
本発明のいくつかの実施形態によれば、細胞型由来または組織由来の無細胞ＤＮＡ量と、試料中の無細胞ＤＮＡの総量との比の分析をさらに含む。
【００３４】
本発明のいくつかの実施形態によれば、細胞型は、膵臓ベータ細胞、膵臓外分泌細胞、肝細胞、脳細胞、肺細胞、子宮細胞、腎臓細胞、乳房細胞、脂肪細胞、結腸細胞、直腸細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、前立腺細胞および甲状腺細胞からなる群より選択されるものである。
【００３５】
本発明のいくつかの実施形態によれば、組織は、膵臓組織、肝臓組織、肺組織、脳組織、子宮組織、腎臓組織、乳房組織、脂肪、結腸組織、直腸組織、心臓組織、骨格筋組織、前立腺組織および甲状腺組織からなる群より選択されるものである。
【００３６】
本発明のいくつかの実施形態によれば、試料は、血液試料である。
【００３７】
本発明のいくつかの実施形態によれば、方法は、細胞型由来または組織由来の無細胞ＤＮＡの定量をさらに含む。
【００３８】
本発明のいくつかの実施形態によれば、配列は、５０～２５０ヌクレオチドを含む。
【００３９】
本発明のいくつかの実施形態によれば、ＤＮＡは、無細胞ＤＮＡである。
【００４０】
本発明のいくつかの実施形態によれば、ＤＮＡ配列は、配列番号１～１４８４のいずれか１種に含まれる配列である。
【００４１】
本発明のいくつかの実施形態によれば、キットは、ＤＮＡ配列をシーケンシングを行うための少なくとも１つの薬剤をさらに含む。
【００４２】
本発明のいくつかの実施形態によれば、キットは、核酸配列を有するＤＮＡをさらに含み、ＤＮＡが目的の既知の細胞由来である。
【００４３】
本発明のいくつかの実施形態によれば、キットは、病理学的プロセスを診断するためのものである。
【００４４】
本発明のいくつかの実施形態によれば、キットは、病理学的プロセスに対する処置をモニタリングするためのものである。
【００４５】
本発明のいくつかの実施形態によれば、キットは、細胞型または組織の死をモニタリングするためのものである。
【００４６】
本発明のいくつかの実施形態によれば、キットは、亜硫酸水素塩をさらに含む。
【００４７】
本発明のいくつかの実施形態によれば、少なくとも２種のオリゴヌクレオチドの少なくとも１種は、バーコード配列をコードする。
【００４８】
本発明のいくつかの実施形態によれば、少なくとも２種のオリゴヌクレオチドの少なく

とも１種は、同定可能な部分で標識されている。
【００４９】
本発明のいくつかの実施形態によれば、少なくとも１種のオリゴヌクレオチドは、検出可能な部分で標識されている。
【００５０】
本発明のいくつかの実施形態によれば、少なくとも２種のオリゴヌクレオチドの少なくとも１種は、バーコード配列をコードする。
【００５１】
本発明のいくつかの実施形態によれば、２種のオリゴヌクレオチドは、フローセル表面への結合を可能せしめる配列をコードする。
【００５２】
別途定義されない限り、本明細書で用いられる全ての技術および／または科学用語は、本発明が属する当業界における通常の知識を有する者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似するか、または等価である方法および材料を、本発明の実施形態の実施または試験において用いることができるが、例示的な方法および／または材料を以下に記載する。矛盾する場合、定義を含む本特許明細書が優先するものとする。さらに、材料、方法、および実施例は例示に過ぎず、必ずしも限定を意図するものではない。
【００５３】
本発明のいくつかの実施形態を、添付の図面および画像を参照しながら、単に例示としてここで説明する。ここで図面に特に詳細に参照するが、ここで示す詳細は例示に過ぎず、本発明の実施形態の例示的考察のためだけのものであることを強調する。これに関して、図面と共に為される説明は、本発明の実施形態をどのように実施することができるかを当業者に明らかにする。
【図面の簡単な説明】
【００５４】
【図１Ａ】Ｔ１Ｄ糖尿病患者の循環中のベータ細胞由来ＤＮＡ。マーカーとして用いるインスリン遺伝子プロモーター断片の構造。黒色の点はＣｐＧ部位を表し、矢印はＰＣＲプライマーの位置を示す。
【図１Ｂ】Ｔ１Ｄ糖尿病患者の循環中のベータ細胞由来ＤＮＡ。複数の組織におけるインスリン遺伝子プロモーター中の個々のＣｐＧ部位のメチル化状態。グラフは、各組織由来のＤＮＡ中の非メチル化分子のパーセンテージを示す。右端のカラム群は、６種のＣｐＧ部位の全てが非メチル化されている分子のパーセンテージを示す。
【図１Ｃ】Ｔ１Ｄ糖尿病患者の循環中のベータ細胞由来ＤＮＡ。健康な対照および最近診断されたＴ１Ｄ患者の血漿中のベータ細胞由来ＤＮＡ。完全に非メチル化されたインスリンプロモーターＤＮＡ分子の画分（ベータ細胞由来ＤＮＡの画分を反映する）に、それぞれの個体において測定されたｃｆＤＮＡの絶対値を掛けた。対照対患者に関するＭａｎｎ　Ｗｈｉｔｎｅｙ検定、ｐ＜０．０００１。
【図１Ｄ】Ｔ１Ｄ糖尿病患者の循環中のベータ細胞由来ＤＮＡ。肝臓内膵島移植後の表示時間経過時に、長期Ｔ１Ｄ患者の循環中から採取したベータ細胞由来ＤＮＡ。
【図２Ａ】多発性硬化症におけるオリゴデンドロサイト由来ｃｆＤＮＡの同定。複数の組織におけるＭＢＰ３およびＷＭ１のメチル化状態。全脳においてはメチル化が欠如しているが、ニューロンに富む小脳中では欠如しておらず、非メチル化分子がグリア由来であることを示唆する結果に留意されたい（図８Ａ～Ｅおよび図９Ａ～Ｅも参照されたい）。
【図２Ｂ】多発性硬化症におけるオリゴデンドロサイト由来ｃｆＤＮＡの同定。健康な個体の血漿中のオリゴデンドロサイト由来ＤＮＡ。
【図２Ｃ】多発性硬化症におけるオリゴデンドロサイト由来ｃｆＤＮＡの同定。寛解および再発ＭＳ／ＮＭＯ患者の血漿中のオリゴデンドロサイト由来ＤＮＡ。グラフは、各試料中の非メチル化ＭＢＰ３およびＷＭ１の累積値を示す。対照対安定疾患、ｐ＝０．６；対照対再発疾患、ｐ＜０．０００１；安定対再発疾患、ｐ＜０．０００１；対照対全患者、

ｐ＝０．０２１。
【図３Ａ】脳損傷後の脳由来ｃｆＤＮＡの同定。ディープシーケンシングにより決定された、複数の組織におけるＣＧ０９７８７５０４遺伝子座（Ｂｒａｉｎ１）のＣｐＧ部位のメチル化状態。バーは、９種の遺伝子座の全てでＣｐＧが非メチル化されている分子のパーセンテージを表す。
【図３Ｂ】脳損傷後の脳由来ｃｆＤＮＡの同定。１２人の健康なボランティアの血漿中の脳由来ＤＮＡであり、完全に非メチル化されたＢｒａｉｎ１分子の割合を、各個体中のｃｆＤＮＡ量と掛けることにより算出された値である。
【図３Ｃ】脳損傷後の脳由来ｃｆＤＮＡの同定。心停止後の１０人の患者の血漿中の脳由来ＤＮＡ。各患者から、蘇生直後（「急性」）およびその後の時点で採取した。ラベルは、患者が存命（「生存」）または死亡か、および死因（脳、心臓または呼吸器）を示した。対照対患者（全時点）、ｐ＜０．０００１。
【図３Ｄ】脳損傷後の脳由来ｃｆＤＮＡの同定。神経外傷病棟への入院後の異なる日数後に採取された、外傷性脳傷害後の５人の患者の血漿中の脳由来ＤＮＡ。１年後には、２人の患者は悪化した神経スコアのままであり、２人の患者は回復し、１人の患者は死亡した。対照対患者（全時点）、ｐ＝０．００５。
【図４Ａ】膵臓がんまたは膵炎を発症した患者における膵臓外分泌腺由来ｃｆＤＮＡの同定。複数の組織における、ＣＵＸ２およびＲＥＧ１Ａ遺伝子座中のＣｐＧクラスターのメチル化状態。ＣＵＸ２は膵管中で選択的に非メチル化されていると考えられるが、ＲＥＧ１Ａは膵管と腺房細胞の両方だけでなく、結腸細胞の約３０％においても非メチル化されている。
【図４Ｂ】膵臓がんまたは膵炎を発症した患者における膵臓外分泌腺由来ｃｆＤＮＡの同定。健康な個体の血漿中の非メチル化ＣＵＸ２およびＲＥＧ１Ａ　ＤＮＡ断片のレベル。
【図４Ｃ】膵臓がんまたは膵炎を発症した患者における膵臓外分泌腺由来ｃｆＤＮＡの同定。膵臓がんまたは慢性膵炎を発症した患者の血漿中の非メチル化膵臓外分泌腺マーカーのレベル。グラフは、各患者における各マーカーからのシグナルから、バックグラウンドシグナル（健康な対照間で見られる最も高いシグナル）を引いた後の強度を示す。対照対全がん患者、ｐ＜０．０００１；対照対局所がん、ｐ＜０．０００１；対照対転移性疾患、ｐ＜０．０００１；局所対転移性がん、ｐ＝０．０４７；対照対膵炎、ｐ＜０．０００１。
【図５Ａ】特定組織由来の循環中ＤＮＡを検出するための方法のフローチャート。組織特異的メチル化マーカーを同定するための手順。
【図５Ｂ】特定組織由来の循環中のＤＮＡを検出するための方法のフローチャート。血漿中の組織特異的ＤＮＡのレベルを決定するための手順。
【図６Ａ】健康なボランティアおよび最近診断されたＴ１Ｄ患者の血漿中インスリン遺伝子プロモーターのメチル化。インスリン遺伝子プロモーターにおける個々のＣｐＧ部位のメチル化状態。
【図６Ｂ】健康なボランティアおよび最近診断されたＴ１Ｄ患者の血漿中インスリン遺伝子プロモーターのメチル化。パネルＡと同じ患者における、非メチル化ＤＮＡの％として表した、４～６箇所のＣｐＧを含む拡張ウィンドウのメチル化状態。
【図７Ａ】ＭＢＰ３の３’ＵＴＲのメチル化。マーカーとして用いたＭＢＰ３　３’ＵＴＲ断片の構造。ロリポップ型はＣｐＧを表す。空のロリポップ型はＩｌｌｕｍｉｎａ　４５０ｋアレイにおいて検出されたＣｐＧを表す。矢印はＰＣＲプライマーの位置を示す。
【図７Ｂ】ＭＢＰ３の３’ＵＴＲのメチル化。Ｉｌｌｕｍｉｎａ　４５０ｋアレイ中で捕捉したＭＢＰ３遺伝子座における個々のＣｐＧ部位のメチル化状態。データは、公表されている４５０ｋアレイのものである。
【図７Ｃ】ＭＢＰ３の３’ＵＴＲのメチル化。ディープシーケンシングにより決定された、複数の組織におけるＭＢＰ３遺伝子座に由来する個々のＣｐＧ部位および複数のＣｐＧを含む拡張ウィンドウのメチル化状態。
【図７Ｄ】ＭＢＰ３の３’ＵＴＲのメチル化。健康な対照および再発ＭＳ／ＮＭＯ患者の

血漿中のＭＢＰ３遺伝子座に由来する個々のＣｐＧ部位のメチル化。
【図７Ｅ】ＭＢＰ３の３’ＵＴＲのメチル化。健康なボランティアおよびＭＳ／ＮＭＯ患者（パネルＤと同じ患者）の血漿中の完全に非メチル化されたＭＢＰ３遺伝子座断片画分。総非メチル化ＭＢＰ３遺伝子座ＤＮＡをｎｇ／ｍｌ血漿で表したものが、図２Ｃに示される。
【図８Ａ】ＣＧ１０８０９５６０および隣接するＣｐＧ部位（ＷＭ１遺伝子座）のメチル化。マーカーとして用いたＷＭ１遺伝子座断片の構造。ロリポップ型はＣｐＧを表す。空のロリポップ型はＩｌｌｕｍｉｎａ　４５０ｋアレイにおいて検出されたＣｐＧを表す。矢印はＰＣＲプライマーの位置を示す。
【図８Ｂ】ＣＧ１０８０９５６０および隣接するＣｐＧ部位（ＷＭ１遺伝子座）のメチル化。公表されているＩｌｌｕｍｉｎａ　４５０ｋアレイ中に記録されている、複数の組織におけるＷＭ１のメチル化状態。
【図８Ｃ】ＣＧ１０８０９５６０および隣接するＣｐＧ部位（ＷＭ１遺伝子座）のメチル化。ディープシーケンシングにより決定された、複数の組織におけるＷＭ１遺伝子座に由来する個々のＣｐＧ部位および複数のＣｐＧを含む拡張ウィンドウのメチル化状態。
【図８Ｄ】ＣＧ１０８０９５６０および隣接するＣｐＧ部位（ＷＭ１遺伝子座）のメチル化。健康な対照および再発ＭＳ／ＮＭＯ患者の血漿中のＷＭ１遺伝子座に由来する個々のＣｐＧ部位のメチル化。
【図８Ｅ】ＣＧ１０８０９５６０および隣接するＣｐＧ部位（ＷＭ１遺伝子座）のメチル化。健康なボランティアおよびＭＳ／ＮＭＯ患者（パネルＤと同じ患者）の血漿中の完全に非メチル化されたＷＭ１　ＤＮＡ断片画分。
【図９Ａ】脳マーカーＣＧ０９７８７５０４（Ｂｒａｉｎ１）および隣接するＣｐＧ部位のメチル化。マーカーとして用いたＢｒａｉｎ１遺伝子座断片の構造。ロリポップ型はＣｐＧを表す。空のロリポップ型はＩｌｌｕｍｉｎａ　４５０ｋアレイにおいて検出されたＣｐＧを表す。矢印はＰＣＲプライマーの位置を示す。
【図９Ｂ】脳マーカーＣＧ０９７８７５０４（Ｂｒａｉｎ１）および隣接するＣｐＧ部位のメチル化。公表されているＩｌｌｕｍｉｎａ　４５０ｋアレイ中に記録されている、複数の組織におけるＢｒａｉｎ１のメチル化状態。
【図９Ｃ】脳マーカーＣＧ０９７８７５０４（Ｂｒａｉｎ１）および隣接するＣｐＧ部位のメチル化。ディープシーケンシングにより決定された、複数の組織におけるＢｒａｉｎ１遺伝子座に由来する個々のＣｐＧ部位および複数のＣｐＧを含む拡張ウィンドウのメチル化状態。
【図９Ｄ】脳マーカーＣＧ０９７８７５０４（Ｂｒａｉｎ１）および隣接するＣｐＧ部位のメチル化。健康な対照および心停止後の患者の血漿中のＢｒａｉｎ１遺伝子座に由来する個々のＣｐＧ部位のメチル化。
【図９Ｅ】脳マーカーＣＧ０９７８７５０４（Ｂｒａｉｎ１）および隣接するＣｐＧ部位のメチル化。健康なボランティアおよび心停止後の患者（パネルＤと同じ患者）の血漿中の完全に非メチル化されたＢｒａｉｎ１　ＤＮＡ断片画分。
【図１０Ａ】ＲＥＧ１Ａ遺伝子近傍のＣｐＧクラスターのメチル化。マーカーとして用たＲＥＧ１Ａ断片の構造。ロリポップ型はＣｐＧを表す。空のロリポップ型はＩｌｌｕｍｉｎａ　４５０ｋアレイにおいて検出されたＣｐＧを表す。矢印はＰＣＲプライマーの位置を示す。
【図１０Ｂ】ＲＥＧ１Ａ遺伝子近傍のＣｐＧクラスターのメチル化。Ｉｌｌｕｍｉｎａ　４５０ｋアレイ中に捕捉されたＲＥＧ１Ａ遺伝子座における、個々のＣｐＧ部位のメチル化状態。データは公表されている４５０ｋアレイのものである。
【図１０Ｃ】ＲＥＧ１Ａ遺伝子近傍のＣｐＧクラスターのメチル化。ディープシーケンシングにより決定された、複数の組織におけるＲＥＧ１Ａ遺伝子座に由来する個々のＣｐＧ部位および複数のＣｐＧを含む拡張ウィンドウのメチル化状態。
【図１０Ｄ】ＲＥＧ１Ａ遺伝子近傍のＣｐＧクラスターのメチル化。健康な対照および膵臓がんを発症した患者の血漿中のＲＥＧ１Ａ遺伝子座に由来する個々のＣｐＧ部位のメチ

ル化。
【図１０Ｅ】ＲＥＧ１Ａ遺伝子近傍のＣｐＧクラスターのメチル化。健康なボランティアおよび膵臓がんを発症した患者（パネルＤと同じ患者）の血漿中の完全に非メチル化されたＲＥＧ１Ａ断片画分。
【図１１Ａ】ＣＵＸ２遺伝子近傍のＣｐＧクラスターのメチル化。マーカーとして用いたＣＵＸ２断片の構造。ロリポップ型はＣｐＧを表す。空のロリポップ型はＩｌｌｕｍｉｎａ　４５０ｋアレイにおいて検出されたＣｐＧを表す。矢印はＰＣＲプライマーの位置を示す。
【図１１Ｂ】ＣＵＸ２遺伝子近傍のＣｐＧクラスターのメチル化。Ｉｌｌｕｍｉｎａ　４５０ｋアレイ中に捕捉されたＣＵＸ２遺伝子座における、個々のＣｐＧ部位のメチル化状態。データは、公表されている４５０ｋアレイのものである。
【図１１Ｃ】ＣＵＸ２遺伝子近傍のＣｐＧクラスターのメチル化。ディープシーケンシングにより決定された、複数の組織における、ＣＵＸ２遺伝子座に由来する個々のＣｐＧ部位および複数のＣｐＧを含む拡張ウィンドウのメチル化状態。
【図１１Ｄ】ＣＵＸ２遺伝子近傍のＣｐＧクラスターのメチル化。健康な対照および膵臓がんを発症した患者の血漿中のＣＵＸ２遺伝子座に由来する、個々のＣｐＧ部位のメチル化。
【図１１Ｅ】ＣＵＸ２遺伝子近傍のＣｐＧクラスターのメチル化。健康なボランティアおよび膵臓がんを発症した患者（パネルＤと同じ患者）の血漿中の完全に非メチル化されたＣＵＸ２断片画分。
【図１２】複数のＡＬＳ患者の血漿中の脳ＤＮＡ断片の存在を例示するグラフである。
【図１３】ＡＬＳ患者の血漿中のオリゴデンドロサイトＤＮＡ（ＭＢＰ；配列番号１２４８）および白質ＤＮＡ（ＷＭ１；配列番号１２４７）の存在（ｎｇ／ｍＬ血清）を例示するグラフである。
【図１４Ａ】結腸上皮細胞用メチル化マーカーを例示するグラフ。配列番号１２５８に含まれる配列。
【図１４Ｂ】結腸上皮細胞用メチル化マーカーを例示するグラフ。配列番号１２５９に含まれる配列。
【図１４Ｃ】結腸上皮細胞用メチル化マーカーを例示するグラフ。配列番号１２６０に含まれる配列。
【図１４Ｄ】結腸上皮細胞用メチル化マーカーを例示するグラフ。配列番号１２５７に含まれる配列。
【図１５】健康な対象の血液中には結腸ＤＮＡ断片が存在しないが（内腔への正常なターンオーバー）、結腸がんおよびクローン病を発症した患者の血液中には結腸ＤＮＡが存在することを例示するグラフ。
【図１６】非メチル化ＳＦＴＰ／Ａ１（配列番号１２６８に含まれる配列）の組織分布、即ち、様々な組織における肺マーカー、を例示するグラフである。
【図１７】非メチル化ＳＦＴＰ／Ｃ（配列番号１２７３に含まれる配列）の組織分布、即ち、様々な組織における肺マーカー、を例示するグラフである。
【図１８】非メチル化ＣＨＳＴ（配列番号１２７２に含まれる配列）の組織分布、即ち、様々な組織における肺マーカー、を例示するグラフである。
【図１９】非メチル化ＲＡＢ４（配列番号１２７１に含まれる配列）の組織分布、即ち、様々な組織における肺マーカー、を例示するグラフである。
【図２０】筋肉では非メチル化され、他の場所ではメチル化されている、３種の骨格筋マーカー（配列番号１２７８に含まれる配列であるＴＮＮＩ２、配列番号１２７７に含まれる配列であるＴＰＯ、および配列番号１２７６に含まれる配列であるＭＡＤ１Ｌ１）の組織分布を例示するグラフ。
【図２１】集中運動後の健康な個体の血漿およびデュシェンヌ型またはベッカー型筋ジストロフィーを発症した患者における、骨格筋由来ＤＮＡレベルを例示するグラフ。
【図２２】血管内皮細胞のメチル化マーカー（ＤＣＵＮ１Ｄ２遺伝子の配列番号１２６１

に記載の配列に含まれるマーカー）の存在を例示するグラフ。
【図２３】肝細胞のメチル化マーカー（ＡＬＢ遺伝子の配列番号１２６７に記載の配列に含まれるマーカー）の存在を例示するグラフ。
【図２４】リンパ球のメチル化マーカー（ＰＴＰＲＣＡＰ遺伝子の配列番号１２７５に記載の配列、およびＡＧＡＰ２遺伝子の配列番号１２７４に記載の配列に含まれるマーカー）の存在を例示するグラフ。
【図２５】腎臓のメチル化マーカー（ＡＱＰ２遺伝子の配列番号１２６６に記載の配列に含まれるマーカー）の存在を例示するグラフ。
【図２６】脂肪細胞のメチル化マーカー（ＡＣＯＴ７遺伝子の配列番号１２６２に記載の配列、ＣＯＬ４Ａ１遺伝子の配列番号１２６３に記載の配列、ＦＲＭＤ４Ａ遺伝子の配列番号１２６４に記載の配列、ＮＮＭＴ遺伝子の配列番号１２６５に記載の配列に含まれるマーカー）の存在を例示するグラフ。
【図２７】健康な個体の循環中の脂肪細胞由来ＤＮＡを例示するグラフ（Ｃは対照である）。
【発明を実施するための形態】
【００５５】
本発明は、いくつかの実施形態においては、無細胞ＤＮＡの由来を決定するための方法、ならびに細胞死と関連する病理学的プロセスの診断、細胞死の変化を意図した薬物などの治療レジメのモニタリング、および細胞死レベルに影響するプロセスの臨床および研究目的での検討のためのその使用に関する。
【００５６】
本発明の少なくとも１つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明が、その適用において、以下の説明に記載されるか、または実施例によって例示される詳細に必ずしも限定されるものではないことを理解されたい。本発明は、他の実施形態を可能にし、また、様々な方法で実施もしくは実行することも可能である。
【００５７】
循環ＤＮＡの分析は、出生前診断、腫瘍診断および移植片拒絶のモニタリングを一新し始めている。しかしながら、全ての適用の主要な限界は、目的の組織と宿主との間の同定可能な遺伝的差異の存在への依存性である。本発明者らは、この限界を克服しうる、無細胞循環ＤＮＡの組織起源を検出するための新規手法を想到した。
【００５８】
本発明者らは、ヒト身体の実質的に全ての組織における細胞死を非侵襲的に検出するための確固たる手段を提供するために、循環ＤＮＡ断片中に存在する組織特異的メチル化パターン（４箇所以上のメチル化部位を含む）の分析を提唱する。本発明の方法は、他の手法と比較して、劇的にノイズ（健康な個体におけるシグナルのレベル）が低下しており、これは臨床応用を想定することができる程度である。
【００５９】
本発明を実施に移しながら、本発明者らは、そのようなメチル化パターンの分析に基づいて特定の病理における特定のヒト組織に由来する循環血漿ＤＮＡを検出した。例として、１型糖尿病における循環膵臓ベータ細胞ＤＮＡ（図１Ａ～Ｄ）、膵管腺がんおよび膵炎における膵臓外分泌腺ＤＮＡ（図４Ａ～Ｃ）、外傷性脳傷害または虚血性傷害後の脳ＤＮＡ（図３Ａ～Ｄ）、再発性多発性硬化症を発症した患者におけるオリゴデンドロサイトＤＮＡ（図２Ａ～Ｃ）ならびにＡＬＳを発症した患者におけるオリゴデンドロサイトＤＮＡおよび白質ＤＮＡ（図１２および１３）の検出が挙げられる。さらに、本発明者らは、結腸がんおよびクローン病患者の血液中の結腸ＤＮＡ、運動後の健康な個体の血液中の骨格筋ＤＮＡ、健康な個体の血液中の脂肪細胞ＤＮＡ、がん患者の血液中の内皮細胞ＤＮＡならびに多形成グリア芽細胞腫を発症した患者の血液中のオリゴデンドロサイトＤＮＡを検出した。
【００６０】
この手法は、侵襲性が最少であるが、高感度かつ特異的な様式で、正常および病的なヒ

ト組織における急性細胞死の検出を可能にする。この手法の潜在的な有用性は、非常に広い。正常な生理学的研究において、この方法を用いて、食事の変化、妊娠および加齢などの、発生途中および生理学的混乱期の組織力学をモニタリングすることができる。限定されるものではないが、がん、外傷、感染症および自己免疫疾患などの様々な病理において、当該方法を、早期診断、疾患進行のモニタリングおよび療法に対する応答の評価のために用いることができる。新規薬物開発の分野においては、当該方法を、有効性または毒性のシグナルを同定するために適合させ、薬物開発の長く高価なプロセスを潜在的に効率化することができる。

【００６１】

かくして、本発明の一態様によれば、目的の細胞に固有のメチル化を同定するための方法であって、目的の細胞のＤＮＡ中から、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を同定することを含み、各メチル化部位は、第２の非同一の細胞とは異なる様式でメチル化されており、連続配列の同定によって、目的の細胞に固有のメチル化を同定する方法が提供される。

【００６２】

本発明は、任意の目的細胞に固有のメチル化を同定することを企図し、目的細胞としては、膵臓細胞（膵臓ベータ細胞、膵臓外分泌腺細胞（例えば、腺房細胞））、脳細胞、オリゴデンドロサイト、心臓細胞（心筋細胞）、肝臓細胞（肝細胞）、腎臓細胞、血管内皮細胞、リンパ球、肺細胞、子宮細胞、乳房細胞、脂肪細胞、結腸細胞、直腸細胞、前立腺細胞、甲状腺細胞および骨格筋細胞などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【００６３】

本明細書で用いられる用語「メチル化部位」とは、グアニン残基に隣接するシトシン残基（ＣｐＧ部位）であって、メチル化されうるものを指す。

【００６４】

連続配列は、好ましくは、３００ヌクレオチド、２９５ヌクレオチド、２９０ヌクレオチド、２８５ヌクレオチド、２８０ヌクレオチド、２７５ヌクレオチド、２７０ヌクレオチド、２６５ヌクレオチド、２６０ヌクレオチド、２５５ヌクレオチド、２５０ヌクレオチド、２４５ヌクレオチド、２４０ヌクレオチド、２３５ヌクレオチド、２３０ヌクレオチド、２２５ヌクレオチド、２２０ヌクレオチド、２１５ヌクレオチド、２１０ヌクレオチド、２０５ヌクレオチド、２００ヌクレオチド、１９５ヌクレオチド、１９０ヌクレオチド、１８５ヌクレオチド、１８０ヌクレオチド、１７５ヌクレオチド、１７０ヌクレオチド、１６５ヌクレオチド、１６０ヌクレオチド、１５５ヌクレオチド、１５０ヌクレオチド、１４５ヌクレオチド、１４０ヌクレオチド、１３５ヌクレオチド、１３０ヌクレオチド、１２５ヌクレオチド、１２０ヌクレオチド、１１５ヌクレオチド、１１０ヌクレオチド、１０５ヌクレオチド、１００ヌクレオチド、９５ヌクレオチド、９０ヌクレオチド、８５ヌクレオチド、８０ヌクレオチド、７５ヌクレオチド、７０ヌクレオチド、６５ヌクレオチド、６０ヌクレオチド、５５ヌクレオチド、または５０ヌクレオチド以下である。

【００６５】

特定の実施形態によれば、配列のヌクレオチド数は、５０～３００、例えば、５０～２５０、５０～２００、１００～３００、または１００～２５０である。

【００６６】

配列は、コード領域または非コード領域のものでもよい。

【００６７】

特定の実施形態によれば、配列は、目的の細胞中で異なる様式で発現する遺伝子に由来するものではない。かくして、例えば、膵臓ベータ細胞のメチル化パターンを同定する場合、ＤＮＡ配列は、インスリンまたは別の膵臓ベータ細胞タンパク質をコードする遺伝子の一部でなくてもよい。

【００６８】

別の特定の実施形態によれば、メチル化パターンは、目的の正常細胞を特徴付けるものであり、疾患細胞を特徴付けるメチル化パターンではない（例えば、特定の型のがん細胞を特徴付けるメチル化パターンではない）。

【００６９】

連続する核酸配列は、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むが、少なくとも５箇所、少なくとも６箇所、少なくとも７箇所、少なくとも８箇所、少なくとも９箇所またはさらには少なくとも１０箇所、またはそれ以上のメチル化部位も企図される。

【００７０】

目的とする特定細胞に固有のメチル化として考慮するためには、少なくとも４箇所のメチル化部位はそれぞれ、第２の非同一細胞とは異なる様式で、目的細胞においてメチル化されている必要がある。

【００７１】

特定の実施形態によれば、少なくとも４箇所のメチル化部位はそれぞれ、目的の細胞（メチル化パターンが決定される細胞）中では非メチル化されているが、第２の非同一細胞中では、当該部位はそれぞれがメチル化されている。

【００７２】

別の実施形態によれば、少なくとも４箇所のメチル化部位はそれぞれ、目的の細胞中ではメチル化されているが、第２の非同一細胞中では、当該部位はそれぞれ非メチル化されている。

【００７３】

別の実施形態によれば、４箇所のメチル化部位の少なくとも１種は、目的の細胞中では非メチル化されているが、第２の非同一細胞中では、その部位はメチル化されている。

【００７４】

別の実施形態によれば、４箇所のメチル化部位の少なくとも２種は、目的の細胞中では非メチル化されているが、第２の非同一細胞中では、これらの部位はメチル化されている。

【００７５】

別の実施形態によれば、４箇所のメチル化部位の少なくとも３種は、目的の細胞中では非メチル化されているが、第２の非同一細胞中では、これらの部位はメチル化されている。

【００７６】

第２の非同一細胞は、例えば、血液細胞などの任意の由来のものでよい。

【００７７】

この方法を用いて、本発明者らは、膵臓ベータ細胞、腺房細胞、脳細胞、ニューロン、オリゴデンドロサイト、心筋細胞、肝細胞、腎臓細胞および骨格筋細胞に由来するＤＮＡに固有のメチル化を同定し、同定した特徴が、これらの細胞に由来するＤＮＡと血液細胞に由来するＤＮＡとを上手く識別することができることを示した。

【００７８】

かくして、本発明の別の態様によれば、ＤＮＡが、試料中の目的の細胞由来であるか否かを決定するための方法であって、

ＤＮＡ中の連続配列上の少なくとも４箇所のメチル化部位のメチル化状態を確認することを含み、配列はヌクレオチド数３００以下であり、細胞に特徴的なＤＮＡの連続配列上の少なくとも４箇所のメチル化部位のそれぞれのメチル化状態を、目的の細胞由来であることの指標とする方法が提供される。

【００７９】

当該方法は、分析される配列が特定の細胞／組織型に特異的であるため、研究対象のＤＮＡが特定の細胞型または組織型に由来するか否かの検査に適切であることが理解される。

【００８０】

かくして、例えば、研究者が、試料中に存在するＤＮＡが膵臓ベータ細胞に由来するか

否かの決定を望む場合、研究者は膵臓ベータ細胞に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。

【００８１】

そのような配列は、例えば、配列番号１～５０および配列番号１２４１～１２４４に記載の配列中に含まれる。

【００８２】

配列番号１～２７および配列番号１２４１～１２４４は、膵臓ベータ細胞中では非メチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、膵臓ベータ細胞中では非メチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。

【００８３】

配列番号２８～５０は、膵臓ベータ細胞中ではメチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、膵臓ベータ細胞中ではメチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている。

【００８４】

研究者が、試料中に存在するＤＮＡが膵管細胞に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は膵管細胞に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。

【００８５】

そのような配列は、例えば、配列番号５１～１５０に記載の配列中に含まれる。

【００８６】

配列番号５１～１００は、膵管細胞中では非メチル化され、他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、膵管細胞中では非メチル化され、他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。

【００８７】

配列番号１０１～１５０は、膵管細胞中ではメチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、膵管細胞中ではメチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている。

【００８８】

研究者が、試料中に存在するＤＮＡが肝臓細胞に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は肝臓細胞に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。

【００８９】

そのような配列は、例えば、配列番号１５１～１９７および配列番号１２６７に記載の配列中に含まれる。

【００９０】

配列番号１５１～１７３および配列番号１２６７は、肝臓細胞中では非メチル化され、他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、肝臓細胞中では非メチル化され、他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。

【００９１】
配列番号１７４～１９７は、肝臓細胞中ではメチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、肝臓細胞中ではメチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている。
【００９２】
研究者が、試料中に存在するＤＮＡが肺組織に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は肺細胞に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。
【００９３】
そのような配列は、例えば、配列番号１９８～２０３および配列１２６８～１２７３に含まれる。
【００９４】
配列番号１９８～２００および配列番号１２６８～１２７３は、肺細胞中では非メチル化され、他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、肺細胞中では非メチル化され、他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。
【００９５】
配列番号２０１～２０３は、肺細胞中ではメチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、肺細胞中ではメチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている。
【００９６】
研究者が、試料中に存在するＤＮＡが子宮組織に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は子宮細胞に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。
【００９７】
そのような配列は、例えば、配列番号２０４～２３７に含まれる。
【００９８】
配列番号２０４～２２７は、子宮細胞中では非メチル化され、他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、子宮細胞中では非メチル化され、他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。
【００９９】
配列番号２２８～２３７は、子宮細胞中ではメチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、子宮細胞中ではメチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている。
【０１００】
研究者が、試料中に存在するＤＮＡが腎臓細胞に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は腎臓細胞に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。
【０１０１】

そのような配列は、例えば、配列２３８～２７３および配列１２６６に含まれる。

【０１０２】

配列番号２３８～２５４および配列番号１２６６は、腎臓細胞中では非メチル化され、他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、腎臓細胞中では非メチル化され、他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。

【０１０３】

配列番号２５５～２７３は、腎臓細胞中ではメチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、腎臓細胞中ではメチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている。

【０１０４】

研究者が、試料中に存在するＤＮＡが乳房組織に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は乳房細胞に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。

【０１０５】

そのような配列は、例えば、配列番号２７４～２９０に含まれる。

【０１０６】

配列番号２７４～２７７は、乳房組織中では非メチル化され、非乳房組織の他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、乳房細胞中では非メチル化され、非乳房組織の他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。

【０１０７】

配列番号２７８～２９０は、乳房組織中ではメチル化されており、非乳房組織の他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、乳房組織中ではメチル化されており、非乳房組織の他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている。

【０１０８】

研究者が、試料中に存在するＤＮＡが脂肪細胞に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は脂肪細胞に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。

【０１０９】

そのような配列は、例えば、配列番号２９１～３３８および配列番号１２６２～１２６５に記載の配列中に含まれる。

【０１１０】

配列番号２９１～３３７および配列番号１２６２～１２６５は、脂肪細胞中では非メチル化され、他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、脂肪細胞中では非メチル化され、他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。

【０１１１】

配列番号３３８は、脂肪細胞中ではメチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数

３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、脂肪細胞中ではメチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている。

【０１１２】

研究者が、試料中に存在するＤＮＡが結腸組織に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は結腸組織に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。

【０１１３】

そのような配列は、例えば、配列番号３３９～３７７および配列番号１２５７～１２６０に記載の配列中に含まれる。

【０１１４】

配列番号３３９～３５１および配列番号１２５７～１２６０は、結腸組織の細胞中では非メチル化され、非結腸組織の他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、結腸細胞中では非メチル化され、非結腸組織の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。

【０１１５】

配列番号３５２～３７７は、結腸組織中ではメチル化されており、非結腸組織の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、結腸組織中ではメチル化されており、非結腸組織の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている。

【０１１６】

研究者が、試料中に存在するＤＮＡが前立腺組織細胞に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は前立腺組織細胞に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。

【０１１７】

そのような配列は、例えば、配列番号３７８～４４３に含まれる。

【０１１８】

配列番号３７８～４０９は、前立腺組織中では非メチル化され、非前立腺組織の他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、前立腺細胞中では非メチル化され、非前立腺組織の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。

【０１１９】

配列番号４１０～４４３は、前立腺組織中ではメチル化されており、非前立腺組織の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、前立腺組織中ではメチル化されており、非前立腺組織の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている。

【０１２０】

研究者が、試料中に存在するＤＮＡが甲状腺組織細胞に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は甲状腺組織細胞に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。

【０１２１】

そのような配列は、例えば、配列番号４４４～５０１に含まれる。

【０１２２】
配列番号４４４～４５５は、甲状腺組織中では非メチル化され、非甲状腺組織の他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、甲状腺細胞中では非メチル化され、非甲状腺組織の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。
【０１２３】
配列番号４５６～５０１は、甲状腺組織中ではメチル化されており、非甲状腺組織の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、甲状腺組織中ではメチル化されており、非甲状腺組織の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている。
【０１２４】
研究者が、試料中に存在するＤＮＡが膀胱組織細胞に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は膀胱組織細胞に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。
【０１２５】
そのような配列は、例えば、配列番号５０２～５０９に含まれる。
【０１２６】
配列番号５０２～５０６は、膀胱組織中では非メチル化され、非膀胱組織の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、膀胱細胞中では非メチル化され、非膀胱組織の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。
【０１２７】
配列番号５０７～５０９は、膀胱組織中ではメチル化されており、非膀胱組織の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、膀胱組織中ではメチル化されており、非膀胱組織の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている。
【０１２８】
研究者が、試料中に存在するＤＮＡが膵島に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は膵島に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。
【０１２９】
そのような配列は、例えば、配列番号５１０～７４６に含まれる。
【０１３０】
配列番号５１０～６５０は、膵島中では非メチル化され、非膵島組織の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、膵島中では非メチル化され、非膵島組織の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。
【０１３１】
配列番号６５１～７４６は、膵島中ではメチル化されており、非膵島組織の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これ

らの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、膵島中ではメチル化されており、非膵島組織の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている。

【０１３２】

研究者が、試料中に存在するＤＮＡが骨格筋に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は骨格筋に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。

【０１３３】

そのような配列は、例えば、配列番号７４７～８１７および配列１２７６～１２７９に含まれる。

【０１３４】

配列番号７４７～７６７および配列番号１２７６～１２７９は、骨格筋中では非メチル化され、非骨格筋の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、骨格筋中では非メチル化され、非骨格筋組織の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。

【０１３５】

配列番号７６８～８１７は、骨格筋中ではメチル化されており、非骨格筋組織の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、膵島中ではメチル化されており、非骨格筋組織の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている。

【０１３６】

研究者が、試料中に存在するＤＮＡが膵臓組織に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は膵臓細胞に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。

【０１３７】

そのような配列は、例えば、配列番号８１８～８６３および配列１２８０～１２８４に含まれる。

【０１３８】

配列番号８１８～８３５および配列番号１２８０～１２８４は、膵臓組織中では非メチル化され、非膵臓組織の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、膵臓組織中では非メチル化され、非膵臓組織の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。

【０１３９】

配列番号８３６～８６３は、膵臓中ではメチル化されており、非膵臓組織の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、膵臓組織中ではメチル化されており、非膵臓組織の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている。

【０１４０】

研究者が、試料中に存在するＤＮＡが脳白質組織に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は脳白質組織に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。

【０１４１】

そのような配列は、例えば、配列番号８６４～１０１２に含まれる。

【０１４２】

配列番号８６４～９６３は、脳白質組織中では非メチル化され、非脳白質組織の細胞（

例えば、血液細胞）中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、白質組織中では非メチル化され、非白質組織の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。

【０１４３】

配列番号９６４～１０１２は、白質組織中ではメチル化されており、非白質組織の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、白質組織中ではメチル化されており、非白質組織の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている。

【０１４４】

研究者が、試料中に存在するＤＮＡが血液細胞に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は血液細胞に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。

【０１４５】

そのような配列は、例えば、配列番号１０１３～１１３７および配列１２７４～１２７５に含まれる。

【０１４６】

配列番号１０１３～１１１２および配列番号１２７４～１２７５は、血液細胞中では非メチル化され、非血液細胞中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、血液細胞中では非メチル化され、非血液細胞中ではメチル化されている。

【０１４７】

配列番号１１１３～１１３７は、血液細胞中ではメチル化されており、非血液細胞中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、血液細胞中ではメチル化されており、非血液細胞中では非メチル化されている。

【０１４８】

研究者が、試料中に存在するＤＮＡが頸部組織に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は頸部細胞に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。

【０１４９】

そのような配列は、例えば、配列番号１１３８～１２１６に含まれる。

【０１５０】

配列番号１１３８～１１７３は、頸部組織細胞中では非メチル化され、非頸部組織細胞中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、頸部細胞中では非メチル化され、非頸部組織細胞中ではメチル化されている。

【０１５１】

配列番号１１７４～１２１６は、頸部組織細胞中ではメチル化されており、非頸部組織細胞中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、頸部組織細胞中ではメチル化されており、非頸部組織細胞中では非メチル化されている。

【０１５２】

研究者が、試料中に存在するＤＮＡが網膜組織に由来するか否かの決定を望む場合、研

究者は網膜細胞に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。

【０１５３】

そのような配列は、例えば、配列番号１２１７～１２４０に含まれる。

【０１５４】

配列番号１２１７～１２４０は、網膜組織細胞中では非メチル化され、非網膜組織細胞中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、網膜細胞中では非メチル化され、非網膜組織細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。

【０１５５】

研究者が、試料中に存在するＤＮＡが脳組織に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は脳組織細胞に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。

【０１５６】

そのような配列は、例えば、配列番号１２８５～１３６４および配列１２４５～１２５６に含まれる。

【０１５７】

配列番号１２４５～１２５６および配列番号１２８５～１３１６は、脳組織細胞中では非メチル化され、非脳組織細胞中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、脳細胞中では非メチル化され、非脳組織細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。

【０１５８】

配列番号１３１７～１３６４は、脳組織細胞中ではメチル化されており、非脳組織細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、脳組織細胞中ではメチル化されており、非脳組織細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている。

【０１５９】

研究者が、試料中に存在するＤＮＡが直腸組織に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は直腸組織細胞に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。

【０１６０】

そのような配列は、例えば、配列番号１３６５～１３８５に記載の配列中に含まれる。

【０１６１】

配列番号１３６５～１３７３は、直腸組織細胞中では非メチル化され、他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、直腸組織細胞中では非メチル化され、他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。

【０１６２】

配列番号１３７４～１３８５は、直腸組織細胞中ではメチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、直腸組織細胞中ではメチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている。

【０１６３】

研究者が、試料中に存在するＤＮＡが心臓組織に由来するか否かの決定を望む場合、研究者は心臓組織細胞に特徴的なメチル化パターンを有する配列を分析する必要がある。

【０１６４】

そのような配列は、例えば、配列番号１３８６～１４８４に記載の配列中に含まれる。

【０１６５】

配列番号１３８６～１４３５は、心臓組織細胞中では非メチル化され、他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、心臓組織細胞中では非メチル化され、他の細胞（例えば、血液細胞）中ではメチル化されている。

【０１６６】

配列番号１４３６～１４８４は、心臓組織細胞中ではメチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むヌクレオチド数３００以下の連続配列を含む。特定の実施形態によれば、連続配列は、これらの配列のそれぞれの２５０位および２５１位に位置するヌクレオチドＣＧを含む。このＣＧは、心臓組織細胞中ではメチル化されており、他の細胞（例えば、血液細胞）中では非メチル化されている。

【０１６７】

本発明者らによって、ＤＮＡの由来となる細胞を決定するための候補として同定された配列は、データベース上に保存することができる。例示的な配列としては、配列番号１～１４８４に記載のものなどの、上記のものが挙げられる。

【０１６８】

データベースは、由来となる特定の細胞型または組織の同定に関連する配列ごとに分けることができる。これに加えて、またはその代替として、データベースを、その非メチル化が由来となる特定の細胞型／組織の指標となる配列と、そのメチル化が由来となる特定の細胞型／組織の指標となる配列とに分けることができる。

【０１６９】

データベースは、試験された対象における配列のメチル化状態を含んでいてもよい。対象を、健常者または罹患者として分類することができる。

【０１７０】

データベースは、コンピュータで読取り可能な媒体上にコンピュータで読取り可能な形式で保存することができ、場合により、好ましくは、一般的な目的のコンピュータまたは専用回線などのデータプロセッサによりアクセスされる。

【０１７１】

分析することができる試料は、一般に、哺乳動物である対象に由来する体液試料であり、例えば、血液、血漿、精子、ミルク、尿、唾液または脳脊髄液が挙げられる。

【０１７２】

分析される試料は、典型的には、更に後述するように、少なくとも２種の由来となる細胞／組織に由来するＤＮＡを含む。

【０１７３】

一実施形態によれば、血液の試料は、当業界で周知の方法にしたがって対象から得られる。血漿または血清は、当業界で公知の方法にしたがって単離することができる。

【０１７４】

ＤＮＡは、血液から直ちに、または１時間、２時間、３時間、４時間、５時間もしくは６時間以内に単離することができる。場合により、血液は、ＤＮＡの単離前に４℃または－２０℃などの温度で保存される。いくつかの実施形態においては、血液試料の一部は、初期に本発明にしたがって用いられるが、血液試料（またはその画分）の１または複数の残部は、後期の使用のために一定期間保存される。

【０１７５】

一実施形態によれば、ＤＮＡは細胞性ＤＮＡ（すなわち、細胞中に含まれるもの）である。

【０１７６】

さらに別の実施形態によれば、ＤＮＡは脱落した細胞中または無傷でない細胞中に含まれる。

【０１７７】

ＤＮＡ抽出の方法は、当業界で周知である。古典的なＤＮＡ単離プロトコールは、フェノールとクロロホルムとの混合物などの有機溶媒を用いる抽出と、それに続く、エタノールを用いる沈降に基づく（非特許文献５）。他の方法としては、塩析ＤＮＡ抽出（非特許文献６、非特許文献７）、トリメチルアンモニウムブロミド塩ＤＮＡ抽出（非特許文献８）およびグアニジニウムチオシアネートＤＮＡ抽出（非特許文献９）が挙げられる。

【０１７８】

また、組織および体液からＤＮＡを抽出するために用いることができる多用途のキットが市販されており、例えば、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｃｌｏｎｔｅｃｈ（カリフォルニア州、パロアルト）、Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（ウイスコンシン州、マディソン）、Ｇｅｎｔｒａ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．（ミネソタ州、ミネアポリス）、ＭｉｃｒｏＰｒｏｂｅ Ｃｏｒｐ．（ワシントン州、ボスウェル）、Ｏｒｇａｎｏｎ Ｔｅｋｎｉｋａ（ノースカロライナ州、ダーハム）、および Ｑｉａｇｅｎ Ｉｎｃ．（カリフォルニア州、バレンシア）が挙げられる。これらキットには、通常、実施すべきプロトコールを非常に詳細に説明したユーザーガイドが含まれる。感度、作業時間および費用は、キット間で異なってもよい。当業者であれば、特定の状況にとって最適なキットを容易に選択することができる。

【０１７９】

別の実施形態によれば、ＤＮＡは無細胞ＤＮＡである。この方法においては、試料に対して細胞溶解は実施しない。体液から無細胞ＤＮＡを単離する方法も当業界で公知である。例えば、Ｑｉａｇｅｎ社の製造するＱｉａｑｕｉｃｋキットを用いて、血漿または血清から無細胞ＤＮＡを抽出することができる。

【０１８０】

当該方法を実行する前に、試料を処理することもでき、例えば、ＤＮＡ精製を、抽出手順の後に実行することができる。試料中のＤＮＡを、物理的または化学的に（例えば、好適な酵素を用いて）開裂することができる。試料の処理は、次の少なくとも１種を含んでもよい：濾過、蒸留、遠心分離、抽出、濃縮、希釈、精製、干渉成分の不活化、試薬の添加など。

【０１８１】

本発明は１種超の標的配列（それぞれ、ＤＮＡの連続配列上に少なくとも４箇所のメチル化部位を含むもの）を分析することを企図することを理解されたい。かくして、例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれ以上の（組織または細胞特異的マーカーとして働く）標的配列を分析することができる。これは、同じＤＮＡ調製物を用いて同時に、または複数のＤＮＡ調製物を用いて行うことができる。

【０１８２】

メチル化部位のメチル化状態を決定する方法は、当業界で公知であり、亜硫酸水素塩（バイサルファイト）の使用が挙げられる。

【０１８３】

この方法において、シトシン残基をウラシルに変換する（ＰＣＲ後にチミジンに変換される）が、５－メチルシトシン残基には影響しないバイサルファイトでＤＮＡを処理する。かくして、バイサルファイト処理は、個々のシトシン残基のメチル化状態に依存する特異的変化をＤＮＡ配列中に導入し、ＤＮＡセグメントのメチル化状態に関する一塩基解像度の情報をもたらす。様々な分析を、変化した配列に対して実施して、この情報を得ることができる。したがって、この分析の目的は、バイサルファイト変換の結果生じる、一塩基多型（シトシンおよびチミジン）による区別に要約される。

【０１８４】
バイサルファイト反応の際には、ＤＮＡの分解を最小化するために、インキュベーション温度のサイクルなどに注意を払うべきである。
【０１８５】
バイサルファイトシーケンシングは、全ての単一の非メチル化シトシン残基のウラシルへの変換に依拠する。変換が不完全な場合、その後の分析で、変換されていない非メチル化シトシンを、メチル化されたシトシンとする誤った解釈となり、メチル化に関して偽陽性の結果をもたらす。一本鎖ＤＮＡ中のシトシンのみが、バイサルファイトによる攻撃を受けやすく、したがって、分析に付されるＤＮＡの変性が重要である。温度や塩濃度などの反応パラメータが、一本鎖のコンフォメーションにＤＮＡを維持し、完全な変換を可能にするのに好適となることを確実にすることが重要である。
【０１８６】
特定の実施形態によれば、酸化的バイサルファイト反応が実施される。５－メチルシトシンと５－ヒドロキシメチルシトシンは両方が、バイサルファイトシーケンシングにおいてはＣとして読まれる。酸化的バイサルファイト反応は、一塩基解像度で５－メチルシトシンと５－ヒドロキシメチルシトシンとの識別を可能にする。当該方法は、５－ヒドロキシメチルシトシンの５－ホルミルシトシンへの特異的化学的酸化を使用し、続いて、バイサルファイト処理中にウラシルに変換する。その後、Ｃとして読まれる唯一の塩基は５－メチルシトシンであり、ＤＮＡ試料中の真のメチル化状態のマップを与える。５－ヒドロキシメチルシトシンのレベルは、バイサルファイトシーケンシングと酸化的バイサルファイトシーケンシングとの差異を測定することにより定量することもできる。
【０１８７】
分析の前に（またはそれと同時に）、少なくとも４箇所のメチル化部位を含むバイサルファイト処理ＤＮＡ配列を、増幅反応に付すことができる。配列の増幅が必要とされる場合、ピリミジン残基の完全な脱スルホン化を達成するために注意を払うべきである。これは、溶液のｐＨをモニタリングし、脱スルホン化の完了を確実にすることで達成される。
【０１８８】
本明細書で用いられる用語「増幅」とは、所望の配列の複数（すなわち、少なくとも２）コピーを生成することにより、試料中の特定の核酸配列集団の表示量を増加させるプロセスを指す。核酸増幅のための方法は、当業界で公知であり、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）およびリガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。典型的なＰＣＲ増幅反応においては、目的の核酸配列は、出発試料中のその量に対して、少なくとも５００００倍に増幅されることが多い。「コピー」または「アンプリコン」は、鋳型配列との完全な配列相補性または同一性を必ずしも意味しない。例えば、コピーは、デオキシイノシンなどのヌクレオチド類似体、意図的な配列変化（鋳型とハイブリダイズ可能であるが、相補的ではない配列を含むプライマーにより導入される配列変化など）、および／または増幅中に生じるＡを含んでもよい。
【０１８９】
典型的な増幅反応は、試料ＤＮＡに対するフォワードプライマーおよびリバースプライマー（プライマー対）を、標的配列の増幅を可能にする条件下で、任意のさらなる増幅反応試薬と接触させることにより実行される。
【０１９０】
用語「フォワードプライマー」と「フォワード増幅プライマー」は、本明細書では互換的に用いられ、標的（鋳型鎖）にハイブリダイズする（またはアニーリングする）プライマーを指す。用語「リバースプライマー」と「リバース増幅プライマー」は、本明細書では互換的に用いられ、相補的標的鎖にハイブリダイズする（またはアニーリングする）プライマーを指す。フォワードプライマーは標的配列とハイブリダイズし、５’側はリバースプライマーである。
【０１９１】
本明細書で用いられる用語「増幅条件」とは、プライマー配列のアニーリングおよび／

または伸長を促進する条件を指す。そのような条件は、当業界で周知であり、選択される増幅方法に依存する。かくして、例えば、ＰＣＲ反応においては、増幅条件は一般に、熱サイクリング、すなわち、２つ以上の温度間での反応混合物のサイクリングを含む。等温増幅反応においては、増幅は熱サイクリングなしでも起こるが、反応を開始させるためには初期の温度上昇が必要であり得る。増幅条件は、温度および温度サイクリング、バッファー、塩、イオン強度、およびｐＨなどの全ての反応条件を包含するが、これらに限定されるものではない。

【０１９２】

本明細書で用いられる用語「増幅反応試薬」とは、核酸増幅反応において用いられる試薬を指し、バッファー、試薬、逆転写酵素および／もしくはポリメラーゼ活性またはエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素、マグネシウムまたはマンガンなどの酵素補因子、塩、ニコチンアミドアデニンジヌクレアーゼ（ＮＡＤ）ならびにデオキシアデノシン三リン酸、デオキシグアノシン三リン酸、デオキシシチジン三リン酸およびチミジン三リン酸などのデオキシヌクレオシド三リン酸（ｄＮＴＰ）を含んでもよいが、これらに限定されるものではない。当業者であれば、増幅反応試薬を、用いられる増幅方法に応じて容易に選択することができる。

【０１９３】

本発明のこの態様によれば、増幅は、対立遺伝子特異的ＰＣＲ、アセンブリＰＣＲまたはポリメラーゼサイクリングアセンブリ（ＰＣＡ）、非対称性ＰＣＲ、ヘリカーゼ依存的増幅、ホットスタートＰＣＲ、配列間特異的ＰＣＲ（ＩＳＳＲ）、インバースＰＣＲ、ライゲーション媒介性ＰＣＲ、メチル化特異的ＰＣＲ（ＭＳＰ）、ミニプライマーＰＣＲ、多重ライゲーション依存的プローブ増幅、多重ＰＣＲ、ネステッドＰＣＲ、重複伸長ＰＣＲ、定量的ＰＣＲ（Ｑ－ＰＣＲ）、逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）、固相ＰＣＲ、熱非対称インタレースＰＣＲ（ＴＡＩＬ－ＰＣＲ）、タッチダウンＰＣＲ（ステップダウンＰＣＲ）、ＰＡＮ－ＡＣおよびユニバーサルファストウォーキングを含むポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）などの技術を用いて行うことができるが、これらに限定されるものではない。また、固相ＰＣＲとしては、ポロニー増幅（ＰＣＲコロニーが、例えば、ゲルマトリックス中に誘導されるもの）、ブリッジＰＣＲ（プライマーが固相支持体表面に共有結合されるもの）、従来の固相ＰＣＲ（水性プライマーの１つと一致する配列を有するプライマーを担持する固相支持体の存在下で非対称性ＰＣＲを適用するもの）および拡張型固相ＰＣＲ（従来の固相ＰＣＲに、高いＴｍおよびネステッド固相支持体プライマーと共に、任意で固相支持体プライミングを好む熱「ステップ」を適用することで改良可能なもの）などが挙げられる。

【０１９４】

ＰＣＲ（またはポリメラーゼ連鎖反応）技術は、当業界で周知であり、例えば、非特許文献１０ならびに特許文献４、特許文献５および特許文献６（それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。その最も単純な形式では、ＰＣＲは、特定のＤＮＡ配列の酵素的合成のためのｉｎ　ｖｉｔｒｏでの方法であって、それぞれが反対の鎖にハイブリダイズし、標的ＤＮＡ中の目的の領域に隣接する２種のオリゴヌクレオチドプライマーを用いる。それぞれのサイクルが、変性ステップ、アニーリングステップおよび重合ステップを含む複数の反応サイクルは、特定のＤＮＡ断片の指数的蓄積をもたらす（非特許文献１１、非特許文献１２、非特許文献１３、非特許文献１４）。増幅された断片の末端は、プライマーの５’末端によって決まる。ＰＣＲ反応において増幅産物を生成することができるＤＮＡポリメラーゼの例としては、大腸菌ＤＮＡポリメラーゼＩ、ＤＮＡポリメラーゼＩのＫｌｅｎｏｗ断片、Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼ、下記より単離された熱安定性ＤＮＡポリメラーゼ：　Ｔｈｅｒｍｕｓ　ａｑｕａｔｉｃｕｓ（Ｔａｑ）（種々のメーカー（例えば、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）から入手可能）、Ｔｈｅｒｍｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ（Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｔｅｒｅｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）、またはＴｈｅｒｍｏｃｏｃｃｕｓ　ｌｉｔｏｒａｌｉｓ（「Ｖｅｎｔ」ポリメラーゼ、Ｎ

ｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。ＲＮＡ標的配列は、ｍＲＮＡをｃＤＮＡに逆転写した後、上記のようなＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）を実施することにより増幅することができる。あるいは、１種の酵素を、特許文献７に記載のように両ステップに用いることができる。

【０１９５】

ＰＣＲサイクルの各ステップの継続時間および温度、ならびにサイクル数は、一般的には、そこで使用するストリンジェンシーの要件にしたがって調整される。アニーリングの温度およびタイミングは、プライマーが鋳型にアニーリングすると予想される効率と、許容されるミスマッチの程度の両方によって決定される。反応サイクル条件を最適化することは、十分に当業者の知識の範囲内にある。反応サイクル数は実施される検出分析に応じて変化してもよいが、通常は少なくとも１５回、より通常は少なくとも２０回であり、６０回以上の多さであってもよい。しかしながら、多くの状況では、反応サイクル数は、典型的には約２０回～約４５回の範囲である。

【０１９６】

ＰＣＲサイクルの変性ステップは、一般に、反応混合物を昇温するために加熱すること、そして混合物を、反応混合物中に存在する全ての二本鎖またはハイブリダイズした核酸が解離するのに十分な時間にわたってその昇温下に維持することを含む。変性のために、反応混合物の温度を、約８５℃～約１００℃、通常は約９０℃～約９８℃、より通常は約９３℃～約９６℃の範囲に上昇させて、その温度で、通常、約３～約１２０秒、通常は約５～約３０秒間にわたって維持する。

【０１９７】

変性後、反応混合物を、混合物中に存在する鋳型ＤＮＡへのプライマーのアニーリングにとって十分な条件下に付す。このような条件を達成するために低下させる温度は、通常、最適な効率および特異性を提供するように選択され、一般には、約５０℃以上、通常は約５５℃～約７０℃、より通常は約６０℃～約６８℃の範囲である。アニーリング条件は、一般に、約１５秒から約３０分、通常は約３０秒から約５分の範囲の時間にわたって維持される。

【０１９８】

鋳型ＤＮＡへのプライマーのアニーリング後または鋳型ＤＮＡへのプライマーのアニーリング中、反応混合物は、プライマーがハイブリダイズする鋳型となるＤＮＡを用いて、プライマーがその５’から３’の方向に伸長される様式で、プライマーの末端にヌクレオチドが重合するのに十分な条件（すなわち、プライマー伸長産物の酵素的生成にとって十分な条件）に付される。プライマー伸長条件を達成するために、反応混合物の温度を、典型的には、約６５℃～約７５℃、通常は約６７℃～約７３℃の範囲に昇温し、約１５秒から約２０分、通常は約３０秒～約５分にわたってその温度で維持する。

【０１９９】

変性、アニーリング、および重合の上記サイクルを、サーマルサイクラーまたはサーモサイクラーとして典型的に知られる自動化装置を用いて実施することができる。用いることができるサーマルサイクラーは、特許文献８、特許文献９、特許文献１０および特許文献１１（それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。サーマルサイクラーは、例えば、Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ－Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（コネチカット州、ノーウォーク）、ＢｉｏＲａｄ（カリフォルニア州、ハーキュリーズ）、Ｒｏｃｈｅ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｓｃｉｅｎｃｅ（インディアナ州、インディアナポリス）、およびＳｔｒａｔａｇｅｎｅ（カリフォルニア州、ラホヤ）から商業的に入手可能である。

【０２００】

一実施形態によれば、増幅反応において用いられるプライマーは、メチル化非依存的プライマーである。これらのプライマーは、少なくとも４箇所のメチル化部位の１つ目と最後に隣接し（しかし、当該部位に直接ハイブリダイズせず）、ＰＣＲ反応においては、４箇所全部またはそれ以上のメチル化部位を含むアンプリコンを生成することができる。

【０２０１】
本発明のこの態様のメチル化非依存的プライマーは、バーコード配列を含むアダプター配列を含んでもよい。アダプターは、フローセル表面への結合に必要な配列（その後のシーケンシングのための、Ｐ５部位およびＰ７部位）であって、ＲＮＡポリメラーゼのためのプロモーターおよび／または制限部位をコードする配列をさらに含んでもよい。バーコード配列を用いて、特定の分子、試料またはライブラリーを同定することができる。バーコード配列は、３～４００ヌクレオチド、より好ましくは３～２００ヌクレオチド、さらにより好ましくは３～１００ヌクレオチドであってもよい。かくして、バーコード配列は、６ヌクレオチド、７ヌクレオチド、８ヌクレオチド、９ヌクレオチドまたは１０ヌクレオチドであってもよい。バーコードは、典型的には４～１５ヌクレオチドである。
【０２０２】
本発明のこの態様のメチル化非依存性オリゴヌクレオチドは、標的核酸配列の正確な配列を反映する必要はない（すなわち、完全に相補的である必要はない）が、特定の実験条件下で標的部位にハイブリダイズするために十分に相補的でなければならない。したがって、オリゴヌクレオチド配列は、典型的には、例えば、連続する少なくとも１３個以上のヌクレオチド以上の領域にわたって、標的配列と少なくとも７０％の相同性、好ましくは少なくとも８０％、９０％、９５％、９７％、９９％または１００％の相同性を有する。条件は、標的部位へのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションが好まれ、非標的部位へのハイブリダイゼーションが最小化されるように選択される。
【０２０３】
ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーを選択する場合、様々なことを考慮に入れる必要がある。例えば、オリゴヌクレオチド（例えば、プライマー）が標的核酸配列をより密接に反映するほど、アッセイ条件のストリンジェンシーは高くなるが、標的配列へのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを防止するほどストリンジェンシーは高すぎてはならない。さらに、標的配列とのオリゴヌクレオチドの相同性が低いほど、アッセイ条件のストリンジェンシーは低くなるはずであるが、非特異的核酸配列へのハイブリダイゼーションを可能にするほどストリンジェンシーは低すぎてはならない。
【０２０４】
記載のように、本発明は、１より多い標的配列（それぞれ、ＤＮＡの連続配列上に少なくとも４箇所のメチル化部位を含むもの）を分析することを企図する。配列を、個別に、または多重反応の一部として分析することができる。
【０２０５】
当業界で公知の任意の方法、例えば、大規模平行ＤＮＡシーケンシング、合成によるシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、４５４ピロシーケンシング、クラスター増幅、ブリッジ増幅、およびＰＣＲ増幅を用いてＤＮＡのシーケンシングを行うことができるが、好ましくは、当該方法は、ハイスループットシーケンシング法を含む。典型的な方法としては、本明細書では「４５４技術」もしくは「４５４シーケンシング」と呼ばれることもある、コネチカット州、ブランフォードのＲｏｃｈｅ　４５４　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（商標）により提供されるシーケンシング技術および分析装置；カリフォルニア州、サンディエゴのＩｌｌｕｍｉｎａ，Ｉｎｃにより提供されるシーケンシング技術および分析装置（そのＳｏｌｅｘａシーケンシング技術は、本明細書では「Ｓｏｌｅｘａ法」もしくは「Ｓｏｌｅｘａ技術」と呼ばれることもある）；または本明細書ではＡＢＩ－ＳＯＬｉＤ（商標）プラットフォームもしくは方法と呼ばれることもある、インディアナ州、インディアナポリスのＡＢＩ，Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓにより提供されるシーケンシング技術および分析装置が挙げられる。
【０２０６】
シーケンシングのための他の公知の方法としては、例えば、非特許文献１５、非特許文献１６、非特許文献１７、非特許文献１８、非特許文献１９、非特許文献２０、非特許文献２１、非特許文献２２および非特許文献２３に記載のものが挙げられる。例えば、特許文献１２、特許文献１３および特許文献１４に記載されたピロリン酸に基づくシーケンシ

ング反応を用いることもできる。

【０２０７】

ＩｌｌｕｍｉｎａまたはＳｏｌｅｘａシーケンシングは、可逆的ダイターミネーターに基づく。ＤＮＡ分子を、典型的にはスライド上のプライマーに結合させ、局所クローンコロニーが形成されるように増幅させる。次いで、１種のヌクレオチドづつを付加して、組み込まれなかったヌクレオチドを洗浄除去する。次いで、蛍光標識されたヌクレオチドの画像を撮影し、染料をＤＮＡから化学的に除去し、次のサイクルを可能にする。Ａｐｐｌｉｅｄ　ＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓのＳＯＬｉＤ技術は、ライゲーションによるシーケンシングを用いる。この方法は、シーケンシングされた位置にしたがって標識された、一定の長さの全ての可能なオリゴヌクレオチドのプールの使用に基づく。そのようなオリゴヌクレオチド鎖をアニーリングさせ、ライゲーションする。次いで、配列を一致させるためのＤＮＡリガーゼによる選択的ライゲーションは、典型的には、その位置のヌクレオチドの情報を提供するシグナルをもたらす。ＤＮＡは、典型的にはエマルジョンＰＣＲによって増幅されるため、結果として得られるビーズは、それぞれ同じＤＮＡ分子のコピーのみを含有し、これらをスライドガラス上に定着させることで、Ｉｌｌｕｍｉｎａシーケンシングと同等の量および長さの配列を得ることができる。想定されるシーケンシング法の別の例は、ピロシーケンシング、特に、例えば、Ｒｏｃｈｅ　４５４　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅｒに基づく４５４ピロシーケンシングである。この方法は、油溶液中の水滴内部のＤＮＡを増幅し、各液滴は単一プライマーで被覆されたビーズに結合した単一のＤＮＡ鋳型を含有し、次いで、クローンコロニーを形成する。ピロシーケンシングは、新生ＤＮＡに付加された個々のヌクレオチドの検出のための光を生成するためにルシフェラーゼを使用し、組み合わせたデータを用いて、配列の読出しを行う。さらなる方法は、ＨｅｌｉｃｏのＨｅｌｉｓｃｏｐｅ技術に基づく方法であって、アレイに係留されたポリＴオリゴマーにより断片を捕捉する。それぞれのシーケンシングサイクルにおいて、ポリメラーゼおよび単一の蛍光標識されたヌクレオチドを添加し、アレイを画像化する。次いで、蛍光タグを除去し、サイクルを繰り返す。本発明の方法に包含されるシーケンシング技術のさらなる例は、ハイブリダイゼーションによるシーケンシング、ナノ細孔の使用によるシーケンシング、顕微鏡観察に基づくシーケンシング技術、マイクロ流体Ｓａｎｇｅｒシーケンシング、またはマイクロチップに基づくシーケンシング法である。本発明はまた、これらの技術のさらなる開発、例えば、シーケンシングの精度、または生物などのゲノム配列の決定にとって必要な時間のさらなる改善も想定する。

【０２０８】

一実施形態によれば、シーケンシング法は、ディープシーケンシングを含む。

【０２０９】

本明細書で用いられる用語「ディープシーケンシング」およびその変法は、シーケンシングプロセス中に読まれるヌクレオチドの回数を指す。ディープシーケンシングは、プロセスの範囲、または深度が、試験下の配列の長さよりも何倍も長いことを示す。

【０２１０】

本明細書に記載の分析法はいずれも、多くの形態で実施することができることを理解されたい。例えば、本明細書に記載の分析法を、方法の操作を実施するためのコンピュータなどの有形的媒体上で実施することができる。本明細書に記載の分析法を、方法の操作を実行するためのコンピュータで読取り可能な装置を含む、コンピュータで読取り可能な媒体上で実施することができる。また、本明細書に記載の分析法を、有形的媒体上のコンピュータプログラムを実行する、またはコンピュータで読取り可能な媒体上の指示を実行するように配置されたデジタルコンピュータ能力を有する電子的装置中で実施することもできる。

【０２１１】

本発明の実施形態の分析方法を実装するコンピュータプログラムを、一般的には、ＣＤ－ＲＯＭまたはフラッシュメモリ媒体などの配布媒体上でユーザーに配布することができるが、これらに限定されるものではない。配布媒体から、コンピュータプログラムをハー

ドディスクまたは同様の中間記憶媒体にコピーすることができる。本発明のいくつかの実施形態においては、本発明の方法を実装するコンピュータプログラムを、通信ネットワーク、例えば、インターネットを介して、遠隔位置からプログラムをダウンロードすることをユーザーに許可することによって、ユーザーに配布することができる。コンピュータプログラムを、その配布媒体またはその中間記憶媒体からコンピュータ指示をコンピュータの実行メモリ中にロードし、本発明の方法にしたがって動作するようにコンピュータを構成することによって実行することができる。これらの操作は全て、コンピュータシステムの当業者には周知である。

【０２１２】

本明細書に記載のメチル化パターンを分析するために用いることができるバイサルファイトの使用に依拠するさらなる方法は、本明細書の以下に記載される。

【０２１３】

メチル化感受性単一ヌクレオチドプライマー伸長：

ＤＮＡをバイサルファイト変換し、バイサルファイト特異的プライマーを、配列中の目的のＣｐＧの直前の塩基対のところまで配列にアニーリングさせる。ＤＮＡポリメラーゼ停止ジデオキシヌクレオチドを用いてプライマーを一塩基対だけＣ（またはＴ）側に伸長させ、ＣとＴの比を定量的に決定する。プライマー伸長のリポーターとしての放射性ｄｄＮＴＰの使用などの、いくつかの方法を用いて、このＣ：Ｔ比を決定することができ、蛍光に基づく方法またはピロシーケンシングを用いることもできる。マトリックス支援レーザー脱離イオン化／飛行時間（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ）質量分析を用いて、２つの多型プライマー伸長産物間を区別することができ、本質的には、ＳＮＰジェノタイピングのために設計されたＧＯＯＤアッセイに基づいて用いることができる。イオン対逆相高速液体クロマトグラフィー（ＩＰ－ＲＰ－ＨＰＬＣ）を用いて、プライマー伸長産物を識別することもできる。

【０２１４】

塩基特異的開裂／ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ：この方法は、ヌクレオチドの変化によってから得られた情報を増すために塩基特異的開裂ステップを付加することで、バイサルファイト変換を利用するものである。ＲＮＡへの目的の領域のｉｎ　ｖｉｔｒｏでの転写を最初に用いることによって（初回の増幅においてＰＣＲプライマーにＲＮＡポリメラーゼプロモーター部位を付加することによって）、ＲＮａｓｅＡを用いて、塩基特異的部位でＲＮＡ転写物を開裂することができる。ＲＮａｓｅＡは、シトシンリボヌクレオチドおよびウラシルリボヌクレオチドで特異的にＲＮＡを開裂するので、塩基特異性は、シトシン特異的（Ｃ特異的）開裂が望まれる場合は開裂耐性ｄＴＴＰを組込み、ウラシル特異的（Ｕ特異的）開裂が望まれる場合はｄＣＴＰを組込むことによって達成される。次いで、開裂された断片を、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦによって分析することができる。バイサルファイト処理は、ＣからＵへの変換による開裂部位の導入／除去または増幅されたリバース鎖におけるＧからＡへの変換による断片質量の変更をもたらす。Ｃ特異的開裂は、全てのメチル化ＣｐＧ部位で特異的に生じる。得られる断片のサイズを分析することによって、領域内のＣｐＧ部位のＤＮＡメチル化の特異的パターンを決定することができる。

【０２１５】

本発明者らは、メチル化依存性オリゴヌクレオチドの使用を含む少なくとも４箇所の部位のメチル化状態を分析することをさらに企図する。

【０２１６】

メチル化依存性オリゴヌクレオチドは、少なくとも１箇所のメチル化部位のメチル化型または少なくとも１箇所のメチル化部位の非メチル化型にハイブリダイズする。

【０２１７】

一実施形態によれば、メチル化依存性オリゴヌクレオチドは、プローブである。一実施形態において、プローブは、実験条件下で検出可能なシグナルを提供するためにメチル化部位にハイブリダイズし、同一の実験条件下で検出可能なシグナルを提供するために非メチル化部位にはハイブリダイズしない。別の実施形態においては、プローブは、実験条件

下で検出可能なシグナルを提供するために非メチル化部位にハイブリダイズし、同一の実験条件下で検出可能なシグナルを提供するためにメチル化部位にはハイブリダイズしない。本発明の本態様の当該実施形態のプローブを、例えば、固相支持体（例えば、アレイまたはビーズ）に固定することができる。

【０２１８】

別の実施形態によれば、メチル化依存性オリゴヌクレオチドは、増幅反応において用いられる場合、標的配列を増幅することができ、メチル化部位がメチル化されているプライマーである。別の実施形態によれば、メチル化依存性オリゴヌクレオチドは、増幅反応において用いられる場合、標的配列を増幅することができ、メチル化部位が非メチル化されているプライマーである。例えば、内容が参照により本明細書に組み込まれる特許文献１を参照されたい。

【０２１９】

本発明のこの態様のメチル化依存性オリゴヌクレオチドは、標的核酸配列の正確な配列を反映する必要はない（すなわち、完全に相補的である必要はない）が、特定の実験条件下でメチル化部位と非メチル化部位とを識別するように十分に相補的でなければならない。したがって、オリゴヌクレオチドの配列は、典型的には、例えば、少なくとも１３個以上の連続するヌクレオチドの領域にわたって、標的配列と少なくとも７０％の相同性、好ましくは、少なくとも８０％、９０％、９５％、９７％、９９％または１００％の相同性を有する。メチル化部位へのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションが好まれ、非メチル化部位へのハイブリダイゼーションが最小となる（およびその逆）ような条件が選択される。

【０２２０】

例として、短い核酸（長さ２００ｂｐ未満、例えば、長さ１３～５０ｂｐ）のハイブリダイゼーションを、所望のストリンジェンシーに応じて以下のハイブリダイゼーションプロトコールによって行うことができる；（ｉ）６ｘＳＳＣおよび１％ＳＤＳまたは３Ｍ　ＴＭＡＣｌ、０．０１Ｍリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、１ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ７．６）、０．５％ＳＤＳ、１００μｇ／ｍｌ変性サケ精子ＤＮＡおよび０．１％無脂肪乾燥ミルクのハイブリダイゼーション溶液、Ｔｍより１～１．５℃低いハイブリダイゼーション温度、Ｔｍより１～１．５℃低い温度の３Ｍ　ＴＭＡＣｌ、０．０１Ｍリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、１ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ７．６）、０．５％ＳＤＳの最終洗浄溶液（ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件）、（ｉｉ）６ｘＳＳＣおよび０．１％ＳＤＳまたは３Ｍ　ＴＭＡＣｌ、０．０１Ｍリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、１ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ７．６）、０．５％ＳＤＳ、１００μｇ／ｍｌ変性サケ精子ＤＮＡおよび０．１％無脂肪乾燥ミルクのハイブリダイゼーション溶液、Ｔｍより２～２．５℃低いハイブリダイゼーション温度、Ｔｍより１～１．５℃低い温度の３Ｍ　ＴＭＡＣｌ、０．０１Ｍリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、１ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ７．６）、０．５％ＳＤＳの最終洗浄溶液、６ｘＳＳＣの最終洗浄溶液、および２２℃での最終洗浄（ストリンジェントから中程度のハイブリダイゼーション条件）；ならびに（ｉｉｉ）６ｘＳＳＣおよび１％ＳＤＳまたは３Ｍ　ＴＭＡＣｌ、０．０１Ｍリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、１ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ７．６）、０．５％ＳＤＳ、１００μｇ／ｍｌ変性サケ精子ＤＮＡおよび０．１％無脂肪乾燥ミルクのハイブリダイゼーション溶液、Ｔｍより２．５～３℃低いハイブリダイゼーション温度および２２℃での６ｘＳＳＣの最終洗浄溶液（中程度のハイブリダイゼーション溶液）。

【０２２１】

本発明のオリゴヌクレオチドを、様々な方法のいずれかにより調製することができる（例えば、非特許文献５、非特許文献１１、非特許文献２４、非特許文献１２および非特許文献２５を参照されたい）。例えば、オリゴヌクレオチドを、例えば、非特許文献２６、非特許文献２７、非特許文献２８、非特許文献２９、非特許文献３０および非特許文献３１ならびに特許文献１５に記載された鋳型に基づく化学的合成および重合を含む、当業界で周知の様々な化学的技術のいずれかを用いて調製することができる。

【０２２２】
例えば、オリゴヌクレオチドを、ホスホラミダイト手法に基づく自動化固相手順を用いて調製することができる。そのような方法においては、各ヌクレオチドを、成長しているオリゴヌクレオチド鎖の５’末端に個別に付加し、固相支持体に３’末端で結合させる。付加されたヌクレオチドは、５’位置でジメトキシトリイル（またはＤＭＴ）基により重合から保護される三価３’－ホスホラミダイトの形態にある。塩基誘導性ホスホラミダイトカップリングの後、五価ホスホトリエステル中間体を得るための温和な酸化およびＤＭＴ除去は、オリゴヌクレオチド伸長のための新規部位を提供する。次いで、オリゴヌクレオチドを固相支持体から切断し、ホスホジエステルおよび環外アミノ基を、水酸化アンモニウムを用いて脱保護する。これらの合成を、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ／Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．（カリフォルニア州、フォスターシティ）、ＤｕＰｏｎｔ（デラウエア州、ウイルミントン）またはＭｉｌｌｉｇｅｎ（マサチューセッツ州、ベッドフォード）から商業的に入手可能なものなどのオリゴ合成装置上で実施することができる。あるいは、オリゴヌクレオチドを、例えば、Ｍｉｄｌａｎｄ　Ｃｅｒｔｉｆｉｅｄ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｃｏｍｐａｎｙ（テキサス州、ミッドランド）、ＥｘｐｒｅｓｓＧｅｎ，Ｉｎｃ．（イリノイ州、シカゴ）、Ｏｐｅｒｏｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．（アラバマ州、ハンツビル）、その他などの、当業界で周知の様々な市販元からカスタムメイドおよび注文によって入手することができる。

【０２２３】
必要な場合または望ましい場合、本発明のオリゴヌクレオチドの精製を、当業界で周知の様々な方法のいずれかによって実行することができる。オリゴヌクレオチドの精製は、典型的には、ネイティブアクリルアミドゲル電気泳動、例えば、非特許文献３２により記載された陰イオン交換ＨＰＬＣ、または逆相ＨＰＬＣ（非特許文献３３）により実施される。

【０２２４】
オリゴヌクレオチドの配列は、化学的分解（非特許文献３４）、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ）質量分析（非特許文献３５）、アルカリホスファターゼとエキソヌクレアーゼ消化との組合せ後の質量分析（非特許文献３６）など任意の好適なシーケンシング法を用いて検証することができるが、これらに限定されるものではない。

【０２２５】
ある特定の実施形態においては、検出プローブまたは増幅プライマー、あるいはプローブとプライマーの両方を、増幅／検出アッセイにおいて用いる前に、検出可能な薬剤または部分で標識する。ある特定の実施形態においては、検出プローブを、検出可能な薬剤で標識する。好ましくは、検出可能な薬剤は、それを測定することができるシグナルを生成し、その強度が分析される試料中の増幅産物の量と関連する（例えば、比例する）ように選択される。

【０２２６】
オリゴヌクレオチドと検出可能な薬剤との間の会合は、共有的または非共有的であってもよい。標識された検出プローブを、検出可能な部分の組込みまたはそれへのコンジュゲーションによって調製することができる。標識を核酸配列に直接的に、または間接的に（例えば、リンカーを介して）結合させることができる。様々な長さのリンカーまたはスペーサーアームが当業界で公知であり、商業的に利用可能であり、立体障害を軽減するように、または得られる標識された分子に他の有用な、もしくは望ましい特性を付与するように選択することができる（例えば、非特許文献３７を参照されたい）。

【０２２７】
核酸分子を標識するための方法は、当業界で周知である。標識化プロトコール、標識検出技術、および当業界における最近の発達の概説については、例えば、非特許文献３８、非特許文献３９および非特許文献４０を参照されたい。標準的な核酸標識方法としては、放射性薬剤の組込み、蛍光染料（非特許文献４１）または酵素（非特許文献４２）の直接

的結合；免疫学的に、または他の親和性反応により核酸分子を検出可能にするそれらの化学的改変（非特許文献４３、非特許文献４４、非特許文献４５、非特許文献４６、非特許文献４７、非特許文献４８、非特許文献４９および非特許文献５０）；ならびにランダムプライミング、ニックトランスレーション、ＰＣＲおよびターミナルトランスフェラーゼを用いるテーリングなどの酵素媒介性標識方法（酵素的標識に関する概説については、例えば、非特許文献５１を参照されたい）が挙げられる。より最近開発された核酸標識システムとしては、限定されるものではないが、モノ反応性シスプラチン誘導体と、ＤＮＡ中のグアニン部分のＮ７位との反応に基づくＵＬＳ（Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ Ｌｉｎｋａｇｅ Ｓｙｓｔｅｍ）（非特許文献５２）、核酸中に挿入し、ＵＶ照射時にヌクレオチド塩基に共有結合されるようになる、プソラレン－ビオチン（非特許文献５３および非特許文献５４）、光反応性アジド誘導体（非特許文献５５）、およびＤＮＡアルキル化剤（非特許文献５６）が挙げられる。

【０２２８】

様々な検出可能な薬剤のいずれかを、本発明の実施において用いることができる。好適な検出可能な薬剤としては、限定されるものではないが、種々のリガンド、放射性核種（例えば、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉなど）；蛍光染料（特定の例示的な蛍光染料については、以下を参照されたい）；化学発光剤（例えば、アクリジニウムエステル、安定化ジオキセタンなど）；分光的に分解可能な無機蛍光半導体ナノ結晶（すなわち、量子ドット）、金属ナノ粒子（例えば、金、銀、銅および白金）またはナノクラスター；酵素（例えば、ＥＬＩＳＡにおいて用いられるもの、すなわち、西洋わさびペルオキシダーゼ、ベーターガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼなど）；比色標識（例えば、染料、コロイド金など）；磁気標識（例えば、Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（商標）など）；ならびにビオチン、ジオキシゲニン、や他のハプテンといった、それらに対する抗血清もしくはモノクローナル抗体が入手可能なタンパク質が挙げられる。

【０２２９】

ある特定の実施形態においては、本発明の検出プローブは、蛍光標識される。様々な化学構造および物理特性のいくつかの公知の蛍光標識部分が、本発明の実施における使用にとって好適である。好適な蛍光染料としては、限定されるものではないが、フルオレセインおよびフルオレセイン染料（例えば、フルオレセインイソチオシアニンまたはＦＩＴＣ、ナフトフルオレセイン、４’，５’－ジクロロ－２’，７’－ジメトキシ－フルオレセイン、６カルボキシフルオレセインまたはＦＡＭ）、カルボシアニン、メロシアニン、スチリル染料、オキソノール染料、フィコエリトリン、エリスロシン、エオシン、ローダミン染料（例えば、カルボキシテトラメチルローダミンまたはＴＡＭＲＡ、カルボキシローダミン６Ｇ、カルボキシ－Ｘ－ローダミン（ＲＯＸ）、リサミンローダミンＢ、ローダミン６Ｇ、ローダミングリーン、ローダミンレッド、テトラメチルローダミンまたはＴＭＲ）、クマリンおよびクマリン染料（例えば、メトキシクマリン、ジアルキルアミノクマリン、ヒドロキシクマリンおよびアミノメチルクマリンまたはＡＭＣＡ）、オレゴングリーン染料（例えば、オレゴングリーン４８８、オレゴングリーン５００、オレゴングリーン５１４）、テキサスレッド、テキサスレッド－Ｘ、Ｓｐｅｃｔｒｕｍ Ｒｅｄ（商標）、Ｓｐｅｃｔｒｕｍ Ｇｒｅｅｎ（商標）、シアニン染料（例えば、Ｃｙ－３（商標）、Ｃｙ－５（商標）、Ｃｙ－３．５（商標）、Ｃｙ－５．５（商標））、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ染料（例えば、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ３５０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５３２、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５４６、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５６８、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５９４、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６３３、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６６０およびＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６８０）、ＢＯＤＩＰＹ染料（例えば、ＢＯＤＩＰＹ ＦＬ、ＢＯＤＩＰＹ Ｒ６Ｇ、ＢＯＤＩＰＹ ＴＭＲ、ＢＯＤＩＰＹ ＴＲ、ＢＯＤＩＰＹ ５３０／５５０、ＢＯＤＩＰＹ ５５８／５６８、ＢＯＤＩＰＹ ５６４／５７０、ＢＯＤＩＰＹ ５７６／５８９、ＢＯＤＩＰＹ ５８１／５９１、ＢＯＤＩＰＹ ６３０／６５０、ＢＯＤＩＰＹ ６５０／６６５）、ＩＲ染

料（例えば、ＩＲＤ４０、ＩＲＤ７００、ＩＲＤ８００）などが挙げられる。好適な蛍光染料および核酸分子に蛍光染料を連結する、または組み込むための方法のさらなる例については、例えば、非特許文献５７を参照されたい。蛍光染料ならびに標識化キットは、例えば、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．（ニュージャージー州、ピスカタウエイ）、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ Ｉｎｃ．（オレゴン州、ユージーン）およびＮｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ Ｉｎｃ．（マサチューセッツ州、ビバリー）から市販品が入手可能である。配列のメチル化状態を分析するための別の企図される方法は、メチル化感受性制限酵素への曝露後のＤＮＡの分析である。例えば、内容が本明細書に組み込まれる、特許文献１６および特許文献１７を参照されたい。

【０２３０】

本明細書に記載の方法によるメチル化状態の分析は、試料のＤＮＡの大部分が異なる細胞源に由来する場合であっても、ＤＮＡ分子の細胞源の正確な決定を可能にすることが理解される。本発明者らは、集団中のＤＮＡの総量に対する特定のＤＮＡの寄与が１：１０００未満、１：５，０００未満、１：１０，０００未満またはさらには１：１００，０００未満である場合であっても、特定のＤＮＡの細胞源を決定することができることを示した。

【０２３１】

細胞死を含む病状および疾患状態は、死滅しつつある細胞から体液（血液、血漿、尿、脳脊髄液）への分解されたＤＮＡの放出を引き起こす。かくして、本明細書に記載の方法を用いて、これらの体液中での特定の細胞集団の細胞死の量を分析することができる。次いで、特定の細胞集団の細胞死の量を用いて、特定の病理学的状態（例えば、疾患）または状況（例えば、外傷）を診断することができる。

【０２３２】

かくして、本発明の別の態様によれば、対象における細胞型または組織の死を検出する方法であって、対象の体液試料中に含まれる無細胞ＤＮＡが細胞型由来または組織由来であるか否かを決定することを含み、当該決定は、無細胞ＤＮＡの連続配列上の少なくとも４箇所のメチル化部位のメチル化状態の確認によって行い、前記配列はヌクレオチド数３００以下であり、前記細胞型または組織に特徴的なＤＮＡの連続配列上の少なくとも４箇所のメチル化部位のそれぞれのメチル化状態を、前記細胞型または組織の死の指標とする方法が提供される。

【０２３３】

特定の細胞型の死は、病理学的状態、例えば、疾患または外傷と関連し得ることが理解される。

【０２３４】

特定の細胞型の死のモニタリングを、特定の細胞型の細胞死を行うと予想される治療レジメの効率をモニタリングするために用いることもできる。

【０２３５】

特定の細胞型の死の決定を、健康な対象または疾患を有する対象の様々な機構の臨床的または科学的研究において用いることもできる。

【０２３６】

かくして、例えば、糖尿病、インスリン過剰症および膵島細胞腫瘍の場合、ならびに膵島移植後のベータ細胞の生存のモニタリング、ベータ細胞を細胞死から保護するために用いられる様々な処置レジメの効能の決定、および膵島細胞腫瘍において膵島細胞の死を引き起こすことを目的とする処置の効能の決定のために、膵臓ベータ細胞の死の測定が重要である。同様に、前記方法は、死滅した腎臓細胞（腎不全の診断）、死滅したニューロン（処置した、または処置していない、外傷性脳傷害、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、脳卒中、アルツハイマー病、パーキンソン病または脳腫瘍の診断）；死滅した膵臓腺房細胞（膵臓がんまたは膵炎の診断）；死滅した肺細胞（肺がんを含む肺の病理の診断）；死滅した脂肪細胞（脂肪代謝回転の変化の診断）、死滅した肝細胞（肝不全、肝臓毒性または肝臓がんを示す）、死滅した心筋細胞（心疾患、または心臓移植の場合の移植不全を示す

）、死滅した骨格筋細胞（筋肉傷害およびミオパシーの診断）、死滅したオリゴデンドロサイト（再発性多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症における白質損傷、またはグリア芽細胞腫を示す）に由来するＤＮＡの同定および定量を可能にする。

【０２３７】

一実施形態によれば、分析される配列は、目的の正常細胞を特徴付けるメチル化パターンを有し、疾患細胞を特徴付けるメチル化パターンではない（例えば、特定の型のがん細胞を特徴付けるメチル化パターンではない）。分析することができる例示的な配列は、配列番号１～１４８４に記載の配列中に含まれる。これらの配列は、上記にさらに記載されている。

【０２３８】

本明細書で用いられる用語「診断する」とは、疾患の存在を決定すること、疾患を分類すること、疾患の重症度（等級またはステージ）を決定すること、疾患進行および療法に対する応答をモニタリングすること、疾患の転帰および／または回復の見込みを予見することを指す。

【０２３９】

前記方法は、細胞型または組織に由来する前記対象の体液試料（例えば、血液試料）中に含まれる無細胞ＤＮＡの量を定量することを含む。前記細胞型または組織に由来する無細胞ＤＮＡの量が所定のレベルより上である場合、それは所定のレベルの細胞死が存在することを示す。細胞死のレベルが所定のレベルよりも上である場合、それは前記対象が疾患または病理学的状態を有することを示す。所定のレベルの決定を、疾患／病理学的状態を有さないことが知られる対象に由来する試料中に存在する無細胞ＤＮＡの量を分析することによって実行することができる。試験試料中の疾患と関連する細胞型または組織に由来する無細胞ＤＮＡのレベルが健康な（非疾患対象）から得られる試料中の同じ細胞型または組織に由来する無細胞ＤＮＡのレベルよりも統計的に有意に高い場合、それは、対象が疾患を有することを示す。あるいは、またはさらに、所定のレベルの決定を、疾患を有することが知られる対象に由来する試料中に存在する無細胞ＤＮＡの量を分析することによって実行することができる。試験試料中の疾患と関連する細胞型または組織に由来する無細胞ＤＮＡのレベルが疾患を有する対象から得られる試料中の疾患と関連する組織の細胞型に由来する無細胞ＤＮＡのレベルと統計的に有意に類似する場合、それは、対象が疾患を有することを示す。

【０２４０】

疾患の重症度を、前記疾患と関連する細胞集団の特異的メチル化パターンを有するＤＮＡ分子の量を定量することによって決定することができる。標的組織の特異的メチル化パターンを有するＤＮＡ分子の量の定量は、標的組織に由来する、既知細胞数を変化させて作成した較正曲線を用いて達成することができる。

【０２４１】

一実施形態によれば、前記方法は、試料中の目的細胞由来の無細胞ＤＮＡの量と、無細胞ＤＮＡの総量との比を決定することを含む。

【０２４２】

さらに別の実施形態によれば、前記方法は、試料中の目的細胞由来の無細胞ＤＮＡの量と、目的の第２細胞に由来の無細胞ＤＮＡの量との比を決定することを含む。

【０２４３】

本明細書に記載の方法を用いて、治療剤または処置の効能を決定することもでき、治療剤の投与後の、疾患と関連する細胞集団に関連したＤＮＡ量の減少をもって、薬剤または処置が治療的であることの指標とする。

【０２４４】

キット

本明細書に記載の成分はいずれも、キット中に含まれていてもよい。非限定例においては、キットは、上記のように、メチル化状態が疾患を示すＤＮＡ配列を増幅することができる少なくとも１種のプライマー対を含む。一実施形態によれば、プライマーは、上述し

たようなバーコード配列および／または下流のシーケンシングを可能にする配列をさらに含む。そのようなプライマー配列としては、例えば、配列番号１４８５～１４９６に記載のものが挙げられる。一実施形態によれば、プライマー対のそれぞれのプライマーは、好適な容器に含まれる。別の実施形態によれば、キットは、２種のプライマー対を含み、当該プライマー対は、上記のように、メチル化状態が疾患の指標となる２つの異なるＤＮＡ配列を増幅することができる。別の実施形態によれば、キットは、３種のプライマー対を含み、当該プライマー対は、上記のように、メチル化状態が疾患の指標となる３つの異なるＤＮＡ配列を増幅することができる。別の実施形態によれば、キットは、４種のプライマー対を含み、当該プライマー対は、上記のように、メチル化状態が疾患の指標となる４つの異なるＤＮＡ配列を増幅することができる。別の実施形態によれば、キットは、５種以上のプライマー対を含み、当該プライマー対は、上記のように、メチル化状態が疾患の指標となる５つ以上の異なるＤＮＡ配列を増幅することができる。

【０２４５】

別の非限定例においては、キットは、核酸配列中の少なくとも４箇所のメチル化部位のメチル化状態を検出し得るオリゴヌクレオチドを含み、前記核酸配列は３００塩基対以下であり、且つ少なくとも４箇所のメチル化部位を含み、各メチル化部位は、目的の第１細胞において、第１細胞とは非同一である第２細胞とは異なる様式でメチル化されている部位である。キットは、核酸配列中の少なくとも４箇所のメチル化部位のメチル化状態を検出することができる１種のオリゴヌクレオチドを含んでもよい。キットは、２種のオリゴヌクレオチドを含んでもよく、これらは組み合わせることによって、核酸配列中の少なくとも４箇所のメチル化部位のメチル化状態を検出することができるものである。キットは、３種のオリゴヌクレオチドを含んでもよく、これらは組み合わせることによって、核酸配列中の少なくとも４箇所のメチル化部位のメチル化状態を検出することができるものである。キットは、４種のオリゴヌクレオチドを含んでもよく、これらは組み合わせることによって、核酸配列中の少なくとも４箇所のメチル化部位のメチル化状態を検出することができるものである。本発明のこの態様のオリゴヌクレオチドは、上記で詳細に説明したような検出可能な部分によって標識することもできる。

【０２４６】

上記のキットのいずれかに含有させることができるさらなる成分としては、下記の少なくとも１種が挙げられる：亜硫酸水素塩（および亜硫酸水素塩反応に必要な他の試薬）、ポリメラーゼ酵素、ＤＮＡの精製のための試薬、$MgCl_2$。前記キットはまた、増幅された、または増幅されなかった配列のシーケンシングを行うための反応成分を含んでもよい。

【０２４７】

前記キットはまた、対照となるＤＮＡ配列を含んでもよい。かくして、例えば、前記キットは、健康な対象に由来の増幅配列と同じ配列を有するＤＮＡ（陰性対照となるもの）、および／または調査される疾患を有することがわかっている対象に由来の増幅配列と同じ配列を有するＤＮＡ（陽性対照となるもの）を含んでもよい。

【０２４８】

さらに、前記キットは、試験ＤＮＡの較正および定量を実施するための、既知量のＤＮＡを含んでもよい。

【０２４９】

キットの容器は、一般に、少なくとも１つのバイアル、試験管、フラスコ、ビン、注射筒または他の容器を含み、容器は、成分を入れることが可能であり、好ましくは、好適に分注可能なものである。キットに１より多い成分が存在する場合、キットはまた、一般に、さらなる成分を別々に入れることができる第２、第３または他のさらなる容器も含有する。しかしながら、様々な組合せの成分が１つの容器に含まれていてもよい。

【０２５０】

キットの成分が１つまたは複数の液体溶液として提供される場合、液体溶液は水性溶液であってもよい。しかしながら、キットの成分は、乾燥粉末として提供することができる

。試薬および／または成分を乾燥粉末として提供する場合、粉末を好適な溶媒の添加により再構成させることができる。

【０２５１】

キットは、好ましくは、キット成分のみならず、キットに含まれない任意の他の試薬の使用に関する指示書を含む。指示書は、実施可能な変法を含んでもよい。

【０２５２】

本出願から発展する特許権の存続期間中に、多くの関連するシーケンシング技術（亜硫酸水素処理を用いずに、メチル化状態を決定することができるものなどを含む）が開発されると予想され、シーケンシングという用語の範囲は、事前にそのような新しい技術を全て含むことが意図される。

【０２５３】

本明細書で使用する用語「約」とは、±１０％を指す。

【０２５４】

用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」およびその同根語は、「含むが、限定されるものではない（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ　ｂｕｔ　ｎｏｔ　ｌｉｍｉｔｅｄ　ｔｏ）」を意味する。

【０２５５】

用語「からなる」は、「含み、それに限定される」を意味する。

【０２５６】

用語「から実質的になる」は、組成物、方法または構造がさらなる成分、ステップおよび／または部分を含んでもよいことを意味するが、さらなる成分、ステップおよび／または部分が特許請求された組成物、方法または構造の基本的かつ新規な特徴を実質的に変化させない場合にのみである。

【０２５７】

本明細書で使用する、単数形の「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は、文脈において別途明確に指示しない限り、複数の参照を含む。例えば、用語「化合物（ａ　ｃｏｍｐｏｕｎｄ）」または「少なくとも１つの化合物（ａｔ　ｌｅａｓｔ　ｏｎｅ　ｃｏｍｐｏｕｎｄ）」は、その混合物を含む、複数の化合物を含んでもよい。

【０２５８】

本出願を通して、本発明の様々な実施形態を、範囲形式で提示することができる。範囲形式での記載は単に便宜上および簡潔性のためであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない限定と解釈するべきではないことを理解されたい。したがって、範囲の記載は、全ての可能なサブ範囲ならびにその範囲内の個々の数値を具体的に開示したものと考えるべきである。例えば、１～６などの範囲の記載は、１～３、１～４、１～５、２～４、２～６、３～６などのサブ範囲、ならびにその範囲内の個々の数値、例えば、１、２、３、４、５、および６を具体的に開示したものと考えるべきである。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

【０２５９】

本明細書で用いられる用語「方法」とは、限定されるものではないが、化学、薬理学、生物学、生化学および医学の業界の実行者にとって公知である、または彼らによって公知の様式、手段、技術および手順から容易に開発される様式、手段、技術および手順を含む、所与の任務を達成するための様式、手段、技術および手順を指す。

【０２６０】

本明細書で用いられる用語「処置すること」は、病態の進行を無効化すること、実質的に阻害すること、減速させること、もしくは逆転させること、病態の臨床的もしくは感覚的症状を実質的に改善すること、または状態の臨床的もしくは感覚的症状の出現を実質的に防止することを含む。

【０２６１】

明確さを目的として、個別の実施形態の文脈の中で説明されている本発明の複数の特徴

は、１つの実施形態の中に組み合わせて設けることもでき、上の説明は、このような組合せが明示的に記載されているものと解釈すべきことを理解されたい。逆に、簡潔さを目的として、１つの実施形態の文脈の中で説明されている本発明のさまざまな特徴は、個別に設ける、または適切な部分組合せとして設ける、または本発明の任意の他の説明されている実施形態において適切に設けることもでき、上の説明は、このような個別の実施形態が明示的に記載されているものと解釈すべきである。さまざまな実施形態の文脈の中で説明されている特徴は、実施形態がそれらの要素なしでは動作・機能しない場合を除いて、それらの実施形態の本質的な特徴とはみなさないものとする。

【０２６２】

上記および添付特許請求の範囲に記載された本発明の種々の実施形態および態様は、以下の実施例において実験的に支持される。

【実施例】

【０２６３】

上記説明と共に、本発明のいくつかの実施形態を限定することなく例示する実施例を、以下に参照する。

【０２６４】

一般に、本明細書で用いられる命名法および本発明で用いられる実験手順は、分子技術、生化学的技術、微生物学的技術および組換えＤＮＡ技術を含む。そのような技術は、文献中に余すところなく説明されている。例えば、非特許文献５８、非特許文献５９、非特許文献６０、非特許文献６１、非特許文献６２、非特許文献６３；特許文献１８、特許文献１９、特許文献２０、特許文献２１および特許文献２２に記載された方法；非特許文献６４、非特許文献６５、非特許文献６６、非特許文献６７、非特許文献６８を参照されたい；利用可能なイムノアッセイは、特許文献および科学文献に広く記載されており、例えば、特許文献２３、特許文献２４、特許文献２５、特許文献２６、特許文献２７、特許文献２８、特許文献２９、特許文献３０、特許文献３１、特許文献３２、特許文献３３、特許文献３４、特許文献３５、特許文献３６、特許文献３７および特許文献３８を参照されたい；非特許文献６９、非特許文献７０、非特許文献７１、非特許文献７２、非特許文献７３、非特許文献７４および非特許文献７５、非特許文献７６、非特許文献７７を参照されたい。これらの全ては、参照により、本明細書に完全に記載されたように組み込まれる。他の一般的な参考文献は、本明細書を通して提供する。これらに記載の手順は、当業者には周知であると考えられ、読者の便宜のために提供する。これらに含まれる情報は全て、参照により本明細書に組み込まれる。

【０２６５】

材料および方法

患者：全ての臨床試験は、関連する地方倫理委員会によって認可されたものであり、血液採取の前に全ての対象またはその法定後見人からインフォームドコンセントを得ている。

【０２６６】

１．最近診断されたＴ１Ｄ患者：血漿を、１～４カ月前にＴ１Ｄと診断された１１人の患者（４～２０歳、平均９．５歳）から調製した。

【０２６７】

２．膵島移植レシピエント：患者は４４～５７歳であり、１０～３６年のＴ１Ｄ期間を有し、血中グルコースレベルがあまり制御されていなかった（ＨｂＡ１Ｃ　６．４～１０）。抗拒絶療法は、アレムツズマブ、エタネルセプトおよびアナキンラを含んでいた。維持療法は、タクロリムスおよびＭＭＦを含んでいた。

【０２６８】

３．ＭＳ／ＮＭＯ患者：ＭＳおよびＮＭＯ患者は、それぞれ、２０１０　ＭｃＤｏｎａｌｄ基準（１）およびＮＭＯ診断基準（２）にしたがって診断された。患者の特徴は以下の通りであった。再発－寛解ＭＳ患者：ｎ＝４９、７４％が女性、平均年齢＝３６±１２．５歳、範囲１８～６８歳、疾患期間４±４．５年、範囲０～１４年。総合障害度評価尺

度（ＥＤＳＳ）＝２．８±１．８、範囲１～７．５。患者はいずれも試験前の２カ月間にステロイド処置を受けていなかった。再発患者においては、血液をＩＶステロイド療法の前に採取した。採血時に、１人の患者をコパキソンで処置し、４人をイムランで処置した。

【０２６９】

４．心停止患者：試料を、スウェーデン国のウプサラ大学病院（Ｕｐｐｓａｌａ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｈｏｓｐｉｔａｌ）の集中治療室（ＩＣＵ）で採取した。心停止した意識不明患者を、自己心拍再開（ＲＯＳＣ）を用いて蘇生させた。３２～３４℃の体温で２４ｈの低体温処置、人工呼吸、および薬理学的支援を、記載のように蘇生の直後に実施した（非特許文献７８）。患者は（ｉ）覚醒していない、（ｉｉ）いかなる命令にも応答しない、および（ｉｉｉ）いかなる刺激にも反応しない場合、昏睡状態と定義した。全ての患者は、採血のために橈骨動脈または大腿動脈中で動脈ラインを受けた。急性期で可能な限り早く始めて、心停止後２４、４８、７２、９６および１０８時間続けて、連続血液試料を収集した。血清アリコートを、分析まで－７０℃で凍結した。

【０２７０】

５．外傷性脳傷害：単独重症外傷性脳傷害（ＴＢＩ）を有する５人の患者（３人の男性および２人の女性、全て白人、平均年齢３９歳）を、スウェーデン国、ヨーテボリのサルグレンスカ大学病院（Ｓａｈｌｇｒｅｎｓｋａ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｈｏｓｐｉｔａｌ）の神経疾患集中治療室（ＮＩＣＵ）での臨床試験から登録した。全ての患者は、局所性挫傷と全身性浮腫との合併症を有していた。以下の基準によると、全員が、重症ＴＢＩを有していた：１）グラスゴー昏睡尺度上のスコア８に対応する、応答レベル尺度（ＲＬＳ）が４である（３＝応答なし、１５＝覚醒）（３）；２）人工呼吸器処置を必要とする；３）頭蓋内圧（ＩＣＰ）のモニタリングを必要とする。静脈血試料を、外傷後、連続する日数で採取した。臨床評価および放射線学的評価の後、患者は承認後数時間以内に神経外科的介入を受けて、頭蓋内圧（ＩＣＰ）モニタリング／治療的ＣＳＦドレナージのための留置脳室内カテーテルを受けた。適切な場合、出血および挫傷のような空間占有病変を外科的に除去した。次いで、患者を、６０ｍｍＨｇより高い脳かん流圧および２０ｍｍＨｇより低い頭蓋内圧を維持する目的で、標準的なプロトコール：「Ｌｕｎｄ概念」にしたがって処置した（４）。収集されたデータは、年齢、性別および傷害の時間などの人口統計的および臨床的変数を含んでいた。生理的および検査所見的変数を、試験期間を通して連続的に記録し、それと同時に、以下の限界値内に保持されるように調整した：ヘモグロビン＞１２０ｇ／Ｌ、血清ナトリウム＞１３５～＜１５０ｍｍｏｌ／Ｌ、血清カリウム＞４．０～＜５．０ｍｍｏｌ／Ｌ、血清アルブミン＞３５～＜５０ｇ／Ｌ、コア温度３７±０．５℃、平均動脈血圧（ＭＡＢＰ）７０～１００ｍｍＨｇ、ＩＣＰ＜２０ｍｍＨｇ、脳かん流圧ＣＰＰ（ＭＡＢＰ－ＩＣＰ）＞６０ｍｍＨｇ、PO_2＞１２～＜１８ｋＰａ、PCO_2約４．５ｋＰａおよび正常なｐＨの中に。血中グルコースは、ＮＩＣＵのルーチンにしたがって、４～６ｍｍｏｌ／Ｌに保持した。患者はステロイドを受けていなかった。

【０２７１】

６．膵臓がんおよび慢性膵炎：病理学的に確認された膵臓腺がんを有する４２人の患者（２８人の男性および１４人の女性；平均年齢６８歳、範囲４１～８７歳）および慢性膵炎を有する１０人の患者から、血漿を調製した。膵臓がんの米国がん合同委員会のＴＮＭ病期分類（２０１０）を用いた。血漿収集の時点で、２９人の患者は限局性疾患（４人はステージＩおよび２５人はステージＩＩ、全員術前）を有し、１３人の患者は転移性疾患、ステージＩＶを有していた。

【０２７２】

７．健康な対照：合計４０人の健康な個体（５０％は女性；２２～６０歳）は、無報酬の健康な対照として試験にボランティアとして参加した。全員、試験した疾患状態と関連する症状の兆候を有することを否定した。

【０２７３】

ＤＮＡのプロセッシング：無細胞ＤＮＡを、キット（Ｑｉａｑｕｉｃｋ、Ｑｉａｇｅｎ

）を用いて血漿または血清から単離し、バイサルファイト（Ｚｙｍｏ　ｒｅｓｅａｒｃｈ）で処理した。バイサルファイト処理したＤＮＡを、モニタリングしたＣｐＧ部位のメチル化状態とは関係なく、バイサルファイト処理したＤＮＡに特異的なプライマーを用いてＰＣＲで増幅した。プライマーをバーコード化し、ＭｉＳｅｑ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）を用いて産物のシーケンシングを行う場合、異なる個体に由来する試料の混合を可能せしめた。

【０２７４】

膵臓腺房細胞および膵管細胞のメチローム：公知の方法によって、解剖した死体由来のヒト膵臓から膵管細胞および腺房細胞を単離した。生細胞を細胞表面マーカーで染色し、選別した。フェノール／クロロホルムを用いてゲノムＤＮＡを単離し、製造業者の指示書にしたがってＩｌｌｕｍｉｎａ　４５０ｋアレイのためにプロセッシングした。

【０２７５】

インスリン
プライマー配列：配列番号１４８５および１４８６
ＭＢＰ３
プライマー配列：配列番号１４９５および１４９６
ＣＧ１０８０９５６０（ＷＭ１）
プライマー配列：配列番号１４９１および１４９２
ＣＧ０９７８７５０４
プライマー配列：配列番号１４９３および１４９４
膵臓（ＣＵＸ２）
プライマー配列：配列番号１４８７および１４８８
膵臓（ＲＥＧ１Ａ）
プライマー配列：配列番号１４８９および１４９０

【０２７６】

統計分析：群間の有意差を評価するために、各患者における非メチル化組織特異的ＤＮＡの値に基づく、両側ＭａｎｎＷｈｉｔｎｅｙ検定を用いた。

【０２７７】

実施例１
組織特異的メチル化マーカーの同定

本発明者らは、個々の組織または細胞型と、他の組織とを識別する、組織特異的ＤＮＡメチル化マーカーを同定した。ｃｆＤＮＡの主要な寄与因子であり、それゆえ、システムにおける主要な潜在的なノイズ源であると考えられる、目的の組織と造血細胞とを区別するマーカーに特に着目した。本発明者らは、公共的に利用可能なメチローム（多くはＴｈｅ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ａｔｌａｓ［ＴＣＧＡ］およびＧｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｏｍｎｉｂｕｓ［ＧＥＯ］に含まれるＩｌｌｕｍｉｎａ　４５０ｋアレイデータ）を分析して、示差的なメチル化パターンを有する個々のＣｐＧジヌクレオチド、即ち、ある組織では特異的に非メチル化され、他の場所ではメチル化されているものを同定した（手順の略図、図５Ａ～Ｂを参照されたい）。

【０２７８】

Ｉｌｌｕｍｉｎａアレイは、個々のＣｐＧジヌクレオチドのメチル化状態に関する情報を提供する。それぞれの部位の識別力は限られており、それは典型的には、非メチル化またはメチル化されている組織に由来するにもかかわらず、一部の分子中ではそれぞれ無作為にメチル化または非メチル化され得るためである。アッセイのシグナル対ノイズ比を増大させるために、本発明者らは、ＤＮＡのメチル化の局所的性質を利用した。本発明者らは、元のＣｐＧマーカー部位に隣接する４～９箇所のＣｐＧ部位を含む「拡張ウィンドウ」を定義した。これは、同じ分子中の複数の隣接するシトシンが偶然にメチル化または脱メチル化される可能性は低いという理屈に基づくものである。これらの拡張ウィンドウのメチル化状態を決定するために、本発明者らは、異なるヒト組織からＤＮＡを取得し、それをバイサルファイトで処理して、非メチル化シトシンをウラシルに変換した。次いで、

特徴的なＣｐＧ部位および複数の隣接するＣｐＧを含有する短い断片をＰＣＲ増幅し、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑを用いてＰＣＲ産物中の複数の分子をシーケンシングした。

【０２７９】

Ｉｌｌｕｍｉｎａメチロームアレイ間の比較に対する代替的手法として、いくつかの場合、本発明者らは、既知の組織特異的遺伝子（Ｉｌｌｕｍｉｎａアレイにおいて十分に提示されていなくてもよいもの）のプロモーターに基づいて、組織特異的マーカーを選択および検証した（図５Ａ～Ｂ）。以下の実施例に示されるように、複数の隣接するＣｐＧ部位が同じ組織特異的メチル化パターンを共有するＤＮＡ分子に関するスコアリングは、個々のＣｐＧ部位の情報内容よりも劇的に高い、目的の組織と他の組織とを識別する力を与えた。かくして、本発明者らは、４～９箇所のＣｐＧ部位を含有するＤＮＡの短い配列であって、そのメチル化状態の組合せが、血液細胞や他の組織と比べて、目的の組織に固有のエピジェネティックなサインを構成するものを定義した。

【０２８０】

実施例２

Ｔ１Ｄ患者の循環中の非メチル化インスリン遺伝子プロモーターの存在

ベータ細胞に由来するｃｆＤＮＡを検出するために、ベータ細胞特異的メチル化マーカーとして、インスリン遺伝子プロモーターを用いた。末梢血試料中のベータ細胞に由来するＤＮＡの同定を目的とした以前の研究は、インスリンプロモーター中の２～３箇所のＣｐＧジヌクレオチドのメチル化状態に基づくメチル化特異的ＰＣＲを用いた（非特許文献７９）。しかしながら、インスリンプロモーターは、ごく近傍にさらなるＣｐＧ部位を含有し、これを用いてベータ細胞と他の組織のＤＮＡ間の区別を改善することができる（図１Ａ）。この概念を試験するために、インスリン遺伝子プロモーターの１６０ｂｐ断片を、複数の組織から得られたバイサルファイト処理されたＤＮＡから増幅し、産物をシーケンシングして、それぞれの組織中のそれぞれのＣｐＧのメチル化状態を決定した。図１Ｂに示されるように、それぞれのＣｐＧは、ヒトベータ細胞に由来するＤＮＡ分子の９０～９５％および他の組織に由来するＤＮＡ分子の５～１５％において非メチル化されていた。しかしながら、この情報を組み合わせ、６箇所全てのＣｐＧ部位が非メチル化されたＤＮＡ分子の画分を算出した場合、ベータ細胞と全ての他の組織との差異は、劇的に大きくなった：完全に非メチル化されたベータ細胞に由来するＤＮＡ分子は約８０％であったが、完全に非メチル化された任意の他の組織に由来する分子は０．０１％未満であった。かくして、インスリン遺伝子プロモーター中の６箇所の隣接する非メチル化ＣｐＧ部位を含む伸長鎖（配列番号１２４１に含まれる）は、１０，０００：１に近いシグナル対ノイズ比で他の組織に由来するベータ細胞と他の組織とを強固に区別する。

【０２８１】

次いで、この情報を用いて、Ｔ１Ｄ患者の循環中のベータ細胞由来ｃｆＤＮＡを探した。患者に由来する血漿ＤＮＡをバイサルファイトで処理し、ＰＣＲで増幅し、シーケンシングして、完全に非メチル化されたインスリンプロモーターＤＮＡを含有する分子画分を決定した。得られた画分に、各試料中で測定されたｃｆＤＮＡの濃度を掛けて、各患者の血液中に循環するベータ細胞由来ＤＮＡの値（ｎｇ／ｍｌ）を得た（図５Ａ～Ｂ）。健康なボランティア（ｎ＝２５）のｃｆＤＮＡについては、完全に非メチル化されたインスリン遺伝子プロモーター分子の頻度は極端に低くかった（最大で循環するインスリンプロモーター断片の０．１２％）。それぞれの個体におけるｃｆＤＮＡの総量を掛けた場合、ベータ細胞に由来する循環ＤＮＡは０．０６ｎｇ／ｍｌ未満であり（１０個のゲノムに相当する）、健康な成人におけるベータ細胞の代謝回転の非常に低い速度と一致することがわかった（図１Ｃ）。診断の２～１６週後に採取されたＴ１Ｄ患者（ｎ＝１１）に由来する血漿は、ｃｆＤＮＡ中の非メチル化されたインスリンプロモーターＤＮＡの明確なシグナル（血漿１ｍｌあたり１．０６～８．６ｎｇのベータ細胞ＤＮＡ）を示し、これはベータ細胞の進行中の自己免疫性破壊の指標となる（図１Ｃ）。

【０２８２】

死体同種異系膵島を移植し、免疫抑制剤で処置された長期Ｔ１Ｄ患者から採取した血漿

試料も試験した。図１Ｄに示されるように、全患者の血漿が、移植の１～２時間後に高いシグナル（非メチル化されたインスリンＤＮＡ）を有し、その後の数時間および数日で劇的に減少した。急性虚血から潜在的にもたらされる、移植直後の移植ベータ細胞の大規模な喪失は、移植患者の以前の画像試験と一致している。多くの患者において、明らかにバックグラウンドより高いシグナルが移植後７日およびさらには１カ月後に検出されたが、これは、免疫抑制にもかかわらず、ベータ細胞の連続的な低レベルの喪失を示唆している。

【０２８３】

インスリン遺伝子プロモーターでの複数のＣｐＧ部位のメチル化パターンの組合せが循環中のベータ細胞由来ＤＮＡを検出するのに必要であったことを確認するために、健康な個体および最近診断されたＴ１Ｄ患者の血漿中のそれぞれの個別のＣｐＧのメチル化状態を検査した。それぞれ個別のＣｐＧは、健康な対照およびＴ１Ｄ患者の血漿中で異なるパターンを有さなかった（ｃｆＤＮＡ分子の２２４～１５％において非メチル化されている）。しかしながら、集合的には、６箇所のＣｐＧ部位は、健康な対照中に存在しない明確なシグナルを、Ｔ１Ｄ患者の血漿中ではもたらした（図６Ａ～Ｂ）。

【０２８４】

これらの結果は、特定の組織に由来するｃｆＤＮＡの検出のための、この次世代シーケンシング（ＮＧＳ）に基づく方法の非常に高い感度および特異度を支持する。Ｔ１Ｄに関して、健康な対照と最近診断された患者におけるシグナル間の完全な分離は、健康な対照と糖尿病患者との有意なシグナル重複を示した以前の報告と都合よく比較することができる。これは、このアッセイを用いて、臨床診断の前にベータ細胞死を同定することが可能で有り、更には他の場面、例えば、移植されたベータ細胞の破壊を防止するために用いられる免疫抑制の効能のモニタリングにおいての使用を示唆する。

【０２８５】

実施例３

多発性硬化症におけるオリゴデンドロサイト由来ｃｆＤＮＡの同定

脳細胞死の非侵襲的検出は、特に困難である。理論的には、脳特異的メチル化パターンを用いて、脳由来ｃｆＤＮＡを同定することができる。本発明者らは、多発性硬化症（ＭＳ）および視神経脊髄炎（ＮＭＯ）といった、白質中のミエリン産生オリゴデンドロサイトおよびアストロサイトが破壊される自己免疫疾患を発症した患者の血液中に循環するオリゴデンドロサイト／グリアＤＮＡの証拠を探した。正常なヒト白質の公開されたメチロームを分析し、隣接するＣｐＧ部位のクラスターを、ミエリン塩基性タンパク質（本明細書ではＭＢＰ３と呼ばれる）の３’ＵＴＲにおいて、およびオリゴデンドロサイト中で選択的に非メチル化された、遺伝子座の決定していない部位（Ｉｌｌｕｍｉｎａアレイにおいてはｃｇ１０８０９５６０、白質１についてはＷＭ１と呼ばれる）の周囲で同定した（図２Ａ）。インスリン遺伝子プロモーターに関しては、これらのクラスター中の個々のＣｐＧは、中程度のシグナル対ノイズ比を示した：それらは、オリゴデンドロサイトに富む起源（グリア調製物、白質および全脳）に由来するＤＮＡ分子の６０～８５％、他の組織に由来するＤＮＡの２～３５％において非メチル化されていた（図７Ａ～Ｅおよび図８Ａ～Ｅ）。ＭＢＰ３およびＷＭ１遺伝子座での全てのＣｐＧの組合せは、オリゴデンドロサイトに富むＤＮＡと、血液を含む他の起源に由来するＤＮＡとの識別を大きく増大させた（図７Ａ～Ｅおよび図８Ａ～Ｅ）。かくして、全ての隣接するＣｐＧ部位で非メチル化されたＭＢＰ３（配列番号１２４８中に含まれる）またはＷＭ１（配列番号１２４７中に含まれる）遺伝子座に由来するＤＮＡは、オリゴデンドロサイトの排他的マーカーとして役立ち得る。

【０２８６】

健康な個体（ｎ＝１９）は、その血漿中に無視できるレベルの非メチル化されたＭＢＰ３またはＷＭ１を有していたが、これは、オリゴデンドロサイトの最小の基礎代謝回転を示唆している（図２Ｂ）。最も安定なＭＳ患者（ｎ＝３０）は、シグナルを有さないか、または非常に低いシグナルを有していた。しかしながら、疾患増悪中の多くの患者（臨床

的に、また、採取時間に近い脳ＭＲＩを用いて実証された再発、ｎ＝１９）は、その血漿中で、ＭＢＰ３、ＷＭ１またはその両方の非メチル化ＤＮＡを示した（図２Ｂ）。この観察は、短寿命の循環している非メチル化ＭＢＰ３またはＷＭ１　ＤＮＡが急性的なオリゴデンドロサイトの細胞死を反映するという見解と一致する。初期の分析は、いくらかの再発患者におけるシグナルの欠如との臨床的相関を示さなかった。血液および年齢、性別、ＥＤＳＳ（総合障害度評価尺度）または疾患持続期間におけるシグナル間で相関は観察されなかった。これらの結果は、オリゴデンドロサイトの急性的な自己免疫性破壊を、ＭＢＰ３またはＷＭ１遺伝子座に由来する完全に非メチル化されたＤＮＡ断片の循環レベルの増大として表すことができることを示しており、脱髄疾患の診断およびモニタリングのための感受性試験を開発するための道を開くものである。オリゴデンドロサイトのさらなるメチル化マーカーを開発して、アッセイの特異度および感度をさらに増大させることができる。

【０２８７】

実施例４

急性脳損傷後の脳由来ｃｆＤＮＡの同定

脳傷害のためのより一般的なマーカーを得るために、そのメチル化状態が脳ＤＮＡを他の組織と識別する遺伝子座についてＩｌｌｕｍｉｎａアレイをスキャンした。ＣＧ０９７８７５０４遺伝子座（本明細書ではＢｒａｉｎ１と呼ばれる；配列番号１２５１中に含まれる）の周囲の９箇所のＣｐＧを含むクラスターは、（ニューロンまたはグリアに富む）脳組織の様々な起源に由来するＤＮＡの７０％において、および他の組織（これらの組織中に存在する末梢ニューロンのＤＮＡを反映する可能性が高い）に由来するＤＮＡ分子の５％未満において完全に非メチル化されていた。重要なことは、非メチル化された血液中の分子は０．０３％未満であり、脳と血液の間のこの遺伝子座のメチル化における差は２０００倍を超えていた（図３Ａおよび図９Ａ～Ｅ）。

【０２８８】

健康な個体は、血漿中に極端に低レベルの完全に非メチル化されたＢｒａｉｎ１を有していた（図３Ｂ）。この低いベースラインは、アッセイの感度の限界より低いニューロン代謝回転または死滅しつつある脳細胞からのＤＮＡのクリアランスのための代替的機構を反映し得る。両方とも血液脳関門の破壊と共にニューロン傷害を含むことが知られる、脳損傷の２つの設定において、患者からの血漿試料を検査した。驚くべきことに、虚血性脳損傷が実証された心停止後の種々の時点で採取された患者（ｎ＝１０）は、血漿中で高レベルの非メチル化されたＢｒａｉｎ１を示した（図３Ｃ）。同様に、重症外傷性脳傷害（ＴＢＩ）後の神経外傷のために集中治療室に入院した患者（ｎ＝５）は、血漿中の非メチル化されたＢｒａｉｎ１が上昇していた（図３Ｄ）。両セットの結果は、これらの患者における死滅した脳細胞（ニューロンおよび／またはグリア）に由来する循環ＤＮＡ断片と一致する。脳由来ｃｆＤＮＡの量および時間的パターンは、患者間で変化した。心停止した群においては、蘇生直後の最初の時点で最も強いシグナルが観察され、多くの患者においてはその後の数日間で低下した。ＴＢＩを発症した患者の群においては、より遅延したパターンの脳由来ｃｆＤＮＡが観察された。これらの知見は、脳特異的ＤＮＡならびにオリゴデンドロサイト特異的ＤＮＡを、独特のメチル化マーカーに基づいて、神経炎症、外傷性および虚血性脳病理を発症した患者の循環中で同定することができることを示している。

【０２８９】

実施例５

膵臓がんおよび膵炎における膵臓外分泌腺由来ｃｆＤＮＡの同定

本発明者らは、前記手法を用いてがんについてもｃｆＤＮＡを検出することができるかどうかを試験した。腫瘍は、正常組織と比較してメチロームにおける広範な変化を呈するが、多くの組織特異的メチル化部位は、腫瘍中でも無傷のままであると考えられる。かくして、腫瘍における細胞死は、腫瘍の組織起源の正常なメチル化パターンを有するｃｆＤＮＡを生じさせるはずである。膵管腺がんは、膵臓外分泌腺中の腺房細胞または膵管細胞

のいずれかを起源とすると考えられる。ヒト死体材料に由来するＦＡＣＳ精製された膵管細胞および腺房細胞に対する抗体を使用し、そのメチロームをＩｌｌｕｍｉｎａ　４５０ｋアレイを用いて取得した（未公開の結果）。これらのデータの分析は、複数のＣｐＧが、膵臓外分泌腺中では非メチル化され、他の多くの組織中ではメチル化されていることを示していた。さらなる分析のために２つの部位を選択し、腺房細胞および膵管細胞を他の細胞型と区別することができる、膵臓外分泌腺のためのマーカーとして用いることができる隣接するＣｐＧのクラスターを同定した（図４Ａ、図１０Ａ～Ｅおよび図１１Ａ～Ｅ）。健康な対象（ｎ＝２５）は、そのｃｆＤＮＡ中に非常に低レベルの非メチル化膵臓外分泌腺マーカーを有し、この組織の低い代謝回転と一致していた（図４Ｂ）。膵臓がんを発症した患者のほぼ半分（４２人のうち２０人）が、バックグラウンドレベルより高い膵臓外分泌腺由来ｃｆＤＮＡを示した（図４Ｃ）。進行した疾患を発症した患者においてシグナルが強くなる傾向があり、これらの患者はバックグラウンドより高いシグナルを示す可能性がより高かった。それにもかかわらず、ステージ１および２（限局性疾患）の患者の何人かは、明確なシグナルを有していたが（２９人のうちの１１人）、この方法は、原理的には、切除可能なステージにある膵臓がんにおける細胞死を同定することができることを示唆している。

【０２９０】

細胞死の全ての原因は組織特異的ｃｆＤＮＡの増加をもたらすという仮説をさらに試験するために、慢性膵炎を発症した患者の血漿を検査した。実際、この非悪性疾患を有する１０人の患者のうちの７人が、高い膵臓由来ｃｆＤＮＡレベルを有していた（図４Ｃ）。膵炎を発症した患者は腺房細胞と膵管細胞の両方において非メチル化されたマーカー（ＲＥＧ１Ａ）に関してより明確なシグナルを有し、一方、膵臓がんを発症した患者は膵管細胞において選択的に非メチル化されたマーカー（ＣＵＸ２）に関してより強いシグナルを有することがわかったが、これは、それぞれの病理において死滅する細胞のエピジェネティックな個性を潜在的に反映している。まとめると、膵臓外分泌腺のメチル化パターンを保持するｃｆＤＮＡは、膵臓がんおよび膵炎を発症した患者の血液中に存在し、これらの条件における外分泌細胞の死を反映している。

【０２９１】

実施例６

ＡＬＳを発症した患者の血漿中での脳由来ＤＮＡの同定

神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）においては、運動ニューロンが死滅した後、筋肉細胞が死滅する。本発明者らは、脳由来ＤＮＡ断片を、ＡＬＳを発症した患者の循環中で同定することができるかどうかを試験した。図１２に示されるように、健康な個体（ｎ＝１２）においてはシグナルがゼロ近くであるのと比べて、４０％のＡＬＳ患者（ｎ＝２９）が、その血漿中で測定可能なレベルの脳由来ＤＮＡを示した（非メチル化されたＣＧ０９７８［Ｂｒａｉｎ１］の画分に、その血漿中の無細胞ＤＮＡの総量を掛けた値に基づく）。さらに、本発明者らは、ＡＬＳ患者の血漿中でグリアＤＮＡの存在を探した。図１３は、健康な個体におけるシグナルなしと比較して、試験したＡＬＳ患者の７０％（ｎ＝１０）がその血漿中に少なくとも２つのグリアマーカー（ＷＭ１およびＭＢＰ３）を有していたことを示す。これらの知見は、ＡＬＳ患者における白質への損傷に関する臨床報告と一致している。予備分析において、本発明者らはまた、ＡＬＳ患者の血液中で筋肉ＤＮＡを同定した（データは示さない）。かくして、前記アッセイを用いて、疾患進行の診断、モニタリングおよび薬物活性の評価のために、ＡＬＳを発症した患者におけるニューロン、グリア細胞および筋肉細胞の死を検出およびモニタリングすることができる。

【０２９２】

実施例７

グリア芽細胞腫を発症した患者の血漿中でのグリアＤＮＡの同定

グリア芽細胞腫は、グリア細胞を起源とする。本発明者らは、グリアＤＮＡ（ＷＭ１またはＭＢＰ３の非メチル化された断片）の存在についてグリア芽細胞腫を発症した患者の

血漿を検査した。試験したグリア芽細胞腫患者の３０％（ｎ＝１０）が、健康な個体における最小レベルよりも高い明確なシグナルを有することがわかった。かくして、前記方法を用いて、グリア芽細胞腫における細胞死を同定およびモニタリングすることができる。

【０２９３】

実施例８

結腸がんまたはクローン病を発症した患者の血漿中での結腸上皮ＤＮＡの同定

本発明者らは、結腸ＤＮＡのいくつかのマーカーを同定した。これらマーカーは、いずれも他の組織中では非メチル化されているが、結腸中ではメチル化されている、ＣｐＧの非メチル化クラスターを有する。非メチル化された分子の組織分布を、図１４Ａ～Ｄに示す。

【０２９４】

次いで、本発明者らは、これらのマーカーが結腸の疾患を発症した患者の血漿中に存在するかどうかを決定した。図１５に示されるように、健康な個体（ｎ＝８）は、４つのマーカーのいずれかに由来する非常に低レベルの非メチル化ＤＮＡを有する。これは、結腸の正常な代謝回転の間に死滅する細胞が内腔から脱落し、そのＤＮＡが循環に到達しないという着想と一致する。対照的に、結腸がんを有する多くの患者は、その血漿中に高レベルの１～４個の結腸マーカーを有していた。この知見は、血液中での腫瘍特異的突然変異の同定を用いて以前に示されたように、結腸がん細胞の広範な死およびそのＤＮＡの循環への放出と一致している。試験されたクローン病を有する１人の患者も、結腸マーカーについて陽性であったが、これは、広範な病理学的結腸細胞死および血液へのＤＮＡの放出を示唆している。

【０２９５】

かくして、前記方法は、結腸がんまたはクローン病を発症した患者の血液中の結腸ＤＮＡを同定することができる。血液を用いた結腸がんの検出のための現存の方法は患者特異的体細胞変異に依拠するものであるが、本発明の方法は個体間で保存され、がんにおいても見かけ上安定なままである結腸マーカーに依拠するため、普遍的であることに留意されたい。

【０２９６】

実施例９

肺がんを発症した患者の血漿中での肺ＤＮＡの同定

本発明者らは、肺上皮のＤＮＡ中では非メチル化され、他の組織中ではメチル化されている、肺細胞のいくつかのマーカーを同定および検証し、健康な個体の血漿中および肺がんを発症した患者の血漿中のそれらのレベルを試験した。

【０２９７】

図１６は、肺細胞中で特異的に発現され、肺において特異的に非メチル化されている遺伝子である非メチル化ＳＦＴＰ／Ａ１の組織分布を示す。非メチル化ＳＦＴＰ／Ａ１は多くの健康な個体の血漿中には存在しないが、肺がんを有する多くの患者の血漿中には存在することがわかった。

【０２９８】

図１７は、肺細胞中で特異的に発現され、肺において特異的に非メチル化されている別の遺伝子である非メチル化ＳＦＴＰ／Ｃの組織分布を示す。非メチル化ＳＦＴＰ／Ｃは多くの健康な個体の血漿中には存在しないが、肺がんを有する多くの患者の血漿中には存在することがわかった。

【０２９９】

図１８は、肺において特異的に非メチル化されている遺伝子である、非メチル化ＣＨＳＴの組織分布を示す。非メチル化ＣＨＳＴは多くの健康な個体の血漿中には存在しないが、肺がんを有する多くの患者の血漿中には存在することがわかった。

【０３００】

図１９は、肺において特異的に非メチル化されている遺伝子である、非メチル化ＲＡＢ４の組織分布を示す。非メチル化ＲＡＢ４は多くの健康な個体の血漿中には存在しないが

、肺がんを有する多くの患者の血漿中には存在することがわかった。
【０３０１】
肺がん患者の血漿は、１より多い肺マーカーを含有する傾向があることがわかった。この特徴は、肺がん患者の血漿と健康な個体とを区別する。
【０３０２】
実施例１０
運動後の血漿および筋ジストロフィーにおける骨格筋ＤＮＡの同定
本発明者らは、骨格筋中では非メチル化され、他の組織（心臓を含む）中ではメチル化されている骨格筋の３つのメチル化マーカーを同定および検証した。図２０Ａ～Ｃは、これらのマーカー（ＴＮＮ、ＴＰＯおよびＭＡＤ１）の組織分布を示す。
【０３０３】
図２１は、健康な対照の血漿中のこれらのマーカーのうちの２つ（非メチル化ＴＰＯおよびＴＮＮ）のレベルが、ベースラインでの筋肉の非常に低い代謝回転を反映して、非常に低いことを示す（１人の健康な対照はシグナルを示すが、その理由は明らかではない）。集中的身体運動の直後の３人の健康な個体は全て、両マーカーについて明確なシグナルを示し、これは、これらのマーカーによって運動誘導性筋肉細胞死を捕捉することができることを示唆している。デュシェンヌ型またはベッカー型筋ジストロフィー（ＢＭＤまたはＤＭＤ）を有する１５人の患者のうち、５人は、筋肉細胞死を反映する明確なシグナルを示した。かくして、このアッセイを用いて、運動後および病理学的変性状態における骨格筋細胞死を検出およびモニタリングすることができる。
【０３０４】
実施例１１
循環中の血管内皮由来ＤＮＡの同定
内皮細胞のメチル化マーカーを同定するために、本発明者らは、臍帯から選別されたヒト内皮細胞のメチロームを決定した。図２２は、内皮細胞（臍帯に由来する）中では非メチル化されているが、試験される全ての特定の細胞型（リンパ球、および膵臓腺房細胞、アルファ細胞および膵管細胞）中では完全にメチル化されている、内皮細胞の１つのマーカーを示す。組織生検に由来するＤＮＡの約１０％が、このマーカーのメチル化の欠如を示し、これは全ての組織における内皮細胞の存在を反映していた。多くの健康な個体は、その血清中にシグナルを有さないが、これは、内皮細胞の低いベースライン代謝回転を示唆している。月経周期中の女性の血液は、大規模な血管虚脱のため予想されるように高いシグナルを示した。妊娠女性はシグナルを有し、それは子癇前症を有する女性において、より強かった。試験した全てのがん患者は明確なシグナルを示した。
【０３０５】
これらの知見は、前記方法が、例えば、がんまたは他の病理における、および子癇前症などの病理における抗血管形成薬の活性を評価するための、様々な設定における内皮細胞死の同定を可能にすることを示唆する。
【０３０６】
実施例１２
循環中の肝臓由来ＤＮＡの同定
本発明者らは、肝細胞マーカーを同定および検証した。図２３は、アルブミン（ＡＬＢ）のプロモーターが、肝細胞（ならびにある程度は腎臓および膵臓）中で非メチル化されているが、他の場所ではメチル化されていることを示す。健康な個体の血液は、シグナルを含有しないか、または比較的高レベルの非メチル化されたアルブミンプロモーターＤＮＡを含有していたが、これは、肝細胞のベースライン代謝回転またはクリアランスの変動を示唆している。試験した全ての肝炎患者（ｎ＝７）は陽性であったが、これは、前記方法が病理学的肝細胞死を検出することができることを示唆している。
【０３０７】
実施例１３
非リンパ球に由来する無細胞循環ＤＮＡの同定

図２４Ａ～Ｂは、リンパ球中では非メチル化され、他の場所ではメチル化されていると同定されたマーカーを示す。多くの健康な個体の血液中で、多くの分子は非メチル化され、ベースライン条件下で多くの無細胞循環ＤＮＡが死滅しつつある血液細胞に由来するという事実を反映する。しかしながら、集中運動の直後の健康な個体またはがんを発症した患者の血清中では、高レベルのメチル化されたこれらのマーカーが存在し、非リンパ球に由来する無細胞循環ＤＮＡ（見かけ上、運動後の筋肉ＤＮＡおよびがん患者における腫瘍ＤＮＡ）の指標となる。これらのマーカーは、個体における正常からの逸脱：血液以外の組織における細胞死の証拠を、大まかに評価するために使用することができる。

【０３０８】

実施例１４

循環中の腎臓由来ＤＮＡの同定

図２５は、ＡＱＰ（アクアポリン遺伝子の１つに由来する配列）が腎臓細胞中では非メチル化され、血液中ではメチル化されていることを示す。健康な個体は、血液中に非メチル化されたＡＱＰを有さない（おそらく、血液よりもむしろ尿への、腎臓中の死滅しつつある細胞の正常な脱落を反映する）。子癇前症を有する妊娠女性（腎臓損傷を有することが知られる）は、強いシグナルを示した。これらの知見は、この方法を用いて、様々な病状における腎臓細胞死（例えば、敗血症を有するいくらかの患者における急性尿細管壊死）を検出することができることを示す。

【０３０９】

実施例１５

循環中の脂肪細胞ＤＮＡの同定

脂肪細胞の総数は、成人期には一定のままであることが、新しい脂肪細胞がかなり形成されるという証拠と共に示されている。かくして、脂肪細胞形成の速度と等しい速度で脂肪細胞死がなければならないと予測される。

【０３１０】

図２６Ａ～Ｄは、脂肪細胞中では非メチル化され、他の場所ではメチル化されている４個の異なる遺伝子座を示す（ここでは血液についてのみ示される）。

【０３１１】

図２７Ａ～Ｄは、多くの健康な個体の血漿が脂肪細胞ＤＮＡの複数のメチル化マーカーを含有することを示し、進行中の脂肪細胞代謝回転を示し、これらの細胞の連続的な形成および破壊と一致する。かくして、この方法を用いて、例えば、生理学的および病理学的状態ならびにこのプロセスに影響する薬物を試験するために、脂肪細胞死をモニタリングすることができる。

【０３１２】

本発明をその特定の実施形態と共に記載してきたが、多数の代替、改変および変種が当業者に明らかとなることは明白である。したがって、添付の特許請求の範囲の趣旨及び広い範囲内に含まれるそれらの代替、改変及び変種の全てを包含することが意図される。

【０３１３】

それぞれの出版物、特許および特許出願が、参照により本明細書に援用されるように具体的かつ個々に示されるのと同程度に、本明細書に記載のすべての出版物、特許および特許出願は、その全体が参照により本明細書に援用される。さらに、本出願における参考文献の引用または同定は、かかる参考文献が従来技術として本発明に利用可能であるという許可として、解釈すべきではない。セクションの表題が用いられる範囲内で、それらが必ずしも制限されると解釈すべきではない。

【配列表フリーテキスト】

【０３１４】

配列番号１４８５：　１本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド

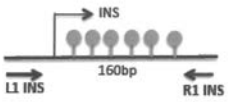
配列番号１４８６：　１本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド

配列番号１４８７：　１本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド

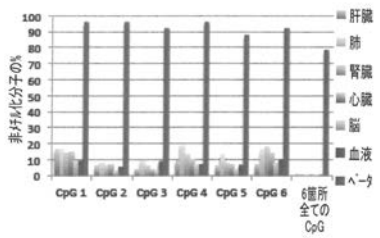
配列番号１４８８：　１本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド

配列番号１４８９：　１本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド
配列番号１４９０：　１本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド
配列番号１４９１：　１本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド
配列番号１４９２：　１本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド
配列番号１４９３：　１本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド
配列番号１４９４：　１本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド
配列番号１４９５：　１本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド
配列番号１４９６：　１本鎖ＤＮＡオリゴヌクレオチド

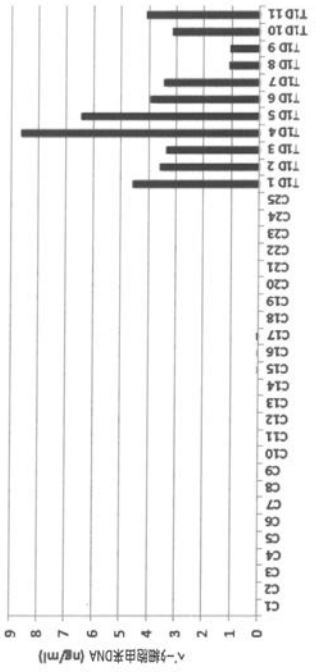
【図１Ａ】



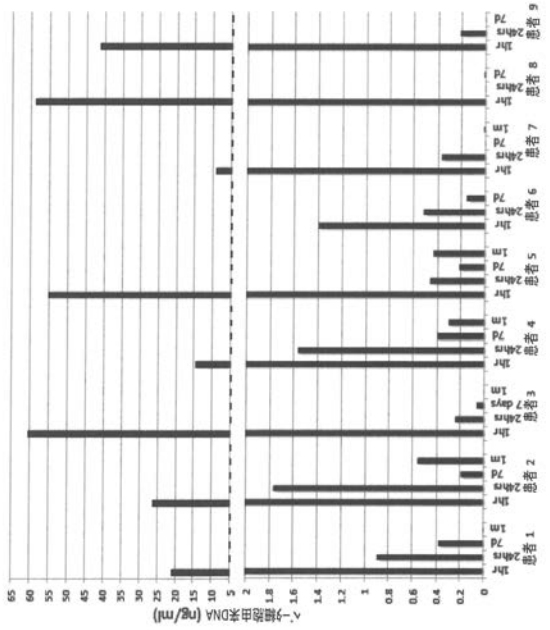
【図１Ｂ】



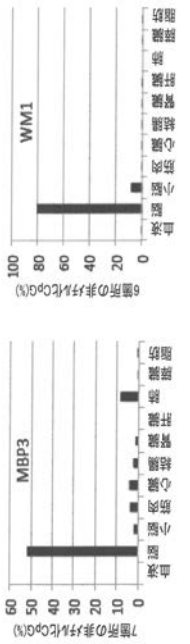
【図１Ｃ】



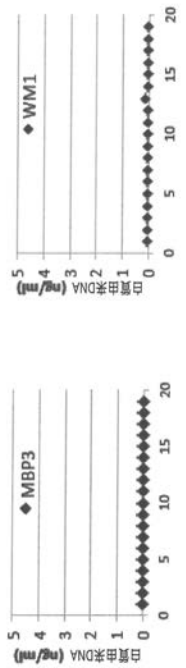
【図１Ｄ】



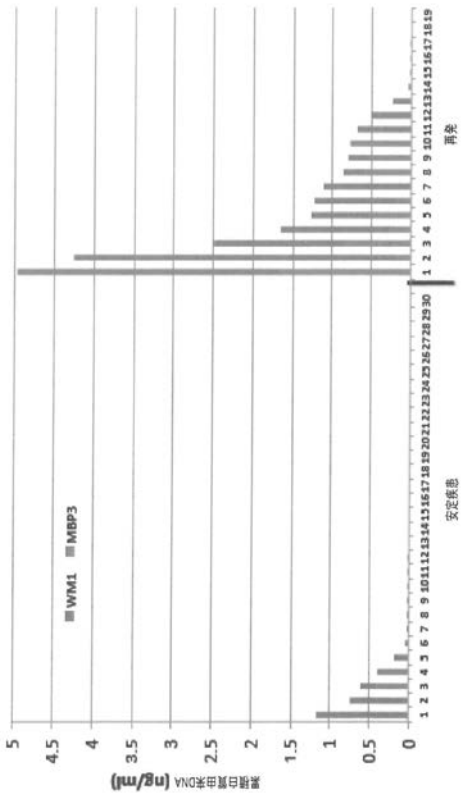
【図２Ａ】



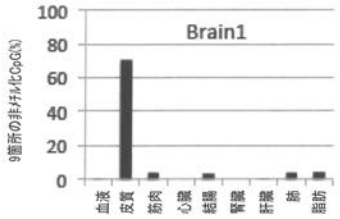
【図２Ｂ】



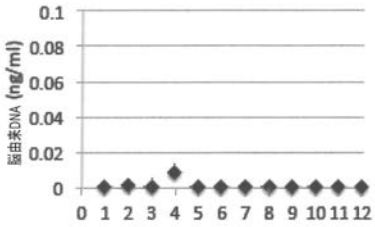
【図２Ｃ】



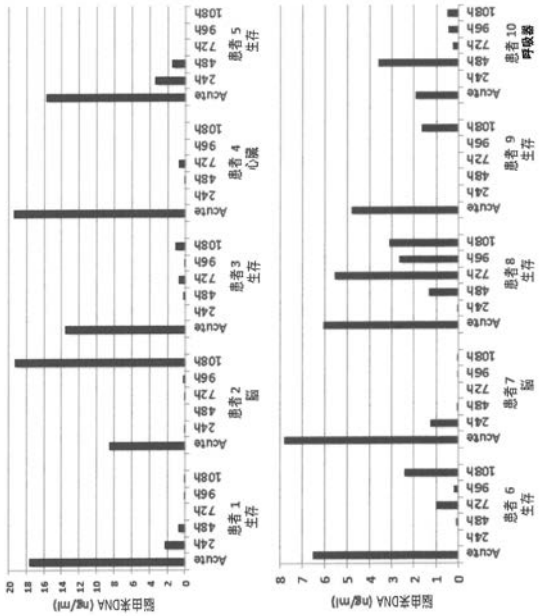
【図３Ａ】



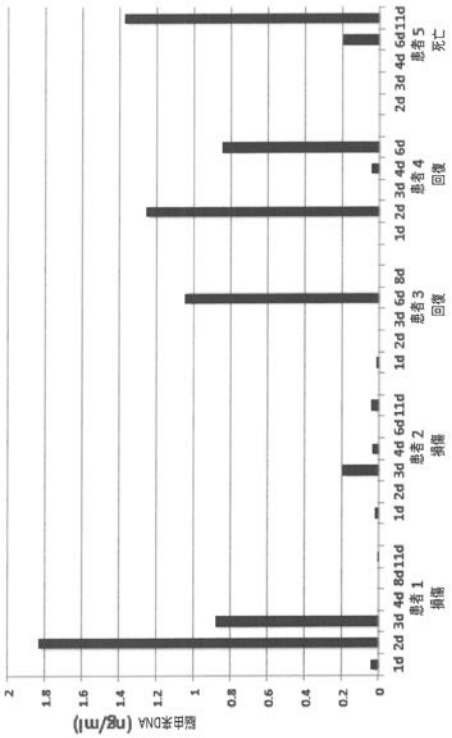
【図３Ｂ】



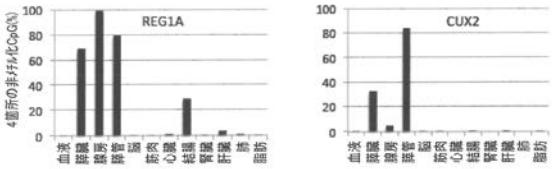
【図３Ｃ】



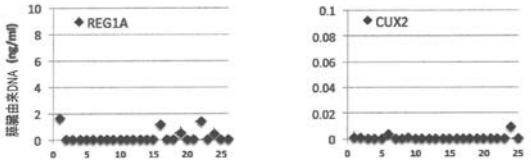
【図３Ｄ】



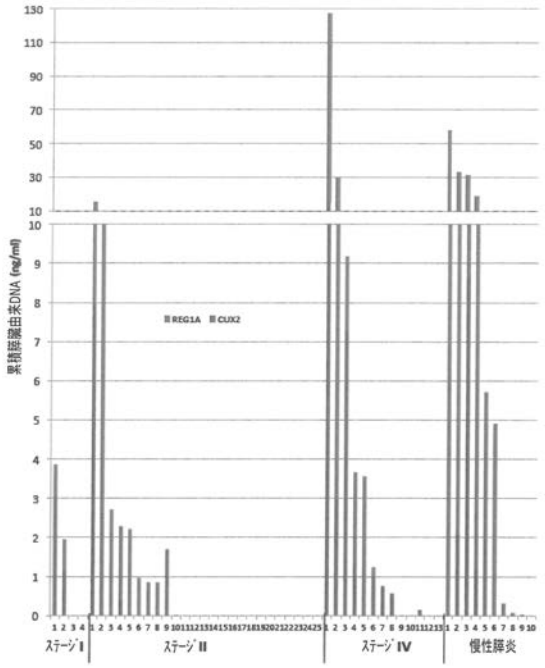
【図４Ａ】



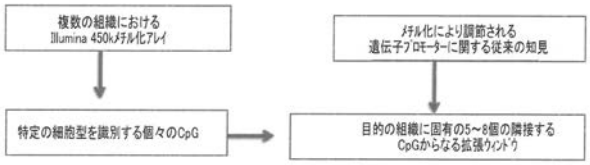
【図４Ｂ】



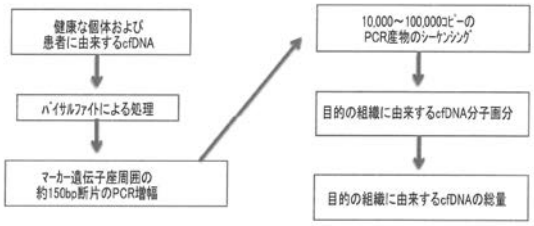
【図４Ｃ】



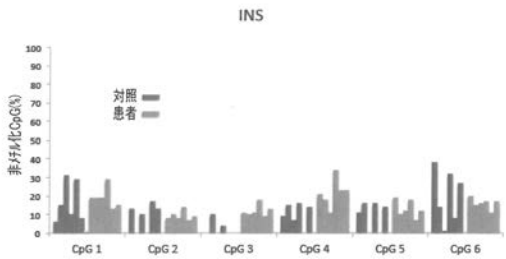
【図５Ａ】



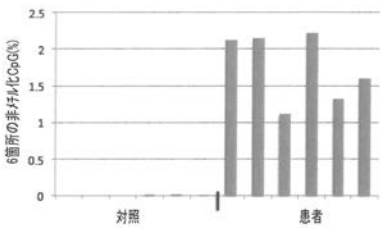
【図５Ｂ】



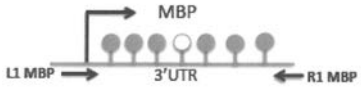
【図６Ａ】



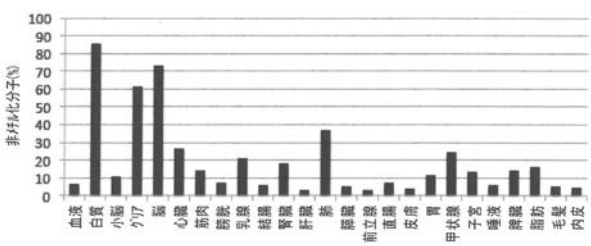
【図６Ｂ】



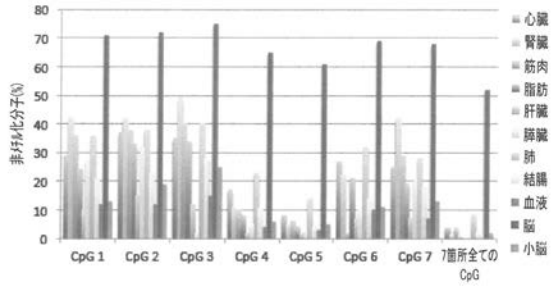
【図７Ａ】



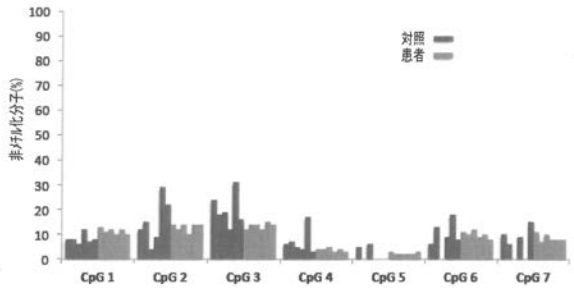
【図７Ｂ】



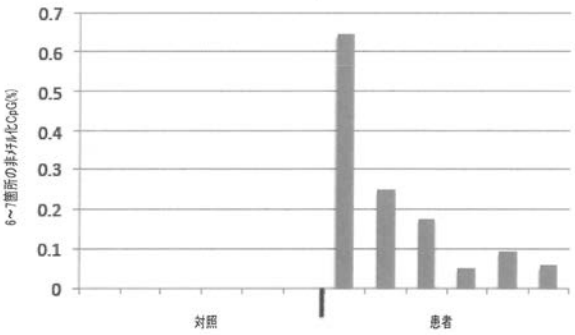
【図７Ｃ】



【図７Ｄ】



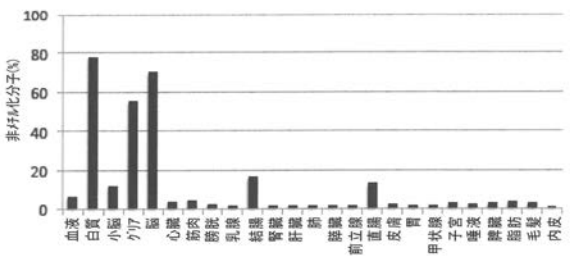
【図７Ｅ】



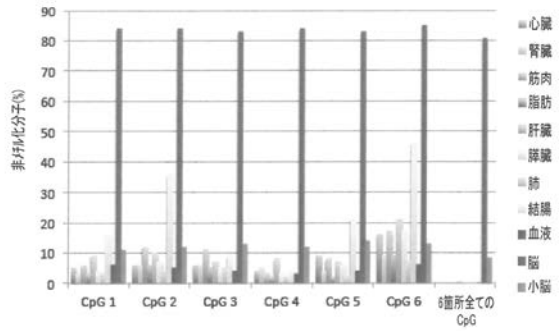
【図８Ａ】



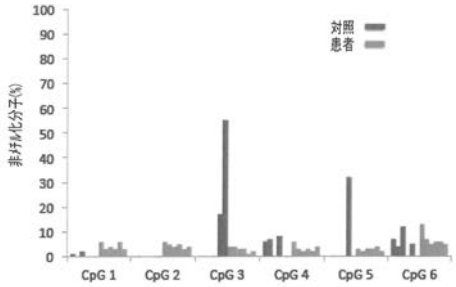
【図８Ｂ】



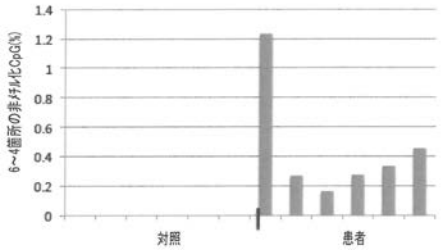
【図８Ｃ】



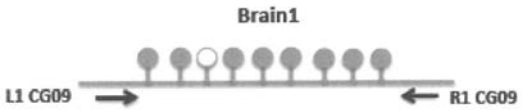
【図８Ｄ】



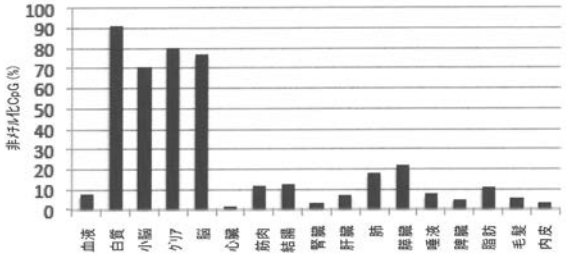
【図８Ｅ】



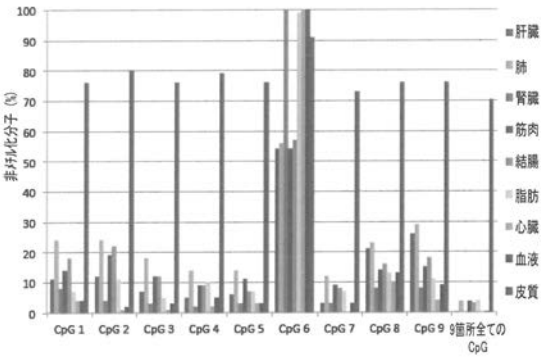
【図９Ａ】



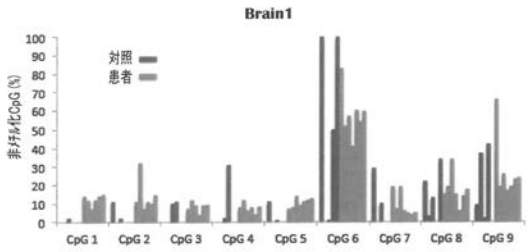
【図９Ｂ】



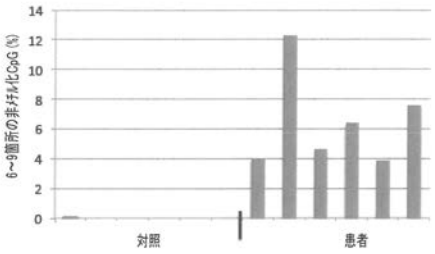
【図９Ｃ】



【図９Ｄ】



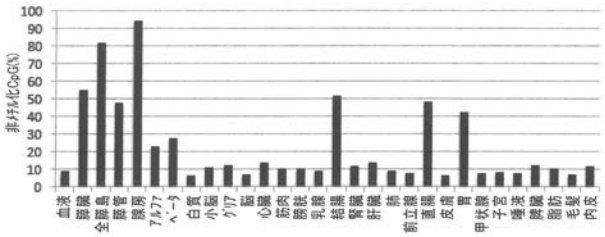
【図９Ｅ】



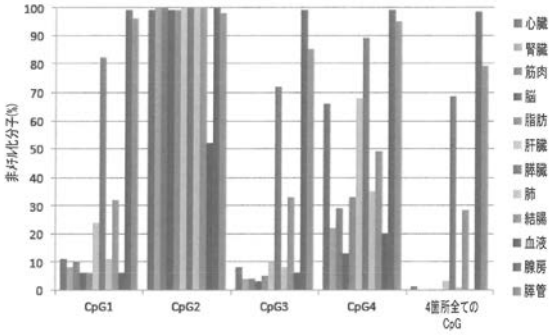
【図１０Ａ】



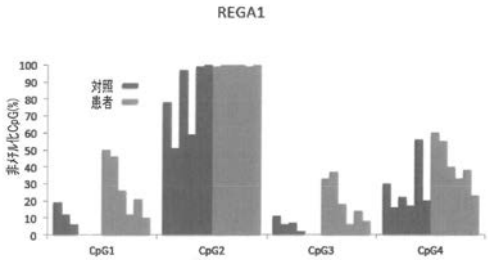
【図１０Ｂ】



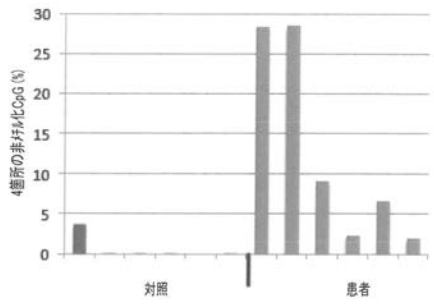
【図１０Ｃ】



【図１０Ｄ】



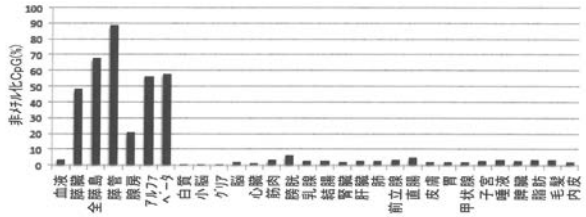
【図１０Ｅ】



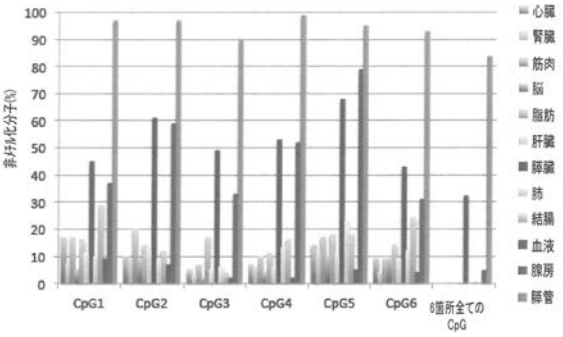
【図１１Ａ】



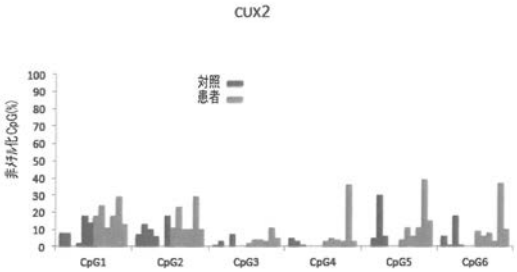
【図１１Ｂ】



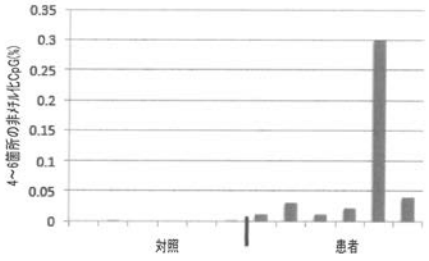
【図１１Ｃ】



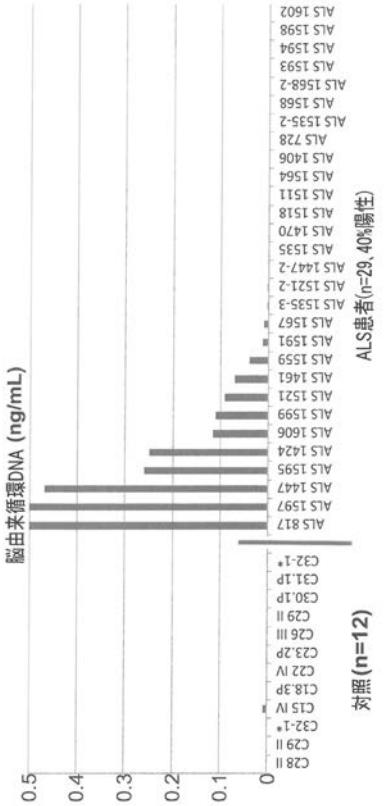
【図１１Ｄ】



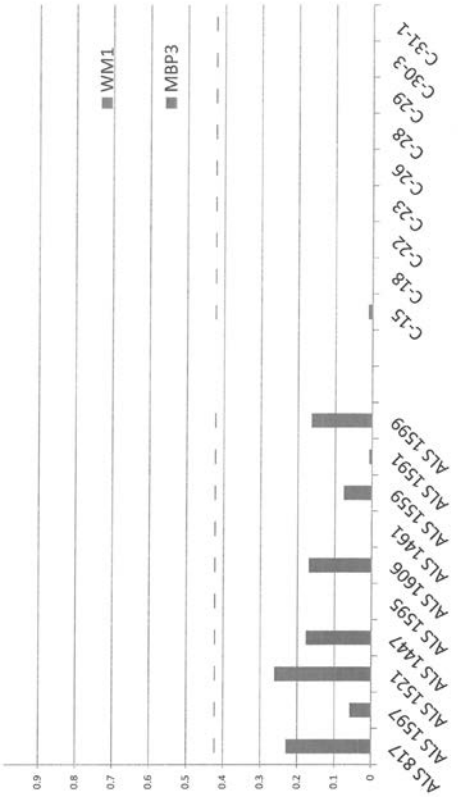
【図１１Ｅ】



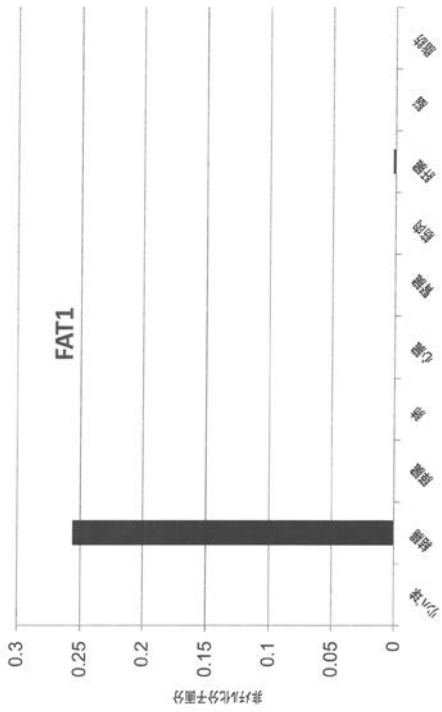
【図１２】



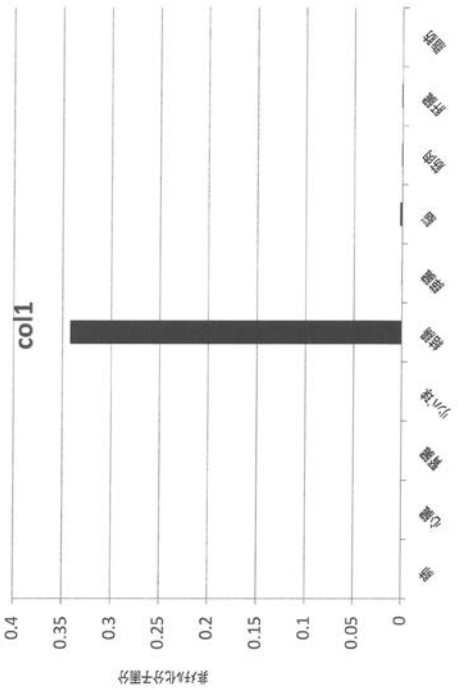
【図１３】



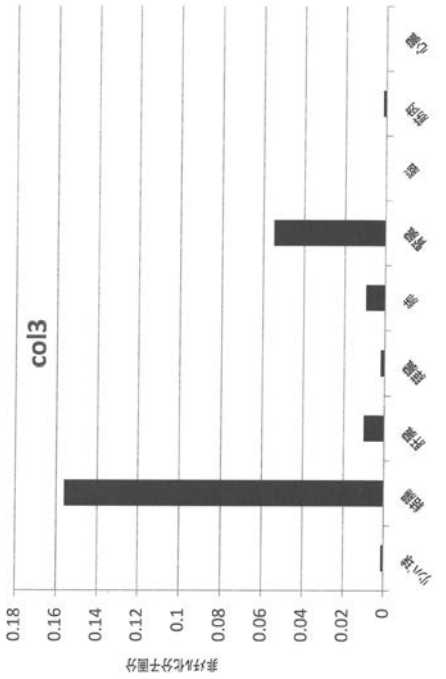
【図１４Ａ】



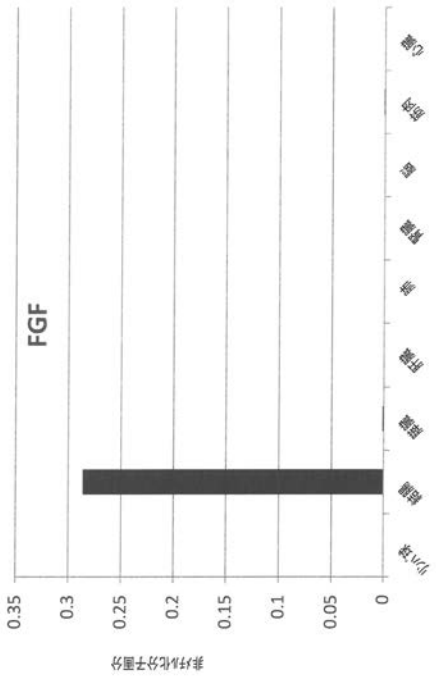
【図１４Ｂ】



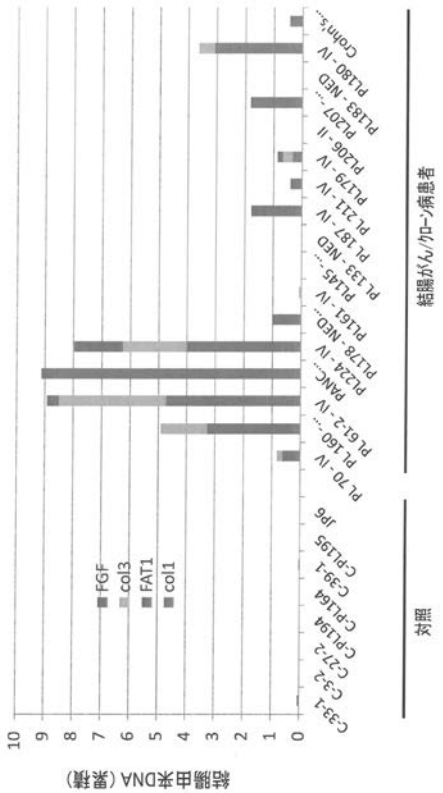
【図１４Ｃ】



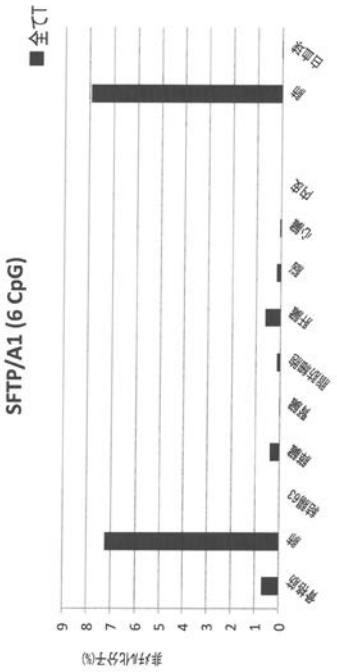
【図１４Ｄ】



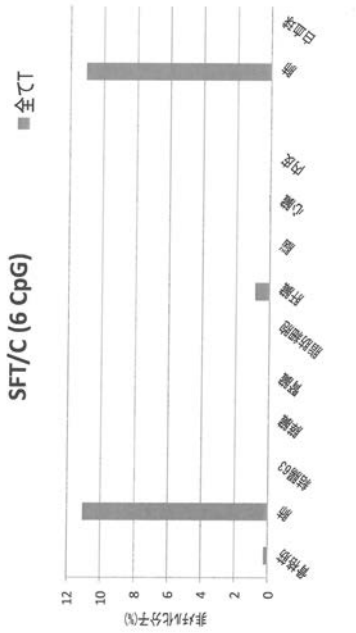
【図１５】



【図１６】



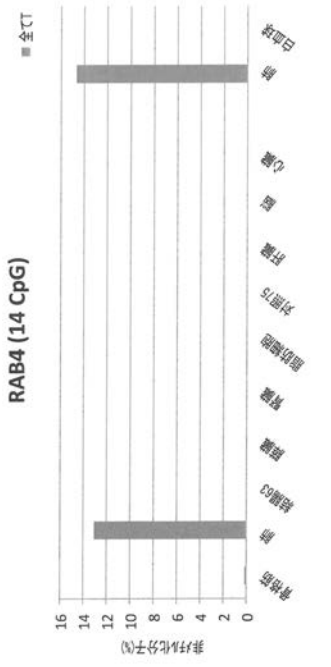
【図１７】



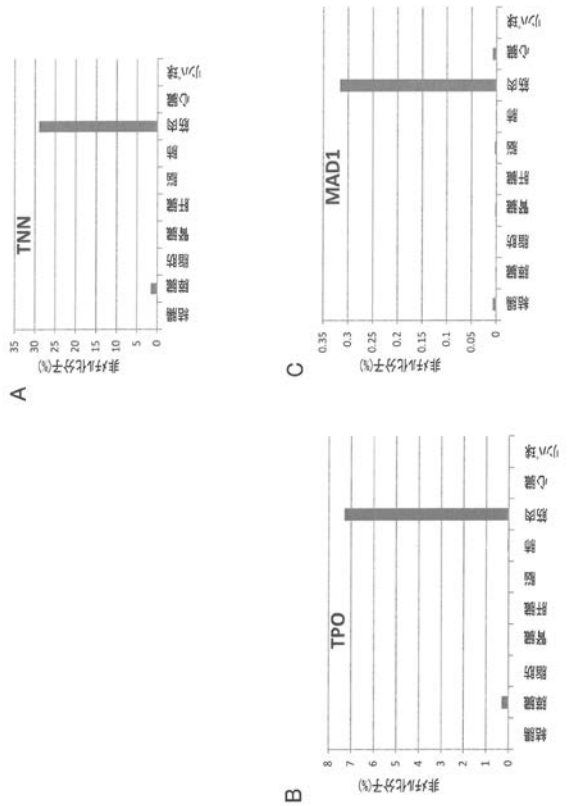
【図１８】



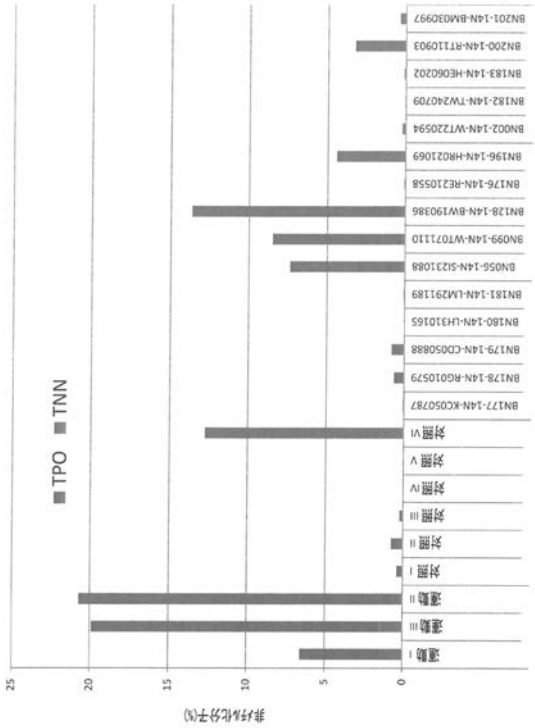
【図１９】



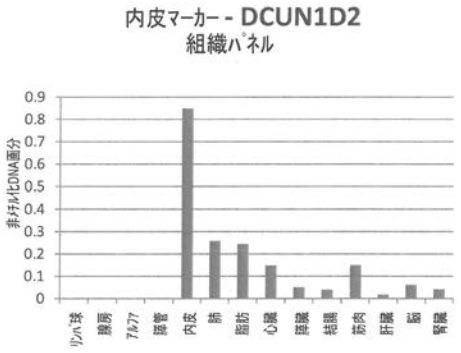
【図２０】



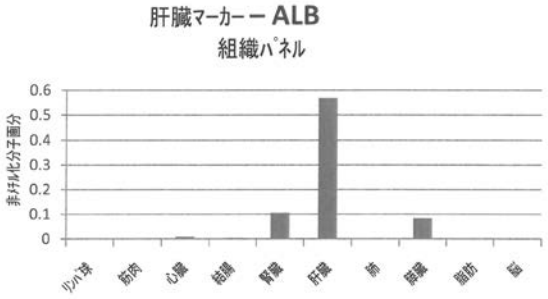
【図２１】



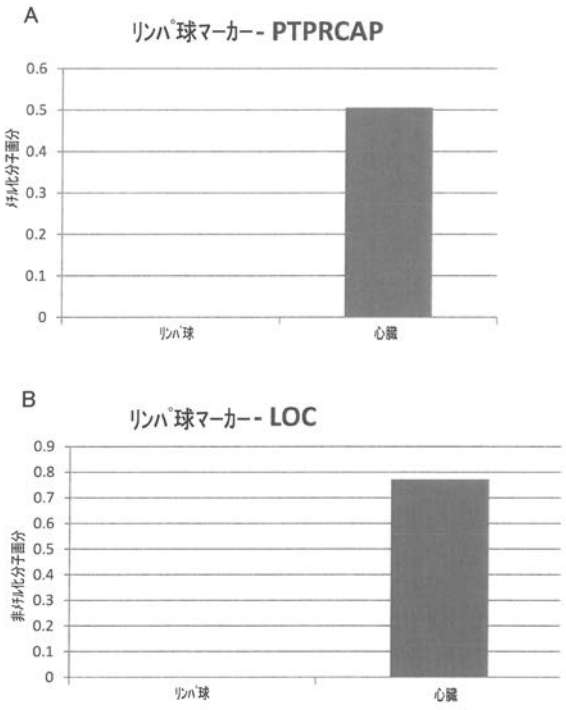
【図２２】



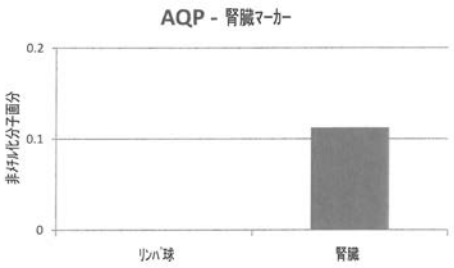
【図２３】



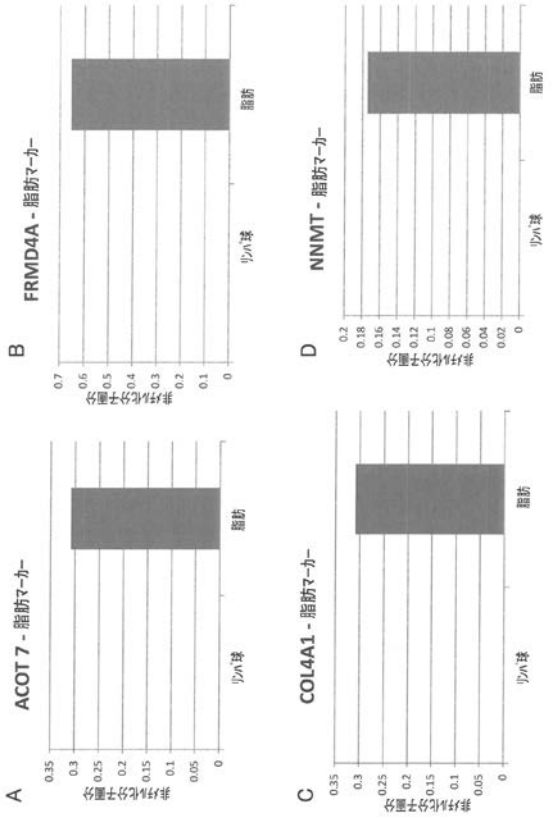
【図２４】



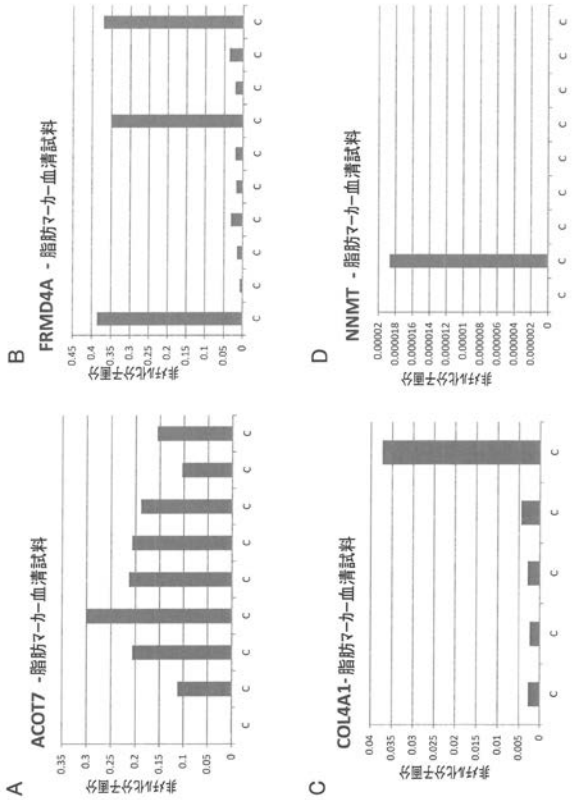
【図２５】


AQP - 腎臓マーカー
非メチル化分子画分
0.2
0.1
0
リンパ球
腎臓

【図２６】


A
ACOT 7 - 脂肪マーカー
B
FRMD4A - 脂肪マーカー
C
COL4A1 - 脂肪マーカー
D
NNMT - 脂肪マーカー
非メチル化分子画分
リンパ球
脂肪

【図２７】


A
ACOT7 -脂肪マーカー-血清試料
B
FRMD4A - 脂肪マーカー-血清試料
C
COL4A1-脂肪マーカー-血清試料
D
NNMT - 脂肪マーカー-血清試料
非メチル化分子画分

【配列表】
2017511142000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IL2015/050403

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68 C12N15
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 C12N

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, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TANIA MADI ET AL: "The determination of tissue-specific DNA methylation patterns in forensic biofluids using bisulfite modification and pyrosequencing", ELECTROPHORESIS, vol. 33, no. 12, 28 June 2012 (2012-06-28) , pages 1736-1745, XP055197910, ISSN: 0173-0835, DOI: 10.1002/elps.201100711	2-5, 7-13, 17-22, 26-37, 39,40,42
Y	abstract tables 1,3,5 Materials and methods, sectinos 2.2, 2.4 and 2.5 Discussion	38,41
	----- -/--	

[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
26 June 2015	14/10/2015

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	Schmitt-Humbert, C

3

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IL2015/050403

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOHAMED I. HUSSEINY ET AL: "Development of a Quantitative Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction Method for Monitoring Beta Cell Death in Type 1 Diabetes", PLOS ONE, vol. 7, no. 10, 29 October 2012 (2012-10-29), page e47942, XP055131207, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0047942	2,4,7-9, 11-13, 17-27, 29-32, 34-37,42
Y	abstract table 1 figure 1 page 3, column 1, last paragraph - column 2, paragraph 1 section "detection of circulating beta cell-specific DNA by qMSP in mouse blood; page 6 page 8, column 2, paragraph 2	38,41

X	MOHAMED I. HUSSEINY ET AL: "Tissue-Specific Methylation of Human Insulin Gene and PCR Assay for Monitoring Beta Cell Death", PLOS ONE, vol. 9, no. 4, 10 April 2014 (2014-04-10), page e94591, XP055197433, DOI: 10.1371/journal.pone.0094591	1-4,6-9, 11-27, 30-32, 34-37,42
Y	abstract results figure 4 page 2, column 2, paragraph 2 -& MOHAMED I. HUSSEINY ET AL: "Table S1. Oligonucleotides used in this study.", PLOS ONE, vol. 9, no. 4, 10 April 2014 (2014-04-10), XP002741463, DOI: 10.1371/journal.pone.0094591.s005	38,41

X	WO 99/18124 A1 (MERCK & CO INC [US]; CUMMINGS RICHARD T [US]; HERMES JEFFREY D [US]; M) 15 April 1999 (1999-04-15) example 1 sequences 9,11 figure 7B	31

	-/--	

3

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IL2015/050403

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. LEBASTCHI ET AL: "Immune Therapy and -Cell Death in Type 1 Diabetes", DIABETES, vol. 62, no. 5, 19 February 2013 (2013-02-19), pages 1676-1680, XP055197604, ISSN: 0012-1797, DOI: 10.2337/db12-1207 abstract figure 1 research design and methods	2,4,5, 7-10, 14-26
X	WO 2005/118852 A2 (UNIV HONG KONG CHINESE [CN]; LO YUK MING DENNIS [CN]; CHIU ROSSA WAI K) 15 December 2005 (2005-12-15)	2,4,5, 7-10, 14-37, 40,42
Y	paragraph [0081] - paragraph [0084] paragraph [0093] - paragraph [0098] example	38,41
Y	MEGAN L MCCLOSKEY ET AL: "Encoding PCR Products with Batch-stamps and Barcodes", BIOCHEMICAL GENETICS, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 45, no. 11-12, 23 October 2007 (2007-10-23), pages 761-767, XP019548696, ISSN: 1573-4927, DOI: 10.1007/S10528-007-9114-X abstract	38,41
Y	Anonymous: "EpiGnome(TM)Methyl-SeqKit", , 1 August 2013 (2013-08-01), XP055198537, Retrieved from the Internet: URL:https://www.westburg.eu/products/genomics-research/next-generation-sequencing/dna-sequencing/methyl-seq-bisulfite-sequencing/$11289 [retrieved on 2015-06-26] the whole document	38,41
X	DATABASE EMBL [Online] 6 April 1998 (1998-04-06), "Homo sapiens chromosome 16, cosmid clone 400H11 (LANL), complete sequence.", XP002741448, retrieved from EBI accession no. EM_STD:AC004495 Database accession no. AC004495 sequence	31

-/--

3

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IL2015/050403

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VARDHMAN K. RAKYAN ET AL: "Epigenome-wide association studies for common human diseases", NATURE REVIEWS GENETICS, vol. 12, no. 8, 12 July 2011 (2011-07-12), pages 529-541, XP055197423, ISSN: 1471-0056, DOI: 10.1038/nrg3000 the whole document -----	1-42
X	AYELET AVRAHAM ET AL: "Tissue Specific DNA Methylation in Normal Human Breast Epithelium and in Breast Cancer", PLOS ONE, vol. 9, no. 3, 20 March 2014 (2014-03-20), page e91805, XP055197434, DOI: 10.1371/journal.pone.0091805 abstract page 2, column 2, last paragraph - page 3, column 2, paragraph 1 table S4 -& AYELET AVRAHAM ET AL: "Table S4. TRIM29 CpG island genomic sequence, Illumina probes details and primers for Q-MSP and RT-PCR.", , 20 March 2014 (2014-03-20), XP002741464, DOI: 10.1371/journal.pone.0091805.s005 Retrieved from the Internet: URL:http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0091805#s5 the whole document -----	2-9, 14-16, 19-24, 26-30, 34-37,42
A	EP 1 342 794 A1 (EPIGENOMICS AG [DE]) 10 September 2003 (2003-09-10) the whole document -----	1-42

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IL2015/050403

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-42(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/IL2015/050403

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-42(partially)

Methods of detecting death of a cell type or tissue in a subject, identifying a methylation signature for a cell type or tissue of interest or determining whether DNA is derived from a cell type or tissue of interest in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides; more specifically wherein the cell type is a pancreatic beta cell and kits for identifying the source of DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides, more particularly for identifying beta cells based on a DNA sequence comprised in SEQ ID NO: 1.

2-54. claims: 1-42(partially)

Methods of detecting death of a pancreatic beta cell in a subject, identifying a methylation signature for a pancreatic beta cell or determining whether DNA is derived from a pancreatic beta in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying beta cell DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in SEQ ID NO: X,
wherein in invention 2, SEQ ID NO: X is SEQ ID NO: 2; in invention 3, SEQ ID NO: X is SEQID NO: 3, ..., in invention 54, SEQ ID NO: X is SEQ ID NO: 1244.

---

55. claims: 1-42(partially)

Methods of detecting death of a pancreatic ductal cell in a subject, identifying a methylation signature for a pancreatic ductal cell or determining whether DNA is derived from a pancreatic ductal cell in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying pancreatic ductal cell DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in any one of SEQ ID NO: 51-150.

---

56. claims: 1-42(partially)

International Application No. PCT/IL2015/050403

Methods of detecting death of a liver cell/tissue in a subject, identifying a methylation signature for a liver cell/tissue or determining whether DNA is derived from a liver cell/tissue in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying liver cell/tissue DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in any one of SEQ ID NO: 151-173 and 1267.

---

57. claims: 1-42(partially)

Methods of detecting death of a lung cell/tissue in a subject, identifying a methylation signature for a lung cell/tissue or determining whether DNA is derived from a lung cell/tissue in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying lung cell/tissue DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in any one of SEQ ID NO: 198-203 and 1268-1273.

---

58. claims: 1-42(partially)

Methods of detecting death of an uterus cell/tissue in a subject, identifying a methylation signature for an uterus cell/tissue or determining whether DNA is derived from an uterus cell/tissue in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying uterus cell/tissue DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in any one of SEQ ID NO: 204-237.

---

59. claims: 1-42(partially)

Methods of detecting death of a kidney cell/tissue in a subject, identifying a methylation signature for a kidney cell/tissue or determining whether DNA is derived from a kidney cell/tissue in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying kidney cell/tissue DNA comprising oligonucleotides capable of

detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in any one of SEQ ID NO: 238-273 and 1266.

---

60. claims: 1-42(partially)

Methods of detecting death of a breast cell/tissue in a subject, identifying a methylation signature for a breast cell/tissue or determining whether DNA is derived from a breast cell/tissue in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying breast cell/tissue DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in any one of SEQ ID NO: 274-290.

---

61. claims: 1-42(partially)

Methods of detecting death of an adipocyte in a subject, identifying a methylation signature for an adipocyte or determining whether DNA is derived from an adipocyte in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying adipocyte DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in any one of SEQ ID NO: 291-338 and 1262-1265.

---

62. claims: 1-42(partially)

Methods of detecting death of a colon/rectum cell/tissue in a subject, identifying a methylation signature for a colon/rectum cell/tissue or determining whether DNA is derived from a colon/rectum cell/tissue in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying colon/rectum cell/tissue DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in any one of SEQ ID NO: 339-377, 1257-1260 and 1365-1385.

---

63. claims: 1-42(partially)

Methods of detecting death of a prostate cell/tissue in a

International Application No. PCT/IL2015/050403

subject, identifying a methylation signature for a prostate cell/tissue or determining whether DNA is derived from a prostate cell/tissue in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying prostate cell/tissue DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in any one of SEQ ID NO: 378-443.

---

64. claims: 1-42(partially)

Methods of detecting death of a thyroid cell/tissue in a subject, identifying a methylation signature for a thyroid cell/tissue or determining whether DNA is derived from a thyroid cell/tissue in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying thyroid cell/tissue DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in any one of SEQ ID NO: 444-501.

---

65. claims: 1-42(partially)

Methods of detecting death of a bladder cell/tissue in a subject, identifying a methylation signature for a bladder cell/tissue or determining whether DNA is derived from a bladder cell/tissue in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying bladder cell/tissue DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in any one of SEQ ID NO: 502-509.

---

66. claims: 1-42(partially)

Methods of detecting death of a islet cell/tissue in a subject, identifying a methylation signature for a islet cell/tissue or determining whether DNA is derived from a islet cell/tissue in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying islet cell/tissue DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in any one of SEQ ID NO: 510-746.

International Application No. PCT/IL2015/050403

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

---

67. claims: 1-42(partially)

Methods of detecting death of a skeletal muscle cell/tissue in a subject, identifying a methylation signature for a skeletal muscle cell/tissue or determining whether DNA is derived from a skeletal muscle cell/tissue in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying skeletal muscle cell/tissue DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in any one of SEQ ID NO: 747-767 and 1276-1279.

---

68. claims: 1-42(partially)

Methods of detecting death of a pancreatic cell/tissue in a subject, identifying a methylation signature for a pancreatic cell/tissue or determining whether DNA is derived from a pancreatic cell/tissue in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying pancreatic cell/tissue DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in any one of SEQ ID NO: 818-863 and 1280-1284.

---

69. claims: 1-42(partially)

Methods of detecting death of a brain cell/tissue in a subject, identifying a methylation signature for a brain cell/tissue or determining whether DNA is derived from a brain cell/tissue in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying brain cell/tissue DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in any one of SEQ ID NO: 864-1012, 1285-1364 and 1245-1256.

---

70. claims: 1-23, 25-42(all partially)

Methods of detecting death of a blood cell in a subject, identifying a methylation signature for a blood cell or determining whether DNA is derived from a blood cell in a

International Application No. PCT/IL2015/050403

sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying blood cell DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in any one of SEQ ID NO: 1013-1137 and 1274-1275.

---

71. claims: 1-42(partially)

Methods of detecting death of a cervical cell/tissue in a subject, identifying a methylation signature for a cervical cell/tissue or determining whether DNA is derived from a cervical cell/tissue in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying cervical cell/tissue DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in any one of SEQ ID NO: 1138-1214.

---

72. claims: 1-42(partially)

Methods of detecting death of a retinal cell/tissue in a subject, identifying a methylation signature for a retinal cell/tissue or determining whether DNA is derived from a retinal cell/tissue in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying retinal cell/tissue DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in any one of SEQ ID NO: 1217-1240.

---

73. claims: 1-42(partially)

Methods of detecting death of a cardiac cell/tissue in a subject, identifying a methylation signature for a cardiac cell/tissue or determining whether DNA is derived from a cardiac cell/tissue in a sample, said methods being based on ascertaining the methylation status of at least four methylation sites on a continuous DNA sequence of no more than 300 nucleotides and kits for identifying cardiac cell/tissue DNA comprising oligonucleotides capable of detecting the methylation status of at least four methylation sites on a nucleic acid sequence of no more than 300 nucleotides comprised in any one of SEQ ID NO:

International Application No. PCT/IL2015/050403

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

1386-1484.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IL2015/050403

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9918124 A1	15-04-1999	CA 2305711 A1	15-04-1999
		EP 1021462 A1	26-07-2000
		JP 2001519525 A	23-10-2001
		WO 9918124 A1	15-04-1999
WO 2005118852 A2	15-12-2005	AU 2005250223 A1	15-12-2005
		CA 2568755 A1	15-12-2005
		EP 1751307 A2	14-02-2007
		HK 1102196 A1	06-12-2013
		US 2006019278 A1	26-01-2006
		US 2010323352 A1	23-12-2010
		US 2012003650 A1	05-01-2012
		WO 2005118852 A2	15-12-2005
EP 1342794 A1	10-09-2003	AT 312946 T	15-12-2005
		AU 2003218691 A1	16-09-2003
		CA 2478493 A1	12-09-2003
		DE 60207979 T2	28-09-2006
		DK 1342794 T3	24-04-2006
		EP 1342794 A1	10-09-2003
		EP 1483410 A1	08-12-2004
		ES 2253461 T3	01-06-2006
		JP 4727149 B2	20-07-2011
		JP 2005518809 A	30-06-2005
		US 2005221314 A1	06-10-2005
		WO 03074730 A1	12-09-2003

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(81)指定国 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,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,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,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100105050
弁理士 鷲田 公一
(72)発明者 ドル ユヴァル
イスラエル国 エルサレム アイン－ケレム シャウル バーカリ ストリート ２１エー
(72)発明者 シェメル ルス
イスラエル国 メヴァッセレト ザイオン ハスノニット ストリート １０
(72)発明者 グレイザー ベンジャミン
イスラエル国 エルサレム ハラヴ シュレム ストリート １３／２３

Ｆターム(参考) 4B029 AA07 BB11 BB20 CC02 CC08 FA01 FA12 FA15 GB10
4B063 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55
QR62 QR72 QR77 QS02 QS07 QS25 QS34 QX01