

(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2012-511917

(P2012-511917A)

(43) 公表日 **平成24年5月31日(2012.5.31)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A Z	4 B O 2 4
G O 1 N 37/00 (2006.01)	G O 1 N 37/00 1 O 2	4 B O 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2011-541165 (P2011-541165)	(71) 出願人	511145937 エピオンティス ゲーエムベーハー ドイツ, 1 2 4 8 9 ベルリン, ルードア ー ショッセ 2 9
(86) (22) 出願日	平成21年12月8日 (2009.12.8)	(74) 代理人	100088904 弁理士 庄司 隆
(85) 翻訳文提出日	平成23年8月1日 (2011.8.1)	(74) 代理人	100124453 弁理士 資延 由利子
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/008764	(74) 代理人	100135208 弁理士 大杉 卓也
(87) 国際公開番号	W02010/069499	(74) 代理人	100152319 弁理士 曾我 亜紀
(87) 国際公開日	平成22年6月24日 (2010.6.24)	(72) 発明者	オレク, スフェン ドイツ, 1 2 2 0 7 ベルリン, ポオート シュトラーセ 1 6
(31) 優先権主張番号	08021838.1		
(32) 優先日	平成20年12月16日 (2008.12.16)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1型の血液細胞成分の同定のためのエピジェネティックマーカー

(57) 【要約】

本発明は、CD3a/b/c/d/g遺伝子中の少なくとも1つのCpG位置、特にその「上流」調節領域、特に遺伝子cd3のプロモーター領域及び他の保存領域のメチル化状態分析を含み、分析試料中の少なくとも1つのCpGの少なくとも90%の脱メチル化が記憶及びナイーブCD4 Tリンパ球、及び/又は記憶及び/又はナイーブTリンパ球の指標となる、哺乳動物のCD3CD4陽性Tリンパ球を同定する方法、特にインビトロ方法に関する。さらに、本発明はTリンパ球の検出及び品質保証及び制御のための遺伝子CD3a/b/c/dのDNAメチル化分析の使用に関する。さらに、本発明は上記の方法を行うためのキット及びそのそれぞれの使用に関する。好ましい実施形態では、本発明は、採取直後でない血液試料又は血清試料といった品質が最適以下の試料からであっても正確な分析を可能にする、遺伝子CD3中の少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態を分析する改善された方法をさらに提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物に由来する試料においてTリンパ球を同定する方法であって、CD3⁺、CD3⁺及びCD3⁺、又はSLA2、CHRNA3、C16orf24、LCK、FASLG、CD7、SIT1、IL32、CXCR6、UBASH3A、GRAP2、ITGB7若しくはTXKの遺伝子の1つ又は複数における少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態を分析することを含み、前記試料における少なくとも1つのCpG位置の少なくとも90%の脱メチル化が、CD3⁺Tリンパ球細胞、特にCD3⁺CD4⁺Tリンパ球細胞及び/又はCD3⁺CD8⁺Tリンパ球細胞の指標となる、方法。

【請求項 2】

前記試料における前記少なくとも1つのCpG位置が91%超、好ましくは92%超、最も好ましくは95%超脱メチル化されている、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記少なくとも1つのCpG位置が、CD3遺伝領域内の転写開始部位、プロモーター領域、イントロン及び/又はエクソン/イントロン境界より上流の5'領域に存在する、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

前記少なくとも1つのCpG位置が、配列番号6に記載の1405番の増幅産物、配列番号7に記載の1406番の増幅産物、及び/又は配列番号8に記載の1408番の増幅産物の領域を含むCD3⁺、CD3⁺、CD3⁺遺伝子の調節領域に見られる、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 5】

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

【請求項 6】

CD4⁺及び/又はCD8⁺、特にCD8⁺の遺伝子中の、又はGNGT2、CRTAM、IL2RB及びZBTB32、又はFLJ00060、FLJ38379、PPP6C、CD226、ZBTB7B及びTNFAIP8の遺伝子中の少なくとも1つのCpG位置のメチル化分析をさらに含む、請求項1~5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記方法が日常的適用、例えばDNAチップ上で好適である、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記同定が前記Tリンパ球と、全ての主要な末梢血細胞型又は非血液細胞とを区別することを含む、請求項1~7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記試料が、ヒト血液試料を含む哺乳動物の体液、又は組織、器官若しくは細胞型の血液試料、血中リンパ球の試料若しくはその画分から選択される、請求項1~8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

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

【請求項 11】

同定された前記Tリンパ球に基づいて、前記哺乳動物の免疫状態を決定する工程をさらに含む、請求項1~10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

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

10

20

30

40

50

【請求項 13】

哺乳動物においてCD3⁺Tリンパ球、特にCD3⁺CD4⁺Tリンパ球又はCD3⁺CD8⁺Tリンパ球のレベルをモニタリングする方法であって、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法、並びに同定されたTリンパ球の量を、同じ哺乳動物から採取した初期試料、及び/又は対照試料と比較することを含む、方法。

【請求項 14】

前記哺乳動物が自己免疫疾患、移植片拒絶反応、癌及び/又はアレルギーを患っているか、又はそれらを患う可能性がある、請求項13に記載の方法。

【請求項 15】

前記Tリンパ球の量を、前記哺乳動物に与える化学物質及び/又は生物学的物質に応じて測定及び/又はモニタリングすることをさらに含む、請求項12～14のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 16】

配列番号2～配列番号5のいずれかに記載のオリゴマー、又は図2に記載の1405番の増幅産物、図3に記載の1406番の増幅産物、及び図5に記載の1408番の増幅産物。

【請求項 17】

哺乳動物においてCD3⁺Tリンパ球、特にCD3⁺CD4⁺Tリンパ球、又はCD3⁺CD8⁺Tリンパ球を、遺伝子CD3中のCpG位置のメチル化状態の分析に基づいて同定及び/又はモニタリングするキットであって、請求項1～16のいずれか一項に記載の方法を行うための材料を含む、キット。

20

【請求項 18】

a) パイサルファイト試薬、並びにb) 配列番号6に記載の1405番の増幅産物、配列番号7に記載の1406番の増幅産物、及び配列番号8に記載の1408番の増幅産物の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9及び10からなる位置から選択されるCpG位置のメチル化分析のための材料を含む、請求項16に記載のキット。

【請求項 19】

哺乳動物においてCD3⁺CD4⁺Tリンパ球又はCD3⁺CD8⁺Tリンパ球を同定及び/又はモニタリングするための、請求項16に記載のオリゴマー若しくは増幅産物、又は請求項17若しくは18に記載のキットの使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、CD3 / / 遺伝子中の少なくとも1つのCpG位置、特にそれらの「上流」調節領域、特にCD3遺伝子のプロモーター領域及び他の保存領域のメチル化状態を分析することを含み、分析された試料中の少なくとも1つのCpGの少なくとも90%の脱メチル化が記憶及びナイーブCD4⁺Tリンパ球並びに記憶及びナイーブCD8⁺Tリンパ球の指標となる、哺乳動物のCD3⁺CD4⁺陽性Tリンパ球及び/又はCD3⁺CD8⁺陽性Tリンパ球を同定する方法、特に*in vitro*方法に関する。本発明は、同様に全てのCD3⁺陽性Tリンパ球の明確な同定を可能にする、遺伝子SLA2、CHRNA3、C16orf24、LCK、FASLG、CD7、SIT1、IL32、CXCR6、UBASH3A、GRAP2、ITGB7及びTXK中の少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態の分析にさらに関する。全てのCD8⁺細胞のさらに明確な同定については、GNGT2、CRTAM、IL2RB及びZBTB32の同等の分析を利用することもできる。これらのマーカーによって、CD3⁺陽性Tリンパ球の中でCD8⁺陽性細胞とCD4⁺陽性細胞とを分離することが可能である。同様に(Equivalently)、FLJ00060、FLJ38379、PPP6C、CD226、ZBTB7B及びTNFAIP8によって、全血においてCD4⁺発現細胞を確実に同定し、CD4⁺陽性CD3⁺陽性細胞とCD8⁺陽性CD3⁺陽性細胞とを分離することが可能である。

40

【0002】

50

さらに、本発明は、Tリンパ球の検出及び品質保証及び制御のための遺伝子CD3 / / 、又はSLA2、CHRNA3、C16orf24、LCK、FASLG、CD7、SIT1、IL32、CXCR6、UBASH3A、GRAP2、ITGB7及びTXK、又はGNGT2、CRTAM、IL2RB及びZBTB32、又はFLJ00060、FLJ38379、PPP6C、CD226、ZBTB7B及びTNFAIP8のDNAメチル化分析の使用に関する。さらに、本発明は上記の方法を行うためのキット及びそのそれぞれの使用に関する。好ましい実施の形態では、本発明は、採取直後でない(non-freshly obtained)血液試料又は血清試料といった品質が最適以下の試料からであっても正確な分析を可能にする、遺伝子CD3中の少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態を分析する改善された方法をさらに提供する。本発明の一目的は、哺乳動物の任意の固形臓器内の血液又は任意の体液の特定のサブセットを定量的に検出及び測定する、新規のより確実な手段を提供することである。

10

【0003】

この方法を利用することによって、本発明者らは、Tリンパ球を決定、定量及び定期的に測定する新規のこれまで知られていなかった手段を提供する。

【背景技術】

【0004】

Tリンパ球は哺乳動物免疫系の主要な成分である。CD4 T細胞及びCD8 T細胞の両方が上記免疫系の適切な機能に参与する。CD8 T細胞は細胞傷害性免疫防御を調節するが、CD4細胞(いわゆるヘルパーT細胞)は、体液性免疫防御及び細胞性免疫防御の両方を補助する。ヘテロ二量体T細胞抗原受容体(TCR)はCD3と呼ばれる単形性のタンパク質複合体に結合する。CD3はCD3、CD3及びCD3という部分要素からなり、全ての末梢T細胞(ただし胸腺細胞サブセットのみ)上で発現される。CD3、CD3及びCD3の遺伝子は、11番染色体(chromo-som)(11q23)上の隣接遺伝子座にコードされる。

20

【0005】

シグナル伝達におけるCD3の役割 - CD3鎖の機能は、完全なCD3複合体の形成及び細胞表面へのその輸送、並びにヘテロ二量体T細胞抗原受容体を介した刺激の際のシグナル伝達の両方である。CD3、CD3、CD3の細胞質部分のアミノ酸配列は各々、刺激の際にリン酸化され、それにより活性化されるモチーフを含有する。このいわゆるITAM(免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ)は、種々のチロシンキナーゼのドッキング部位として機能する。CD3鎖又はCD3鎖に欠陥のある個体は、重度の臨床的自己免疫不全を患う。

30

【0006】

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

40

【0007】

メチル化の主要な標的は、2ヌクレオチド配列であるシトシン - グアニン(「CpG部位」)であり、この状況でシトシン(C)は簡単な化学修飾を受けて5 - メチル - シトシンとなる場合がある。ヒトゲノムにおいては、CG配列は或る特定の比較的密なクラスター(「CpGアイランド」と呼ばれる)以外については予想されるよりもはるかに希である。CpGアイランドは遺伝子プロモーターと関連することが多く、半数を超えるヒト遺伝子がCpGアイランドを有すると推定されている(非特許文献1)。

【0008】

異常なDNAメチル化は、しばしば健常細胞から癌性細胞への形質転換を伴う。観察さ

50

れる影響には、ゲノム規模での低メチル化、腫瘍抑制遺伝子のメチル化の増大及び多くの癌遺伝子の低メチル化がある（例えば非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4に概説される）。メチル化プロファイルは腫瘍特異的である（すなわち、特定の遺伝子又はさらには個々のCpGのメチル化パターンの変化は、特定の腫瘍型の診断に用いられる）ことが認識されており、現在では、膀胱癌、乳癌、結腸癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、肺癌及び前立腺癌の大規模な診断マーカー群が存在する（例えば非特許文献4に要約される）。

【0009】

Flanagan et al. (非特許文献5)は、マウス及びヒトのCD3G遺伝子及びCD3D遺伝子が逆の転写方向に構成され、それらの5'末端は約1.6キロベース(kb)のDNAによって隔てられていることを記載している。ヒトCD3G及びCD3D遺伝子発現の組織特異的調節の分子基盤は、マウスにおいてDNase I高感受性分析及びCpGメチル化分析を用いて検査された。筆者らは、CD3D遺伝子に対して3'にあり、CD3D及びCD3Gの発現の両方に影響を与える調節要素を含有する遺伝子間領域内の領域を規定することを試み、CD3D遺伝子及びCD3G遺伝子からの転写が、メチル化したプロモーターから始まる可能性があることを示している。重要なことには(Significantly)、3'調節領域が分化系列決定及びCD3転写の前にオープンクロマチン構造をとることが示された。このFlanaganの非常に限られた酵素的分析は、ヒトに見られるどの領域にも相同性を有しないマウスの領域に基づいている(based on)。さらに、この論文ではDC3リンパ球の同定に好適に分析される領域は同定されていない。

【0010】

Clevers et al. (非特許文献6)は、T細胞受容体(TCR/CD3)複合体のCD3鎖をコードする遺伝子が、全てのTリンパ球系細胞において独自に転写されることを記載している。ヒトCD3遺伝子をマウス生殖細胞系に導入したところ、正確に組織特異的に発現された。次いで、この遺伝子を一時的クロラムフェニコールトランスフェラーゼアッセイにおいてTリンパ球特異的なシス作用エレメントについてスクリーニングした。プロモーター(-228~+100)は細胞型に関係なく機能した。厳密なT細胞特異性を有する1225bpのエンハンサーが最後のエクソンの下流、プロモーターから12kbの位置にあるDNase I高感受性部位に見られた。この部位はT細胞のみに存在する。CD3エンハンサーは、胸腺内分化の間にCD3と同時調節される関連遺伝子であるCD3のT細胞特異的エンハンサーと配列類似性を示さなかった。CD3エンハンサーはCpGアイランドを構成し、組織型とは無関係に低メチル化したという点で独特であった。CD3遺伝子が発現されず、エンハンサーが不活性な2つのHTLV-I形質転換T細胞株が同定された。本発明の好ましい実施の形態とは対照的に、Clevers et al.は、TCR/CD3遺伝子に対して3'側に遠く離れて位置するエンハンサー領域を分析している。

【0011】

Hamerman et al. (非特許文献7)は、CD4 Tリンパ球とCD8 Tリンパ球とを区別している。

【0012】

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

【0013】

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

【0014】

最後に、特許文献3には、遺伝子foxp3、又はそのオーソログ遺伝子若しくはパラログ遺伝子中の少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態を分析することを含む、哺乳動物のFoxP3陽性調節性T細胞、好ましくはCD25⁺CD4⁺調節性T細胞を

同定する方法、特に *in vitro* 方法、並びに調節性 T 細胞の検出及び品質保証及び制御のための、転写因子 FoxP3 の遺伝子の DNA メチル化分析の使用が記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【特許文献1】欧州特許第1213360号

【特許文献2】国際公開第2004/050706号

【特許文献3】欧州特許第1826279号

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献1】Antequera and Bird, Proc Natl Acad Sci U S A 90:11995-9, 1993

【非特許文献2】Jones and Laird, Nature Genetics 21:163-167, 1999

【非特許文献3】Esteller, Oncogene 21:5427-5440, 2002

【非特許文献4】Laird, Nature Reviews/Cancer 3:253-266, 2003

【非特許文献5】Flanagan BF, Wotton D, Tuck-Wah S, Owen MJ. DNase hypersensitivity and methylation of the human CD3G and D genes during T-cell development. Immunogenetics. 1990;31(1):13-20.

【非特許文献6】Clevers H, Lonberg N, Dunlap S, Lacy E, Terhorst C. An enhancer located in a CpG-island 3' to the TCR/CD3-epsilon gene confers T lymphocyte-specificity to its promoter. EMBO J. 1989 Sep;8(9):2527-35.

【非特許文献7】Hamerman JA, Page ST, Pullen AM. Distinct methylation states of the CD8 beta gene in peripheral T cells and intraepithelial lymphocytes. J Immunol. 1997 Aug 1;159(3):1240-6

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

CD4 細胞及び CD8 細胞の測定及び決定は概して容易であり、通常は細胞表面上の上記抗原の発現を分析することによって臨床的に達成されるが、一般的に使用される FACS 分析については、細胞の構成要素 (entities) を無傷に維持するには細胞試料を新たに単離するか、又は即座に固定する必要があるため、これらの細胞型を決定するのは依然として困難である。したがって、Tリンパ球の検出は所望されているが、特に日常的適用にとって問題をはらんでいる。

【0018】

上記を鑑みると、Tリンパ球をより便利かつ確実に同定するための優れた手段 (tool) として、DNA メチル化分析に基づく改善された、特に確実な方法を提供することが本発明の一目的である。

【課題を解決するための手段】

【0019】

本発明は、哺乳動物、特に哺乳動物に由来する試料において Tリンパ球を同定する方法であって、CD3、CD3 及び CD3 の遺伝子の1つ又は複数における少なくとも1つの CpG 位置のメチル化状態を分析することを含み、上記試料における少なくとも1つの CpG 位置の少なくとも90%の脱メチル化が、CD3⁺ Tリンパ球細胞、特に CD3⁺ CD4⁺ Tリンパ球細胞、及び/又は CD3⁺ CD8⁺ Tリンパ球細胞の指標となる、方法を提供することによって上記の目的を解決するものである。

【0020】

本発明は、特異的エピジェネティックマーカーとしての CD3 遺伝子の同定によって、上記のマーカーの分析の臨床的な日常的適用が非常に容易となり得るといふ本発明者らの驚くべき発見に基づく。FACS 及び mRNA 測定とは対照的に、それぞれの測定は精製、保管、また、かなりの程度まで組織品質に無関係に行うことができる。

10

20

30

40

50

【0021】

本発明による方法の別の好ましい実施の形態では、上記試料における上記少なくとも1つのCpG位置が、91%超、好ましくは92%超、最も好ましくは95%超脱メチル化されている。

【0022】

この概念は、CD3陽性Tリンパ球におけるCD3領域の特異的な脱メチル化に基づく。本発明者らは、単純かつ正確な定量PCR方法を用いて、CD3脱メチル化が血液又は組織中のTリンパ球数の代理マーカーとなることを示す。本発明者らはこのようにして、CD3陽性Tリンパ球の存在に機能的に関与するか、又は無条件に(mandatory)関連するCD3遺伝子内の特定の領域を同定した。好ましい一実施の形態では、非常に良好な領域は、そのプロモーター、又は例えば配列番号1に記載のヌクレオチド配列、及び例えばバイサルファイトシーケンシング方法を使用する場合、CD4⁺細胞又はCD8⁺細胞のいずれかにおいてCD3を発現する細胞を、CD3を発現しない他の全ての細胞と比較した際に、差次的(differential)メチル化状態を示す多くのCpGモチーフを含有する他のヌクレオチド配列を有するT L S D Rである。

10

【0023】

本発明者らは、CD3⁺細胞においてCpGモチーフがほぼ完全に(すなわち70%超、好ましくは80%、好ましくは90%超、最も好ましくは95%超)脱メチル化されている一方で、全てのCD3⁻細胞においては同じモチーフが完全にメチル化されていることを実証することができた。上述の領域内のCpGモチーフの差次的メチル化は、CD3発現と相関する。したがって、CD3遺伝子座のメチル化状態の決定は、調節性T細胞の安定な集団を同定するうえで有益な手段となり得る、例えば所望される場合、任意の想定され得る状況下での自己免疫疾患、移植片拒絶反応、癌、アレルギー又は単にTリンパ球関連免疫状態においてTリンパ球を測定するのに必要とされるか、又は少なくとも幾らか有用であり得る。このアッセイは、精製又は任意の染色手順なしにTリンパ球の測定を可能にする。固形腫瘍又は他の固形組織において、上記領域で脱メチル化される細胞の数もさらに報告され、それによりCD3陽性腫瘍浸潤Tリンパ球の総量が示される。

20

【0024】

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

30

【0025】

本発明による方法の別の好ましい態様では、遺伝子SLA2、CHRNA3、C16orf24、LCK、FASLG、CD7、SIT1、IL32、CXCR6、UBASH3A、GRAP2、ITGB7及びTXK中の少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態を、CD3について本明細書中に記載される場合と同様に分析する。このため、これらの遺伝子によって、全てのCD3陽性Tリンパ球の明確な同定も可能となる。したがって、本発明による方法の好ましい実施の形態では、上記少なくとも1つのCpG位置は、遺伝子SLA2、CHRNA3、C16orf24、LCK、FASLG、CD7、SIT1、IL32、CXCR6、UBASH3A、GRAP2、ITGB7及びTXK内の転写開始部位、プロモーター領域、イントロン、及び/又はエクソン/イントロン境界より上流の5'領域に存在する。

40

【0026】

全てのCD8細胞をさらに明確に同定するために、本発明は、その別の好ましい態様において、CD3陽性Tリンパ球における遺伝子GNGT2、CRTAM、IL2RB及び

50

ZBTB32の同等の分析を提供する(これらのマーカーによって、CD8陽性細胞とCD4陽性細胞とを分離することが可能である)。この分析は、CD3表現型についてのTリンパ球の分析と同時に、又はそれに続いて行うのが好ましい。

【0027】

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

【0028】

本発明による方法の別の好ましい態様は、Tリンパ球の検出及び品質保証及び制御のための遺伝子CD3 / /、又はSLA2、CHRNA3、C16orf24、LCK、FASLG、CD7、SIT1、IL32、CXCR6、UBASH3A、GRAP2、ITGB7及びTXK、又はGNGT2、CRTAM、IL2RB及びZBTB32、又はFLJ00060、FLJ38379、PPP6C、CD226、ZBTB7B及びTNFAIP8のDNAメチル化分析の使用に関する。

【0029】

本発明による方法の別の好ましい実施の形態では、上記少なくとも1つのCpG位置は、CD3遺伝子内の転写開始部位、プロモーター領域、イントロン、及び/又はエクソン/イントロン境界より上流の5'領域に存在する。本発明はまた、CD3遺伝子の特に好ましい領域、いわゆる「TLSDR」(Tリンパ球特異的脱メチル化領域)においてCpGモチーフがほぼ完全に(すなわち90%超、好ましくは91%、好ましくは92%超、最も好ましくは95%超)脱メチル化されている一方で、全ての非Tリンパ球においては同じモチーフが完全にメチル化されているという驚くべき発見を提供する。したがって、この領域及びその診断用途は、本発明による診断分析に対して有益かつ確実な手段を提供するものでもある。本発明によるTLSDRは、1405番の増幅産物(amplicon)(AMP1405)(配列番号6)、1406番の増幅産物(AMP1406)(配列番号7)及び/又は1408番の増幅産物(AMP1408)(配列番号8)に位置する。これらの増幅産物は全て、配列番号1に示す本発明の対象とする全領域の一部である。

【0030】

本発明による方法の好ましい実施の形態では、上記メチル化状態の分析は、配列番号1に基づいて好適に設計することのできる好適なプライマー対の少なくとも1つのプライマー、好ましくは配列番号2~配列番号5のいずれかに記載のオリゴマーを用いた増幅を含む。

【0031】

好ましくは、例えばMSP、HeavyMethyl、Scorpion、MS-SNUPE、Methylight、パイサルファイトシーケンシング、メチル特異的制限アッセイの状況における増幅には、ポリメラーゼ酵素、PCR増幅反応若しくは化学的増幅反応、又は下に記載されるような当業者に既知の他の増幅方法が含まれる。増幅によって、本発明による方法(複数可)を行うための特に好ましい「手段」である、CD3遺伝子又は本明細書中に記載されるような任意のパラログ若しくはオーソログ中のTLSDR又は任意の他の領域の増幅産物が生成される。結果として、配列番号2~配列番号5のいずれかに記載のオリゴマー、又は上で言及されるようなプライマー対によって増幅される増幅産物は、本発明の好ましい実施の形態を構成する。

【0032】

当業者であれば、分析すべき部位、例えば1405番の増幅産物(配列番号6)、1406番の増幅産物(配列番号7)及び1408番の増幅産物(配列番号8)のCpG位置1、2、3、4、5、6、7、8、9及び10の少なくとも1つ、又は配列番号1に記載の増幅産物若しくはCD3遺伝子座中の他の配列上に存在する全ての部位の量を最小限にするために、CpG位置の特異的サブセットをさらに選択することが可能である。これらの位置は、生成及び分析される増幅産物の5'末端から数値的に数えられる。4、5、6

10

20

30

40

50

又は7の位置の組み合わせが好ましく、これらは本発明において有益となるほど十分に情報を生み出す。

【0033】

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

10

【0034】

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

【0035】

本発明による方法の別の好ましい実施の形態では、同定には、上記Tリンパ球を全ての主要な末梢血細胞型又は非血液細胞、好ましくはCD14、CD15、CD19及びCD56（これらに限定されない）から区別することが含まれる。

【0036】

本発明による方法のさらに別の好ましい実施の形態では、試料は、ヒト血液試料を含む哺乳動物の体液、又は組織、器官若しくは細胞型の血液試料、血中リンパ球の試料若しくはその画分から選択される。好ましくは、上記哺乳動物はマウス、ラット、サル又はヒトである。試料は必要に応じて好適にプールすることができる。

20

【0037】

本発明による方法の別の好ましい態様は次に、同定された上記Tリンパ球に基づいて、上記哺乳動物の免疫状態を決定する工程をさらに含む。リンパ球の一般集団は定量する（quantified）ことができ、CD3CD4CD25陽性調節性T細胞等のさらに詳細な亜集団を相対的に定量するための基準として使用するか、又は最終的にこの集団を検出して、全体的な免疫活性状態を決定するために使用することができる。

【0038】

本発明による方法のさらに別の好ましい実施の形態では、哺乳動物は自己免疫疾患、移植片拒絶反応、癌及び/又はアレルギーを患っているか、又はそれらを患う可能性がある。

30

【0039】

本発明による方法の別の好ましい態様は、哺乳動物においてCD3⁺CD4⁺Tリンパ球、及び/又はCD3⁺CD8⁺Tリンパ球のレベルをモニタリングする方法であって、上記の方法、並びに同定されたTリンパ球の量を、同じ哺乳動物から採取した初期試料、及び/又は対照試料と比較することを含む、方法に関する。本発明による方法のさらに別の好ましい実施の形態では、哺乳動物は自己免疫疾患、移植片拒絶反応、癌及び/又はアレルギーを患っているか、又はそれらを患う可能性がある。

40

【0040】

本発明による方法の別の好ましい態様は次に、上記Tリンパ球の量を、上記哺乳動物に与える化学物質及び/又は生物学的物質に応じて測定及び/又はモニタリングすることをさらに含む、上記の方法に関する。

【0041】

本発明による方法の別の好ましい態様は、配列番号2～配列番号5のいずれかに記載のオリゴマー、又は配列番号1に基づくプライマー対によって増幅され、上に記載のように設計される増幅産物、特に1405番の増幅産物（配列番号6）、1406番の増幅産物（配列番号7）及び1408番の増幅産物（配列番号8）に関する。

【0042】

50

本発明のさらに別の好ましい態様は次に、哺乳動物においてCD3⁺CD4⁺Tリンパ球及び/又はCD3⁺CD8⁺Tリンパ球を、遺伝子CD3中のCpG位置のメチル化状態の分析に基づいて同定及び/又はモニタリングするキットであって、本明細書中に記載されるような本発明による方法を行うための材料を含む、キットに関する。好ましくは、上記キットはa)パイサルファイト試薬、並びにb)1405番の増幅産物(配列番号6)、1406番の増幅産物(配列番号7)及び1408番の増幅産物(配列番号8)に含まれるCpG位置のメチル化分析のための材料を含む。さらに好ましくは、位置は上記増幅産物の位置1、2、3、4、5、6、7、8、9及び10からなる。上記増幅産物の5、6若しくは7、又は全ての位置であるのが最も好ましい。

【0043】

最後に、本発明は、哺乳動物においてCD3⁺CD4⁺Tリンパ球及び/又はCD3⁺CD8⁺Tリンパ球を同定及び/又はモニタリングするための、本発明によるオリゴマー若しくは増幅産物、又はキットの使用も包含する。

【0044】

要約すると、本発明者らは、CD3マーカーを使用して、CD3/CD4陽性Tリンパ球及びCD3/CD8陽性Tリンパ球の両方を非常に特異的に同定した(区別はしていない)。ここで、マーカーCD8を使用すると、例えばCD8陽性リンパ球をCD4リンパ球から区別することができた。したがって、本発明のマーカー(複数可)とCD8マーカーとの組み合わせを使用すると、CD4細胞とCD8細胞とを特異的に区別することができる。全てのCD4は非Tリンパ球と同一に見えていたため、このことは本発明以前には可能ではなかった。

【0045】

本発明をここで、以下の実施例に基づき、添付の図面及びシーケンシングプロトコルを参照して(これらに限定されない)さらに説明する。本発明の目的上、本明細書中に引用される全ての参考文献は、その全体が参照により本明細書中に援用される。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】CD3g及びCD3dに見られる差次的にメチル化した遺伝子領域を示す図であり、これらを「blastヒット」として赤線によって表示する。

【図2-1】1405番の増幅産物(配列番号6)(パイサルファイト鎖:2、シーケンシング方向:フォワード)の分析を示す図である。関連位置を太字で示す。

【図2-2】1405番の増幅産物(配列番号6)(パイサルファイト鎖:2、シーケンシング方向:フォワード)の分析を示す図である。関連位置を太字で示す。

【図3-1】1406番の増幅産物(パイサルファイト鎖:2、シーケンシング方向:リバース)の分析を示す図である。関連位置を太字で示す。

【図3-2】1406番の増幅産物(パイサルファイト鎖:2、シーケンシング方向:リバース)の分析を示す図である。関連位置を太字で示す。

【図4-1】1406番の増幅産物(配列番号7)(パイサルファイト鎖:2、シーケンシング方向:フォワード)の分析を示す図である。関連位置を太字で示す。

【図4-2】1406番の増幅産物(配列番号7)(パイサルファイト鎖:2、シーケンシング方向:フォワード)の分析を示す図である。関連位置を太字で示す。

【図5-1】1408番の増幅産物(配列番号8)(パイサルファイト鎖:2、シーケンシング方向:フォワード)の分析を示す図である。関連位置を太字で示す。

【図5-2】1408番の増幅産物(配列番号8)(パイサルファイト鎖:2、シーケンシング方向:フォワード)の分析を示す図である。関連位置を太字で示す。

【図6-1】11番染色体(NCBI36:11:117714000:117730500:1)上の領域1405番、1406番及び1408番を含む、T細胞受容体の調節領域を示す図である。エクソン配列は、CD3については下線が、CD3については二重下線が引いてある。CGは太字で示す。

【図6-2】11番染色体(NCBI36:11:117714000:1177305

10

20

30

40

50

00:1)上の領域1405番、1406番及び1408番を含む、-T細胞受容体の調節領域を示す図である。エクソン配列は、CD3については下線が、CD3については二重下線が引いてある。CGは太字で示す。

【図6-3】11番染色体(NCBI36:11:117714000:117730500:1)上の領域1405番、1406番及び1408番を含む、-T細胞受容体の調節領域を示す図である。エクソン配列は、CD3については下線が、CD3については二重下線が引いてある。CGは太字で示す。

【図6-4】11番染色体(NCBI36:11:117714000:117730500:1)上の領域1405番、1406番及び1408番を含む、-T細胞受容体の調節領域を示す図である。エクソン配列は、CD3については下線が、CD3については二重下線が引いてある。CGは太字で示す。

【発明を実施するための形態】

【0047】

配列番号1は、CD3細胞において特異的なメチル化パターンを有すると考えられる領域の配列を示す。

【0048】

配列番号2～配列番号5及び配列番号9は、CD3及びCD3及びCD3に対するIllumina Chip-Fragmentアッセイに使用したオリゴヌクレオチドの配列を示す。

【0049】

配列番号6～配列番号8は、1405番の増幅産物(配列番号6)、1406番の増幅産物(配列番号7)及び1408番の増幅産物(配列番号8)の参照配列を示す。

【0050】

配列番号10～配列番号38は、実施例2に記載の本発明の他の好ましいTリンパ球マーカーにおいて分析されたCpG位置の周辺の配列を示す。

【0051】

配列番号39～配列番号65は、図2～図5のアラインメントにおいて示される配列を示す。他に指定のない限り、これらの配列は図2～図5に表示される順序で配列される。

【実施例】

【0052】

実施例1 - CD3分析

CD3/CD4、CD3/CD8ナイーブ及び記憶Tリンパ球、CD56ナチュラルキラー細胞、CD19ナイーブ及び記憶B細胞、CD14単球並びにCD15顆粒球を含む様々な血液サブセットを精製した。精製した細胞に由来するDNAをバイサルファイト処理して、様々なCpGジヌクレオチドモチーフにおいて分析した。次いで、メチル化状態を比較した(元の配列においてメチル化しなかったシトシンについてTが見られるのに対し、元の配列においてメチル化したシトシンについてCが見られる)。

【0053】

データから、全てのCD3CD4細胞型及びCD3CD8細胞型において脱メチル化し、他の全ての血液細胞型においてメチル化した、CD3、CD3及びCD3中の様々なCpGモチーフ及び領域が示された。CD3、CD3及びCD3に見られる差次的にメチル化した遺伝子領域を下記図1に示し、これらを「blastヒット」として太字で表示する。

【0054】

Illumina Golden Gate技術を用いて観察されたデータから、全てのCD4陽性記憶T細胞及びCD8陽性記憶T細胞(それぞれ0.06及び0.06)並びにCD4陽性ナイーブT細胞及びCD8陽性ナイーブT細胞(それぞれ0.03及び0.06)が、他の全ての試験した細胞型(CD15(0.92)、CD14(0.90)、CD19記憶及びナイーブ(それぞれ0.81及び0.67)、CD56(0.86)陽性血液細胞、並びに非血液組織に由来する細胞(0.78)を含む)よりも大幅に低い

10

20

30

40

50

メチル化率を受けることが示される。この実験結果を以下の表にさらに示す。

【 0 0 5 5 】

表 1 : メチル化分析の結果

【表 1】

遺伝子	Chr.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
		n=12; 女性	n=5; 男性	プール; 女性	プール; (5男性)	プール; (5男性)	プール; (5男性)	プール; (5男性)	プール; (5男性)	プール; (5男性)	プール; (5男性)	プール; (5男性)	プール; (5男性)
		0.8	0.6	0.6	0.9	0.9	0.9	0.0	0.1	0.1	0.1	0.7	0.8
CD3D	11	0.9	0.7	0.7	0.9	0.9	0.9	0.1	0.1	0.2	0.2	0.7	0.8
		0.7	0.6	0.7	0.9	0.9	0.8	0.1	0.1	0.1	0.1	0.8	0.9
CD3G	11	0.4	0.6	0.5	0.7	0.8	0.7	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.6

S1 = 卵巣組織, S2 = 全血, S3 = 末梢血単核細胞, S4 = 顆粒球, S5 = 単球, S6 = NK細胞, S7 = ナイーブヘルパーT細胞, S8 = 記憶ヘルパーT細胞, S9 = ナイーブ細胞傷害性T細胞, S10 = 記憶細胞傷害性T細胞, S11 = ナイーブB細胞, S12 = 記憶B細胞 Chr = 染色体

Illumina Golden Gate技術を用いて以下のゲノム CpG 領域を分析したところ、高い特異性を示すデータが得られた。

【0057】

CD3

cg15880738 (配列番号2)

(+1) AGCTGCTGCACAGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGCTAAGGGCTGCTCCACG

cg07545925 (配列番号3)

(+1) CGGAAAAACAAAAGGCATCTGCACCTGCAGCCCTGCTGAGGCCCTGCTG

【0058】

CD3

cg24841244 (配列番号4)

(-1) ACCCAGGCTGATAGTTCGGTGACCTGGCTTTATCTACTGGATGAGTTCCG

cg07728874 (配列番号5)

(-1) TGGACATAGCACGTTTCTCTCTGGCCTGGTACTGGCTACCCTTCTCTCG

【0059】

CD3

cg24612198 (配列番号9)

AGTCATCTGTTTTGCTTTTTTTCCAGAAGTAGTAAGTCTGCTGGCCTCCG

【0060】

このIllumina技術では、単一のCpG(もっと厳密に言えば1つの遺伝子座につき2つのCpG)の分析しか可能でないため、バイサルファイトシーケンシングを用いてメチル化特性を検証した。このため、試料をQiagenのEpiTectキットを用いてバイサルファイト処理し、試料をABI 3100 prismシーケンサーを用いてシーケンシングした。データ解釈については、ABIによって供給されるKBase callingソフトウェアを使用した。

【0061】

非メチル化パーセントイル値(すなわち、プラス鎖配列上のTG)に対するメチル化パーセントイル値(すなわち、プラス鎖配列上のCGシグナル)を算出した完全に定量的な結果は提示していないが、データは精製した細胞型について明確であった。全てのTリンパ球が分析した全てのCG位置で圧倒的に脱メチル化した一方で、分析した他の全ての細胞型は同一位置でメチル化した。

【0062】

実施例2 - CD3と類似のさらなるマーカーの分析

Tリンパ球を識別及びモニタリングするのにさらに好適なマーカーを同定するために、CD3に加えて他のマーカーを同定し、メチル化分析によって試験した。SLA2、CHRNA3、C16orf24、LCK、FASLG、CD7、SIT1、IL32、CXCR6、UBASH3A、GRAP2、ITGB7及びTXKの遺伝子中のCpG位置におけるメチル化が、これらのマーカーによってもCD3陽性Tリンパ球を同定することが可能であるため、本発明において同様に使用され得ることが見出された。

【0063】

さらに、CD3陽性Tリンパ球群においてCD8陽性細胞及びCD4陽性細胞のサブセットを同定する他のマーカーを同定した。NGGT2、CRTAM、IL2RB及びZBTB32の遺伝子によって、CD8陽性細胞とCD4陽性細胞とが分離されることが見出された。同様に、FLJ00060、FLJ38379、PPP6C、CD226、ZBTB7B及びTNFAIP8は、全血においてCD4発現細胞を確実に同定し、CD4陽性CD3陽性細胞とCD8陽性CD3陽性細胞とを分離することが可能である。

【0064】

以下の表2に、選択されたCpG位置で上記のマーカーについて得られたIlluminaデータを要約する。好ましい例として選択されるCpG部位と共に示される他の幾つかのマーカーを、(CD3+リンパ球サブセットを同定する目的で)CD4+を選択的に

10

20

30

40

50

同定するため（すなわちFLJ00060、FLJ38379、PPP6C、CD226、ZBTB7B及び/又はTNFAIP8）、（CD3+リンパ球サブセットを同定する目的で）CD8+を選択的に同定するため（すなわちGNGT2、CRTAM、IL2RB及び/又はZBTB32）、CD3+リンパ球を選択的に同定するため（すなわちCD3D、CD3G、及び/又はCD3E、及び/又はSLA2、CHRNA3、C16orf24、LCK、FASLG、FASLG、CD7、SIT1、IL32、CXCR6、UBASH3A、GRAP2、ITGB7及び/又はTXK）に使用することができることを見て取れる。当業者であれば、この表に基づいて本明細書中に記載されるようなCD3に関する教示を、これらのマーカー及びそのCpG部位にまで広げることができる。

【0065】

表2：選択されたマーカーを用いてCpG位置で得られたIlluminaデータ（Chr. = 染色体）

【表 2】

CD4+ マーカー CpG-ID	遺伝子名	Ch r.	配列番号/ アクセッション 番号	卵巣 組織 (平均, n=12)	全血 (プール)	PBMC (Pro- mega)	BCST1 8 顆粒球 (CD15 +)	BCST1 9 単球 (CD14 +)	BCST2 0 NK (CD56 +)	BCST21 Tナイーブ (CD4+ D27 +CD45R A+)	BCST22 T mem (CD4+ CD27+ CD45RA -)	BCST23 CTL ナイーブ (CD8+C D27+ CD45RA +)	BCST24 CTL mem (CD8+C D27+ CD45RA -)	BCST2 5 Bナイーブ (CD19 +)	BCST2 6 B mem (CD19 +)	平均値 細胞 型	平均値 細胞 型	δメチル化 (縦的— その他)
cg03602500	FLJ00060	19	NM_033206.111/	0.802	0.728	0.779	0.858	0.851	0.873	0.235	0.279	0.521	0.687	0.656	0.747	0.257	0.75	-0.493
cg16173109	FLJ38379	2	XR_001026.112/	0.614	0.675	0.719	0.833	0.844	0.784	0.1141	0.113	0.341	0.383	0.418	0.385	0.113	0.599	-0.486
cg00620024	PPP6C	9	NM_002721.313/	0.641	0.619	0.692	0.801	0.851	0.836	0.107	0.169	0.269	0.420	0.404	0.502	0.138	0.603	-0.465
cg13164537	CD226	18	NM_006566.114/	0.458	0.470	0.508	0.582	0.557	0.601	0.029	0.071	0.351	0.543	0.366	0.501	0.05	0.494	-0.443
cg01782486	ZBTB7B	1	NM_015872.115/	0.789	0.725	0.720	0.823	0.809	0.886	0.190	0.428	0.875	0.864	0.586	0.414	0.309	0.749	-0.44
cg07086380	TNFAIP8	5	NM_014350.1	0.728	0.579	0.635	0.857	0.733	0.793	0.110	0.106	0.288	0.148	0.309	0.208	0.108	0.528	-0.419
cg17839611	GNGT2	17	NM_031498.117/	0.779	0.629	0.688	0.828	0.867	0.207	0.340	0.562	0.09	0.119	0.854	0.722	0.104	0.648	-0.543
cg22512531	CRTA	11	NM_019604.218/	0.651	0.634	0.709	0.835	0.735	0.5	0.363	0.630	0.079	0.082	0.194	0.336	0.08	0.559	-0.478
cg26757673	IL2RB	22	NM_000878.219/	0.799	0.662	0.752	0.878	0.9	0.092	0.573	0.086	0.157	0.061	0.411	0.403	0.109	0.555	-0.446
cg08539991	ZBTB3	2	NM_014319.1	0.823	0.736	0.791	0.912	0.926	0.674	0.563	0.153	0.303	0.085	0.648	0.140	0.194	0.637	-0.442

83.1

CD4+ / CD8+ マーカー CpG-ID	遺伝子名	Ch r	配列番号/ アクセッション 番号	卵巣 組織 (平均, n=12)	全血 (プール)	PBMC (Pro- mega)	BCST1 8 顆粒球 (CD15 +)	BCST1 9 単球 (CD14 +)	BCST2 0 NK (CD56 +)	BCST21 Tナイーブ (CD4+C D27 +CD45R A+)	BCST22 T mem (CD4+ CD27+ CD45RA -)	BCST23 CTL ナイーブ (CD8+C D27+ CD45RA +)	BCST24 CTL mem (CD8+C D27+ CD45RA -)	BCST2 5 Bナイーブ (CD19 +)	BCST2 6 B mem (CD19 +)	平均値 細胞 型 その他	平均値 細胞 型 その他	δメチル化 (縦的- その他)
cg24841 244	CD3D	11	NM_0007 32.3 21/	0.783	0.582	0.644	0.917	0.904	0.857	0.025	0.057	0.058	0.058	0.673	0.810	0.049	0.771	-0.721
cg07728 874	CD3D	11	NM_0007 32.3 22/	0.854	0.683	0.727	0.911	0.901	0.881	0.128	0.149	0.175	0.155	0.744	0.807	0.152	0.814	-0.661
cg15880 738	CD3G	11	NM_0000 73.1 23/	0.714	0.616	0.682	0.874	0.876	0.836	0.061	0.091	0.103	0.103	0.811	0.898	0.087	0.788	-0.701
cg07545 925	CD3G	11	NM_0000 73.1 24/	0.370	0.552	0.545	0.737	0.771	0.739	0.133	0.149	0.132	0.131	0.303	0.601	0.132	0.49	-0.358
cg24612 198	CD3E	11	NM_0007 33.2 25/	0.679	0.485	0.563	0.794	0.793	0.698	0.064	0.036	0.093	0.051	0.206	0.279	0.061	0.562	-0.501
cg04759 756	SLA2	20	NM_0322 14.2 26/	0.857	0.673	0.754	0.892	0.925	0.711	0.363	0.228	0.129	0.211	0.756	0.849	0.233	0.802	-0.569
cg22670 733	CHRN A3	15	NM_0007 43.2 27/	0.792	0.733	0.721	0.911	0.888	0.8	0.122	0.180	0.092	0.315	0.456	0.668	0.177	0.746	-0.568
cg09830 866	C16orf 24	16	NM_0239 33.1 28/	0.493	0.629	0.647	0.842	0.79	0.076	0.041	0.056	0.033	0.058	0.72	0.510	0.047	0.588	-0.541
cg17078 393	LCK	1	NM_0053 56.2 29/	0.807	0.575	0.666	0.920	0.884	0.26	0.05	0.037	0.036	0.041	0.144	0.27	0.041	0.566	-0.524
cg10161 121	FASLG	1	NM_0006 39.1 30/	0.704	0.587	0.697	0.905	0.892	0.068	0.051	0.06	0.088	0.06	0.353	0.441	0.065	0.581	-0.516
cg00071 250	FASLG	1	NM_0006 39.1 31/	0.659	0.498	0.602	0.871	0.838	0.075	0.061	0.069	0.139	0.051	0.391	0.6208	0.08	0.543	-0.463
cg02473 123	CD7	17	NM_0061 0.811	0.681	0.767	0.767	0.942	0.898	0.339	0.102	0.328	0.168	0.372	0.767	0.81	0.243	0.752	-0.509

10

20

30

40

cg15518 883	SIT1	9	50.2	NM_0144	0.817	0.601	0.696	0.911	0.885	0.9033	0.11	0.142	0.154	0.358	0.392	0.373	0.191	0.697	-0.506
cg18350 391	IL32	16	12631.1	NM_0010	0.332	0.724	0.794	0.937	0.901	0.658	0.296	0.169	0.15	0.192	0.881	0.406	0.202	0.704	-0.502
cg25226 014	CXCR 6	3	64.1	NM_0065	0.702	0.481	0.548	0.789	0.89	0.35	0.028	0.046	0.046	0.193	0.258	0.514	0.078	0.567	-0.488
cg13578 652	UBAS H3A	21	61.2	NM_0189	0.564	0.444	0.475	0.537	0.703	0.169	0.027	0.04	0.035	0.05	0.602	0.673	0.038	0.521	-0.483
cg25712 380	GRAP2	22	10.2	NM_0048	0.633	0.602	0.639	0.824	0.83	0.506	0.097	0.093	0.089	0.1	0.179	0.310	0.095	0.565	-0.470
cg19812 619	ITGB7	12	89.1	NM_0008	0.819	0.651	0.785	0.874	0.897	0.645	0.3374	0.275	0.199	0.177	0.608	0.4337	0.247	0.714	-0.467
cg02600 394	TXK	4	28.1	NM_0033	0.775	0.576	0.682	0.867	0.909	0.082	0.036	0.075	0.051	0.354	0.376	0.484	0.129	0.594	-0.465

10

20

30

40

【図 3 - 2】

顆粒球
N K細胞
記憶 T 細胞
ナイーブ T 細胞
記憶 C T L
ナイーブ T 細胞
顆粒球
AMP1406 参照配列
.....
顆粒球
N K細胞
記憶 T 細胞
ナイーブ T 細胞
記憶 C T L
ナイーブ T 細胞
顆粒球
AMP1406 参照配列
.....
顆粒球
N K細胞
記憶 T 細胞
ナイーブ T 細胞
記憶 C T L
ナイーブ T 細胞
顆粒球
AMP1406 参照配列
.....

【図 4 - 1】

Figure 4 (参照配列は配列番号 7 である)

顆粒球
N K細胞
AMP1406 参照配列
顆粒球
記憶 T 細胞
ナイーブ T 細胞
.....
顆粒球
N K細胞
AMP1406 参照配列
顆粒球
記憶 T 細胞
ナイーブ T 細胞
.....
顆粒球
N K細胞
AMP1406 参照配列
顆粒球
記憶 T 細胞
ナイーブ T 細胞
.....
顆粒球
N K細胞
AMP1406 参照配列
顆粒球
記憶 T 細胞
ナイーブ T 細胞
.....

【図 4 - 2】

顆粒球
N K細胞
AMP1406 参照配列
顆粒球
記憶 T 細胞
ナイーブ T 細胞
.....
顆粒球
N K細胞
AMP1406 参照配列
顆粒球
記憶 T 細胞
ナイーブ T 細胞
.....
顆粒球
N K細胞
AMP1406 参照配列
顆粒球
記憶 T 細胞
ナイーブ T 細胞
.....
顆粒球
N K細胞
AMP1406 参照配列
顆粒球
記憶 T 細胞
ナイーブ T 細胞
.....

【図 5 - 1】

Figure 5 (参照配列は配列番号 B である)

ナイーブ T h 細胞
記憶 T h 細胞
ナイーブ C T L
AMP1408 参照配列
顆粒球
N K細胞
.....
ナイーブ T h 細胞
記憶 T h 細胞
記憶 C T L
ナイーブ C T L
AMP1408 参照配列
顆粒球
N K細胞
.....
ナイーブ T h 細胞
記憶 T h 細胞
記憶 C T L
ナイーブ C T L
AMP1408 参照配列
顆粒球
N K細胞
.....
ナイーブ T h 細胞
記憶 T h 細胞
記憶 C T L
ナイーブ C T L
AMP1408 参照配列
顆粒球
N K細胞
.....

【 図 6 - 4 】

```

CAACATGATGAACCTCTGCTCTACTAAAATACAAAAAAATTAACAGGCGTGGAGCGCCGGCGCTGTAGTCC
CAACTCTCAGAGGCTGAGGACAGAGACCACTTGAAACCCAGAGGTCGAGGTTGCAGTGAAGTCGGATTGTGC
CACTGACTCCAGGCTGGGCAACAGAGAGAGACTCCCTCTCAAAAABAAAABAGAGGGGGAGGAGAAAGAAA
AGACAGAGCTCCATCTCTCTGCTCTTTCCATCCCTCAGGACCATGAAGTCCCACTCCAAATTCACATATA
AAAAACATTCATAAACAATGCATCAAAATTAATTAATAGAGGATGAAAAAATGACTTATGACTGTGTCTCTTT
CCAGCCCTCAGGATCGAGAGATGACCGTACAGCCACTTCAAGGAAACCACTTGAAGGCGATTGAACTCA
GACTCGAGAGGCTGGGTTCTCATGCAATTCATATAAGACCCCTGCATCACTGCCCTGCAATTGCTT
CTAGCTTAGTCTCTCCCTAGAGCCCTATAGCCATCGACTTCGGGATCAGGGATGGGACCTGGTTTGGG
TACTCTTTCTAAAATCTGGGCGATGCTGTGGCTAGTAAATGAAATTTAIGTATCTGTAAA
TCCTGTCAAGCAGGCGCTCAAGCCATAGAGATGCTGAATTAATCTTAACCTAGATTGAAATTCATTATC
TACACTTTACATTTTGGCTAATTAATTAATTTGTATGAGGGGCTAGCCTGTGATTGTAGGAGTTATGGAG
CATCCCTGGCTCTCTCCAGCATGCTGGTAAATTTCCAGTGGACATCAAAATGCTGCAGACATFACCA
AATGTCACCAACATCACTCCAGGCAAAATCAACCTAGTACAGACCATCAACCATATTAACTTCACATC
AATAAATCAATCAGTCAAGACTTATGATTAAATTAATCTATCGAAGTTTCTATCAGGAAGCAGGGTTGAAGC
ATTATTGTTTTTTTGAACAAATGCAATTTTCTTTTTTCAGTCCAGGTTCTCCCTCCATTCAGTTCCAG
AATCAAGCAATGCAATTTGGAAGCTCTAGCAGAGAGACTTTGACCCATAATCGACTAGAGTTCCGGA
GATGGAAATGGGAGAGAGGCTATCGAGCAATTTGGGGTTTCTCAATTAATTAATTAATTAATTAATTA
CTGTCTTTCAGAGCCCTCACTATTTGGGAAATTTAAAGAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
GAATTAATTTTTTGTGTAATTTAATTTGGTTTGTATAGATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
GAAGCTCTCCCTCCAGCCATCCCGCTACCCAGTACCCCTGTGGCTCTCAGAGACAAATTAATTAATTAAT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
CTCTCTCCAGACTCTCCCTCCAGCCATCCCGCTACCCAGTACCCCTGTGGCTCTCAGAGACAAATTAATTAAT
CAACACATCCACACCTGCAATTTTGTATTTTAGTAGAGACAGGTTTTCCTCTTTGGCCAGCTGGTCT
CGAGCTCTGAGGTCAGAGGATCCGCGCGCTAGCTCCCAAGTCTGGGATTAAGGAGGAGGAGGAGGAGG
CTGTCTTAAGCCGCTTCTTAATATCTTTGAGGATTTAGSCATATAAGAGGCAATTTCTAGTACAT
ATTACTGCTTGGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGAT
TATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGAT
TATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGATGAGGAT
ATAAATCAATTTTAAAATAATGATGATGAGGATTAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
TCACCTTTCTAGAAATTTTGTAAATTTAACTAATTTGACAGCCATTCATAATCCAGCTTTAGGACATTT
TCTTTTTCTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TGGAGTCACTGAGGATCTAGCTCACTGCAACCTCCACCTCC166GTTCAAGGATTCCTTTGCTTGGCT
CCGAGTACCTGAGACTCAGGACATGCCACAGCCCAAGCTCAATTTTTGTATTAGTATTGTATATCA
GTATTGTACTTAGTAGAGCAGGGTTTCCACTGTTGGCAGGCTGCTCCAAATTCCTGACCTCAGGCGAT
C

```

【 配 列 表 】

201251191700001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2009/008764
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FLANAGAN B F ET AL: "DNASE HYPERSENSITIVITY AND METHYLATION OF THE HUMAN CD3G AND D GENES DURING T-CELL DEVELOPMENT" IMMUNOGENETICS, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 31, no. 1, 1 January 1990 (1990-01-01), pages 13-20, XP009113698 ISSN: 0093-7711 the whole document	1-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 document 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. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 February 2010		Date of mailing of the international search report 02/07/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bradbrook, Derek

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/008764

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CLEVERS H ET AL: "AN ENHANCER LOCATED IN A CPG-ISLAND 3' TO THE TCR-CD3-EPSILON GENE CONFERS T LYMPHOCYTE-SPECIFICITY TO ITS PROMOTER" EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 8, no. 9, 1989, pages 2527-2536, XP002519563 ISSN: 0261-4189 abstract page 2529, column 2, paragraph 3 - page 2531, column 2, paragraph 1 -----</p>	1,13
A	<p>TUTT LANDOLFI M M ET AL: "Specific demethylation of the CD4 gene during CD4 T lymphocyte differentiation." MOLECULAR IMMUNOLOGY JAN 1997, vol. 34, no. 1, January 1997 (1997-01), pages 53-61, XP002519564 ISSN: 0161-5890 the whole document -----</p>	1-15
A	<p>LUSSO P ET AL: "Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8<+> T lymphocytes by human herpesvirus 6" NATURE 1991 GB, vol. 349, no. 6309, 1991, pages 533-535, XP002519565 ISSN: 0028-0836 abstract -----</p>	1-15
A	<p>GEORGOPOULOS K ET AL: "A T cell-specific enhancer is located in a DNase I-hypersensitive area at the 3' end of the CD3-delta gene." THE EMBO JOURNAL AUG 1988, vol. 7, no. 8, August 1988 (1988-08), pages 2401-2407, XP002519566 ISSN: 0261-4189 the whole document -----</p>	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2009/008764**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.:
16-19(completely); 1-15(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/EP2009/008764

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

Invention: 1; Claims: 16-19(completely); 1-15(partially)

A method for analysing T-lymphocytes in a sample from a mammal comprising analysing the methylation status of at least one CpG position in at least one gene listed in claim 1, wherein one gene is CD3 gamma, delta or epsilon, and wherein a demethylation to at least 90% of at least one CpG position is indicative of a CD3+ T-lymphocyte cell.

Inventions: 2-14; Claims: 1-15(partially)

A method for analysing T-lymphocytes in a sample from a mammal comprising analysing the methylation status of at least one CpG position in at least one gene listed in claim 1, wherein one gene is SLA2, CHRNA3, C16orf24, LCK, FASLG, CD7, SIT1, IL32, CXCR6, UBASH3A, GRAP2, ITGB7 and TXK respectively for each of inventions 2-14, and wherein a demethylation to at least 90% of at least one CpG position is indicative of a CD3+ T-lymphocyte cell.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 テュルバコファ, イファナ

ドイツ, 1 2 2 0 7 ベルリン, ボオートシュトラッセ 1 6

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA20 HA08 HA11

4B063 QA18 QA19 QQ42 QR08 QR42 QR62 QS25 QS36 QX02

专利名称(译)	用于鉴定1型血细胞成分的表现遗传标记		
公开(公告)号	JP2012511917A	公开(公告)日	2012-05-31
申请号	JP2011541165	申请日	2009-12-08
申请(专利权)人(译)	EPION塞维利亚有限公司		
[标]发明人	オレクスフェン テュルバコファイアナ		
发明人	オレク,スフェン テュルバコファ,イファナ		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N37/00 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6881 C12Q2600/156		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.Z G01N37/00.102 G01N33/53.M C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA20 4B024/HA08 4B024/HA11 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子		
优先权	2008021838 2008-12-16 EP		
其他公开文献	JP2012511917A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于鉴定哺乳动物的CD3CD4阳性T淋巴细胞的方法，特别是体外方法，其中所述方法包括分析CD3a/b/c/d/g中至少一个CpG位置的甲基化状态。基因，特别是它们的“上游”调节区，特别是基因cd3的启动子和其他保守区，其中分析样品中至少一个CpG的去甲基化至少90%指示记忆和幼稚CD4或/和记忆和/或幼稚T淋巴细胞。此外，本发明涉及基因CD3a/b/c/d的DNA甲基化分析用于T淋巴细胞的检测和质量保证和控制的用途。此外，本发明涉及用于实施上述方法的试剂盒及其各自的用途。在一个优选的实施方案中，本发明还提供了一种改进的方法，用于分析基因CD3中至少一个CpG位置的甲基化状态，甚至可以从次优质样品中进行精确分析，例如非新鲜获得的血液或血清样本。

遺伝子 CpG	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
	男性	女性	男性	女性	男性	女性	男性	女性	男性	女性	男性	女性
CD3D11	0.8	0.6	0.6	0.9	0.9	0.9	0.9	0.1	0.1	0.1	0.1	0.8
	0.9	0.7	0.7	0.9	0.9	0.9	0.1	0.1	0.2	0.2	0.7	0.8
CD3G11	0.7	0.6	0.7	0.9	0.9	0.8	0.1	0.1	0.1	0.1	0.8	0.9
	0.4	0.6	0.5	0.7	0.8	0.7	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.6

S1 = 脐带血, S2 = 全血, S3 = 末梢血, S4 = 脐带血, S5 = 脐带血, S6 = 脐带血, S7 = 脐带血, S8 = 脐带血, S9 = 脐带血, S10 = 脐带血, S11 = 脐带血, S12 = 脐带血
 S1 = 脐带血, S2 = 全血, S3 = 末梢血, S4 = 脐带血, S5 = 脐带血, S6 = 脐带血, S7 = 脐带血, S8 = 脐带血, S9 = 脐带血, S10 = 脐带血, S11 = 脐带血, S12 = 脐带血
 S1 = 脐带血, S2 = 全血, S3 = 末梢血, S4 = 脐带血, S5 = 脐带血, S6 = 脐带血, S7 = 脐带血, S8 = 脐带血, S9 = 脐带血, S10 = 脐带血, S11 = 脐带血, S12 = 脐带血