

(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2015-536639

(P2015-536639A)

(43) 公表日 平成27年12月24日(2015.12.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	C12Q 1/68	ZNAZ 2G045
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00	A 4B024
<b>GO1N 33/50 (2006.01)</b>	C12Q 1/68	A 4B063
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/50	P
	GO1N 33/53	M

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 204 頁)

(21) 出願番号 特願2015-532250 (P2015-532250)  
 (86) (22) 出願日 平成25年9月20日 (2013. 9. 20)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年4月10日 (2015. 4. 10)  
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2013/001088  
 (87) 国際公開番号 WO2014/043763  
 (87) 国際公開日 平成26年3月27日 (2014. 3. 27)  
 (31) 優先権主張番号 61/703, 512  
 (32) 優先日 平成24年9月20日 (2012. 9. 20)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 13/842, 209  
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/830, 571  
 (32) 優先日 平成25年6月3日 (2013. 6. 3)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513134487  
 ザ チャイニーズ ユニバーシティ オブ  
 ホンコン  
 中華人民共和国, 香港特別行政区, ニュー  
 テリトリーズ, シャーティン, ピ チウ  
 ビルディング, ルーム 301, ノウレッ  
 ジ トランスファー オフィス  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次

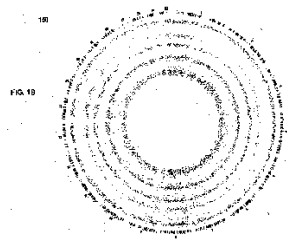
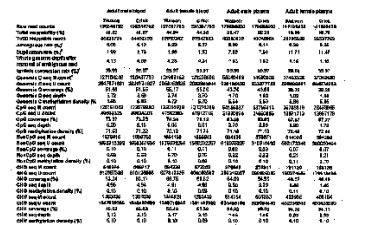
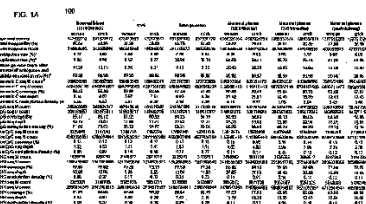
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血漿による胎児または腫瘍のメチロームの非侵襲的決定

(57) 【要約】

系、方法、および装置は、種々の組織と試料のメチル化特性を決定し利用することができる。実施例を提供する。メチル化特性を、血漿メチル化（または、無細胞DNAをもった他の試料）と母体/患者のメチル化特性との比較に基づいて、胎児/腫瘍組織について推定することができる。試料がDNAの混合物を有する場合、組織特異的対立遺伝子を用いて胎児/腫瘍からDNAを特定し、その胎児/腫瘍組織についてメチル化特性を決定することができる。メチル化特性を用いて、胎児/腫瘍のゲノムにおけるコピー数変動を決定することができる。胎児についてのメチル化マーカーは、種々の技術によって特定されている。メチル化特性を、DNA断片のサイズ分布のサイズパラメーターを決定することによって決定し、サイズパラメーターに対する参照値を用いてメチル化レベルを決定することができる。加えて、メチル化レベルを用いてがんのレベルを決定することができる。

【選択図】なし



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

生物の生物試料を解析する方法であって、

前記生物試料は正常細胞に由来する核酸分子と、がんに関連した細胞に由来する可能性のある核酸分子とを含み、前記核酸分子の少なくともいくつかは前記生物試料において無細胞であるものであり、

前記生物試料から複数の DNA 分子を解析するステップであって、

前記生物のゲノムにおける前記 DNA 分子の位置を決定することと；

前記 DNA 分子が一つまたは複数の部位でメチル化されているか否かを決定することと、を含む、DNA 分子を解析するステップと；

複数の部位のそれぞれについて、

前記部位でメチル化されているそれぞれの DNA 分子数を決定するステップと；

前記複数の部位でメチル化されている前記それぞれの DNA 分子数に基づいて第一のメチル化レベルを計算するステップと；

前記第一のメチル化レベルを第一のカットオフ値と比較するステップと；

前記比較に基づいてがんのレベルの第一の分類を決定するステップと、

を含む、生物の生物試料を解析する方法。

**【請求項 2】**

前記 DNA 分子が一つまたは複数の部位でメチル化されているか否かを決定することは、メチル化認識配列決定を実行することを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

メチル化認識配列決定を実行することは、

前記 DNA 分子を亜硫酸水素ナトリウムで処理することと；

前記処理した DNA 分子の配列決定を実行することと、

を含む、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記無細胞 DNA 分子を亜硫酸水素ナトリウムで処理することは、5 - ヒドロキシメチルシトシンの検出をするための Tet 補助亜硫酸水素塩変換または酸化的亜硫酸水素塩配列決定の一部である、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 5】**

各領域の前記それぞれの DNA 分子数を、前記メチル化認識配列決定から得られる配列リードを整列させることによって決定する、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 6】**

一つまたは複数の部位で DNA 分子がメチル化されているか否かを決定することは、メチル化感受性制限酵素消化、メチル化特異的 PCR、メチル化依存的 DNA 沈降、メチル化 DNA 結合タンパク質 / ペプチド、または、亜硫酸水素ナトリウム処理なしの単一分子配列決定、を用いることを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記ゲノムの第一の複数の領域のそれぞれについて、

前記領域に由来するそれぞれの DNA 分子数を決定し；

前記それぞれの数からそれぞれの正規化数を計算し；

前記それぞれの正規化数を参照値と比較して、前記それぞれの領域が欠失または増幅を示すか否かを決定するステップと；

欠失または増幅を示すと決定される第一の量の領域を決定するステップと；

前記第一の量を第一の閾値と比較してがんのレベルの第二の分類を決定するステップと

；

前記第一の分類と前記第二の分類とを用いてがんのレベルの第三の分類を決定するステップと、

をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 8】**

10  
20  
30  
40  
50

前記第一の閾値は、欠失または増幅を示すと決定される前記第一の複数の領域のパーセンテージである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記第三の分類は、前記第一の分類と前記第二の分類の両方ががんを示す場合にのみ、がん陽性である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記第三の分類は、前記第一の分類と前記第二の分類のいずれかががんを示す場合に、がん陽性である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

前記第一の分類は前記生物にがんが存在することを示すものであり、

10

前記第一のメチル化レベルを、他の生物から決定される対応する値と比較することによって、前記生物に関連するがんの型を特定するステップであって、前記他の生物の少なくとも 2 つが異なる型のがんを有していると特定されるステップ、をさらに含む、請求項 1 または 7 に記載の方法。

【請求項 12】

前記第三の分類は前記生物にがんが存在することを示すものであり、

前記第一の量の領域を、前記他の生物から決定される対応する値と比較することによって、前記生物に関連する前記型のがんを特定するステップをさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

20

前記第一のメチル化レベルを計算するステップは、

前記ゲノムの第二の複数の領域を特定することと；

前記領域のそれぞれの中の一つまたは複数の部位を特定することと；

各領域について領域メチル化レベルを計算することと、を含み、前記第一のメチル化レベルは第一の領域についてのものであり、

前記領域メチル化レベルのそれぞれをそれぞれの領域カットオフ値と比較するステップであって、前記第一のメチル化レベルを前記第一のカットオフ値と比較することを含むステップと；

前記それぞれの領域カットオフ値を超える領域メチル化レベルを有すると決定される第二の量の領域を決定するステップと；

30

前記第二の量の領域を第二の閾値と比較して、前記第一の分類を決定するステップと、をさらに含む、請求項 1 または 7 に記載の方法。

【請求項 14】

前記それぞれの領域カットオフ値を超える領域メチル化レベルを有すると決定される領域は第一の一連の領域に対応するものであり、

前記第一の一連の領域の領域メチル化レベルを、他の生物の、前記第一の一連の領域に対応する領域メチル化レベルと比較するステップであって、前記他の生物は、第一の型のがん、がん不存在、および第二の型のがんの少なくとも 2 つを有する、ステップと；

前記比較に基づいて、前記生物が前記第一の型のがん、がん不存在、または前記第二の型のがんを有するか否かを決定するステップと、

40

をさらに含む、請求項 13 の方法。

【請求項 15】

前記第一の一連の領域の領域メチル化レベルに基づいて前記他の生物をクラスタリングするステップであって、クラスターの 2 つは、前記第一の型のがん、がん不存在、および前記第二の型のがんのいずれか 2 つに対応するステップをさらに含む、

前記領域メチル化レベルの比較は前記生物がどちらのクラスターに属するかを決定する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記他の生物のクラスタリングは前記生物の領域メチル化レベルを用いる、請求項 15 に記載の方法。

50

**【請求項 17】**

前記クラスターは、前記第一の型のがんに対応する第一のクラスターと、前記第二の型のがんに対応する第二のクラスターと、がん不存在に対応する第三のクラスターとを含む、請求項 15 に記載の方法。

**【請求項 18】**

前記他の生物のクラスタリングは前記他の生物の第二の一連の領域のそれぞれの正規化数にさらに基づき、前記第二の一連の領域は、欠失または増幅を示すと決定される領域に対応し、領域に対する前記それぞれの正規化数は前記領域に由来するそれぞれの DNA 分子数から決定されるものであり、

前記第二の一連の領域のそれぞれについて、

前記領域に由来するそれぞれの DNA 分子数を決定し；

前記それぞれの数からそれぞれの正規化数を計算するステップと；

前記生物がどのクラスターに属するかを決定することの一部として、前記生物についての前記第二の一連の領域の前記それぞれの正規化数を、前記他の生物の前記それぞれの正規化数と比較するステップと、

をさらに含む、請求項 15 に記載の方法。

**【請求項 19】**

前記他の生物のクラスタリングは、高度メチル化 CpG 島のそれぞれのメチル化密度にさらに基づくものであり、

前記高度メチル化 CpG 島のそれぞれについて、

それぞれのメチル化密度を決定するステップと、

前記生物がどのクラスターに属するかを決定することの一部として、前記生物について前記高度メチル化 CpG 島のそれぞれのメチル化密度を、前記他の生物のメチル化密度と比較するステップと、

をさらに含む、請求項 18 に記載の方法。

**【請求項 20】**

前記第二の複数の領域のそれぞれについて、

前記領域メチル化レベルと前記それぞれの領域カットオフ値との間のそれぞれの差異を算出するステップと、

前記それぞれの差異に対応するそれぞれの確率を計算するステップと、をさらに含み、

前記第二の量の領域を決定することは、前記それぞれの確率を含む累積スコアを計算することを含む、請求項 13 の方法。

**【請求項 21】**

前記累積スコアを計算することは、

前記それぞれの確率の対数を取ってそれぞれの対数の結果を得るステップと；

前記それぞれの対数の結果を含む合計を計算するステップと、

を含む、請求項 20 に記載の方法。

**【請求項 22】**

前記累積スコアは前記それぞれの対数の結果の合計の負値である、請求項 21 に記載の方法。

**【請求項 23】**

各差異は前記それぞれの領域カットオフ値に関連する標準偏差で正規化される、請求項 20 に記載の方法。

**【請求項 24】**

前記それぞれの確率は、統計分布に従って前記それぞれの差異についての確率に対応する、請求項 20 に記載の方法。

**【請求項 25】**

前記第二の閾値は、参照群に由来する最も高い累積スコアに対応する、請求項 20 に記載の方法。

**【請求項 26】**

10

20

30

40

50

前記第一の複数の領域のそれぞれについて、  
 前記それぞれの正規化数と前記参照数との間のそれぞれの差異を算出するステップと；  
 前記それぞれの差異に対応するそれぞれの確率を計算するステップと、をさらに含み；  
 前記第一の量の領域を決定することは、前記それぞれの確率を含む第一の合計を計算することを含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記それぞれの領域カットオフ値は参照メチル化レベルに由来する特定量である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記第二の閾値はパーセンテージであり、前記第二の量の領域を第二の閾値と比較することは、

前記第二の閾値と比較する前に前記第二の量の領域を前記第二の複数の領域の第二の数で割ることを含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記第二の数は前記第二の複数の領域の全てに対応する、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記第一の複数の領域は前記第二の複数の領域と同じであり、前記それぞれの領域カットオフ値は、前記それぞれの領域が欠失または増幅を示すか否かに依存する、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 3 1】

それぞれの領域カットオフ値は、前記それぞれの領域が増幅を示さない場合より増幅を示す場合のほうがより大きい値を有し、それぞれの領域カットオフ値は、前記それぞれの領域が欠失を示さない場合より欠失を示す場合のほうがより小さい値を有する、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

それぞれの領域カットオフ値は前記第二の複数の領域の低メチル化について試験され、それぞれの領域カットオフ値は、前記それぞれの領域が増幅を示さない場合より増幅を示す場合のほうがより大きい負値を有し、それぞれの領域カットオフ値は、前記それぞれの領域が欠失を示さない場合より欠失を示す場合のほうがより小さい負値を有する、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記生物試料は処理の前に取られるものであり、  
 処理の後に取られる別の生物試料に対して請求項 1 3 の方法を繰り返して、  
 欠失または増幅を示すと決定される後続の第一の量の領域と、  
 前記それぞれの領域カットオフ値を超える領域メチル化レベルを有すると決定される後続の第二の量の領域と、を得るステップと；

前記第一の量を前記後続の第一の量と、前記第二の量を前記後続の第二の量と比較して前記生物の予後を決定するステップと、  
 をさらに含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記第一の量を前記後続の第一の量と、前記第二の量を前記後続の第二の量と比較して前記生物の予後を決定することは、

前記第一の量と前記後続の第一の量との間の第一の差異を決定するステップと；

前記第一の差異を一つまたは複数の第一の差異閾値と比較するステップと；

前記第二の量と前記後続の第二の量との間の第二の差異を決定するステップと；

前記第二の差異を一つまたは複数の第二の差異閾値と比較するステップと、

を含む、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記第一の差異が 1 つの第一の差異閾値を下回る場合のほうが、前記第一の差異が前記 1 つの第一の差異閾値を上回る場合よりも、前記予後は悪化すると予測され、前記第二の

10

20

30

40

50

差異が1つの第二の差異閾値を下回る場合のほうが、前記第二の差異が前記1つの第二の差異閾値を上回る場合よりも、前記予後は悪化すると予測される、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

前記1つの第一の差異閾値および前記1つの第二の差異閾値はゼロである、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記処理は免疫療法、外科手術、放射線療法、化学療法、抗体に基づく治療、エピジェネティック治療法、または標的療法である、請求項33に記載の方法。

【請求項38】

前記第一のカットオフ値は、健常生物から得られる生物試料により確定される参照メチル化レベルから特定の隔たりがある、請求項1に記載の方法。

10

【請求項39】

前記特定の隔たりは、前記参照メチル化レベルからの標準偏差の特定の数である、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

前記第一のカットオフ値は、前記生物試料が試験される前に得られる前記生物の試験前生物試料から決定される参照メチル化レベルより確定される、請求項1に記載の方法。

【請求項41】

前記第一のメチル化レベルを前記第一のカットオフ値と比較することは、  
前記第一のメチル化レベルと参照メチル化レベルとの間の差異を決定するステップと；  
前記差異を、前記第一のカットオフ値に対応する閾値と比較するステップと、  
を含む、請求項1に記載の方法。

20

【請求項42】

前記生物試料における腫瘍DNAの濃度分率を決定するステップと；  
前記濃度分率に基づいて前記第一のカットオフ値を計算するステップと、  
をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項43】

前記生物試料における腫瘍DNAの濃度分率が最小値より大きいか否かを決定するステップと；  
前記濃度分率が前記最小値より大きくない場合に前記生物試料にフラグを付けるステップと、  
をさらに含む、請求項1に記載の方法。

30

【請求項44】

腫瘍について参照メチル化レベルと比較したメチル化レベルの所期の差異に基づいて前記最小値を決定する、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記複数の部位でDNA分子のサイズを測定するステップと；  
前記第一のメチル化レベルを前記第一のカットオフ値と比較する前に、前記DNA分子の前記測定されたサイズに基づいて前記第一のメチル化レベルを正規化するステップと、  
をさらに含む、請求項1に記載の方法。

40

【請求項46】

前記測定されたサイズに基づいて前記第一のメチル化レベルを正規化することは、  
第一のサイズを有するDNA分子を選択するステップと；  
前記選択されたDNA分子を用いて前記第一のメチル化レベルを計算するステップであって、前記第一のカットオフ値は前記第一のサイズに対応するステップと、  
を含む、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記第一のサイズは或る範囲の長さである、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

50

前記DNA分子は、サイズに依存する物理的分離に基づいて選択される、請求項46に記載の方法。

【請求項49】

第一のサイズを有するDNA分子を選択することは、

前記複数のDNA分子のペアエンド大規模並列配列決定 (paired-end massively parallel sequencing) を実行して、前記DNA分子のそれぞれについて配列の対を得るステップと；

前記配列の対を参照ゲノムと比較することによってDNA分子のサイズを決定するステップと；

前記第一のサイズを有するDNA分子を選択するステップと、  
を含む、請求項46に記載の方法。

10

【請求項50】

前記測定されたサイズに基づいて前記第一のメチル化レベルを正規化することは、  
サイズとメチル化レベルとの間の関数関係を得るステップと；

前記関数関係を用いて前記第一のメチル化レベルを正規化するステップと、  
を含む、請求項45に記載の方法。

【請求項51】

前記関数関係は、それぞれのサイズに対応するスケール値を提供する、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

DNA分子に対応する平均サイズを算出して、これを用いて前記第一のメチル化レベルを計算するステップと；

前記第一のメチル化レベルに、前記対応するスケール値を掛けるステップと、  
をさらに含む、請求項51に記載の方法。

20

【請求項53】

前記複数の部位のそれぞれについて、

前記部位に位置する前記DNA分子のそれぞれについて、

前記部位における前記DNA分子のそれぞれのサイズを得るステップと；

前記それぞれのサイズに対応する前記スケール値を用いて、前記部位でメチル化される前記それぞれのDNA分子数への前記DNA分子の寄与を正規化するステップと、  
をさらに含む、請求項51に記載の方法。

30

【請求項54】

前記複数の部位はCpG部位を含み、前記CpG部位は複数のCpG島に組織化され、  
各CpG島は一つまたは複数のCpG部位を含み、前記第一のメチル化レベルは第一のCpG島に対応する、請求項1に記載の方法。

【請求項55】

前記CpG島は参照群に第一のパーセンテージより低い平均メチル化密度を有し、前記参照群における前記メチル化密度に対する変動係数は第二のパーセンテージよりも低い、  
請求項54に記載の方法。

【請求項56】

前記CpG島のそれぞれについて、

前記CpG島のメチル化レベルをそれぞれのカットオフ値と比較することによって、前記CpG島が他の生物の試料の参照群と比較して高度メチル化されているか否かを決定するステップと；

前記高度メチル化CpG島のそれぞれについて、  
それぞれのメチル化密度を決定するステップと；

前記それぞれのメチル化密度から累積スコアを計算するステップと；

前記累積スコアを累積カットオフ値と比較して前記第一の分類を決定するステップと、  
をさらに含む、請求項54に記載の方法。

40

【請求項57】

50

前記それぞれのメチル化密度から前記累積スコアを計算することは、  
 前記高度メチル化 CpG 島のそれぞれについて、  
 前記それぞれのメチル化密度と参照密度との間のそれぞれの差異を計算し；  
 前記それぞれの差異に対応するそれぞれの確率を計算するステップと；  
 前記それぞれの確率を用いて前記累積スコアを決定するステップと、  
 を含む、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

前記累積スコアを、  
 前記それぞれの確率の対数を取ってそれぞれの対数の結果を得るステップと；  
 前記それぞれの対数の結果を含む合計を計算するステップと、  
 によって決定し、前記累積スコアは前記合計の負値である、  
 請求項 56 に記載の方法。

10

【請求項 59】

各差異それぞれは、前記参照密度に関連する標準偏差で正規化される、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 60】

前記累積カットオフ値は、前記参照群からの最も高い累積スコアに対応する、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 61】

前記第一の CpG 島が高度メチル化されているか否かを決定することは、  
 前記第一のメチル化レベルを前記第一のカットオフ値および第三のカットオフ値と比較するステップを含み、  
 前記第一のカットオフ値は、前記参照群についてのメチル化密度の平均に特定のパーセンテージを足したものに  
 対応し、前記第三のカットオフ値は、特定の標準偏差数に前記参照群についてのメチル化密度の前記平均を足したものに  
 対応する、  
 請求項 56 に記載の方法。

20

【請求項 62】

前記特定のパーセンテージは 2% である、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

前記特定の標準偏差数は 3 である、請求項 61 に記載の方法。

30

【請求項 64】

前記ゲノムの第一の複数の領域のそれぞれについて、  
 前記領域に由来するそれぞれの DNA 分子数を決定し；  
 前記それぞれの数からそれぞれの正規化数を計算し；  
 前記それぞれの正規化数を参照値と比較して、前記それぞれの領域が欠失又は増幅を示すか否かを決定するステップと；

全て、欠失、増幅、または正常な表現の 1 つを示すと決定される第一の一連の領域を決定するステップであって、前記第一のメチル化レベルは前記第一の一連の領域に対応するステップと；

全て、欠失、増幅、または正常な表現のいずれか 2 つ目を示すと決定される第二の一連の領域を決定するステップと；

40

前記第二の一連の領域の部位においてメチル化される前記それぞれの DNA 分子数に基づいて第二のメチル化レベルを計算するステップと、をさらに含み、

前記第一のメチル化レベルを前記第一のカットオフ値と比較することは、  
 前記第一のメチル化レベルと前記第二のメチル化との間のパラメーターを算出することと

；  
 前記パラメーターを前記第一のカットオフ値と比較することと、  
 を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 65】

前記第一のメチル化レベルは前記第一の一連の領域のそれぞれの領域について計算され

50

る領域メチル化レベルの統計値であり、前記第二のメチル化レベルは前記第二の一連の領域のそれぞれの領域について計算される領域メチル化レベルの統計値である、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記統計値を、スチューデント t 検定、分散分析 (ANOVA) 検定、またはクラスカル・ワリス検定を用いて決定する、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記パラメーターは比率または差異を含む、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記パラメーターを算出することは確率分布を前記比率または前記差異に適用することを含む、請求項 6 7 に記載の方法。 10

【請求項 6 9】

生物の生物試料から第一のメチル化特性を決定する方法であって、前記生物試料は、第一の組織および第二の組織に由来する無細胞 DNA 分子の混合物を含む無細胞 DNA を含み、

前記第二の組織の DNA 分子に対応する第二のメチル化特性を得るステップであって、前記第二のメチル化特性は、前記生物のゲノムの複数の遺伝子座のそれぞれにおけるメチル化密度を提供し、特定の遺伝子座における前記メチル化密度は、メチル化されている前記第二の組織の DNA 分子の割合に対応する、ステップと；

前記混合物の前記無細胞 DNA 分子から無細胞メチル化特性を決定するステップであって、前記無細胞メチル化特性は前記複数の遺伝子座のそれぞれにおけるメチル化密度を提供するステップと； 20

前記第一の組織に由来する前記混合物における前記無細胞 DNA 分子のパーセンテージを決定するステップと；

前記組織の前記第一のメチル化特性を決定するステップと；

前記複数の遺伝子座のそれぞれについて、

前記第二のメチル化特性のメチル化密度と前記無細胞メチル化特性のメチル化密度との間のパーセンテージ単位で決められる差異を含む示差パラメーターを計算することによって、前記第一の組織の前記第一のメチル化特性を決定するステップと、を含む、方法。 30

【請求項 7 0】

前記第一のメチル化特性から第一のメチル化レベルを決定するステップと；

前記第一のメチル化レベルを第一のカットオフ値と比較して、前記比較に基づいてがんのレベルの分類を決定するステップと、をさらに含む、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記第一のメチル化特性を変換して、補正された第一のメチル化特性を得るステップをさらに含む、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記変換は線形の変換である、請求項 7 1 に記載の方法。 40

【請求項 7 3】

遺伝子座についての前記示差パラメーター D は、

【数 1】

$$D = mbc - \frac{(mbc - mp)}{A - CN}$$

(式中、m b c は前記遺伝子座における前記第二のメチル化特性の前記メチル化密度を表 50

し、 $m_p$  は前記遺伝子座における前記無細胞メチル化特性の前記メチル化密度を表し、 $f$  は前記生物試料における前記第一の組織に由来する無細胞 DNA 分子のパーセンテージであり、 $C_N$  は前記遺伝子座におけるコピー数を表す) と定義される、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 74】

$C_N$  は、前記遺伝子座において二染色体である前記第一の組織のコピー数についてのものである、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 75】

D が閾値を超える領域を特定することをさらに含む、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 76】

次の基準：

50% より大きい GC 含量；

第一の閾値より小さいか第二の閾値より大きい、前記第二のメチル化特性のメチル化密度；

前記遺伝子座によって定義される、領域内の最低 5 つの CpG 部位；

のいずれか一つまたは複数を有する遺伝子座を選択することによって前記複数の遺伝子座を特定するステップ、

をさらに含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 77】

前記生物試料は胎児を妊娠している女性対象に由来し、前記第一の組織は前記胎児または胎盤に由来し、前記第二の組織は前記女性対象に由来する、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 78】

前記第一のメチル化特性から第一のメチル化レベルを決定するステップと；

前記第一のメチル化レベルを第一のカットオフ値と比較して病状の分類を決定するステップと、

をさらに含む、請求項 77 に記載の方法。

【請求項 79】

前記病状は子癇前症、または前記第一の組織における染色体異常である、請求項 78 に記載の方法。

【請求項 80】

前記第一の組織は前記生物内の腫瘍に由来し、前記第二の組織は前記生物の非悪性組織に由来する、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 81】

前記生物試料はまた、前記第二の組織に由来する DNA 分子を含み、

前記第二のメチル化特性を得ることは、

前記第二の組織に由来する前記 DNA 分子を解析して前記第二のメチル化特性を決定することを含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 82】

前記得られた第二のメチル化特性は、対照試料の群より得られる平均メチル化特性に対応する、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 83】

前記複数の遺伝子座の第一の遺伝子座について前記無細胞メチル化特性のメチル化密度を決定することは、

前記第一の遺伝子座に由来する前記無細胞 DNA 分子の第一の数を決定するステップと；

前記第一の数の各 DNA 分子が一つまたは複数の部位でメチル化されるか否かを決定して、メチル化 DNA 分子の第二の数を決定するステップと；

前記第一の数および前記第二の数から前記メチル化密度を計算するステップと、

を含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 84】

10

20

30

40

50

前記一つまたは複数の部位は CpG 部位である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 85】

前記無細胞メチル化特性を決定することは、

前記無細胞 DNA 分子を亜硫酸水素ナトリウムで処理するステップと；

前記処理された DNA 分子の配列決定を実行するステップと、

を含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 86】

前記無細胞 DNA 分子の処理は、Tet 支援 (Tet - assisted) 亜硫酸水素塩変換の一部であるか、または、前記無細胞 DNA 分子を過ルテニウム酸カリウム (KRuO<sub>4</sub>) で処理することを含む、請求項 85 に記載の方法。

10

【請求項 87】

前記無細胞メチル化特性を決定することは、

前記 DNA の単一分子配列決定を実行するステップであって、前記単一分子配列決定は、DNA 分子の少なくとも 1 つの部位がメチル化されているか否かを決定することを含むステップを含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 88】

複数の指示が実行されるとコンピューターシステムを制御して請求項 1 に記載の方法を実行する前記複数の指示を記憶するコンピューター読取り可能な非一時的記録媒体を含むコンピューター製品。

【請求項 89】

生物の生物試料から第一のメチル化特性を決定する方法であって、前記生物試料は第一の組織および第二の組織に由来する無細胞 DNA の混合物を含み、

20

前記生物試料から複数の DNA 分子を解析するステップであって、DNA 分子を解析することは：

前記生物のゲノムにおける前記 DNA 分子の位置を決定することと；

前記 DNA 分子の遺伝子型を決定することと；

前記 DNA 分子が一つまたは複数の部位でメチル化されているか否かを決定することと、を含む、ステップと；

それぞれの第一の対立遺伝子およびそれぞれの第二の対立遺伝子について前記第一の組織の第一のゲノムがヘテロ接合性であり、前記それぞれの第一の対立遺伝子について前記第二の組織の第二のゲノムがホモ接合性である、複数の第一の遺伝子座を特定するステップと；

30

前記第一の遺伝子座のそれぞれについて：

前記遺伝子座に関連する一つまたは複数の部位のそれぞれについて：

前記部位においてメチル化され、前記遺伝子座の前記それぞれの第二の対立遺伝子に対応する DNA 分子の数を決定し、

前記遺伝子座の前記一つまたは複数の部位でメチル化され、前記遺伝子座の前記それぞれの第二の対立遺伝子に対応する DNA 分子の数に基づいてメチル化密度を計算するステップと；

前記第一の遺伝子座についてのメチル化密度から、前記第一の組織の前記第一のメチル化特性を作成するステップと、を含む、方法。

40

【請求項 90】

前記生物試料は胎児を妊娠している女性対象に由来し、前記第一の組織は前記胎児または胎盤に由来し、前記第二の組織は女性対象に対応する、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 91】

前記部位は CpG 部位に対応する、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 92】

各遺伝子座は少なくとも 1 つの CpG 部位を含む、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 93】

50

各遺伝子座は少なくとも1つのCpG部位に隣接する、請求項89に記載の方法。

【請求項94】

胎児のDNAと胎児を妊娠している女性対象に由来するDNAとの混合物を含有する生物試料における胎児のDNAを解析するキットであって、

表S2A、S2B、S2C、S2D、S3A、S3B、S3C、およびS3Dに列記するゲノム領域の少なくとも1つのセクションと特異的にハイブリダイズする一つまたは複数のオリゴヌクレオチドを含む、キット。

【請求項95】

前記オリゴヌクレオチドの少なくとも1つは、前記ゲノム領域の1つの少なくとも1つのセクションに対応するプライマーである、請求項94に記載のキット。

10

【請求項96】

前記オリゴヌクレオチドの少なくとも1つは、前記ゲノム領域の1つの少なくとも1つのセクションに対応するプローブである、請求項94に記載のキット。

【請求項97】

一つまたは複数のメチル化感受性制限酵素をさらに含む、請求項94に記載のキット。

【請求項98】

前記一つまたは複数のメチル化感受性制限酵素の少なくとも1つは、低メチル化されているDNA分子を切断する、請求項94に記載のキット。

【請求項99】

前記一つまたは複数のメチル化感受性制限酵素の少なくとも1つは、高度メチル化されているDNA分子を切断する、請求項94に記載のキット。

20

【請求項100】

前記一つまたは複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも1つは表S2Aより選択される、請求項94に記載のキット。

【請求項101】

前記一つまたは複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも1つは表S2Bより選択される、請求項94に記載のキット。

【請求項102】

前記一つまたは複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも1つは表S2Cより選択される、請求項94に記載のキット。

30

【請求項103】

前記一つまたは複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも1つは表S2Dより選択される、請求項94に記載のキット。

【請求項104】

前記一つまたは複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも1つは表S3Aより選択される、請求項94に記載のキット。

【請求項105】

前記一つまたは複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも1つは表S3Bより選択される、請求項94に記載のキット。

【請求項106】

前記一つまたは複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも1つは表S3Cより選択される、請求項94に記載のキット。

40

【請求項107】

前記一つまたは複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも1つは表S3Dより選択される、請求項94に記載のキット。

【請求項108】

生物の生物試料におけるDNAのメチル化レベルを推定する方法であって、

複数のサイズの各サイズについて；

前記サイズに対応する前記生物試料から複数のDNA断片の量を測定するステップと；

複数のサイズのDNA断片の量に基づいて第一のパラメーターの第一の値をコンピュー

50

ターシステムで計算するステップであって、前記第一のパラメーターは前記生物試料における DNA 断片のサイズ特性の統計的尺度を提供する、ステップと；

前記第一のサイズ値を、参照試料の DNA 断片から計算される参照サイズ値と比較するステップと、

前記比較に基づいて前記メチル化レベルを推定するステップと、  
を含む、方法。

【請求項 109】

前記サイズに対応する DNA 断片の量を測定することは、

前記生物試料に由来する前記複数の DNA 断片のそれぞれについて；

前記 DNA 断片のサイズを測定するステップであって、

DNA 断片のサイズを測定することは、

前記 DNA 断片のペアエンド配列決定を実行してペア配列リードを得ることと；

前記ペア配列リードを参照ゲノムに整列させることと；

前記整列した位置を用いて前記 DNA 断片のサイズを決定することと、を含むステップ、  
を含む、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 110】

前記メチル化レベルは、前記特定の領域に整列する DNA 断片からのみ前記第一のサイズ値を決定することによって特定の領域に対応する、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 111】

前記サイズに対応する DNA 断片の量を測定することは電気泳動法を用いることを含む、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 112】

前記参照試料は前記生物試料より早期に前記生物から得られ、前記推定されたメチル化レベルは、前記参照サイズ値と比較した前記第一のサイズ値の増加量または減少量に対応する相対的レベルである、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 113】

前記参照サイズ値は校正曲線の一部である、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 114】

前記メチル化レベルはメチル化密度である、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 115】

前記メチル化密度は CpG 部位についてのものである、請求項 114 に記載の方法。

【請求項 116】

生物の生物試料から染色体異常を検出する方法であって、前記生物試料は、第一の組織と第二の組織とに由来する無細胞 DNA の混合物を含む無細胞 DNA を含み、

複数の DNA 分子を前記生物試料から解析するステップであって、DNA 分子を解析することは、

参照ゲノムにおける前記 DNA 分子の位置を決定することと；

前記 DNA 分子が一つまたは複数の部位においてメチル化されているか否かを決定することと、を含む、ステップと；

複数の部位のそれぞれについて；

前記部位においてメチル化されているそれぞれの DNA 分子数を決定するステップと；

前記第一の染色体領域内の部位においてメチル化される前記それぞれの DNA 分子数に基づいて第一の染色体領域の第一のメチル化レベルを計算するステップと；

前記第一のメチル化レベルをカットオフ値と比較するステップと；

前記比較に基づいて前記第一の染色体領域について前記第一の組織における異常の分類を決定するステップと、

を含む、方法。

【請求項 117】

前記第一のメチル化レベルをカットオフ値と比較することは、

前記第一のメチル化レベルを正規化することと、前記正規化された第一のメチル化レベル

10

20

30

40

50

を前記カットオフ値と比較することと、を含む、請求項 1 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

前記正規化は第二の染色体領域の第二のメチル化レベルを用いる、請求項 1 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

前記正規化は前記第一の組織に由来する無細胞 DNA の濃度分率を用いる、請求項 1 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

第一のメチル化レベルを計算することは、

前記生物のゲノムの複数の領域を特定するステップと；

前記領域のそれぞれの中の一つまたは複数の部位を特定するステップと；

各領域について領域メチル化レベルを計算するステップと、を含み、

前記第一のメチル化レベルは第一の領域についてのものであり、

前記第一のメチル化レベルを第一のカットオフ値と比較することは、

前記領域メチル化レベルのそれぞれをそれぞれの領域カットオフ値と比較するステップと；

領域メチル化レベルが前記それぞれの領域カットオフ値を超える領域の第一の数を決定するステップと；

前記第一の数を閾値と比較して前記分類を決定するステップと、

を含む、請求項 1 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記閾値はパーセンテージであり、

前記第一の数を閾値と比較することは、前記閾値と比較する前に前記第一の領域数を第二の領域数で割ることを含む、請求項 1 2 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記第二の領域数は前記特定された複数の領域の全てである、請求項 1 2 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記それぞれの領域カットオフ値は、参照メチル化レベルに由来する特定の量である、請求項 1 2 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記生物試料は胎児を妊娠している女性対象に由来し、前記第一の組織は前記胎児または胎盤に由来し、前記第二の組織は前記女性対象に由来し、前記染色体異常は胎児の染色体異常である、請求項 1 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記カットオフ値は、前記女性対象に由来する前記第二の組織の DNA に関連するバックグラウンドメチル化レベルに基づく、請求項 1 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記カットオフ値は、前記第一の染色体領域について染色体異常のない胎児を懐妊している他の女性妊娠対象から決定される、請求項 1 2 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記染色体異常は、2 1 番染色体トリソミーまたは 1 8 番染色体トリソミーまたは 1 3 番染色体トリソミーまたはターナー症候群またはクラインフェルター症候群である、請求項 1 2 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記第一の組織は前記生物内の腫瘍に由来し、前記第二の組織は前記生物の非悪性組織に由来する、請求項 1 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記カットオフ値は、がんを有さない他の生物から決定される、請求項 1 1 6 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 130】

カットオフ値は、前記生物試料における前記第一の組織に由来する無細胞DNAの濃度に基づき、請求項 116 に記載の方法。

## 【請求項 131】

前記カットオフ値は、異常のタイプに対応するスケーリング因子に基づき、前記異常のタイプは欠失または重複である、請求項 130 に記載の方法。

## 【請求項 132】

参照ゲノムにおける前記DNA分子の位置を決定することは、前記位置が前記第一の染色体領域内にあるか否かを決定することを含む、請求項 116 に記載の方法。

## 【請求項 133】

前記参照ゲノムにおける前記DNA分子の位置を決定することは、前記DNA分子が前記第一の染色体領域に位置するか否かを決定することによって成される、請求項 132 に記載の方法。

## 【請求項 134】

前記染色体異常は、染色体欠失、または染色体重複、またはディジョージ症候群である、請求項 116 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

分野

本開示は一般に、DNAのメチル化パターン（メチローム）の決定に関し、より詳しくは、別々のゲノムに由来（例えば胎児と母親にそれぞれ由来、または腫瘍と正常細胞にそれぞれ由来）するDNAの混合物を含む生物試料（例えば血漿）を解析して、少数のゲノムのメチル化パターン（メチローム）を決定することに関する。決定されたメチロームの使用についても記載する。

## 【背景技術】

## 【0002】

関連出願への相互参照

本願は、2013年6月3日出願の米国仮特許出願第61/830,571号「Tumor Detection In Plasma Using Methylation Status And Copy Number」と、2012年9月20日出願の米国仮特許出願第61/703,512号「Method Of Determining The Whole Genome DNA Methylation Status Of The Placenta By Massively Parallel Sequencing Of Maternal Plasma」の非仮出願でありその利益を主張する2013年3月15日出願の米国出願第13/842,209号「Non-Invasive Determination Of Methylome Of Fetus Or Tumor From Plasma」と、に対して優先権を主張するPCT出願であり、それらの全体はあらゆる目的のために参照によって本明細書に援用される。

## 【0003】

背景

胚および胎児の発生は複雑なプロセスであり、一連の高度に統制された遺伝的および後成的現象が関与している。がんの発生もまた、典型的に多重的な遺伝的および後成的過程が関与する複雑なプロセスである。発生プロセスの後成的制御における異常は、不妊症、自然流産、子宮内発育異常、および出生後経過に関係するとされる。DNAメチル化は、研究されることの最も多い後成的メカニズムのひとつである。DNAのメチル化は、CpGジヌクレオチドの間でシトシン残基の5'炭素にメチル基が付加されるという状況としてもっともよく起こる。シトシンメチル化は、遺伝子転写およびDNA機能に制御を一階層付加する。例えば、CpG島と称される、CpGジヌクレオチドの多い遺伝子プロモ-

10

20

30

40

50

ターの高度メチル化は通常、遺伝子機能の抑制に関連づけられる。

【0004】

発生プロセスを調和させる上で後成的メカニズムの役割が重要であるにもかかわらず、ヒトの胚および胎児の組織は、解析のために容易に利用できない（腫瘍も同様に利用できないことがある）。ヒトの出生前期中の健康と疾患におけるこのような後成的プロセスの動的変化について研究は実質上不可能である。胚外組織、特に胎盤は出生前診断の手順の一部として、または出産後に得ることができるので、このような調査にとって主要な手段のひとつとなっている。しかしながら、このような組織は浸潤性の手順を必要とする。

【0005】

ヒト胎盤のDNAメチル化特性は数十年の間研究者の興味を引いてきた。ヒト胎盤は、DNAメチル化の関係する独特な生理的特徴を非常に多く示す。全体のレベルでは、胎盤組織はほとんどの体細胞組織に比べて低メチル化となっている。遺伝子のレベルでは、所定のゲノム遺伝子座のメチル化状態は、胎盤組織に固有の特異的な特徴である。全体および遺伝子座特異的なメチル化特性の両方が妊娠期間依存的な変化を示す。刷り込み遺伝子、即ち、その発現が対立遺伝子の親起源に依存的な遺伝子は、胎盤において重要な機能を果たす。胎盤は擬似悪性として説明され、いくつかの腫瘍抑制遺伝子の高度メチル化が観察されてきた。

10

【0006】

胎盤組織のDNAメチル化特性の研究は、例えば、子癇前症および子宮内胎児発育遅延等、妊娠関連または発生関連疾患の病態生理学に洞察を与えてきた。ゲノム刷り込みにおける障害は、プラダー・ウィリー症候群およびアンジェルマン症候群等、発達障害に関連するとされる。胎盤および胎児の組織におけるゲノム刷り込みおよび全体DNAメチル化の変動特性が、補助生殖医療によって起こる妊娠において観察されている（H Hiura et al. 2012 Hum Reprod; 27: 2541 - 2548）。いくつかの環境要因、例えば母親の喫煙（K E Haworth et al. 2013 Epigenomics; 5: 37 - 49）、母親の食事要因（X Jiang et al. 2012 FASEB J; 26: 3563 - 3574）、および糖尿病等の母親の代謝状態（N Hajj et al., Diabetes. doi: 10.2337/db12-0289）が、出生児の後成的異常に関連するとされている。

20

【発明の概要】

30

【0007】

概要

数十年間の努力にもかかわらず、胎児または腫瘍のメチロームを研究するためおよび、妊娠中または悪性腫瘍等の疾患経過中を通して動的変化を監視するために、利用可能な実用的手段が何もなかった。したがって、胎児のメチロームおよび腫瘍のメチロームの全てまたは部分を非浸潤的に解析する方法を提供することが望まれている。

【0008】

実施形態は、種々の組織および試料のメチル化特性を決定し使用する系、方法、および装置を提供する。実施例を提供する。メチル化特性は、血漿メチル化（または無細胞DNAをもった他の試料、例えば尿、唾液、生殖器流出物）と母親/患者のメチル化特性との比較に基づいて、胎児/腫瘍組織について推定することができる。試料がDNAの混合物を有する場合、組織特異的対立遺伝子を用いて胎児/腫瘍からDNAを特定し、その胎児/腫瘍組織についてメチル化特性を決定することができる。メチル化特性を用いて、胎児/腫瘍のゲノムにおけるコピー数変動を決定することができる。胎児についてのメチル化マーカーは、種々の技術によって特定されてきた。メチル化特性を、DNA断片のサイズ分布のサイズパラメーターを決定することによって決定し、サイズパラメーターに対する参照値を用いてメチル化レベルを決定することができる。

40

【0009】

加えて、メチル化レベルを用いてがんのレベルを決定することができる。がんの関連においては、血漿におけるメチロームの変化の測定によってがんを検出して（例えば、スク

50

リーニングを目的として)、監視(例えば、抗がん治療に続く応答の検出、およびがん再発の検出)、および予後判定が(例えば、身体におけるがん細胞の負荷の測定のため、または病期分類目的のため、または、疾患または疾患進行若しくは転移プロセスによる死亡の可能性の推定のために)可能となる。

【0010】

以下の、発明を実施するための形態と添付図面を参照して、本発明の実施形態の性質および利点についてよりよい理解が得られる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1A-1】本発明の実施形態による、母体血、胎盤、および母体血漿の配列決定の、表100の結果を示す。 10

【図1A-2】本発明の実施形態による、母体血、胎盤、および母体血漿の配列決定の、表100の結果を示す。

【図1B】本発明の実施形態に従って配列決定された試料の1Mbウィンドウ内のメチル化密度を示す。

【図2A】メチル化指標に対する値のプロットを示す:(A)母体血液細胞、(B)絨毛膜絨毛検体、(C)満期胎盤組織。

【図2B】メチル化指標に対する値のプロットを示す:(A)母体血液細胞、(B)絨毛膜絨毛検体、(C)満期胎盤組織。

【図2C】メチル化指標に対する値のプロットを示す:(A)母体血液細胞、(B)絨毛膜絨毛検体、(C)満期胎盤組織。 20

【図3A】成人男性および非妊娠成人女性から採取された血漿および血液細胞における、メチル化されたCpG部位の割合の棒グラフを示す:(A)常染色体、(B)X染色体。

【図3B】成人男性および非妊娠成人女性から採取された血漿および血液細胞における、メチル化されたCpG部位の割合の棒グラフを示す:(A)常染色体、(B)X染色体。

【図4A】血液細胞DNAおよび血漿DNAにおける対応する遺伝子座のメチル化密度のプロットを示す:(A)非妊娠成人女性、(B)成人男性。

【図4B】血液細胞DNAおよび血漿DNAにおける対応する遺伝子座のメチル化密度のプロットを示す:(A)非妊娠成人女性、(B)成人男性。

【図5A】妊娠女性から採取した試料間の、メチル化されたCpG部位の割合の棒グラフを示す:(A)常染色体、(B)X染色体。 30

【図5B】妊娠女性から採取した試料間の、メチル化されたCpG部位の割合の棒グラフを示す:(A)常染色体、(B)X染色体。

【図6】母体血、胎盤および母体血漿における、ヒトゲノムの異なる反復クラスのメチル化レベルの棒グラフを示す。

【図7A】第一期試料のCircosプロット700を示す。

【図7B】第三期試料のCircosプロット750を示す。

【図8A】有益な一塩基多型を囲んでいるCpG部位についての、母体血漿DNAに対するゲノム組織DNAのメチル化密度の比較のプロットを示す。

【図8B】有益な一塩基多型を囲んでいるCpG部位についての、母体血漿DNAに対するゲノム組織DNAのメチル化密度の比較のプロットを示す。 40

【図8C】有益な一塩基多型を囲んでいるCpG部位についての、母体血漿DNAに対するゲノム組織DNAのメチル化密度の比較のプロットを示す。

【図8D】有益な一塩基多型を囲んでいるCpG部位についての、母体血漿DNAに対するゲノム組織DNAのメチル化密度の比較のプロットを示す。

【図9】本発明の実施形態に従って、生物の生物試料から第一のメチル化特性を決定するための方法900を示すフローチャートである。

【図10】本発明の実施形態に従って、生物の生物試料から第一メチル化特性を決定する方法1000を示すフローチャートである。

【図11A】本発明の実施形態による、母体血漿データおよび胎児DNA濃度分率を用い 50

た予測アルゴリズムの実行のグラフを示す。

【図 1 1 B】本発明の実施形態による、母体血漿データおよび胎児 DNA 濃度分率を用いた予測アルゴリズムの実行のグラフを示す。

【図 1 2 A】本発明の実施形態に従った、メチル化予測のための、15 の選択されたゲノム遺伝子座の詳細を示す表 1 2 0 0 である。

【図 1 2 B】15 の選択されたゲノム遺伝子座および胎盤におけるそれらの対応するメチル化レベルの推定カテゴリーを示すグラフ 1 2 5 0 を示す。

【図 1 3】少なくとも 1 つの胎児を妊娠した女性対象の生物試料から胎児の染色体異常を検出する方法 1 3 0 0 のフローチャートである。

【図 1 4】本発明の実施形態に従って、胎盤メチル化特性を母体メチル化特性と比較することによる、メチル化マーカーを特定するための方法 1 4 0 0 のフローチャートである。

【図 1 5 A】33 の以前に報告された第一期マーカーを参照して第一期データを用いる、DMR 特定アルゴリズムの性能を示す、表 1 5 0 0 である。

【図 1 5 B】第三期データを用いる、分娩時に得られた胎盤試料と比較された、DMR 特定アルゴリズムの性能を示す、表 1 5 5 0 である。

【図 1 6】母体血漿亜硫酸水素塩配列決定データの直接解析に基づいて高度メチル化または低メチル化状態であると予測された遺伝子座の数を示す、表 1 6 0 0 である。

【図 1 7 A】母体血漿 DNA、非妊娠女性対照血漿 DNA、胎盤 DNA および末梢血 DNA のサイズ分布を示す、プロット 1 7 0 0 である。

【図 1 7 B】母体血漿、成人女性対照血漿、胎盤組織および成人女性対照血液のサイズ分布およびメチル化特性の、プロット 1 7 5 0 である。

【図 1 8 A】本発明の実施形態による、血漿 DNA 分子のメチル化密度およびサイズのプロットである。

【図 1 8 B】本発明の実施形態による、血漿 DNA 分子のメチル化密度およびサイズのプロットである。

【図 1 9 A】成人非妊娠女性の配列決定されたリードのメチル化密度およびサイズの、プロット 1 9 0 0 を示す。

【図 1 9 B】母体血漿中の胎児特異的 DNA 分子および母体特異的 DNA 分子のサイズ分布およびメチル化特性を示す、1 9 5 0 である。

【図 2 0】本発明の実施形態に従って、生物の生物試料中の DNA のメチル化レベルを推定するための方法 2 0 0 0 のフローチャートである。

【図 2 1 A】肝細胞がん (HCC) 患者の手術前血漿および組織試料のメチル化密度を示す表 2 1 0 0 である。

【図 2 1 B】試料ごとに達成された配列リードの数および配列決定深度を示す表 2 1 5 0 である。

【図 2 2】常染色体におけるメチル化密度が健常対照群の血漿試料において 71.2% ~ 72.5% の範囲であったことを示す、表 2 2 0 である。

【図 2 3 A】HCC 患者の軟膜、腫瘍組織、非腫瘍性肝組織、手術前血漿および手術後血漿のメチル化密度を示す。

【図 2 3 B】HCC 患者の軟膜、腫瘍組織、非腫瘍性肝組織、手術前血漿および手術後血漿のメチル化密度を示す。

【図 2 4 A】HCC 患者から得た手術前血漿のメチル化密度を示すプロット 2 4 0 0 である。

【図 2 4 B】HCC 患者から得た手術後血漿のメチル化密度を示すプロット 2 4 5 0 である。

【図 2 5 A】1 番染色体の参照として 4 人の健常対照患者の血漿メチロームデータを用いた、HCC 患者の手術前 (プロット 2 5 0 0) および手術後 (プロット 2 5 5 0) の血漿試料の血漿 DNA メチル化密度の Z 値を示す。

【図 2 5 B】1 番染色体の参照として 4 人の健常対照患者の血漿メチロームデータを用いた、HCC 患者の手術前 (プロット 2 5 0 0) および手術後 (プロット 2 5 5 0) の血漿

10

20

30

40

50

試料の血漿 DNA メチル化密度の Z 値を示す。

【図 2 6 A】手術前血漿および手術後血漿の Z 値のデータを示す、表 2 6 0 0 である。

【図 2 6 B】全常染色体から解析された 1 Mb ビンの参照として 4 人の健常対照患者を用いた、HCC 患者の手術前血漿試料および手術後血漿試料の血漿 DNA メチル化密度の Z 値を示す Circos プロット 2 6 2 0 である。

【図 2 6 C】HCC 患者の手術前血漿試料および手術後血漿試料の両方における全ゲノムの 1 Mb ビンの Z 値の分布を示す、表 2 6 4 0 である。

【図 2 6 D】CHH 配列および CHG 配列を用いた場合の対照血漿試料のいくつかと重複する、腫瘍組織および手術前血漿試料のメチル化レベルを示す、表 2 6 6 0 である。

【図 2 7 A】本発明の実施形態による、8 人のがん患者のメチル化密度の Circos プロットを示す。

【図 2 7 B】本発明の実施形態による、8 人のがん患者のメチル化密度の Circos プロットを示す。

【図 2 7 C】本発明の実施形態による、8 人のがん患者のメチル化密度の Circos プロットを示す。

【図 2 7 D】本発明の実施形態による、8 人のがん患者のメチル化密度の Circos プロットを示す。

【図 2 7 E】本発明の実施形態による、8 人のがん患者のメチル化密度の Circos プロットを示す。

【図 2 7 F】本発明の実施形態による、8 人のがん患者のメチル化密度の Circos プロットを示す。

【図 2 7 G】本発明の実施形態による、8 人のがん患者のメチル化密度の Circos プロットを示す。

【図 2 7 H】本発明の実施形態による、8 人のがん患者のメチル化密度の Circos プロットを示す。

【図 2 7 I】配列リードの数および試料毎に達成された配列決定深度を示す表 2 7 8 0 である。

【図 2 7 J】異なる悪性腫瘍を有する患者の血漿中のゲノム全体における 1 Mb ビンの Z 値分布を示す、表 2 7 9 0 である。CL = 肺腺がん；NPC = 上咽頭がん；CRC = 結腸直腸がん；NE = 神経内分泌がん；SMS = 平滑筋肉腫。

【図 2 8】本発明の実施形態に従って、生物の生物試料を解析してがんのレベルの分類を決定する、方法 2 8 0 0 のフローチャートである。

【図 2 9 A】分布が正規分布に従うことを仮定する、参照対象におけるメチル化密度の分布を示すプロット 2 9 0 0 である。

【図 2 9 B】がん対象におけるメチル化密度の分布を、この分布が正規分布になり、平均メチル化レベルがカットオフより 2 標準偏差下回ると仮定して示すプロット 2 9 5 0 である。

【図 3 0】健常対象およびがん患者の血漿 DNA のメチル化密度の分布を示す、プロット 3 0 0 0 である。

【図 3 1】健常対象の血漿 DNA および HCC 患者の腫瘍組織の平均値の間のメチル化密度における差異の分布を示す、グラフ 3 1 0 0 である。

【図 3 2 A】血漿試料が 5 % または 2 % の腫瘍 DNA を含有した場合の、配列決定深度の減少の影響を示す、表 3 2 0 0 である。

【図 3 2 B】4 人の健常対照群対象の血漿、並びに HCC 患者の軟膜、正常肝組織、腫瘍組織、手術前血漿試料、および手術後血漿試料の、反復要素と非反復領域のメチル化密度を示すグラフ 3 2 5 0 である。

【図 3 3】本発明の実施形態による系および方法とともに使用することができる例示的コンピューターシステム 3 3 0 0 のブロック図を示す。

【図 3 4 A】全身性エリテマトーデス (SLE) 患者 SLE 0 4 における血漿 DNA のサイズ分布を示す。

10

20

30

40

50

【図34B】SLE患者SLE04（図34B）およびHCC患者TBR36（図34C）から得られた血漿DNAのメチル化解析を示す。

【図34C】SLE患者SLE04（図34B）およびHCC患者TBR36（図34C）から得られた血漿DNAのメチル化解析を示す。

【図35】本発明の実施形態に従って、CG島の高度メチル化に基づいてがんのレベルの分類を決定する、方法3500のフローチャートである。

【図36】本発明の実施形態に従って複数の染色体領域を用いて生物の生物試料を解析する、方法3600のフローチャートである。

【図37A】患者TBR36の腫瘍組織、非亜硫酸水素塩（BS）処理血漿DNAおよび亜硫酸水素塩処理血漿DNAのCNA解析（内側から外側に）を示す。

【図37B】患者TBR36の1Mbピンの亜硫酸水素塩処理血漿および非亜硫酸水素塩処理血漿を用いるCNAの検出におけるZ値間の関連性を示す、散布図である。

【図38A】患者TBR34の腫瘍組織、非亜硫酸水素塩（BS）処理血漿DNAおよび亜硫酸水素塩処理血漿DNA（内側から外側に）のCNA解析を示す。

【図38B】患者TBR34の1Mbピンの亜硫酸水素塩処理血漿および非亜硫酸水素塩処理血漿を用いるCNAの検出におけるZ値間の関連性を示す、散布図である。

【図39A】HCC患者TBR240の亜硫酸水素塩処理血漿のCNA（内側の環）およびメチル化解析（外側の環）を示す、Circosプロットである。

【図39B】HCC患者TBR164の亜硫酸水素塩処理血漿の、CNA（内側の環）およびメチル化解析（外側の環）を示す、Circosプロットである。

【図40A】患者TBR36についての、処置前試料および処置後試料に対するCNA解析を示す。

【図40B】患者TBR36についての、処置前試料および処置後試料に対するメチル化解析を示す。

【図41A】患者TBR34についての、処置前試料および処置後試料に対するCNA解析を示す。

【図41B】患者TBR34についての、処置前試料および処置後試料に対するメチル化解析を示す。

【図42】異なる数の配列決定されたリードを用いたゲノムワイドな低メチル化解析の診断能の図を示す。

【図43】異なるピンサイズ（50kb、100kb、200kbおよび1Mb）を用いた、ゲノムワイドな低メチル化解析に基づくがんの検出における、ROC曲線を示す図である。

【図44A】累積確立（CP）および異常を有するピンの割合の診断能を示す。

【図44B】全体的な低メチル化、CG島高度メチル化およびCNAの血漿解析の診断能を示す。

【図45】肝細胞癌患者における全体的な低メチル化、CG島高度メチル化およびCNAの結果を含む、表を示す。

【図46】肝細胞癌以外のがんを有する患者における全体的な低メチル化、CG島高度メチル化およびCNAの結果を含む、表を示す。

【図47】症例TBR34の血漿メチル化の連続解析を示す。

【図48A】HCC患者TBR36の亜硫酸水素塩処理血漿DNAにおけるCNA（内側の環）およびメチル化変化（外側の環）を示す、Circosプロットを示す。

【図48B】HCC患者TBR36の、染色体の増加および減少を有する領域、並びにコピー数に変化が無い領域の、メチル化Z値のプロットである。

【図49A】HCC患者TBR34の亜硫酸水素塩処理血漿DNAにおけるCNA（内側の環）およびメチル化変化（外側の環）を示す、Circosプロットを示す。

【図49B】HCC患者TBR34の、染色体の増加および減少を有する領域、およびコピー数に変化が無い領域の、メチル化Z値のプロットである。

【図50A】SLE患者SLE04およびSLE10に対する血漿低メチル化およびCN

10

20

30

40

50

A解析の結果を示す。

【図50B】SLE患者SLE04およびSLE10に対する血漿低メチル化およびCNA解析の結果を示す。

【図51A】2人のHCC患者(TBR34およびTBR36)の血漿における、CNAを有する領域およびCNAを有さない領域に対する、 $Z_{meth}$ 解析を示す。

【図51B】2人のHCC患者(TBR34およびTBR36)の血漿における、CNAを有する領域およびCNAを有さない領域に対する、 $Z_{meth}$ 解析を示す。

【図51C】2人のSLE患者(SLE04およびSLE10)の血漿における、CNAを有する領域およびCNAを有さない領域に対する、 $Z_{meth}$ 解析を示す。

【図51D】2人のSLE患者(SLE04およびSLE10)の血漿における、CNAを有する領域およびCNAを有さない領域に対する、 $Z_{meth}$ 解析を示す。

【図52A】CNA、全体メチル化、およびCpG島メチル化についてA群特徴を用いる、HCC患者、非HCCがん患者および健常対照患者から得られた血漿試料に対する、階層クラスタリング解析を示す。

【図52B】CNA、全体メチル化、およびCpG島メチル化についてB群特徴を用いる階層クラスタリングを示す。

【図53A】A群CpG島メチル化特徴を用いた、HCC患者、非HCCがん患者および健常対照患者から得られた血漿試料に対する、階層クラスタリング解析を示す。

【図53B】A群全体メチル化密度を用いた、HCC患者、非HCCがん患者および健常対照患者から得られた血漿試料に対する、階層クラスタリング解析を示す。

【図54A】A群全体CNAを用いた、HCC患者、非HCCがん患者および健常対照患者から得られた血漿試料に対する、階層クラスタリング解析を示す。

【図54B】B群CpG島メチル化密度を用いた、HCC患者、非HCCがん患者および健常対照患者から得られた血漿試料に対する、階層クラスタリング解析を示す。

【図55A】HCC患者、非HCCがん患者および健常対照患者から得られた血漿試料に対する、階層クラスタリング解析を示す。

【図55B】B群全体メチル化密度を用いた、HCC患者、非HCCがん患者および健常対照患者から得られた血漿試料に対する、階層クラスタリング解析を示す。

【図56】32人の健常対象間の、1Mbピンの平均メチル化密度(赤い点)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

定義

「メチローム」は、ゲノム内の複数の部位または遺伝子座におけるDNAメチル化量の尺度を与える。メチロームは、ゲノム全体、ゲノムの相当な部分、またはゲノムの比較的小さな部分に該当し得る。「胎児メチローム」は、妊娠女性の胎児のメチロームに該当する。胎児メチロームは、種々の胎児組織または胎児DNAの供給源、例えば、胎盤組織および母体血漿中の無細胞胎児DNAを用いて、決定することができる。「腫瘍メチローム」は、生物(例えば、ヒト)の腫瘍のメチロームに該当する。腫瘍メチロームは、腫瘍組織または母体血漿中の無細胞腫瘍DNAを用いて決定することができる。胎児メチロームおよび腫瘍メチロームは、目的のメチロームの例である。目的のメチロームの他の例は、体液(例えば、血漿、血清、汗、唾液、尿、生殖器分泌物、精液、便液(stools fluid)、下痢液(diarrheal fluid)、脳脊髄液、胃腸管分泌物、膵臓分泌物、腸分泌物、痰、涙、乳房からの吸引液および甲状腺等)にDNAを与え得る臓器のメチローム(例えば、脳細胞、骨、肺、心臓、筋肉および腎臓等のメチローム)である。臓器は移植された臓器であってもよい。

【0013】

「血漿メチローム」は、動物(例えば、ヒト)の血漿または血清から決定されるメチロームである。血漿メチロームは、血漿および血清は無細胞DNAを含むことから、無細胞メチロームの一例である。血漿メチロームは、胎児/母体メチロームまたは腫瘍/患者メチロームの混合物であることから、混合メチロームの一例でもある。「胎盤メチローム」

10

20

30

40

50

は、絨毛膜絨毛検体 (chorionic villus sample: C V S) または胎盤組織検体 (例えば、出産後に得られる) から決定することができる。「細胞メチローム」は、患者の細胞 (例えば、血液細胞) から決定されるメチロームに該当する。血液細胞のメチロームは、血液細胞メチローム (または血液メチローム) と称される。

【0014】

「部位」は、一塩基位置であっても一群の関連塩基位置 (例えば、C p G 部位) であってもよい、単一部位に該当する。「座位」は、複数の部位を含む領域に該当する。座位は、該座位をその配列内のある部位と等しくする、ただ一つの部位を含み得る。

【0015】

各ゲノム部位 (例えば、C p G 部位) の「メチル化指数」は、その部位を被覆するリードの総数に対する、部位においてメチル化を示す配列リードの比率を指す。領域の「メチル化密度」は、該領域内の部位を被覆するリードの総数で除算した、メチル化を示す該領域内の部位におけるリードの数である。部位は特定の特徴を有していてもよく、例えば、C p G 部位であってもよい。従って、領域の「C p G メチル化密度」は、該領域内の C p G 部位 (例えば、特定の C p G 部位、C G 島内の C p G 部位、またはより大きな領域) を被覆するリードの総数で除算した、C p G メチル化を示すリードの数である。例えば、ヒトゲノム内の各 100 kb のビン (bin) のメチル化密度は、該 100 kb 領域に位置付けられる配列リードによって被覆される全 C p G 部位の比率として、C p G 部位における亜硫酸水素塩処理後に変換されていないシトシンの総数 (メチル化シトシンに相当) から決定することができる。この解析は、他のビン部位 (例えば、50 kb または 1 Mb 等) に対しても行うこともできる。領域は、ゲノム全体または染色体または染色体の部分 (例えば、染色体腕) であり得る。C p G 部位のメチル化指数は、領域がその C p G 部位を含むのみである場合の、領域のメチル化密度と同じである。「メチル化シトシンの比率」は、解析されたシトシン残基 (すなわち、該領域内の C p G 配列の外側にあるシトシンを含む) の総数に対する、メチル化されていることが示される (例えば、亜硫酸水素塩変換の後に変換されていない)、シトシン部位 (「C」) の数を指す。メチル化指数、メチル化密度およびメチル化シトシンの比率は、「メチル化レベル」の例である。

10

20

【0016】

「メチル化特性」 (メチル化状態とも称される) は、領域の DNA メチル化に関連する情報を含む。DNA メチル化に関連する情報としては、限定はされないが、C p G 部位のメチル化指数、領域内の C p G 部位のメチル化密度、隣接領域にわたる C p G 部位の分布、2 つ以上の C p G 部位を含有する領域内の個々の C p G 部位のメチル化のパターンまたはレベル、および非 C p G メチル化が含まれ得る。ゲノムの相当な部分のメチル化特性は、メチロームと等価であるとみなすことができる。哺乳類ゲノムにおける「DNA メチル化」は、典型的には、C p G ジヌクレオチド間の、シトシン残基の 5' 炭素へのメチル基の付加 (すなわち、5-メチルシトシン) を指す。DNA メチル化は、他の配列内のシトシン、例えば、CHG および CHH (H はアデニン、シトシンまたはチミンである) において生じ得る。シトシンメチル化は、5-ヒドロキシメチルシトシンの形態であってもよい。N6-メチルアデニン等の非シトシンメチル化も報告されている。

30

【0017】

「組織」はあらゆる細胞に該当する。異なる種類の組織は、異なる種類の細胞 (例えば、肝臓、肺、または血液) に該当し得るが、異なる生物 (母対胎児) から得られた組織または正常細胞対腫瘍細胞にも該当し得る。「生物試料」は、対象 (例えば、ヒト、例えば、妊娠女性、担がん患者、または担がんが疑われる人、臓器移植受容者、または臓器 (例えば、心筋梗塞における心臓、または脳卒中における脳) に関する疾患仮定を有することが疑われる対象) から得られ、一つまたは複数の目的の核酸分子を含有する、あらゆる試料を指す。生物試料は、体液血液、血漿、血清、尿、腔液、子宮または腔洗い流し液 (flushing fluid)、複数の体液、腹水、脳脊髄液、唾液、汗、涙、痰、気管支肺胞洗浄液等の体液であり得る。便試料を用いることもできる。

40

【0018】

50

用語「がんのレベル」は、がんが存在するかどうか、がんの段階、腫瘍のサイズ、転移の有無、身体の内腫瘍量、および/またはがんの重症度の他の尺度を指し得る。がんのレベルは、数または他の特性であり得る。レベルはゼロであってもよい。がんのレベルは、変異またはいくつかの変異と関連する前悪性状態または前がん状態も含む。がんのレベルは様々な方法で用いることができる。例えば、スクリーニングは、がんを有することが以前に知られていない者にがんが存在するかどうかを調べることができる。評価により、がんを有すると診断された者を調査することで、がんの進行を経時的にモニターすること、治療の有効性を研究すること、または予後を決定することができる。一実施形態では、予後は、患者ががんで死亡する確率、またはがんが特定の期間もしくは時間の後に進行する確率、またはがんが転移する確率を表し得る。検出は、「スクリーニング」を意味し得る、あるいは、がんを示唆する特徴（例えば、症状または他の陽性検査）を有する者ががんを有するかどうかをチェックすることを意味し得る。

10

【0019】

#### 詳細な説明

エピジェネティック機構は、胚発生および胎児発生において重要な役割を担う。しかし、ヒトの胚および胎児組織（胎盤組織を含む）は容易に利用できるものではない（米国特許第6,927,028号）。ある特定の実施形態は、母体循環系に存在する無細胞胎児DNA分子を含有する試料を分析することにより、この問題に取り組んだ。胎児メチロームは様々な方法で推定することができる。例えば、母体血漿メチロームは細胞メチローム（母親の血液細胞からの）と比較することができ、その差異は胎児メチロームと関連することが示されている。別の例として、胎児特異的対立遺伝子を用いることで、特定の遺伝子座での胎児メチロームのメチル化決定することができる。さらに、サイズおよびメチル化率間の相関が示されているため、断片のサイズはメチル化率の指標として用いることができる。

20

【0020】

一実施形態では、ゲノムワイド亜硫酸水素塩配列決定は、単一ヌクレオチド分析（single nucleotide resolution）において母体血漿DNAのメチル化特性（メチロームの一部または全て）を分析するために用いられる。母親および胎児間の多形性差異を利用することで、胎児メチロームを母体血試料から構築することができる。別の実施においては、多形性差異を用いたが、血漿メチロームおよび血液細胞メチローム間の差異を用いることができる。

30

【0021】

別の実施形態では、腫瘍ゲノムおよび非腫瘍ゲノム間の単一ヌクレオチド変異および/またはコピー数異常、並びに血漿（または他の試料）から得た配列決定データを利用することにより、がんを有することが疑われるまたはがんを有すると診断された患者の試料において、腫瘍のメチル化プロファイリングを行うことができる。健常対照または健常対照群の血漿メチル化レベルと比較した場合の試験個体の血漿試料中のメチル化レベルの差異は、試験個体ががんを有することの特定を可能にし得る。さらに、メチル化特性は、例えば、患者がどの臓器から発達させたか、および転移がどの臓器から生じたか等の、がんの種類を明らかにするサインとして機能し得る。

40

【0022】

このアプローチは非侵襲性であるため、第一期、第三期および出産後に採取した母体血試料から胎児および母体の血漿メチロームを連続的に評価することができた。妊娠に関連する変化を観察した。前記アプローチは、第二期中に得られた試料に適応することもできる。妊娠中の母体血漿から推定された胎児メチロームは胎盤メチロームに似ていた。インプリンティング遺伝子および示差的にメチル化された領域を母体血漿データから特定した。

【0023】

胎児メチロームを非侵襲的、連続的且つ包括的に研究することにより、生物マーカーを同定する、または妊娠に関連した病態を直接検査する可能性を提供するアプローチを開発

50

した。また、実施例を用いることで、対象ががんを有しているかどうかをスクリーニングまたは検出するため、がん患者における悪性疾患をモニターするため、および予後判定のために、腫瘍メチロームを非侵襲的に、連続的に、且つ包括的に研究することができる。実施例は、あらゆるがん型、例えば、限定はされないが、肺がん、乳がん、結腸直腸がん、前立腺がん、鼻咽腔がん、胃がん、精巣がん、皮膚がん（例えばメラノーマ）、神経系に発症するがん、骨がん、卵巣がん、肝臓がん（例えば肝細胞癌）、造血器腫瘍、膵がん、子宮内膜癌（endometriocarcinoma）、腎がん、子宮頸がん、膀胱がん等に、適用することができる。

#### 【0024】

メチロームまたはメチル化特性を決定する方法の記述を最初に考察し、次に、種々のメチローム（例えば、胎児メチローム、腫瘍メチローム、母親または患者のメチローム、および混合メチローム（例えば、血漿から得られた））を記述する。次に、胎児特異的マーカーを用いる、または混合メチル化特性を細胞メチル化特性と比較することによる、胎児メチル化特性の決定を記述する。胎児メチル化マーカーはメチル化特性を比較することにより決定される。サイズおよびメチル化間の関連性を考察する。がんを検出するためのメチル化特性の使用も提供する。

10

#### 【0025】

##### I. メチロームの決定

胎盤メチロームを調べるために無数のアプローチが用いられているが、それぞれのアプローチには限界がある。例えば、亜硫酸水素ナトリウムは、非メチル化シトシン残基をウラシルに変化させ、メチル化シトシンを変化させない化学薬品であるが、これは、シトシンメチル化における差異を、さらなる照合のための遺伝子配列差異へと変換する。シトシンメチル化を研究するゴールドスタンダードな方法は、組織DNAを亜硫酸水素ナトリウムで処理し、その後、亜硫酸水素塩によって変換されたDNA分子の個々のクローンを直接配列決定することに基づいている。DNA分子の複数のクローンを解析した後、CpG部位あたりのシトシンメチル化のパターンおよび量的特性を得ることができる。しかし、クローニング化亜硫酸水素塩配列決定は、ゲノムワイドな規模に容易に応用することができない、ロースルーブットで非常に手間のかかる手順である。

20

#### 【0026】

非メチル化DNAを典型的に消化するメチル化感受性制限酵素は、DNAメチル化を研究するための安価なアプローチを提供する。しかし、そのような研究から得られたデータは、酵素認識モチーフを有する遺伝子座に限定されており、結果は非定量的である。抗メチル化シトシン抗体が結合したDNAの免疫沈降は、ゲノムの巨大なセグメントを調べるのに用いることができるが、抗体が高密度なメチル化を有する遺伝子座により強く結合することから、そのような領域に偏る傾向がある。マイクロアレイに基づくアプローチは、照合プローブの演繹的設計、並びに該プローブおよび標的DNA間のハイブリダイゼーション効率に依存している。

30

#### 【0027】

メチロームを包括的に調べるために、いくつかの実施形態では、大規模並列配列決定（massively parallel sequencing：MPS）を用いることで、1ヌクレオチドあたりおよび1対立遺伝子あたりのメチル化レベルのゲノムワイドな情報および定量的評価が与えられる。近年、亜硫酸水素塩変換後のゲノムワイドMPSが実行可能になった（R Lister et al 2008 Cell； 133： 523-536）。

40

#### 【0028】

ゲノムワイド亜硫酸水素塩配列決定をヒトメチロームの調査に応用した、小数の公表された研究（R Lister et al. 2009 Nature； 462： 315-322； L Laurent et al. 2010 Genome Res； 20： 320-331； Y Li et al. 2010 PLoS Biol； 8： e1000533；およびM Kulis et al. 2012 Nat Genet； 44： 1236-1242）のうち、2つの研究が、胚性幹細胞および胎児線維芽細胞に焦点を当てた（R Lister et al. 2009 Nature； 462： 315-322； L Laurent et al. 2010 Genome Res； 20： 320-331）。これらの研究は共に細胞系由来DNA分析した。

50

## 【 0 0 2 9 】

## A . ゲノムワイド亜硫酸水素塩配列決定

ある特定の実施形態は、上記の問題を克服することが可能であり、胎児メチロームの照合を包括的、非侵襲、且つ連続的に可能にする。一実施形態では、妊娠女性の血行中に存在する無細胞胎児DNA分子を分析するために、ゲノムワイド亜硫酸水素塩配列決定が用いられた。血漿DNA分子が少量で断片化されていることから、母体血漿から高分解能胎児メチロームを構築することで、妊娠の進行に伴う変化を連続的に観察することができた。非侵襲的出生前検査 (noninvasive prenatal testing: NIPT) への強い関心を考慮して、実施形態は、胎児生物マーカーを発見するための強力な新規の手段を提供する、または、胎児関連疾患もしくは妊娠関連疾患のNIPTを達成するための直接的なプラットフォームとして役立つことができる。胎児メチロームを得ることができる、種々の試料のゲノムワイド亜硫酸水素塩配列決定から得られたデータが、以下に提供される。一実施形態では、この科学技術は、子癩前症、または子宮内胎児発育遅延、または早産と合併した妊娠におけるメチル化プロファイリングに応用され得る。そのような合併妊娠において、この科学技術は、モニタリングおよび/または予後判定および/または治療に対する応答を可能にするために、その非浸潤的な性質から、連続的に用いることができる。

10

## 【 0 0 3 0 】

図1Aは、本発明の実施形態による、母体血、胎盤、および母体血漿の配列決定の、表100の結果を示している。一実施形態では、全ゲノム配列決定が、第一期に採取された血液試料の血液細胞、CVS、期間の終了時に採取された胎盤組織、第一期および第三期並びに産褥期に採取された母体血漿試料の、メチル化DNAライブラリーアダプター(イルミナ社)(R Lister et al. 2008 Cell; 133: 523-536)を用いて調製された、亜硫酸水素塩によって変換されたDNAライブラリーに対して、行われた。1人の成人男性および1人の成人非妊娠女性から得られた血液細胞および血漿DNA試料も分析した。合計95億対の生配列リードを本研究において作製した。各試料の配列決定被覆率は表100に示される。

20

## 【 0 0 3 1 】

ヒト参照ゲノムに唯一マッピング可能であった配列リードは、第一期、第三期および出産後の母体血漿試料において、それぞれ50倍、34倍および28倍の平均1倍体ゲノム被覆率に達した。ゲノム内のCpG部位の被覆率は、前記妊娠期間から得られた試料において、81%~92%の範囲であった。CpG部位に広がる配列リードは、第一期、第三期および出産後の母体血漿試料において、それぞれ33倍/鎖、23倍/鎖および19倍/鎖の平均1倍体被覆率に達した。全ての試料の亜硫酸水素塩変換効率は99.9%超であった(表100)。

30

## 【 0 0 3 2 】

表100において、あいまいな割合(「a」と標識)は、参照ヒトゲノムのワトソン鎖およびクリック鎖の両方にマッピングされたリードの割合を指す。変換率は、亜硫酸水素塩修飾によって「チミン」残基に変換されている、内部DNA対照における非メチル化シトシンの割合を指す。Hは一般的にA、C、またはTに等しい。「a」は、特定のゲノム遺伝子座にマッピングすることができるが、ワトソン鎖またはクリック鎖に割り当てることができない、リードを指す。「b」は、同一の開始および終止の位置情報(coordinate)を有するリード対を指す。「c」について、DNAを亜硫酸水素塩変換の前に各試料にスパイクした。変換率は、亜硫酸水素塩変換後にシトシンとして残っているシトシンヌクレオチドの割合を指し、成功した亜硫酸水素塩変換の割合の指標として用いられる。「d」は、参照ヒトゲノム内に存在し、亜硫酸水素塩変換後にシトシン配列として残っている、シトシンヌクレオチドの数を指す。

40

## 【 0 0 3 3 】

亜硫酸水素塩修飾の間に、非メチル化シトシンはウラシルに変換され、その後PCR増幅後にチミンに変換されるが、一方、メチル化シトシンは未変化のまま残る(M Frommer et al. 1992 Proc Natl Acad Sci USA; 89:1827-31)。従って、配列決定およびアライメ

50

ントの後に、個々の CpG 部位のメチル化状態は、CpG 配列内のシトシン残基における、メチル化配列リード「M」（メチル化）の数および非メチル化配列リード「U」（非メチル化）の数から推測することができる。亜硫酸水素塩配列決定データを用いて、母体血、胎盤および母体血漿の全体のメチロームが構築された。母体血漿における特定の遺伝子座の平均メチル化 CpG 密度（メチル化密度 MD とも称される）は、下記式を用いて算出することができる、

【0034】

【数1】

$$MD = \frac{M}{M+U}$$

10

【0035】

式中、M は遺伝子座内の CpG 部位におけるメチル化リードの数であり、U は遺伝子座内の CpG 部位における非メチル化リードの数である。座位内に 2 つ以上の CpG 部位が存在する場合、および U はそれらの部位の全体における数に一致する。

【0036】

B. 様々な手法

20

上記のように、メチル化プロファイリングは、亜硫酸水素塩によって変換された血漿 DNA の大規模並列配列決定 (MPS) を用いて実行することができる。亜硫酸水素塩によって変換された血漿 DNA の MPS は、ランダムまたはショットガン様式で実行することができる。配列決定の深度は、目的の領域のサイズに応じて変動し得る。

【0037】

別の実施形態では、亜硫酸水素塩によって変換された血漿 DNA 内の目的の領域は、液相または固相ハイブリダイゼーションに基づくプロセス、その後の MPS を用いて、最初に捕捉され得る。大規模並列配列決定は、合成による配列決定 (sequencing-by-synthesis) プラットフォーム (例えば、Illumina)、ライゲーションによる配列決定 (sequencing-by-ligation) プラットフォーム (例えば、ライフテクノロジーズ社製の SOLiD プラットフォーム)、半導体ベースの配列決定システム (例えば、ライフテクノロジーズ社製の Ion Torrent または Ion Proton プラットフォーム)、または単一分子配列決定システム (例えば、Helicos システムまたは Pacific Biosciences システムまたはナノポアベース配列決定システム) を用いて実行することができる。ナノポアベース配列決定には、例えば、脂質二重層およびタンパク質ナノポアを用いて構築されたナノポア、並びに固体ナノポア (例えば、グラフェンベースのナノポア) が含まれる。選択された単一分子配列決定プラットフォームは、DNA 分子のメチル化状態 (例えば、N6-メチルアデニン、5-メチルシトシンおよび 5-ヒドロキシメチルシトシン) を亜硫酸水素塩変換無しに直接的に解明できるようにするため (BA Flusberg et al. 2010 Nat Methods; 7: 461-465; J Shim et al. 2013 Sci Rep; 3:1389. doi: 10.1038/srep01389)、そのようなプラットフォームの使用は、亜硫酸水素塩によって変換されていない試料 DNA (例えば血漿 DNA) のメチル化状態の解析を可能にする。

30

40

【0038】

配列決定に加えて、他の手法を用いることができる。一実施形態では、メチル化プロファイリングを、メチル化特異的 PCR またはメチル化感受性制限酵素消化、その後の PCR またはリガーゼ連鎖反応、その後の PCR によって、行うことができる。さらに別の実施形態では、PCR は、単一分子またはデジタル PCR の形態である (B Vogelstein et al. 1999 Proc Natl Acad Sci USA; 96: 9236-9241)。さらに別の実施形態では、PCR は、リアルタイム PCR であり得る。他の実施形態では、PCR はマルチプレックス PC

50

Rであり得る。

【0039】

#### II. メチロームの解析

いくつかの実施形態は、全ゲノム亜硫酸水素塩配列決定を用いて、血漿DNAのメチル化特性を決定することができる。胎児のメチル化特性は、以下に記載される通りに母体血漿DNA試料を配列決定することによって決定することができる。従って、胎児DNA分子（および胎児メチローム）は、妊娠期間中に非侵襲的にアクセス可能であり、妊娠が進行するにつれて、変化が連続的にモニタリングされた。配列決定データの包括性のために、単一ヌクレオチド分解能において、ゲノムワイドな規模で母体血漿メチロームを研究することができた。

10

【0040】

配列決定されたリードのゲノム位置情報は公知であったため、これらのデータによって、ゲノム内のメチロームまたはあらゆる目的領域の全体メチル化レベルの研究を可能にし、異なる遺伝因子間の比較を可能となった。さらに、複数の配列リードはそれぞれのCpG部位または座位を被覆した。メチロームを測定するのに用いられた測定基準のいくつかの説明を以下に記載する。

【0041】

#### A. 血漿DNA分子のメチル化

DNA分子は、低濃度で、断片化された形態で、典型的には、モノヌクレオソーム単位に類似した長さで、ヒト血漿中に存在する（YMD Lo et al. 2010 Sci Transl Med; 2: 61ra91; and YW Zheng et al. 2012 Clin Chem; 58: 549-558）。これらの制限にもかかわらず、ゲノムワイド亜硫酸水素塩配列決定パイプラインは、血漿DNA分子のメチル化を解析することが可能であった。さらに別の実施形態では、選択された単一分子配列決定プラットフォームは、DNA分子のメチル化状態を亜硫酸水素塩変換無しに直接的に解明できるようにすることから（BA Flusberg et al. 2010 Nat Methods; 7: 461-465; J Shim et al. 2013 Sci Rep; 3:1389. doi: 10.1038/srep01389）、そのようなプラットフォームの使用は、亜硫酸水素塩によって変換されていない血漿DNAを、血漿DNAのメチル化レベルを測定するため、または血漿メチロームを測定するために用いることを可能にする。そのようなプラットフォームは、異なる形態のメチル化の異なる生物学的機能に関連した、結果の改善（例えば、感度または特異度の改善）をもたらし得る、N6-メチルアデニン、5-メチルシトシン、および5-ヒドロキシメチルシトシンを検出することができる。そのような結果の改善は、実施形態を特定の障害（例えば子癇前症）または特定のがん型の検出またはモニタリングに適用する場合に有用であり得る。

20

30

【0042】

亜硫酸水素塩配列決定は、異なる形態のメチル化を識別することもできる。一実施形態では、亜硫酸水素塩配列決定は、5-メチルシトシンを5-ヒドロキシメチルシトシンと区別することが可能な追加のステップを含み得る。1つのそのようなアプローチは、酸化的亜硫酸水素塩配列決定（oxidative bisulfite sequencing: oxBS-seq）であり、これは、一塩基分解能で、5-メチルシトシンおよび5-ヒドロキシメチルシトシンの位置を明らかにすることができる（MJ Booth et al. 2012 Science; 336: 934-937; MJ Booth et al. 2013 Nature Protocols; 8: 1841-1851）。亜硫酸水素塩配列決定では、5-メチルシトシンおよび5-ヒドロキシメチルシトシンは共に、シトシンとして読まれるため、区別することができない。一方、oxBS-seqでは、過ルテニウム酸カリウム（ $K_2RuO_4$ ）による処理、続く亜硫酸水素塩変換を用いた新たに形成された5-ホルミルシトシンのウラシルへの変換による、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定の酸化は、5-ヒドロキシメチルシトシンを5-メチルシトシンから区別することを可能にする。従って、5-メチルシトシンの読み取りは1回のoxBS-seq実行から得ることができ、5-ヒドロキシメチルシトシンレベルは、亜硫酸水素塩配列決定の結果を比較することによって推定される。別の実施形態では、5-メチルシトシンは、Tet補助亜硫酸水素塩配列決定（Tet-assisted bisulfite sequencing: TAB-

40

50

s e q ) を用いることで、5 - ヒロドキシメチルシトシンと区別することができる (M Yu et al. 2012 Nat Protoc; 7: 2159-2170)。T A B - s e q は、5 - ヒロドキシメチルシトシンを一塩基分解能で特定することができ、それぞれの修飾部位におけるその存在量を決定することができる。この方法には、5 - ヒロドキシメチルシトシンの - グルコシルトランスフェラーゼを介した保護 (グルコシル化)、および5 - メチルシトシンの5 - カルボキシルシトシンへの組換えマウス T e t 1 ( m T e t 1 ) を介した酸化が含まれる。続く亜硫酸水素塩処理および P C R 増幅の後、シトシンおよび5 - カルボキシルシトシン (5 - メチルシトシン由来) は共に、チミン ( T ) に変換され、一方、5 - ヒロドキシメチルシトシンは C として読まれる。

#### 【 0 0 4 3 】

図 1 B は、本発明の実施形態に従って配列決定された試料の 1 M b ウィンドウ内のメチル化密度を示す。プロット 1 5 0 は、母体血漿およびゲノム全域の 1 M b ウィンドウ内のゲノム DNA におけるメチル化密度を示す C i r c o s プロットである。外側から内側に向かって：染色体模式図は、時計回りの方向で p t e r - q t e r 配向であり得る：(セントロメアは赤色で示される)、母体血 (赤色)、胎盤 (黄色)、母体血漿 (緑色)、母体血漿内の共有リード (青色)、および母体血漿内の胎児特異的リード (紫色)。母体血細胞、胎盤および母体血漿の全体の C p G メチル化レベル (すなわち、密度レベル) は、表 1 0 0 に見出すことができる。母体血細胞のメチル化レベルは、通常、全ゲノムにわたって、胎盤のメチル化レベルよりも高い。

#### 【 0 0 4 4 】

##### B . 亜硫酸水素塩配列決定と他の手法の比較

大規模並列亜硫酸水素塩配列決定を用いて胎盤メチロームを研究した。さらに、ヒトゲノムにおける約 4 8 0 , 0 0 0 の C p G 部位を網羅したオリゴヌクレオチドアレイプラットフォーム (イルミナ社) を用いて、胎盤メチロームを研究した (M Kulis et al. 2012 Nat Genet; 44: 1236-1242; および C Clark et al. 2012 PLoS One; 7: e50233)。ビーズチップベースの遺伝子型同定およびメチル化解析を用いる一実施形態では、イルミナ社製 H u m a n O m n i 2 . 5 - 8 遺伝子型同定アレイを用い、製造業者のプロトコルに従って、遺伝子型同定を行った。遺伝子型は、G e n o m e S t u d i o S o f t w a r e (イルミナ社) の G e n C a l l アルゴリズムを用いてコール (call) した。コールレイト (call rate) は 9 9 % 超であった。マイクロアレイに基づくメチル化解析において、ゲノム DNA (5 0 0 ~ 8 0 0 n g ) を、イルミナ社製 I n f i n i u m M e t h y l a t i o n アッセイ用に、製造業者の推奨に従って、Z y m o E Z DNA メチル化キット (ジモ・リサーチ社 (Zymo Research)、米国カリフォルニア州オレンジ) を用いて、亜硫酸水素ナトリウムで処理した。

#### 【 0 0 4 5 】

I n f i n i u m H D メチル化アッセイプロトコルに従って、4  $\mu$  l の、亜硫酸水素塩によって変換されたゲノム DNA (5 0 n g /  $\mu$  l ) に対して、メチル化アッセイを行った。ハイブリダイズされたビーズチップをイルミナ社製 i S c a n 装置上でスキャンした。DNA メチル化データを G e n o m e S t u d i o ( v 2 0 1 1 . 1 ) M e t h y l a t i o n M o d u l e ( v 1 . 9 . 0 ) ソフトウェアによって解析し、内部標準に対する正規化およびバックグラウンド除去も行った。個々の C p G 部位のメチル化指数は値 ( ) によって表され、これは、メチル化対立遺伝子および非メチル化対立遺伝子の間の蛍光強度の比を用いて算出される：

#### 【 0 0 4 6 】

10

20

30

40

【数 2】

$$\beta = \frac{\text{メチル化対立遺伝子の強度}}{\text{非メチル化対立遺伝子の強度} + \text{メチル化対立遺伝子の強度} + 100}$$

【0047】

アレイ上に表され、少なくとも10倍の被覆率に配列決定されたCpG部位について、アレイによって得られた値を、同一部位の配列決定によって決定されるメチル化指数と比較した。値は、メチル化されたプローブの強度を、同一のCpG部位を被覆するメチル化プローブおよび非メチル化プローブの混合強度の比率として表した。各CpG部位のメチル化指数は、そのCpGを被覆するリードの総数に対するメチル化リードの比率を指す。

10

【0048】

図2A~図2Cは、両方のプラットフォームによって調べられた対応するCpG部位のゲノムワイド亜硫酸水素塩配列決定によって決定されたメチル化指数に対する、イルミナ社製Infinium Human Methylation 450Kビーズチップアレイによって決定された値のプロットを示している：(A)母体血細胞、(B)絨毛膜絨毛検体、(C)妊娠末期胎盤組織。両方のプラットフォームから得られたデータは高度に一致しており、母体血細胞、CVSおよび妊娠末期胎盤組織のそれぞれについて、ピアソン相関係数は0.972、0.939および0.954であり、R<sup>2</sup>値は0.945、0.882および0.910であった。

20

【0049】

さらに、配列決定データを、約27,000のCpG部位を網羅するオリゴヌクレオチドアレイを用いて12対のCVSおよび母体血細胞DNA試料のメチル化特性を調べた、Chuetalによって報告された配列決定データと比較した(T Chu et al. 2011 PLoS One; 6: e14723)。CVSおよび母体血細胞DNA、並びに先の研究における12対の各試料の配列決定の結果の間の相関データによって、母体血において平均ピアソン係数(0.967)およびR<sup>2</sup>(0.935)が得られ、CVSにおいて平均ピアソン計数(0.943)およびR<sup>2</sup>(0.888)が得られた。両方のアレイ上に表されたCpG部位の中で、我々のデータは発表データと高度に相関していた。母体血細胞、CVSおよび胎盤組織において非CpGメチル化の割合は1%未満であった(表100)。これらの結果は、相当量の非CpGメチル化が主に多能性細胞に限定されたという現在の知見と一致した(R Lister et al. 2009 Nature; 462: 315-322; L Laurent et al. 2010 Genome Res; 20: 320-331)。

30

【0050】

C. 非妊娠対象の血漿メチロームおよび血液メチロームの比較

図3Aおよび図3Bは、成人男性および非妊娠成人女性から採取された血漿および血液細胞における、メチル化されたCpG部位の割合の棒グラフを示している：(A)常染色体、(B)X染色体。図表は、男性および非妊娠女性の血漿メチロームおよび血液メチローム間の類似性を示している。男性および非妊娠女性の血漿試料におけるメチル化されたCpG部位の全体的な割合は、対応する血液細胞DNAとほぼ同じであった(表100並びに図2Aおよび図2B)。

40

【0051】

次に、血漿試料および血液細胞試料のメチル化特性の座位特異的な相関を研究した。ヒトゲノムにおける各100kbのピンのメチル化密度を、100kb領域にマッピングされた配列リードによって被覆された全CpG部位の割合として、CpG部位における未変換シトシンの総数を決定することにより、決定した。メチル化密度は、男性および女性試

50

料の血漿試料および対応する血液細胞DNAの間で高度に一致した。

【0052】

図4Aおよび図4Bは、血液細胞DNAおよび血漿DNAにおける対応する遺伝子座のメチル化密度のプロットを示している：(A)非妊娠成人女性、(B)成人男性。非妊娠女性試料のピアソン相関係数および $R^2$ 値はそれぞれ0.963および0.927であり、男性試料のピアソン相関係数および $R^2$ 値はそれぞれ0.953および0.908であった。これらのデータは、造血細胞がヒト血漿におけるDNAの主な供給源であることを示した、同種間造血幹細胞移植の受容者の血漿DNA分子の遺伝子型評価に基づく先の知見(YW Zheng et al. 2012 Clin Chem; 58: 549-558)と一致している。

【0053】

D. メチローム全般のメチル化レベル

次に、メチル化レベルを決定するために、母体血漿DNA、母体血細胞、および胎盤組織のDNAメチル化レベルを調べた。反復領域、非反復領域、および全域におけるレベルを決定した。

【0054】

図5Aおよび図5Bは、妊娠女性から採取した試料間の、メチル化されたCpG部位の割合の棒グラフを示している：(A)常染色体、(B)X染色体。メチル化されたCpGsの全割合は、第一期および第三期の母体血漿試料において、それぞれ67.0%および68.2%であった。非妊娠個体から得られた結果とは異なり、これらの割合は第一期母体血細胞試料のそれよりも低かったが、CVSおよび妊娠末期胎盤組織検体のそれよりも高かった(表100)。注目すべきことに、出産後母体血漿試料におけるメチル化されたCpGの割合は73.1%であり、これは血液細胞データに類似していた(表100)。これらの傾向は、全ての常染色体およびX染色体にわたって分布するCpGにおいて観察され、ヒトゲノムの非反復領域および複数のクラスの反復領域の両方に及んだ。

【0055】

胎盤における反復領域および非反復領域の両方は、母体血細胞と比較して低メチル化であることが分かった。これらの結果は、胎盤が他の組織(例えば、末梢血細胞)と比較して低メチル化であるという、文献中の知見と一致した。

【0056】

妊娠女性、非妊娠女性および成人男性から得られた血液細胞DNAにおいて、配列決定されたCpG部位のうち71%~72%がメチル化されていた(図1の表100)。これらのデータは、Y Li et al. 2010 PLoS Biol; 8: e1000533によって報告された、血中単核細胞のCpG部位の68.4%という報告と同程度である。胎盤組織の低メチル化性質に関する先の報告と一致して、CpG部位の55%および59%が、それぞれCVSおよび妊娠末期胎盤組織においてメチル化されていた(表100)。

【0057】

図6は、母体血、胎盤および母体血漿における、ヒトゲノムの異なる反復クラスのメチル化レベルの棒グラフを示している。反復クラスはUCSCゲノムブラウザによって定義される。示されるデータは第一期試料から得られたものである。胎盤組織の低メチル化性質がゲノム内のある特定の反復クラスにおいて主に観察されたことを示す初期のデータ(B Novakovic et al. 2012 Placenta; 33: 959-970)と異なり、ここでは、胎盤が、血液細胞を基準にして、ゲノムエレメントの大部分のクラスにおいて実際は低メチル化状態であったことを示す。

【0058】

E. メチロームの類似性

実施形態によって、同一のプラットフォームを用いて胎盤組織、血液細胞および血漿のメチロームを決定することができる。従って、それらの生物試料型のメチロームの直接比較が可能であった。男性および非妊娠女性における血液細胞および血漿のメチローム間、並びに母体血細胞および出産後母体血漿試料間の高レベルの類似によって、造血細胞がヒト血漿におけるDNAの主な供給源であることがさらに確認された(YW Zheng et al. 20

10

20

30

40

50

12 Clin Chem; 58: 549-558)。

【0059】

ゲノム内のメチル化 CpG の全割合の点から、並びに血液細胞 DNA および血漿 DNA における対応する遺伝子座間のメチル化密度の高い相関から、類似は明らかである。しかし、第一期および第三期の母体血漿試料におけるメチル化 CpG の全割合は、母体血細胞データまたは出産後母体血漿試料と比較した場合、減少していた。妊娠中のメチル化レベルの減少は、母体血漿内に存在する胎児 DNA 分子の低メチル化性質のためであった。

【0060】

出産後母体血漿試料におけるメチル化特性が逆転して母体血細胞のメチル化特性により類似するようになったことは、胎児 DNA 分子が母体循環系から排除されたことを示唆している。胎児の SNP マーカーに基づいて胎児 DNA 濃度の算出したところ、確かに、濃度が出産前の 33.9% から、出産後試料においてはほんの 4.5% に変化したことが示された。

10

【0061】

F. 他の応用

実施形態は、血漿 DNA の MPS 解析を通じて、DNA メチロームを構築することに成功している。母体血漿から胎盤メチロームまたは胎児メチロームを決定する能力は、子癇前症、子宮内胎児発育遅延、早産等の妊娠関連状態と関連する異常なメチル化特性を決定、検出およびモニタリングするための非浸潤的方法を提供する。例えば、疾患特異的な異常なメチル化サインの検出は、そのような妊娠関連状態の検診、診断およびモニタリングを可能にする。母体血漿メチル化レベルの測定は、そのような妊娠関連状態の検診、診断およびモニタリングを可能にする。妊娠関連状態の研究への直接適用に加えて、前期アプローチは、血漿 DNA 解析を目的とした他の医学領域に応用することができる。例えば、がんのメチロームは、がん患者の血漿 DNA から決定することができる。本明細書に記載される、血漿からのがんメチローム解析は、血漿からのがんゲノム解析に対して相乗的な科学技術になり得る (KCA Chan et al. 2013 Clin Chem; 59: 211-224 および RJ Leary et al. 2012 Sci Transl Med; 4:162ra154)。

20

【0062】

例えば、血漿試料のメチル化レベルの決定は、がんの検診に用いることができる。血漿試料のメチル化レベルが健常対照群と比較して異常なレベルを示す場合、がんが疑われ得る。その後、異なるゲノム遺伝子座におけるメチル化の血漿特性を決定することにより、または腫瘍関連性のコピー数異常、染色体転座および単一ヌクレオチド変異を検出するための血漿ゲノム解析により、がん型またはがんの組織起源のさらなる確認および評価を行ってもよい。実際に、本発明の一実施形態では、血漿におけるがんのメチロームおよびゲノムのプロファイリングは、同時に行うことができる。あるいは、放射線検査および画像診断検査 (例えば、コンピュータ断層撮影、磁気共鳴画像法、陽電子断層撮影法) または内視鏡検査 (例えば、上部消化管内視鏡検査または大腸内視鏡検査) を用いることで、血漿メチル化レベル解析に基づいてがんを有することが疑われた個体をさらに検査することができる。

30

【0063】

がんの検診または検出において、血漿試料 (または他の生物試料) のメチル化レベルの決定は、がんの検診または検出用の他の様式と併せて用いることができ、例えば、前立腺特異抗原測定 (例えば、前立腺がん用)、癌胎児抗原 (例えば、結腸直腸癌、胃癌、膵癌、肺癌、乳癌、甲状腺髄様癌用)、フェトプロテイン (例えば、肝臓がんまたは胚細胞性腫瘍用)、CA125 (例えば、卵巣がんおよび乳がん用) および CA19-9 (例えば、膵癌用) である。

40

【0064】

さらに、他の組織を配列決定して細胞メチロームを得ることができる。例えば、肝組織を解析することで、肝臓に特異的なメチル化パターンを決定することができ、これを、肝臓病変を特定するのに用いてもよい。分析が可能である他の組織には、脳細胞、骨、肺、

50

心臓、筋肉および腎臓等が含まれる。種々の組織のメチル化特性は、例えば、発生、加齢、疾患仮定（例えば、炎症または肝硬変または自己免疫過程（例えば、全身性エリテマトーデス））として、または処置（例えば、5 - アザシチジンおよび5 - アザデオキシシチジン等の脱メチル化剤での処置）の結果として、時に応じて変化し得る。DNAメチル化の動的性質は、生理学的プロセスおよび病理学的プロセスをモニタリングする上で、そのような解析を潜在的に非常に価値のあるものになっている。例えば、個体が健康であった時に得られたベースライン値と比較して個体の血漿メチロームにおける変化を検出する場合、血漿DNAを与える臓器における疾患仮定を検出することができる。

#### 【0065】

また、移植臓器のメチロームは、臓器移植受容者の血漿DNAから決定することができる。本発明に記載される、血漿からの移植片メチローム解析は、血漿からの移植片ゲノム解析に対する相乗的な科学技術となり得る（YW Zheng et al., 2012; YMD Lo et al., 1998 Lancet; 351: 1329-1330; およびTM Snyder et al., 2011 Proc Natl Acad Sci USA; 108: 6229-6234）。血漿DNAは一般的には細胞死のマーカーと見なされていることから、移植臓器から放出されたDNAの血漿内レベルの増加は、その臓器からの細胞死の増加、例えば、拒絶エピソードまたはその臓器に関わる他の病理過程（例えば、感染または膿瘍）に対するマーカーとして用いることができる。抗拒絶反応療法が上手く開始されたイベントにおいて、移植臓器によって放出されたDNAの血漿内レベルは、減少することが予測される。

#### 【0066】

III. SNPを用いた胎児メチロームまたは腫瘍メチロームの決定

上記のように、非妊娠健常人において、血漿メチロームは血液メチロームに一致する。しかし、妊娠女性においては、これらのメチロームは異なる。胎児DNA分子が、大部分の母体DNAバックグラウンドの中、母体血漿内を循環している（YMD Lo et al., 1998 Am J Hum Genet; 62: 768-775）。それ故、妊娠女性において、血漿メチロームは、大部分は胎盤メチロームおよび血液メチロームの混成である。従って、血漿から胎盤メチロームを抽出することができる。

#### 【0067】

一実施形態では、母親および胎児間の一塩基多型（SNP）の差異は、母体血漿中の胎児DNA分子を特定するために用いられる。母親がホモ接合性であるが胎児がヘテロ接合性であるSNP遺伝子座を特定することを目的としており；胎児特異的対立遺伝子を用いることで、どのDNA断片が胎児由来であるかを決定することができる。母体血細胞由来のゲノムDNAを、SNP遺伝子型同定アレイ、イルミナ社製HumanOmni2.5-8を用いて解析した。一方、母親がヘテロ接合性であり胎児がホモ接合性であるSNP遺伝子座については、母親に特異的なSNP対立遺伝子を用いることで、どの血漿DNA断片が母親由来であるかを決定することができる。そのようなDNA断片のメチル化レベルは、母親における関連ゲノム領域のメチル化レベルを反映する。

#### 【0068】

A. 胎児特異的リードのメチル化および胎盤メチロームの相関

一方の対立遺伝子（B）の量がもう一方の対立遺伝子（A）の量よりも有意に少ない、2つの異なる対立遺伝子を有する遺伝子座を、生物試料の配列決定の結果から特定した。B対立遺伝子を被覆するリードは胎児特異的（胎児特異的リード）と見なした。母親はAについてホモ接合性であり、胎児はA/Bについてヘテロ接合性であることが決定されたことから、A対立遺伝子を被覆するリードは母親および胎児によって共有されていた（共有リード）。

#### 【0069】

本発明における概要のいくつかを説明するために用いられた、解析された1つの妊娠症例において、妊娠中の母親は、常染色体上の1, 945, 516の遺伝子座においてホモ接合性であることが分かった。これらのSNPを被覆する母体血漿DNA塩基配列決定法のリードを検査した。非母体対立遺伝子を保有するリードが107, 750の遺伝子座に

10

20

30

40

50

において検出され、これらは有益な遺伝子座であると見なされた。それぞれの有益な SNP において、母親由来でなかった対立遺伝子は胎児特異的対立遺伝子と称され、その他の対立遺伝子は共有対立遺伝子と称された。

【 0 0 7 0 】

母体血漿中の胎児 / 腫瘍 DNA 濃度分率 (胎児 DNA 割合とも称される) を決定することができる。一実施形態では、母体血漿中の胎児 DNA 濃度分率 (  $f$  ) は下記式によって決定され、

【 0 0 7 1 】

【 数 3 】

$$f = \frac{2p}{p+q}$$

【 0 0 7 2 】

式中、  $p$  は胎児特異的対立遺伝子を有する配列決定されたリードの数であり、  $q$  は母親および胎児間で共有される対立遺伝子を有する配列決定されたリードの数である (YMD Lo et al. 2010 Sci Transl Med; 2: 61ra91)。第一期、第三期および出産後母体血漿試料における胎児 DNA 割合は、それぞれ 14.4%、33.9% および 4.5% であることが分かった。また、Y 染色体に並んだリードの数を用いて、胎児 DNA 割合を算出した。Y 染色体データに基づくと、結果は、第一期、第三期および出産後母体血漿試料中で、それぞれ 14.2%、34.9% および 3.7% であった。

【 0 0 7 3 】

胎児特異的配列リードまたは共有配列リードを別々に解析することにより、実施形態は、循環中の胎児 DNA 分子がバックグラウンド DNA 分子よりもさらにより低メチル化状態であったことを示している。第一期および第三期の両方の胎児特異的母体血漿リードおよび胎盤組織データにおける対応する遺伝子座のメチル化密度の比較によって、高レベルの相関が明らかになった。これらのデータは、胎盤が母体血漿中の胎児由来 DNA 分子の主な供給源であるというゲノムレベルでの証拠を与え、選択された遺伝子座から得られる情報に基づく先の証拠と比較して、大きな進歩を示すものである。

【 0 0 7 4 】

ゲノム内の各 1 Mb 領域のメチル化密度を、有益な SNP に隣接する CpG 部位を被覆する胎児特異的リードまたは共有リードを用いて決定した。母体血漿配列リードから構築された胎児特異的メチロームおよび非胎児特異的メチロームは、例えば Circos プロットに、表示することができる (M Krzywinski et al. 2009 Genome Res; 19: 1639-1645)。母体血細胞および胎盤組織検体における 1 Mb のピンあたりのメチル化密度も決定した。

【 0 0 7 5 】

図 7 A は、第一期試料の Circos プロット 700 を示している。図 7 B は、第三期試料の Circos プロット 750 を示している。プロット 700 およびプロット 750 は 1 Mb のピンあたりのメチル化密度を示している。染色体模式図 (最外側の環) は、時計回りの方向で pter - qter 配向である (セントロメアは赤色で示される)。最外側から 2 番目のトラックは、対応する 1 Mb 領域における CpG 部位の数を示している。示される赤色バーのスケールは 1 Mb のピンあたり最大 20,000 部位である。対応する 1 Mb 領域のメチル化密度は、中央に示される配色に基づいてその他のトラックに示される。

【 0 0 7 6 】

第一期試料 (図 7 A) において、内側から外側に向かって、トラックは、絨毛膜絨毛検体、母体血漿中の胎児特異的リード、母体血漿中の母体特異的リード、母体血漿中の胎児

10

20

30

40

50

リードおよび非胎児リードの組み合わせ、並びに母体血細胞である。第三期 試料（図 7 B）において、トラックは、妊娠末期胎盤組織、母体血漿中の胎児特異的リード、母体血漿中の母体特異的リード、母体血漿中の胎児リードおよび非胎児リードの組み合わせ、出産後母体血漿並びに母体血細胞（第一期血液試料から得られる）である。第一期および第三期の血漿試料の両方において、胎児メチロームは、非胎児特異的メチロームのメチル化状態よりも、より低メチル化状態であったことが理解できる。

#### 【 0 0 7 7 】

胎児メチロームの全体的なメチル化特性は、C V S または胎盤組織検体のメチル化特性とよく似ていた。反対に、主に母体 D N A であった血漿中の共有リードの D N A メチル化特性は、母体血細胞のメチル化特性とよく似ていた。次に、母体血漿 D N A リードおよび母体組織または胎児組織のメチル化密度の系統的な座位ごとの比較を行った。同一の配列リード上に有益な S N P として存在し、少なくとも 5 つの母体血漿 D N A 配列リードによって被覆された、C p G 部位のメチル化密度を決定した。

10

#### 【 0 0 7 8 】

図 8 A ~ 図 8 D は、有益な一塩基多型を囲んでいる C p G 部位についての、母体血漿 D N A に対するゲノム組織 D N A のメチル化密度の比較のプロットを示している。図 8 A は、C V S 試料中のリードのメチル化密度と比較した、第一期母体血漿試料中の胎児特異的リードのメチル化密度を示している。図に示すように、胎児特異的リードの値は、C V S リードの値とよく一致している。

20

#### 【 0 0 7 9 】

図 8 B は、妊娠末期胎盤組織のリードのメチル化密度と比較した、第三期母体血漿試料中の胎児特異的リードのメチル化密度を示している。再度、これら一組の密度はよく一致しているが、このことは、胎児メチル化特性が、胎児特異的対立遺伝子を有するリードを解析することによって得ることが可能であることを示している。

#### 【 0 0 8 0 】

図 8 C は、母体血細胞内のリードのメチル化密度と比較した、第一期母体血漿試料中の共有リードのメチル化密度を示している。共有リードの大部分が母親由来であることを考慮すると、これら 2 組の値はよく一致している。図 8 D は、母体血細胞内のリードのメチル化密度と比較した、第三期母体血漿試料中の共有リードのメチル化密度を示している。

30

#### 【 0 0 8 1 】

母体血漿中の胎児特異的リードにおいて、第一期母体血漿および C V S 間のスピアマン相関係数は  $0.705$  ( $P < 2.2 * e^{-16}$ ) であり；第三期母体血漿および妊娠末期胎盤組織間のスピアマン相関係数は  $0.796$  ( $P < 2.2 * e^{-16}$ ) であった（図 8 A および図 8 B）。母体血漿中の共有リードと母体血細胞データについて、同様の比較を行った。第一期血漿試料においてピアソン相関係数は  $0.653$  ( $P < 2.2 * e^{-16}$ ) であり、第三期血漿試料においてピアソン相関係数は  $0.638$  ( $P < 2.2 * e^{-16}$ ) であった（図 8 C および図 8 D）。

#### 【 0 0 8 2 】

##### B . 胎児メチローム

一実施形態において、母体血漿から胎児メチロームを構築するため、少なくとも 1 つの有益な胎児 S N P 部位を被覆し、同一リード内に少なくとも 1 つの C p G 部位を含有する配列リードを選別した。胎児特異的対立遺伝子を示したリードは、胎児メチロームの構築に含まれた。共有対立遺伝子（すなわち非胎児特異的対立遺伝子）を示したリードは、母体由来 D N A 分子から主に成る非胎児特異的メチロームの構築に含まれた。

40

#### 【 0 0 8 3 】

第一期母体血漿試料の胎児特異的リードは、常染色体上の 2 1 8 , 0 1 0 の C p G 部位を被覆した。第三期および出産後の母体血漿試料の対応する数字は、それぞれ、2 6 3 , 6 1 1 および 7 4 , 0 2 0 であった。平均して、共有リードはそれらの C p G 部位をそれぞれ、平均して 3 3 . 3 倍、2 1 . 7 倍および 2 6 . 3 倍被覆した。第一期、第三期および出産後の母体血漿試料の胎児特異的リードは、それらの C p G 部位をそれぞれ 3 . 0 倍

50

、4.4倍および1.8倍被覆した。

【0084】

胎児DNAは母体血漿中では小数の集団であるため、胎児特異的リードによるそれらのCpG部位の被覆率は、該試料の胎児DNA割合に比例した。第一期母体血漿試料において、胎児リード間のメチル化CpGの全体割合は47.0%であり、一方、共有リードのメチル化CpGの全体割合は68.1%であった。第三期母体血漿試料において、胎児リードのメチル化CpGの割合は53.3%であり、一方、共有リードのメチル化CpGの割合は68.8%であった。これらのデータにより、母体血漿中の胎児特異的リードが、母体血漿中の共有リードよりも、より低いメチル化状態であったことが示された。

【0085】

C. 方法

上記の手法を用いることで、腫瘍メチル化特性を決定することもできる。胎児および腫瘍のメチル化特性を決定する方法を以下に記載する。

【0086】

図9は、本発明の実施形態に従って、生物の生物試料から第一のメチル化特性を決定するための方法900を示している、フローチャートである。方法900は、母体血漿のメチル化特性から胎児のエピジェネティックマップを構築することができる。生物試料には、第一組織由来および第二組織由来の無細胞DNAの混合物を含む無細胞DNAが含まれる。例として、第一組織は胎児、腫瘍、または移植臓器から得ることができる。

【0087】

ブロック910において、複数のDNA分子が生物試料から解析される。DNA分子の解析には、生物のゲノム内のDNA分子の位置を決定すること、DNA分子の遺伝子型を決定すること、およびDNA分子が一つまたは複数の部位においてメチル化されているかどうかを決定すること、が含まれ得る。

【0088】

一実施形態では、DNA分子は、DNA分子の配列リードを用いて解析され、そこでの配列決定ではメチル化が認識される。従って、配列リードは、生物試料由来のDNA分子メチル化状態を含む。メチル化状態は、特定のシトシン残基が5-メチルシトシンまたは5-ヒドロキシメチルシトシンであるかどうか、を含み得る。配列リードは、種々の配列決定法、PCR法、アレイ、および断片の配列を特定するための他の適切な手法から得ることができる。配列リードの部位のメチル化状態は、本明細書に記載の通りに得ることができる。

【0089】

ブロック920において、第一組織の第一ゲノムがそれぞれの第一対立遺伝子およびそれぞれの第二対立遺伝子についてヘテロ接合性であり、第二組織の第二ゲノムがそれぞれの第一対立遺伝子についてホモ接合性である、複数の第一遺伝子座が特定される。例えば、胎児特異的リードは、複数の第一遺伝子座において特定され得る。あるいは、腫瘍特異的リードは、複数の第一遺伝子座において特定され得る。組織特異的リードは、第二対立遺伝子の配列リードの割合が特定の範囲、例えば、約3%~25%の範囲に入り、それにより、その座位におけるヘテロ接合性ゲノム由来のDNA断片が小数の集団であり、その座位におけるホモ接合性ゲノム由来のDNA断片が大多数の集団であることが示される、配列決定リードから特定することができる。

【0090】

ブロック930において、各第一座位の一つまたは複数の部位に位置するDNA分子が解析される。部位においてメチル化されており、その座位の各第二対立遺伝子に対応するいくつかのDNA分子が決定される。座位あたりに2つ以上の部位が存在し得る。例えば、SNPは、断片が胎児特異的であること、および断片がメチル化状態が決定されている複数の部位を有し得ることを示し得る。メチル化された各部位におけるリードの数を決定することができ、その座位のメチル化リードの総数を決定することができる。

【0091】

10

20

30

40

50

座位は、特定の数の部位、特定の一連の部位、または組織特異的対立遺伝子を含む変異の周囲の領域の具体的なサイズによって定義され得る。座位はただ1つの部位を有し得る。部位は特定の性質を有し得、例えば、CpG部位であり得る。非メチル化されたリードの数の決定は同じであり、メチル化状態の決定に包含される。

【0092】

ブロック940において、第一遺伝子座のそれぞれについて、その座位の一つまたは複数の部位においてメチル化され、その座位のそれぞれの第二対立遺伝子に対応するDNA分子の数に基づいて、メチル化密度が算出される。例えば、座位に対応するCpG部位のメチル化密度を決定することができる。

【0093】

ブロック950において、第一組織の第一メチル化特性は、第一遺伝子座のメチル化密度から作成される。第一メチル化特性は、特定の部位、例えば、CpG部位に対応し得る。メチル化特性は、胎児特異的対立遺伝子を有する全ての遺伝子座、またはそれらの遺伝子座のほんのいくつかのものであり得る。

【0094】

IV. 血漿メチロームおよび血液メチロームの差異の使用

上記において、血漿由来の胎児特異的リードが胎盤メチロームと相関することが示された。母体血漿メチロームの母体成分は主に血液細胞によって与えられるため、血漿メチロームおよび血液メチローム間の差異を用いることで、胎児特異的対立遺伝子の位置だけでなく、全ての遺伝子座の胎盤メチロームを決定することができる。血漿メチロームおよび血液メチローム間の差異を用いることで、腫瘍のメチロームを決定することもできる。

【0095】

A. 方法

図10は、本発明の実施形態に従って、生物の生物試料から第一メチル化特性を決定する方法1000を示す、フローチャートである。生物試料(例えば、血漿)には、第一組織由来および第二組織由来の無細胞DNAの混合物を含む無細胞DNAが含まれる。第一メチル化特性は、第一組織(例えば、胎児組織または腫瘍組織)のメチル化特性に対応する。方法1200は、母体血漿由来の示差的にメチル化された領域の推論を可能にし得る。

【0096】

ブロック1010において、生物試料が受け取られる。生物試料は、装置(例えば、配列決定装置)において単純に受け取られ得る。生物試料は、生物から入手された形態であってもよいし、あるいは加工された形態であってもよく、例えば、試料は血液試料から抽出された血漿であってもよい。

【0097】

ブロック1020において、第二組織のDNAに対応する第二メチル化特性が得られる。第二メチル化特性は、以前に決定されているため、メモリーから読まれ得る。第二メチル化特性は、第二組織(例えば、第二組織の細胞を唯一または主に含有する異なる試料)から決定することができる。第二メチル化特性は、細胞メチル化特性に対応し得、細胞DNAから得ることができる。別の例として、第二特性は、妊娠前に、あるいは、がんを有さない非妊娠者の血漿メチロームは血液細胞のメチロームと非常に似ていることから、がんの発達の前に、採取された血漿試料から決定することができる。

【0098】

第二メチル化特性は、生物のゲノム内の複数の遺伝子座のそれぞれにおけるメチル化密度を与え得る。特定の座位におけるメチル化密度は、メチル化された第二組織のDNAの割合に対応する。一実施形態では、メチル化密度はCpGメチル化密度であり、そこでは、座位と関連するCpG部位はメチル化密度を決定するために用いられる。座位に1つの部位が存在する場合、メチル化密度はメチル化指数と同じであり得る。メチル化密度および非メチル化密度の値は相補的であることから、メチル化密度は非メチル化密度にも対応する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 9 】

一実施形態では、生物の試料由来の細胞DNAのメチル化認識配列決定を行うことにより、第二メチル化特性が得られる。メチル化認識配列決定の一例は、DNAを亜硫酸水素ナトリウムで処理し、次にDNA塩基配列決定法を行うことを含む。別の例では、メチル化認識配列決定は、亜硫酸水素ナトリウムを用いずに、DNA分子のメチル化状態（例えば、N6-メチルアデニン、5-メチルシトシンおよび5-ヒドロキシメチルシトシン）を亜硫酸水素塩変換無しに直接的に解明することを可能にする単一分子配列決定プラットフォームを用いて（AB Flusberg et al. 2010 Nat Methods; 7: 461-465; J Shim et al. 2013 Sci Rep; 3:1389. doi: 10.1038/srep01389）；または、メチル化シトシンの免疫沈降（例えば、メチルシトシンに対する抗体を用いることによる、またはメチル化されたDNA結合タンパク質もしくはペプチドを用いることによる）（LG Acevedo et al. 2011 Epigenomics; 3: 93-101）、その後の配列決定によって；または、メチル化感受性制限酵素の使用、その後の配列決定によって、行うことができる。別の実施形態では、アレイ、デジタルPCRおよび質量分析等の、非配列決定法が用いられる。

10

## 【 0 1 0 0 】

別の実施形態では、第二組織の第二メチル化密度は、対象の対照試料から、または他の対象から、予め得ることができる。別の対象からのメチル化密度は、参照メチル化密度を有する参照メチル化特性として役立つ。参照メチル化密度は、複数の試料から決定することができ、そこでは、座位における異なるメチル化密度の平均レベル（または他の統計値）がその座位における参照メチル化密度として用いられ得る。

20

## 【 0 1 0 1 】

ブロック1030において、混合物の無細胞DNAから無細胞メチル化特性が決定される。無細胞メチル化特性は、複数の遺伝子座のそれぞれにおけるメチル化密度を与える。無細胞メチル化特性は、無細胞DNAの配列決定から配列リードを得て、該配列リードを用いてメチル化情報を得ることにより、決定することができる。無細胞メチル化特性は、細胞メチロームと同様に決定することができる。

## 【 0 1 0 2 】

ブロック1040において、生物試料内の第一組織由来の無細胞DNAの割合が決定される。一実施形態では、第一組織は胎児組織であり、対応するDNAは胎児DNAである。別の実施形態では、第一組織は腫瘍組織であり、対応するDNAは腫瘍DNAである。割合は、様々な方法で、例えば、胎児特異的対立遺伝子または腫瘍特異的対立遺伝子を用いて、決定することができる。コピー数を用いることで、例えば、3013年3月13日に出版された、「Mutational Analysis Of Plasma DNA For Cancer Detection」という題名の米国特許出願公開第13/801,748号（参照によって組み込まれる）に記載されるように、割合を決定することもできる。

30

## 【 0 1 0 3 】

ブロック1050において、第一メチロームを決定するための複数の遺伝子座が特定される。これらの遺伝子座は、無細胞メチル化特性および第二メチル化特性を決定するために用いられる各遺伝子座に対応し得る。従って、複数の遺伝子座は一致し得る。無細胞メチル化特性および第二メチル化特性を決定するためにより多くの遺伝子座を用いることができる可能性がある。

40

## 【 0 1 0 4 】

いくつかの実施形態において、第二メチル化特性において高度メチル化または低メチル化された遺伝子座は、例えば、母体血細胞を用いて特定することができる。母体血細胞において高度メチル化された遺伝子座を特定するために、X%以上（例えば、80%）のメチル化指数を有するCpG部位が染色体の片端から走査され得る。次に、下流領域内（例えば、200bpの下流内）の次のCpG部位が探索され得る。すぐ下流のCpG部位がX%以上（または他の特定の量）のメチル化指数を有していた場合、第一CpG部位および第二CpG部位はグループ化され得る。次の下流領域内に他のCpG部位が存在しなくなるまで；またはすぐ下流のCpG部位がX%未満のメチル化指数を有するまで、グルー

50

ブ化は継続され得る。グループ化された CpG 部位の領域は、領域が少なくとも 5 つの直接隣接した高度メチル化 CpG 部位を含有している場合に、母体血細胞において高度メチル化されていると報告され得る。同様の解析を行うことで、20% 以下のメチル化指数を有する CpG 部位について、母体血細胞において低メチル化状態の遺伝子座を探索することができる。第二メチル化特性のメチル化密度は、短く収載された (short-listed) 遺伝子座について算出することができ、対応する遺伝子座の第一メチル化特性 (例えば、胎盤組織メチル化密度) を、例えば、母体血漿亜硫酸水素塩配列決定データから、推定するのに用いることができる。

【0105】

ブロック 1060 において、第一組織の第一メチル化特性は、複数個の遺伝子座のそれぞれについて第二メチル化特性のメチル化密度および無細胞メチル化特性のメチル化密度間の差異を含む示差パラメーターを算出することによって、決定される。差異は割合に応じて決定される。

10

【0106】

一実施形態では、第一 (例えば、胎盤) 組織における座位の第一メチル化密度 (D) は、下記式を用いて推定され、

【0107】

【数 4】

$$D = mbc - \frac{(mbc - mp)}{f * CN} \quad (1)$$

20

【0108】

式中、m b c は、座位 (例えば、母体血細胞の亜硫酸水素塩配列決定データにおいて決定される短く収載された座位) における第二メチル化特性のメチル化密度を示し; m p は、母体血漿の亜硫酸水素塩配列決定データにおける対応する座位のメチル化密度を示し; f は、第一組織由来の無細胞 DNA の割合 (例えば、胎児 DNA 濃度分率) を示し、C N は、座位におけるコピー数 (例えば、正常と比較した場合の、より高い増幅値またはより少ない欠失数) を示す。第一組織に増幅も欠失も存在しない場合、C N は 1 つであり得る。トリソミー (すなわち、腫瘍または胎児における領域の重複) において、C N は 1.5 であり (増加は 2 コピーから 3 コピーであるため)、モノソミーは 0.5 を有する。より高度な増幅は、0.5 の値ずつ増加し得る。この例において、D は示差パラメーターに対応し得る。

30

【0109】

ブロック 1070 において、第一組織の補正第一メチル化密度を得るために、第一メチル化密度が変換される。変換は、示差パラメーターおよび第一組織の実際のメチル化特性間の固定された差異を与え得る。例えば、前記値は、固定された定数ずつ、または勾配ずつ、異なり得る。変換は線形または非線形であり得る。

40

【0110】

一実施形態では、推定値 D の分布は、胎盤組織の実際のメチル化レベルよりも低いことが分かった。例えば、推定値は、CpG 部位が過剰出現したゲノム分節である CG 島から得られたデータを用いて線形に変換され得る。本研究で用いられる CG 島のゲノム位置は、UCSC Genome Browser データベース (NCBI build 36/hg18) から得られた (PA Fujita et al. 2011 Nucleic Acids Res; 39: D876-882)。例えば、CG 島は、50% 以上の GC 含量、200bp 超のゲノム長および 0.6 超の測定 / 予測 CpG 数比を有するゲノム分節として定義され得る (M Gardiner-Garden et al 1987 J Mol Biol; 196: 261-282)。

【0111】

50

ある実施において、線形変換式を得るために、少なくとも4つのCpG部位および配列決定された試料内のCpG部位あたり5以上の平均読み深度を有するCG島が含まれ得る。CVSまたは妊娠末期胎盤におけるCG島のメチル化密度および推定値Dの間の直線関係を決定した後、下記式を用いて予測値を決定した：

第一期予測値 =  $D \times 1.6 + 0.2$

第三期予測値 =  $D \times 1.2 + 0.05$

【0112】

B. 胎児の例

上記のように、方法1000を用いることで、母体血漿から胎盤のメチル化状況を推定することができる。血漿中の循環DNAは、主に造血細胞に由来する。なお、未知の他の内部臓器から与えられる無細胞DNAの割合は未知である。さらに、胎盤由来無細胞DNAは、母体血漿中の全DNAのおよそ5~40%を占め、平均値はおよそ15%である。従って、母体血漿中のメチル化レベルは、上記のように、既存のバックグラウンドのメチル化+妊娠中の胎盤の寄与に等しいと仮定することができる。

【0113】

母体血漿メチル化レベルMPは、下記式を用いて決定することができ、

【0114】

【数5】

$$MP = BKG \times (1 - f) + PLN \times f$$

【0115】

式中、BKGは血液細胞および内部臓器から得られる血漿中のバックグラウンドのDNAメチル化レベルであり、PLNは胎盤のメチル化レベルであり、fは母体血漿中の胎児DNA濃度分率である。

【0116】

一実施形態では、胎盤のメチル化レベルは下記式によって理論上は推定することができる。

【0117】

【数6】

$$PLN = \frac{MP - BKG \times (1 - f)}{f} \quad (2)$$

【0118】

式(1)および式(2)は、CNが1に等しく、DがPLNに等しく、BKGがmbcに等しい場合に、等しい。別の実施形態では、胎児DNA濃度分率は、特定の値に仮定または設定することができる(例えば、最小値fが存在するという仮定の一環として)。

【0119】

母体血のメチル化レベルは、母体血漿のバックグラウンドメチル化を表すものと見なした。母体血細胞において高度メチル化または低メチル化された遺伝子座に加えて、臨床的関連性を有する定義された領域、例えば、ヒトゲノム内のCG島に焦点を当てることにより、推定アプローチをさらに求めた。

【0120】

常染色体およびX染色体上の合計27,458のCG島(NCBI Build 36/hg18)の平均メチル化密度を、母体血漿および胎盤の配列決定データから得た。胎盤

10

20

30

40

50

、母体血および母体血漿を含む全ての分析試料における、10以上の被覆 CpG 部位および被覆 CpG 部位あたり5以上の平均読み深度を有する CG 島のみを選別した。結果として、26,698の CG 島(97.2%)が妥当なものとして残り、それらのメチル化レベルを、上記式に従って、血漿メチル化データおよび胎児 DNA 濃度分率を用いて推定した。

#### 【0121】

推定 PLN 値の分布が胎盤組織における CG 島の実際のメチル化レベルよりも低かったことが注目された。従って、一実施形態では、推定 PLN 値、または単に推定値(D)は、胎盤における CG 島のメチル化レベルを推定するための、任意の単位として用いられた。変換後、線形的に推定された値およびそれらの分布は、実際のデータセットにより類似したものとなった。変換した推定値はメチル化予測値(methylation predictive value: MPV)と命名され、その後、胎盤における遺伝子座のメチル化レベルを予測するために用いられた。

10

#### 【0122】

この例において、CG 島は、胎盤におけるそれらのメチル化密度に基づいて3つのカテゴリーに分類された:低(0.4以下)、中(0.4超~0.8未満)および高(0.8以上)。推定式を用いて、同じ一連の CG 島の MPV を算出し、次に、その値を用いて、CG 島を同一のカットオフで3つのカテゴリーに分類した。実際のデータセットおよび推定データセットを比較することにより、短く収載された CG 島の75.1%が、それらの MPV による組織データにおける同一のカテゴリーに正確に一致し得ることが分かった。CG 島の約22%が1レベルの差異(高対中、または中对低)を有するグループに割り当てられ、3%未満が完全に誤って分類された(高対低)図12A)。また、全体的な分類性能が決定された:胎盤において0.4以上、0.4超~0.8未満および0.8以上のメチル化密度を有する86.1%、31.4%および68.8%の CG 島は、「低」、「中」および「高」と正確に推定された(図12B)。

20

#### 【0123】

図11Aおよび図11Bは、本発明の実施形態による、母体血漿データおよび胎児 DNA 濃度分率を用いた予測アルゴリズムの実行のグラフを示している。図11Aは、MPV 補正分類(推定カテゴリーは実際のデータセットと正確に一致);1レベルの差異(推定カテゴリーは実際のデータセットから1レベル異なる);誤分類(推定カテゴリーは実際のデータセットと反対)を用いた、CG 島分類の正確さを示すグラフ1100である。図11Bは、各推定カテゴリーに分類された CG 島の割合を示すグラフ1150である。

30

#### 【0124】

母体バックグラウンドメチル化がそれぞれのゲノム領域において低度であるならば、循環血液中の高度メチル化胎盤由来 DNA の存在は、全体的な血漿メチル化レベルを胎児 DNA 濃度分率に応じた程度まで増加させる。放出される胎児 DNA が十分にメチル化されている場合、顕著な変化が観察され得る。反対に、母体バックグラウンドメチル化が高度である場合、血漿メチル化レベルにおける変化の程度は、低メチル化胎児 DNA が放出された場合により有意になる。従って、推定スキームは、メチル化レベルが母体バックグラウンドおよび胎盤間で異なることが知られている遺伝子座について、特に、高度メチル化された遺伝子座および胎盤における低メチル化マーカーについて推定される場合に、より実際的になり得る。

40

#### 【0125】

図12Aは、本発明の実施形態に従った、メチル化予測のための、15の選択されたゲノム遺伝子座の詳細を示す、表1200である。手法を確認するために、先に研究されている、15の示差的にメチル化されたゲノム遺伝子座を選択した。選択された領域のメチル化レベルを推定し、先に研究された15の示差的にメチル化された遺伝子座と比較した(RWK Chiu et al. 2007 Am J Pathol; 170: 941-950; S.S.C. Chim et al. 2008 Clin Chem; 54: 500-511; SSC Chim et al. 2005 Proc Natl Acad Sci U S A; 102: 14753-14758; DWY Tsui et al. 2010 PLoS One; 5: e15069)。

50

## 【0126】

図12Bは、15の選択されたゲノム遺伝子座および胎盤におけるそれらの対応するメチル化レベルの推定カテゴリを示すグラフ1250である。推定されたメチル化カテゴリは、低、0.4以下；中、0.4超～0.8未満；高、0.8以上である。表1200およびグラフ1300は、胎盤におけるそれらのメチル化レベルが、いくつかの例外（RASSF1A、CGI009、CGI137およびVAPA）を有して、正確に推定され得ることを示している。これらの4つのマーカーのうち、CGI009のみが、実際のデータセットとの顕著な矛盾を示した。その他はわずかに誤分類されたのみである。

## 【0127】

表1200において、「1」は、下記式によって算出される推定値（D）を指し、

10

## 【0128】

## 【数7】

$$D = \frac{MP - BKG \times (1 - f)}{f}$$

## 【0129】

式中、fは胎児DNA濃度分率である。標識「2」は、式：MPV = D × 1.6 + 0.25を用いる、線形変換された推定値を指している、メチル化予測値（MPV）を指す。標識「3」は、推定値に対する分類カットオフ（classification cutoff）を指す：低、0.4以下；中、0.4超～0.8未満；高、0.8以上。標識「4」は、実際の胎盤データセットに対する分類カットオフを指す：低、0.4以下；中、0.4超～0.8未満；高、0.8以上。標識「5」は、胎盤状態が母体血細胞のメチル化状態と比較した胎盤のメチル化状態を指すことを表している。

20

## 【0130】

## C. 胎児DNAの濃度分率の算出

一実施形態では、第一組織由来の胎児DNAの割合は、男児胎児のY染色体を用いることができる。母体血漿試料中のY染色体配列の割合（Y染色体率）は、男児胎児由来のY染色体リードおよびY染色体に誤整列した母体（女性）リードの数の混成であった（RWK Chiu et al. 2011 BMJ; 342: c7401）。従って、試料中のY染色体率および胎児DNA濃度分率（f）間の関連性は、以下で与えられ得、

30

## 【0131】

## 【数8】

$$\%chrY = \%chrY_{male} \times f + \%chrY_{female} \times (1 - f)$$

40

## 【0132】

式中、%chrY<sub>male</sub>（Y染色体率（男性））は、100%の男性DNAを含有する血漿試料中のY染色体に整列したリードの割合を指し；%chrY<sub>female</sub>（Y染色体率（女性））は、100%の女性DNAを含有する血漿試料中のY染色体に整列したリードの割合を指す。

## 【0133】

Y染色体率は、男児胎児を妊娠した女性から得られた試料のミスマッチを有せずにY染色体に整列したリードから決定することができ、例えば、該リードは亜硫酸水素塩によって変換された試料から得られるものである。%chrY<sub>male</sub>値は、2つの成人男性血漿試

50

料の亜硫酸水素塩配列決定から得ることができる。 $\%chrY_{female}$ 値は、2つの非妊娠成人女性血漿試料の亜硫酸水素塩配列決定から得ることができる。

【0134】

他の実施形態では、胎児DNA率は、常染色体上の胎児特異的対立遺伝子から決定することができる。別の例として、エピジェネティックマーカーを用いて、胎児DNA率を決定してもよい。胎児DNA率を決定する他の方法を用いてもよい。

【0135】

D. メチル化を用いてコピー数を決定する方法

胎盤ゲノムは母体ゲノムよりもより低メチル化状態である。前述の通り、妊娠女性の血漿のメチル化は、母体血漿中の胎盤由来胎児DNAの濃度分率に依存する。従って、染色体領域のメチル化密度の解析を通じて、胎児組織の母体血漿への寄与における差異を検出することが可能である。例えば、トリソミー胎児（例えば、トリソミー21またはトリソミー18またはトリソミー13を抱える胎児）を身籠っている妊娠女性において、胎児は、二染色体性染色体と比較した場合に、三染色体性染色体から母体血漿にさらなる量のDNAを与える。この状況において、三染色体性染色体（または増幅を有するあらゆる染色体領域）の血漿メチル化密度は、二染色体性染色体のそれよりもより低くなる。差異の程度は、血漿試料中の胎児DNA濃度分率を考慮することにより、数学的計算によって予測することができる。血漿試料中の胎児DNA濃度分率が高くなるほどに三染色体性染色体および二染色体性染色体間のメチル化密度における差異はより大きなものになる。欠失を有する領域については、メチル化密度はより高くなる。

【0136】

欠失の1例は、女性胎児が1コピーのX染色体しか有さない場合のターナー症候群である。この状況では、ターナー症候群を抱える胎児を身籠る妊娠女性においては、血漿DNA中のX染色体のメチル化密度は、正常な数のX染色体を有する女性胎児を身籠る同じ妊娠女性の状況よりも高くなる。この戦略の一実施形態では、Y染色体配列の存在または不在について、母体血漿が最初に解析され得る（例えば、MPSまたはPCRに基づく手法を用いて）。Y染色体配列が存在する場合、胎児は男性に分類され得、その後の解析は必要ではない。一方、Y染色体配列が母体血漿中に存在しない場合、胎児は女性に分類され得る。この状況では、母体血漿中のX染色体のメチル化密度が次に解析され得る。正常よりも高いX染色体メチル化密度は、胎児がターナー症候群を有するリスクが高いことを示す。このアプローチは、その他の性染色体異数性にも応用することができる。例えば、XY Yを有する胎児において、母体血漿中のY染色体のメチル化密度は、母体血漿中に同様のレベルの胎児DNAを有する正常なXY胎児のそれよりも低くなる。別の例として、クラインフェルター症候群（XXY）を抱える胎児においては、Y染色体配列は母体血漿中に存在するが、母体血漿中のX染色体のメチル化密度は、母体血漿中に同様のレベルの胎児DNAを有する正常なXY胎児のそれよりも低くなる。

【0137】

先の考察から、二染色体性染色体の血漿メチル化密度（ $MP_{Non-aneu}$ （非異数））は、

【0138】

【数9】

$$MP_{Non-aneu} = BKG \times (1 - f) + PLN \times f,$$

【0139】

として算出することができ、式中、BKGは血液細胞および内部臓器由来の血漿中のバックグラウンドDNAメチル化レベルであり、PLNは胎盤のメチル化レベルであり、fは母体血漿中の胎児DNA濃度分率である。

【 0 1 4 0 】

三染色体性染色体（ $MP_{Aneu}$ （異数））は、

【 0 1 4 1 】

【 数 1 0 】

$$MP_{Aneu} = BKG \times (1 - f) + PLN \times f \times 1.5、$$

【 0 1 4 2 】

として算出することができ、式中、1.5はコピー数CNに対応し、もう1つの染色体の追加は50%の増加となる。三染色体性染色体および二染色体性染色体間の差異（ $MP_{Diff}$ ）は、以下となる。

【 0 1 4 3 】

【 数 1 1 】

$$MP_{Diff} = PLN \times f \times 0.5$$

【 0 1 4 4 】

一実施形態では、潜在的に異数体の染色体（または染色体領域）のメチル化密度の、一つまたは複数の他の推定非異数体染色体またはゲノムの全体のメチル化密度に対する比較は、血漿試料中の胎児DNA濃度を効率的に正規化するために使用することができる。前記比較は、正規化されたメチル化密度を得るための、それら2つの領域のメチル化密度の間のパラメーター（例えば、比または差異を含む）の算出によるものであり得る。前記比較は、得られるメチル化レベルの依存（例えば、それら2つのメチル化密度からパラメーターとして決定される）を排除することができる。

【 0 1 4 5 】

潜在的に異数体の染色体のメチル化密度が一つもしくは複数の他の染色体のメチル化密度、または胎児DNAの濃度分率を反映する他のパラメーターに対して正規化されていない場合、濃度分率は血漿中のメチル化密度に影響を与える主な要因となる。例えば、10%の胎児DNA濃度分率を有するトリソミー21胎児を身籠る妊娠女性の21番染色体の血漿メチル化密度は、正倍数体胎児を身籠る妊娠女性のそれと同じであり、胎児DNA濃度分率は15%であるが、正規化されたメチル化密度は差異を示す。

【 0 1 4 6 】

別の実施形態では、潜在的に異数体の染色体のメチル化密度は、胎児DNA濃度分率に対して正規化され得る。

例えば、下記式は、メチル化密度を正規化するために適用することができ、

【 0 1 4 7 】

【 数 1 2 】

$$MP_{Normalized} = MP_{non-normalized} + (BKG - PLN) \times f$$

【 0 1 4 8 】

式中、 $MP_{Normalized}$ （正規化）は血漿中の胎児DNA濃度分率を用いて正規化されたメチル化密度であり、 $MP_{non-normalized}$ （非正規化）は測定メチル化密度であり、BKG

10

20

30

40

50

は母体血細胞または組織から得られるバックグラウンドメチル化密度であり、PLNは胎盤組織におけるメチル化密度であり、fは胎児DNA濃度分率である。BK GおよびPLNのメチル化密度は、正常妊娠女性から得られた母体血細胞および胎盤組織から先に確立された基準値に基づき得る。様々な遺伝学およびエピジェネティクス的手法を用いることで、例えば、非亜硫酸水素塩変換DNAに対する大規模並列配列決定またはPCRを用いた、Y染色体からの配列リードの割合の測定によって、血漿試料中の胎児DNA濃度分率を決定することができる。

【0149】

ある実施では、潜在的に異数体の染色体の正規化されたメチル化密度は、正倍数体胎児を身籠る妊娠女性から成る参照群と比較され得る。参照群の正規化されたメチル化密度の平均値およびSDが決定され得る。次に、検査症例の正規化されたメチル化密度が、下記式による参照群の平均値からのSDの数字を示すZ値として表され得、

10

$$Z\text{-スコア} = \frac{MP_{\text{Normalized}} - \text{Mean}}{SD},$$

【0150】

式中、 $MP_{\text{Normalized}}$ は検査症例の正規化されたメチル化密度であり、Mean（平均値）は参照症例の正規化されたメチル化密度の平均値であり、SDは参照症例の正規化されたメチル化密度の標準偏差である。カットオフ（例えば、-3未満のZ値）を用いることで、染色体有意に低メチル化されているかどうかを分類することができ、それにより、試料の異数体状態を決定することができる。

20

【0151】

別の実施形態では、 $MP_{\text{Diff}}$ は、正規化されたメチル化密度として用いられ得る。そのような実施形態では、PLNは、例えば方法1000を用いて、推定され得る。いくつかの実施において、参照メチル化密度（fを用いて正規化することができる）は、非異数体領域のメチル化レベルから決定され得る。例えば、Mean（平均値）は、同一試料の一つまたは複数の染色体領域から決定され得る。カットオフは、fに応じて決定されるか、または単に、最低濃度が存在するに足る十分なレベルに設定される。

30

【0152】

従って、カットオフに対する領域のメチル化レベルの比較は、様々な方法で達成することができる。比較は正規化（例えば、上記のような）を含み得、正規化は、メチル化レベルまたはカットオフ値に対して、それらの値が定義された方法に応じて、等しく行われ得る。従って、領域の決定されたメチル化レベルが基準レベル（同一試料または他の試料から決定）と統計学的に異なるかどうかは、様々な方法で決定することができる。

【0153】

上記解析は、染色体全体または染色体の部分（例えば、染色体の近接したまたはばらばらの小領域）を含み得る、染色体領域の解析に応用することができる。一実施形態では、潜在的に異数体の染色体は、いくつかのピンに分割され得る。ピンは同じまたは異なるサイズのものであり得る。各ピンのメチル化密度は、試料の濃度分率に対して、または一つもしくは複数の推定非異数体染色体のメチル化密度もしくはゲノムの全体的なメチル化密度に対して、正規化され得る。各ピンの正規化されたメチル化密度は次に、有意に低メチル化されているかどうかを決定するために参照群と比較され得る。次に、有意に低メチル化されているピンの割合が決定され得る。カットオフ（例えば、ピンの5%、10%、15%、20%または30%超が有意に低メチル化されている）は、症例の異数体状態を分類するために用いられ得る。

40

【0154】

50

増幅または欠失について検査する場合、メチル化密度は参照メチル化密度と比較され得、これは、検査される特定の領域に特異的であり得る。メチル化は領域によって、特に、領域のサイズに応じて（例えば、より小さな領域ほどより大きな変動を示す）異なり得るため、各領域は異なる参照メチル化密度を有し得る。

【 0 1 5 5 】

上記のように、正倍数体胎児をそれぞれ身籠る一人または複数人の妊娠女性を用いることで、目的領域のメチル化密度の正常範囲、または2つの染色体領域間のメチル化密度におけるまたは差異を定義することができる。PLNの正常範囲を決定することもできる（例えば、直接測定によって、または方法1000による推定値として）。他の実施形態では、2つのメチル化密度の間の比が用いられ得、例えば、潜在的に異数体の染色体および非異数体染色体のメチル化密度が、それらの差異の代わりに解析に用いられ得る。このメチル化解析アプローチを、配列リード計数アプローチ（RWK Chiu et al. 2008 Proc Natl Acad Sci USA;105:20458-20463）および血漿DNAのサイズ解析を含むアプローチ（米国特許出願公開第2011/0276277号）と組み合わせることで、異数体を決定または確認することができる。メチル化解析との組み合わせで用いられる配列リード計数アプローチは、ランダムシーケンス（RWK Chiu et al. 2008 Proc Natl Acad Sci USA;105:20458-20463; DW Bianchi DW et al. 2012 Obstet Gynecol 119:890-901）またはターゲットシーケンス（AB Sparks et al. 2012 Am J Obstet Gynecol 206:319.e1-9; B Zimmermann et al. 2012 Prenat Diagn 32:1233-1241; GJ Liao et al. 2012 PLoS One; 7:e38154）を用いて行うことができる。

10

20

【 0 1 5 6 】

BKGの使用は、試料間のバックグラウンドにおける差異を説明し得る。例えば、ある女性は別の女性と異なるBKGメチル化レベルを有し得るが、BKGおよびPLNの間の差異はそのような状況において試料をまたがって使用され得る。異なる染色体領域のカットオフは、例えば、ゲノムのある領域のメチル化密度がゲノムの別の領域と異なる場合、異なり得る。

【 0 1 5 7 】

このアプローチは、胎児ゲノムにおける欠失および増幅を含むあらゆる染色体異常を検出するために一般化され得る。さらに、この解析の分解能は所望のレベルに調整することができ、例えば、ゲノムは10Mb、5Mb、2Mb、1Mb、500kb、100kbのピンに分割することができる。従って、本科学技術は、染色体内（subchromosomal）重複または染色体内欠失を検出するのにも用いることができる。従って、本科学技術は、出生前胎児の分子的核型を非侵襲的に得ることを可能にする。このように用いられる場合、本科学技術は、分子の計数に基づく非侵襲的出生前検査法（A Srinivasan et al. 2013 Am J Hum Genet;92:167-176; SCY Yu et al. 2013 PLoS One 8: e60968）と組み合わせで用いられ得る。他の実施形態では、ピンのサイズは同一でなくてもよい。例えば、ピンのサイズは、各ピンが同数のCpGジヌクレオチドを含有するように調整され得る。この場合、ピンの物理的サイズは異なるであろう。

30

【 0 1 5 8 】

前記式は、様々なタイプの染色体異常に適用するために以下のように書き換えることができる。

40

【 0 1 5 9 】

【 数 1 4 】

$$MP_{Diff} = (BKG - PLN) \times f \times 0.5 \times CN.$$

【 0 1 6 0 】

50

式中、CNは障害領域におけるコピー数変化の数を表す。CNは、1コピーの染色体の増加において1に等しく、2コピーの染色体の増加において2に等しく、2つの相同染色体のうち1つの減少において-1に等しい（例えば、XO核型をもたらす、女性胎児がX染色体の1つを失っている胎児ターナー症候群の検出）。ピンのサイズを変更する際、この式を変更する必要は無い。しかし、CpGジヌクレオチド（または胎児DNAおよび母体DNAの間で示差的なメチル化を示す他のヌクレオチドの組み合わせ）の数が少ないほど、より小さなピン内に存在することとなり、これによりメチル化密度の測定における確率的変動が増加するため、より小さなピンのサイズが用いられる場合、感度および特異度は減少し得る。一実施形態では、必要なリードの数は、メチル化密度の変動係数および所望の感度レベルを解析することによって決定され得る。

10

## 【0161】

このアプローチが実行可能であることを示すために、9人の妊娠女性から得た血漿試料を解析した。5人の妊娠女性において、それぞれは正倍数体胎児を身籠っており、その他の4人はそれぞれトリソミー21（T21）胎児を身籠っていた。それら5人の正倍数体妊娠女性から3人を無作為に選び、参照群を形成させた。残りの2人の正倍数体妊娠例（Eu1およびEu2）および4人のT21例（T21-1、T21-2、T21-3およびT21-4）を、潜在的なT21状態を検査するために本アプローチを用いて解析した。血漿DNAを亜硫酸水素塩によって変換し、イルミナ社製HiSeq2000プラットフォームを用いて配列決定した。一実施形態では、個々の染色体のメチル化密度が算出された。次に、21番染色体およびその他の21個の常染色体の平均値の間のメチル化密度における差異を決定して、正規化されたメチル化密度を得た（表1）。参照群の平均値およびSDは、6つの検査例のZ値の算出に用いた。

20

## 【0162】

## 【表1】

	Eu1	Eu2	T21-1	T21-2	T21-3	T21-4
21番染色体および他の常染色体間のMP <sub>Diff</sub> のZ値	-1.48	1.09	-4.46	-5.30	-8.06	-5.69

30

表1：試料をT21であると分類するのに-3未満のZ値のカットオフを用いたところ、全ての正倍数体およびT21例の分類は正しかった。

## 【0163】

別の実施形態において、ゲノムを1Mbのピンに分割し、1Mbのピンそれぞれのメチル化密度を決定した。潜在的に異数体の染色体上の全てのピンのメチル化密度は、推定非異数体染色体上に位置する全てのピンのメチル化密度中央値を用いて正規化することができる。ある実施において、各ピンについて、非異数体ピンの中央値とのメチル化密度における差異を算出することができる。これらの値のZ値は、参照群の平均値および標準偏差値を用いて算出することができる。低メチル化（表2）を示すピンの割合を決定し、カットオフ率と比較することができる。

40

## 【0164】

【表 2】

	Eu1	Eu2	T21-1	T21-2	T21-3	T21-4
-3 未満の $MP_{diff}$ の Z 値を有する 21 番染色体上のビンの割合	0%	0%	33.3%	58.3%	19.4%	52.8%

表 2：21 番染色体上の有意により低メチル化であるビンに対して 5% をカットオフとして用いたところ、全ての例は T 2 1 状態に正しく分類された。

10

## 【0165】

胎児の染色体または染色体内の異常を検出するためのこの DNA メチル化に基づくアプローチは、配列決定 (RWK Chiu et al. 2008 Proc Natl Acad Sci USA; 105: 20458-20463) もしくはデジタル PCR (YMD Lo et al. 2007 Proc Natl Acad Sci USA; 104: 13116-13121) 等による分子の計数、または DNA 分子のサイズ測定 (米国特許出願公開第 2011/0276277 号) に基づくアプローチと組み合わせて用いることができる。そのような組み合わせ (例えば、DNA メチル化 + 分子計数、または DNA メチル化 + サイズ測定、または DNA メチル化 + 分子計数 + サイズ測定) は、臨床背景、例えば感度および/または特異度の向上において有利となる相乗効果を有するであろう。例えば、例えば配列決定により解析が必要となる DNA 分子の数を、診断精度に不利な影響を与えずに減らすことができる。この特徴は、そのような検査をより経済的に行うことを可能にする。別の例として、分析される所与の数の DNA 分子について、組み合わせられたアプローチは、胎児の染色体または染色体内の異常をより低い濃度分率の胎児 DNA において検出することを可能にする。

20

30

## 【0166】

図 13 は、生物の生物試料から染色体異常を検出するための方法 1300 のフローチャートである。生物試料には、第一組織由来および第二組織由来の無細胞 DNA の混合物を含む無細胞 DNA が含まれる。第一組織は胎児または腫瘍から得られたものであり得、第二組織は妊娠女性または患者から得られたものであり得る。

## 【0167】

ブロック 1310 において、生物試料由来の複数の DNA 分子が解析される。DNA 分子の解析には、生物のゲノムにおける DNA 分子の位置を決定し、DNA 分子が一つまたは複数の部位においてメチル化されているかどうかを決定すること、が含まれ得る。前記解析はメチル化認識配列決定から配列リードを得ることで行うことができるため、前記解析はその DNA から以前に得られたデータに対してのみ行われ得る。他の実施形態では、前記解析は、実際の配列決定またはデータを得るための他の有効な段階を含み得る。

40

## 【0168】

位置の決定は、ヒトゲノムの各部分への、例えば、特定領域への DNA 分子のマッピング (例えば、配列リードを介した) を含み得る。ある実施において、あるリード目的領域に位置しない場合、そのリードは無視することができる。

## 【0169】

ブロック 1320 において、複数の部位のそれぞれについて、部位においてメチル化されている DNA 分子のそれぞれの数が決定される。一実施形態では、部位は CpG 部位であり、本明細書に記載の一つまたは複数の判定基準を用いて選択されるある特定の CpG

50

部位のみであり得る。メチル化されているDNAの数は、正規化が特定部位における分析されたDNA分子の総数（例えば、配列リードの総数）を用いて行われたならば、非メチル化状態である数の決定に等しい。

【0170】

ブロック1330において、第一染色体領域の第一メチル化レベルは、第一染色体領域内の部位においてメチル化されているDNA分子のそれぞれの数に基づいて算出される。第一染色体領域はいかなるサイズ（例えば、上記サイズ）のものであってもよい。メチル化レベルは、例えば、正規化手順の一部として、第一染色体領域に整列したDNA分子の総数を説明することができる。

【0171】

第一染色体領域は、いかなるサイズ（例えば、染色体全体）であってもよく、ばらばらの小領域から成っていてもよい（すなわち、小領域が互いに分離している）。各小領域のメチル化レベルを決定し、それを組み合わせることで（例えば、平均値または中央値として）、第一染色体領域のメチル化レベルを決定することができる。

【0172】

ブロック1340において、第一メチル化レベルはカットオフ値と比較される。カットオフ値は参照メチル化レベルであってもよいし、あるいは参照メチル化レベルと関連していてもよい（例えば、正常レベルからの特定の距離）。カットオフ値は、第一染色体領域の染色体異常を有さない胎児を身籠る他の妊娠女性対象から、がんを有さない個人の試料から、または異数体と関連していないことが知られている生物の遺伝子座（すなわち、二染色体性の領域）から、決定され得る。

【0173】

一実施形態では、カットオフ値は、下記式の参照メチル化レベルとの差異を有すると定義され得、

【0174】

【数15】

$$(BKG - PLN) \times f \times 0.5 \times CN,$$

【0175】

式中、BKGは女性のバックグラウンド（または他の対象からの平均値または中央値）であり、fは第一組織由来の無細胞DNAの濃度分率であり、CNは検査されるコピー数である。CNは、異常の種類（欠失または重複）に対応するスケーリング因子の一例である。CN=1のカットオフが最初に全ての増幅を検査するために用いられ得、その後、さらなるカットオフが増幅の程度を決定するために用いられ得る。カットオフ値を、第一組織由来の無細胞DNAの濃度分率に基づかせることで、座位のメチル化の予測レベルを決定することができる（例えば、コピー数異常が存在しない場合）。

【0176】

ブロック1350において、第一染色体領域の異常の分類が、比較に基づいて決定される。レベルにおける統計的に有意な差異は、染色体異常を有する胎児のリスクの増加を示し得る。種々の実施形態において、染色体異常は、21トリソミー、18トリソミー、13トリソミー、ターナー症候群、またはクラインフェルター症候群であり得る。他の例は、染色体内欠失、染色体内重複、またはディジョージ症候群である。

【0177】

V. マーカーの決定

上記で言及したように、胎児ゲノムのある特定の部分は、母体ゲノムと異なるようにメチル化されている。これらの差異は妊娠全体にわたって一般的であり得る。異なるメチル化の領域は、胎児由来のDNA断片を特定するために用いることができる。

10

20

30

40

50

## 【0178】

## A. 胎盤組織および母体組織からDMRを決定する方法

胎盤は組織特異的なメチル化サインを有する。胎児特異的DNAメチル化マーカーは、胎盤組織および母体血細胞間で示差的にメチル化された遺伝子座に基づいて、母体血漿検出のために、および非浸潤的出生前診断適用のために、開発された (SSC Chim et al. 2008 Clin Chem; 54: 500-511; EA Papageorgiou et al 2009 Am J Pathol; 174: 1609-1618; およびT Chu et al. 2011 PLoS One; 6: e14723)。そのような示差的にメチル化された領域 (DMR) をゲノムワイドに探索する実施形態が提供される。

## 【0179】

図14は、本発明の実施形態に従って、胎盤メチル化特性を母体メチル化特性 (例えば、血液細胞から決定された) と比較することによる、メチル化マーカーを同定するための方法1400のフローチャートである。方法1400は、腫瘍メチル化特性を健常組織に対応するメチル化特性と比較することにより腫瘍マーカーを決定するために、用いてもよい。

10

## 【0180】

ブロック1410において、胎盤メチロームおよび血液メチロームが得られる。胎盤メチロームは胎盤試料 (例えば、CVSまたは妊娠末期胎盤) から決定することができる。メチロームはゲノムの一部のみのメチル化密度を含み得ることを理解されたい。

## 【0181】

ブロック1420において、特定の数の部位 (例えば、5つのCpG部位) を含む領域が特定され、そのために十分な数のリードが入手された。一実施形態では、各染色体の一端から特定を開始して、少なくとも5つの適切なCpG部位を含有する最初の500bp領域を突き止めた。CpG部位は、該部位が少なくとも5つの配列リードによって被覆された場合に、適切と見なされ得る。

20

## 【0182】

ブロック1430において、胎盤メチル化指数および血中メチル化指数が各部位について算出される。例えば、メチル化指数は各500bp領域内の全ての適切なCpG部位について個別に算出された。

## 【0183】

ブロック1440において、メチル化指数を母体血細胞および胎盤試料間で比較することで、一連の指数が互いに異なるかどうかを決定した。例えば、メチル化指数を、例えば、マン・ホイットニー検定を用いて、母体血細胞およびCVSまたは妊娠末期胎盤間で比較した。例えば、0.01以下のP値を統計的に有意に異なると見なしたが、より低い数字が偽陽性領域を減少させる場合は他の値を用いてもよい。

30

## 【0184】

一実施形態では、適切なCpG部位の数が5未満である場合、またはマン・ホイットニー検定が有意でない場合、500bp領域は100bp下流に移動された。領域は、マン・ホイットニー検定が500bp領域について有意になるまで、下流への移動を継続された。次に、次の500bp領域が考慮された。次の領域がマン・ホイットニー検定による統計的有意性を示すことが分かった場合、結合された隣接領域が1,000bp以下でない限り、目下の領域に追加された。

40

## 【0185】

ブロック1450において、統計的に有意に異なっていた (例えば、マン・ホイットニー検定により) 隣接領域が統合され得る。2つの試料のメチル化指数の間に差異が存在することに注意されたい。一実施形態では、隣接領域が互いの特定の距離 (例えば、1,000bp) 内に存在し、それらが同様のメチル化特性を示す場合、それらは統合される。ある実施において、隣接領域間のメチル化特性の類似性は、以下のいずれかを用いて定義され得る: (1) 母体血細胞に関して、胎盤組織において同じ傾向を示す (例えば、両領域が血液細胞においてよりも胎盤組織においてよりメチル化されている); (2) 胎盤組織における隣接領域において10%未満のメチル化密度における差異を有する; および (

50

3) 母体血細胞における隣接領域において10%未満のメチル化密度における差異を有する。

【0186】

ブロック1460において、領域における、母体血細胞DNAおよび胎盤試料(例えば、CVSまたは妊娠末期胎盤組織)からの血液メチロームのメチル化密度が算出される。メチル化密度は本明細書に記載の通りに決定することができる。

【0187】

ブロック1470において、全胎盤メチル化密度および全血液メチル化密度が領域内の全ての部位について統計的に有意に異なる推定上のDMRが決定される。一実施形態では、統合された領域内の全ての適切なCpG部位が<sup>2</sup>検査を受ける。<sup>2</sup>検査により、統合された領域内の全ての適切なCpG部位間のメチル化シトシンおよび非メチル化シトシンの割合としてのメチル化シトシンの数が、母体血細胞および胎盤組織間で統計的に有意に異なるかどうかを評価された。ある実施では、<sup>2</sup>検査において、0.01以下のP値が統計的に有意に異なる見なされ得る。<sup>2</sup>検査によって有意性を示された統合されたセグメントが、推定上のDMRと見なされた。

【0188】

ブロック1480において、母体血細胞DNAのメチル化密度が高カットオフ超または低カットオフ未満であった遺伝子座が特定された。一実施形態では、母体血細胞DNAのメチル化密度が20%以下または80%以上であった遺伝子座が特定された。他の実施形態では、母体血以外の体液、例えば、限定はされないが、唾液、女性生殖器からの子宮または子宮頸部の洗浄液、涙、汗、唾液、および尿が用いられ得る。

【0189】

母体血漿における胎児特異的なDNAメチル化マーカーの開発を成功させるために重要なことは、母体血細胞のメチル化状態が、可能な限り高度にメチル化されているか、または可能な限りメチル化されていないことであり得る。これは、反対のメチル化特性を示す胎盤由来胎児DNA分子の解析に干渉する母体DNA分子を有する可能性を減少(例えば、最小化)させ得る。従って、一実施形態では、候補DMRがさらなる選別によって選択された。候補低メチル化遺伝子座は、母体血細胞において20%以下のメチル化密度を示し、胎盤組織において少なくとも20%より高いメチル化密度を有するものであった。候補高度メチル化遺伝子座は、母体血細胞において80%以上のメチル化密度を示し、胎盤組織において少なくとも20%より低いメチル化密度を有するものであった。他のパーセンテージを用いてもよい。

【0190】

ブロック1490において、次に、DMRが、差異を閾値と比較することにより、胎盤メチル化密度が血液メチル化密度と有意に異なる一部の遺伝子座の間で特定された。一実施形態では、閾値は20%であり、そのため、メチル化密度は母体血細胞のメチル化密度と少なくとも20%異なっていた。従って、それぞれの特定された遺伝子座における胎盤メチル化密度および血液メチル化密度間の差異が算出され得る。差異は単純な減算であり得る。他の実施形態では、スケーリング因子および他の関数が差異を決定するための用いられ得る(例えば、差異は単純な減算に適用された関数の結果であり得る)。

【0191】

ある実施では、この方法を用いて、11,729の高度メチル化遺伝子座および239,747の低メチル化遺伝子座が第一期胎盤試料から特定された。上から100の高度メチル化遺伝子座を付録の表S2Aに列挙する。上から100の低メチル化遺伝子座を付録の表S2Bに列挙する。表S2Aおよび表S2Bは、染色体、開始位置および終止位置、領域のサイズ、母体血におけるメチル化密度、胎盤試料におけるメチル化密度、P値(全て非常に小さい)、並びにメチル化の差異を列挙している。位置は参照ゲノムhg18に対応しており、これは、hgdownload.soe.ucsc.edu/goldenPath/hg18/chromosomesで見つけることができる。

【0192】

11,920の高度メチル化遺伝子座および204,768の低メチル化遺伝子座を第三期胎盤試料から特定した。第三期の上から100の高度メチル化遺伝子座を表S2Cに列挙し、上から100の低メチル化遺伝子座を表S2Dに列挙する。母体血細胞および第一期胎盤組織間で示差的にメチル化されていることが以前に報告された33の遺伝子座を用いて、第一期候補の列挙の妥当性を確認した。33の遺伝子座の79%が、本アルゴリズムを用いることにより、DMRであると特定された。

#### 【0193】

図15Aは、33の以前に報告された第一期マーカーを参照して第一期データを用いる、DMR特定アルゴリズムの性能を示す、表1500である。表中で、「a」は、遺伝子座1~15が(RWK Chiu et al. 2007 Am J Pathol; 170:941-950 and SSC Chim et al. 2008 Clin Chem; 54:500-511)で以前に報告されたこと；遺伝子座16~23が(KC Yuen, thesis 2007, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong)で以前に報告されたこと；および遺伝子座24~33が(EA Papageorgiou et al. 2009 Am J Pathol; 174:1609-1618)で以前に報告されたことを示している。「b」は、これらのデータが上記刊行物から得られたことを示している。「c」は、母体血細胞のメチル化密度および絨毛膜絨毛検体のメチル化密度並びにそれらの差異が、本研究で作製されたが元の研究によって提供されたゲノム座標に基づく配列決定データから観察されたことを示している。「d」は、遺伝子座に関するデータが、Chiu et al (2007), Chim et al (2008), Yuen (2007) およびPapageorgiou et al (2009)による上記刊行物を参照せずに、亜硫酸水素塩配列決定データに対する方法1400の実施形態を用いて特定されたことを示している。遺伝子座の全長は以前に報告されたゲノム領域を含んだが、概して、より大きな領域にまたがった。「e」は、候補DMRが、母体血細胞および絨毛膜絨毛検体におけるDMRの対応するゲノム座標のメチル化密度の間で、0.20超の差異を観察する必要に基づいて、真陽性(TP)または偽陽性(FN)に分類されたことを示している。

#### 【0194】

図15Bは、第三期データを用いる、分娩時に得られた胎盤試料と比較された、DMR特定アルゴリズムの性能を示す、表1550である。「a」は、図17A中の記載と同一の33の遺伝子座の列挙が用いられたことを示している。「b」は、33の遺伝子座は妊娠初期試料から以前に特定されたため、それらは第三期データに適用可能でない場合があることを示している。従って、元の研究によって提供されたゲノム座標に基づいて妊娠末期胎盤組織に関する本研究において作成された亜硫酸水素塩配列決定データが概説された。母体血細胞および妊娠末期胎盤組織間のメチル化密度における0.20超の差異は、遺伝子座が確かに第三期における真のDMRであるかどうかを決定するために用いられた。「c」は、遺伝子座に関するデータが、Chiu et al (2007), Chim et al (2008), Yuen (2007)およびPapageorgiou et al (2009)による刊行物を参照せずに、亜硫酸水素塩配列決定データに対する方法1400を用いて特定されたことを示している。遺伝子座の全長は以前に報告されたゲノム領域を含んだが、概して、より大きな領域にまたがった。「d」は、第三期における示差的なメチル化に適した遺伝子座を含有する候補DMRが、母体血細胞および妊娠末期胎盤組織におけるDMRの対応するゲノム座標のメチル化密度の間で、0.20超の差異を観察する必要に基づいて、真陽性(TP)または偽陽性(FN)に分類されたことを示している。第三期における示差的なメチル化に適していなかった遺伝子座については、DMRの列挙中のそれらの不在または該遺伝子座を含有するが0.20未満のメチル化差異を示すDMRの存在が、真の陰性(TN)DMRと見なされた。

#### 【0195】

##### B. 母体血漿配列決定データから得られるDMR

試料の胎児DNA濃度分率も既存であるならば、胎盤組織DMRを母体血漿DNAの亜硫酸水素塩配列決定データから直接的に特定できるはずである。胎盤は母体血漿中の胎児DNAの主な供給源であり得るため(SSC Chim et al. 2005 Proc Natl Acad Sci USA 102, 14753-14758)、本研究において、母体血漿中の胎児特異的DNAのメチル化状態が胎盤メチロームと相関することが示された。

10

20

30

40

50

## 【0196】

従って、胎盤試料を用いる代わりに、血漿メチロームを用いて方法1400の態様を実行して、推定胎盤メチロームを決定してもよい。従って、方法1000および方法1400を組み合わせるとDMRを決定することができる。方法1000を用いることで、胎盤メチル化特性の予測値を決定し、それらを方法1400で用いることができる。この解析において、実施例は、母体血細胞において20%以下または80%以上メチル化されていた遺伝子座にも焦点を当てている。

## 【0197】

ある実施において、母体血細胞と比較して胎盤組織において高度メチル化された遺伝子座を推定するために、母体血細胞において20%以下のメチル化、並びに血液細胞メチル化密度および予測値の間に少なくとも50%の差異を有する、予測値による60%以上のメチル化を示した遺伝子座を選び出した。母体血細胞と比較して胎盤組織において低メチル化状態の遺伝子座を推定するために、母体血細胞において80%以上のメチル化、並びに血液細胞メチル化密度および予測値の間に少なくとも50%の差異を有する、予測値による40%以下のメチル化を示した遺伝子座を選び出した。

10

## 【0198】

図16は、母体血漿亜硫酸水素塩配列決定データの直接解析に基づいて高度メチル化または低メチル化状態であると予測された遺伝子座の数を示す、表1600である。「N/A」は適用不可を意味する。「a」は、高度メチル化遺伝子座の探索が、母体血細胞において20%未満のメチル化密度を示す遺伝子座リストから開始されたことを示している。「b」は、低メチル化遺伝子座の探索が、母体血細胞において80%超のメチル化密度を示す遺伝子座リストから開始されたことを示している。「c」は、絨毛膜絨毛検体から得られた亜硫酸水素塩配列決定データが第一期母体血漿データの妥当性を検証するために用いられ、妊娠末期胎盤組織が第三期母体血漿データを検証するために用いられたことを示している。

20

## 【0199】

表1600に示すように、非侵襲的に推定された遺伝子座の大部分は、組織において予測されたメチル化パターンを示し、組織データから掘り出され先のセクションに示されたDMRと重複した。付録は血漿から特定されたDMRを収載している。表S3Aは、第一期母体血漿の亜硫酸水素塩配列決定データから高度メチル化状態であると推定された、上から100の遺伝子座を収載している。表S3Bは、第一期母体血漿の亜硫酸水素塩配列決定データから低メチル化状態であると推定された、上から100の遺伝子座を収載している。表S3Cは、第三期母体血漿の亜硫酸水素塩配列決定データから高度メチル化状態であると推定された、上から100の遺伝子座を収載している。第三期母体血漿の亜硫酸水素塩配列決定データから低メチル化状態であると推定された、上から100の遺伝子座を収載している。

30

## 【0200】

## C. 胎盤メチロームおよび胎児メチロームの妊娠性変動

CVSにおけるメチル化CpGの全割合は55%であり、一方、妊娠末期胎盤におけるメチル化CpGの全割合は59%であった(図1の表100)。より低メチル化状態のDMRは妊娠末期胎盤よりもCVSから特定され得たが、高度メチル化DMRの数はそれら2つの組織において同様であった。従って、CVSが妊娠末期胎盤よりもより低メチル化状態であることは明らかであった。この妊娠性傾向は母体血漿データにおいても明白であった。胎児特異的リード間のメチル化CpGの割合は、第一期母体血漿においては47.0%であったが、第三期母体血漿においては53.3%であった。確認された高度メチル化遺伝子座の数は、第一(1, 457遺伝子座)および第三期(1, 279遺伝子座)母体血漿試料において同様であったが、第三期試料(12, 677遺伝子座)よりも第一試料(21, 812遺伝子座)において実質的により多くの低メチル化遺伝子座が存在した(図16の表1600)。

40

## 【0201】

50

#### D. マーカーの使用

示差的にメチル化されたマーカー、またはDMRは、いくつかの態様において有用である。母体血漿中のそのようなマーカーの存在により、胎児DNAまたは胎盤DNAの存在が示され、確認される。この確認は、非侵襲的出生前検査の精度管理として用いることができる。DMRは、母体血漿中の一般的な胎児DNAマーカーとして役立ち、遺伝子多型に基づくマーカーまたはY染色体に基づくマーカー等の母親および胎児の間の遺伝子型の差異に依存するマーカーに優る利点を有し得る。DMRは、あらゆる妊娠に有用な一般的な胎児マーカーである。遺伝子多型に基づくマーカーは、胎児がその父親から該マーカーを受け継いでおり、その母親がそのゲノム内に該マーカーを保有していない、一部の妊娠にのみ適用可能である。さらに、それらのDMRに由来するDNA分子を定量化することによって、母体血漿試料中の胎児DNA濃度を測定することができる。正常妊娠に期待されるDMRの特性を知ること、母体血漿DMR特性またはメチル化特性の、正常妊娠に期待される該特性からの逸脱を観察することによって、妊娠関連合併症、特に胎盤組織変化を伴う妊娠関連合併症を、検出することができる。胎盤組織変化を伴う妊娠関連合併症としては、限定はされないが、胎児染色体異数性が挙げられる。例として、21トリソミー、子癩前症、子宮内胎児発育遅延および早産が挙げられる。

10

#### 【0202】

#### E. マーカーを用いるキット

実施形態は、本明細書に記載の方法および他の適用可能な方法を実行するための組成物およびキットを提供し得る。キットは、胎児DNA（例えば、母体血漿中の無細胞胎児DNA）を分析するアッセイを実行するために用いることができる。一実施形態では、キットは、本明細書で同定される一つまたは複数の遺伝子座との特異的なハイブリダイゼーションに有用な少なくとも一つのオリゴヌクレオチドを含み得る。キットは、一つまたは複数の参照遺伝子座との特異的なハイブリダイゼーションに有用な少なくとも一つのオリゴヌクレオチドも含み得る。一実施形態では、胎盤高度メチル化マーカーが測定される。検査座位は母体血漿中のメチル化DNAであり得、参照座位は母体血漿中のメチル化DNAであり得る。血漿中の腫瘍DNAを分析するために類似のキットを構成することができる。

20

#### 【0203】

いくつかの例において、前記キットは、標的座位（例えば、付録中の座位）および参照座位の少なくとも1区間の増幅に用いることができる少なくとも2つのオリゴヌクレオチドプライマーを含み得る。プライマーの代わりに、またはそれに追加して、キットは、標的座位および参照座位に対応するDNA断片を検出するための標識プローブを含み得る。種々の実施形態において、前記キットの一つまたは複数のオリゴヌクレオチドは、付録の表中の座位に対応している。典型的に、キットは、試験試料を分析し検査対象における生理機能または病態の状態を評価する際に使用者を手引きする取扱説明書も提供する。

30

#### 【0204】

種々の実施形態において、胎児DNAおよび胎児を妊娠している女性対象由来のDNAの混合物を含有する生物試料中の胎児DNAを分析するキットが提供される。前記キットは、表S2A、S2B、S2C、S2D、S3A、S3B、S3C、およびS3Dに収載されるゲノム領域の少なくとも一区画に特異的にハイブリダイズする一つまたは複数のオリゴヌクレオチドを含み得る。従って、これらの表全てからの、または(are)1つの表のみからのいかなる数のオリゴヌクレオチドも、用いることができる。オリゴヌクレオチドはプライマーとして機能し得、表中の特定の領域に対応するプライマー対として構築され得る。

40

#### 【0205】

#### VI. サイズおよびメチル化密度の関連性

血漿DNA分子は、短い分子の形態で循環血液中に存在することが知られており、大部分の分子は約160bpの長さを有している(YMD Lo et al. 2010 Sci Transl Med; 2: 61ra91, YW Zheng et al. 2012 Clin Chem; 58: 549-558)。興味深いことに、我々のデ

50

ータは、血漿 DNA 分子のメチル化状態およびサイズの間に関連性を明らかにした。このように、血漿 DNA 断片長は DNA メチル化レベルと関連している。血漿 DNA 分子の特徴的なサイズ特性は、大部分が、アポトーシス中の酵素的分解から生じ得るモノヌクレオソームと関連があることを示唆している。

#### 【0206】

循環 DNA は天然では断片化されている。具体的には、循環胎児 DNA は、母体血漿試料中の母体由来 DNA よりも短い (KCA Chan et al. 2004 Clin Chem; 50: 88-92)。ペアエンド (paired-end) アライメントは亜硫酸水素塩によって処理された DNA のサイズ解析を可能にするため、血漿 DNA 分子のサイズおよびそれらの各メチル化レベルの間に相関が存在するかどうかを、直接的に評価することができる。母体血漿および非妊娠成人女性の対照血漿試料においてこれを調べた。

10

#### 【0207】

本研究において各試料を解析するために、各 DNA 分子の両端に対するペアエンド配列決定 (分子全体の配列決定を含む) を用いた。各 DNA 分子の末端配列の対を参照ヒトゲノムに整列させ、配列されたリードの最末端のゲノム座標を記録することで、配列決定された DNA 分子の長さを決定することができる。血漿 DNA 分子は天然において小分子に断片化されており、血漿 DNA の配列決定ライブラリーは典型的にはいかなる断片化ステップも用いずに作成される。それ故、配列決定により推定された長さは、元の血漿 DNA 分子のサイズを表すものであった。

#### 【0208】

以前の研究において、母体血漿中の胎児 DNA 分子および母体 DNA 分子のサイズ特性を決定した (YMD Lo et al. 2010 Sci Transl Med; 2: 61ra91)。血漿 DNA 分子がモノヌクレオソームに似たサイズを有し、胎児 DNA 分子が母体 DNA 分子よりも短かったことが示された。この研究において、血漿 DNA 分子のメチル化状態のそれらのサイズに対する関連性が決定された。

20

#### 【0209】

##### A. 結果

図 17 A は、母体血漿 DNA、非妊娠女性対照血漿 DNA、胎盤 DNA および末梢血 DNA のサイズ分布を示す、プロット 1700 である。母体試料および非妊娠女性対照血漿において、これら 2 つの亜硫酸水素塩処理血漿試料は、最も豊富な 166 ~ 167 bp 長の全体配列および 143 bp よりも短い DNA 分子の 10 bp の周期性 (periodicity) を有する、先に報告された (YMD Lo et al. 2010 Sci Transl Med; 2: 61ra91) ものと同じ特徴的なサイズ分布を示した。

30

#### 【0210】

図 17 B は、母体血漿、成人女性対照血漿、胎盤組織および成人女性対照血液のサイズ分布およびメチル化特性の、プロット 1750 である。同一サイズを有し、少なくとも 1 つの CpG 部位を含有する DNA 分子について、それらの平均メチル化密度を算出した。次に、DNA 分子のサイズおよびそれらのメチル化密度の間に関連性をプロットした。具体的には、少なくとも 1 つの CpG 部位を被覆する配列決定されたリードについて、50 bp から最大 180 bp までの範囲の各断片長の平均メチル化密度を決定した。興味深いことに、メチル化密度は血漿 DNA サイズに伴って増加し、約 166 ~ 167 bp で最大となった。しかし、このパターンは、超音波処理システムを用いて断片化された胎盤 DNA 試料および対照血液 DNA 試料においては観察されなかった。

40

#### 【0211】

図 18 は、血漿 DNA 分子のメチル化密度およびサイズのプロットを示している。図 18 A は、第一期母体血漿についてのプロット 1800 である。図 18 B は、第三期母体血漿についてのプロット 1850 である。少なくとも 1 つの CpG 部位を被覆する全ての配列決定されたリードのデータは、青色の曲線 1805 で表される。胎児特異的 SNP 対立遺伝子も含有したリードのデータは、赤色の曲線 1810 で表される。母体特異的 SNP 対立遺伝子も含有したリードのデータは緑色の曲線 1815 で表される。

50

## 【0212】

胎児特異的SNP対立遺伝子を含むリードは、胎児DNA分子由来と見なした。母体特異的SNP対立遺伝子を含むリードは、母体DNA分子由来と見なした。概して、高いメチル化密度を有するDNA分子はサイズがより長かった。この傾向は、第一期および第三期の両方における胎児DNA分子および母体DNA分子の両方に現れた。胎児DNA分子の全体サイズは、先に報告された母体DNA分子の全体サイズよりも短かった。

## 【0213】

図19Aは、成人非妊娠女性の配列決定されたリードのメチル化密度およびサイズの、プロット1900を示している。成人非妊娠女性から得られた血漿DNA試料も、DNA分子のサイズおよびメチル化状態の間に同じ関連性を示した。一方、ゲノムDNA試料は、MPS解析に先立ち、超音波処理ステップによって断片化された。プロット1900に示されるように、血液細胞および胎盤組織検体から得られたデータは、同じ傾向を示さなかった。細胞の断片化は人工的であるため、サイズおよび密度の関連性は無いと予想される。血漿中の天然に断片化されたDNA分子はサイズに対する依存性を示すため、メチル化密度が低いほど、分子がより小さな断片に切断される可能性が高いと仮定することができる。

10

## 【0214】

図19Bは、母体血漿中の胎児特異的DNA分子および母体特異的DNA分子のサイズ分布およびメチル化特性を示す、プロット1950である。胎児特異的血漿DNA分子および母体特異的血漿DNA分子も、断片化サイズおよびメチル化レベルの間に同じ相関を示した。胎盤由来循環無細胞DNAおよび母体循環無細胞DNAの断片長は共に、メチル化レベルに伴って増加した。さらに、それらのメチル化状態の分布は互いに重複せず、このことは、前記現象が循環DNA分子の供給源の元の断片長にかかわらず起こることを示唆している。

20

## 【0215】

## B. 方法

従って、サイズ分布を用いることで、血漿試料の全体メチル化率を推定することができる。このメチル化測定値は次に、妊娠中、がんのモニタリング中、または図18Aおよび図18Bに示される関連性による、血漿DNAのサイズ分布の連続測定による処理中に、追跡することができる。メチル化測定値は、目的の臓器または組織からのDNA放出の増加または減少を探すことにも用いることができる。例えば、特定の臓器（例えば肝臓）に特有のDNAメチル化サインを具体的に探して、血漿中のこれらのサインの濃度を測定することができる。DNAは細胞が死ぬ際に血漿中に放出されるため、レベルの増加は、その特定の臓器または組織における細胞死または細胞傷害の増加を意味し得る。特定の臓器からのレベルの減少は、その臓器における傷害または病理過程に対抗する処置が制御下にあることを意味し得る。

30

## 【0216】

図20は、本発明の実施形態に従って、生物の生物試料中のDNAのメチル化レベルを推定するための方法2000のフローチャートである。ゲノムの特定領域またはゲノム全体のメチル化レベルを推定することができる。特定領域が望ましい場合、その特定領域のみに由来するDNA断片が用いられ得る。

40

## 【0217】

ブロック2010において、様々なサイズに対応するDNA断片の量が測定される。複数のサイズの各サイズについて、サイズに対応する生物試料由来の複数のDNA断片の量が測定され得る。例えば、140塩基長を有するDNA断片の数が測定され得る。前記量はヒストグラムとして記録され得る。一実施形態では、生物試料由来の複数個の核酸のそれぞれのサイズが測定され、その測定は、個別に（例えば、分子全体または分子の末端のみの単一分子配列決定によって）、またはまとめて（例えば、電気泳動によって）行われ得る。サイズは範囲に対応し得る。従って、量は、特定の範囲内のサイズを有するDNA

50

断片の量であり得る。ペアエンド配列決定が行われる場合、特定の領域に位置（整列）するDNA断片（ペア配列リードによって決定される）は、該領域のメチル化レベルを決定するために用いられ得る。

**【0218】**

ブロック2020において、第一パラメーターの第一の値が、複数のサイズにおけるDNA断片の量に基づいて算出される。一態様において、第一パラメーターは、生物試料中のDNA断片のサイズ特性（例えば、ヒストグラム）の統計的尺度を与える。前記パラメーターは、複数のDNA断片のサイズから決定されることから、サイズパラメーターと称され得る。

**【0219】**

第一パラメーターは様々な形態のパラメーターであり得る。あるパラメーターは、全DNA断片に対する、または別のサイズまたは範囲のDNA断片に対する、特定のサイズまたはサイズ範囲のDNA断片の割合である。そのようなパラメーターは、ヒストグラム（特定のサイズの断片の絶対計数または相対計数を与えるあらゆるデータ構造）から得られ得る、断片の総数で除算された特定のサイズのDNA断片の数である。別の例として、パラメーターは、別のサイズまたは範囲の断片の数で除算された、特定のサイズの、または特定の範囲内の断片の数であり得る。除算は、異なる試料について解析されている異なる数のDNA断片を説明するための、正規化の機能を果たし得る。正規化は、各試料について同一数のDNA断片を解析することにより達成され得、これは、解析された断片の総数での除算と同じ結果を効率的に与える。パラメーターの、およびサイズ解析についてのさらなる例は、米国特許出願公開第13/789,553号に見出すことができる（あらゆる目的で参照によって組み込まれる）。

**【0220】**

ブロック2030において、第一のサイズ値が参照サイズ値と比較される。参照サイズ値は、参照試料のDNA断片から算出することができる。参照サイズ値を決定するために、参照試料のメチル化特性が算出および定量化され、同様に、第一サイズパラメーターの値が算出および定量化され得る。このように、第一のサイズ値が参照サイズ値と比較されると、メチル化レベルが決定され得る。

**【0221】**

ブロック2040において、メチル化レベルが前記比較に基づいて推定される。一実施形態では、第一パラメーターの第一の値が参照サイズ値を超えるまたは下回るかどうか決定され、それにより、目下の試料のメチル化レベルが参照サイズ値に対するメチル化レベルを上回るかまたは下回るかどうか決定され得る。別の実施形態では、前記比較は、第一の値を校正関数に入力することにより達成される。校正関数は、第一の値に対応する曲線上の点を特定することにより、第一の値を較正值（一連の参照サイズ値）と効率的に比較することができる。次いで、推定メチル化レベルが校正関数の出力値として与えられる。

**【0222】**

従って、サイズパラメーターはメチル化レベルに合わせて校正することができる。例えば、メチル化レベルは、測定され、その試料の特定のサイズパラメーターと関連付けられ得る。次に、種々の試料からのデータポイントが校正関数に当てはめられ得る。ある実施において、異なる校正関数が、異なるDNAサブセットに用いられ得る。従って、特定のDNAサブセットのメチル化およびサイズの間の関連性に関する予備知識に基づく、いくつかの校正の形態が存在し得る。例えば、胎児DNAおよび母体DNAの校正は異なり得る。

**【0223】**

上記に示したように、胎盤は母体血と比較してより低メチル化状態であるため、胎児DNAは、そのより低度のメチル化のために、より小さい。従って、試料の断片の平均サイズ（または他の統計値）を用いることで、メチル化密度を推定することができる。断片サイズは、技術的により複雑であり得るメチル化認識配列決定ではなく、ペアエンド配列決

10

20

30

40

50

定を用いて測定することができるため、このアプローチは、臨床に用いた場合に対費用効果が高い可能性がある。このアプローチは、妊娠の進行に伴う、または子癇前症、早産および胎児障害（例えば、染色体もしくは遺伝子異常または子宮内胎児発育遅延によって引き起こされる障害）等の妊娠関連疾患と関連する、メチル化変化をモニタリングするために用いることができる。

#### 【0224】

別の実施形態では、このアプローチは、がんの検出およびモニタリングに用いることができる。例えば、がんの治療が成功することで、このサイズに基づくアプローチを用いて測定される血漿または別の体液におけるメチル化特性は、がんを有さない健常人のそれに向かって変化するだろう。逆に、がんが進行中である場合は、血漿または別の体液におけるメチル化特性は、がんを有さない健常人のそれから逸脱するだろう。

10

#### 【0225】

要約すると、低メチル化分子は、血漿中で高度メチル化分子よりも短かった。胎児DNA分子および母体DNA分子の両方において同じ傾向が観察された。DNAメチル化ヌクレオソームの詰め込みに影響を与えることが知られていることから、我々のデータは、恐らく低メチル化DNA分子にはより低密度にヒストンが詰め込まれており、そのために、酵素的分解の影響をより受け易いことを示唆している。一方、図18Aおよび図18Bに示されるデータにより、胎児DNAが母体リードよりもはるかに低メチル化状態であるにもかかわらず、胎児DNAおよび母体DNAのサイズ分布は互いから完全には分離しないことも示された。図19Bにおいて、同じサイズ分類であっても、胎児特異的リードおよび母体特異的リードのメチル化レベルは互いに異なることを理解することができる。この観察は、胎児DNAの低メチル化状態が、母体DNAに対するその相対的な短さを説明する唯一の因子ではないことを示唆している。

20

#### 【0226】

##### VII. 遺伝子座の刷り込み状態

母体血漿中の母親と同じ遺伝子型を共有するが異なるエピジェネティックサインを有する胎児由来DNA分子は、検出が可能である (LLM Poon et al. 2002 Clin Chem; 48: 35-41)。配列決定アプローチが母体血漿中の胎児由来DNA分子の捕捉において感度が高いことを示すために、同じ戦略を、母体血漿試料中の刷り込み胎児対立遺伝子の検出に適用した。2つのゲノム刷り込み領域が特定された：H19 (11番染色体：1, 977, 419 ~ 1, 977, 821、NCBI Build 36/hg18) およびMEST (7番染色体：129, 917, 976 ~ 129, 920, 347、NCBI Build 36/hg18)。それらは共に、母体配列および胎児配列を区別するための有益なSNPを含有している。母体で発現される遺伝子であるH19に関して、領域内のSNP rs2071094 (11番染色体：1, 977, 740) について、母親はホモ接合性 (A/A) であり、胎児はヘテロ接合性 (A/C) であった。A母体対立遺伝子の一方は十分にメチル化されており、他方は非メチル化状態であった。しかし、胎盤においては、対立遺伝子Aは非メチル化状態であったが、一方、父親から遺伝したC対立遺伝子は十分にメチル化されていた。胎盤由来の刷り込まれた父性対立遺伝子に対応するC遺伝子型を有する2つのメチル化リードを母体血漿中で検出した。

30

40

#### 【0227】

MESTは、PEG1としても知られており、これは父親性発現遺伝子である。母親および胎児の両方が、刷り込み遺伝子座内のSNP rs2301335 (7番染色体：129, 920, 062) についてヘテロ接合性 (A/G) であった。母体血において、G対立遺伝子はメチル化されていたが、A対立遺伝子は非メチル化状態であった。胎盤におけるメチル化パターンは逆転しており、母性A対立遺伝子はメチル化され、父性G対立遺伝子は非メチル化状態であった。父親由来の3つの非メチル化状態のG対立遺伝子は、母体血漿中で検出可能であった。対照的に、19番染色体上の非刷り込み遺伝子座 (19番染色体：6, 723, 621 - 6, 724, 121) であるVAV1は、組織および血漿DNA試料においていかなる対立遺伝子メチル化パターンも示さなかった。

50

## 【0228】

従って、メチル化状態は、どのDNA断片が胎児由来であるかを決定するのに用いることができる。例えば、母体血漿中のA対立遺伝子の検出だけでは、母親がGAヘテロ接合性である場合に、胎児マーカーとして用いることができない。しかし、血漿中のA分子のメチル化状態を識別する場合、メチル化されたA分子は胎児特異的であり、一方非メチル化状態のA分子は母体特異的であり、あるいは逆も同じである。

## 【0229】

次に、胎盤組織においてゲノム刷り込みを示すことが報告されている遺伝子座に焦点を当てた。Woodfine et al.(2011 Epigenetics Chromatin; 4: 1)によって報告された遺伝子座のリストに基づいて、刷り込み制御領域内でSNPを含有していた遺伝子座をさらに選別した。4つの遺伝子座が判定基準を満たし、これらは、H19、KCNQ10T1、MESTおよびNESPであった。

10

## 【0230】

H19およびKCNQ10T1の母体血細胞試料のリードに関して、これらの母体リードは、SNPについてホモ接合性であり、メチル化リードおよび非メチル化リードはおおよそ等しい割合であった。CVSおよび妊娠末期胎盤組織検体によって、胎児が両方の遺伝子座についてヘテロ接合性であり、各対立遺伝子が排他的にメチル化または非メチル化状態である、すなわち単一对立遺伝子性メチル化を示すことが明らかになった。母体血漿試料において、父親から遺伝された胎児DNA分子が両方の遺伝子座において検出された。H19において、父親から遺伝された分子は、胎児特異的対立遺伝子を含有していた配列決定されたリードによって表され、メチル化されていた。KCNQ10T1において、父親から遺伝された分子は、胎児特異的対立遺伝子を含有していた配列決定されたリードによって表され、非メチル化状態であった。

20

## 【0231】

一方、母親はMESTおよびNESPの両方についてヘテロ接合性であった。MESTに関して、母親および胎児の両方がSNPについてGAヘテロ接合体であった。しかし、母体血細胞および胎盤組織のワトソン鎖のデータから明らかのように、SNPに隣接したCpGのメチル化状態は母親および胎児において反対であった。A対立遺伝子は母親のDNAにおいて非メチル化状態であったが、胎児のDNAにおいてはメチル化されていた。MESTに関して、母性対立遺伝子はメチル化されていた。従って、胎児はその母親から遺伝されたA対立遺伝子(CVSにおいてメチル化状態)を有しており、その母親は彼女の父親から遺伝されたA対立遺伝子(母体血細胞において非メチル化状態)を有していたことを特定することができる。興味深いことに、母体血漿試料において、4つ全ての分子群は容易に区別することができた(例えば、母親の2つの対立遺伝子のそれぞれおよび胎児の2つの対立遺伝子のそれぞれ)。従って、遺伝子型情報を刷り込み遺伝子座におけるメチル化状態と組み合わせることにより、母親から遺伝された胎児DNA分子をバックグラウンド母体DNA分子から容易に区別することができた(LLM Poon et al. 2002 Clin Chem; 48: 35-41)。

30

## 【0232】

このアプローチは片親性ダイソミーを検出するのに用いることができる。例えば、この胎児の父親がG対立遺伝子についてホモ接合性であることが分かっている場合、非メチル化状態のG対立遺伝子が母体血漿中に検出できないことは、父性対立遺伝子の寄与の欠如を示している。さらに、そのような状況下で、メチル化されたG対立遺伝子およびメチル化されたA対立遺伝子の両方がこの妊娠女性の血漿中に検出された場合、胎児が母親由来のヘテロダイソミー(heterodisomy)を有していること、すなわち、父親から遺伝はされずに母親から2つの異なる対立遺伝子を受け継いでいることが示唆される。あるいは、メチル化状態のA対立遺伝子(母親から受け継いだ胎児性対立遺伝子)および非メチル化状態のA対立遺伝子(母方の祖父から受け継いだ母性対立遺伝子)の両方が、非メチル化状態のG対立遺伝子(胎児に遺伝されているはずの父性対立遺伝子)無しで、母体血漿中に検出された場合、胎児が母親由来のイソダイソミー(isodisomy)を有すること、すなわ

40

50

ち、母親から2つの同一の対立遺伝子を受け継ぎ、父親からは何も受け継いでいないことが示唆される。

【0233】

NESPに関して、母親はSNPにおいてGAヘテロ接合体であり、一方、胎児はG対立遺伝子についてホモ接合体であった。NESPにおいて、父性対立遺伝子はメチル化されていた。母体血漿試料において、メチル化状態の、父親から遺伝された胎児性G対立遺伝子は、非メチル化状態のバックグラウンド母性G対立遺伝子から容易に区別することができた。

【0234】

VIII. がん/供与者

いくつかの実施形態は、循環血漿/血清DNAのメチル化解析を用いたがんの検出、検診、モニタリング（例えば、再発、軽快、または治療に対する応答（例えば、存在または不在）の）、病期分類、分類（例えば、最も適切な治療法の選択を助けるための）および予後判定に、用いることができる。

【0235】

がんDNAは異常なDNAメチル化を示すことが知られている（JG Herman et al. 2003 N Engl J Med; 349: 2042-2054）。例えば、非がん細胞と比較して、遺伝子（例えば、腫瘍抑制遺伝子）のCG島プロモーターは高度メチル化されているが、その遺伝子本体のCpG部位は低メチル化状態である。がん細胞のメチル化特性が、本明細書に記載の方法を用いて、腫瘍由来血漿DNA分子のメチル化特性に反映され得る場合、血漿における全体的なメチル化特性は、がんを有さない健常人と比較した場合に、またはがんが治癒されている者と比較した場合に、がんを有する個体間で異なるであろうことが予想される。メチル化特性における差異の種類は、ゲノムのメチル化密度および/またはゲノムの区画のメチル化密度における定量的差異に関してであり得る。例えば、がん組織由来のDNAの普遍的な低メチル化性質（Gama-Sosa MA et al. 1983 Nucleic Acids Res; 11: 6883-6894）から、血漿メチロームまたはゲノムの区画におけるメチル化密度の減少が、がん患者の血漿において観察されるだろう。

【0236】

メチル化特性における定量的変化は、血漿メチロームデータ間でも反映されるはずである。例えば、がん細胞においてのみ高度メチル化されている遺伝子に由来する血漿DNA分子は、同一遺伝子に由来するが健常対照の試料中の血漿DNA分子と比較した場合に、がん患者の血漿において高度メチル化を示すであろう。異常なメチル化は大部分のがんにおいて生じているため、本明細書に記載の方法は、異常なメチル化を有するあらゆる形態の悪性腫瘍、例えば、限定はされないが、肺、乳房、結腸直腸、前立腺、鼻咽頭、胃、精巣、皮膚、神経系、骨、卵巣、肝臓、血液系組織、膵臓、子宮、腎臓、膀胱、リンパ組織等における悪性腫瘍の検出に適用することができる。悪性腫瘍は、例えば、癌腫、腺癌、肉腫、線維腺癌、神経内分泌、および未分化癌等の、種々の組織学的亜型の悪性腫瘍であってもよい。

【0237】

一方、腫瘍由来DNA分子はバックグラウンド非腫瘍由来DNA分子から区別することができるが、それは、腫瘍由来DNAの全体的に短いサイズ特性が、DNA分子のサイズに対してさらなる影響を及ぼすであろう、腫瘍関連性の異常な低メチル化を有する遺伝子座由来のDNA分子において強調されるためである。また、腫瘍由来血漿DNA分子は、腫瘍DNAに関連する複数の特性、例えば、限定はされないが、単一ヌクレオチド変異、コピー数の増加および減少、転座、逆位、異常な高度または低度メチル化並びにサイズ特性を用いて、バックグラウンド非腫瘍由来血漿DNA分子から区別することができる。これらの変化は全て独立して起こり得るため、これらの特徴の併用は、血漿中のがんDNAの高感度且つ特異的な検出のための、さらなる利点を与え得る。

【0238】

A. サイズおよびがん

血漿中の腫瘍由来DNA分子のサイズはまた、モノヌクレオソーム単位のサイズに似ており、がん患者の血漿中に同時に存在しているバックグラウンド非腫瘍由来DNA分子よりも短い。サイズパラメーターは、米国特許出願公開第13/789,553号(あらゆる目的で参照によって組み込まれる)に記載されているように、がんに関連があることが示されている。

#### 【0239】

血漿中の胎児由来DNAおよび母体由来DNAの両方が分子のサイズおよびメチル化状態の間に関連性を示したことから、腫瘍由来DNA分子は同じ傾向を示すことが予想される。例えば、低メチル化分子は、がん患者の血漿またはがん検査を受ける対象において、高度メチル化分子よりも短いだろう。

10

#### 【0240】

##### B. がん患者における様々な組織のメチル化密度

この例において、肝細胞癌(HCC)患者の血漿および組織試料を解析した。腫瘍の外科的切除の前、およびその1週間後にHCC患者から血液試料を採取した。血液試料の遠心分離後に血漿および軟膜を収集した。切除腫瘍および隣接非腫瘍性肝組織を採取した。血漿および組織試料から抽出したDNA試料を、事前の亜硫酸水素塩処理有りおよび無しの大規模並列配列決定を用いて解析した。がんを有さない4人の健常人から得られた血漿DNAも、対照として解析した。DNA試料の亜硫酸水素塩処理により、非メチル化シトシン残基はウラシルに変換される。下流のポリメラーゼ連鎖反応および配列決定において、これらのウラシル残基はチミジンとして振る舞う。一方、亜硫酸水素塩処理によってメチル化シトシン残基がウラシルに変換されない。大規模並列配列決定の後、配列決定リードをMethy-Pipeを用いて解析して(P Jiang, et al. Methy-Pipe: An integrated bioinformatics data analysis pipeline for whole genome methylome analysis, paper presented at the IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine Workshops, Hong Kong, 18 to 21 December 2010)、全てのCGジヌクレオチド位置(すなわち、CpG部位)におけるシトシン残基のメチル化状態を決定した。

20

#### 【0241】

図21Aは、HCC患者の手術前血漿および組織試料のメチル化密度を示す表2100である。目的領域(例えば、CpG部位、プロモーター、または反復領域等)のCpGメチル化密度は、ゲノムのCpGジヌクレオチドを被覆するリードの総数に対するCpGメチル化を示すリードの割合を指す。軟膜および非腫瘍性肝組織のメチル化密度は同様であった。全ての常染色体から得られるデータに基づく腫瘍組織の全体メチル化密度は、軟膜および非腫瘍性肝組織のそれよりも25%より低かった。低メチル化は個々の染色体全てにおいて一貫していた。血漿のメチル化密度は非悪性組織およびがん組織の値の間であった。この観察は、がん組織および非がん組織の両方ががん患者の循環DNAに寄与しているという事実と一致している。造血系が、活性な悪性状態を有さない個体における循環DNAの主な供給源であることも示されている(YYN Lui, et al. 2002 Clin Chem; 48: 421-7)。従って、4人の健常対照群から得られた血漿試料も解析した。試料ごとに達成された配列リードの数および配列決定深度を図21Bの表2150に示す。

30

#### 【0242】

図22は、常染色体におけるメチル化密度が健常対照群の血漿試料において71.2%~72.5%の範囲であったことを示す、表220である。これらのデータにより、腫瘍DNAの供給源を有さない個体から得られた血漿試料中のDNAメチル化の予測レベルが示された。がん患者においては、腫瘍組織も血行中にDNAを放出する(KCA Chan et al. 2013 Clin Chem; 59: 211-224); RJ Leary et al. 2012 Sci Transl Med; 4: 162ra154)。HCC腫瘍の低メチル化性質のために、患者の手術前血漿中の腫瘍由来DNAおよび非腫瘍由来DNAの両方の存在は、健常対照群の血漿内レベルと比較した場合のメチル化密度の減少をもたらす。実際に、手術前血漿試料のメチル化密度は、腫瘍組織のメチル化密度および健常対照群の血漿のメチル化密度の間であった。その理由は、がん患者の血漿DNAのメチル化レベルが、腫瘍組織の異常なメチル化の程度(この場合は低メチル化)

40

50

および循環血液中の腫瘍由来DNAの濃度分率によって影響を受けるためである。腫瘍組織のより低いメチル化密度および循環血液中の腫瘍由来DNAのより高い濃度分率は、がん患者における血漿DNAのより低いメチル化密度をもたらす。大部分の腫瘍は、全体的な低メチル化を示すことが報告されている(JG Herman et al. 2003 N Engl J Med; 349: 2042-2054; MA Gama-Sosa et al. 1983 Nucleic Acids Res; 11: 6883-6894)。従って、HCC試料において見られる現在の知見は、他の型の腫瘍にも適用可能なはずである。

#### 【0243】

一実施形態では、血漿DNAのメチル化密度を用いることで、腫瘍組織のメチル化レベルが既知である場合に血漿/血清試料中の腫瘍由来DNAの濃度分率を決定することができる。腫瘍組織のメチル化レベル(例えば、メチル化密度)は、腫瘍試料が入手可能である、または腫瘍の生検が入手可能である場合に得ることができる。別の実施形態では、腫瘍組織のメチル化レベルに関する情報は、類似の型の腫瘍群におけるメチル化レベルの調査から得ることができ、この情報(例えば、平均レベルまたはレベル中央値)は、本発明に記載の科学技術を用いて解析される患者に適用される。腫瘍組織のメチル化レベルは、患者の腫瘍組織の解析によって決定、または、同一もしくは類似のがん型を有する他の患者の腫瘍組織の解析から推測することができる。腫瘍組織のメチル化は、一連のメチル化認識プラットフォーム、例えば、限定はされないが、大規模並列配列決定、単一分子配列決定、マイクロアレイ(例えば、オリゴヌクレオチドアレイ)、または質量分析(例えば、Epityper解析、シクアノム社(Sequenom, Inc.))を用いて決定することができる。いくつかの実施形態において、そのような解析は、DNA分子のメチル化状態に敏感な手順、例えば、限定はされないが、シトシン免疫沈降およびメチル化認識制限酵素消化に先行され得る。腫瘍のメチル化レベルが既知である場合、がん患者の血漿中の腫瘍DNAの濃度分率は、血漿メチローム解析後に算出することができる。

#### 【0244】

血漿メチル化レベル(P)、腫瘍DNA濃度分率(f)、および腫瘍組織メチル化レベル(TUM)の間の関連性は、 $P = BKG \times (1 - f) + TUM \times f$ として記載することができる。式中、BKGは血液細胞および他の内部臓器由来の血漿中のバックグラウンドDNAメチル化レベルである。例えば、全常染色体の全体メチル化密度は、このHCC患者から得られた腫瘍生検組織において(すなわち、この場合はTUM値)、42.9%であることが示された。4人の健常対照群から得られた血漿試料の平均メチル化密度(すなわち、この場合はBKG値)は71.6%であった。手術前血漿の血漿メチル化密度は59.7%であった。これらの値を用いて、fは41.5%であると推定される。

#### 【0245】

別の実施形態では、腫瘍組織のメチル化レベルは、血漿試料中の腫瘍由来DNAの濃度分率が既知である場合、血漿メチロームデータに基づいて、非侵襲的に推定することができる。血漿試料中の腫瘍由来DNAの濃度分率は、他の遺伝子解析、例えば、前述(米国特許出願公開第13/308,473号; KCA Chan et al. 2013 Clin Chem; 59: 211-24)の、対立遺伝子欠失(GAAL)のゲノムワイド解析および単一ヌクレオチド変異の解析によって、決定することができる。計算は、本実施形態では、fの値が既知でありTUMの値が未知となる以外は同一の、上記の関連性に基づく。推定は、母体血漿データから胎盤組織メチル化レベルを決定する状況において観察されたデータと同様に、全ゲノムに対して、またはゲノムの部分に対して、行うことができる。

#### 【0246】

別の実施形態では、がんを有する対象とがんを有さない対象を区別するために、メチル化密度のビン内変動または特性を利用することができる。メチル化解析の分解能は、ゲノムを特定のサイズ(例えば、1Mb)のビンに分割することによってさらに増加することができる。そのような実施形態において、各1Mbのbinのメチル化密度は、採取された試料、例えば、軟膜、切除されたHCC組織、腫瘍に隣接する非腫瘍性肝組織および腫瘍切除の前および後に採取された血漿について算出された。別の実施形態では、ビンのサイズは一定でなくてもよい。ある実施において、ビンそれ自体はサイズにおいて異なり得

10

20

30

40

50

るが、CpG部位の数は各ピン内で一定である。

【0247】

図23Aおよび図23Bは、HCC患者の軟膜、腫瘍組織、非腫瘍性肝組織、手術前血漿および手術後血漿のメチル化密度を示している。図23Aは、1番染色体における結果のプロット2300である。図23Bは、2番染色体における結果のプロット2350である。

【0248】

1Mbウィンドウの大部分において、軟膜および腫瘍に隣接する非腫瘍性肝組織のメチル化密度は同様であったが、一方、腫瘍組織のメチル化密度はより低かった。手術前血漿のメチル化密度は、腫瘍組織および非悪性組織のメチル化密度の間である。腫瘍組織内の照合ゲノム領域のメチル化密度は、手術前血漿のメチル化データおよび腫瘍DNA濃度分率を用いて推定することができる。前記方法は、全ての常染色体のメチル化密度値を用いる上記と同じである。記載された腫瘍メチル化の推定は、このより高い分解能の血漿DNAメチル化データを用いて行うこともできる。300kb、500kb、2Mb、3Mb、5Mbまたは5Mb超等の他のピンのサイズを用いることもできる。一実施形態では、ピンのサイズは一定でなくてもよい。ある実施において、ピンそれ自体はサイズにおいて異なり得るが、CpG部位の数は各ピン内で一定である。

【0249】

C. がん患者および健常人の間の血漿メチル化密度の比較

2100に示されるように、手術前血漿DNAのメチル化密度は、がん患者における非悪性組織のメチル化密度よりも低かった。これは、低メチル化状態であった腫瘍組織由来DNAの存在が原因であり得る。このより低い血漿DNAメチル化密度は、潜在的に、がんの検出用およびモニタリング用の生物マーカーとして用いることができる。がんのモニタリングにおいて、がんが進行中である場合、血漿中のがん由来DNAの量の経時的な増加が起こる。この例において、血漿中の循環がん由来DNAの量の増加は、ゲノムワイドなレベルでの血漿DNAメチル化密度におけるさらなる減少に繋がる。

【0250】

逆に、がんが治療に応答している場合、血漿中のがん由来DNAの量は経時的に減少する。この例において、血漿中のがん由来DNAの量の減少は、血漿DNAメチル化密度の増加に繋がる。例えば、上皮増殖因子受容体変異を有する肺がん患者が標的療法（例えば、チロシンキナーゼ阻害）によって処置されている場合、血漿DNAメチル化密度の増加は応答を示すものである。その後、チロシンキナーゼ阻害耐性の腫瘍クローンの発生は、再発を示す血漿DNAメチル化密度の減少と関連している。

【0251】

血漿メチル化密度測定は連続的に行うことができ、そのような測定値の変化率は、算出して、臨床上の進行または軽快または予後を予測または関連付けに用いることができる。がん組織においては高度メチル化状態であるが正常組織においては低メチル化状態である選択されたゲノム遺伝子座（例えば、いくつかの腫瘍抑制遺伝子のプロモーター領域）において、がんの進行および処置への好ましい応答の間の関連性は、上記のパターンと反対である。

【0252】

このアプローチが実行可能であることを示すため、腫瘍の外科的切除の前および後にがん患者から採取した血漿試料のDNAメチル化密度を、4人の健常な対照患者から得た血漿DNAと比較した。

【0253】

表2200は、がん患者の手術前および手術後の血漿試料の全ての、並びに4人の健常対照患者の、各常染色体のDNAメチル化密度および常染色体の値の組み合わせを示している。全ての染色体において、手術前血漿DNA試料のメチル化密度は、手術後試料および4人の健常対象から得た血漿試料のメチル化密度よりも低かった。手術前試料および手術後試料の間の血漿DNAメチル化密度における差異により、手術前血漿試料における

10

20

30

40

50

より低いメチル化密度がHCC腫瘍由来のDNAの存在が原因であったという、裏付けになる証拠が得られる。

【0254】

手術後血漿試料におけるDNAメチル化密度の、健常対照群の血漿試料と同様のレベルへの回復によって、腫瘍由来DNAの大部分が供給源（すなわち、腫瘍）の外科的切除により消失したことが示唆された。これらのデータは、巨大なゲノム領域（例えば、全常染色体または個々の染色体）から入手できるデータを用いて決定される手術前血漿のメチル化密度が、健常対照群のメチル化レベルよりも低いメチル化レベルであり、これにより、がんを有する検査症例の同定（すなわち、診断または検診）が可能であることを示唆している。

10

【0255】

手術後血漿のメチル化レベルよりもさらにより低いメチル化レベルが、血漿メチル化レベルが腫瘍量をモニターし、それにより患者におけるがんの進行を予後判定およびモニターするのにも利用することができることも、手術前血漿のデータによって示された。参照値は、健常対照群またはがんのリスクがあるが現在はがんを有していない者の血漿から決定することができる。HCCのリスクがある者には、慢性B型またはC型肝炎感染を有する者、ヘモクロマトーシスを有する者、および肝硬変を有する者が含まれる。

【0256】

基準値に基づく既定のカットオフを超える（例えば、より低い）血漿メチル化密度値は、非妊娠女性の血漿が腫瘍DNAを有しているかどうかを評価するのに用いることができる。低メチル化状態の循環腫瘍DNAの存在を検出するため、カットオフは、対照集団の値の5もしくは1パーセントよりも低く、または対照の平均メチル化密度値より低い標準偏差の数、例えば、2もしくは3の標準偏差（SD）に基づいて、または中央値倍数（MOM）の決定に基づいて、定義され得る。高度メチル化状態の腫瘍DNAについては、カットオフは、対照集団の値の95もしくは99パーセントよりも高く、または対照の平均メチル化密度値を超える標準偏差の数、例えば、2もしくは3のSDに基づいて、または中央値倍数（MOM）の決定に基づいて、定義され得る。一実施形態では、対照集団は、検査対象と年齢が一致している。年齢の一致は厳密でなくてもよく、年齢帯（例えば、35歳の検査対象に対して、30～40歳）において行われ得る。

20

【0257】

次に、がん患者および4人の対照患者の血漿試料間で、1Mbのピンのメチル化密度を比較した。図示するために、1番染色体の結果を示す。

30

【0258】

図24Aは、HCC患者から得た手術前血漿のメチル化密度を示すプロット2400である。図24Bは、HCC患者から得た手術後血漿のメチル化密度を示すプロット2450である。青色のドットは対照患者の結果を表し、赤色のドットはHCC患者の血漿試料の結果を表す。

【0259】

図24Aに示すように、HCC患者から得た手術前血漿のメチル化密度は、大部分のピンにおいて、対照患者のそれよりも低かった。類似のパターンが他の染色体において観察された。図24Bに示すように、HCC患者から得た手術後血漿のメチル化密度は、大部分のピンにおいて、対照患者のそれと同様であった。類似のパターンが他の染色体において観察された。

40

【0260】

検査対象ががんを有しているかどうかを評価するために、検査対象の結果を参照群の値と比較した。一実施形態では、参照群はいくつかの健常対象から成る。別の実施形態では、参照群は、非悪性状態（例えば、慢性B型肝炎感染または肝硬変）を有する対象から成り得る。検査対象および参照群間のメチル化密度における差異が次に定量化され得る。

【0261】

一実施形態では、参照範囲は対照群の値から得ることができる。次に、参照群の上限ま

50

たは下限からの検査対象の結果における逸脱が、該対象が腫瘍を有するかどうかを決定するために用いられ得る。この量は、血漿中の腫瘍由来DNAの濃度分率並びに悪性組織および非悪性組織間のメチル化レベルにおける差異によって影響を受ける。血漿中の腫瘍由来DNAの濃度分率がより高いほど、検査血漿試料および対照の間により大きなメチル化密度の差異をもたらす。悪性組織および非悪性組織のメチル化レベルにおける差異のより大きいな程度は、検査血漿試料および対照間のより大きなメチル化密度の差異にも関連する。さらに別の実施形態では、様々な参照群が様々な年齢範囲の検査対象に対して選ばれた。

#### 【0262】

別の実施形態では、4人の対照患者のメチル化密度の平均値およびSDが、各1Mbピンについて算出された。次に、対応するピンについて、HCC患者およびのメチル化密度および対照患者の平均値の間の差異が算出された。一実施形態では、次に、この差異が対応するピンのSDで除算されて、Z値が決定された。言い換えれば、Z値は、対照患者の平均値からのSDの数として表される、検査血漿試料および対照血漿試料の間のメチル化密度の差異を表す。ピンの3より大きいZ値は、HCC患者の血漿DNAが、そのピンにおいて3より大きなSDだけ対照患者よりもより高度なメチル化状態であることを示しており、一方、ピンの-3未満のZ値は、HCC患者の血漿DNAがそのピンにおいて3より大きなSDだけ対照患者よりもより低メチル化状態であることを示している。

10

#### 【0263】

図25Aおよび図25Bは、1番染色体の参照として4人の健常対照患者の血漿メチロームデータを用いた、HCC患者の手術前(プロット2500)および手術後(プロット2550)の血漿試料の血漿DNAメチル化密度のZ値を示している。各ドットは、1つの1Mbピンの結果を表している。黒色ドットは、-3~3のZ値を有するピンを表している。赤色ドットは-3未満のZ値を有するピンを表している。

20

#### 【0264】

図26Aは、手術前血漿および手術後血漿のZ値のデータを示す、表2600である。手術前血漿試料における1番染色体上のピンの大部分(80.9%)は-3未満のZ値を有していたが、これは、HCC患者の手術前血漿DNAが対照患者の手術前血漿DNAよりも有意により低いメチル化状態であったことを示している。その反対に、赤色ドットの数(手術後血漿試料において実質的に減少した(1番染色体上のピンの8.3%))が、これは、腫瘍DNAの大部分が循環腫瘍DNAの供給源が外科的切除されたために血行から除去されたことを示唆している。

30

#### 【0265】

図26Bは、全常染色体から解析された1Mbピンの参照として4人の健常対照患者を用いた、HCC患者の手術前血漿試料および手術後血漿試料の血漿DNAメチル化密度のZ値を示すCircosプロット2620である。最外側の環は、ヒト常染色体の記号を示している。中央の環は、手術前血漿試料のデータを示している。最内側の環は、手術後血漿試料のデータを示している。各ドットは、1つの1Mbピンの結果を表している。黒色ドットは、-3~3のZ値を有するピンを表している。赤色ドットは、-3未満のZ値を有するピンを表している。緑色ドットは、3超のZ値を有するピンを表している。

40

#### 【0266】

図26Cは、HCC患者の手術前血漿試料および手術後血漿試料の両方における全ゲノムの1MbピンのZ値の分布を示す、表2640である。結果は、HCC患者の手術前血漿DNAが、全ゲノムにおける領域の大部分(1Mbピンの85.2%)において、対照の手術前血漿DNAよりもより低いメチル化状態であったことを示している。それとは反対に、手術後血漿試料における領域の大部分(1Mbピンの93.5%)は、対照と比較して、有意な高度メチル化または低メチル化を示さなかった。これらのデータは、このHCCの天然において主に低メチル化状態である腫瘍DNAの大部分が、手術後血漿試料中に存在していなかったことを示している。

#### 【0267】

50

一実施形態では、-3未満のZ値を有するピンの数、割合または比率は、がんが存在するかどうかを示すために用いることができる。例えば、表2640に示されるように、解析された2734のbinのうち2330(85.2%)が手術前血漿において-3未満のZ値を示したが、解析された2734のピンのうち171のみ(6.3%)が手術後血漿において-3未満のZ値を示した。前記データは、手術前血漿中の腫瘍DNA量が手術後血漿中の腫瘍DNA量よりもかなり大きかったことを示している。

#### 【0268】

ピンの数のカットオフ値は、統計手法を用いて決定され得る。例えば、ピンのおよそ0.15%は、正常分布に基づいて-3未満のZ値を有することが予測される。従って、ピンのカットオフ数は解析されているピンの総数の0.15%であり得る。言い換えれば、非妊娠個体から得られた血漿試料が0.15%よりも多い、-3未満のZ値を有するピンを示す場合、血漿中の低メチル化DNAの供給源、すなわち、がんが存在する。例えば、この例において解析された2734の1Mbピンのうちの0.15%は、約4のピンである。この値をカットオフとして用いると、手術前血漿試料および手術後血漿試料の両方が低メチル化腫瘍由来DNAを含有していたが、その量は、手術後血漿試料よりも、手術前血漿試料においてかなり多かった。4人の健常対照患者において、いずれのピンも、有意な高度メチル化または低メチル化を示さなかった。他のカットオフ値(例えば、1.1%)を用いることもでき、用いられるアッセイの要求に応じて異なり得る。他の例として、カットオフ率は、統計分布、並びに所望の感度および許容できる特異度に応じて異なり得る。

10

20

#### 【0269】

別の実施形態では、カットオフ値は、幾人かのがん患者およびがんを有さない個体を解析することによる受信者動作特性(ROC)曲線解析によって、決定され得る。このアプローチの特異度をさらに確認するために、非悪性状態(C06)の診察を求める患者から得られた血漿試料を解析した。ピンの1.1%が-3未満のZ値を有していた。一実施形態では、様々なレベルの疾病状態を分類するために、様々な閾値が用いられ得る。より低い閾値率を用いることで良性症状から健常状態を区別することができ、より高い閾値率を用いることで悪性腫瘍から良性症状を区別することができる。

#### 【0270】

大規模並列配列決定を用いる血漿低メチル化解析の診断能は、特定クラスの反復領域(例えば、長鎖散在反復配列-1(LINE-1))のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に基づく増幅を用いて得られるそれよりも優れていると思われる(P Tangkijvanich et al. 2007 Clin Chim Acta; 379:127-133)。この所見の1つの可能な説明は、低メチル化は腫瘍ゲノムの広範にわたるが、ゲノム領域毎にある程度の不均一性を有するということである。

30

#### 【0271】

実際に、参照対象の平均血漿メチル化密度がゲノム全域で異なることが観察された(図56)。図56中の赤色ドットのそれぞれは、32人の健常対象間の、1つの1Mbピンの平均メチル化密度を示している。プロットは、ゲノム全域で解析された全ての1Mbピンを示している。各ボックス内の数字は染色体数を表している。平均メチル化密度がピン毎に異なることが観察された。

40

#### 【0272】

単純なPCRに基づくアッセイは、そのような領域毎の不均一性をその診断アルゴリズムの考慮に入れることができないだろう。そのような不均一性は、健常人の間に観察されるメチル化密度の範囲を広げる。メチル化密度のより大規模な減少は、低メチル化を示すと見なされる試料に必要とされる。これは、検査感度の減少をもたらす。

#### 【0273】

対照的に、大規模並列配列決定に基づくアプローチでは、ゲノムが1Mbピン(または他のサイズのピン)に分割され、そのようなピンのメチル化密度が個々に測定される。このアプローチは、異なるゲノム領域にわたるベースラインメチル化密度における変動の影

50

響を減少させるが、これはそのような領域が試験試料および対照間で比較されるためである。実際に、同じビン内で、32人の健常対照群間の個人間変動は比較的小さかった。ビンの95%は、32人の健常対照群間で1.8%以下の変動係数(CV)を有していた。なお、がんに関連する低メチル化の検出感度をさらに増強するため、比較を複数のゲノム領域にわたって行うことができる。ただ1つの領域が検査された時にがん試料が特定領域における低メチル化を偶然示さない場合の生物学的変動の影響から保護されることから、感度は複数のゲノム領域を検査することにより増強されであろう。

#### 【0274】

対照および試験試料間の対応するゲノム領域のメチル化密度を比較し(例えば、各ゲノム領域を別々に検査し、次にかかる結果を組み合わせる)、複数のゲノム領域に対してこの比較を行うアプローチは、がんに関連する低メチル化の検出においてより高い信号雑音比を有する。この大規模並列配列決定アプローチを例として示す。複数のゲノム領域のメチル化密度を決定し、対照および試験試料間の対応する領域のメチル化密度の比較を可能にし得る他の方法論は、同様の効果を達成すると予想される。例えば、特定のゲノム領域に由来する血漿DNA分子を標的とし、該領域のメチル化レベルを決定することができるハイブリダイゼーションプローブまたは分子反転(molecular inversion)プローブは、所望の効果を達成するように設計することができる。

10

#### 【0275】

さらに別の実施形態では、がんが存在するかどうかを決定するために、または血漿DNAメチル化のレベルの連続的变化をモニタリングするために、全てのビンのZ値の和が用いられ得る。腫瘍DNAの全体的な低メチル化性質のため、Z値の和は、健常対照群よりも、がんを有する個体から採取された血漿においてより低くなるだろう。HCC患者の手術前および手術後の血漿試料のZ値の和は、それぞれ、-49843.8および-3132.13であった。

20

#### 【0276】

他の実施形態では、血漿DNAのメチル化レベルを調べるために、他の方法が用いられ得る。例えば、シトシン残基の総量に対するメチル化シトシン残基の割合は、質量分析(ML Chen et al. 2013 Clin Chem; 59: 824-832)または大規模並列配列決定を用いることで決定することができる。しかし、シトシン残基の大部分はCpGジヌクレオチド配列に存在しないため、全シトシン残基におけるメチル化シトシンの割合は、CpGジヌクレオチドの配列において推定されるメチル化レベルと比較した場合、比較的小さくなるだろう。HCC患者から得られた組織および血漿試料並びに健常対照群から得られた4つの血漿試料のメチル化レベルを決定した。ゲノムワイドな大規模並列配列決定データを用いて、CpG配列、あらゆるシトシン、CHG配列およびCHH配列におけるメチル化レベルを測定した。Hはアデニン、チミンまたはシトシン残基を指す。

30

#### 【0277】

図26Dは、CHH配列およびCHG配列を用いた場合の対照血漿試料のいくつかと重複する、腫瘍組織および手術前血漿試料のメチル化レベルを示す、表2660である。腫瘍組織および手術前血漿試料のメチル化レベルは、CpGおよび不特定シトシンの両方において、軟膜、非腫瘍性肝組織、手術後血漿試料および健常対照血漿試料と比較して一貫してより低かった。しかし、メチル化CpGに基づくデータ、すなわち、メチル化密度は、メチル化シトシンに基づくデータよりも広いダイナミックレンジを示した。

40

#### 【0278】

他の実施形態では、血漿DNAのメチル化状態は、メチル化シトシンに対する抗体を用いる方法(例えば、メチル化DNA免疫沈降(MeDIP))によって決定され得る。しかし、これらの方法の精度は、抗体結合における変動性のために、配列決定に基づく方法よりも劣ることが予想される。さらに別の実施形態では、血漿DNA中の5-ヒロドキシメチルシトシンのレベルが決定され得る。これに関して、5-ヒロドキシメチルシトシンのレベルの減少は、ある特定のがん(例えば、メラノーマ)の後成的特徴であることが分かっている(CG Lian, et al. 2012 Cell; 150: 1135-1146)。

50

## 【0279】

HCCに加えて、このアプローチが他のがん型に適応可能かどうかも調べた。肺腺癌（CL1およびCL2）を有する2人の患者、上咽頭癌（NPC1およびNPC2）を有する2人の患者、結腸直腸がん（CRC1およびCRC2）を有する2人の患者、転移性神経内分泌腫瘍（NE1）を有する1人の患者および転移性平滑筋肉腫（SMS1）を有する1人の患者から得られた血漿試料を解析した。これらの対象の血漿DNAを亜硫酸水素塩によって変換し、一端の50bpについて、イルミナ社製HiSeq2000プラットフォームを用いて配列決定した。上記の4人の健常対照患者を、これら8人の患者の解析のための参照群として用いた。一端の配列リードの50bpを用いた。ゲノム全体を1Mbピンに分割した。参照群から得られたデータを用いて、各ピンのメチル化密度の平均値およびSDを算出した。次に、8人のがん患者の結果を、参照群の平均値からのSDの数値を示すZ値として表した。正の値は検査例のメチル化密度が参照群の平均値よりも低いことを示しており、逆に、負の値は検査例のメチル化密度が参照群の平均値よりも高いことを示す。配列リードの数および試料毎に達成された配列決定深度を、図27Iの表2780に示す。

10

## 【0280】

図27A-Hは、本発明の実施形態による、8人のがん患者のメチル化密度のCircosプロットである。各ドットは1Mbピンの結果を表す。黒色ドットは-3~3のZ値を有するピンを表す。赤色ドットは-3未満のZ値を有するピンを表す。緑色ドットは3より大きいZ値を有するピンを表す。2本の連続線間の間隔はZ値の差異が20であることを表す。

20

## 【0281】

肺がん、上咽頭癌、結腸直腸がんおよび転移性神経内分泌腫瘍を含む大部分のがん型を有する患者のゲノム全域の複数の領域において、有意な低メチル化が観察された。興味深いことに、低メチル化に加えて、転移性平滑筋肉腫を有する症例において、有意な高度メチル化がゲノム全域の複数の領域において観察された。平滑筋肉腫の胚起源は中胚葉であるが、一方、残り7人の患者における他のがん型の胚起源は外胚葉である。従って、肉腫のDNAメチル化パターンは癌腫のDNAメチル化パターンと異なる場合があり得る。

## 【0282】

この例から理解できるように、血漿DNAのメチル化パターンは、異なる型のがんを識別するのに有用であり得、この例では癌腫および肉腫の識別である。これらのデータは、前記アプローチを、悪性腫瘍に関連する異常な高度メチル化を検出するのに用いることができることも示唆している。これら8つ全ての例では、血漿試料のみが利用可能であり、腫瘍組織は解析されなかった。これにより、腫瘍組織の事前のメチル化特性またはメチル化レベルが無くとも、記載された方法を用いることで血漿中で腫瘍由来DNAを容易に検出できることが示された。

30

## 【0283】

図27Jは、異なる悪性腫瘍を有する患者の血漿中のゲノム全体における1MbピンのZ値分布を示す、表2790である。-3未満、-3~3および3を超えるZ値を有するピンの割合が各例について示される。全ての例において、ピンの5%超が-3未満のZ値を有していた。従って、試料をがん陽性であると分類するために、5%のピンが有意に低メチル化されているというカットオフを用いる場合、これらの例は全て、がん陽性に分類されるだろう。結果は、低メチル化が様々ながん型における一般的な現象であり得、血漿メチローム解析が様々ながん型を検出するのに有用であろうことを示している。

40

## 【0284】

## D. 方法

図28は、本発明の実施形態に従って、生物の生物試料を解析してがんのレベルの分類を決定する、方法2800のフローチャートである。生物試料は、正常細胞由来のDNA含み、がんに関連する細胞由来のDNAを潜在的に含み得る。DNAの少なくとも一部は、生物試料中で無細胞DNAであり得る。

50

## 【0285】

ブロック2810において、生物試料由来の複数のDNA分子が解析される。DNA分子の解析には、生物のゲノム内でのDNA分子の位置を決定し、該DNA分子が一つまたは複数の部位においてメチル化されているかどうかを決定することが含まれ得る。前記解析はメチル化認識配列決定から配列リードを得ることによって行うことができるため、前記解析は、前記DNAから先に得られたデータに対してのみ行われ得る。他の実施形態では、前記解析は、実際の配列決定または他のデータを得るための能動的ステップを含み得る。

## 【0286】

ブロック2820において、複数の部位のそれぞれについて、部位においてメチル化されているDNA分子のそれぞれの数が決定される。一実施形態では、部位はCpG部位であり、本明細書に記載の一つまたは複数の判定基準を用いて選択されるある特定のCpG部位のみであり得る。メチル化されているDNA分子の数は、正規化が特定部位における分析されたDNA分子の総数（例えば、配列リードの総数）を用いて行われたならば、非メチル化状態である数の決定に等しい。例えば、領域のCpGメチル化密度の増加は、同一領域の非メチル化CpGの密度の減少に等しい。

10

## 【0287】

ブロック2830において、複数個の部位においてメチル化されているDNA分子のそれぞれの数に基づいて、第一メチル化レベルが算出される。第一メチル化レベルは、複数個の部位に対応するDNA分子の数に基づいて決定されるメチル化密度に対応し得る。部位は複数の遺伝子座またはただ1つの座位に対応し得る。

20

## 【0288】

ブロック2840において、第一メチル化レベルが第一カットオフ値と比較される。第一カットオフ値は参照メチル化レベルであってもよいし、あるいは参照メチル化レベルと関連していてもよい（例えば、正常レベルからの特定の距離）。参照メチル化レベルは、がんを有さない個人の試料から、または生物のがんと関連していないことが知られている生物の遺伝子座から、決定され得る。第一カットオフ値は、生物試料の検査に先立って得られた、事前の該生物の生物試料から得られた参照メチル化レベルから確立されてもよい。

## 【0289】

一実施形態では、第一カットオフ値は、健常生物から得られた生物試料から確立された参照メチル化レベルからの、特定の距離（例えば、標準偏差の特定の値）である。比較は、第一メチル化レベルおよび参照メチル化レベル間の差異を決定し、次にその差異を第一カットオフ値に対応する閾値と比較することによって行うことができる（例えば、メチル化レベルが参照メチル化レベルと統計学的に異なるかどうかを決定するために）。

30

## 【0290】

ブロック2850において、がんのレベルの分類は、前記比較に基づいて決定される。がんのレベルの例は、対象ががんまたは前癌状態を有するかどうか、または対象ががんを発症させる可能性が増加しているかが含まれる。一実施形態では、第一カットオフ値は、対象から事前に得られた試料から決定され得る（例えば、参照メチル化レベルは事前の試料から決定され得る）。

40

## 【0291】

いくつかの実施形態において、第一メチル化レベルは、メチル化レベルが閾値を超えている領域の数に対応し得る。例えば、生物のゲノムの複数の領域が特定され得る。本明細書に記載の判定基準（例えば、ある特定の長さまたはある特定の数の部位を有する）を用いて、領域は特定され得る。一つまたは複数の部位（例えば、CpG部位）は、各領域内で特定され得る。領域メチル化レベルは各領域について算出され得る。第一メチル化レベルは第一領域についてである。各領域メチル化レベルは、領域間で同じであっても異なってもよいそれぞれの領域カットオフ値と比較される。第一領域の領域カットオフ値は第一カットオフ値である。それぞれの領域カットオフ値は、参照メチル化レベルからの特

50

定の量（例えば、0.5）であるため、非がん対象から決定され得る参照からの有意差を有する領域のみが計数され得る。

【0292】

領域メチル化レベルがそれぞれの領域カットオフ値を超えている領域の第一の数は、決定され、閾値と比較されて、分類が決定され得る。ある実施において、閾値は割合である。閾値の第一の数の比較は、第一の領域数を第二の領域数（例えば、全ての領域）で除算し、その後、例えば、正規化過程の一部として、閾値と比較することを含み得る。

【0293】

上記のように、生物試料中の腫瘍DNAの濃度分率は、第一カットオフ値を算出するのに用いられ得る。濃度分率は最小値より大きいことが単純に推定され得るが、一方、最小値より低い濃度分率を有する試料は、例えば解析に適していないものとして、警告され得る。最小値は、参照メチル化レベルと比較した腫瘍のメチル化レベルにおける期待される差異に基づいて決定され得る。例えば、差異が0.5（例えば、カットオフ値として用いられる）である場合、ある特定の腫瘍の濃度は、この差異を見るために充分高いことが必要とされる。

10

【0294】

方法1300からの特定の手法は、方法2800に応用され得る。方法1300において、コピー数変動が腫瘍において決定され得る（例えば、腫瘍の第一染色体領域が、その腫瘍の第二染色体領域と比較してコピー数変化を有しているかどうかを検査され得る）。従って、方法1300により、腫瘍が存在することが推定され得る。方法2800において、試料は、いかなるコピー数の特徴にもかかわらず、いずれの腫瘍が存在する徴候があるかどうかを検査され得る。前記2つの方法のいくつかの手法は同様であり得る。しかし、方法2800のカットオフ値およびメチル化パラメーター（例えば、正規化されたメチル化レベル）では、がんDNAおよびコピー数変化を有し得るいくつかの領域を有する非がん性DNAの混合物の参照メチル化レベルからの差異とは対照的に、非がん性DNAの参照メチル化レベルからの統計的有意差が検出され得る。従って、方法2800の基準値は、がんを含まない試料から、例えば、がんを有さない生物から、または同一患者の非がん性組織から（例えば、事前に採取された血漿、または細胞DNAから決定され得る、がんを有さないことが知られている同時期に得られた試料から）、決定され得る。

20

【0295】

E. 血漿DNAメチル化解析を用いる検出される腫瘍DNA最小濃度分率の予測

血漿DNAのメチル化レベルを用いてがんを検出するアプローチの感度を測定する1つの方法は、対照の血漿DNAメチル化レベルと比較した場合の血漿DNAメチル化レベルにおける変化を明らかにするのに必要な、最小の腫瘍由来DNA濃度分率と関連している。検査感度は、健常対照群または血液細胞DNAにおける腫瘍組織およびベースライン血漿DNAメチル化レベル間のDNAメチル化における差異の程度にも依存している。血液細胞は、健常人の血漿中のDNAの主な供給源である。差異が大きいほど、がん患者は非がん性個体からより容易に区別され得、血漿中の腫瘍由来物のより低い検出限界およびがん患者を検出する際のより高い臨床的感度として反映されるだろう。さらに、健常対象または異なる年齢の対象における血漿DNAメチル化の変動（G Hannum et al. 2013 Mol Cell; 49: 359-367）も、がんの存在と関連するメチル化変化を検出する感度に影響するだろう。健常対象における血漿DNAメチル化の変動が小さいほど、少量のがん由来DNAの存在によって引き起こされる変化の検出はより容易になるだろう。

30

40

【0296】

図29Aは、分布が正規分布に従うことを仮定する、参照対象におけるメチル化密度の分布を示すプロット2900であり、この解析は、1つのメチル化密度値（例えば、全常染色体または特定の染色体のメチル化密度）のみを与える、各血漿試料に基づいている。それにより、解析の特異度がどのように影響を受けるかが説明される。一実施形態では、参照対象の平均DNAメチル化密度を3SD下回るカットオフが、検査試料が参照対象から得られた試料よりも有意により低いメチル化状態であるかどうかを決定するために用い

50

られる。このカットオフが用いられる場合、非がん性対象のおよそ 0.15% が、がんを有すると分類される偽陽性の結果を有することとなり、99.85% の特異度に帰着することが予想される。

【0297】

図 29B は、参照対象およびがん患者におけるメチル化密度の分布を示す、プロット 2950 である。カットオフ値は、参照対象のメチル化密度の平均値を 3SD 下回る。がん患者のメチル化密度の平均値がカットオフ値を 2SD 下回る（すなわち、参照対象の平均値を 5SD 下回る）場合、がん対象の 97.5% は、カットオフ値を下回るメチル化密度を有すると予想される。言い換えれば、1つのメチル化密度値が各対象に与えられる場合、例えば、ゲノム全体、全常染色体または特定の染色体の全体メチル化密度が解析される場合、予想感度は 97.5% となるだろう。前記 2つの集団の平均メチル化密度間の差異は、2つの因子、すなわち、がん性組織および非がん性組織間のメチル化レベルにおける差異の程度、並びに血漿試料中の腫瘍由来 DNA の濃度分率に影響を受ける。これら 2つのパラメーターの値が高いほど、これら 2つの集団のメチル化密度値の差異はより大きくなるだろう。さらに、2つの集団のメチル化密度分布の SD が低いほど、それら 2つの集団のメチル化密度分布の重複はより少なくなる。

10

【0298】

以下で、仮説例を用いてこの概念を説明する。腫瘍組織のメチル化密度がおよそ 0.45 であり、健常対象の血漿 DNA のメチル化密度がおよそ 0.7 であると仮定する。これらの仮定値は、常染色体の全体メチル化密度が 42.9% であり、健常対照群から得られた血漿試料の常染色体の平均メチル化密度が 71.6% であった、HCC 患者から得られた値に類似している。ゲノム全体の血漿 DNA メチル化密度を測定する CV が 1% であると仮定すると、カットオフ値は、 $0.7 \times (100\% - 3 \times 1\%) = 0.679$ 、になる。97.5% の感度を達成するために、がん患者の血漿 DNA の平均メチル化密度は、およそ、 $0.679 - 0.7 \times (2 \times 1\%) = 0.665$  である必要がある。f により血漿試料中の腫瘍由来 DNA の濃度分率を表す。f は、 $(0.7 - 0.45) \times f = 0.7 - 0.665$ 、として算出され得る。これから、f はおよそ 14% である。この計算から、血漿中で検出が可能な最小濃度分率は 14% であり、その結果、ゲノム全体の全体メチル化密度が診断パラメーターとして使用される場合に、97.5% の診断鋭敏度が達成されることが推定される。

20

30

【0299】

次に、HCC 患者から得られたデータに対してこの解析を行った。これを説明するために、全ての常染色体から推定された値に基づく 1 回のみメチル化密度測定を各試料に行った。健常対象から得られた血漿試料間の平均メチル化密度は 71.6% であった。これら 4つの試料のメチル化密度の SD は 0.631% であった。従って、血漿メチル化密度のカットオフ値は、-3 未満の Z 値および 99.85% の特異度を達成するために、 $71.6\% - 3 \times 0.631\% = 69.7\%$  である必要がある。97.5% の感度を達成するために、がん患者の平均血漿メチル化密度は、カットオフを 2SD 下回っている（すなわち、68.4% である）必要がある。腫瘍組織のメチル化密度は 42.9% であったため、式： $P = BKG \times (1 - f) + TUM \times f$  を用いると、f は少なくとも 11.1% である必要がある。

40

【0300】

別の実施形態では、異なるゲノム領域のメチル化密度は、例えば、図 25A または図 26B に示されるように、別々に解析され得る。言い換えれば、複数のメチル化レベル測定が各試料に対して行われる。以下に示すように、有意な低メチル化は血漿中のさらにより低い腫瘍 DNA 濃度分率において検出され得るため、がん検出における血漿 DNA メチル化解析の診断能は増強される。参照集団からのメチル化密度の有意な逸脱を示すゲノム領域の数が計数され得る。次に、ゲノム領域の数がカットオフ値と比較されて、検査されたゲノム領域の集団（例えば、ゲノム全体の 1 Mb ビン）にわたる血漿 DNA の全体的な有意な低メチル化が存在するかどうか決定され得る。カットオフ値は、がんを有さない

50

参照対象の1群の解析によって確立されるか、または数学的に、例えば、正規分布関数に従って得られる。

【0301】

図30は、健常対象およびがん患者の血漿DNAのメチル化密度の分布を示す、プロット3000である。各1Mbピンのメチル化密度が参照群の対応する値と比較される。有意な低メチル化（参照群の平均値を3SD下回る）を示すピンの割合が決定された。腫瘍由来DNAが血漿試料中に存在しているかどうかを決定するために、有意な低メチル化状態である10%のカットオフが用いられた。検査の所望の感度および特異度に応じて、5%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%または90%等の他のカットオフ値も用いることができる。

10

【0302】

例えば、腫瘍由来DNAを含有しているとして試料を分類するために、10%の、有意な低メチル化（-3未満のZ値）を示す1Mbピンがカットオフとして用いられ得る。参照群よりも有意により低メチル化状態であるピンが10%を超えて存在する場合、その試料はがん検査において陽性に分類される。各1Mbピンにおいて、参照群の平均メチル化密度を3SD下回るカットオフが、有意により低メチル化状態であると試料を定義するために用いられる。1Mbピンのそれぞれについて、がん患者の平均血漿DNAメチル化密度が参照対象の平均血漿DNAメチル化密度よりも1.72SD低い場合、がん患者のいずれか特定のピンのメチル化密度値がカットオフよりも低く（すなわち、-3未満のZ値）、陽性の結果を与える、10%の確率が存在する。次に、ゲノム全体の全ての1Mbピンを調べる場合、ピンのおよそ10%が、有意により低いメチル化密度を有する（すなわち、-3未満のZ値）という陽性の結果を示すことが予想される。健常対象の血漿DNAの全体メチル化密度はおよそ0.7であり、各1Mbピンの血漿DNAメチル化密度測定の変動係数（CV）が1%であると仮定すると、がん患者の血漿DNAの平均メチル化密度は、 $0.7 \times (100\% - 1.72 \times 1\%) = 0.68796$ になる必要があるだろう。fを血漿中の腫瘍由来DNAの濃度分率とすると、この平均血漿DNAメチル化密度が得られる。腫瘍組織のメチル化密度が0.45であると仮定すると、fは下記式を用いて算出され得、

20

【0303】

【数16】

$$(\overline{M}_{P_{ref}} - M_{tumor}) \times f = \overline{M}_{P_{ref}} - \overline{M}_{P_{cancer}}$$

30

【0304】

式中、

【0305】

【数17】

$$\overline{M}_{P_{ref}}$$

40

【0306】

は、参照個体中の血漿DNAの平均メチル化密度を表し；

【0307】

【数 1 8】

$$M_{tumor}$$

【0 3 0 8】

は、がん患者の腫瘍組織のメチル化密度を表し；

【0 3 0 9】

【数 1 9】

10

$$\overline{M}_P$$

【0 3 1 0】

は、がん患者の血漿 DNA の平均メチル化密度を表す。

【0 3 1 1】

この式を用いると、 $(0.7 - 0.45) \times f = 0.7 - 0.68796$ となる。従って、最少濃度分率はこのアプローチを用いて検出され得、4.8%と推定される。感度は、有意により低メチル化状態であるピンのカットオフ率を、例えば、10%から5%まで減少させることにより、さらに増強され得る。

20

【0 3 1 2】

上記の例で示されたように、この方法の感度は、がん性組織および非がん性組織（例えば、血液細胞）間のメチル化レベルにおける差異の程度によって決定される。一実施形態では、非がん対象の血漿 DNA および腫瘍組織間のメチル化密度において大きな差異を示す染色体領域のみが選択される。一実施形態では、0.5より大きなメチル化密度における差異を有する領域のみが選択される。他の実施形態では、0.4、0.6、0.7、0.8または0.9の差異が、適切な領域を選択するために用いられ得る。さらに別の実施形態では、ゲノム領域の物理的サイズは固定されない。代わりに、ゲノム領域は、例えば、固定の読み深度または固定の CpG 部位数に基づいて定義される。これらのゲノム領域の複数におけるメチル化レベルが各試料において評価される。

30

【0 3 1 3】

図 3 1 は、健常対象の血漿 DNA および HCC 患者の腫瘍組織の平均値の間のメチル化密度における差異の分布を示す、グラフ 3 1 0 0 である。正の値はメチル化密度が健常対象の血漿 DNA においてより高いことを示し、負の値はメチル化密度が腫瘍組織においてより高いことを示す。

【0 3 1 4】

一実施形態では、がん組織および非がん性組織のメチル化密度間で最も大きな差異を有するピン（例えば、0.5超の差異を有するピン）が、腫瘍がこれらのピンにおいて低メチル化状態であるか高度メチル化状態であるかにかかわらず、選択され得る。血漿中の腫瘍由来 DNA の濃度分率の検出限界は、がん対象および非がん対象間の血漿 DNA メチル化レベルの分布間の差異がより大きいために、これらのピンに焦点を当てることにより低下し得、血漿中の腫瘍由来 DNA が同じ濃度分率が与えられ得る。例えば、0.5超の差異を有するピンのみが用いられ、ピンの10%が有意により低メチル化状態であるというカットオフが採用されて検査個体のがんを有するかどうか決定される場合、検出される腫瘍由来 DNA の最小濃度分率（ $f$ ）は、下記式を用いて算出され得、

40

【0 3 1 5】

【数 2 0】

$$(\overline{M}_{P_{ref}} - M_{tumor}) \times f = \overline{M}_{P_{ref}} - \overline{M}_{P_{cancer}}$$

【0 3 1 6】

式中、

【0 3 1 7】

【数 2 1】

10

$$\overline{M}_{P_{ref}}$$

【0 3 1 8】

は、参照個体における血漿 DNA の平均メチル化密度を表し；

【0 3 1 9】

【数 2 2】

20

$$M_{tumor}$$

【0 3 2 0】

は、がん患者における腫瘍組織のメチル化密度を表し；

【0 3 2 1】

【数 2 3】

$$\overline{M}_{P_{cancer}}$$

30

【0 3 2 2】

は、がん患者における血漿 DNA の平均メチル化密度を表す。

【0 3 2 3】

一方、参照対象の血漿および腫瘍組織間のメチル化密度における差異は少なくとも 0.5 である。そのとき、 $0.5 \times f = 0.7 - 0.68796$  となり、 $f = 2.4\%$  である。従って、がん組織および非がん性組織間のメチル化密度においてより大きな差異を有するピンに焦点を当てることにより、腫瘍由来 DNA 分率の下限は 4.8% から 2.4% に低下され得る。どのピンががん組織および非がん性組織（例えば、血液細胞）間でより大きな程度のメチル化差異を示すかに関する情報は、他の個体から得られる同じ臓器または同じ組織型の腫瘍組織から決定され得る。

40

【0 3 2 4】

別の実施形態では、パラメーターは全てのピンの血漿 DNA のメチル化密度から得られ、がん組織および非がん性組織間のメチル化密度における差異が考慮され得る。より大きな差異を有するピンはより重い重量が与えられ得る。一実施形態では、各ピンのがん組織および非がん性組織間のメチル化密度における差異は、最終パラメーターを算出する際の特定のピンならば、重量として直接的に用いられ得る。

【0 3 2 5】

さらに別の実施形態では、異なるがん型は、異なるパターンの腫瘍組織におけるメチル化を有し得る。がん特異的な重量特性は特定のがん型のメチル化の程度から得られ得る。

【0 3 2 6】

50

さらに別の実施形態では、メチル化密度のピンの間の関連性が、がんを有する対象およびがんを有さない対象において決定され得る。図8において、小数のピンにおいて、腫瘍組織が参照対象の血漿DNAよりもよりメチル化状態であったことが観察できる。従って、最も極端な差異の値（例えば0.5超の差異および0未満の差異）を有するピンが選択され得る。次に、検査個体のがんを有するかどうかを示すために、これらのピンのメチル化密度の比が用いられ得る。他の実施形態では、異なるピンのメチル化密度の差異および商が、ピンの間の関連性を示すためのパラメーターとして用いられ得る。

#### 【0327】

HCC患者から得られたデータにより示される、複数のゲノム領域のメチル化密度を用いて腫瘍を検出または評価するためのアプローチの検出感度をさらに評価した。まず、手術前血漿由来のリードを健常対照群の血漿試料由来のリードと混合して、20%~0.5%の範囲の腫瘍DNA濃度分率を含有する血漿試料を模倣した。次に、-3未満のZ値と等しいメチル化密度を有する（ゲノム全体における2,734のピン中の）1Mbピンの割合を計数した。血漿中の腫瘍DNA濃度分率が20%であった場合に、ピンの80.0%が有意な低メチル化を示した。10%、5%、2%、1%および0.5%の血漿中の腫瘍DNA濃度分率に対応するデータは、それぞれ、67.6%、49.7%、18.9%、3.8%および0.77%の低メチル化を示すピンであった。対照試料において-3未満のZ値を示すピンの数の理論限界は0.15%であるため、我々のデータは、腫瘍濃度分率がたった0.5%であった場合でも、理論上のカットオフ限界を超えるさらに多くのピン（0.77%）が存在したことを示している。

10

20

#### 【0328】

図32Aは、血漿試料が5%または2%の腫瘍DNAを含有した場合の、配列決定深度の減少の影響を示す、表3200である。有意な低メチル化を示す高い割合のピン（0.15%超）は、平均配列決定深度が1倍体ゲノムあたりたった0.022回であった場合でも検出され得る。

#### 【0329】

図32Bは、4人の健常対照患者の血漿、HCC患者の軟膜、正常肝組織、腫瘍組織、手術前血漿試料および手術後血漿試料における反復領域および非反復領域のメチル化密度を示す、グラフ3250である。がん組織および非がん性組織の両方において、反復領域が非反復領域よりもよりメチル化されていた（より高いメチル化密度）ことが観察され得る。しかし、反復領域および非反復領域間のメチル化における差異は、腫瘍組織と比較した場合、非がん性組織および健常対象の血漿DNAにおいて、より大きかった。

30

#### 【0330】

結果として、がん患者の血漿DNAは、非反復領域よりも、反復領域におけるメチル化密度においてより大きな減少を示した。4人の健常対照群の平均値およびHCC患者間の血漿DNAメチル化密度における差異は、反復領域および非反復領域において、それぞれ0.163および0.088であった。また、手術前血漿試料および手術後血漿試料に関するデータは、メチル化密度における変化のダイナミックレンジが非反復領域においてよりも反復領域においてより大きかったことを示した。一実施形態では、反復領域の血漿DNAメチル化密度は、患者のがんに冒されているかどうかの決定または疾患増悪のモニタリングのために用いられ得る。

40

#### 【0331】

前述の通り、参照対象の血漿におけるメチル化密度の変動は、がん患者を非がん個体と区別する正確さにも影響を与える。メチル化密度の分布がより密接であるほど（すなわち、標準偏差がより小さいほど）、がん対象および非がん対象の区別がより正確になる。別の実施形態では、1Mbピンのメチル化密度の変動係数(CV)が、参照群における血漿DNAメチル化密度の変動性が小さいピンを選択するための判定基準として用いられ得る。例えば、1%未満のCVを有するピンのみが選択される。他の値、例えば0.5%、0.75%、1.25%および1.5%も、メチル化密度の変動性が小さいピンを選択するための判定基準として用いることができる。さらに別の実施形態では、選択判定基準は、

50

ピンのCV並びにがん組織および非がん性組織間のメチル化密度における差異の両方を含み得る。

【0332】

メチル化密度は、腫瘍組織のメチル化密度が既知である場合の血漿試料中の腫瘍由来DNAの濃度分率を推定するのにも用いることができる。この情報は、患者の腫瘍の解析によって、または同じがん型を有する幾人かの患者から得られた腫瘍の調査から、得ることができる。前述の通り、血漿メチル化密度(P)は下記式を用いて表現することができ、

【0333】

【数24】

$$P = BKG \times (1 - f) + TUM \times f$$

【0334】

式中、BKGは血液細胞および他の臓器から得られたバックグラウンドメチル化密度、TUMは腫瘍組織におけるメチル化密度であり、fは血漿試料中の腫瘍由来DNAの濃度分率である。これは以下のように書き換えることができる。

【0335】

【数25】

$$f = \frac{BKG - P}{BKG - TUM}$$

【0336】

BKGの値は、がんが存在していない時点の患者の血漿試料を解析することによって、またはがんを有さない個体から成る参照群の調査から、決定することができる。従って、血漿メチル化密度を測定した後、fを決定することができる。

【0337】

F. 他の方法との併用

本明細書に記載のメチル化解析アプローチは、血漿中の腫瘍由来DNAの遺伝子変化に基づく他の方法と併用して用いることができる。そのような方法の例には、がん関連染色体異常(KCA Chan et al. 2013 Clin Chem; 59:211-224; RJ Leary et al. 2012 Sci Transl Med; 4:162ra154)および血漿におけるがん関連単一ヌクレオチド変異(KCA Chan et al. 2013 Clin Chem; 59:211-224)の解析が含まれる。メチル化解析アプローチにはそれらの遺伝学的アプローチに優る利点が存在する。

【0338】

図21Aに示すように、腫瘍DNAの低メチル化は、ゲノムのほぼ全体にわたって分布する領域を含む全体的な現象である。従って、全ての染色体領域からのDNA断片は、患者における血漿/血清DNAへの腫瘍由来低メチル化DNAの潜在的寄与に関して、有益である。対照的に、染色体異常(染色体領域の増幅または欠失)はいくつかの染色体領域に存在するのみであり、腫瘍組織における染色体異常を有さない領域からのDNA断片は解析において有益ではない(KCA Chan et al. 2013 Clin Chem; 59: 211-224)。同様に、ほんの数千の単一ヌクレオチド変化各がんゲノムにおいて観察される(KCA Chan et al. 2013 Clin Chem; 59: 211-224)。これらの単一ヌクレオチド変化と重複しないDNA断片は、腫瘍由来DNAが血漿中に存在しているかどうかを決定する際に有益ではない。従って、本メチル化解析アプローチは、循環血液中でがんに関連する変化を検出するそれらの遺伝学的アプローチよりも潜在的により対費用効果が高い。

【0339】

10

20

30

40

50

一実施形態では、血漿DNAメチル化解析の対費用効果の高さは、最も有益な領域からのDNA断片、例えば、がん組織および非がん性組織間で最も高度に示差的なメチル化差異を有する領域を富化することによって、さらに増強され得る。これらの領域を富化する方法の例には、ハイブリダイゼーションプロブ（例えば、ニンプルジェン社製SeqCapシステムおよびアジレント社製SureSelect Target Enrichmentシステム）、PCR増幅および固相ハイブリダイゼーションの使用が含まれる。

【0340】

#### G. 組織特異的解析 / 提供者

腫瘍由来細胞は隣接臓器または遠隔臓器に浸潤および転移する。浸潤された組織または転移巣は、細胞死の結果としてDNAを血漿中に供給する。がん患者の血漿中のDNAのメチル化特性を解析し、組織特異的メチル化サインの存在を検出することにより、疾患経過に關与する組織型を検出することができる。このアプローチは、がん過程に關与する組織の非浸潤性解剖学的走査を提供することで、原発部位および転移部位として關わる臓器の特定に役立つ。また、血漿中の病変臓器のメチル化サインの相対濃度をモニタリングすることにより、それらの臓器の腫瘍量を評価し、その臓器におけるがん過程が増悪中であるまたは改善中であるまたは治癒が完了しているかどうかを決定することが可能となる。例えば、遺伝子Xが肝臓において特異的にメチル化されているとする。その場合、がん（例えば、結腸直腸がん）によるその肝臓の転移性關与は、血漿中の遺伝子X由来のメチル化配列の濃度を増加させると予想される。遺伝子Xと似たメチル化特徴を有する別の配列または配列群も存在するだろう。その場合、そのような配列から得られた結果を組み合わせることができる。同様の考察が、他の組織、例えば、脳、骨、肺および腎臓等に適用可能である。

10

20

【0341】

一方、異なる臓器由来のDNAは組織特異的メチル化サインを示すことが知られている（BW Futscher et al. 2002 Nat Genet; 31:175-179; SSC Chim et al. 2008 Clin Chem; 54: 500-511）。従って、血漿中のメチル化プロファイリングは、種々の臓器に由来する組織の血漿中への寄与を解明するために用いることができる。血漿DNAは細胞が死ぬ時に放出されると考えられているため、そのような寄与の解明は臓器傷害を評価するのに用いることができる。例えば、肝炎（例えば、ウイルス、自己免疫過程等による）または肝毒性（hepatotoxicity）（例えば、薬剤過剰摂取（パラセタモール等による）または薬剤によって生じる毒素（アルコール等）等の肝臓病変は、肝細胞傷害と関連しており、血漿中の肝臓由来DNAのレベルの増加と関連していることが予想される。例えば、遺伝子Xが肝臓において特異的にメチル化されているとする。その場合、肝臓病変は、血漿中の遺伝子X由来メチル化配列の濃度を増加させると予想される。逆に、肝臓において遺伝子Yが特異的に低メチル化されているとする。その場合、肝臓病変は、血漿中の遺伝子Y由来メチル化配列の濃度を減少させると予想される。さらに他の実施形態では、遺伝子Xまたは遺伝子Yは、遺伝子でなくてもよい、身体内の異なる組織において示差的なメチル化を示すいかなるゲノム配列によっても置換され得る。

30

【0342】

本明細書に記載の手法は、臓器移植受容者の血漿中の提供者由来DNAの評価にも適用することができる（YMD Lo et al. 1998 Lancet; 351:1329-1330）。提供者および受容者間の多形性差異が、血漿中で提供者由来DNAを受容者由来DNAと区別するのに用いられた（YW Zheng et al. 2012 Clin Chem; 58: 549-558）。移植臓器の組織特異的メチル化サインが受容者の血漿中の提供者DNAを検出する方法としても用いられ得ることを報告する。

40

【0343】

提供者DNAの濃度をモニタリングすることにより、移植臓器の状態を非侵襲的に評価することができる。例えば、移植拒絶反応は、より高い細胞死率、およびそれによる、移植臓器のメチル化サインによって反映される受容者血漿（または血清）中の提供者DNAのより高い濃度と関連しており、患者が安定状態にある時と比較した場合、または他の安

50

定な移植受容者もしくは移植されていない健常対照群と比較した場合に、増加しているだろう。がんについて報告されていることと同様に、提供者由来DNAは、多形性差異、移植された実質臓器のより短いサイズのDNA (YW Zheng et al. 2012 Clin Chem; 58: 549-558) および組織特異的メチル化特性を含む特性の全てまたはいくつかを検出することにより、移植受容者の血漿中で特定され得る。

#### 【0344】

##### H. サイズに基づくメチル化の正規化

上記およびLun et al (FMF Lun et al. Clin. Chem. 2013; doi:10.1373/clinchem.2013.212274) に記載されているように、メチル化密度 (例えば、血漿DNAのメチル化密度) はDNA断片のサイズと相関している。より短い血漿DNA断片のメチル化密度の分布は、より長い断片のメチル化密度よりも有意により低かった。血漿DNAの異常な断片化パターンを有するいくつかの非がん性状態 (例えば、全身性エリテマトーデス (SLE)) が、より低メチル化状態であるより大量の短い血漿DNA断片の存在により、見かけの血漿DNA低メチル化を示し得ることを提唱する。言い換えれば、血漿DNAのサイズ分布は、血漿DNAのメチル化密度の交絡因子であり得る。

#### 【0345】

図34Aは、SLE患者SLE04における血漿DNAのサイズ分布を示している。9人の健常対照患者のサイズ分布は灰色点線として示され、SLE04のサイズ分布は黒色実線として示される。短い血漿DNA断片は、9人の健常対照患者においてよりも、SLE04においてより豊富であった。より短いDNA断片は概してより低メチル化状態であるため、このサイズ分布パターンは、血漿DNAのメチル化解析を混乱させ、さらなる見かけの低メチル化をもたらし得る。

#### 【0346】

いくつかの実施形態において、血漿DNAメチル化解析に対するサイズ分布の交絡効果を低減させるために、測定されたメチル化レベルは正規化され得る。例えば、複数個の部位におけるDNA分子のサイズが測定され得る。種々の実施において、測定によって、DNA分子の特定のサイズ (例えば、長さ) が得られるか、またはサイズにも対応し得る、サイズが特定の範囲内にあることが単に決定され得る。次に、正規化されたメチル化レベルはカットオフ値と比較され得る。サイズ分布の血漿DNAメチル化解析に対する交絡効果を低減させるための正規化を行うための、いくつかの方法がある。

#### 【0347】

一実施形態では、DNA (例えば、血漿DNA) のサイズ分画が行われ得る。サイズ分画は、類似のサイズを有するDNA断片が、カットオフ値と整合的な様式でメチル化レベルを決定するのに用いられることを確実にし得る。サイズ分画の一部として、第一のサイズ (例えば、第一の長さ範囲) を有するDNA断片が選択され得、ここで、第一のカットオフ値は第一のサイズに対応している。正規化は、それらの選択されたDNA断片のみを用いてメチル化レベルを算出することにより達成され得る。

#### 【0348】

サイズ分画は、種々の方法で、例えば、異なるサイズのDNA分子の物理的分離によって (例えば電気泳動もしくはマイクロフルイデクスに基づく科学技術、または遠心分離に基づく科学技術によって)、またはインシリコ解析によって、達成され得る。インシリコ解析において、一実施形態では、血漿DNA分子のペアエンド大規模並列配列決定が行われ得る。次に、配列決定された分子のサイズが、血漿DNA分子の2つの末端のそれぞれの位置を参照ヒトゲノムと比較することにより、推定され得る。次に、一つまたは複数のサイズ選択判定基準 (例えば、特定の範囲内であるサイズの判定基準) に適合する配列決定されたDNA分子を選択することにより、その後の解析が行われ得る。従って、一実施形態では、より小さなサイズ (例えば、特定の範囲内) を有する断片のメチル化密度が解析され得る。カットオフ値 (例えば、方法2800のブロック2840における) は、同じサイズ範囲内の断片に基づいて決定され得る。例えば、メチル化レベルはがんを有するまたはがんを有さないことが知られている試料から決定され得、カットオフ値はこれら

10

20

30

40

50

のメチル化レベルから決定され得る。

【0349】

別の実施形態では、循環DNAのメチル化密度およびサイズ間の関数関係が決定され得る。関数関係は、関数のデータポイントまたは係数によって定義され得る。関数関係はそれぞれのサイズに対応するスケール値を与え得る（例えば、より短いサイズはメチル化に対する対応する増加を有し得る）。種々の実施において、スケール値は、0～1または1超であり得る。

【0350】

正規化は平均サイズに基づいて行われ得る。例えば、第一メチル化レベルを算出するのに用いられるDNA分子に対応する平均サイズがコンピュータで算出され得、その第一メチル化レベルが対応するスケール値（すなわち、平均サイズに対応している）で乗算され得る。別の例として、各DNA分子のメチル化密度は、DNA分子のサイズ並びにDNAサイズおよびメチル化間の関連性に従って正規化され得る。

10

【0351】

別の実施において、正規化は分子毎に行われ得る。例えば、特定部位におけるDNA分子のそれぞれのサイズが（例えば、上記のように）得られ、それぞれのサイズに対応するスケール値が関数関係から特定され得る。正規化されない算出において、各分子は部位におけるメチル化指数の決定において同等に計数される。正規化された算出において、メチル化指数に対する分子の寄与は、分子のサイズに対応するスケール因子によって加重値が与えられ得る。

20

【0352】

図34Bおよび図34Cは、SLE患者SLE04（図34B）およびHCC患者TBR36（図34C）から得られた血漿DNAのメチル化解析を示している。外側の環は、インシリコサイズ分画無しの血漿DNAの $Z_{meth}$ 結果を示している。内側の環は、130bp以上の血漿DNAの $Z_{meth}$ 結果を示している。SLE患者SLE04において、ピンの84%がインシリコサイズ分画無しで低メチル化を示した。低メチル化を示すピンの割合は、130bp以上の断片のみが解析された場合に、15%にまで減少した。HCC患者TBR36において、ピンの98.5%および98.6%が、それぞれインシリコサイズ分画有りまたは無しで、血漿DNAの低メチル化を示した。これらの結果は、インシリコサイズ分画が、血漿DNAの断片化の増加（例えば、SLEまたは他の炎症性疾患を有する患者における）に関連する、偽陽性の低メチル化結果を効果的に減少させ得ることを示唆している。

30

【0353】

一実施形態では、サイズ分画有りおよび無しの解析の結果が比較されて、メチル化結果に対するサイズの交絡効果が存在するかが示され得る。従って、正規化に加えて、または正規化の代わりに、特定のサイズにおけるメチル化レベルの算出が、カットオフ値を超えるピンの割合がサイズ分画有りおよび無しで異なる場合の偽陽性の可能性が存在するかどうか、または特定のメチル化レベルのみが異なるのかどうかを決定するために、用いられ得る。例えば、サイズ分画有りおよび無しでの試料の結果間の有意差の存在が、異常な断片化パターンによる偽陽性結果の可能性を示すために用いられ得る。差異が有意であるかどうかを決定するための閾値は、がん患者のコホートおよび非がん対照患者のコホートの解析によって確立され得る。

40

【0354】

I. 血漿中のゲノムワイドなCG島高度メチル化の解析

全体的な低メチル化に加えて、CG島の高度メチル化が、がんにおいて共通して観察される（SSB Baylin et al. 2011 Nat Rev Cancer; 11: 726-734; PA Jones et al. 2007, Cell; 128: 683-692; M Esteller et al. 2007 Nat Rev Genet 2007; 8: 286-298; M Ehrlich et al. 2002 Oncogene 2002; 21: 5400-5413）。このセクションでは、がんを検出およびモニタリングするためのCG島高度メチル化のゲノムワイド解析の使用について記載する。

50

## 【0355】

図35は、本発明の実施形態に従って、CG島の高度メチル化に基づいてがんのレベルの分類を決定する、方法3500のフローチャートである。方法2800の複数の部位にはCpG部位が含まれ得、ここで、CpG部位は複数のCG島に構築され、各CG島は一つまたは複数のCpG部位を含んでいる。各CG島のメチル化レベルは、がんのレベルの分類を決定するために用いられ得る。

## 【0356】

ブロック3510において、解析されるCG島が特定される。この解析において、一例として、健常参照対象の血漿における比較的低いメチル化密度を特徴とする、解析される一連のCG島が定義された。一態様において、がん関連高度メチル化の検出をより容易に可能とするために、参照群におけるメチル化密度の変化は比較的小さなものであり得る。一実施形態では、CG島は参照群における第一の割合に満たない平均メチル化密度を有し、参照群におけるメチル化密度の変動係数は第二の割合に満たない。

10

## 【0357】

一例として、説明を目的として、以下の判定基準が有用なCG島を特定するために用いられる：

- i . 参照群（例えば健常対象）におけるCG島の平均メチル化密度が5%未満
- ii . 参照群（例えば健常対象）の血漿におけるメチル化密度の解析の変動係数が30%未満。これらのパラメータは特定の適用のために調整され得る。我々のデータセットから、ゲノム内の454のCG島がこれらの判定基準を満たした。

20

## 【0358】

ブロック3520において、各CG島のメチル化密度が算出される。メチル化密度は本明細書に記載の通りに算出され得る。

## 【0359】

ブロック3530において、各CG島が高度メチル化されているかどうか決定される。例えば、検査症例のCG島高度メチル化の解析において、各CG島のメチル化密度は、参照群の対応するデータと比較された。メチル化密度（メチル化レベルの一例）が一つまたは複数のカットオフ値と比較されて、特定の島が高度メチル化されているかどうか決定され得る。

30

## 【0360】

一実施形態では、第一カットオフ値は、参照群のメチル化密度の平均値 + 特定の割合に一致し得る。別のカットオフ値は、参照群のメチル化密度の平均値 + 特定の標準偏差値に一致し得る。ある実施では、Z値（ $Z_{meth}$ ）が算出され、カットオフ値と比較された。一例として、検査対象（例えば、がんを検診されている対象）におけるCG島は、以下の判定基準を満たした場合に有意に高度メチル化されていると見なされた：

- i . そのメチル化密度が参照群の平均値よりも2%より高く、
- ii .  $Z_{meth}$ が3より大きい。

また、これらのパラメータは特定の適用のために調整され得る。

## 【0361】

ブロック3540において、高度メチル化CG島のメチル化密度（例えば、Z値）は、累積スコアを決定するために用いられる。例えば、有意に高度メチル化されたCG島を全て特定した後、Z値の和または高度メチル化されたCG島全てのZ値の関数を含むスコアが算出され得る。スコアの一例は、別のセクションに記載される累積確率（CP）スコアである。累積確率スコアは、確率分布（例えば、自由度3を有する学生t確率分布）に従って、そのような観察を偶然に有する確率を決定するために $Z_{meth}$ を用いる。

40

## 【0362】

ブロック3550において、累積スコアは、がんのレベルの分類を決定するために、累積閾値と比較される。例えば、特定されたCG島における全高度メチル化が十分に大きい場合、その生物はがんを有していると特定され得る。一実施形態では、累積閾値は参照群から得られる最も高い累積スコアに一致する。

50

## 【0363】

## IX. メチル化およびCNA

上記のように、本明細書に記載のメチル化解析アプローチは、血漿中の腫瘍由来DNAの遺伝子変化に基づく他の方法と併用して用いられ得る。そのような方法の例には、がん関連染色体異常の解析が含まれる(KCA Chan et al. 2013 Clin Chem; 59: 211-224; RJ Leary et al. 2012 Sci Transl Med; 4: 162ra154)。コピー数異常(CNA)の側面は、米国特許出願公開第13/308,473号に記載されている。

## 【0364】

## A. CNA

コピー数異常は、ゲノムの特定部分に整列するDNA断片を計数し、その計数を正規化し、その計数をカットオフ値と比較することにより検出され得る。種々の実施形態において、正規化は、ゲノムの同一部分の別のハプロタイプに整列したDNA断片の計数によって(相対ハプロタイプ適用量(relative haplotype dosage: RHD))またはゲノムの別の部分に整列したDNA断片の計数によって、行われ得る。

10

## 【0365】

RHD法はヘテロ接合性遺伝子座の使用に依存している。本セクションに記載される実施形態は、2つの領域および同一領域の2つでないハプロタイプを比較することにより、ホモ接合性の遺伝子座に対しても用いることができ、故に、非ハプロタイプ特異的である。相対染色体領域適用量法(relative chromosomal region dosage method)において、1つの染色体領域由来の断片の数(例えば、その領域に整列した配列リードを計数することにより決定される)は、期待値(参照染色体領域から、または健常であることが知られている別の試料の同一領域から得られ得る)と比較される。このように、染色体領域の断片は、配列決定されたタグがどのハプロタイプ由来であるかにかかわらず、計数される。従って、非ヘテロ接合性遺伝子座を含有する配列リードも用いることができる。比較を行うために、ある実施形態では、比較の前にタグ数が正規化され得る。各領域は少なくとも2つの遺伝子座(互いに分離される)によって定義され、これらの遺伝子座における断片は、その領域に関する集合的値を得るために用いられ得る。

20

## 【0366】

特定領域の配列決定されたリード(タグ)の正規化数は、その領域に整列している配列決定されたリードの数を、ゲノム全体に整列可能な配列決定されたリードの総数で除算することによって、算出され得る。この正規化されたタグ数は、ある試料から得られた結果を、別の試料の結果と比較することを可能にする。例えば、正規化数は、上記のように、特定領域由来であることが期待される配列決定されたリードの比(例えば、割合または分率)であり得る。他の実施形態では、正規化のための他の方法が可能である。例えば、1つの領域の計数の数を、参照領域(上記例において、該参照領域は単なるゲノム全体である)の計数の数で除算することにより、正規化することができる。この正規化されたタグ数は、次に、がんを示さない一つまたは複数の参照試料から決定され得る閾値と比較され得る。

30

## 【0367】

検査症例の正規化されたタグ数は、次に、一つまたは複数の参照対象(例えばがんを有さない一つまたは複数の参照対象)の正規化されたタグ数と比較される。一実施形態では、前記比較は、特定の染色体領域における前記症例のZ値を算出することにより、行われる。Z値は、下記式を用いて算出され得る： $Z \text{ 値} = (\text{症例の正規化されたタグ数} - \text{平均値}) / SD$ 、式中、「平均値」は、参照試料の特定の染色体領域に整列している正規化されたタグ数の平均値であり；SDは、参照試料の特定の領域に整列している正規化されたタグ数の数の標準偏差である。従って、Z値は、検査症例の染色体領域の正規化されたタグ数が、一つまたは複数の参照対象の同一染色体領域の正規化された平均タグ数から逸脱している、標準偏差の数である。

40

## 【0368】

検査生物ががんを有する状況において、腫瘍組織において増幅された染色体領域は、血

50

漿DNA中で大きな比率を占める。これは、正の値のZ値をもたらす。一方、腫瘍組織において欠失している染色体領域は、血漿DNA中で小さな比率を占める。これは、負の値のZ値をもたらす。Z値の大きさはいくつかの因子によって決定される。

【0369】

1つの因子は、生物試料（例えば血漿）中の腫瘍由来DNAの濃度分率である。試料（例えば血漿）中の腫瘍由来DNAの濃度分率が高いほど、検査症例および参照症例の正規化されたタグ数の間の差異はより大きくなる。従って、より大きな規模のZ値がもたらされる。

【0370】

別の因子は、一つまたは複数の参照症例における正規化されたタグ数の変動である。検査症例の生物試料（例えば血漿）における染色体領域の過剰提示が同じ程度である場合、参照群における正規化されたタグ数のより小さな変動（すなわち、より小さな標準偏差）は、より大きなZ値をもたらす。同様に、検査症例の生物試料（例えば血漿）における染色体領域の過小提示が同じ程度である場合、参照群における正規化されたタグ数のより小さな標準偏差は、さらに負のZ値をもたらす。

10

【0371】

別の因子は、腫瘍組織における染色体異常の規模である。染色体異常の規模は、特定の染色体領域のコピー数変化（増加または減少）を指す。腫瘍組織におけるコピー数変化がより高いほど、血漿DNA中の特定の染色体領域の過剰または過小提示の程度はより高くなる。例えば、染色体の両方のコピーの損失は、染色体の2つのコピーのうち一方の損失よりも、血漿DNA中の染色体領域のより大きな過小提示をもたらす。故に、さらに負のZ値をもたらす。典型的に、がんには複数の染色体異常が存在する。それぞれのがんにおける染色体異常は、その性質（すなわち、増幅または欠失）、その程度（単一または複数のコピーの増加または減少）およびその範囲（染色体の長さに関する異常のサイズ）によってさらに異なり得る。

20

【0372】

正規化されたタグ数を測定する精度は、解析される分子の数によって影響を受ける。1つのコピー変化（増加または減少）を有する染色体異常を検出するために、濃度分率がそれぞれおよそ12.5%、6.3%および3.2%である場合、15,000、60,000および240,000個の分子が解析される必要があると予想される。異なる染色体領域におけるがんの検出におけるタグ計数のさらなる詳細は、Lo et al.による「Diagnosing Fetal Chromosomal Aneuploidy Using Massively Parallel Genomic Sequencing」という題名の米国特許出願公開第2009/0029377号に記載されており、該米国特許出願公開の全ての内容はあらゆる目的で参照によって本明細書組み込まれる。

30

【0373】

実施形態では、タグ計数法の代わりに、サイズ解析も用いられ得る。サイズ解析はまた、正規化されたタグ数の代わりに用いられ得る。サイズ解析では、本明細書および米国特許出願公開第12/940,992号に記載の種々のパラメーターが用いられ得る。例えば、上記からのQ値またはF値が用いられ得る。そのようなサイズ値は、これらの値がリードの数に対応していないため、他の領域からの計数による正規化を必要としない。上記の、および米国特許出願公開第13/308,473号により詳細に記載されるRHDO法等の、ハプロタイプ特異的な方法の手法は、非特異的な方法にも用いられ得る。例えば、領域の深度および細分化（refinement）を含む手法が用いられ得る。いくつかの実施形態において、特定領域のGC傾向が2つの領域を比較する際に考慮され得る。RHDO法は同一領域を用いるため、そのような補正は不要である。

40

【0374】

ある種のがんは典型的に特定の染色体領域内に異常を有して存在し得るが、そのようながんは、常に排他的に、そのような領域内に異常を有して存在しているわけではない。例えば、追加の染色体領域が異常を示す場合があり、そのような追加の領域の位置は未知である場合がある。さらに、がんの初期段階を特定するために患者を検診する際、ゲノム全

50

体わたって存在する異常を示し得る、広範ながんの特定が望まれる場合がある。これらの状況に対応するため、実施形態では、複数の領域が系統的に解析されて、どの領域が異常を示しているかが決定され得る。異常の数およびそれらの位置（例えば、それらが近接しているかどうか）が、例えば、異常を確認し、がんのステージを決定し、がんの診断を下し（例えば、前記数が閾値よりも大きい場合）、異常を示している種々の領域の数および位置に基づいて予後を下すために、用いられ得る。

#### 【0375】

従って、実施形態では、異常を示す領域の数に基づいて、生物ががんを有しているかどうか特定され得る。従って、異常を示す領域の数を特定するために、複数の領域（例えば、3, 000）が検査され得る。前記領域は、ゲノム全体にわたっていてもよいし、あるいはゲノムの部分のみ（例えば、非反復領域）にわたっていてもよい。

10

#### 【0376】

図36は、本発明の実施形態に従って複数の染色体領域を用いて生物の生物試料を解析する、方法3600のフローチャートである。生物試料には核酸分子（断片とも称される）が含まれる。

#### 【0377】

ブロック3610において、生物のゲノムの複数の領域（例えば、非オーバーラップ領域）が特定される。各染色体領域には複数の遺伝子座が含まれる。領域は、1 Mbのサイズ、またはいくつかの他の同等のサイズであり得る。領域が1 Mbサイズである場合、ゲノム全体には、それぞれ所定のサイズおよび位置を有する約3, 000個の領域が含まれ得る。そのような所定の領域は、特定の染色体の長さまたは用いられる領域の特定の数、および本明細書に記載のあらゆる他の判定基準に適応するために、変動し得る。領域が異なる長さを有する場合、そのような長さは、例えば、本明細書に記載のように、結果を正規化するために用いられ得る。領域は、特定の生物のある特定の判定基準に基づいて、および/または検査されているがんの知見に基づいて、具体的に選択され得る。領域は任意に選択もされ得る。

20

#### 【0378】

ブロック3620において、生物の参照ゲノム内の核酸分子の位置が、複数の核酸分子のそれぞれについて特定される。前記位置は、本明細書に記載の方法のいずれかで、例えば、配列決定されたタグを得るために断片を配列決定し、配列決定されたタグを参照ゲノムに整列させることにより、決定され得る。分子の特定のハプロタイプも、ハプロタイプ特異的な方法のために決定され得る。

30

#### 【0379】

染色体領域のそれぞれについて、ブロック3630~3650が行われる。ブロック3630において、それぞれの核酸分子群が、特定された位置に基づいて、該染色体領域に由来することが特定される。各群には、前記染色体領域の複数個の遺伝子座のそれぞれに位置する、少なくとも1つの核酸分子が含まれ得る。一実施形態では、前記群は、前記染色体領域の特定のハプロタイプに（例えば、上記のRHDOに）整列する断片であり得る。別の実施形態では、前記群は、前記染色体領域に整列するあらゆる断片であり得る。

40

#### 【0380】

ブロック3640において、コンピューターシステムによって、各核酸分子群の各値が算出される。各値は、各群の核酸分子の特定を定義する。各値は本明細書に記載される値のいずれかであり得る。例えば、前記値は、群における断片の数または群における断片のサイズ分布の統計値であり得る。各値はまた、正規化数、例えば、試料におけるタグ数の総数または参照領域におけるタグ数の数で除算された領域のタグ数であり得る。各値は、別の値（例えば、RHDOにおける）からの差異または比であり得、それによって領域における差異の特性が得られ得る。

#### 【0381】

ブロック3650において、各値が基準値と比較されて、第一の染色体領域が欠失または増幅を示すかどうかの分類が決定される。この基準値は、本明細書に記載のいかなる閾

50

値または基準値であってもよい。例えば、基準値は正常試料において決定された閾値であり得る。RHD0において、各値は2つのハプロタイプにおけるタグ数の差異または比であり得、基準値は統計的に有意な逸脱が存在することを決定するための閾値であり得る。別の例として、基準値は別のハプロタイプまたは領域のタグ数またはサイズ値であり得、比較には、差異または比（またはそのような比の関数）を得た後、その差異または比が閾値よりも大きいかどうかを決定することが含まれ得る。

#### 【0382】

基準値は他の領域の結果に基づいて変動し得る。例えば、隣接する領域も逸脱を示す場合（ある閾値（例えば、3のZ値）と比較して小さいが）、より小さなが用いられ得る。例えば、3つの連続した領域全てが第一の閾値を上回る場合、がんである可能性が高い。従って、この第一の閾値は、非連続領域からがんを特定するのに必要な別の閾値よりも低くてもよい。小さくとも逸脱を有する3つの領域（または3つより多い）を有することは、感度および特異度が保存され得る偶然の影響の可能性が、十分に低くなり得る。

10

#### 【0383】

ブロック3660において、欠失または増幅を示すと分類されるゲノム領域の量が決定される。計数される染色体領域には制限があり得る。例えば、少なくとも1つの他の領域と隣接している領域のみが計数され得る（または、隣接領域はある特定のサイズ（例えば、4以上の領域）であることが必要とされ得る）。領域が等しくない実施形態において、前記数は、それぞれの長さも説明し得る（例えば、前記数は異常な領域の全長であり得る）。

20

#### 【0384】

ブロック3670において、前記量が量閾値と比較されて、試料の分類が決定される。例として、分類は、生物ががんを有しているかどうか、がんのステージ、およびがんの予後であり得る。一実施形態では、全ての異常な領域が計数され、それらの領域がどこに出現するかにかかわらず、単一の閾値が用いられる。別の実施形態では、閾値は、計数された領域の位置およびサイズに基づいて変動し得る。例えば、特定の染色体または染色体腕上の領域の量は、その特定の染色体（または腕）の閾値と比較され得る。複数の閾値を用いてもよい。例えば、特定の染色体（または腕）上の異常な領域の量は、第一の閾値よりも大きくなくてはならず、ゲノム内の異常な領域の総量は第二の閾値よりも大きくなくてはならない。閾値は、欠失または増幅を示すことが決定された領域の割合であり得る。

30

#### 【0385】

領域の量に対するこの閾値は、計数された領域において不均衡がどれだけ強いかに依存し得る。例えば、がんの分類を決定するための閾値として用いられる領域の量は、各領域における異常を検出するために用いられる特異度および感度（異常な閾値）に依存し得る。例えば、異常な閾値が低い場合（例えば2のZ値）、量閾値は、高く（例えば、150）あることが選択され得る。しかし、異常な閾値が高い場合（例えば、3のZ値）、量閾値は低くなり得る（例えば、50）。また、異常を示す領域の量は加重値であり得、例えば、高度な不均衡を示す1つの領域は、小さな不均衡を示すだけの領域よりも高く加重され得る（すなわち、異常について単なる陽性および陰性よりも多くの分類が存在する）。一例として、Z値の和が用いられ得、それにより加重値が用いられる。

40

#### 【0386】

従って、正規化されたタグ数（または群の特性における他の各値）の有意な過剰または過小提示を示す染色体領域の量（数および/またはサイズを含み得る）は、疾患の重症度を反映するために用いられ得る。異常な正規化されたタグ数を有する染色体領域の量は、2つの因子、すなわち、腫瘍組織内の染色体異常の数（またはサイズ）および生物試料（例えば血漿）中の腫瘍由来DNAの濃度分率によって決定され得る。より進行したがんは、より多くの（且つより大きな）染色体異常を示す傾向がある。従って、より多くのがん関連染色体異常が、試料（例えば血漿）中で検出可能であり得る。より進行したがんを有する患者において、より高い腫瘍量は、血漿中の腫瘍由来DNAのより高い濃度分率をもたらすだろう。結果として、腫瘍関連染色体異常は、血漿試料中でより容易に検出される

50

であろう。

【0387】

特異度を犠牲にせずに感度を向上させるための1つの可能なアプローチは、隣接する染色体セグメントの結果を考慮することである。一実施形態では、Z値のカットオフは、2超および-2未満のままである。しかし、染色体領域は、2つの連続したセグメントが同じタイプの異常を示す(例えば、両方のセグメントが2超のZ値を有する)場合にのみ、潜在的に異常であると分類される。他の実施形態では、隣接セグメントのZ値は、より高いカットオフ値を用いて、合計され得る。例えば、3つの連続したセグメントのZ値が合計され得、5のカットオフ値が用いられ得る。この概念は、3つを超える連続したセグメントに拡張され得る。

10

【0388】

量および異常な閾値の組み合わせは、解析の目的、および生物のあらゆる予備知識(またはその欠如)にも依存し得る。例えば、健常集団をがんについて検診する場合、典型的には、領域の量(すなわち、領域の数に対する高い閾値)および領域が異常を有すると特定された場合の異常な閾値のおそらく両方において、高い特異度が用いられる。しかし、より高いリスクを有する患者(例えば、腫瘍(lump)または家族歴を訴える患者、喫煙者、慢性的なヒトパピローマウイルス(HPV)保因者、肝炎ウイルス保因者、または他のウイルス保因者)では、より高い感度(より少ない偽陰性)を持たせるために、閾値はより低くなり得る。

20

【0389】

一実施形態では、染色体異常を検出するために1Mb分解能および6.3%の腫瘍由来DNAというより低い検出限界が用いられる場合、各1Mbセグメントにおける分子の数は、60,000であることが必要となる。これは、ゲノム全体においておよそ1.8億(60,000リード/Mb $\times$ 3,000Mb)の整列可能なリードに置き換えられる。

【0390】

より小さなセグメントサイズは、より小さな染色体異常を検出するためのより高い分解能を与える。しかし、これは、全体で解析される分子の数の要求を増加させる。より大きなセグメントサイズは、分解能を犠牲にして、解析に必要な分子の数を減少させる。従って、より大きな異常のみが検出され得る。ある実施では、より大きな領域が用いられ得、異常を示すセグメントが細分割され得、これらの小領域が解析されてより良好な分解能が得られ得る(例えば、上記の通り)。検出される欠失または増幅のサイズ(または検出するための最低濃度)についての推定を有する場合、解析される分子の数は減少し得る。

30

【0391】

B. 亜硫酸水素塩処理血漿DNAの配列決定に基づくCNA

ゲノムワイドな低メチル化およびCNAは、腫瘍組織において頻繁に観察され得る。ここで、CNAおよびがん関連メチル化変化の情報が血漿DNAの亜硫酸水素塩配列決定から同時に得られ得ることを示す。それら2つのタイプの解析は同じデータセットに対して実行することができるため、CNA解析のための追加のコストは実質的に存在しない。他の実施形態では、メチル化情報および遺伝情報を得るために異なる手順が用いられ得る。他の実施形態では、CNA解析と組み合わせて、がん関連高度メチル化に対する同様の解析が行われ得る。

40

【0392】

図37Aは、患者TBR36の腫瘍組織、非亜硫酸水素塩(BS)処理血漿DNAおよび亜硫酸水素塩処理血漿DNAのCNA解析(内側から外側に)を示している。図37Aは、患者TBR36の腫瘍組織、非亜硫酸水素塩(BS)処理血漿DNAおよび亜硫酸水素塩処理血漿DNAのCNA解析(内側から外側に)を示している。最外側の環は染色体模式図を示している。各ドットは1Mb領域の結果を表している。緑色、赤色および灰色のドットは、それぞれ、コピー数増加を有する領域、コピー数減少を有する領域およびコピー数変化が無い領域を表している。血漿解析において、Z値が示される。2本の同心性の線の間には5の差異が存在する。腫瘍組織解析において、コピー数が示される。2本の

50

同心性の線の間には1つのコピー差異が存在する。図38Aは、患者TBR34の腫瘍組織、非亜硫酸水素塩(BS)処理血漿DNAおよび亜硫酸水素塩処理血漿DNA(内側から外側に)のCNA解析を示している。亜硫酸水素塩処理血漿試料および非亜硫酸水素塩処理血漿試料において検出されたCNAのパターンは一致した。

【0393】

腫瘍組織、非亜硫酸水素塩処理血漿および亜硫酸水素塩処理血漿において検出されたCNAのパターンは一致した。亜硫酸水素塩処理血漿および非亜硫酸水素塩処理血漿の結果の間の一致をさらに評価するために、散布図が作成される。図37Bは、患者TBR36の1Mbピンの亜硫酸水素塩処理血漿および非亜硫酸水素塩処理血漿を用いるCNAの検出におけるZ値間の関連性を示す、散布図である。それら2つの解析のZ値の間に正相関が観察された( $r = 0.89$ 、 $p < 0.001$ 、ピアソン相関)。図38Bは、患者TBR34の1Mbピンの亜硫酸水素塩処理血漿および非亜硫酸水素塩処理血漿を用いるCNAの検出におけるZ値間の関連性を示す、散布図である。それら2つの解析のZ値の間に正相関が観察された( $r = 0.81$ 、 $p < 0.001$ 、ピアソン相関)。

10

【0394】

C. がん関連CNAおよびメチル化変化の相乗的解析

上記のように、CNAの解析は各1Mb領域内の配列リードの数の計数を含み得るが、一方、メチル化密度の解析は、メチル化されているCpGジヌクレオチドにおけるシトシン残基の割合の検出が含まれ得る。これら2つの解析の組み合わせは、がんの検出において相乗的な情報を与え得る。例えば、メチル化分類およびCNA分類が用いられることで、がんのレベルの第三の分類が決定され得る。

20

【0395】

一実施形態では、がん関連CNAまたはメチル化変化のいずれかの存在が用いられて、がんの潜在的な存在が示され得る。そのような実施形態において、がんを検出する感度は、CNAまたはメチル化変化が検査対象の血漿に存在する場合に増加し得る。別の実施形態では、両方の変化の存在が用いられて、がんの存在が示され得る。そのような実施形態において、これら2つのタイプの変化のいずれかが幾人かの非がん対象において潜在的に検出され得るため、検査の特異度は向上され得る。従って、第三の分類は、第一の分類および第二の分類の両方ががんを示す場合にのみ、がん陽性であり得る。

【0396】

26人のHCC患者および22人の健常対象が募集した。血液試料を各対象から採取し、血漿DNAを亜硫酸水素塩処理後に配列決定した。HCC患者において、血液試料は診断時に採取された。有意な量のCNAの存在は、例えば、-3未満または3超のZ値を示す5%超のピンを有するものとして定義した。有意な量のがん関連低メチル化の存在は、-3未満のZ値を示す3%超のピンを有するものとして定義した。例として、領域(ピン)の量は、ピンの生の数、割合、およびピンの長さとして表され得る。

30

【0397】

表3は、亜硫酸水素塩処理血漿DNAに対する大規模並列配列決定を用いた、26人のHCC患者の血漿における有意な量のCNAおよびメチル化変化の検出を示している。

【0398】

40

【表 3】

表 3

		CNA	
		有り	無し
メチル 化変化	有り	12	6
	無し	1	7

10

## 【0399】

がん関連メチル化変化およびCNAの検出率は、それぞれ、69%および50%であった。がんの潜在的な存在を示すためにいずれかの判定基準の存在が用いられた場合、検出率（すなわち、診断鋭敏度）は73%に向上した。

## 【0400】

CNA（図39A）またはメチル化変化（図39B）の存在を示す2人の患者の結果が示される。図39Aは、HCC患者TBR240の亜硫酸水素塩処理血漿のCNA（内側の環）およびメチル化解析（外側の環）を示す、Circosプロットである。CNA解析において、緑色、赤色および灰色のドットは、それぞれ、染色体の増加を有する、染色体の減少を有する、およびコピー数に変化が無い領域を表す。メチル化解析において、緑意図、赤色および灰色のドットは、それぞれ、高度メチル化、低メチル化および正常なメチル化を有する領域を表す。この患者において、がん関連CNAが血漿において検出されたが、メチル化解析は有意な量のがん関連低メチル化を示さなかった。図39Bは、HCC患者TBR164の亜硫酸水素塩処理血漿の、CNA（内側の環）およびメチル化解析（外側の環）を示す、Circosプロットである。この患者において、がん関連低メチル化が血漿において検出された。しかし、有意な量のCNAを観察することができなかった。CNAおよびメチル化変化の両方の存在を示す2人の患者の結果は図48A（TBR36）および図49A（TBR34）に示される。

20

30

## 【0401】

表4は、亜硫酸水素塩処理血漿DNAに対する大規模並列配列決定を用いた、22人の対照患者の血漿における有意な量のCNAおよびメチル化変化の検出を示している。ブートストラッピング（すなわち、一個抜き）法を各対照患者の評価に用いた。従って、特定の対象が評価された場合、その他の21人の対象は対照群の平均値およびSDの算出に用いられた。

## 【0402】

【表 4】

		CNA	
		有り	無し
メチル化 変化	有り	1	2
	無し	1	18

40

表 4

## 【0403】

50

有意な量のメチル化変化およびCNAの検出の特異度は、それぞれ、86%および91%であった。両方の判定基準の存在ががんの潜在的な存在を示すために必要であった場合に、特異度は95%まで向上した。

#### 【0404】

一実施形態では、CNAおよび/または低メチル化陽性の試料はがん陽性に見なされ、試料は、その両方が検出できない場合、陰性に見なされる。「または」の論法を用いることで、より高い感度が与えられる。別の実施形態では、CNAおよび低メチル化の両方について陽性である試料のみが、がん陽性に見なされ、それにより、より高い特異度が与えられる。さらに別の実施形態では、3階層の分類が用いられ得る。対象は、i . 共に正常 ; i i . 一方が異常 ; i i i . 共に異常に分類される。

10

#### 【0405】

これら3つの分類に異なる追跡戦略が用いられ得る。例えば、(i i i)の対象は、最も集中的な追跡プロトコル(例えば、全身イメージングを含む)を施され得 ; (i i)の対象は、それほど集中的でない追跡プロトコル(例えば、数週間という比較的短い時間間隔の後の反復血漿DNA塩基配列決定法)を施され得 ; (i)の対象は、最も集中的でない追跡プロトコル(例えば、幾年後かの再検査)を施され得る。他の実施形態では、メチル化およびCNAの測定値が、分類をさらに細分化するための他の臨床的パラメーター(例えば、イメージングの結果または血清生化学)と組み合わせて用いられ得る。

#### 【0406】

D . 治療を目的とした処置後の血漿DNA解析の予後値

20

血漿におけるがん関連CNAおよび/またはメチル化変化の存在は、がん患者の循環血液中の腫瘍由来DNAの存在を示す。これらのがん関連変化の減少または排除が、処置(例えば、外科手術)後に期待される。一方、処置後における血漿中のこれらの変化の持続は、身体からの全腫瘍細胞の不完全な除去を示し得、疾患再発の有用な予後判定因子となり得る。

#### 【0407】

血液試料を、腫瘍の治療を目的とした外科的切除の1週間後に、2人のHCC患者、TBR34およびTBR36から採取した。CNAおよびメチル化解析を、亜硫酸水素塩処理した処置後血漿試料に対して行った。

#### 【0408】

30

図40Aは、HCC患者TBR36の腫瘍の外科的切除の前(内側の環)および後(外側の環)に採取された、亜硫酸水素塩処理血漿DNAに対するCNA解析を示している。各ドットは1Mb領域の結果を表している。緑色、赤色および灰色のドットは、それぞれ、コピー数増加を有する領域、コピー数減少を有する領域およびコピー数に変化が無い領域を表している。処置前に観察されたCNAの大部分は腫瘍切除後に消失した。-3未満または3超のZ値を示すピンの割合は、25%から6.6%に減少した。

#### 【0409】

図40Bは、HCC患者TBR36の腫瘍の外科的切除の前(内側の環)および後(外側の環)に採取された、亜硫酸水素塩処理血漿DNAに対するメチル化解析を示している。緑色、赤色および灰色のドットは、それぞれ、高度メチル化、低メチル化および正常なメチル化を有する領域を表している。有意な低メチル化を示すピンの割合に90%から7.9%への顕著な減少が見られ、低メチル化の程度も顕著な減少を示した。この患者は、腫瘍切除の22ヶ月後に完全な臨床的寛解を得た。

40

#### 【0410】

図41Aは、HCC患者TBR34の腫瘍の外科的切除の前(内側の環)および後(外側の環)に採取された、亜硫酸水素塩処理血漿DNAに対するCNA解析を示している。腫瘍の外科的切除後にCNAを示すピンの数および影響を受けたピンにおけるCNAの規模は共に減少するが、残留CNAが手術後血漿試料中に観察され得る。赤色の環は、残留CNAが最も明白であった領域を強調している。-3未満または3超のZ値を示すピンの割合は57%から12%に減少した。

50

## 【0411】

図41Bは、HCC患者TBR34の腫瘍の外科的切除の前（内側の環）および後（外側の環）に採取された、亜硫酸水素塩処理血漿DNAに対するメチル化解析を示している。低メチル化の規模は腫瘍切除後に減少し、低メチル化ピンの平均Z値は-7.9から-4.0に減少した。しかし、-3未満のZ値を有するピンの割合は逆の変化を示し、41%から85%に増加した。この観察は、処置後における残留がん細胞の存在を潜在的に示している。臨床的に、腫瘍切除の3ヵ月後に残りの非切除肝臓において、腫瘍小結節の複数の病巣が検出された。肺転移が外科手術後4ヵ月目から観察された。患者は、手術から8ヵ月後に局所再発および転移性疾患によって死亡した。

## 【0412】

これら2人の患者（TBR34およびTBR36）における観察は、CNAおよび低メチル化の、残留したがん関連変化の存在を、治療を目的とした処置後のがん患者のモニタリングおよび予後判定に用いることができることを示唆している。またデータは、検出された血漿CNAの量における変化の程度が、治療有効性の予後判定およびモニタリングのための、血漿DNA低メチル化の範囲における変化の程度の評価と共に、相乗的に用いられ得ることを示した。

## 【0413】

従って、いくつかの実施形態において、1つの生物試料が処置前に得られ、第二の生物試料が処置（例えば、外科手術）後に得られる。第一の値が第一の試料において得られ、例えば、領域のZ値（例えば、領域メチル化レベルおよびCNAの正規化された数）および低メチル化およびCNA（例えば、増幅または欠失）を示す領域の数等である。第二の値は第二の試料において得られ得る。別の実施形態では、第三、またはさらに追加された試料が、処置後に得られ得る。低メチル化およびCNA（例えば、増幅または欠失）を示す領域の数が、第三またはさらに追加された試料から得られ得る。

## 【0414】

図40Aおよび図41Aについての上記のように、第一の試料における低メチル化を示す領域の第一の数は、第二の試料における低メチル化を示す領域の第二の量と比較され得る。図40Bおよび図41Bについての上記のように、第一の試料における低メチル化を示す領域の第一の量は、第二の試料における低メチル化を示す領域の第二の量と比較され得る。第一の量と第二の量との比較および第一の数と第二の数との比較が用いられて、処置の予後が決定され得る。種々の実施形態において、それらの比較の一方のみが予後の決定要因になり得、あるいは両方の比較が用いられ得る。第三またはさらに追加された試料が得られる実施形態において、これらの試料のうちの一つまたは複数を用いられて、それ自体により、または第二の試料との組み合わせにおいて、処置の予後が決定され得る。

## 【0415】

ある実施において、予後は、第一の量および第二の量間の第一の差異が第一の差異閾値を下回る場合に、悪化することが予想される。別の実施において、予後は、第一の数および第二の数の間の第二の差異が第二の差異閾値を下回る場合に、悪化することが予想される。前記閾値は同じであっても異なってもよい。一実施形態では、第一の差異閾値および第二の差異閾値はゼロである。従って、上記の例において、メチル化の値の間の差異は、患者TBR34のさらに悪い予後を示す。

## 【0416】

予後は、第一の差異および/または第二の差異が同じ閾値またはそれぞれの閾値を上回る場合により良くなり得る。予後の分類は、差異がどれだけ大きく閾値を上回るまたは下回っているかに依存し得る。複数の閾値が種々の分類を与えるために用いられ得る。より大きな差異であるほど、より良い予後が予想され得、より小さな差異であるほど（およびさらには負の値）、より悪い予後が予想され得る。

## 【0417】

いくつかの実施形態において、種々の試料が採取される時点も記録される。そのような時間パラメータを用いることで、前記量の変化の動態または速度が決定され得る。一実

10

20

30

40

50

施形態では、血漿における腫瘍関連低メチル化の急速な減少および/または血漿における腫瘍関連CNAの急速な減少は、良好な予後を予測するものである。逆に、血漿における腫瘍関連低メチル化の静的(static)増加または急速な増加および/または腫瘍関連CNAの静的増加または急速な増加は、不良な予後を予測するものである。メチル化およびCNAの測定は、臨床成績の予測のために、他の臨床的パラメーター(例えば、イメージング結果または血清生化学またはタンパク質マーカー)と組み合わせて用いることができる。

#### 【0418】

実施形態では血漿以外に他の試料が用いられ得る。例えば、腫瘍関連性のメチル化異常(例えば、低メチル化)および/または腫瘍関連CNAが、がん患者の血液中で循環している腫瘍細胞から、尿、便、唾液、痰、胆汁液、腭液、子宮頸部スワブ、生殖器系(例えば、膣)からの分泌物、腹水、胸膜液、精液、汗および涙中の無細胞DNAまたは腫瘍細胞から、測定され得る。

10

#### 【0419】

種々の実施形態において、腫瘍関連メチル化異常(例えば、低メチル化)および/または腫瘍関連CNAは、乳がん、肺がん、結腸直腸がん、膵がん、卵巣がん、上咽頭癌、子宮頸がん、メラノーマ、脳腫瘍等を有する患者の血液または血漿から検出され得る。実際に、メチル化およびCNA等の遺伝子変化はがんにおいて普遍的な現象であるため、前記アプローチは全てのがん型に用いられ得る。メチル化およびCNAの測定値は、臨床成績の予測のために、他の臨床的パラメーター(例えば、イメージング結果)と組み合わせて用いられ得る。実施形態は、前癌病変部(例えば、腺腫)を有する患者の検診およびモニタリングにも用いられ得る。

20

#### 【0420】

従って、一実施形態では、生物試料は処置前に採取され、CNAおよびメチル化の測定は処置後に繰り返される。前記測定から、欠失または増幅を示すことが決定された領域の後の第一の量が得られ得、各領域カットオフ値を超える領域メチル化レベルを有することが決定された領域の後の第二の量が得られ得る。第一の量が後の第一の量と比較され、第二の量が後の第二の量と比較されることで、生物の予後が決定され得る。

#### 【0421】

生物の予後を決定するための比較には、第一の量および後の第一の量の間第一の差異を決定することが含まれ得、第一の差異が一つまたは複数の第一の差異閾値と比較されることで、予後が決定され得る。生物の予後を決定するための比較には、第二の量および後の第二の量の間第二の差異を決定することが含まれ得、第二の差異は一つまたは複数の第二の差異閾値と比較され得る。閾値は、ゼロまたは別の数であり得る。

30

#### 【0422】

予後は、第一の差異が第一の差異閾値を上回る場合よりも、第一の差異が第一の差異閾値を下回る場合に、悪化することが予測され得る。予後は、第二の差異が第二の差異閾値を上回る場合よりも、第二の差異が第二の差異閾値を下回る場合に、悪化することが予測され得る。処置の例としては、免疫療法、外科手術、放射線療法、化学療法、抗体に基づく療法、遺伝子療法、エピジェネティック療法または標的療法が挙げられる。

40

#### 【0423】

E. 性能

CNAおよびメチル化解析における異なる数の配列リードおよび異なる数のピンサイズの診断能が以下に記載される。

#### 【0424】

1. 配列リードの数

一実施形態に従って、32人の健常対照患者、26人の肝細胞癌を有する患者および他のがん型(例えば、上咽頭癌、乳がん、肺がん、神経内分泌がんおよび平滑筋肉腫)を有する20人の患者の、血漿DNAが解析された。32人中22人の健常対象が参照群として無作為に選択された。これら22人の参照個体の平均値および標準偏差(SD)が、メ

50

チル化密度およびゲノム表現 (genomic representation) の正常範囲を決定するために用いられた。各個体の血漿試料から抽出された DNA が、イルミナ社製ペアエンド配列決定キットを用いる配列決定ライブラリー (sequencing library) 構築のために用いられた。配列決定ライブラリーは次に、非メチル化シトシン残基をウラシルに変換する亜硫酸水素塩処理を受けた。各血漿試料の亜硫酸水素塩処理された配列決定ライブラリーは、イルミナ社製 HiSeq 2000 配列決定装置の 1 レーンを用いて配列決定された。

【0425】

ベースコールの後、断片末端のアダプター配列および低クオリティ塩基 (low quality base) (すなわち、クオリティスコアが 5 未満) が除去された。FASTQ 形式のトリミングされたリードは次に、Methy-Pipe と称されるメチル化データ解析パイプラインによって処理された (P Jiang et al. 2010, IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine, doi:10.1109/BIBMW.2010.5703866)。亜硫酸水素塩変換した配列決定リードを整列させるために、最初に、参照ヒトゲノム (NCBI build 36/hg19) を用いて、ワトソン鎖およびクリック鎖上で別々に、全シトシン残基のチミンへのインシリコ変換が行われた。次に、処理された全てのリードにおいて各シトシンのチミンへのインシリコ変換が行われ、それぞれの変換された残基の位置情報が保持された。SOAP2 が、変換されたリードを 2 つの事前変換された参照ヒトゲノムに整列させるために用いられ (R Li et al. 2009 Bioinformatics 25:1966-1967)、最高 2 つのミスマッチが整列されたリードのそれぞれに許された。ユニークなゲノム位置にマッピング可能なリードのみが、下流の解析に用いられた。ワトソン鎖およびクリック鎖の両方にマッピングされるあいまいなリードおよび重複 (クローン) リードは排除された。CpG ジヌクレオチド配列内のシトシン残基が下流のメチル化解析に用いられた。アライメントの後、配列決定されたリード上に元々存在したシトシンは、インシリコ変換中に保持された位置情報に基づいて、回復された。CpG ジヌクレオチド中の回復されたシトシンは、メチル化状態としてスコアリングされた。CpG ジヌクレオチド中のチミンは、非メチル化状態としてスコアリングされた。

10

20

30

【0426】

メチル化解析において、ゲノムは等しいサイズのビンに分割された。検査されたビンのサイズには、50 kb、100 kb、200 kb および 1 Mb が含まれる。各ビンのメチル化密度は、CpG 位置におけるシトシンの総数で除算された、CpG ジヌクレオチドの配列中のメチル化シトシンの数として算出された。他の実施形態では、ビンサイズはゲノム全域で不等であり得る。一実施形態では、不等なサイズのそのようなビンの中の各ビンが、複数の対象にわたって比較される。

【0427】

検査症例の血漿メチル化密度が正常であるかどうかを決定するために、メチル化密度が参照群の結果と比較された。32人中22人の健常対象が、メチル化 Z 値 ( $Z_{meth}$ ) の算出のために、参照群として無作為に選択された。

【0428】

【数26】

40

$$Z_{meth} = \frac{MD_{test} - \overline{MD_{ref}}}{MD_{SD}}$$

【0429】

式中、

【0430】

【数 2 7】

$$MD_{test}$$

【0 4 3 1】

は、検査症例の特定の 1 M b ピンのメチル化密度であり；

【0 4 3 2】

【数 2 8】

10

$$\overline{MD}_{ref}$$

は、参照群の対応するピンの平均メチル化密度であり；

【0 4 3 3】

【数 2 9】

20

$$MD_{SD}$$

【0 4 3 4】

は、参照群の対応するピンのメチル化密度の S D である。

【0 4 3 5】

CNA 解析において、各 1 M b ピンにマッピングされる配列決定されたリードの数が決定された (KCA Chan et al. 2013 Clin Chem 59:211-24)。先に報告された (EZ Chen et al. 2011 PLoS One 6: e21791) 局所加重散布図平滑化回帰 (Locally Weighted Scatter Plot Smoothing regression) を用いる GC の偏りに対する補正の後、各ピンにおける配列決定されたリード密度が決定された。血漿解析において、検査症例の配列決定されたリード密度が参照群と比較されて、CNA の Z 値、

30

【0 4 3 6】

【数 3 0】

$$Z_{CNA}$$

【0 4 3 7】

が算出された。

40

【0 4 3 8】

【数 3 1】

$$Z_{CNA} = \frac{RD_{test} - \overline{RD}_{ref}}{RD_{SD}}$$

【0 4 3 9】

式中、

50

【 0 4 4 0 】

【 数 3 2 】

$$RD_{test}$$

【 0 4 4 1 】

は、検査症例の特定の 1 Mb ピンの配列決定されたリード密度であり；

【 0 4 4 2 】

【 数 3 3 】

10

$$\overline{RD}_{ref}$$

【 0 4 4 3 】

は、参照群の対応するピンの配列決定されたリード密度の平均値であり；

【 0 4 4 4 】

【 数 3 4 】

20

$$RD_{SD}$$

【 0 4 4 5 】

は、参照群の対応するピンの配列決定されたリード密度の SD であった。ピンは、ピンの  $Z_{CNA}$  が - 3 未満または 3 超である場合に、CNA を示すと定義された。

【 0 4 4 6 】

9300 万の整列されたリード（範囲：3900 万～1 億 4200 万）の平均値が症例毎に得られた。診断能に対する配列決定されたリードの数の減少の影響を評価するために、各症例から 1000 万の整列されたリードが無作為に選択された。配列決定されたリードが減少したデータセットにおける、各 1 Mb ピンの参照範囲を確立するために、同じ参照個体群が用いられた。有意な低メチル化（すなわち、 $Z_{meth}$  が - 3 未満）を示すピンの割合および CNA（すなわち、 $Z_{CNA}$  が - 3 未満または 3 超）を有するピンの割合が、各症例において決定された。1 レーンからの全ての配列決定されたリードおよび症例毎の 1000 万のリードを用いたデータセットに対するゲノムワイドな低メチル化および CNA 解析の診断能を図示するために、受信者操作特性（ROC）曲線が用いられた。ROC 解析において、32 人全ての健常対象が解析に用いられた。

30

【 0 4 4 7 】

図 4 2 は、異なる数の配列決定されたリードを用いたゲノムワイドな低メチル化解析の診断能の図を示している。低メチル化解析において、ROC 曲線の曲線下面積は、1 レーンからの全ての配列決定されたリードおよび症例毎の 1000 万のリードを解析した 2 つのデータセット間で、有意差があるとは言えなかった（ $P = 0.761$ ）。CNA 解析において、診断能は、配列決定されたリードの数が、1 レーンのデータの使用から、1000 万に、減少した場合に、曲線下面積の有意な減少を伴って劣化した（ $P < 0.001$ ）。

40

【 0 4 4 8 】

2. 異なるピンサイズの使用の影響

ゲノムの 1 Mb ピンへの分割の他に、より小さなピンサイズが使用可能であるかどうか

50

も調べられた。理論上は、より小さなピンの使用は、ピン内のメチル化密度における変動性を減少させ得る。これは、メチル化密度が異なるゲノム領域間で大きく異なり得るためである。ピンがより大きい場合、異なるメチル化密度を有する領域を含む確率は増加するため、ピンのメチル化密度における変動性の全体的な増加に繋がる。

【0449】

より小さなピンサイズの使用は領域間差異に関連するメチル化密度における変動性を減少させ得るが、これは、一方で、特定のピンにマッピングされる配列決定されたリードの数を減少させる。個々のピンにマッピングされるリードの減少は、抽出変動により、変動性を増加させる。メチル化密度において最も小さな全体的な変動性を生じ得る最適なピンサイズは、特定の診断的適用の要求に応じて、実験的に決定され得る（例えば、試料毎の配列決定されたリードの総数および使用されるDNA配列決定装置の型）。

10

【0450】

図43は、異なるピンサイズ（50kb、100kb、200kbおよび1Mb）を用いた、ゲノムワイドな低メチル化解析に基づくがんの検出における、ROC曲線を示す図である。示されるP値は、1Mbのピンサイズを用いた曲線下面積比較のP値である。ピンサイズが1Mbから200kbに減少した場合に、向上の傾向が見ることができる。

【0451】

#### F. 累積確率スコア

メチル化およびCNAの領域の量は、様々な値であり得る。上記例により、試料ががんに関連しているかどうかを分類するためのパラメーターとしての、カットオフ値を超過する領域の数、または有意な低メチル化もしくはCNAを示した領域の割合が説明された。そのようなアプローチは、個々のピンにおける異常の規模を考慮していない。例えば、 $-3.5$ の $Z_{meth}$ を有するピンと、 $-3.0$ の $Z_{meth}$ を有するピンは、共に有意な低メチル化を有すると分類されるため、同一である。しかし、血漿中の低メチル化変化の程度（すなわち、 $Z_{meth}$ 値の規模）は、試料中のがん関連DNAの量によって影響され、そのため、異常を示すピンの割合の情報を補足して、腫瘍量を反映し得る。血漿試料中の腫瘍DNAのより高い濃度分率は、より低いメチル化密度をもたらし、これはより低い $Z_{meth}$ 値に換算される。

20

【0452】

#### 1. 診断パラメーターとしての累積確率スコア

30

異常の規模から得られる情報を利用するため、累積確立（CP）スコアと称されるアプローチが開発される。正規分布確率関数に基づいて、各 $Z_{meth}$ 値が、そのような観察が偶然に得られる確率に換算された。

【0453】

CPスコアは、 $-3$ 未満の $Z_{meth}$ を有するピン（ $i$ ）について、

【0454】

【数35】

$$CP \text{ スコア} = \sum -\log(\text{Prob}_i)$$

40

【0455】

として算出され、式中、 $\text{Prob}_i$ は、自由度3を有する学生t分布に従うピン（ $i$ ）の $Z_{meth}$ の確率であり、 $\log$ は自然対数関数である。別の実施形態では、10（または他の数字）を低とする対数が用いられ得る。他の実施形態では、他の分布（例えば、限定はされないが、正規分布および分布）が、Z値をCPに変換するために適用され得る。

【0456】

より大きなCPスコアは、正規母集団にそのような逸脱したメチル化密度を偶然に有す

50

る、確率がより低いことを示している。従って、高いC Pスコアは、試料中に異常な低メチル化DNAを有する（例えば、がん関連DNAの存在）可能性がより高いことを示している。

#### 【0457】

異常を示すピンの割合と比較すると、C Pスコア測定はより高いダイナミックレンジを有している。異なる患者間の腫瘍量は大きく異なり得るが、より大きな範囲のC P値は、比較的高い、および比較的低い腫瘍量を有する患者の腫瘍量を反映するのに有用である。さらに、C Pスコアの使用は、潜在的に、血漿中の腫瘍関連DNAの濃度における変化を検出するためのより高い感度となり得る。これは、治療応答および予後判定のモニタリングに有利である。従って、治療中のC Pスコアの減少は、良好な治療応答を示すものである。治療中のC Pスコアの減少の欠如またはさらには増加は、応答が乏しいことまたは応答の欠如を示している。予後判定において、高いC Pスコアは、高い腫瘍量を示しており、不良な予後（例えば、死亡または腫瘍進行の確率がより高い）を示唆するものである。

10

#### 【0458】

図44Aは、累積確立（C P）および異常を有するピンの割合の診断能を示している。それら2つのタイプの診断アルゴリズムの曲線下面積の間に有意差はなかった（ $P = 0.791$ ）。

#### 【0459】

図44Bは、全体的な低メチル化、C G島高度メチル化およびC N Aの血漿解析の診断能を示している。試料あたり1レーンの配列決定（低メチル化解析については200 kbピンサイズ、C N Aについては1 Mbピンサイズ、そしてC G島は、カリフォルニア大学サンタクルズ校（UCSC）が主催したデータベースに従って定義された）を行ったところ、3種の解析全ての曲線下面積は0.90を上回った。

20

#### 【0460】

その後の解析において、対照患者における最も高いC Pスコアが、前記3種の解析のそれぞれに対するカットオフとして用いられた。これらのカットオフの選択は、100%の診断特異度を与えた。全体的な低メチル化、C G島高度メチル化およびC N A解析の診断感度は、それぞれ、78%、89%および52%であった。46人中43人のがん患者において、これら3種の異常のうち少なくとも1つが検出され、これにより、93.4%の感度および100%の特異度が得られた。これらの結果は、これら3種の解析ががんの検出に相乗的に用いられ得ることを示している。

30

#### 【0461】

図45は、肝細胞癌患者における全体的な低メチル化、C G島高度メチル化およびC N Aの結果を含む、表を示している。これら3種の解析におけるC Pスコアのカットオフ値は、それぞれ、960、2.9および211であった。陽性のC Pスコア結果は、太字にされ、且つ下線が引かれた。

#### 【0462】

図46は、肝細胞癌以外のがんを有する患者における全体的な低メチル化、C G島高度メチル化およびC N Aの結果を含む、表を示している。これら3種の解析におけるC Pスコアのカットオフ値は、それぞれ、960、2.9および211であった。陽性のC Pスコア結果は、太字にされ、且つ下線を引かれた。

40

#### 【0463】

### 2. がんモニタリングへのC Pスコアの適用

連続試料が、処置の前および後にHCC患者TBR34から採取された。これらの試料は、全体的な低メチル化について解析された。

#### 【0464】

図47は、症例TBR34の血漿メチル化の連続解析を示している。最内側の環は、軟膜（黒色）および腫瘍組織（紫色）のメチル化密度を示している。これらの血漿試料において、各1 Mbピンの $Z_{meth}$ が示されている。2本の線の間の変異は、5の $Z_{meth}$ 変異を表している。赤色および灰色のドットは、参照群と比較して、低メチル化を有するピンお

50

よびメチル化密度における変化を有さないピンを表している。2番目に内側の環から外側に向かって、それぞれ、処置前、腫瘍切除の3日後および腫瘍切除の2ヵ月後に採取された血漿試料である。処置前では、高度な低メチル化が血漿中に観察され得、18.5%超のピンが-10未満の $Z_{meth}$ を有していた。腫瘍切除の3日後では、血漿中の低メチル化の程度が減少したことが観察され得、いずれのピンも-10未満の $Z_{meth}$ を有さなかった。

【0465】

【表5】

表5

症例番号	時点	メチル化解析		
		有意な低メチル化を示すピンの割合	累積確率 (CP) スコア	累積Z値
TBR34	手術前	62.6%	37,573	14,285
	手術の3日後	80.5%	17,777	9,195
	手術の2ヵ月後	40.1%	15,087	5,201

【0466】

表5は、低メチル化変化の規模は腫瘍の外科的切除の3日後に減少したが、異常を示すピンの割合は逆に増加を示したことを示している。一方、CPスコアは、血漿中の低メチル化の程度における減少をより正確に示し、腫瘍量における変化をより反映するものであり得る。

【0467】

手術(OT)の2ヵ月後でも、低メチル化変化を示すピンが有意な割合で存在した。CPスコアも、およそ15,000において静止したままであった。この患者は後に、3ヵ月目の残りの非切除肝臓において、多巣性の腫瘍堆積(外科手術の時点において事前に未知であった)を有すると診断され、手術の4ヵ月後には複数の肺転移を有すると報告された。前記患者は、手術の8ヵ月後に転移性疾患により死亡した。これらの結果により、CPスコアが、腫瘍量の反映において、異常を有するピンの割合よりも、より強力であり得ることが示唆された。

【0468】

全体として、CPは、血漿中の腫瘍DNAの量の測定を必要とする適用に有用であり得る。そのような適用の例としては、がん患者の予後判定およびモニタリング(例えば、治療に対する応答を観察するための、または腫瘍進行を観察するための)が挙げられる。

【0469】

累積Z値はZ値の直和である(すなわち、確率への変換が無い)。この例において、累積Z値は、CPスコアと同じ挙動を示す。他の例において、CPは、CPスコアのダイナミックレンジがより大きいことから、残存疾患のモニタリングにおいて、累積Z値よりも高感度であり得る。

【0470】

X. メチル化に対するCNAの影響

がんのレベルの各分類を決定するためのCNAおよびメチル化の使用(ここで、これら

10

20

30

40

50

の分類は組み合わせられることで第三の分類を与える)が、上に記載された。そのような組み合わせに加え、CNAは、メチル化解析におけるカットオフ値を変化させるために、および異なるCNA特徴を有する領域群のメチル化レベルを比較することにより偽陽性を特定するために、用いられ得る。例えば、過剰なメチル化レベル(例えば、3超の $Z_{CNA}$ )は、正常な存在量のメチル化レベル(例えば、 $-3 < Z_{CNA} < 3$ )と比較され得る。まず、メチル化レベルに対するCNAの影響が記載される。

#### 【0471】

A. 染色体の増加および減少を有する領域におけるメチル化密度の変化

腫瘍組織は概して全体的な低メチル化を示すため、がん患者の血漿中の腫瘍由来DNAの存在は、非がん対象と比較した場合、メチル化密度の減少をもたらす。がん患者の血漿中の低メチル化の程度は、理論上は、血漿試料中の腫瘍由来DNAの濃度分率に比例する。

10

#### 【0472】

腫瘍組織における染色体増加を示す領域において、さらなる量の腫瘍DNAが、増幅したDNAセグメントから血漿中に放出される。この、血漿への腫瘍DNAの寄与の増加は、理論上は、罹患領域の血漿DNA中のより高度な低メチル化をもたらす。さらなる因子は、増幅を示すゲノム領域が、腫瘍細胞に増殖有意性を与えていることが予想され、従って発現されていることが予想されるということである。そのような領域は概して低メチル化状態である。

20

#### 【0473】

対照的に、腫瘍組織において染色体減少を示す領域では、血漿への腫瘍DNAの寄与の減少は、コピー数変化が無い領域と比較して、より低度の低メチル化をもたらす。さらなる因子は、腫瘍細胞において欠失しているゲノム領域が腫瘍抑制遺伝子を含み得ること、およびそのような発現停止した領域を有することが腫瘍細胞に有利であり得ることである。従って、そのような領域は、高度メチル化されている可能性がより高いことが予想される。

#### 【0474】

ここで、この影響を説明するために、2人のHCC患者(TBR34およびTBR36)の結果が用いられる。図48A(TBR36)および図49A(TBR34)は、染色体の増加または減少を有する領域を強調している環、および対応するメチル化解析を有する

30

#### 【0475】

図48Aは、HCC患者TBR36の亜硫酸水素塩処理血漿DNAにおけるCNA(内側の環)およびメチル化変化(外側の環)を示す、Circosプロットを示している。赤色の環は染色体の増加または減少を有する領域を強調している。染色体増加を示す領域は、コピー数変化が無い領域よりも、より低メチル化状態であった。染色体減少を示す領域は、コピー数変化が無い領域よりも、低メチル化の程度が低かった。図48Bは、HCC患者TBR36の、染色体の増加および減少を有する領域、並びにコピー数に変化が無い領域の、メチル化Z値のプロットである。コピー数変化を有さない領域と比較して、染色体増加を有する領域はより負のZ値(より低メチル化)を有し、染色体減少を有する領域はそれほど負ではないZ値(それほど低メチル化でない)を有していた。

40

#### 【0476】

図49Aは、HCC患者TBR34の亜硫酸水素塩処理血漿DNAにおけるCNA(内側の環)およびメチル化変化(外側の環)を示す、Circosプロットを示している。図49Bは、HCC患者TBR34の、染色体の増加および減少を有する領域、およびコピー数に変化が無い領域の、メチル化Z値のプロットである。染色体の増加および減少を有する領域間のメチル化密度における差異は、患者TBR34においてよりも患者TBR36においてより大きかったが、これは、患者TBR36における腫瘍由来DNAの濃度分率がより高かったためである。

50

## 【0477】

この例において、CNAを決定するために用いられた領域は、メチル化を決定するために用いられた領域と同一である。一実施形態では、それぞれの領域カットオフ値は、それぞれの領域が欠失または増幅を示すかどうか依存している。ある実施において、それぞれの領域カットオフ値（例えば、低メチル化を決定するために用いられたZ値カットオフ）は、増幅が示されない場合よりもそれぞれの領域が増幅を示す場合に、より大きな規模を有する（例えば、規模は3より大きくなり得、-3未満のカットオフが用いられ得る）。従って、低メチル化の検査において、それぞれの領域カットオフ値は、増幅が示されない場合よりもそれぞれの領域が増幅を示す場合に、より大きな負の値を有し得る。そのような実施は、がんを検出するための検査の特異度を向上させることが期待される。

10

## 【0478】

別の実施において、それぞれの領域カットオフ値は、欠失が示されない場合よりもそれぞれの領域が欠失を示す場合に、より小さな規模（例えば、3未満）を有する。従って、低メチル化の検査において、それぞれの領域カットオフ値は、欠失が示されない場合よりもそれぞれの領域が欠失を示す場合に、それほど負でない値を有し得る。そのような実施は、がんを検出するための検査の感度を向上させることが期待される。上記実施におけるカットオフ値の調整は、特定の診断シナリオの所望の感度および特異度に依存して変化し得る。他の実施形態では、メチル化およびCNAの測定は、他の臨床的パラメーター（例えば、イメージングの結果または血清生化学）と組み合わせて、がんの予測に用いられ得る。

20

## 【0479】

## B. 領域を選択するためのCNAの使用

上記のように、腫瘍組織におけるコピー数異常を有する領域において血漿メチル化密度が変化することが示された。腫瘍組織におけるコピー数増加を有する領域において、血漿への低メチル化腫瘍DNAの寄与の増加は、コピー数異常を有さない領域と比較して、血漿DNAのより大きな程度の低メチル化をもたらす。逆に、腫瘍組織におけるコピー数減少を有する領域において、血漿への低メチル化がん由来DNAの寄与の減少は、血漿DNAのより低度の低メチル化をもたらす。血漿DNAのメチル化密度および相対的な提示の間のこの関連性は、潜在的に、がん関連DNAの存在に伴う低メチル化の結果と、血漿DNA中の低メチル化の他の非癌性の原因（例えば、SLE）とを区別するために、用いられ得る。

30

## 【0480】

このアプローチを説明するために、2人の肝細胞癌（HCC）患者およびがんを有さないがSLEを有する2人の患者の血漿試料が解析された。これらの2人のSLE患者（SLE04およびSLE10）は、血漿における低メチル化およびCNAの見かけの存在を示した。患者SLE04において、84%のピンが低メチル化を示し、11.2%のピンがCNAを示した。患者SLE10において、10.3%のピンが低メチル化を示し、5.7%のピンがCNAを示した。

## 【0481】

図50Aおよび図50Bは、SLE患者SLE04およびSLE10に対する血漿低メチル化およびCNA解析の結果を示している。外側の環は、1Mb分解能においての、メチル化Z値（ $Z_{meth}$ ）を示している。-3未満のメチル化 $Z_{meth}$ を有するピンは赤色であり、-3超の $Z_{meth}$ を有するピンは灰色であった。内側の環はCNAのZ値（ $Z_{CNA}$ ）を示している。緑色、赤色および灰色のドットは、それぞれ、3超、3未満および-3~3の $Z_{CNA}$ を有するピンを表している。これら2人のSLE患者において、低メチル化およびCNAの変化が血漿中で観察された。

40

## 【0482】

メチル化およびCNAにおける変化が血漿中のがん由来DNAの存在と一貫しているかどうかを決定するために、3超、3未満および-3~3の $Z_{CNA}$ を有する領域の $Z_{meth}$ が比較された。血漿中のがん由来DNAによって寄与されるメチル化変化およびCNAにお

50

いて、 $-3$ 未満の $Z_{CNA}$ を有する領域は、より低度の低メチル化状態であることが予測され、それほど負でない $Z_{meth}$ を有した。対照的に、 $3$ 超の $Z_{CNA}$ を有する領域は、より低メチル化状態であることが予想され、より負な $Z_{meth}$ を有した。説明のために、片側順位和検定が適用されて、 $CNA$ を有する領域（すなわち、 $-3$ 未満または $3$ 超の $Z_{CNA}$ を有する領域）の $Z_{meth}$ が、 $CNA$ を有さない領域（すなわち、 $-3 \sim 3$ の $Z_{CNA}$ を有する領域）の $Z_{meth}$ と比較された。他の実施形態では、他の統計検定、例えば、限定はされないが、スチューデント $t$ 検定、分散分析（ $ANOVA$ ）検定およびクラスカル・ワリス検定が、用いられ得る。

#### 【0483】

図51Aおよび図51Bは、2人のHCC患者（TBR34およびTBR36）の血漿における、 $CNA$ を有する領域および $CNA$ を有さない領域に対する、 $Z_{meth}$ 解析を示している。 $-3$ 未満の $Z_{CNA}$ を有する領域および $3$ 超の $Z_{CNA}$ を有する領域は、それぞれ、血漿中の、過小提示を有する領域および過剰提示を有する領域を表す。TBR34およびTBR36の両方において、血漿中で過小提示された領域（すなわち、 $-3$ 未満の $Z_{CNA}$ を有する領域）は、血漿中に正常な提示を有する領域（すなわち、 $-3 \sim 3$ の $Z_{CNA}$ を有する領域）よりも、有意に高い $Z_{meth}$ （ $P$ 値 $< 10^{-5}$ 、片側順位和検定）を有した。正常な提示は、正倍数体ゲノムに期待されるものと一致する。血漿において過剰提示を有する領域（すなわち、 $3$ 超の $Z_{CNA}$ を有する領域）において、それらは、血漿において正常な提示を有する領域よりも、有意により低い $Z_{meth}$ を有した（ $P$ 値 $< 10^{-5}$ 、片側順位和検定）。これらの変化は全て、血漿試料中の低メチル化腫瘍DNAの存在と一貫した。

#### 【0484】

図51Cおよび図51Dは、2人のSLE患者（SLE04およびSLE10）の血漿における、 $CNA$ を有する領域および $CNA$ を有さない領域に対する、 $Z_{meth}$ 解析を示している。 $-3$ 未満の $Z_{CNA}$ を有する領域および $3$ 超の $Z_{CNA}$ を有する領域は、それぞれ、血漿中の、過小提示を有する領域および過剰提示を有する領域を表す。SLE04において、血漿中で過小提示された領域（すなわち、 $-3$ 未満の $Z_{CNA}$ を有する領域）は、血漿中に正常な提示を有する領域（すなわち、 $-3 \sim 3$ の $Z_{CNA}$ を有する領域）よりも、有意により高い $Z_{meth}$ を有さず（ $P$ 値 $= 0.99$ 、片側順位和検定）、血漿において過剰提示を有する領域（すなわち、 $3$ 超の $Z_{CNA}$ を有する領域）は、血漿において正常な提示を有する領域よりも、有意により低い $Z_{meth}$ を有さなかった（ $P$ 値 $= 0.68$ 、片側順位和検定）。これらの結果は、血漿中の腫瘍由来低メチル化DNAの存在を原因とする、期待された変化とは異なった。同様に、SLE10において、 $-3$ 未満の $Z_{CNA}$ を有する領域は、 $-3 \sim 3$ の $Z_{CNA}$ を有する領域よりも、有意により高い $Z_{meth}$ を有さなかった（ $P$ 値 $= 0.99$ 、片側順位和検定）。

#### 【0485】

SLE患者における $Z_{meth}$ および $Z_{CNA}$ の間に典型的ながん関連パターンが無い理由は、SLE患者において、低メチル化も示す特定の細胞型に $CNA$ が存在しないことである。実際に、観察された、 $CNA$ および低メチル化の見かけの存在は、SLE患者における循環DNAのサイズ分布の変化が原因である。参照が健常対象から得られるために、サイズ分布の変化は、潜在的に、異なるゲノム領域における配列決定されたリード密度を変化させて、見かけの $CNA$ をもたらし得る。先のセクションに記載されたように、循環DNA断片のサイズおよびそのメチル化密度の間には相関が存在する。従って、サイズ分布の変化は、異常なメチル化ももたらし得る。

#### 【0486】

$3$ 超の $Z_{CNA}$ を有する領域は $-3 \sim 3$ の $Z_{CNA}$ を有する領域よりもわずかにより低いメチル化レベルを有したが、比較における $p$ 値は、2のがん患者において観察されたものよりもはるかに高かった。一実施形態では、 $p$ 値は、検査症例ががんを有する可能性を決定するためのパラメーターとして用いられ得る。別の実施形態では、正常な提示を有する領域および異常な提示を有する領域の間の $Z_{meth}$ における差異は、がんが存在する可能性を示すためのパラメーターとして用いられ得る。一実施形態では、がん患者の一群が、 $Z_{me}$

10

20

30

40

50

$t_h$  および  $Z_{CNA}$  間の相関を確立するために、並びに異なるパラメーターの閾値を決定するために用いられ、変化が検査血漿試料中のがん由来低メチル化 DNA の存在と一貫していることが示され得る。

#### 【0487】

従って、一実施形態では、CNA 解析が行われて、全てが欠失、増幅、または正常な提示のうちの1つを示す、第一の一連の領域が決定され得る。例えば、第一の一連の領域は、全て欠失を示し得るか、または全て増幅を示し得るか、または全て正常な提示を示し得る（例えば、正常な第一の量の領域を有する（例えば、正常な  $Z_{meth}$ ））。メチル化レベルは、この第一の一連の領域について決定され得る（例えば、方法 2800 の第一メチル化レベルは第一の一連の領域に対応し得る）。

10

#### 【0488】

CNA 解析によって、全てが第二の欠失、増幅、または正常な提示を示す、第二の一連の領域が決定され得る。第二の一連の領域は、第一の一連の領域とは異なるように、示す。例えば、第一の一連の領域が正常であった場合、第二の一連の領域は欠失または増幅を示し得る。第二のメチル化レベルは、第二の一連の領域内の部位におけるメチル化された DNA 分子の数のそれぞれに基づいて、算出され得る。

#### 【0489】

次に、パラメーターが第一メチル化レベルおよび第二メチル化間で算出され得る。例えば、差異または比が算出され、カットオフ値と比較され得る。また、前記差異または比は、確率分布（例えば、統計検定の一部として）にかけられて、その値が得られる確率が決定され得、この確率はカットオフ値と比較されて、メチル化レベルに基づいてがんのレベルが決定され得る。そのようなカットオフは、がんを有する試料とがんを有さない試料（例えば、SLE）を区別するように選択され得る。

20

#### 【0490】

一実施形態では、第一の一連の領域または領域の混合（すなわち、増幅、欠失、および正常を示す領域の混合）のメチル化レベルが決定され得る。このメチル化レベルは次に、解析の第一段階の一部として、第一のカットオフと比較され得る。カットオフを上回った場合、これによりがんの可能性が示されるが、その現れが偽陽性であるかどうかを決定するために、上記の解析が行われ得る。このように、がんのレベルの最終的な分類には、2つのメチル化レベルのパラメーターの第二のカットオフとの比較が含まれ得る。

30

#### 【0491】

第一メチル化レベルは、第一の一連の領域の各領域について算出された領域メチル化レベルの、統計値（例えば、平均値または中央値）であり得る。第二のメチル化レベルも、第二の一連の領域の各領域について算出された領域メチル化レベルの、統計値であり得る。例として、統計値は、片側順位和検定、スチューデント t 検定、分散分析（ANOVA）検定、またはクラスカル・ワリス検定を用いて決定され得る。

#### 【0492】

### XI. がん型分類

生物ががんを有するかどうかを決定することに加えて、実施形態では、試料と関連するがん型が特定され得る。このがん型の特定では、全体的な低メチル化、CG 島高度メチル化、および/または CNA のパターンが用いられ得る。前記パターンには、測定された領域メチル化レベル、領域の各 CNA 値、および CG 島のメチル化レベルを用いた既知の診断を有する患者のクラスタリングが含まれ得る。下記の結果は、類似のがん型を有する生物が、領域および CG 島において類似の値を有すること、並びに非がん患者が類似の値を有することを示している。クラスタリングにおいて、領域または島におけるこれらの値のそれぞれは、クラスタリング過程において、別々の次元であり得る。

40

#### 【0493】

同じがん型は類似の遺伝子変化および後成的変化を共有していることが知られている（E Gebhart et al. 2004 Cytogenet Genome Res; 104: 352-358; PA Jones et al. 2007 Cell; 128: 683-692）。下記に、血漿中で検出される CNA およびメチル化変化のパ

50

ターンが、がんの起源または型を推測するのにどのように有用であるかが記載される。HCC患者、非HCC患者および健常対照患者からえられた血漿DNA試料が、例えば階層クラスタリング解析を用いて、分類された。解析は、例えば、R scriptパッケージのheatmap.2機能(cran.r-project.org/web/packages/gplots/gplots.pdf)を用いて、行われた。

【0494】

このアプローチの可能性を説明するために、血漿試料を分類するのに有用な特徴を特定するための例として、2組の判定基準(A群およびB群)が用いられた(表6を参照)。他の実施形態では、これらの特徴を特定するために他の判定基準が用いられ得る。用いられた特徴には、1Mb分解能における全体CNA、1Mb分解能における全体メチル化密度およびCG島メチル化が含まれた。

10

【0495】

【表6】

表6

	1Mb 分解能における全体メチル化	
	A 群判定基準	B 群判定基準
判定基準	3 超または-3 未満の Z 値を有する 20 超のがん症例	2.5 超または-2.5 未満の Z 値を有する 20 超のがん症例
特定された特徴の数	584	1,911

20

30

【0496】

【表 7】

	CNA 特徴	
	A 群判定基準	B 群判定基準
判定基準	3 超または-3 未満の Z 値を有する 10 超のがん症例	2.5 超または-2.5 未満の Z 値を有する 10 超のがん症例
特定された特徴の数	355	759

10

【 0 4 9 7 】

【表 8】

20

	CG 島メチル化	
	A 群判定基準	B 群判定基準
判定基準	特定の CG 島において参照の平均値と 2%異なるメチル化密度を有する、5 超のがん症例	特定の CG 島において参照の平均値と 2%異なるメチル化密度を有する、1 超のがん症例
特定された特徴の数	110	191

30

40

【 0 4 9 8 】

第一の 2 つの例において、CNA、1 Mb 分解能における全体メチル化および CG 島メチル化特徴の全てが分類に用いられた。他の実施形態では、他の判定基準、例えば、限定はされないが、参照群の血漿における特徴を測定する精度が用いられ得る。

【 0 4 9 9 】

図 5 2 A は、355 の CNA、584 の 1 Mb 分解能における全体メチル化特徴および 110 の CG 島のメチル化状態を含む 1,130 の A 群特徴の全てを用いる、HCC 患者、非 HCC がん患者および健常対照患者から得られた血漿試料に対する、階層クラスタリング解析を示している。上側のカラーバーは試料群を表しており：緑色、青色および赤色は、それぞれ、健常対象、HCC がん患者および非 HCC がん患者を表している。概して

50

、前記3つの対象群は共にクラスター化する傾向があった。縦軸は分類特徴を表している。異なる対象間で類似のパターンを有する特徴は一緒にクラスター化された。これらの結果は、血漿におけるCG島メチル化変化、1Mb分解能におけるゲノムワイドなメチル化変化およびCNAのパターンが、潜在的に、原発不明である患者におけるがんの起源を特定するのに用いられ得ることを示唆している。

#### 【0500】

図52Bは、759のCNA、1,911の1Mb分解能における全体メチル化および191のCG島のメチル化状態を含む2,780のB群特徴の全てを用いる、HCC患者、非HCCがん患者および健常対照患者から得られた血漿試料に対する、階層クラスタリング解析を示している。上側のカラーバーは試料群を表しており：緑色、青色および赤色は、それぞれ、健常対象、HCCがん患者および非HCCがん患者を表している。概して、前記3つの対象群は一緒にクラスター化する傾向があった。縦軸は分類特徴を表している。異なる対象間で類似のパターンを有する特徴は一緒にクラスター化された。これらの結果は、血漿におけるCG島メチル化変化、1Mb分解能におけるゲノムワイドなメチル化変化およびCNAの様々な集合のパターンが、原発不明である患者におけるがんの起源を特定するのに用いられ得ることを示唆している。分類特徴の選択は特定の適用のために調整され得る。さらに、様々ながん型についての対象の事前確率に応じて、がん型予測には加重が加えられ得る。例えば、ウイルス性慢性肝炎を有する患者は、肝細胞癌を発達させる傾向があり、常習的喫煙者は肺がんを発達させる傾向がある。従って、がん型の加重された確率は、例えば、限定はされないが、ロジスティック回帰、重回帰、またはクラスタリング回帰を用いて、算出され得る。

10

20

#### 【0501】

他の実施形態では、1種類の特徴が分類解析に用いられ得る。例えば、以下の例では、1Mb分解能における全体メチル化のみ、CG島高度メチル化のみまたは1Mb分解能におけるCNAのみが、階層クラスタリング解析に用いられる。区別能力は、異なる特徴が用いられた場合、異なり得る。分類特徴の特徴細分化によって、潜在的に、分類精度が向上され得る。

#### 【0502】

図53Aは、A群CG島メチル化特徴を用いた、HCC患者、非HCCがん患者および健常対照患者から得られた血漿試料に対する、階層クラスタリング解析を示している。概して、がん患者は一緒にクラスター化し、非がん対象別のクラスターに含まれた。しかし、HCC患者および非HCC患者は、3種全ての特徴を用いた場合と比較して、それほど分離されなかった。

30

#### 【0503】

図53Bは、1Mb分解能におけるA群全体メチル化密度を分類特徴として用いた、HCC患者、非HCCがん患者および健常対照患者から得られた血漿試料に対する、階層クラスタリング解析を示している。HCC患者および非HCC患者の優先的なクラスタリングが観察された。

#### 【0504】

図54Aは、1Mb分解能におけるA群全体CNAを分類特徴として用いた、HCC患者、非HCCがん患者および健常対照患者から得られた血漿試料に対する、階層クラスタリング解析を示している。HCC患者および非HCC患者の優先的なクラスタリングが観察された。

40

#### 【0505】

図54Bは、B群CG島メチル化密度を分類特徴として用いた、HCC患者、非HCCがん患者および健常対照患者から得られた血漿試料に対する、階層クラスタリング解析を示している。HCC患者および非HCCがん患者の優先的なクラスタリングが観察された。

#### 【0506】

図55Aは、B群1Mb分解能における全体メチル化密度を分類特徴として用いた、H

50

C C患者、非H C Cがん患者および健常対照患者から得られた血漿試料に対する、階層クラスタリング解析を示している。H C C患者および非H C Cがん患者の優先的なクラスタリングが観察され得た。

【0507】

図55Bは、B群1Mb分解能における全体CNAを分類特徴として用いた、H C C患者、非H C Cがん患者および健常対照患者から得られた血漿試料に対する、階層クラスタリング解析を示している。H C C患者および非H C Cがん患者の優先的なクラスタリングが観察され得た。

【0508】

血漿試料に対するこれらの階層クラスタリングの結果は、異なる特徴の組み合わせが潜在的に原発性癌型の特定に用いられ得ることを示唆している。選択判定基準のさらなる細分化により、分類の精度がさらに向上され得る。

【0509】

従って、一実施形態では、メチル化分類が生物にがんが存在することを示す場合、生物に関連するがん型は、メチル化レベル（例えば、方法2800からの第一のメチル化またはあらゆる領域メチル化レベル）を、他の生物（すなわち、ヒト等の同種の他の生物）から決定された対応する値と比較することによって、特定され得る。対応する値は、メチル化レベルが算出された、同一領域または一連の部位の値であり得る。少なくとも2つの他の生物が異なるがん型を有すると特定される。例えば、対応する値はクラスターへと組織化され得、ここで、2つのクラスターは異なるがんに関連している。

【0510】

さらに、がんのレベルの第三の分類を得るためにCNAおよびメチル化が共に用いられる場合、CNAおよびメチル化の特徴は、他の生物から得られた対応する値と比較され得る。例えば、欠失または増幅を示す領域の第一の量（例えば、図36からの）が、他の生物から決定された対応する値と比較されて、該生物と関連するがん型が特定され得る。

【0511】

いくつかの実施形態において、メチル化特徴は、ゲノムの複数の領域の領域メチル化レベルである。それぞれの領域カットオフ値を超過する領域メチル化レベルを有することが決定された領域が、用いられ得、例えば、生物の領域メチル化レベルは、ゲノムの同一領域において、他の生物の領域メチル化レベルと比較され得る。比較によって、がん型の区別が可能となり得、あるいは、がんを確認するための（例えば、偽陽性を特定するための）追加のフィルターが与えられ得る。従って、生物が、第一のがん型、がんの非存在、または第二のがん型を有しているかどうか、比較に基づいて決定され得る。

【0512】

他の生物は（検査を受けている生物と一緒に）、領域メチル化レベルを用いて、クラスタリングされ得る。従って、領域メチル化レベルの比較は、どのクラスターに生物が属するかを決定するために用いられ得る。クラスタリングでは、上記の通り、欠失または増幅を示すことが決定された領域のCNA正規化数も用いられ得る。そして、クラスタリングでは、高度メチル化されたCG島のそれぞれのメチル化密度が用いられ得る。

【0513】

この方法の原理を説明するために、2つの未知の試料の分類に対しロジスティック回帰を用いる例が示される。この分類の目的は、これら2つの試料がH C Cであるかまたは非H C Cがんであるかを決定することであった。H C C患者から採取された23の血漿試料およびH C C以外のがんを有する患者から採取された18の試料を含んだ、訓練試料セットが収集された。従って、訓練セットには合計41の症例が存在した。この例において、CG島のメチル化に関する5つの特徴（X1～X5）、1Mb領域のメチル化に関する6つの特徴（X6～X11）および1Mb領域のCNAに関する2つの特徴（X12～X13）を含む、13の特徴が選択された。CpGメチル化特徴が、3超または-3未満のZ値を有する訓練セット中の少なくとも15の症例の判定基準に基づいて、選択された。1Mbメチル化特徴が、3超または-3未満のZ値を有する訓練セット中の少なくとも39

10

20

30

40

50

の症例の判定基準に基づいて、選択された。CNA特徴が、3超または-3未満のZ値を有する少なくとも20の症例の判定基準に基づいて、選択された。この訓練セットの試料に対してロジスティック回帰が行われ、各特徴(X1~X13)の回帰係数が決定された。より大きな規模の回帰係数を有する特徴(肯定的な意味または否定的な意味であるかにかかわらず)によって、HCC試料および非HCC試料間のより良好な区別が得られる。各特徴における各症例のZ値が、独立変数の入力値として用いられた。次に、一方はHCC患者(TBR36)由来、他方は肺がんを有する患者(TBR177)由来の2つの血漿試料が、13の特徴について解析された。

【0514】

このがん型分類解析において、これら2つの試料は、原発不明のがんを有する患者から採取されたと仮定された。各試料において、各特徴のZ値がロジスティック回帰式に入力されて、オッズ比の自然対数( $\ln$ (オッズ比))が決定され、ここで、オッズ比は、HCCを有する確率およびHCCを有さない確率の比(HCC/非HCC)を表す。

10

【0515】

表7は、ロジスティック回帰式の13の特徴における回帰係数を示している。2つの検査症例(TBR36およびTBR177)の各特徴のZ値も示される。TBR36およびTBR177のHCCの $\ln$ (オッズ比)は、それぞれ、37.03および-4.37であった。これらのオッズ比から、血漿試料がHCC患者から採取された可能性は、それぞれ、99.9%超および1%と算出された。要約すれば、TBR36はHCC患者から採取された試料である可能性が高く、一方、TBR177はHCC患者から採取された試料

20

【0516】

【表 9】

表 7

特徴	回帰係数	各特徴の Z 値	
		TBR36	TBR177
X1	-2.9575	14.8	0
X2	2.2534	21.3	0
X3	-1.5099	6.1	0
X4	-0.236	34.0	0
X5	0.7426	17.3	0
X6	-0.6682	-26.3	-1.5
X7	-0.2828	-13.9	-2.6
X8	-0.7281	-9.4	-4.4
X9	1.0581	-7.8	-3.7
X10	0.3877	-20.8	-4.3
X11	0.3534	-15.5	-3.1
X12	-1.1826	4.8	3.3
X13	-0.3805	-11.7	-1.4
	ln (オッズ比)	37.03	-4.37463

10

20

30

40

50

## 【0517】

他の実施形態では、階層クラスタリング回帰、分類木解析および他の回帰モデルが、がんの可能性のある原発部位を決定するために、用いられ得る。

## 【0518】

## XII. 材料および方法

## A. 亜硫酸水素塩処理 DNA ライブラリーの作製および配列決定

0.5% (w/w) 非メチル化 DNA (プロメガ社) を加えられたゲノム DNA (5  $\mu$ g) を、Covaris S220 System (コパリス社 (Covaris)) でおよそ 200 bp 長に断片化した。メチル化されたアダプター (イルミナ社) を DNA 断片にライゲーションした以外は製造業者の取扱説明書に従い、Paired-End Sequencing Sample Preparation Kit (イルミナ社) を用いて、DNA ライブラリーを作製した。AMPure XP 磁気ビーズ (ベックマン・コールター社) を用いた 2 回の精製の後、ライゲーション産物を 2 つの部分に分割し、その一方を、EpiTect Bisulfite Kit (キアゲン社) を用いる 2 回の亜硫酸水素塩修飾にかけた。インサート内の CpG 部位における非メチル化シトシンをウラシ

ルに変換し、メチル化シトシンはそのままにした。亜硫酸水素ナトリウムで処理された、または処理されていないアダプター連結DNA分子を、以下のレシピを用いて10サイクルのPCRで富化した：50 µlの反応液中の2.5 UのPfuTurboC<sub>x</sub>ホットスタートDNAポリメラーゼ（アジレント・テクノロジー社）、1×PfuTurboC<sub>x</sub>反応緩衝液、25 µMのdNTP、1 µlのPCR Primer PE 1.0および1 µlのPCR Primer PE 2.0（イルミナ社）。熱サイクルプロファイルは、95 を2分間、98 を30秒間、次に98 を15秒間、60 を30秒間および72 を4分間の10サイクル、そして最終ステップである72 を10分間であった（R Lister, et al. 2009 Nature; 462: 315-322）。AMPure XP磁気ビーズを用いてPCR産物を精製した。

#### 【0519】

3.2 ~ 4 mlの母体血漿試料から抽出された血漿DNAを、断片化DNA（血漿1 mlあたり25 pg）でスパイクし、上記のようなライブラリー構築にかけた（RWK Chiu et al. 2011 BMJ; 342: c7401）。メチル化されたアダプターにライゲーションした後、ライゲーション産物を2等分に分割し、一方の部分を2回の亜硫酸水素塩修飾にかけた。亜硫酸水素塩処理されたまたは未処理のライゲーション産物を次に、10サイクルのPCRで上記のように富化した。

#### 【0520】

亜硫酸水素塩処理されたまたは未処理のDNAライブラリーを、HiSeq2000装置（イルミナ社）上で、ペアエンド形式で、75 bpについて配列決定した。cBot装置（イルミナ社）上でPaired-End Cluster Generation Kit v3を用いて、DNAクラスターを作製した。HiSeq Control Software（HCS）v1.4およびReal Time Analysis（RTA）Software v1.13（イルミナ社）を用いてリアルタイム画像解析およびベースコールを行い、これにより、自動マトリックスおよび位相計算は、DNAライブラリーを用いて配列決定された、中にスパイクされたPhiX control v3に基づかれた。

#### 【0521】

##### B. 配列アラインメントおよびメチル化シトシンの特定

ベースコールの後、断片末端のアダプター配列および低クオリティ塩基（low quality base）（すなわち、クオリティスコアが20未満）が除去された。FASTQ形式のトリミングされたリードは次に、Methy-Pipeと称されるメチル化データ解析パイプラインによって処理された（IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine Workshops（香港、2010年12月18~21日）で発表された論文である、P Jiang, et al. Methy-Pipe: An integrated bioinformatics data analysis pipeline for whole genome methylome analysis）。亜硫酸水素塩変換した配列決定リードを整列させるために、最初に、参照ヒトゲノム（NCBI build 36/hg18）を用いて、ワトソン鎖およびクリック鎖上で別々に、全シトシン残基のチミンへのインシリコ変換が行われた。次に、処理された全てのリードにおいて各シトシンのチミンへのインシリコ変換が行われ、それぞれの変換された残基の位置情報が保持された。SOAP2R Li, et al. 2009 Bioinformatics; 25: 1966-1967）が、変換されたリードを2つの事前変換された参照ヒトゲノムに整列させるために用いられ、最高2つのミスマッチが整列されたリードのそれぞれに許された。ユニークなゲノム位置にマッピング可能なリードのみが、選択された。ワトソン鎖およびクリック鎖の両方にマッピングされるあいまいなリード、並びに同一の開始および終止ゲノム位置を有する重複（クローン）リードは排除された。600 bp以下のインサートサイズを有する配列決定されたリードが、メチル化解析およびサイズ解析のために保持された。

#### 【0522】

CpGジヌクレオチド配列内のシトシン残基は、下流DNAメチル化研究の主な標的であった。アラインメントの後、配列決定されたリード上に元々存在したシトシンは、インシ

10

20

30

40

50

リコ変換中に保持された位置情報に基づいて、回復された。CpGジヌクレオチド中の回復されたシトシンは、メチル化状態としてスコアリングされた。CpGジヌクレオチド中のチミンは、非メチル化状態としてスコアリングされた。ライブラリー作製中に含まれる非メチル化DNAは、亜硫酸水素ナトリウム修飾の効率を推定するための内部標準として機能した。亜硫酸水素塩変換効率が100%であるならば、DNA上のシトシンは全て、チミンに変換されているはずである。

#### 【0523】

#### XIII. 概要

本明細書に記載の実施形態の使用により、例えば対象の血漿を用いた、がんの非侵襲的な検診、検出、モニタリングまたは予後判定が可能となる。母体血漿から得られる胎児DNAのメチル化特性を推定することにより、胎児の出生前の検診、診断、調査またはモニタリングの実行も可能となる。本アプローチの能力を説明するために、胎盤組織の研究を通じ従来法で得られた情報が、母体血漿から直接的に評価され得ることが示された。例えば、遺伝子座の刷り込み状態、胎児DNAおよび母体DNA間で示差的なメチル化を有する遺伝子座の特定、並びに遺伝子座のメチル化特性における妊娠性変動が、母体血漿DNAの直接的な解析を通じて達成される。本アプローチの主な利点は、胎児メチロームを、妊娠に対する混乱または胎児組織の浸潤的試料採取の必要無しに、妊娠中に、包括的に評価できることである。DNAメチル化状態の変化および多くの妊娠関連状態の間の既知の関連性を考慮すると、本研究において記載されるアプローチは、それらの状態における生物マーカーの病態生理の調査およびそれらの生物マーカーの特定のための、重要な手段として機能し得る。刷り込み遺伝子座に焦点を当てることにより、父系伝達性の胎児メチル化特性および母系伝達性の胎児メチル化特性の両方が、母体血漿から評価可能であることが示された。このアプローチは、刷り込み疾患の研究に潜在的に有用であり得る。実施形態は、胎児疾患または妊娠関連疾患の出生前評価に直接適用することもできる。

#### 【0524】

ゲノムワイド亜硫酸水素塩配列決定が、胎盤組織のDNAメチル化特性の研究に適用できることが示された。ヒトゲノム内にはおよそ28MのCpG部位が存在する(C Clark et al. 2012 PLoS One; 7: e50233)。CVSおよび妊娠末期胎盤組織検体の亜硫酸水素塩配列決定データは、CpGの80%超を被覆した。これは、他のハイスループットなプラットフォームを用いて達成できるものよりも、実質的により広い被覆率を表す。例えば、胎盤組織に関する先の研究(T Chu et al. 2011 PLoS One; 6: e14723)において用いられたイルミナ社製Infinium Human Methylation 27Kビーズチップアレイは、ゲノム内のCpGのうちの0.1%を被覆したのみであった。より最近になって利用可能になったイルミナ社製Infinium Human Methylation 450Kビーズチップアレイは、CpGの1.7%を被覆したのみであった(C Clark et al. 2012 PLoS One; 7: e50233)。MPSアプローチはプローブ設計、ハイブリダイゼーション効率または抗体捕捉の強度に関する制限が無いいため、CG島内外の、および大部分の配列構成内のCpGを評価することができた。

#### 【0525】

#### XIV. コンピューターシステム

本明細書において言及されたコンピューターシステムのいずれも、あらゆる適切な数のサブシステムを利用し得る。そのようなサブシステムの例は、コンピューターデバイス3300において、図33に示される。いくつかの実施形態において、コンピューターシステムには、サブシステムが構成要素であり得る単一のコンピューターデバイスが含まれ得る。他の実施形態では、コンピューターシステムには、それぞれが内部構成要素を有するサブシステムである、複数のコンピューターデバイスが含まれ得る。

#### 【0526】

図33に示されるサブシステムは、システムバス3375を介して相互接続される。プリンター3374、キーボード3378、記憶デバイス3379、ディスプレイアダプター3382と連結されたモニター3376等の追加のサブシステムが示されている。I /

0 制御デバイス 3371 に連結された周辺デバイスおよび入出力 ( I / O ) デバイスは、シリアルポート 3377 等の当該技術分野において既知のいかなる数の手段によっても、コンピューターシステムに連結され得る。例えば、シリアルポート 3377 または外部インターフェース 3381 ( 例えば、イーサネット、Wi-Fi 等 ) が用いられて、コンピューターシステム 3300 はインターネット等の広域ネットワーク、マウス入力デバイス、またはスキャナーに連結され得る。システムバス 3375 を介した相互接続は、中央処理デバイス 3373 が各サブシステムと通信し、システムメモリ 3372 または記憶デバイス 3379 ( 例えば、固定ディスク ) からの指示の実行、およびサブシステム間の情報の交換を制御することを可能にする。システムメモリ 3372 および / または記憶デバイス 3379 は、コンピューター可読媒体を包含していてもよい。本明細書に記載される値のいずれも、ある構成要素から別の構成要素に出力可能であり、使用者に出力可能である。

10

**【 0 5 2 7 】**

コンピューターシステムは、例えば、外部インターフェース 3381 によって、または内部インターフェースによって相互接続された、複数の同一の構成要素またはサブシステムを含み得る。いくつかの実施形態において、コンピューターシステム、サブシステム、または装置は、ネットワーク上で通信し得る。そのような装置において、あるコンピューターはクライアントと見なされ得、別のコンピューターはサーバーと見なされ得、ここで、それぞれは同一のコンピューターシステムの一部であり得る。クライアントおよびサーバーは、それぞれ複数のシステム、サブシステム、または構成要素を含み得る。

20

**【 0 5 2 8 】**

本発明の実施形態のいずれも、ハードウェア ( 例えば、特定用途向け集積回路またはフィールド・プログラマブル・ゲート・アレイ )、および / または一般的にプログラム可能なプロセッサを有するコンピュータソフトウェアをモジュール様式または集積様式で用いて、制御論理の形態で実行され得ることが理解されよう。本明細書における使用者として ( as user herein )、プロセッサには、マルチコア・プロセッサもしくは同一の集積チップ、または単一の回路基盤もしくはネットワーク接続基盤上の複数の処理装置が含まれる。本明細書に記載される開示および教示に基づいて、当業者は、ハードウェア並びにハードウェアおよびソフトウェアの組み合わせを用いて本発明の実施形態を実行するための他のやり方および / または方法を知り、理解するであろう。

30

**【 0 5 2 9 】**

本願に記載されるソフトウェアコンポーネントまたは機能のいずれも、例えば、従来のまたはオブジェクト指向の技術を用いて、例えば、Java、C++ または Perl 等のあらゆる適切なコンピューター言語を用いて、プロセッサによって実行されるようコードされたソフトウェアとして、実行され得る。コードされたソフトウェアは、保存および / または伝達のためにコンピューター可読媒体上に一連の指示または命令として保存され得、適切な媒体には、読み書き可能メモリ ( RAM )、読出し専用メモリ ( ROM )、ハードドライブもしくはフロッピーディスク等の磁気媒体、またはコンパクトディスク ( CD ) もしくは DVD ( デジタル多用途ディスク ) 等の光媒体、フラッシュメモリー等が含まれる。コンピューター可読媒体は、そのような保存または伝達デバイスのいかなる組み合わせであってもよい。

40

**【 0 5 3 0 】**

そのようなプログラムはまた、インターネットを含む、種々のプロトコルに適合する有線、光、および / または無線ネットワークを介した伝達に適したキャリア信号を用いて、コード化および伝達され得る。従って、本発明の一実施形態に係るコンピューター可読媒体は、そのようなプログラムによってコード化されたデータ信号を用いて作製され得る。コードされたプログラムによってコード化されたコンピューター可読媒体は、互換デバイスとひとまとめにされ得るか、または他のデバイスとは別々に提供され得る ( 例えば、インターネットダウンロードを介して )。いかなるそのようなコンピューター可読媒体も、単一のコンピュータプログラム製品 ( 例えば、ハードドライブ、CD、またはコンピューター

50

ターシステム全体)上、またはその内部に存在し得、システムまたはネットワーク内の異なるコンピュータプログラム製品上またはその内部に存在し得る。コンピュータシステムには、モニター、プリンター、または本明細書に記載される結果のいずれかを使用者に提供するための他の適切なディスプレイが含まれ得る。

【0531】

本明細書に記載の方法のいずれも、それらのステップを実行するように構成され得る一つまたは複数のプロセッサを含むコンピュータシステムを用いて、完全にまたは部分的に実行され得る。従って、実施形態は、各ステップまたは各ステップ群を実行する異なる構成要素を含み得る、本明細書に記載の方法のいずれかのステップを実行するように構成されたコンピュータシステムに関し得る。番号を付けたステップとして提供されているが、本明細書における方法のステップは、同時にまたは異なる順序で実行され得る。さらに、これらのステップの一部は、他の方法からの他のステップの一部と共に用いられ得る。また、ステップの全てまたは一部は任意であり得る。さらに、いずれの方法のいずれのステップも、これらのステップを実行するためのモジュール、回路、または他の手段を用いて、実行され得る。

10

【0532】

特定の実施形態の具体的な詳細は、本発明の実施形態の精神および範囲から逸脱することなく、あらゆる適切な様式で、組み合わせられ得る。しかし、本発明の他の実施形態は、個々の態様、またはこれらの個々の態様の特定の組み合わせに関連する特定の実施形態に関し得る。

20

【0533】

例示的な本発明の実施形態の上述の説明は、説明および解説を目的として提示されている。網羅的であること、または記載された正確な形態に本発明を限定することは意図されておらず、多くの変形態態および変形形態が上記の教示に照らし合わせて可能である。実施形態は、本発明の原理およびその実際の応用を最良に説明し、それにより他の当業者が、種々の実施形態で、および企図される特定の用途に適した種々の変更を加えて、本発明を最良に利用できるようにするために、選択および記述されている。

【0534】

「a」、「an」または「the」の記述は、特に記載がない限り、「一つまたは複数」を意味することが意図される。

30

【0535】

全ての特許、特許出願、刊行物、および本明細書で言及された記述は、あらゆる目的でそれら全体が参照によって組み込まれる。いずれも、先行技術であることを認めるものではない。

【0536】

【表 10】

表 S 2 A 第一期の絨毛膜絨毛検体および母体血液細胞から特定される 100 の最も高度メチル化された領域のリスト

染色体	開始	終了	サイズ (bp)	母体血液 細胞	CVS	P 値	メチル化 差異
chr13	113063600	113064100	500	0.009	0.9	3.67E-15	0.891
chr6	36279700	36280200	500	0.0068	0.8957	2.39E-22	0.8889
chr16	66876000	66876500	500	0.0327	0.9211	3.82E-21	0.8684
chr10	163500	164000	500	0.0195	0.9034	3.60E-35	0.8839
chr9	3518300	3518800	500	0.0263	0.9045	1.32E-26	0.8782
chr12	31877100	31877600	500	0.007	0.8784	3.08E-22	0.8714
chr22	37477400	37478400	1000	0.0152	0.8848	0.00E+00	0.8696
chr4	148940500	148941000	500	0.0055	0.8717	4.40E-29	0.8662
chr5	131836300	131836800	500	0.075	0.9403	1.54E-10	0.8653
chr17	26661700	26663600	1900	0.0187	0.875	2.95E-38	0.8563
chr2	105758600	105759600	1000	0.0305	0.8828	1.19E-53	0.8523
chr22	39188800	39189800	1000	0	0.8514	2.05E-46	0.8514
chr3	153443900	153444900	1000	0.0436	0.8945	5.43E-34	0.8509
chr6	25149600	25150600	1000	0.0135	0.8632	0.00E+00	0.8497
chr5	98296800	98297300	500	0.0432	0.8925	4.97E-23	0.8493
chr7	150679900	150680400	500	0.0496	0.8944	6.50E-17	0.8448
chr7	107563100	107563600	500	0.0495	0.8895	9.58E-26	0.84
chr7	37348300	37349300	1000	0.0012	0.8409	0.00E+00	0.8397
chr14	58837800	58838300	500	0.0097	0.848	3.35E-16	0.8383
chr6	119238100	119238600	500	0.0899	0.928	2.38E-19	0.8381
chr15	93669900	93670400	500	0.0753	0.913	2.19E-10	0.8377
chr17	26669200	26670200	1000	0.0221	0.859	1.44E-29	0.8369
chr2	88108100	88108600	500	0.075	0.9109	3.55E-17	0.8359
chr13	98363800	98364300	500	0.11	0.9457	1.28E-11	0.8357
chr16	66948000	66948500	500	0.0331	0.8685	0.00E+00	0.8354
chr6	42098000	42098500	500	0.0484	0.8835	3.73E-16	0.8351
chr3	129876000	129876500	500	0.0565	0.8897	8.81E-17	0.8332
chr3	142700300	142700800	500	0.0063	0.8393	2.59E-22	0.833
chr8	145883800	145884300	500	0.0392	0.872	0.00E+00	0.8328
chr10	8320700	8321200	500	0.0566	0.8371	9.40E-09	0.8305
chr3	120438100	120438600	500	0.102	0.9292	7.09E-16	0.8272
chr3	173792600	173793100	500	0.0182	0.8453	2.84E-39	0.8271
chr17	40320700	40321200	500	0.0639	0.8788	6.50E-30	0.8249
chr15	72076200	72076700	500	0.0299	0.8525	6.48E-10	0.8226
chr16	29663900	29665400	1500	0.0081	0.8305	0.00E+00	0.8224
chr11	66961100	66962100	1000	0.0489	0.8712	0.00E+00	0.8223
chr9	27083100	27084100	1000	0.097	0.9177	2.37E-55	0.8207
chr9	111249600	111250100	500	0.0613	0.8795	1.99E-20	0.8182
chr14	101412400	101412900	500	0	0.8167	8.26E-32	0.8167
chr1	242549200	242549700	500	0	0.8155	3.50E-21	0.8155
chr8	38642800	38643300	500	0.0191	0.8346	3.22E-41	0.8155
chr4	85893600	85894100	500	0.0394	0.8533	1.45E-15	0.8139
chr5	142368600	142369100	500	0.0385	0.8523	1.18E-18	0.8138
chr8	130969500	130970000	500	0.069	0.8824	2.42E-24	0.8134
chr2	196783900	196784400	500	0	0.8123	3.63E-40	0.8123
chr16	49258100	49258600	500	0.0733	0.8851	4.29E-18	0.8118

10

20

30

40

【表 1 1】

chr1	232601200	232601700	500	0.0594	0.8707	1.73E-13	0.8113
chr1	109039500	109040000	500	0.0366	0.8471	1.07E-11	0.8105
chr17	59491300	59491800	500	0.0662	0.8758	2.15E-17	0.8096
chr21	42194100	42194600	500	0.11	0.9182	1.61E-12	0.8082
chr9	116174500	116175500	1000	0.0062	0.8132	1.98E-60	0.807
chr15	73429200	73429700	500	0	0.8066	9.81E-33	0.8066
chr6	157462800	157463300	500	0.0758	0.8819	7.94E-16	0.8061
chr3	16858500	16859500	1000	0.0021	0.8068	4.76E-68	0.8047
chr9	96662800	96663300	500	0.0614	0.8651	6.79E-28	0.8037
chr9	88143000	88143500	500	0.1538	0.9559	7.43E-09	0.8021
chr19	16090000	16091000	1000	0.0899	0.8904	1.60E-53	0.8005
chr15	29436300	29437300	1000	0.0553	0.8556	1.18E-80	0.8003
chr11	77816100	77816600	500	0.1069	0.9068	2.31E-17	0.7999
chr10	30346800	30347300	500	0.1212	0.9211	7.48E-07	0.7999
chr1	89510300	89511300	1000	0.0203	0.8191	3.53E-77	0.7988
chr3	125986100	125986600	500	0.1686	0.9674	5.24E-22	0.7988
chr19	60162800	60163300	500	0.0127	0.8113	9.99E-19	0.7986
chr16	73655900	73656900	1000	0.082	0.8806	4.48E-41	0.7986
chr16	30104300	30105800	1500	0.0298	0.8282	0.00E+00	0.7984
chr10	118642400	118642900	500	0.0588	0.8571	8.63E-11	0.7983
chr16	4495000	4496000	1000	0.0632	0.8615	2.27E-44	0.7983
chr1	2048300	2048800	500	0.0309	0.8289	1.19E-80	0.798
chr2	136481800	136482800	1000	0.0554	0.8533	8.50E-48	0.7979
chr10	29959200	29959700	500	0.1429	0.94	2.60E-08	0.7971
chr6	139642400	139642900	500	0.0618	0.8585	2.16E-29	0.7967
chr14	69825300	69825800	500	0.0654	0.8615	6.85E-14	0.7961
chr8	49739700	49740200	500	0.0324	0.828	2.88E-30	0.7956
chr17	42205700	42206200	500	0.057	0.852	2.11E-30	0.795
chr4	77445300	77445800	500	0.0442	0.8377	1.79E-35	0.7935
chr17	53762700	53763300	3600	0.0003	0.7926	0.00E+00	0.7923
chr17	44269900	44270400	500	0.026	0.8182	3.49E-21	0.7922
chr6	42462700	42463200	500	0.0761	0.8678	4.74E-22	0.7917
chr2	23396200	23396700	500	0.0333	0.8235	1.25E-14	0.7902
chr9	100921100	100921600	500	0.0244	0.814	3.32E-21	0.7896
chr7	74016100	74016600	500	0.1442	0.9333	6.74E-10	0.7891
chr6	157879000	157879500	500	0.133	0.9219	6.36E-17	0.7889
chr3	3189400	3190400	1000	0.0693	0.8571	1.38E-24	0.7878
chr16	29581500	29584500	3000	0.0081	0.7956	0.00E+00	0.7875
chr17	42201800	42202800	1000	0.0884	0.8751	0.00E+00	0.7867
chr11	94257000	94257500	500	0.1122	0.8986	4.29E-10	0.7864
chr10	14741600	14742100	500	0.0139	0.8	1.73E-20	0.7861
chr21	33826900	33827400	500	0.0879	0.8739	2.81E-11	0.786
chr4	130057200	130057700	500	0.0893	0.875	1.76E-13	0.7857
chr21	35343400	35343900	500	0	0.7853	2.43E-18	0.7853
chr12	105372800	105373300	500	0.0923	0.8767	8.67E-22	0.7844
chr5	10799800	10800300	500	0.1429	0.9263	8.21E-17	0.7834
chr5	16753100	16753600	500	0.041	0.8241	1.40E-15	0.7831
chr3	135746000	135746500	500	0.1429	0.9259	2.86E-09	0.783
chr6	53708300	53708800	500	0.0412	0.8235	2.74E-31	0.7823
chr2	128122900	128123400	500	0.0634	0.8455	4.82E-21	0.7821
chr5	150574200	150574700	500	0.0876	0.8696	1.56E-20	0.782

## 【表 1 2】

chr1	232601200	232601700	500	0.0594	0.8707	1.73E-13	0.8113
chr1	109039500	109040000	500	0.0366	0.8471	1.07E-11	0.8105
chr17	59491300	59491800	500	0.0662	0.8758	2.15E-17	0.8096

## 【 0 5 3 9 】

【表 1 3】

表 S 2 B 第一期の絨毛膜絨毛検体および母体血液細胞から特定される 100 の最も低メチル化された領域のリスト

染色体	開始	終了	サイズ (bp)	母体血液 細胞	CVS	P 値	メチル化 差異
chr18	12217500	12218500	1000	0.9873	0	3.05E-25	0.9873
chr17	22885400	22885900	500	0.9714	0.0161	8.92E-12	0.9553
chr3	184827100	184827600	500	0.9875	0.033	4.79E-16	0.9545
chr5	148968300	148968800	500	0.98	0.0426	6.70E-09	0.9374
chr10	104794500	104795000	500	0.973	0.0385	9.33E-10	0.9345
chr4	84977900	84978400	500	0.9643	0.0417	2.98E-08	0.9226
chr3	180395300	180395800	500	0.9877	0.0667	6.72E-08	0.921
chr2	138908300	138908800	500	0.939	0.0208	1.10E-16	0.9182
chr6	139873100	139873600	500	0.9667	0.0526	1.29E-07	0.914
chr8	59604700	59605200	500	0.9468	0.033	2.88E-14	0.9138
chr6	167622300	167622800	500	0.9452	0.0316	3.86E-14	0.9136
chr3	175701300	175701800	500	0.9846	0.0735	7.43E-10	0.9111
chr13	59246400	59246900	500	0.9402	0.0313	2.31E-11	0.9089
chr12	71263600	71264100	500	0.9296	0.0213	1.08E-08	0.9083
chr5	39459400	39459900	500	0.9219	0.014	5.01E-22	0.9079
chr17	24904700	24905200	500	0.9161	0.0092	5.04E-35	0.9069
chr12	31889900	31890400	500	0.9524	0.0465	6.78E-13	0.9059
chr3	152897800	152898300	500	0.9402	0.0345	1.70E-17	0.9057
chr1	40378700	40379200	500	0.9565	0.0526	3.31E-09	0.9039
chr12	43979300	43979800	500	0.952	0.05	6.68E-13	0.902
chr18	1395900	1397400	1500	0.9308	0.0293	0.00E+00	0.9015
chr1	223482900	223483400	500	0.9579	0.0575	3.36E-24	0.9004
chr9	130357000	130357500	500	0.9282	0.0286	9.19E-13	0.8996
chr3	72878300	72878800	500	0.9612	0.0625	8.20E-14	0.8987
chr7	84347200	84348700	1500	0.9401	0.0418	0.00E+00	0.8983
chr15	37317500	37318000	500	0.9358	0.0385	7.58E-14	0.8973
chr8	42528600	42529100	500	0.9302	0.0337	1.73E-14	0.8965
chr6	134914000	134914500	500	0.9037	0.0076	4.84E-21	0.8961
chr13	56207100	56208100	1000	0.9184	0.0245	0.00E+00	0.894
chr2	209074000	209074500	500	0.9309	0.037	6.13E-27	0.8938
chr12	74021100	74022100	1000	0.9513	0.058	0.00E+00	0.8933
chr4	118939300	118939800	500	0.9192	0.0276	6.58E-27	0.8916
chr5	12626600	12628600	2000	0.9266	0.0355	0.00E+00	0.8911
chr5	105517300	105518300	1000	0.927	0.0359	0.00E+00	0.891
chr12	70056300	70057300	1000	0.9488	0.0609	0.00E+00	0.888
chr6	153238200	153239200	1000	0.9123	0.0244	0.00E+00	0.8879
chr17	60374800	60375300	500	0.9655	0.0777	3.64E-14	0.8878
chr14	68272700	68273200	500	0.9389	0.0523	1.23E-22	0.8866
chr19	54533800	54534800	1000	0.9117	0.0262	0.00E+00	0.8855
chr12	15392200	15393200	1000	0.9307	0.0457	0.00E+00	0.885
chr1	212517400	212517900	500	0.9266	0.0417	9.81E-12	0.8849
chr10	49344400	49345400	1000	0.9422	0.0579	0.00E+00	0.8844
chr3	47410400	47410900	500	0.9213	0.0381	5.59E-16	0.8832
chr3	879500	880000	500	0.9455	0.0625	8.06E-06	0.883
chr2	31572400	31573400	1000	0.9176	0.0357	0.00E+00	0.8819

10

20

30

40

【 0 5 4 0 】

【表 1 4】

chr1	89131200	89131700	500	0.9314	0.0498	5.15E-70	0.8816
chr8	94832000	94832500	500	0.9156	0.0351	2.16E-65	0.8805
chr7	14008300	14009800	1500	0.9349	0.0545	0.00E+00	0.8804
chr12	12971300	12972300	1000	0.9361	0.0559	0.00E+00	0.8802
chr5	43114700	43115200	500	0.9638	0.0842	1.79E-13	0.8796
chr11	107872400	107872900	500	0.9472	0.0677	2.31E-32	0.8794
chr8	49757600	49758100	500	0.9048	0.0269	3.15E-52	0.8779
chr13	33106400	33106900	500	0.9384	0.0606	9.54E-15	0.8778
chr3	190658800	190659300	500	0.9388	0.0617	2.71E-22	0.877
chr1	181508000	181508500	500	0.9259	0.0495	3.78E-15	0.8764
chr1	180436900	180437400	500	0.9412	0.0652	2.36E-13	0.876
chr6	122642800	122643800	1000	0.9218	0.0458	0.00E+00	0.8759
chr5	166429300	166429800	500	0.9551	0.08	5.26E-05	0.8751
chr12	14972900	14973400	500	0.9483	0.0733	2.10E-18	0.8749
chr5	123933900	123934400	500	0.943	0.0683	1.12E-39	0.8746
chr2	15969400	15970400	1000	0.8939	0.0196	9.43E-46	0.8743
chr3	167635200	167636200	1000	0.9363	0.0625	9.03E-41	0.8738
chr5	159442700	159443200	500	0.9174	0.044	6.27E-14	0.8734
chr4	48027200	48027700	500	0.9839	0.1111	8.89E-06	0.8728
chr6	140071500	140072000	500	0.9234	0.0506	4.39E-33	0.8728
chr10	22356300	22356800	500	0.9548	0.0822	1.04E-18	0.8726
chr8	61007300	61007800	500	0.9197	0.0476	1.24E-15	0.8721
chr11	95463500	95464000	500	0.9348	0.0629	1.16E-20	0.8718
chr2	216399800	216400300	500	0.938	0.0667	5.98E-06	0.8713
chr18	57359700	57360200	500	0.9293	0.0584	1.77E-19	0.871
chr3	102734400	102734900	500	0.8917	0.0207	7.94E-22	0.871
chr1	173605700	173606200	500	0.96	0.0891	5.46E-13	0.8709
chr2	86993700	86995700	2000	0.8965	0.0261	0.00E+00	0.8704
chr3	162621100	162621600	500	0.9226	0.0526	7.89E-38	0.8699
chr12	10144800	10145300	500	0.929	0.0598	3.45E-17	0.8691
chr3	113855100	113855600	500	0.9667	0.0982	3.97E-14	0.8685
chr2	156958200	156959200	1000	0.9252	0.0571	8.89E-50	0.8681
chr2	55775000	55776000	1000	0.9159	0.0483	0.00E+00	0.8676
chr6	124898400	124898900	500	0.8987	0.0313	1.91E-15	0.8675
chr5	42003700	42004700	1000	0.9262	0.0588	0.00E+00	0.8674
chr3	24162200	24162700	500	0.883	0.0161	1.75E-27	0.8668
chr6	35394000	35395000	1000	0.9204	0.0539	0.00E+00	0.8665
chr17	8451800	8453300	1500	0.9376	0.0714	0.00E+00	0.8662
chr14	53487700	53488700	1000	0.9013	0.0353	0.00E+00	0.866
chr7	98572800	98573300	500	0.9651	0.0995	8.37E-26	0.8656
chr6	52298700	52299200	500	0.9427	0.0772	1.31E-28	0.8655
chr6	159047900	159048400	500	0.908	0.0426	3.34E-08	0.8655
chr14	22152600	22153100	500	0.9085	0.0435	4.43E-17	0.865
chr12	103285000	103285500	500	0.9321	0.0674	0.00E+00	0.8647
chr7	43302200	43302700	500	0.968	0.1037	6.40E-16	0.8643
chr14	22247400	22247900	500	0.9804	0.1163	3.83E-06	0.8641
chr2	66780900	66781400	500	0.9355	0.0714	8.37E-09	0.8641
chr12	97393000	97393500	500	0.9045	0.0408	3.46E-21	0.8637
chr5	162797900	162798900	1000	0.9271	0.0635	1.75E-57	0.8636
chr2	83598400	83599400	1000	0.9354	0.0719	0.00E+00	0.8635
chr11	111358800	111359300	500	0.9156	0.0523	4.15E-24	0.8632

10

20

30

40

【 0 5 4 1 】

【表 1 5】

chr1	89131200	89131700	500	0.9314	0.0498	5.15E-70	0.8816
chr8	94832000	94832500	500	0.9156	0.0351	2.16E-65	0.8805
chr7	14008300	14009800	1500	0.9349	0.0545	0.00E+00	0.8804
chr12	12971300	12972300	1000	0.9361	0.0559	0.00E+00	0.8802

【 0 5 4 2 】

【表 16】

表 S 2 C 第三期の胎盤組織および母体血液細胞から特定される 100 の最も高度メチル化された領域のリスト

染色体	開始	終了	サイズ (bp)	母体血液 細胞	満期胎 盤	P 値	メチル化 差異
chr4	78129700	78130200	500	0.0488	0.9747	3.97E-33	0.926
chr5	131467400	131467900	500	0.0213	0.9275	7.10E-27	0.9063
chr17	26661700	26663600	1900	0.0187	0.9226	1.79E-41	0.9039
chr4	148940500	148941000	500	0.0055	0.9079	1.82E-29	0.9024
chr9	100921100	100921600	500	0.0244	0.9242	1.38E-25	0.8998
chr6	137114200	137114700	500	0	0.8934	8.87E-14	0.8934
chr3	173792600	173793100	500	0.0182	0.9091	1.70E-42	0.8908
chr5	98296800	98297300	500	0.0432	0.9333	2.58E-23	0.8901
chr12	44898000	44898500	500	0	0.8889	4.47E-11	0.8889
chr3	197328900	197329400	500	0.0169	0.9048	5.55E-10	0.8878
chr8	49739700	49740200	500	0.0324	0.9194	5.71E-34	0.887
chr12	122279300	122279800	500	0.0135	0.8969	3.46E-21	0.8834
chr17	43092200	43092700	500	0	0.8824	4.34E-10	0.8824
chr7	107563100	107563600	500	0.0495	0.931	1.05E-28	0.8815
chr11	72543200	72543700	500	0.0377	0.9167	2.94E-09	0.8789
chr14	58837800	58838300	500	0.0097	0.886	9.16E-18	0.8763
chr3	153443900	153444900	1000	0.0436	0.9197	6.24E-39	0.876
chr3	16953200	16953700	500	0.0896	0.9655	6.78E-09	0.876
chr17	42205700	42206200	500	0.057	0.933	1.13E-31	0.8759
chr6	53217600	53218100	500	0.0818	0.9571	1.54E-19	0.8754
chr3	112749000	112749500	500	0.0403	0.9154	4.11E-22	0.8752
chr8	22453700	22454200	500	0.003	0.8765	1.64E-50	0.8735
chr1	162860900	162861400	500	0.023	0.8932	8.37E-14	0.8702
chr6	36279700	36280200	500	0.0068	0.8762	1.14E-21	0.8694
chr5	80962500	80963000	500	0	0.8679	2.08E-15	0.8679
chr16	11312500	11313000	500	0	0.8679	2.14E-10	0.8679
chr16	29663900	29665400	1500	0.0081	0.8759	0.00E+00	0.8678
chr3	120438100	120438600	500	0.102	0.9639	2.98E-15	0.8618
chr8	134157000	134157500	500	0.0625	0.9219	6.10E-20	0.8594
chr6	42620900	42621400	500	0	0.8571	5.68E-08	0.8571
chr5	131836300	131836800	500	0.075	0.9315	1.26E-10	0.8565
chr14	60290000	60290500	500	0	0.8544	5.63E-14	0.8544
chr6	42850300	42851300	1000	0.0676	0.9211	2.38E-24	0.8534
chr8	28974100	28974600	500	0.0394	0.8927	2.03E-51	0.8533
chr22	22368500	22369000	500	0.0248	0.8778	1.15E-70	0.8529
chr14	69825300	69825800	500	0.0654	0.9174	2.73E-14	0.852
chr3	142700300	142700800	500	0.0063	0.8582	2.56E-23	0.8519
chr17	59491300	59491800	500	0.0662	0.9175	1.81E-16	0.8513
chr15	30881700	30882200	500	0.0493	0.8995	2.38E-26	0.8502
chr15	91496300	91496800	500	0	0.85	3.13E-17	0.85
chr17	18745300	18745800	500	0.0294	0.8775	3.47E-51	0.848
chr15	29436500	29437000	500	0.0336	0.8811	2.62E-66	0.8476
chr2	217795300	217795800	500	0	0.8472	1.78E-22	0.8472
chr11	16328100	16328600	500	0.0278	0.875	3.43E-11	0.8472
chr13	113063500	113064000	500	0.0102	0.8571	1.82E-15	0.8469

10

20

30

40

【 0 5 4 3 】

【表 1 7】

chr5	40472400	40472900	500	0.0197	0.8664	7.54E-35	0.8467	
chr1	242549200	242549700	500	0	0.8462	8.53E-23	0.8462	
chr11	58099100	58099600	500	0.0162	0.8612	4.45E-35	0.845	
chr9	16020400	16020900	500	0.0132	0.8555	8.05E-23	0.8423	
chr8	37550700	37551200	500	0.0093	0.8512	1.11E-16	0.8419	
chr5	75722400	75722900	500	0.1215	0.9627	5.97E-23	0.8411	
chr19	60454700	60455200	500	0.0316	0.8722	2.44E-62	0.8405	
chr4	99587100	99587600	500	0.0128	0.8526	1.49E-12	0.8398	
chr6	25149600	25150600	1000	0.0135	0.8514	0.00E+00	0.8379	10
chr1	32065200	32065700	500	0	0.8371	1.09E-44	0.8371	
chr7	5337200	5337700	500	0.0727	0.9098	2.18E-14	0.8371	
chr17	44269900	44270400	500	0.026	0.8621	3.94E-22	0.8361	
chr1	36180800	36181300	500	0.0714	0.9067	1.23E-09	0.8352	
chr18	10472700	10473700	1000	0.0713	0.9064	9.35E-70	0.8351	
chr5	350000	350500	500	0.0297	0.8643	1.49E-16	0.8346	
chr2	136481800	136482800	1000	0.0554	0.8887	1.87E-52	0.8332	
chr4	89241100	89241600	500	0.1091	0.9423	1.05E-12	0.8332	
chr17	40320700	40321200	500	0.0539	0.8859	6.94E-31	0.832	
chr7	133897200	133897700	500	0.0769	0.9077	1.64E-24	0.8308	
chr8	98060600	98061100	500	0.0741	0.9048	3.11E-07	0.8307	
chr8	134141500	134142000	500	0	0.829	2.77E-58	0.829	20
chr14	80250600	80251100	500	0.0839	0.9122	2.05E-18	0.8283	
chr2	100730900	100731400	500	0.0787	0.9067	4.85E-11	0.828	
chr2	88108100	88108600	500	0.075	0.901	2.10E-16	0.826	
chr19	16338500	16339500	1000	0.0011	0.8259	0.00E+00	0.8247	
chr5	141791900	141792900	1000	0.0225	0.8467	0.00E+00	0.8243	
chr11	116227400	116227900	500	0	0.8242	1.01E-17	0.8242	
chr22	48705500	48706000	500	0.0649	0.8891	4.00E-76	0.8242	
chr9	3518300	3518800	500	0.0263	0.8493	6.66E-25	0.823	
chr11	16791000	16791500	500	0.1095	0.9322	1.05E-22	0.8228	
chr3	135746000	135746500	500	0.1429	0.9651	7.63E-10	0.8223	
chr1	19323400	19323900	500	0.0411	0.8624	2.36E-20	0.8213	
chr9	96662800	96663300	500	0.0614	0.8826	1.07E-28	0.8212	30
chr7	37348300	37349300	1000	0.0012	0.821	0.00E+00	0.8198	
chr2	234882000	234882500	500	0.0392	0.8591	5.36E-15	0.8198	
chr6	44694000	44694500	500	0.1024	0.9222	5.68E-19	0.8198	
chr17	18320500	18321000	500	0	0.8197	2.78E-39	0.8197	
chr22	28992000	28994000	2000	0.0012	0.8195	0.00E+00	0.8183	
chr17	53762700	53766300	3600	0.0003	0.8179	0.00E+00	0.8176	
chr1	114215500	114216000	500	0	0.8169	2.24E-20	0.8169	
chr6	13381700	13382700	1000	0.0037	0.8206	1.03E-40	0.8169	
chr5	17045400	17045900	500	0.0235	0.84	3.24E-13	0.8165	
chr12	110924300	110924800	500	0.0855	0.9016	1.01E-18	0.816	
chr1	200499800	200500300	500	0.011	0.8269	9.73E-24	0.8159	
chr4	8311000	8311500	500	0.053	0.8687	7.82E-18	0.8157	40
chr8	6535300	6535800	500	0.0667	0.8824	5.25E-09	0.8157	
chr6	42462700	42463200	500	0.0761	0.8919	5.78E-23	0.8157	
chr1	91969900	91970400	500	0.0172	0.8325	5.23E-18	0.8152	
chr2	105758600	105759600	1000	0.0305	0.8455	5.15E-52	0.815	
chr21	37538500	37539000	500	0.1595	0.9745	8.81E-16	0.815	
chr9	92953000	92953500	500	0.0189	0.8333	1.88E-15	0.8145	

【 0 5 4 4 】

【表 1 8】

chr5	40472400	40472900	500	0.0197	0.8664	7.54E-35	0.8467
chr1	242549200	242549700	500	0	0.8462	8.53E-23	0.8462
chr11	58099100	58099600	500	0.0162	0.8612	4.45E-35	0.845
chr9	16020400	16020900	500	0.0132	0.8555	8.05E-23	0.8423

【 0 5 4 5 】

【表 19】

表 S 2 D 第三期の胎盤組織および母体血液細胞から特定される 100 の最も低メチル化された領域のリスト

染色体	開始	終了	サイズ (bp)	母体血液 細胞	満期胎 盤	P 値	メチル化 差異
chr9	40380300	40380800	500	0.9667	0	1.13E-06	0.9667
chr1	31769200	31769700	500	0.9548	0.0256	5.57E-25	0.9291
chr18	12217600	12218100	500	0.9873	0.0602	1.63E-19	0.9271
chr20	19704400	19704900	500	0.9426	0.018	4.34E-18	0.9246
chr15	37317500	37318000	500	0.9358	0.0132	1.90E-25	0.9226
chrX	83368400	83368900	500	0.913	0	3.15E-07	0.913
chr11	27549100	27549600	500	0.9224	0.0123	3.92E-24	0.9101
chr18	58141500	58142000	500	0.9737	0.0645	1.07E-09	0.9092
chr1	159897000	159897500	500	0.9067	0	2.53E-16	0.9067
chr7	84347200	84348700	1500	0.9401	0.0407	0.00E+00	0.8994
chr2	216916100	216916600	500	0.9695	0.0714	2.13E-16	0.8981
chr7	144200000	144200500	500	0.9294	0.0317	1.24E-10	0.8977
chr1	241331600	241332100	500	0.9198	0.0227	0.00E+00	0.8971
chr7	123190000	123191000	1000	0.9341	0.0384	0.00E+00	0.8957
chr5	12626600	12628600	2000	0.9266	0.0321	0.00E+00	0.8944
chr12	12971300	12972300	1000	0.9361	0.0438	0.00E+00	0.8923
chr22	20936500	20937000	500	0.9528	0.0606	1.87E-06	0.8922
chr13	31321900	31322400	500	0.9231	0.0313	1.43E-06	0.8918
chr22	21701500	21702000	500	0.9579	0.0667	1.30E-09	0.8912
chr10	104794400	104794900	500	1	0.1111	6.10E-09	0.8889
chr7	21835800	21836300	500	0.9156	0.0267	3.85E-13	0.8889
chr10	16134800	16135300	500	0.95	0.0635	4.79E-10	0.8865
chr3	47410400	47410900	500	0.9213	0.0357	6.63E-17	0.8855
chr10	49344400	49345400	1000	0.9422	0.0571	0.00E+00	0.8851
chr2	209073900	209074400	500	0.9196	0.0353	1.63E-22	0.8843
chr1	89131200	89131700	500	0.9314	0.0472	1.05E-75	0.8842
chr3	167118500	167119500	1000	0.9365	0.0527	0.00E+00	0.8838
chr18	1395900	1397400	1500	0.9308	0.0472	0.00E+00	0.8836
chr2	59670300	59670800	500	0.9433	0.0599	5.09E-23	0.8834
chr14	28368900	28369400	500	0.9446	0.0619	5.03E-64	0.8827
chr3	126028800	126029300	500	0.9379	0.0556	1.83E-20	0.8823
chr9	69378900	69379900	1000	0.8816	0	6.02E-51	0.8816
chr5	105517300	105518300	1000	0.927	0.0461	0.00E+00	0.8808
chr2	31572400	31573400	1000	0.9176	0.037	0.00E+00	0.8806
chr5	42003700	42004700	1000	0.9262	0.0462	0.00E+00	0.88
chr14	94718300	94718800	500	0.9548	0.0764	6.67E-19	0.8784
chr19	56417800	56418300	500	0.9615	0.0833	1.71E-06	0.8782
chr2	70183000	70183500	500	0.9694	0.0914	9.49E-39	0.878
chr4	118939300	118939800	500	0.9192	0.0412	2.20E-34	0.878
chr13	59246400	59246900	500	0.9402	0.0633	5.40E-12	0.8769
chr12	74021100	74022100	1000	0.9513	0.0752	0.00E+00	0.8761
chr2	173432500	173433000	500	0.9529	0.0778	5.39E-12	0.8752
chr16	24004400	24004900	500	0.9239	0.0488	3.25E-23	0.8751
chr13	27596300	27597300	1000	0.9538	0.0795	0.00E+00	0.8743
chr15	88904300	88904800	500	0.9212	0.0481	7.69E-27	0.8731

10

20

30

40

【 0 5 4 6 】

【表 2 0】

chr18	12720200	12721200	1000	0.9346	0.0618	0.00E+00	0.8728
chr15	60975900	60976900	1000	0.9311	0.0587	0.00E+00	0.8724
chr21	39630100	39631100	1000	0.9423	0.07	4.68E-43	0.8723
chr5	123933900	123934400	500	0.943	0.0707	2.60E-38	0.8722
chr8	77382600	77383600	1000	0.9117	0.0395	0.00E+00	0.8722
chr21	32238800	32239300	500	0.9396	0.0677	1.28E-18	0.8719
chr5	175019600	175020100	500	0.9542	0.0828	4.34E-20	0.8714
chr8	134437400	134438400	1000	0.9083	0.037	4.79E-29	0.8713
chr5	69668800	69669300	500	0.9194	0.0492	2.88E-09	0.8702
chr1	60877900	60878900	1000	0.9378	0.068	0.00E+00	0.8698
chr16	80650400	80650900	500	0.9309	0.0611	2.49E-32	0.8698
chr18	59388800	59389300	500	0.9706	0.1008	4.84E-15	0.8697
chr2	15969400	15970400	1000	0.8939	0.0244	3.07E-52	0.8695
chr13	56207100	56208100	1000	0.9184	0.0505	0.00E+00	0.868
chr3	180395300	180395800	500	0.9877	0.12	1.73E-09	0.8677
chr6	153238200	153239200	1000	0.9123	0.0452	0.00E+00	0.8671
chr18	61635100	61635600	500	0.9268	0.06	2.77E-13	0.8668
chr3	177562200	177563200	1000	0.9121	0.0455	0.00E+00	0.8666
chr4	160368300	160370200	1900	0.9272	0.0606	0.00E+00	0.8665
chr6	144626900	144627400	500	0.9114	0.046	2.10E-12	0.8654
chr16	59885500	59886500	1000	0.9407	0.0757	1.12E-62	0.865
chr1	55667100	55667600	500	0.9095	0.0446	8.62E-39	0.8649
chr2	83598300	83599300	1000	0.9366	0.0718	0.00E+00	0.8648
chr4	105135200	105136200	1000	0.913	0.0486	0.00E+00	0.8644
chr14	32048400	32048900	500	0.9142	0.0499	5.43E-53	0.8643
chr1	223482700	223483700	1000	0.9636	0.0997	2.69E-34	0.864
chr14	47487700	47488200	500	0.915	0.0514	5.45E-33	0.8636
chr3	104515000	104515500	500	1	0.1373	1.08E-06	0.8627
chr7	14008300	14009800	1500	0.9349	0.0725	0.00E+00	0.8624
chr1	243134000	243135500	1500	0.9208	0.0588	0.00E+00	0.8619
chr10	14156400	14156900	500	0.9105	0.0489	0.00E+00	0.8616
chr2	118616200	118617200	1000	0.9178	0.0565	0.00E+00	0.8613
chr17	8455500	8456000	500	0.8941	0.0331	1.94E-18	0.8611
chr12	15392200	15393200	1000	0.9207	0.0697	0.00E+00	0.861
chr8	81275900	81276900	1000	0.9291	0.0684	0.00E+00	0.8606
chr1	234269300	234269800	500	0.9471	0.087	2.25E-25	0.8602
chr1	181970300	181970800	500	0.9167	0.0566	2.15E-08	0.8601
chr2	55775000	55776000	1000	0.9159	0.0559	0.00E+00	0.8599
chr3	88338000	88339000	1000	0.8909	0.0311	0.00E+00	0.8598
chr5	140078700	140079200	500	0.8852	0.0253	0.00E+00	0.8598
chr21	16720900	16721400	500	0.9317	0.0721	1.38E-15	0.8596
chr11	104891100	104892600	1500	0.9164	0.0569	0.00E+00	0.8595
chr1	184204700	184205200	500	0.9194	0.0603	8.16E-16	0.859
chr6	160732500	160733000	500	0.9191	0.0606	1.31E-10	0.8585
chr8	37134300	37134800	500	0.9151	0.0567	1.21E-26	0.8584
chr18	5869800	5870300	500	0.913	0.0548	1.21E-09	0.8582
chr1	98448100	98448600	500	0.9574	0.1	2.08E-05	0.8574
chr3	152897800	152898300	500	0.9402	0.0828	3.28E-18	0.8574
chr1	110304000	110304500	500	0.9783	0.121	2.60E-18	0.8572
chr2	86993600	86995600	2000	0.8965	0.0395	0.00E+00	0.857
chr19	15428100	15430600	2500	0.9424	0.0862	0.00E+00	0.8563

10

20

30

40

【 0 5 4 7 】

【表 2 1】

chr18	12720200	12721200	1000	0.9346	0.0618	0.00E+00	0.8728
chr15	60975900	60976900	1000	0.9311	0.0587	0.00E+00	0.8724
chr21	39630100	39631100	1000	0.9423	0.07	4.68E-43	0.8723
chr5	123933900	123934400	500	0.943	0.0707	2.60E-38	0.8722

【 0 5 4 8 】

【表 2 2】

表 S 3 A 第一期母体血漿の亜硫酸水素塩配列決定データから、高度メチル化されたと推定される上位 100 の遺伝子座のリスト

染色体	開始	終了	母体血液 細胞	CVS	メチル化 差異	
chr22	39189067	39189863	0	0.8444	0.8444	
chr17	53763065	53764027	0	0.7922	0.7922	
chr7	41887694	41888213	0	0.7614	0.7614	10
chr2	1.14E+08	1.14E+08	0	0.751	0.751	
chr12	25096242	25097206	0	0.7098	0.7098	
chr1	66574104	66574793	0	0.7025	0.7025	
chr6	11489985	11490755	0	0.7004	0.7004	
chr6	1.07E+08	1.07E+08	0	0.6978	0.6978	
chr10	30858286	30858871	0	0.6693	0.6693	
chr17	21131574	21132167	0	0.6496	0.6496	
chr18	13454740	13455292	0	0.5468	0.5468	
chr16	11298755	11299326	0	0.5373	0.5373	
chr2	1.75E+08	1.75E+08	0	0.5196	0.5196	
chr19	44060511	44061036	0	0.5128	0.5128	20
chr6	1.08E+08	1.08E+08	0	0.5	0.5	
chr3	71261611	71262501	0	0.4587	0.4587	
chr9	36247847	36248885	0	0.447	0.447	
chr19	17819240	17820082	0	0.4279	0.4279	
chr17	53769900	53770731	0	0.4102	0.4102	
chr1	1.12E+08	1.12E+08	0.0002	0.6167	0.6166	
chr7	1.34E+08	1.34E+08	0.0003	0.4351	0.4348	
chr3	11658550	11659929	0.0004	0.4299	0.4295	
chr17	53764417	53765963	0.0005	0.7967	0.7961	
chr10	11246762	11249052	0.0005	0.4002	0.3997	
chr22	28992647	28993434	0.0006	0.8092	0.8087	
chr15	62460278	62461007	0.0006	0.4334	0.4328	30
chr1	31002038	31003474	0.0007	0.5926	0.5919	
chr19	3129246	3132159	0.0008	0.7725	0.7717	
chr12	1.21E+08	1.21E+08	0.0008	0.7303	0.7295	
chr19	12304446	12305741	0.0009	0.6986	0.6978	
chr3	67788734	67789395	0.001	0.9131	0.9121	
chr9	1.32E+08	1.32E+08	0.001	0.7047	0.7037	
chr19	6723370	6724479	0.001	0.689	0.688	
chr3	1.84E+08	1.84E+08	0.001	0.4384	0.4374	
chr2	53848089	53849214	0.001	0.4368	0.4358	
chr17	59450886	59452113	0.0012	0.469	0.4678	
chr5	1.72E+08	1.72E+08	0.0014	0.578	0.5766	
chr21	35342527	35343373	0.0014	0.5392	0.5378	40
chr21	45164804	45165437	0.0015	0.4251	0.4236	
chrX	3742417	3744601	0.0016	0.4486	0.447	
chr21	45158293	45159003	0.0017	0.7799	0.7782	
chr7	39839340	39839876	0.0017	0.4074	0.4057	
chr2	1.75E+08	1.75E+08	0.0018	0.4816	0.4797	
chr12	1.24E+08	1.24E+08	0.0019	0.6306	0.6287	

【 0 5 4 9 】

【表 2 3】

chr3	50352688	50353823	0.002	0.624	0.622	
chr9	97264382	97265523	0.0021	0.5008	0.4987	
chr7	64178628	64179354	0.0021	0.4088	0.4066	
chr9	94767202	94767802	0.0023	0.7568	0.7544	
chr5	42986308	42988304	0.0023	0.4882	0.4859	
chr17	63854127	63854693	0.0024	0.8266	0.8242	
chr12	1.22E+08	1.22E+08	0.0024	0.4869	0.4844	
chr17	16260170	16260909	0.0026	0.6404	0.6378	
chr4	39874787	39875456	0.0027	0.7233	0.7206	
chr12	6441080	6441608	0.0027	0.6228	0.6201	10
chr19	45015653	45016886	0.0028	0.5444	0.5416	
chr6	30757752	30758823	0.0028	0.4783	0.4755	
chr6	41636176	41637112	0.0028	0.4254	0.4226	
chr12	6315199	6315765	0.0029	0.4613	0.4584	
chr14	76576283	76577070	0.0029	0.4365	0.4336	
chr16	48857790	48858300	0.0031	0.5625	0.5594	
chr5	1.7E+08	1.7E+08	0.0031	0.4752	0.4721	
chr13	26897813	26898557	0.0032	0.4354	0.4322	
chr14	52753948	52754571	0.0032	0.4221	0.4189	
chr1	1.66E+08	1.66E+08	0.0033	0.5579	0.5545	
chr12	56157424	56158348	0.0033	0.47	0.4667	20
chr22	16079971	16080532	0.0034	0.6226	0.6193	
chr7	1946410	1946975	0.0036	0.6826	0.6789	
chr11	258799	259749	0.0036	0.5072	0.5037	
chr6	13381944	13382477	0.0037	0.5945	0.5908	
chr7	1.27E+08	1.27E+08	0.0037	0.5096	0.5058	
chr13	23743886	23744467	0.0037	0.4534	0.4497	
chr2	1.21E+08	1.21E+08	0.0038	0.7175	0.7137	
chr21	25855853	25857105	0.0039	0.4661	0.4622	
chr2	43211724	43212565	0.0039	0.4345	0.4306	
chr12	1.08E+08	1.08E+08	0.0041	0.6024	0.5983	
chr15	92928924	92929575	0.0041	0.4074	0.4033	
chr19	10731043	10731636	0.0042	0.5868	0.5826	30
chr6	1.45E+08	1.45E+08	0.0043	0.5783	0.574	
chr1	52875323	52875907	0.0044	0.4145	0.4101	
chr14	75058186	75058956	0.0045	0.602	0.5975	
chr12	1.21E+08	1.21E+08	0.0045	0.4821	0.4776	
chr17	76873737	76874417	0.0046	0.6012	0.5966	
chr2	2.38E+08	2.38E+08	0.0049	0.7654	0.7604	
chr2	1.98E+08	1.98E+08	0.0049	0.7228	0.7179	
chr6	1.47E+08	1.47E+08	0.0049	0.4967	0.4918	
chr9	1.36E+08	1.36E+08	0.0049	0.4584	0.4535	
chr1	67545402	67546771	0.005	0.4971	0.4921	
chr6	1.58E+08	1.58E+08	0.0052	0.6145	0.6093	
chr3	1.7E+08	1.7E+08	0.0052	0.5845	0.5794	40
chr1	2.34E+08	2.34E+08	0.0053	0.7033	0.6979	
chr10	80715722	80716751	0.0053	0.6515	0.6462	
chr4	48602901	48603736	0.0053	0.6315	0.6262	
chr19	13957965	13958580	0.0053	0.599	0.5937	
chr1	90081114	90082367	0.0053	0.4574	0.4521	
chr2	1.06E+08	1.06E+08	0.0054	0.8858	0.8804	

【 0 5 5 0 】

## 【表 2 4】

chr16	29664213	29665369	0.0054	0.8339	0.8285
chr1	1.59E+08	1.59E+08	0.0054	0.7663	0.7608
chr13	97926489	97927025	0.0054	0.6229	0.6175
chr1	41604452	41605277	0.0054	0.6011	0.5956
chr9	1.28E+08	1.28E+08	0.0054	0.5871	0.5818

## 【 0 5 5 1】

【表 2 5】

表 S 3 B 第一期母体血漿の亜硫酸水素塩配列決定データから、低メチル化されたと推定される上位100の遺伝子座のリスト

染色体	開始	終了	母体血液細胞	CVS	メチル化 差異	
chr1	235771917	235772426	0.9868	0.549	0.4377	
chr1	97357972	97358622	0.9835	0.4805	0.503	
chr1	4490516	4491074	0.9826	0.4793	0.5032	
chr4	181124168	181124671	0.9825	0.4725	0.5099	10
chr16	71908694	71909213	0.982	0.5581	0.4239	
chr3	182727915	182728477	0.981	0.3577	0.6233	
chr5	115339535	115340038	0.9802	0.5455	0.4347	
chr3	195855575	195856122	0.9801	0.3793	0.6008	
chr6	155437621	155438161	0.9799	0.5991	0.3808	
chr9	20468093	20468904	0.9798	0.4271	0.5527	
chr10	90702298	90702987	0.9787	0.3324	0.6463	
chr1	170581654	170582162	0.9785	0.4817	0.4968	
chr3	108816849	108817794	0.9783	0.4793	0.4989	
chr20	36912749	36913319	0.9783	0.5	0.4783	
chr13	72517281	72517839	0.9782	0.4855	0.4927	20
chr12	103553001	103553677	0.9774	0.492	0.4854	
chr22	27638905	27639408	0.9766	0.5385	0.4382	
chr7	17290850	17291462	0.9763	0.59	0.3863	
chr6	17227866	17228510	0.976	0.4058	0.5703	
chr15	56998547	56999107	0.9754	0.3766	0.5988	
chr7	70965945	70966842	0.9753	0.5893	0.386	
chr3	32159338	32160065	0.9752	0.5379	0.4372	
chr16	17043258	17043854	0.9752	0.5521	0.4231	
chr16	22776223	22776850	0.9752	0.5735	0.4017	
chr5	169344029	169344869	0.9751	0.4211	0.5541	
chr11	34324955	34325722	0.975	0.5561	0.4189	
chr8	58554745	58555376	0.9747	0.5784	0.3964	30
chr1	153933389	153934121	0.9746	0.463	0.5116	
chr14	88003983	88004485	0.9745	0.5379	0.4366	
chr3	151738501	151739120	0.9741	0.4901	0.484	
chr14	105618699	105619606	0.974	0.3457	0.6283	
chr16	24060085	24060702	0.9738	0.3991	0.5747	
chr8	68941792	68942711	0.9738	0.5449	0.429	
chr12	53208707	53209304	0.9737	0.4847	0.489	
chr7	76892564	76893249	0.9736	0.5664	0.4072	
chr3	69464294	69464971	0.9736	0.5893	0.3843	
chr19	61401137	61401745	0.9732	0.4933	0.4799	
chr11	124569867	124570490	0.9732	0.5136	0.4595	40
chr18	42618440	42619096	0.9732	0.5942	0.379	
chr5	169398896	169399637	0.9731	0.498	0.4751	
chr5	169328124	169328983	0.9731	0.572	0.401	
chr20	34679880	34680448	0.9731	0.5922	0.3809	
chr16	9042198	9042702	0.973	0.4286	0.5444	
chr10	90205044	90205701	0.973	0.4407	0.5323	
chr13	33236454	33236997	0.973	0.5906	0.3824	

【 0 5 5 2 】

【表 2 6】

chr16	73284579	73285087	0.9729	0.5602	0.4127
chr8	29100691	29101428	0.9728	0.505	0.4678
chr2	202383851	202384447	0.9727	0.5461	0.4267
chr3	179501620	179502300	0.9722	0.5766	0.3956
chr6	107674976	107675906	0.9719	0.4434	0.5285
chr6	107880632	107881161	0.9718	0.5623	0.4095
chr12	56350283	56350933	0.9718	0.5909	0.3809
chr19	40636458	40637339	0.9717	0.4941	0.4776
chr2	223472599	223473287	0.9714	0.1824	0.7891
chr22	20709067	20709787	0.9714	0.5149	0.4565
chr19	46095583	46096190	0.9713	0.5385	0.4328
chr6	90258338	90259318	0.9712	0.3415	0.6297
chr2	54598347	54598933	0.9712	0.5894	0.3819
chr3	114810453	114811493	0.9711	0.5166	0.4545
chr19	15851125	15851654	0.9711	0.5236	0.4476
chr8	42889138	42890084	0.9711	0.5652	0.4059
chr18	52354390	52355064	0.971	0.598	0.373
chr15	38206236	38207010	0.9709	0.4186	0.5523
chr7	99700554	99701110	0.9708	0.305	0.6658
chr12	19487336	19487855	0.9708	0.4105	0.5603
chr7	87996908	87997437	0.9708	0.5462	0.4246
chr6	63628653	63629378	0.9707	0.529	0.4417
chr15	38209108	38209618	0.9706	0.5882	0.3824
chr19	6623769	6624450	0.9704	0.5179	0.4526
chr2	10794513	10795242	0.9704	0.5976	0.3728
chr2	118472785	118474454	0.9704	0.5992	0.3712
chr5	57820209	57820801	0.9701	0.5815	0.3886
chr10	100183380	100184702	0.9701	0.5826	0.3875
chr2	8151989	8152646	0.97	0.4701	0.4999
chr10	3938374	3938914	0.9699	0.1741	0.7958
chr9	123724524	123725439	0.9697	0.57	0.3997
chr14	89085469	89086097	0.9696	0.3278	0.6418
chr16	14129437	14130133	0.9695	0.5304	0.4392
chr5	60746367	60747191	0.9695	0.5571	0.4124
chr1	92002953	92003729	0.9694	0.52	0.4494
chr6	31264677	31265413	0.9693	0.5135	0.4558
chr7	99317013	99318281	0.9692	0.5117	0.4574
chr8	8808867	8809422	0.9692	0.5691	0.4002
chr19	20052165	20052720	0.969	0.2792	0.6898
chr8	129139026	129139573	0.969	0.3458	0.6232
chr11	122314929	122315458	0.969	0.4232	0.5458
chr13	98377663	98378165	0.9688	0.3319	0.6369
chr9	107606194	107606872	0.9688	0.449	0.5198
chr8	56096904	56097736	0.9688	0.5267	0.4422
chr7	128093836	128094339	0.9688	0.5929	0.3758
chr2	103109370	103109916	0.9686	0.3333	0.6352
chr3	101803534	101804063	0.9686	0.5027	0.4659
chr10	69505720	69506278	0.9684	0.2515	0.7169
chr13	26608225	26608754	0.9683	0.3614	0.6069
chr1	90993315	90993828	0.9683	0.5519	0.4164
chr6	11361243	11361801	0.9681	0.2578	0.7103

【 0 5 5 3 】

【表 2 7】

chr16	73284579	73285087	0.9729	0.5602	0.4127
chr8	29100691	29101428	0.9728	0.805	0.4678
chr2	202383851	202384447	0.9727	0.5461	0.4267
chr3	179501620	179502300	0.9722	0.5766	0.3956

【 0 5 5 4 】

【表 2 8】

表 S 3 C 第三期母体血液の亜硫酸水素塩配列決定データから、高度メチル化されたと推定される上位 100 の遺伝子座のリスト

染色体	開始	終了	母体血液 細胞	満期胎 盤	メチル化 差異	
chr17	53763065	53764027	0.0000	0.8680	0.8680	
chr22	39189067	39189863	0.0000	0.8233	0.8233	10
chr10	30858286	30858871	0.0000	0.7713	0.7713	
chr7	41887694	41888212	0.0000	0.7578	0.7578	
chr2	1.14E+08	1.14E+08	0.0000	0.7500	0.7500	
chr12	25096242	25097206	0.0000	0.7332	0.7332	
chr6	1.07E+08	1.07E+08	0.0000	0.7229	0.7229	
chr1	66574104	66574793	0.0000	0.7136	0.7136	
chr16	11298755	11299326	0.0000	0.7005	0.7005	
chr6	11489985	11490755	0.0000	0.6935	0.6935	
chr18	13454740	13455292	0.0000	0.6594	0.6594	
chr6	1.08E+08	1.08E+08	0.0000	0.6231	0.6231	
chrX	3627885	3628549	0.0000	0.6133	0.6133	
chr12	7979754	7980413	0.0000	0.6118	0.6118	20
chr3	71261611	71262501	0.0000	0.5938	0.5938	
chr17	53769900	53770731	0.0000	0.5586	0.5586	
chr11	1.18E+08	1.18E+08	0.0000	0.5558	0.5558	
chr19	44060511	44061036	0.0000	0.5464	0.5464	
chr2	2.38E+08	2.38E+08	0.0000	0.5330	0.5330	
chr1	1.91E+08	1.91E+08	0.0000	0.5294	0.5294	
chr1	1.44E+08	1.44E+08	0.0000	0.4857	0.4857	
chr2	1.75E+08	1.75E+08	0.0000	0.4785	0.4785	
chr4	15366889	15367646	0.0000	0.4729	0.4729	
chr2	19537237	19537737	0.0000	0.4599	0.4599	
chr1	1.15E+08	1.15E+08	0.0000	0.4351	0.4351	
chr1	1.54E+08	1.54E+08	0.0000	0.4299	0.4299	30
chr14	51383387	51384149	0.0000	0.4186	0.4186	
chr1	1.12E+08	1.12E+08	0.0002	0.5350	0.5348	
chr3	11658550	11659929	0.0004	0.5579	0.5575	
chr17	53764417	53765963	0.0005	0.7894	0.7889	
chr22	28992647	28993434	0.0006	0.8053	0.8047	
chr6	27214981	27215823	0.0006	0.4593	0.4587	
chr1	31002038	31003474	0.0007	0.6309	0.6302	
chr12	1.21E+08	1.21E+08	0.0008	0.7360	0.7352	
chr19	3129246	3132159	0.0008	0.7257	0.7249	
chr19	12304446	12305741	0.0009	0.6397	0.6388	
chr6	28723918	28724965	0.0009	0.4344	0.4335	
chr19	6723370	6724479	0.0010	0.7280	0.7270	40
chr2	53848089	53849214	0.0010	0.4060	0.4050	
chr9	1.32E+08	1.32E+08	0.0010	0.7558	0.7548	
chr3	67788734	67789395	0.0010	0.9219	0.9209	
chr19	18276368	18277132	0.0011	0.5136	0.5125	
chr17	59450886	59452113	0.0012	0.5196	0.5184	
chr17	74243852	74244670	0.0012	0.4117	0.4105	

【 0 5 5 5 】

【表 2 9】

chr3	1.85E+08	1.85E+08	0.0014	0.4961	0.4948
chr21	35342527	35343373	0.0014	0.5126	0.5112
chr5	1.72E+08	1.72E+08	0.0014	0.6531	0.6516
chr21	45164804	45165437	0.0015	0.4364	0.4349
chrX	3742417	3744601	0.0016	0.7517	0.7501
chr21	45158293	45159003	0.0017	0.8180	0.8163
chr2	1.75E+08	1.75E+08	0.0018	0.6214	0.6196
chr12	1.24E+08	1.24E+08	0.0019	0.5906	0.5887
chr3	50352688	50353823	0.0020	0.6082	0.6062
chr9	94767202	94767802	0.0023	0.8327	0.8304
chr17	63854127	63854693	0.0024	0.7886	0.7862
chr12	1.22E+08	1.22E+08	0.0024	0.5021	0.4997
chr17	16260170	16260909	0.0026	0.5780	0.5754
chr12	6441080	6441608	0.0027	0.7471	0.7444
chr4	39874787	39875456	0.0027	0.7962	0.7935
chr18	50536032	50536649	0.0027	0.4920	0.4893
chr6	30757752	30758823	0.0028	0.4029	0.4001
chr19	2571763	2572292	0.0031	0.4200	0.4169
chr5	1.7E+08	1.7E+08	0.0031	0.4218	0.4187
chr13	26897813	26898557	0.0032	0.6485	0.6453
chr12	56157424	56158348	0.0033	0.5541	0.5508
chr1	1.66E+08	1.66E+08	0.0033	0.5147	0.5113
chr22	16079971	16080532	0.0034	0.6265	0.6231
chr6	16820551	16821134	0.0035	0.4800	0.4765
chr11	258799	259749	0.0036	0.5475	0.5439
chr7	1946410	1946975	0.0036	0.8251	0.8215
chr6	13381944	13382477	0.0037	0.8221	0.8183
chr7	1.27E+08	1.27E+08	0.0037	0.4767	0.4730
chr2	1.21E+08	1.21E+08	0.0038	0.6734	0.6697
chr2	43211724	43212565	0.0039	0.4256	0.4217
chr15	92928924	92929575	0.0041	0.5605	0.5564
chr12	1.08E+08	1.08E+08	0.0041	0.7313	0.7271
chr19	10731043	10731636	0.0042	0.5668	0.5626
chr6	1.45E+08	1.45E+08	0.0043	0.5910	0.5867
chr1	52875323	52875907	0.0044	0.6115	0.6071
chr12	1.21E+08	1.21E+08	0.0045	0.5884	0.5839
chr14	75058186	75058956	0.0045	0.6534	0.6489
chr17	76873737	76874417	0.0046	0.5658	0.5612
chr6	1.47E+08	1.47E+08	0.0049	0.5826	0.5777
chr2	1.98E+08	1.98E+08	0.0049	0.7944	0.7895
chr2	2.38E+08	2.38E+08	0.0049	0.7328	0.7278
chr8	1.42E+08	1.42E+08	0.0050	0.7728	0.7679
chr3	1.7E+08	1.7E+08	0.0052	0.7227	0.7176
chr6	1.58E+08	1.58E+08	0.0052	0.6389	0.6337
chr2	2.38E+08	2.38E+08	0.0052	0.4238	0.4185
chr11	56948854	56949496	0.0053	0.4484	0.4431
chr4	48602901	48603736	0.0053	0.5920	0.5867
chr5	1.31E+08	1.31E+08	0.0053	0.4858	0.4805
chr10	80715722	80716751	0.0053	0.5249	0.5196
chr19	13957965	13958580	0.0053	0.4379	0.4326
chr1	2.34E+08	2.34E+08	0.0053	0.8440	0.8387

10

20

30

40

【 0 5 5 6 】

## 【表 3 0】

chr3	1.85E+08	1.85E+08	0.0014	0.4961	0.4948
chr21	35342527	35343373	0.0014	0.5126	0.5112
chr5	1.72E+08	1.72E+08	0.0014	0.6531	0.6516
chr21	45164804	45165437	0.0015	0.4364	0.4349
chrX	3742417	3744601	0.0016	0.7517	0.7501

## 【 0 5 5 7】

【表 3 1】

表 S 3 D the から、低メチル化されたと推定される上位 100 の遺伝子座のリスト

染色体	開始	終了	母体血液 細胞	満期胎 盤	メチル化 差異	
chr10	7548948	7549483	0.9866	0.5685	0.4181	
chr1	4490516	4491074	0.9826	0.5015	0.4810	
chr4	1.81E+08	1.81E+08	0.9825	0.5981	0.3843	
chr3	1.83E+08	1.83E+08	0.9810	0.2925	0.6886	
chr3	1.96E+08	1.96E+08	0.9801	0.4643	0.5158	10
chr6	1.55E+08	1.55E+08	0.9799	0.4610	0.5189	
chr1	1.71E+08	1.71E+08	0.9785	0.5122	0.4662	
chr20	36912749	36913319	0.9783	0.4513	0.5269	
chr22	38583100	38583616	0.9783	0.5428	0.4355	
chr1	19391314	19392207	0.9778	0.5273	0.4505	
chr5	1.74E+08	1.74E+08	0.9770	0.5852	0.3918	
chr19	13678906	13679531	0.9760	0.5812	0.3949	
chr14	83650790	83651395	0.9760	0.5378	0.4382	
chr15	56998547	56999107	0.9754	0.4691	0.5063	
chr16	22776223	22776850	0.9752	0.5114	0.4638	
chr5	1.69E+08	1.69E+08	0.9751	0.4809	0.4943	
chr8	58554745	58555376	0.9747	0.5977	0.3770	20
chr14	1.06E+08	1.06E+08	0.9740	0.2069	0.7671	
chr8	68941792	68942711	0.9738	0.5872	0.3866	
chr16	24060085	24060702	0.9738	0.3470	0.6268	
chr12	53208707	53209304	0.9737	0.5278	0.4459	
chr5	1.69E+08	1.69E+08	0.9731	0.5057	0.4673	
chr16	9042198	9042702	0.9730	0.1860	0.7869	
chr10	90205044	90205701	0.9730	0.5922	0.3808	
chr3	1.89E+08	1.89E+08	0.9720	0.4949	0.4771	
chr6	1.08E+08	1.08E+08	0.9719	0.5825	0.3894	
chr2	2.23E+08	2.23E+08	0.9714	0.3333	0.6381	
chr19	46095583	46096190	0.9713	0.5065	0.4648	
chr8	1.41E+08	1.41E+08	0.9713	0.5753	0.3959	30
chr6	90258338	90259318	0.9712	0.4357	0.5355	
chr13	51403556	51404069	0.9710	0.3980	0.5731	
chr18	66875048	66875726	0.9710	0.5259	0.4451	
chr7	99700554	99701110	0.9708	0.3757	0.5951	
chr7	87996908	87997437	0.9708	0.5720	0.3988	
chr19	6623769	6624450	0.9704	0.4774	0.4930	
chr1	97639047	97639749	0.9701	0.4148	0.5553	
chr16	23892096	23892772	0.9701	0.5000	0.4701	
chr10	3938374	3938914	0.9699	0.1148	0.8551	
chr14	89085469	89086097	0.9696	0.2964	0.6732	
chr8	1.29E+08	1.29E+08	0.9690	0.3565	0.6126	
chr13	98377663	98378165	0.9688	0.3123	0.6566	40
chr8	56096904	56097736	0.9688	0.4562	0.5126	
chr2	1.03E+08	1.03E+08	0.9686	0.3459	0.6227	
chr13	26608225	26608754	0.9683	0.4562	0.5121	
chr2	22738157	22738760	0.9682	0.5122	0.4560	
chr6	11361243	11361801	0.9681	0.2646	0.7035	
chr21	36529300	36529981	0.9680	0.1829	0.7852	

【 0 5 5 8 】

【表 3 2】

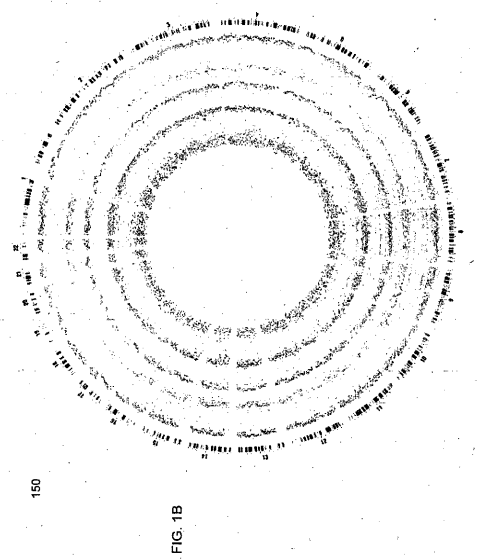
chr21	37813953	37814521	0.9679	0.3061	0.6619	
chr2	2.43E+08	2.43E+08	0.9679	0.5750	0.3929	
chr4	12413543	12414103	0.9679	0.5944	0.3735	
chr3	1.27E+08	1.27E+08	0.9677	0.4030	0.5648	
chr7	33509047	33509556	0.9676	0.4627	0.5048	
chr14	59284846	59285553	0.9674	0.5254	0.4420	
chr17	42623453	42624024	0.9673	0.4318	0.5355	
chr19	6778363	6779377	0.9671	0.4416	0.5255	
chr4	41798250	41798788	0.9670	0.5000	0.4670	10
chr5	88054080	88054588	0.9669	0.2238	0.7431	
chr16	24109379	24110289	0.9669	0.5062	0.4607	
chr10	13847159	13847895	0.9667	0.3188	0.6479	
chr10	1.27E+08	1.27E+08	0.9667	0.5423	0.4244	
chr12	1.12E+08	1.12E+08	0.9663	0.3722	0.5941	
chr10	17220886	17221845	0.9662	0.4455	0.5207	
chr8	5947355	5947862	0.9662	0.5171	0.4491	
chr3	73740840	73741439	0.9659	0.3657	0.6002	
chr14	57945953	57946875	0.9658	0.5357	0.4301	
chr14	50905777	50906333	0.9658	0.3008	0.6650	
chr15	90275374	90276000	0.9657	0.5409	0.4248	
chr22	24717299	24718197	0.9657	0.5160	0.4497	20
chr7	36530128	36530987	0.9656	0.5194	0.4462	
chr2	1.31E+08	1.31E+08	0.9655	0.4384	0.5271	
chr4	42116988	42117788	0.9654	0.5195	0.4459	
chr12	1.16E+08	1.16E+08	0.9653	0.5594	0.4059	
chr2	7491785	7492736	0.9652	0.4556	0.5097	
chr19	6599638	6600187	0.9652	0.5488	0.4163	
chr6	25326803	25327398	0.9651	0.3974	0.5677	
chr4	1.7E+08	1.7E+08	0.9651	0.4933	0.4718	
chr7	99875338	99876155	0.9650	0.2696	0.6953	
chr14	97144328	97145208	0.9649	0.5377	0.4272	
chr3	11718596	11719163	0.9649	0.5521	0.4128	
chr14	1E+08	1E+08	0.9649	0.3794	0.5855	30
chr7	1.5E+08	1.5E+08	0.9648	0.3327	0.6322	
chr12	56357827	56358328	0.9648	0.4217	0.5430	
chr10	8275750	8276276	0.9647	0.3100	0.6547	
chr11	16999685	17000209	0.9647	0.2765	0.6882	
chr22	34419356	34419861	0.9646	0.4245	0.5401	
chr18	72453151	72453725	0.9646	0.4700	0.4946	
chr5	49919879	49920699	0.9645	0.3169	0.6476	
chr1	24580891	24581805	0.9643	0.3565	0.6078	
chr22	18233774	18234492	0.9641	0.5205	0.4436	
chr14	45356178	45356903	0.9640	0.3934	0.5706	
chr3	53007193	53008661	0.9638	0.4902	0.4737	
chr4	55027912	55028539	0.9637	0.5254	0.4384	40
chr5	1.37E+08	1.37E+08	0.9637	0.5290	0.4347	
chr1	2.23E+08	2.23E+08	0.9636	0.0997	0.8640	
chr7	1.35E+08	1.35E+08	0.9636	0.2959	0.6677	
chr5	80350438	80351169	0.9636	0.4969	0.4667	
chr12	31889600	31890343	0.9636	0.1745	0.7891	
chr12	8365395	8366096	0.9636	0.5721	0.3914	

【 0 5 5 9 】

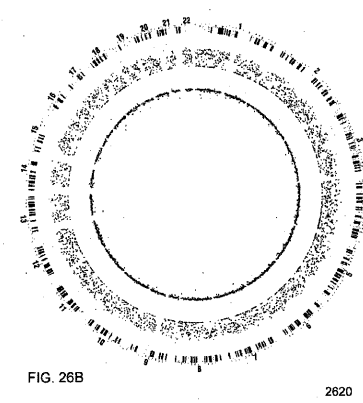
【表 3 3】

chr21	37813953	37814521	0.9679	0.3061	0.6619
chr2	2.43E+08	2.43E+08	0.9679	0.5750	0.3929

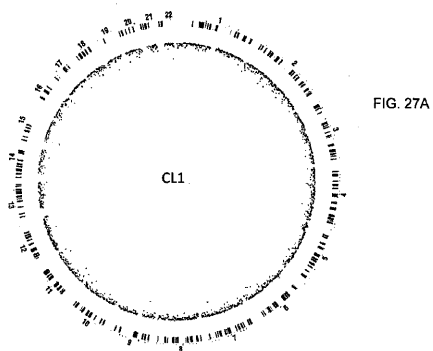
【図 1 B】



【図 2 6 B】



【図 2 7 A】



【図 27 B】

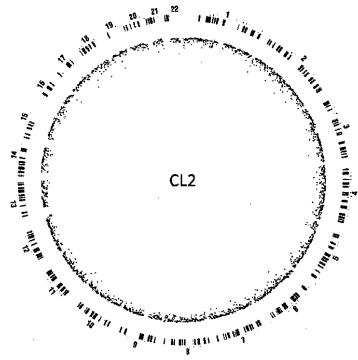


FIG. 27B

【図 27 D】

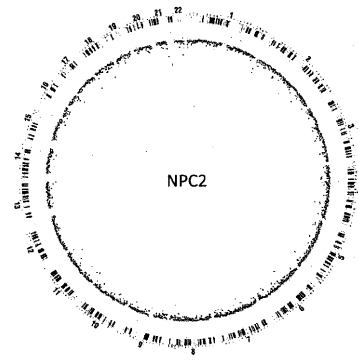


FIG. 27D

【図 27 C】

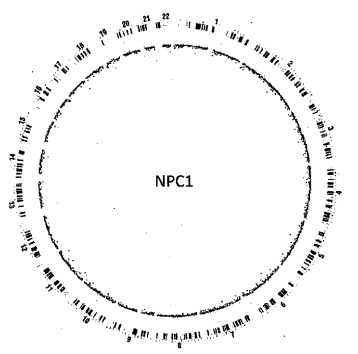


FIG. 27C

【図 27 E】

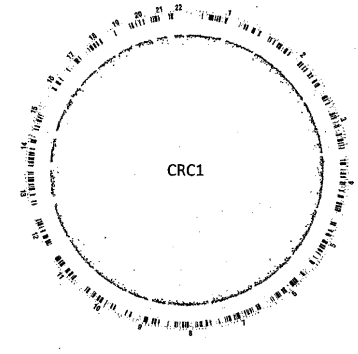


FIG. 27E

【図 27 F】

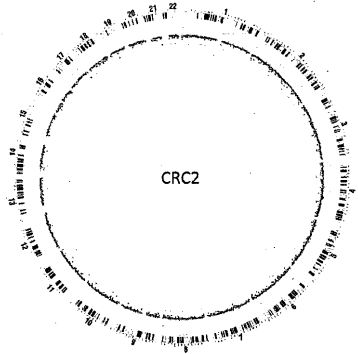


FIG. 27F

【図 27 H】

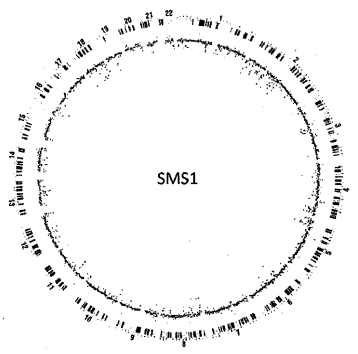


FIG. 27H

【図 27 G】

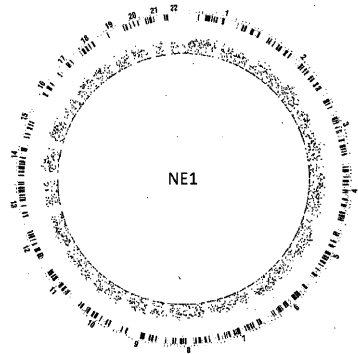


FIG. 27G

【 図 3 4 B 】

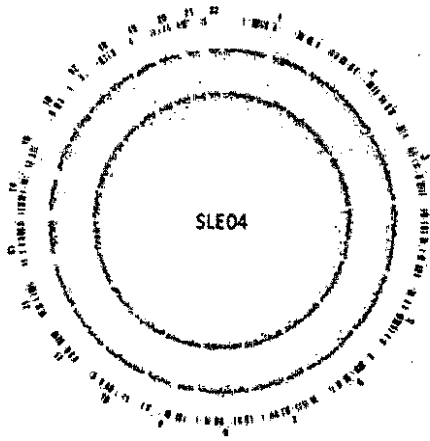


FIG. 34B

【 図 3 4 C 】

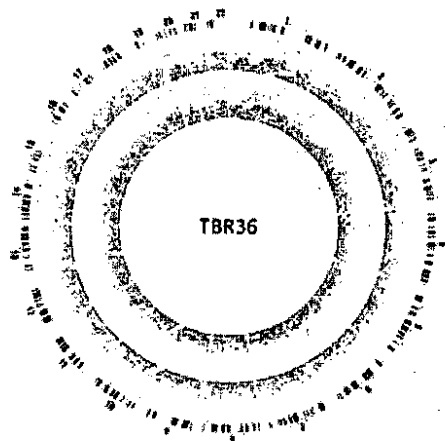


FIG. 34C

【 図 3 9 B 】

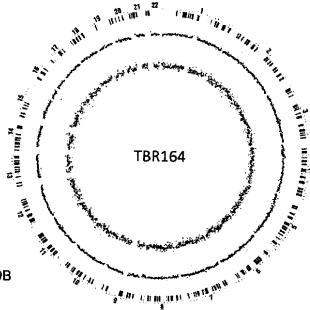


FIG. 39B

【 図 4 7 】

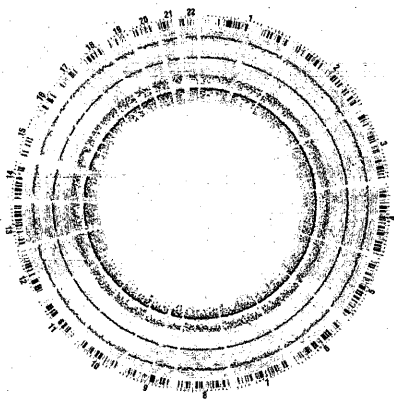


FIG. 47

【 図 5 0 B 】

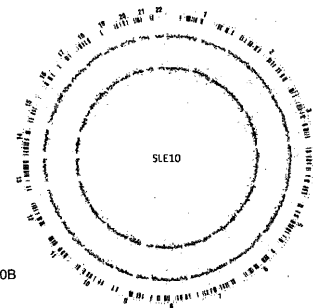


FIG. 50B

【 図 5 0 A 】

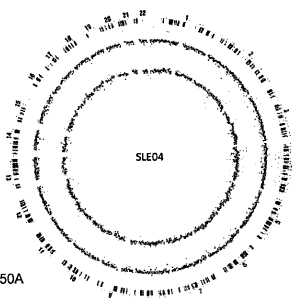


FIG. 50A

【 図 5 2 A 】

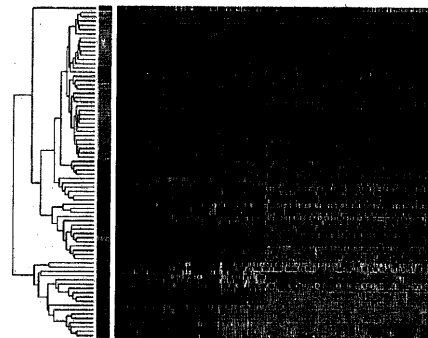


FIG. 52A

【 図 5 2 B 】

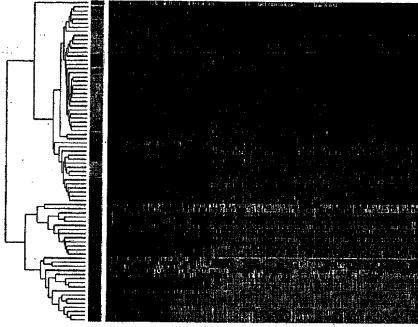


FIG. 52B

【 図 5 3 B 】

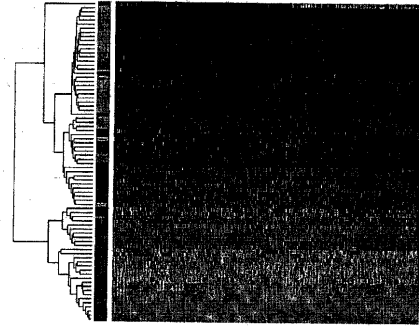


FIG. 53B

【 図 5 3 A 】

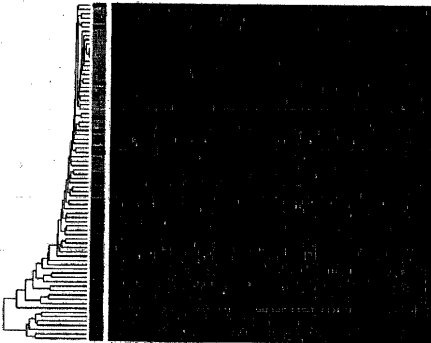


FIG. 53A

【 図 5 4 A 】

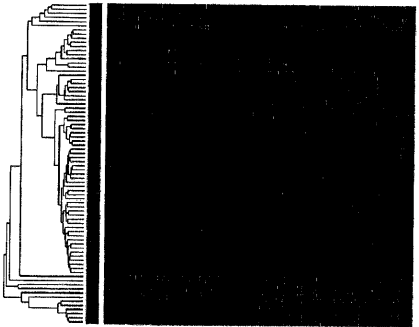


FIG. 54A

【 図 5 4 B 】

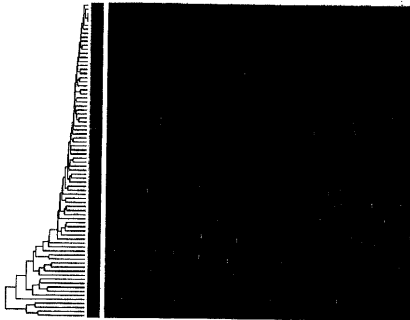


FIG. 54B

【 図 5 5 B 】

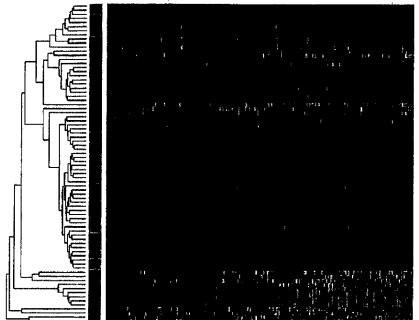


FIG. 55B

【 図 5 5 A 】

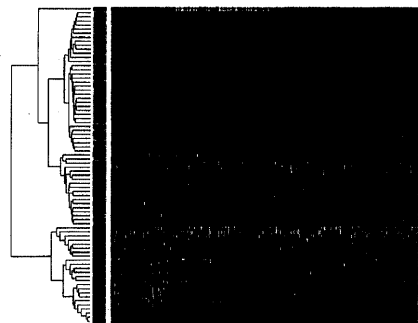


FIG. 55A

【 図 5 6 】

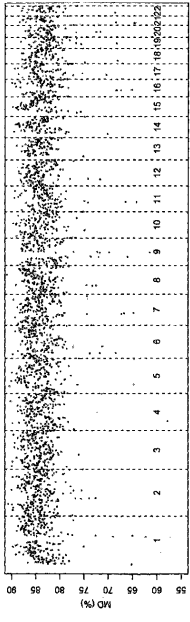


FIG. 56

【図 1 A - 1】

FIG. 1A

100

	母体血液 [第一期]		CVS		満期胎盤		母体血漿 [第一期]		母体血漿 [第三期]		母体血漿 [出産後]	
	ワトソ	クリック	ワトソ	クリック	ワトソ	クリック	ワトソ	クリック	ワトソ	クリック	ワトソ	クリック
生リードカウント	547522712	547522712	422873853	422873853	637537170	637537170	4567226854	4567226854	1289337674	1289337674	1277615263	1277615263
合計マッピング可能部(%)	45.08	44.39	44.22	43.83	46.70	44.40	29.82	29.48	35.81	35.39	37.86	37.40
合計マッピング可読リード	246808492	243029086	186985998	185346026	297735873	283050215	1361958504	1346252254	461659066	456249836	483697803	477778078
曖昧率(%) <sup>a</sup>	6.72	6.83	5.84	5.89	5.26	5.54	6.35	6.43	5.86	5.93	5.98	6.05
重複率(%) <sup>b</sup>	6.60	5.86	9.52	8.27	32.94	30.39	64.66	64.41	25.70	25.18	41.01	40.56
全ゲノム深度	11.29	11.19	8.36	8.31	9.43	9.25	25.40	25.29	16.95	16.85	14.08	14.00
(以下を除去:												
曖昧率及び入変換率(%) <sup>c</sup>	99.98	99.98	99.93	99.94	99.95	99.96	99.96	99.97	99.96	99.96	99.96	99.96
ゲノムC配列Mカウント <sup>d</sup>	268498966	265662985	190603545	188460370	226378366	223722865	640697054	635295175	456206420	453569856	397672185	395159659
ゲノムC配列Uカウント	4484594136	4449649557	4232382985	4201356735	4968445023	4908568234	1.1699E+10	1.1641E+10	8576357118	8538105685	6896711473	6865335640
ゲノムC被覆率(%)	66.45	66.39	62.66	62.55	67.49	67.40	80.48	80.46	69.84	69.76	67.68	67.61
ゲノムC配列深度	8.14	8.07	7.57	7.51	8.89	8.78	21.12	21.01	15.46	15.39	12.48	12.43
ゲノムCメチル化密度(%)	5.65	5.63	4.31	4.29	4.36	4.36	5.19	5.17	5.05	5.04	5.45	5.44
CpG配列Mカウント	265203963	262504347	183242316	181245307	213757505	211325313	627866879	622753476	443226176	440725023	389810638	387417582
CpG配列Uカウント	104163657	103975011	145623817	148498340	147248261	146617702	310000675	308133594	206357402	205477045	142858625	142271154
CpG被覆率(%)	85.17	85.12	81.02	80.92	84.23	84.15	92.05	92.02	86.13	86.06	84.93	84.86
CpG配列深度	13.12	13.01	11.68	11.71	12.82	12.71	33.30	33.05	23.06	22.94	18.91	18.81
CpGメチル化密度(%)	71.80	71.63	55.72	54.97	59.21	59.04	66.95	66.90	68.23	68.20	73.18	73.14
非CpG配列Mカウント	3279043	3147047	7286715	7162226	12502145	12301418	12818574	125332920	12979169	12843942	7859475	7740641
非CpG配列Uカウント	4302393851	4285094041	3979826287	3971182968	4560807406	4537834784	1.1356E+10	1.1308E+10	8350532598	8330532598	6749182596	6719112682
非CpG被覆率(%)	0.13	0.13	0.12	0.12	0.13	0.13	0.16	0.16	0.14	0.14	0.13	0.13
非CpG配列深度	1.52	1.52	1.41	1.41	1.62	1.61	4.02	4.00	2.96	2.95	2.39	2.38
非CpGメチル化密度(%)	0.08	0.07	0.18	0.18	0.27	0.27	0.11	0.11	0.15	0.15	0.12	0.12
CHG配列Mカウント	1029734	1000287	2100977	2071015	3223342	3176751	3766562	3691190	3625562	3692617	2347392	2314323
CHG配列Uカウント	1345439602	1341393096	1217982855	1216609371	1362682765	1357568840	3416559203	3404225988	2519517702	2509439947	2036338055	2028059603
CHG被覆率(%)	77.90	77.82	73.26	73.13	77.50	77.38	88.16	88.12	79.68	79.59	77.84	77.75
CHG配列深度	10.89	10.85	9.86	9.85	11.04	11.00	27.65	27.55	20.40	20.32	16.48	16.42
CHGメチル化密度(%)	0.08	0.07	0.17	0.17	0.24	0.23	0.11	0.11	0.14	0.14	0.12	0.11
CHH配列Mカウント	2249309	2146760	5185738	5091211	9278803	9124667	9052012	8841730	9353607	9251325	5512083	5426318
CHH配列Uカウント	2956954249	2943700945	2761843432	2754573597	3198124641	3180265944	7939543368	7903584596	5848054967	5821092651	4712844541	4691053079
CHH被覆率(%)	61.96	61.90	58.43	58.32	63.54	63.45	77.53	77.52	65.96	65.89	63.65	63.58
CHH配列深度	6.84	6.81	6.40	6.38	7.42	7.38	18.38	18.30	13.55	13.48	10.91	10.86
CHHメチル化密度(%)	0.08	0.07	0.19	0.18	0.29	0.29	0.11	0.11	0.16	0.16	0.12	0.12

【 図 1 A - 2 】

	成人男性血液		成人女性血液		成人男性血漿		成人女性血漿	
	ワトソン	クリック	ワトソン	クリック	ワトソン	クリック	ワトソン	クリック
生リードカウント	196544792	196544792	197387755	197387755	179688600	179688600	141199439	141199439
合計マッピング可能部(%)	43.52	42.97	44.94	44.35	22.47	22.29	18.98	18.79
合計マッピング可読リード	85526774	84462496	88699242	87542953	40380938	40048964	26795699	26537762
曖昧率(%) <sup>a</sup>	6.05	6.13	6.29	6.37	6.09	6.14	6.29	6.35
重複率(%) <sup>b</sup>	1.99	1.73	1.88	1.53	7.89	7.64	11.71	11.47
全ゲノム深度	4.13	4.09	4.28	4.24	1.83	1.82	1.16	1.15
(以下を除去:								
曖昧率及び入変換率(%) <sup>c</sup>	99.96	99.97	99.97	99.97	99.96	99.97	99.96	99.97
ゲノムC配列Mカウント <sup>d</sup>	127154246	125487793	124983462	123238608	55049489	54630306	37403326	37048480
ゲノムC配列Uカウント	2047971831	2026731827	2058153525	2039985644	938186429	93337753	598496591	594974253
ゲノムC被覆率(%)	51.66	51.55	55.17	55.06	43.76	43.66	38.39	38.28
ゲノムC配列深度	3.72	3.68	3.74	3.70	1.70	1.69	1.09	1.08
ゲノムCメチル化密度(%)	5.85	5.83	5.72	5.70	5.54	5.53	5.88	5.86
CpG配列Mカウント	125161042	123578850	123020928	121374309	54155037	53756413	36788819	36453865
CpG配列Uカウント	49564325	49936003	47562383	47812716	21930864	21830555	13971713	13867179
CpG被覆率(%)	73.37	73.25	76.24	76.12	63.93	63.80	57.87	57.77
CpG配列深度	6.20	6.16	6.06	6.01	2.70	2.68	1.80	1.79
CpGメチル化密度(%)	71.63	71.22	72.12	71.74	71.18	71.12	72.48	72.44
非CpG配列Mカウント	1979410	1899750	1951160	1856642	894139	873671	614025	594289
非CpG配列Uカウント	1960312392	1950307695	1976031265	1966232257	915375235	910910490	583173346	580050464
非CpG被覆率(%)	0.10	0.10	0.11	0.11	0.08	0.08	0.07	0.07
非CpG配列深度	0.69	0.69	0.70	0.70	0.32	0.32	0.21	0.21
非CpGメチル化密度(%)	0.10	0.10	0.10	0.09	0.10	0.10	0.11	0.10
CHG配列Mカウント	618974	598717	594336	573203	279945	272311	191120	186135
CHG配列Uカウント	612387336	610126996	607312325	605093927	283916067	282826050	180374803	179612404
CHG被覆率(%)	63.24	63.11	66.75	66.62	54.69	54.56	48.57	48.45
CHG配列深度	4.96	4.94	4.91	4.90	2.30	2.29	1.46	1.45
CHGメチル化密度(%)	0.10	0.10	0.10	0.09	0.10	0.10	0.11	0.10
CHH配列Mカウント	1360436	1301033	1356824	1283439	614194	601360	422905	408154
CHH配列Uカウント	1347925056	1340180699	1368718940	1361138330	631459168	628084440	402798543	400438060
CHH被覆率(%)	46.93	46.83	50.48	50.38	39.32	39.22	34.20	34.11
CHH配列深度	3.12	3.10	3.17	3.15	1.46	1.45	0.93	0.93
CHHメチル化密度(%)	0.10	0.10	0.10	0.09	0.10	0.10	0.10	0.10

FIG. 1A (続き)

【図 2 A】

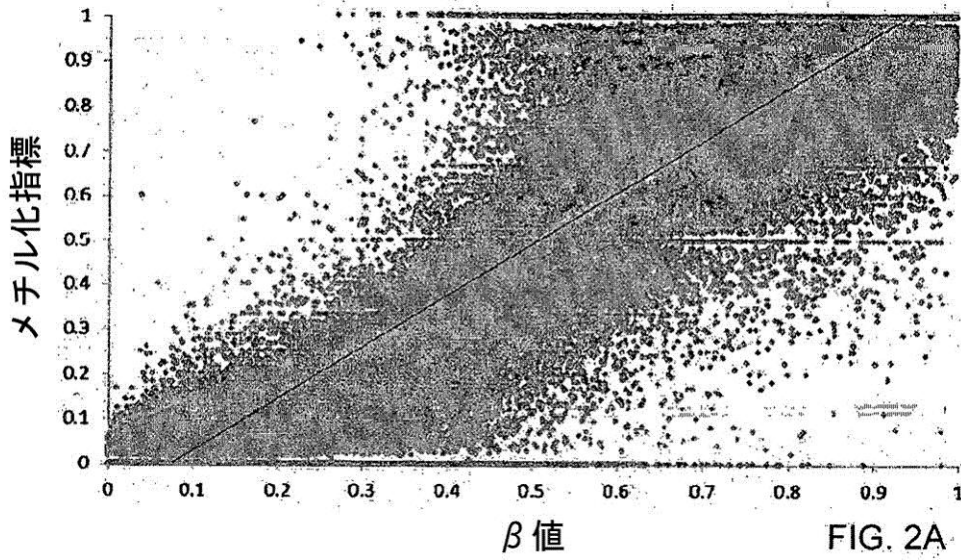


FIG. 2A

【図 2 B】

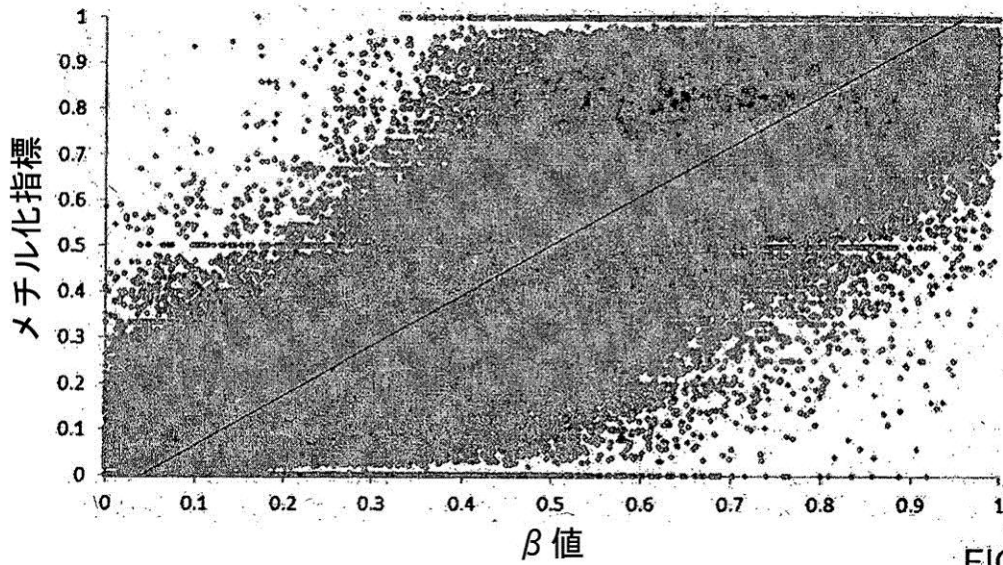
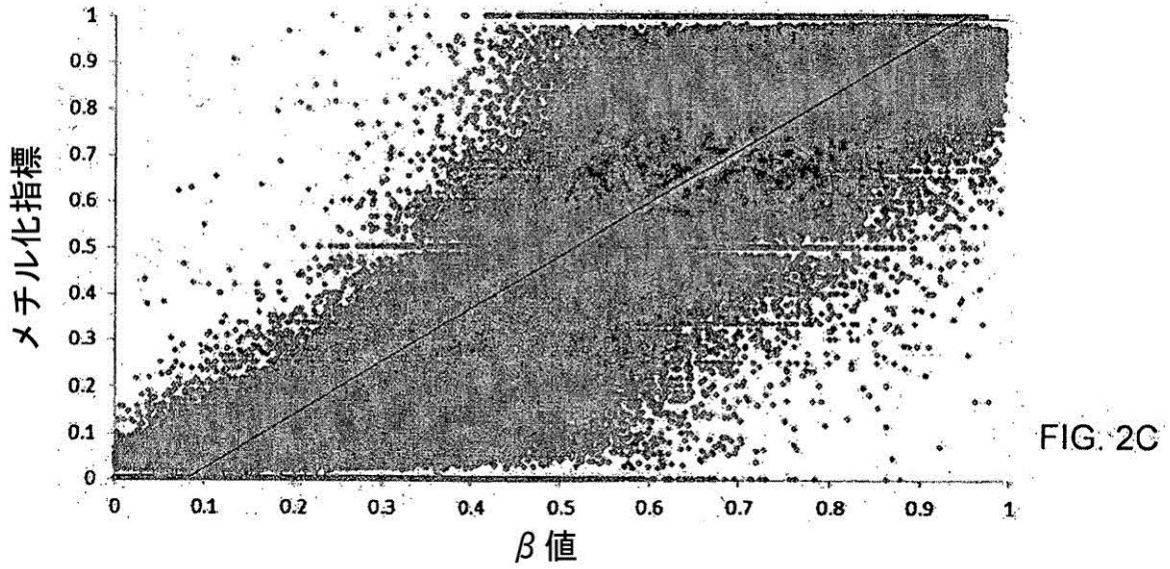


FIG. 2B

【 図 2 C 】



【 図 3 A 】

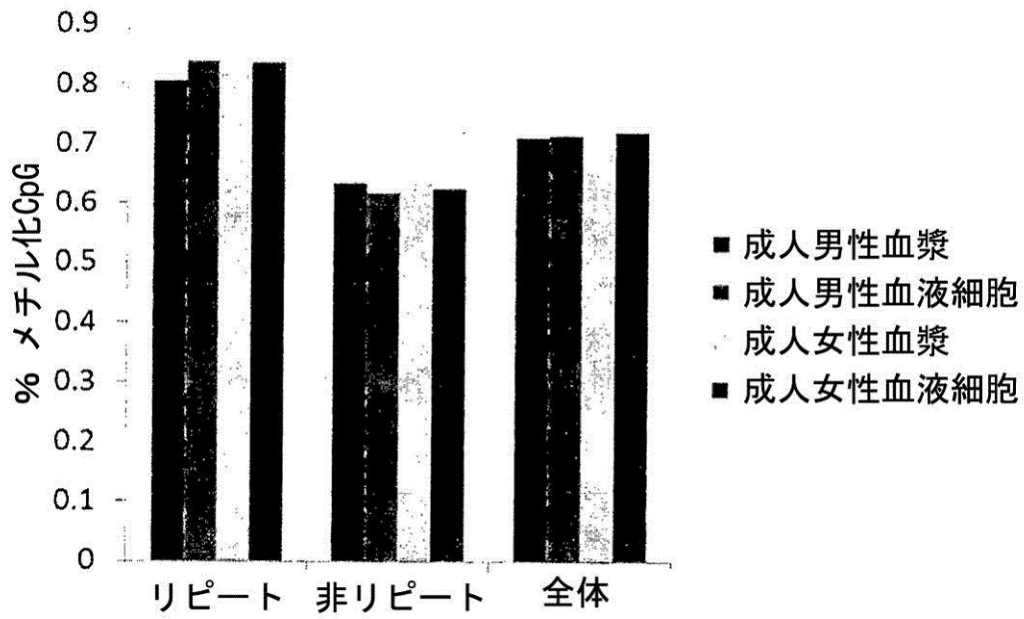


FIG. 3A

【図 3 B】

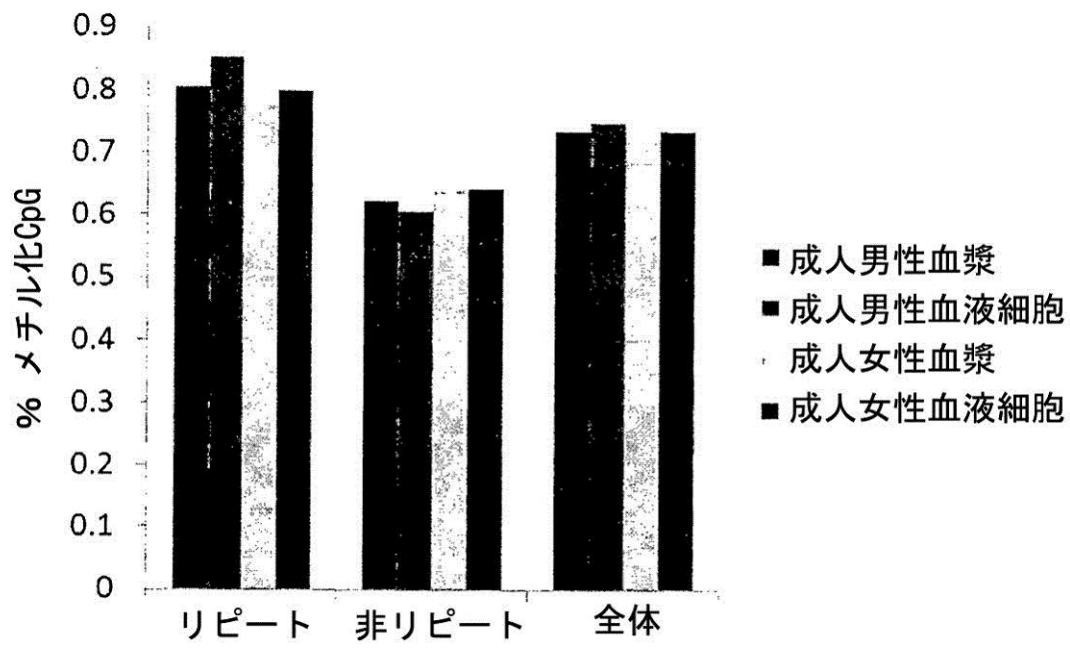


FIG. 3B

【図 4 A】

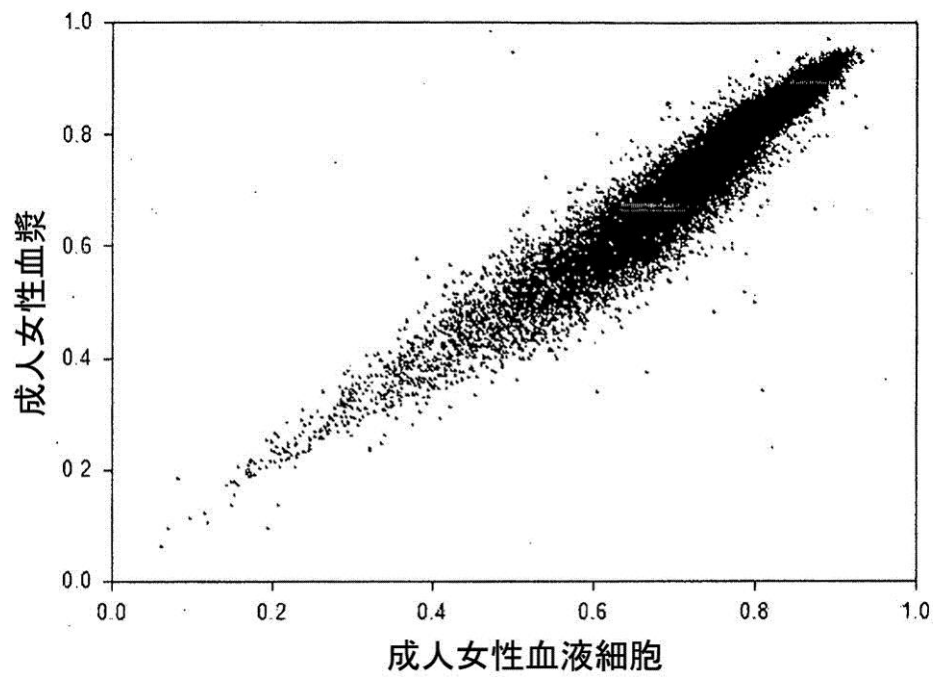


FIG. 4A

【図 4 B】

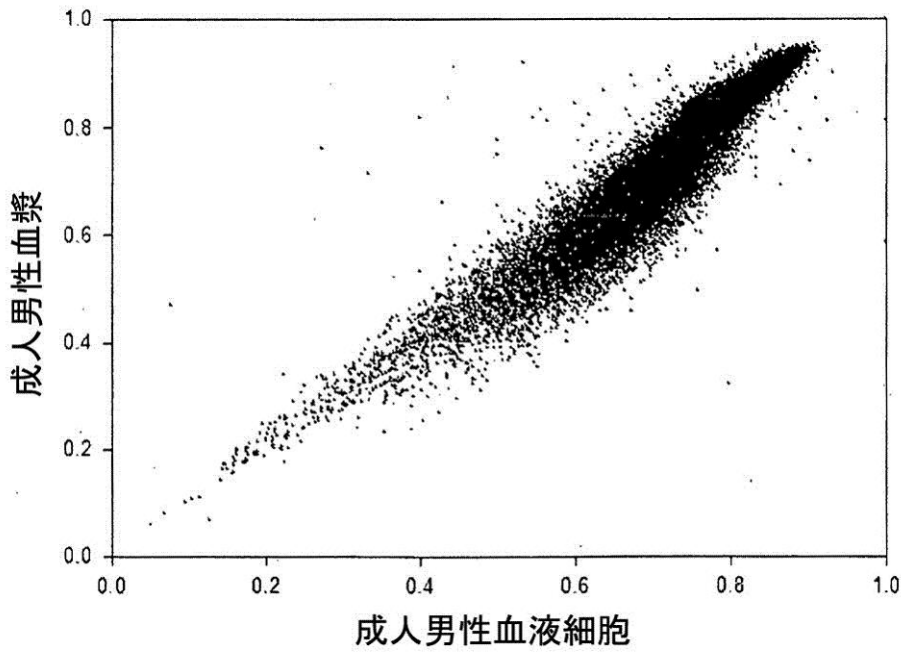


FIG. 4B

【図 5 A】

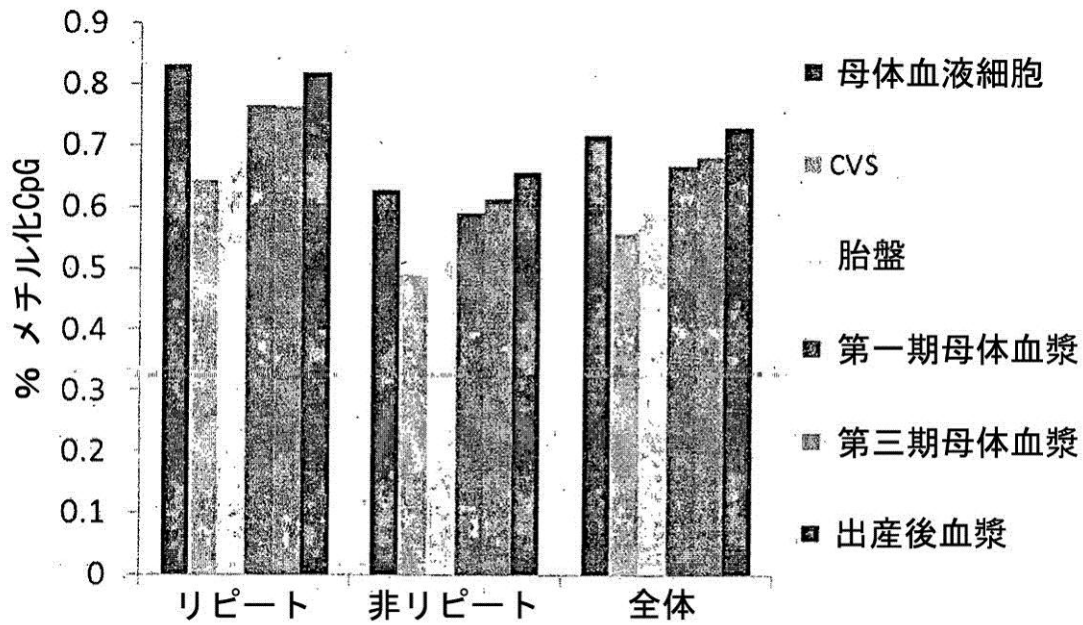


FIG. 5A

【図5B】

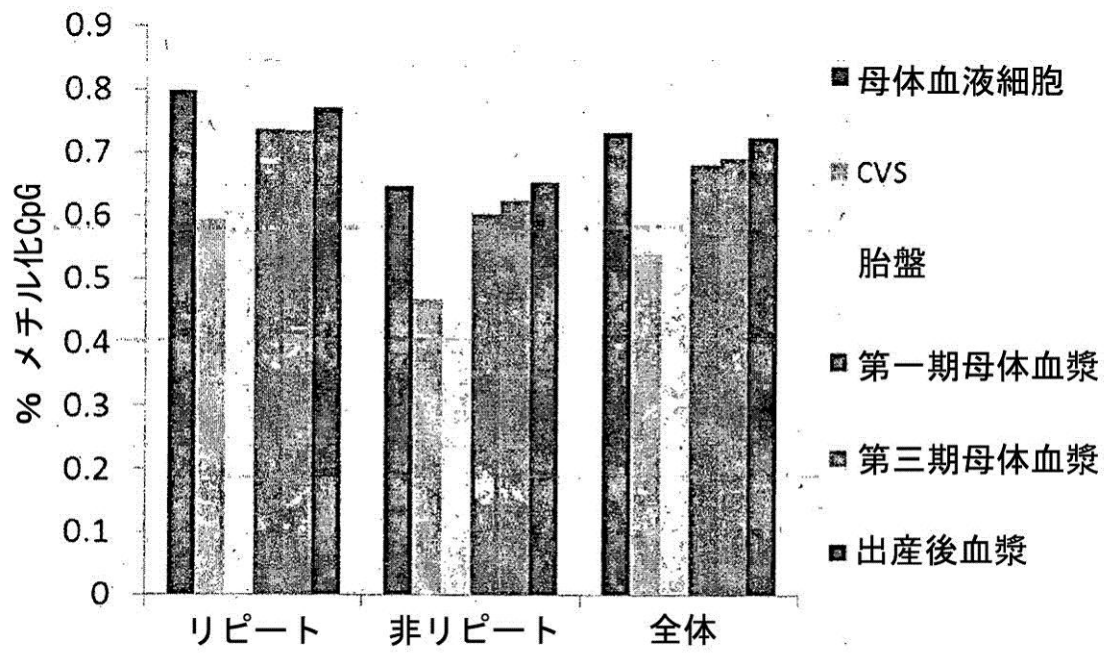


FIG. 5B

【 図 6 】

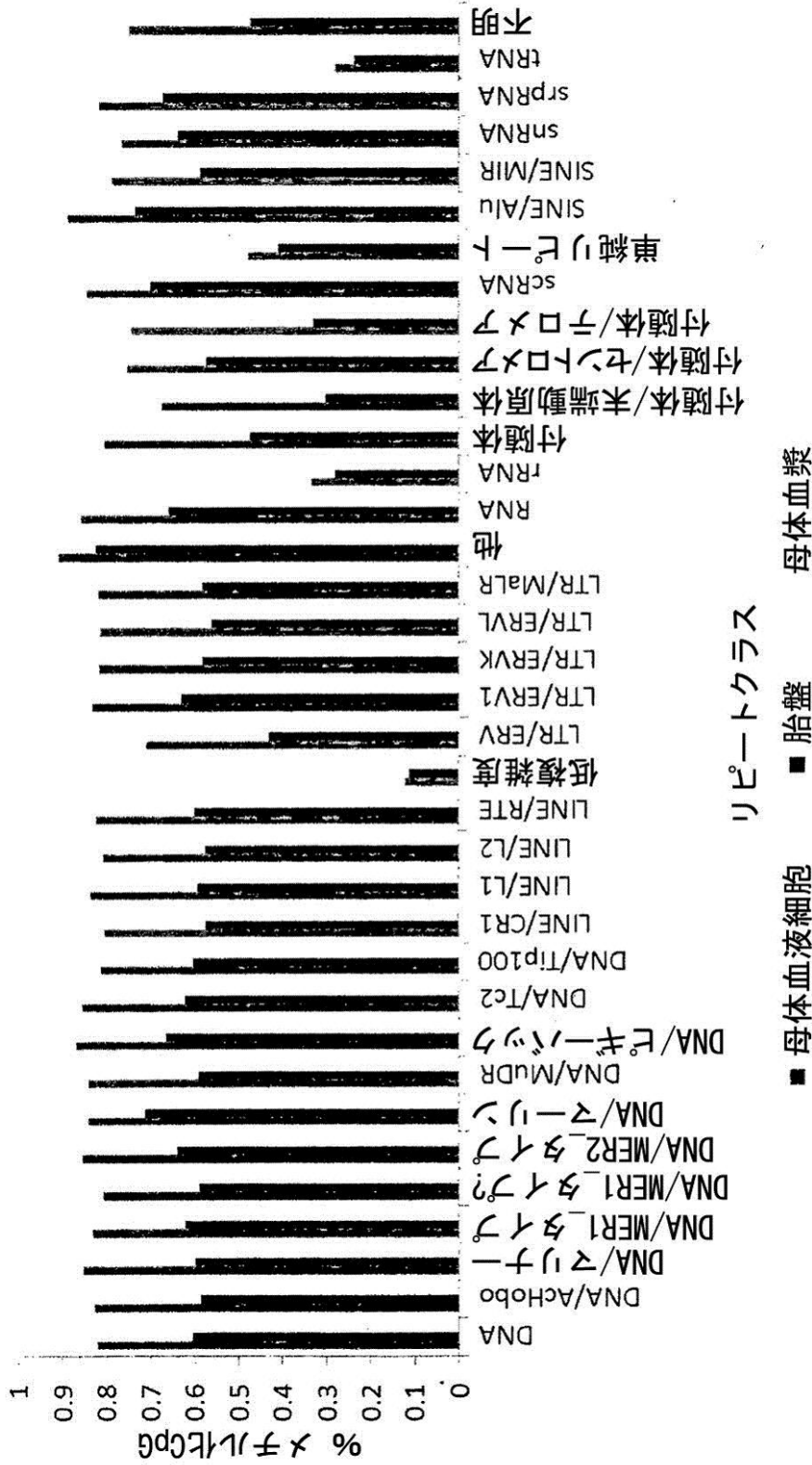


FIG. 6

【図7A】

外から内へ向かって：  
CpG密度  
母体血液細胞  
母体血漿(第一期)  
共有血漿リト  
胎児特異的血漿リト  
CVS

700

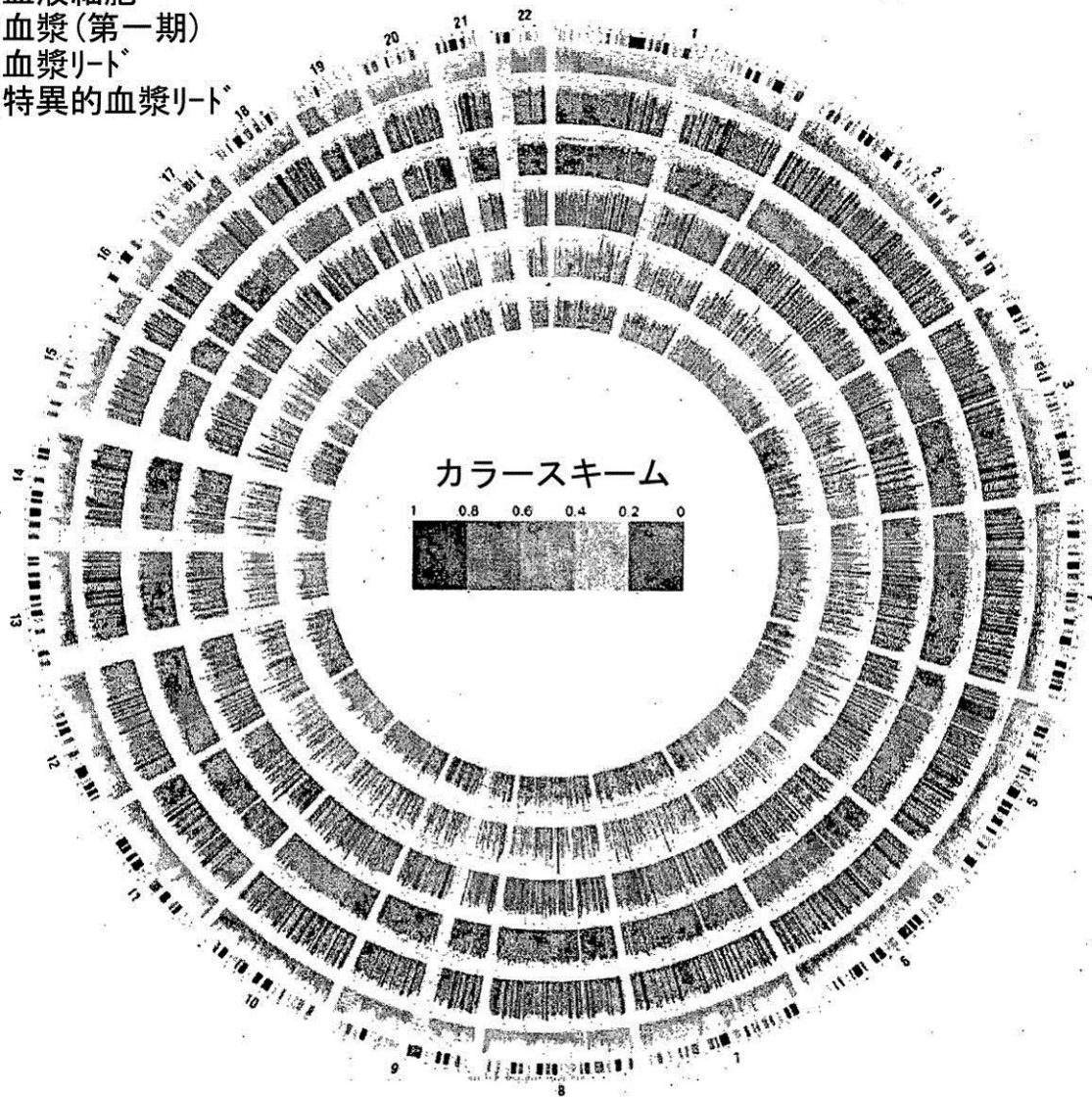


FIG: 7A

【図7B】

外から内へ向かって：  
CpG密度  
母体血液細胞  
出産後血漿  
母体血漿(第三期)  
共有血漿リト  
胎児特異的血漿リト  
胎盤組織

750

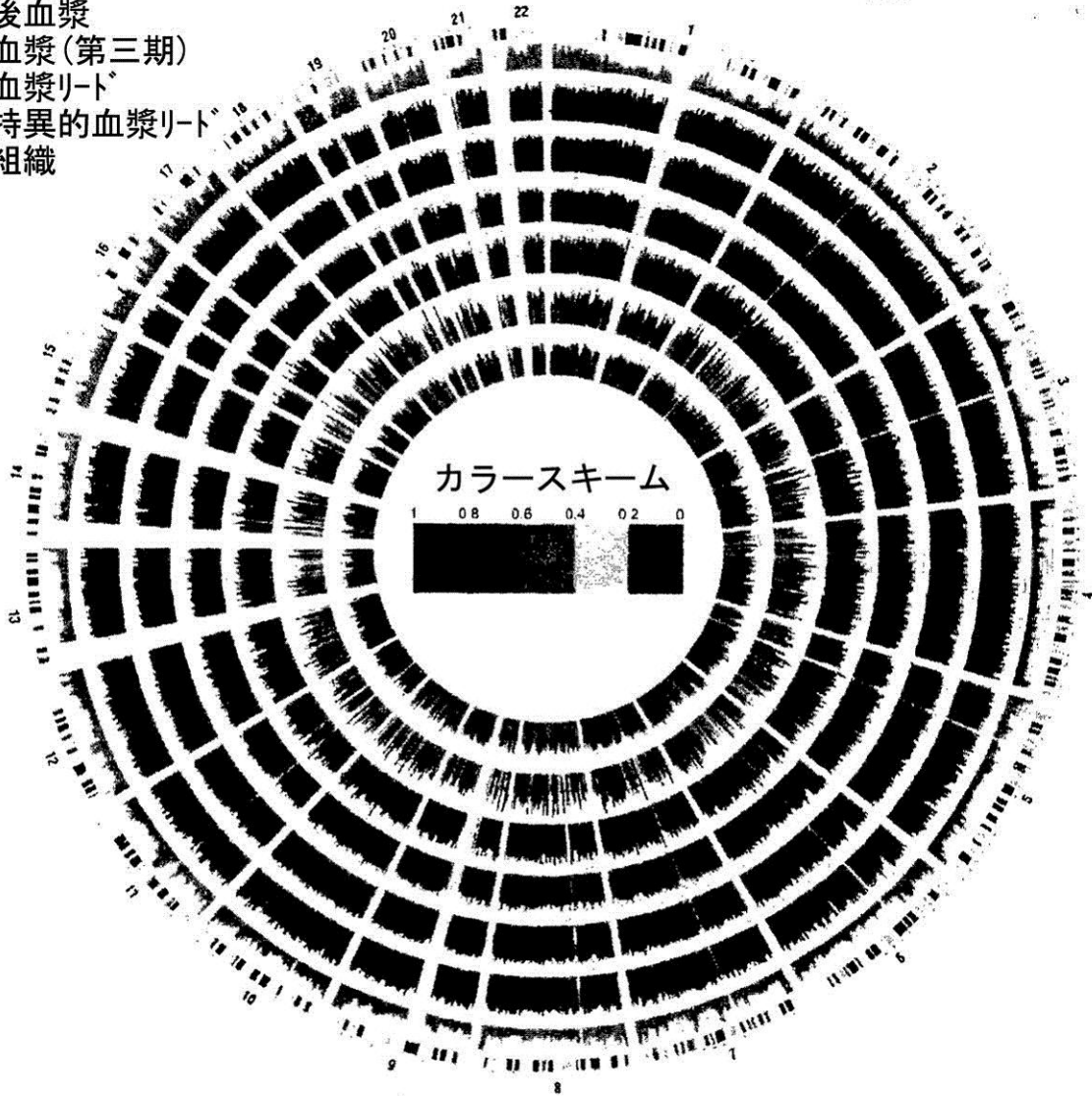


FIG. 7B

【図 8 A】

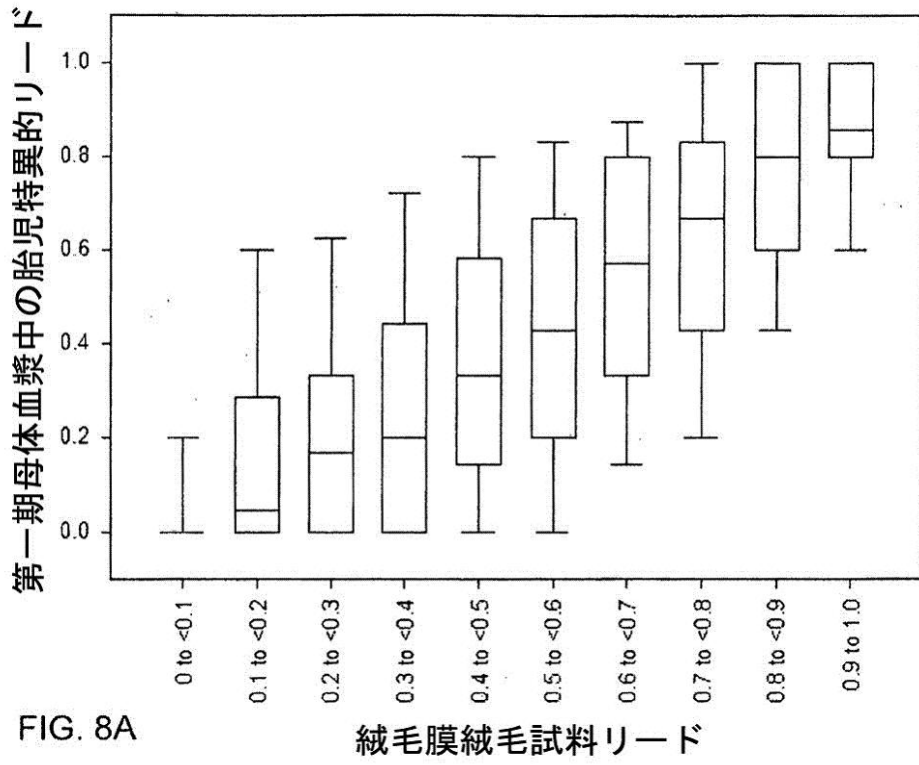


FIG. 8A

【図 8 B】

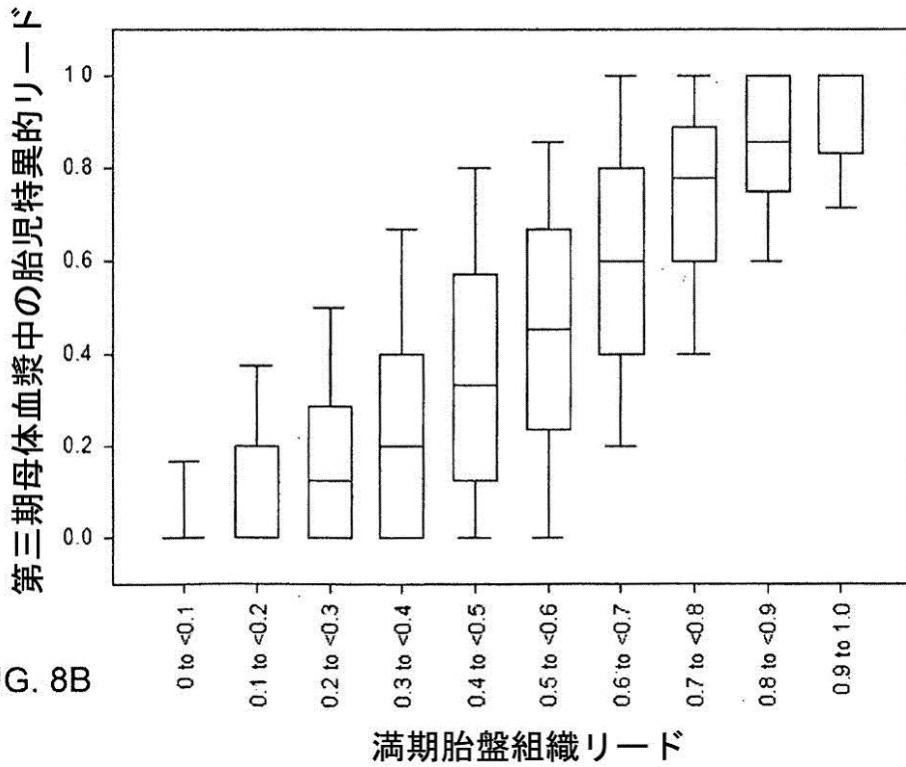


FIG. 8B

【 図 8 C 】

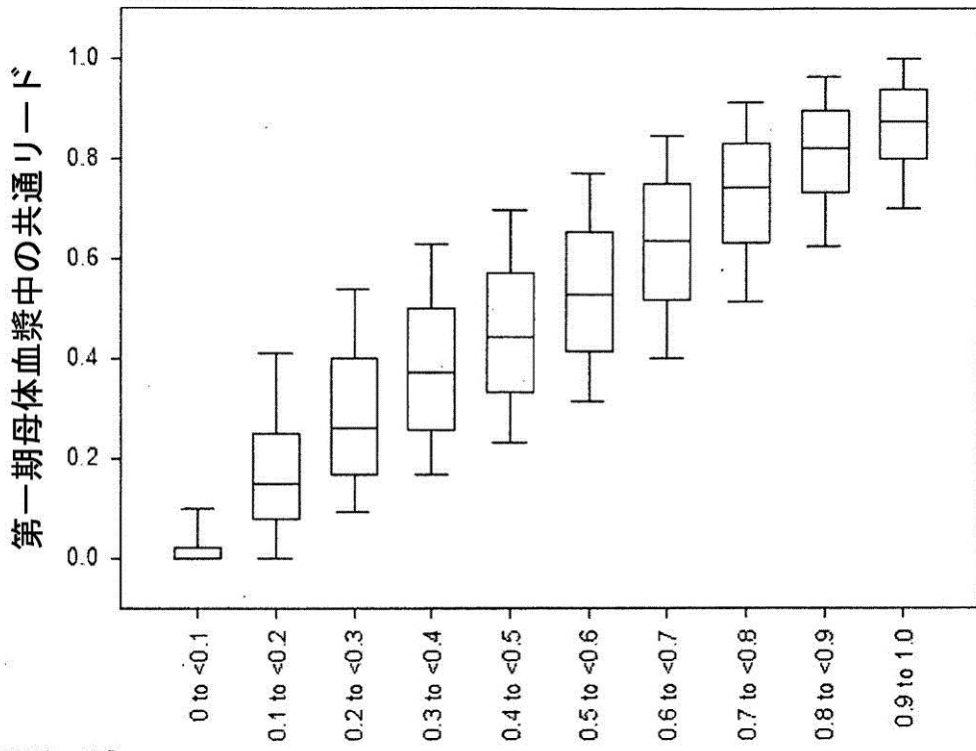


FIG. 8C

母体血液細胞リード

【 図 8 D 】

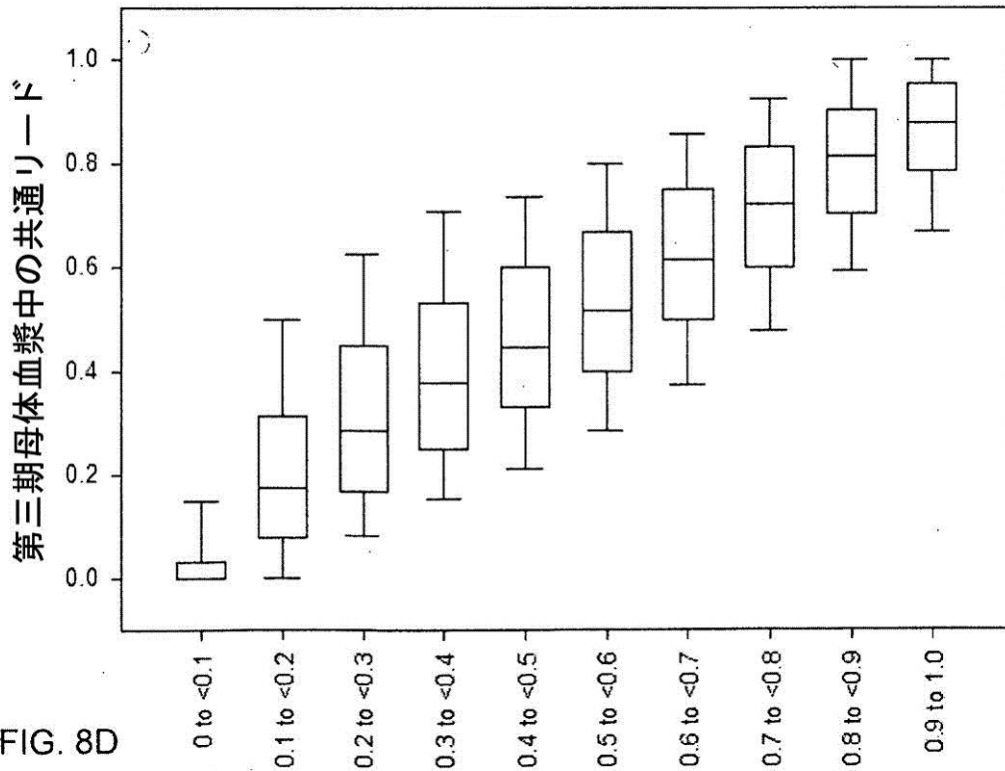


FIG. 8D

母体血液細胞リード

【 図 9 】

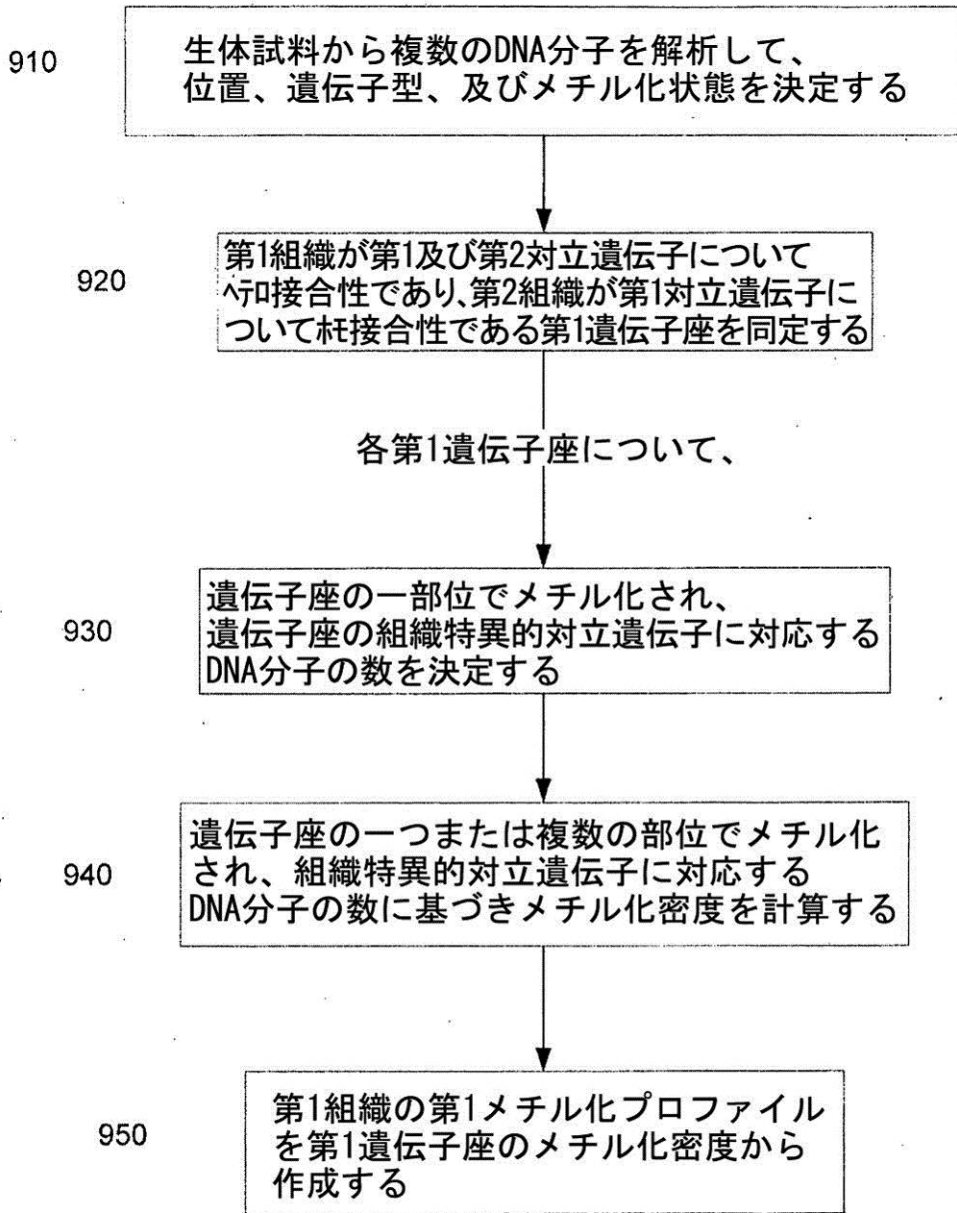


FIG. 9

【図10】

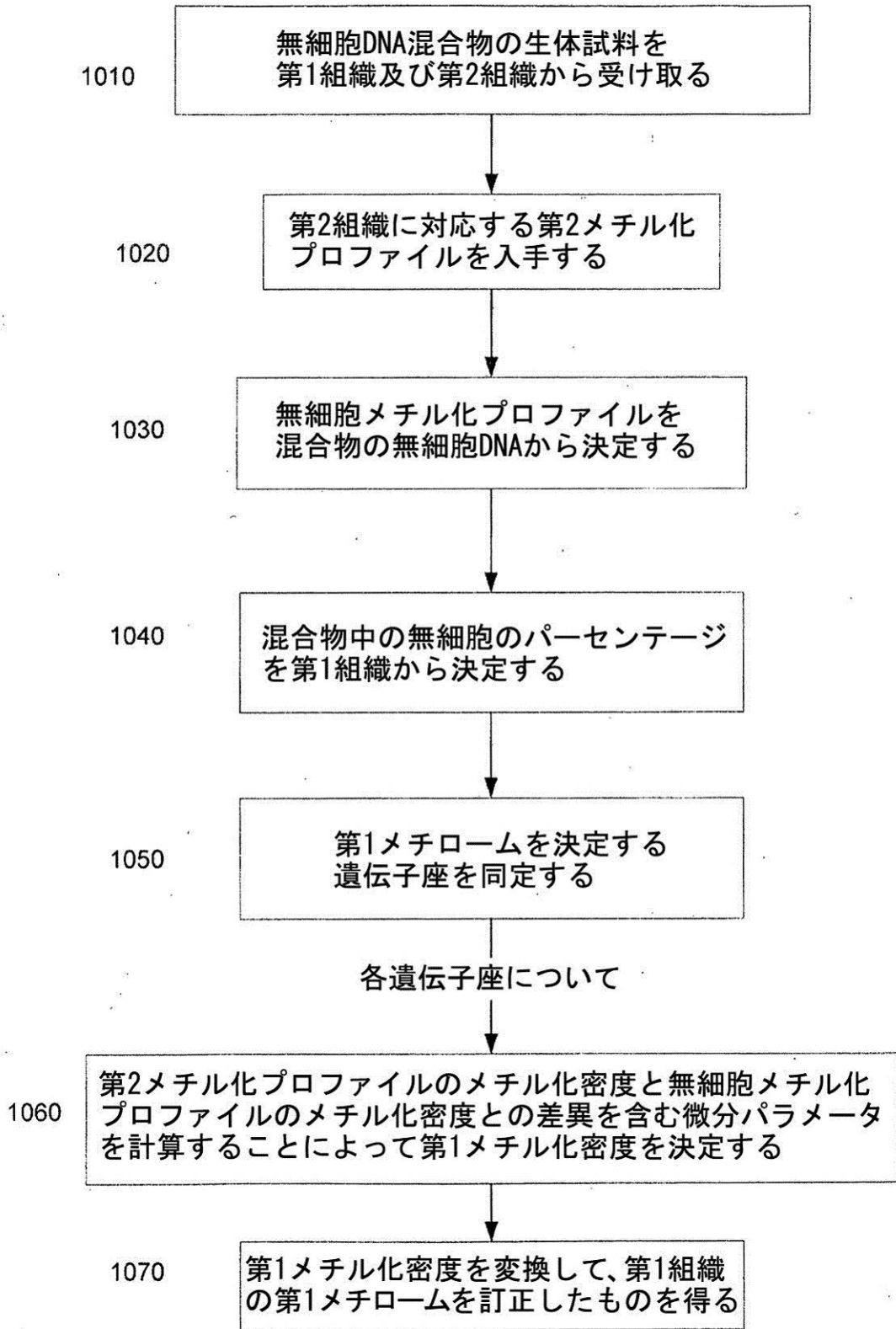


FIG. 10

【図11A】

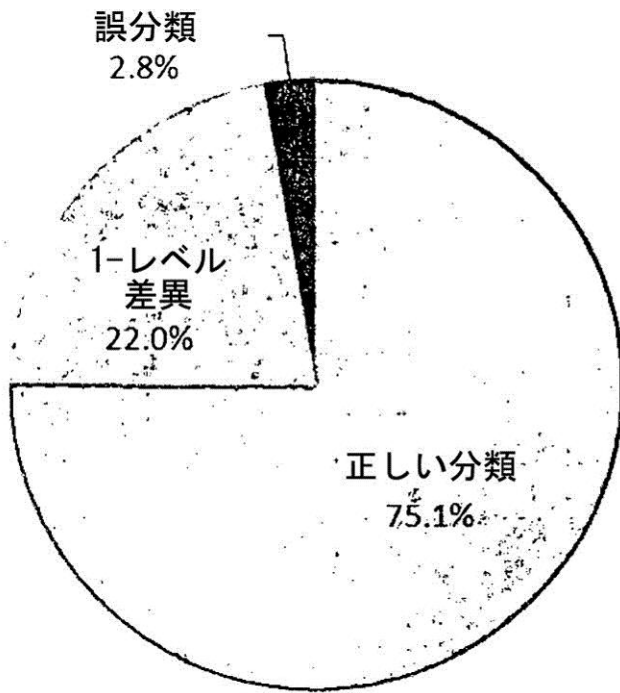
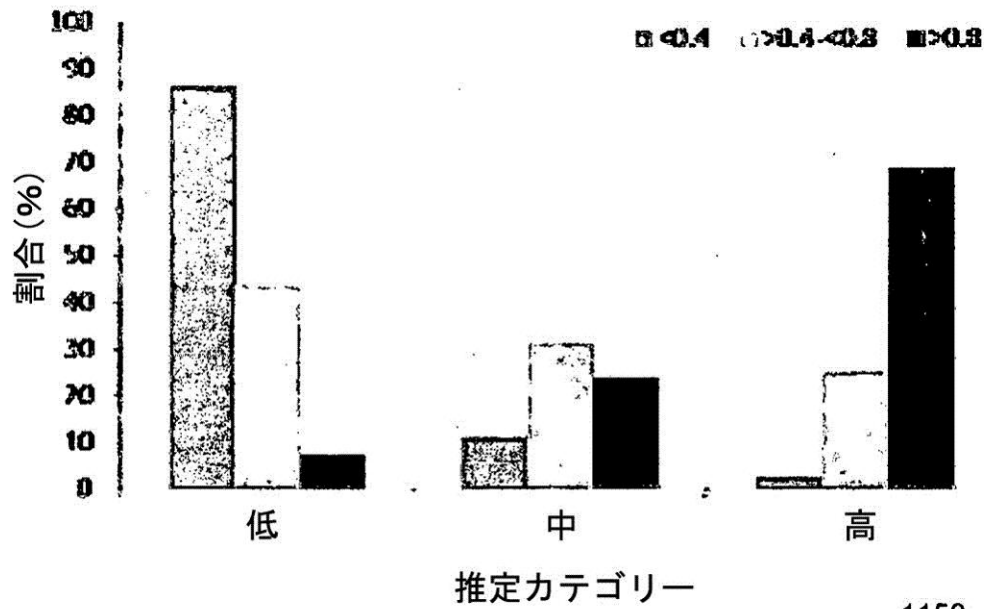


FIG. 11A

【図11B】



1150

FIG. 11B

【 図 1 2 A 】

メチル化密度(シーケンシングデータ)										文献中のメチル化状態	
No.	遺伝子座	遺伝子位置	母体血液 (BKG)	胎盤	母体血漿 (MP)	推定値 (D) <sup>1</sup>	推定		胎盤 メチル化 レベル <sup>4</sup>	胎盤状態 <sup>5</sup>	参照
							メチル化 予測スコア <sup>7</sup> (MPS) <sup>2</sup>	推定 カテゴリー <sup>3</sup>			
1	RASSF1A	chr3:50352938-50353234	0.000	0.637	0.067	0.506	1.060	高	中	過剰メチル化	(1)
2	CGI009	chr21:25856489-25856756	0.001	0.432	0.050	0.374	0.849	高	中	過剰メチル化	(2)
3	CGI028	chr21:33321942-33322182	0.035	0.331	0.040	0.073	0.367	低	低	過剰メチル化	(2)
4	CGI051	chr21:36995232-36995509	0.043	0.303	0.046	0.072	0.365	低	低	過剰メチル化	(2)
5	CGI071	chr21:41140466-41140898	0.031	0.531	0.046	0.146	0.483	中	中	過剰メチル化	(2)
6	CGI113	chr21:44953820-44953972	0.013	0.547	0.051	0.306	0.739	中	中	過剰メチル化	(2)
7	CGI137	chr21:46249872-46250196	0.940	0.413	0.820	0.030	0.299	低	中	過剰メチル化	(2)
8	CGI149	chr21:46911575-46912533	0.004	0.440	0.030	0.202	0.573	中	中	過剰メチル化	(2)
9	HLCS	chr21:37274945-37275031	0.038	0.576	0.059	0.203	0.575	中	中	過剰メチル化	(2)
10	PDE9A	chr21:42979270-42979525	0.950	0.303	0.823	-0.018	0.222	低	低	過剰メチル化	(2)
11	-	chr21:36589647-36589995	0.952	0.149	0.827	0.007	0.262	低	低	過剰メチル化	未発表
12	SERPINB5	chr18:59294739-59295038	0.936	0.530	0.856	0.329	0.777	中	中	過剰メチル化	(3)
13	VAPA	chr18:10022563-10023186	0.036	0.752	0.082	0.382	0.861	高	中	過剰メチル化	(4)
14	CABLES1	chr18:19035954-19036069	0.335	0.801	0.491	1.519	2.680	高	高	過剰メチル化	(4)
15	B4GALT6	chr18:27486040-27486932	0.113	0.827	0.331	1.764	3.072	高	高	過剰メチル化	(4)

1200

FIG. 12A

【 図 1 2 B 】

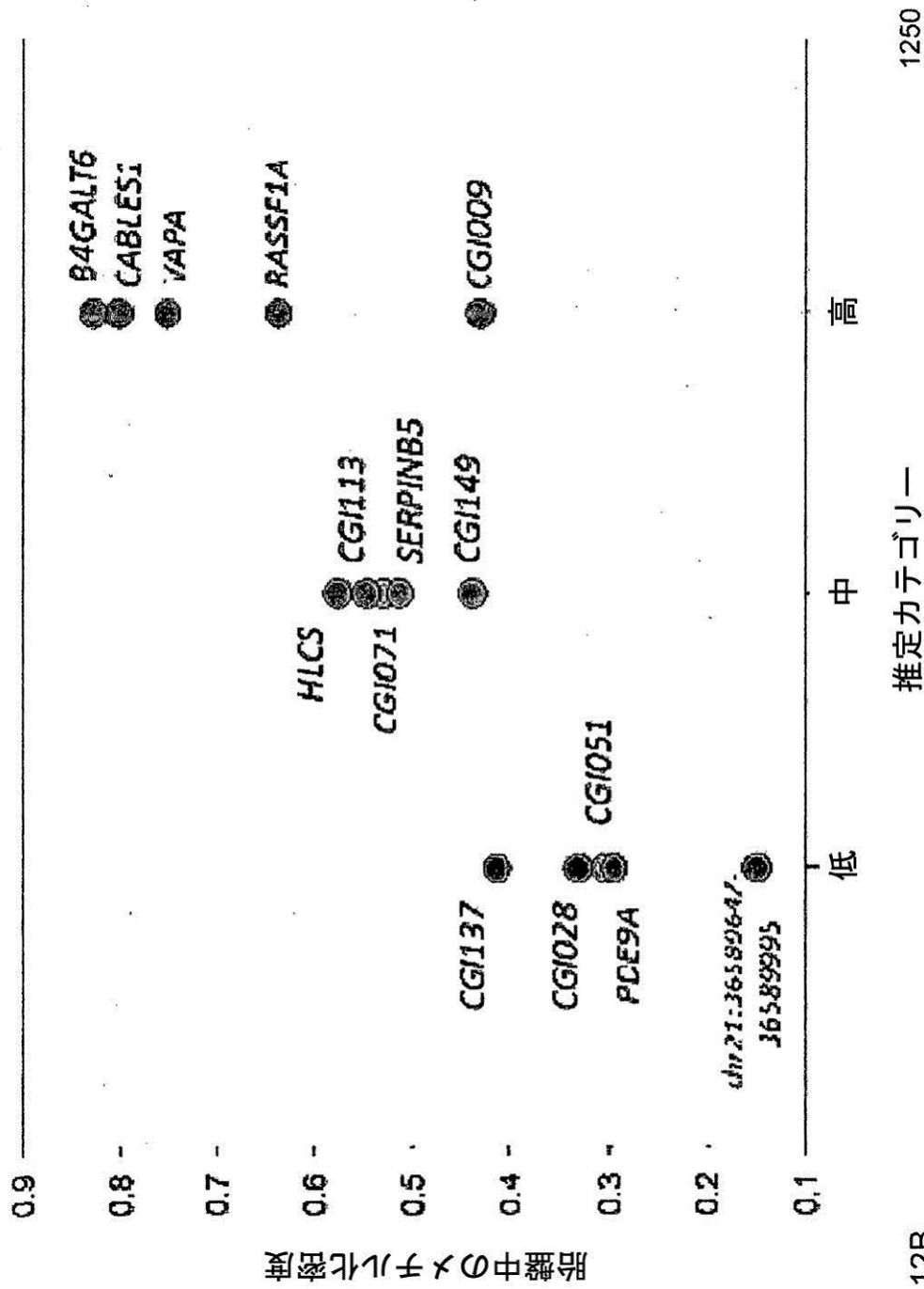
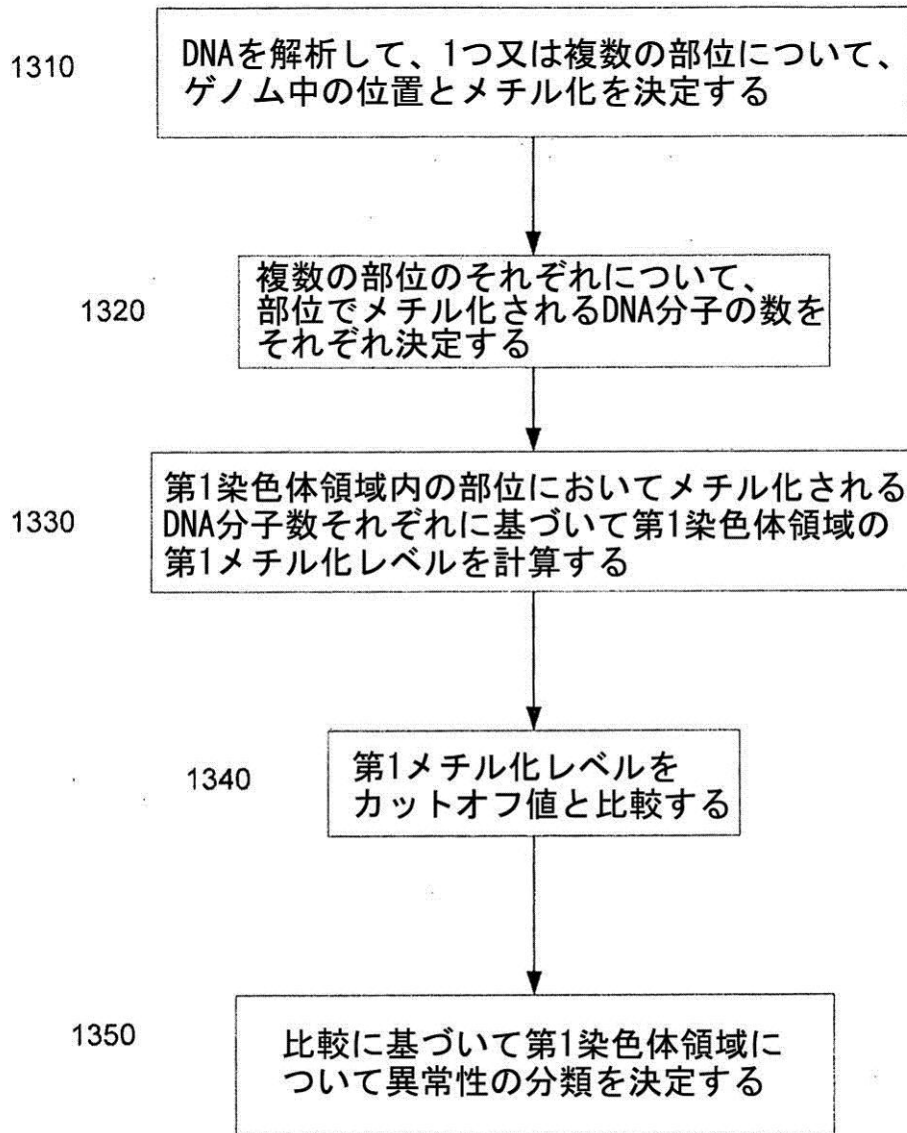


FIG. 12B

【 図 1 3 】



1300

FIG. 13

【 図 1 4 】

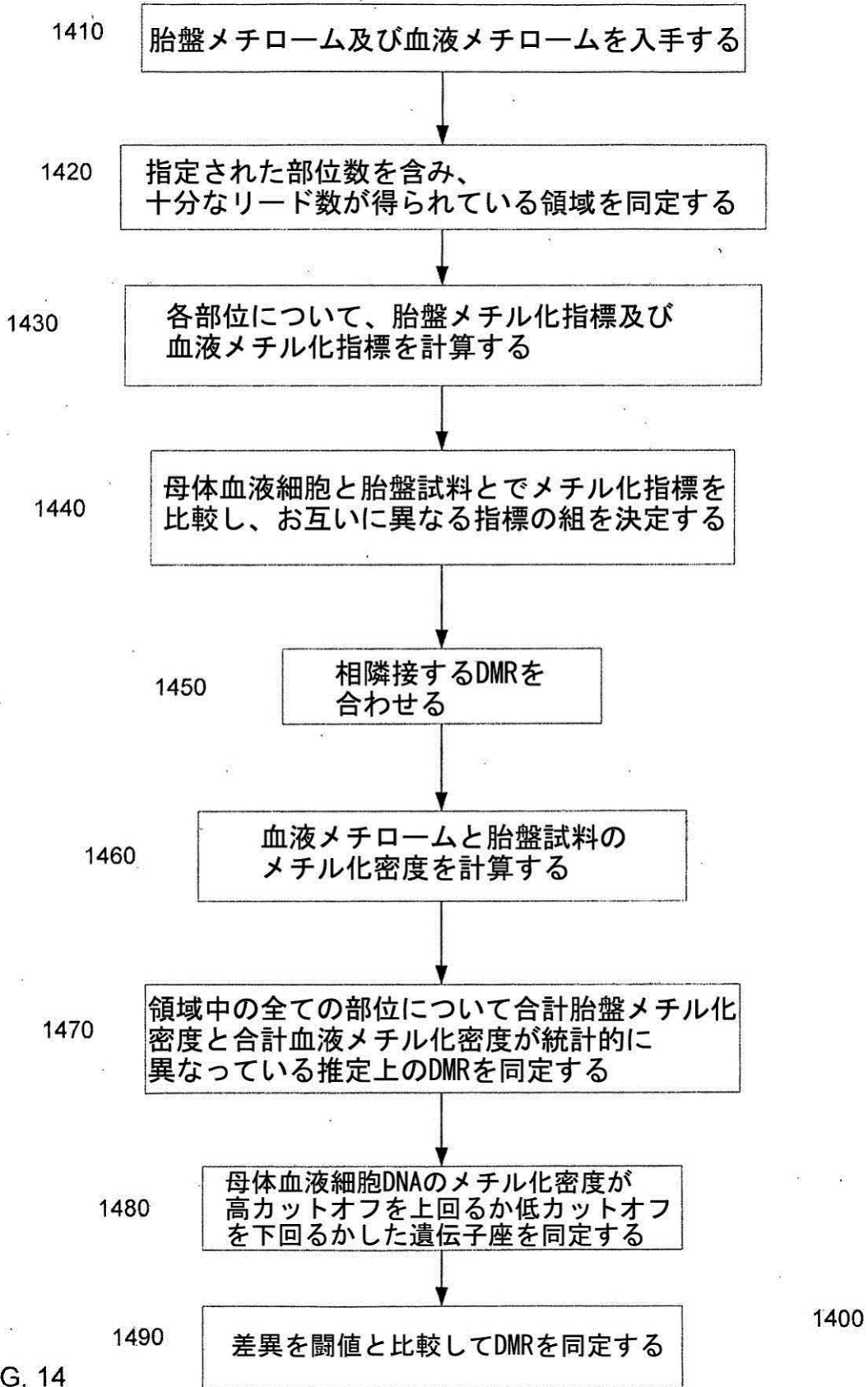


FIG. 14

【図 15 A】

No. <sup>a</sup>	遺伝子座	遺伝子位置 <sup>b</sup>	サイズ <sup>b</sup>	胎盤状態 <sup>b</sup>	BS-Seq <sup>c</sup>			DMR <sup>d</sup>								
					母体血液細胞	CVS	メチル化差異	Chr	開始	終了	サイズ	母体血液細胞	CVS	P値	メチル化差異	クラス <sup>d</sup>
1	RASSF1A	chr3:50352938-50353234	297	過剰メチル化	0.00	63.73	63.73	chr3	50351000	50354000	3000	6.26	66.68	0.00E+00	60.42	TP
2	CGI009	chr21:25856489-25856756	268	過剰メチル化	0.08	43.20	43.13	chr21	25855500	25857500	2000	4.97	48.70	0.00E+00	43.73	TP
3	CGI028	chr21:33321942-33322182	241	過剰メチル化	3.51	33.10	29.59	chr21	33316400	33323900	7500	4.52	23.85	0.00E+00	19.33	FN
4	CGI051	chr21:36995232-36995509	278	過剰メチル化	4.26	30.33	26.07	chr21	36992800	37003900	11100	3.12	21.91	0.00E+00	18.79	FN
5	CGI071	chr21:41140466-41140898	433	過剰メチル化	3.09	53.06	49.97	chr21	41140000	41141000	1000	3.40	52.00	0.00E+00	48.60	TP
6	CGI113	chr21:44953820-44953972	153	過剰メチル化	1.27	54.69	53.42	chr21	44948500	44954700	6200	7.18	57.23	0.00E+00	50.05	TP
7	CGI137	chr21:46249872-46250196	325	過剰メチル化	94.00	41.34	52.65	chr21	46227800	46250400	22600	89.74	52.67	0.00E+00	37.07	TP
8	CGI149	chr21:46911575-46912533	959	過剰メチル化	0.40	43.95	43.56	chr21	46911200	46912700	1500	5.31	46.17	0.00E+00	40.86	TP
9	H LCS	chr21:37274945-37275031	87	過剰メチル化	3.77	57.61	53.85	chr21	37274200	37275200	1000	7.33	54.24	0.00E+00	46.91	TP
10	PDE9A	chr21:42979270-42979525	256	過剰メチル化	95.01	30.33	64.68	chr21	42978100	43004800	26700	89.97	51.44	0.00E+00	38.53	TP
11	-	chr21:36589647-36589995	349	過剰メチル化	95.17	14.89	80.28	chr21	36589200	36590200	1000	94.49	19.27	0.00E+00	75.22	TP
12	SERPIN5	chr18:59294739-59295038	300	過剰メチル化	93.64	53.00	40.64	chr18	59294800	59296300	1500	88.47	40.76	3.33E-27	47.71	TP
13	VAPA	chr18:10022563-10023187	625	過剰メチル化	3.63	75.17	71.54	chr18	10021800	10023300	1500	24.08	80.33	0.00E+00	56.25	TP
14	CABLES1	chr18:19035954-19036070	117	過剰メチル化	33.47	80.09	46.62	-	-	-	-	-	-	-	FN	
15	B4GALT6	chr18:27486040-27486933	894	過剰メチル化	11.34	82.75	71.41	chr18	27486100	27487100	1000	11.34	82.75	9.6408E-86	71.41	TP
16	CASP8	chr2:201830342-201831885	1544	過剰メチル化	0.52	47.54	47.03	chr2	201830200	201832200	2000	3.77	49.13	4.22E-42	45.36	TP
17	RARB	chr3:25444840-25445090	251	過剰メチル化	2.28	26.93	24.65	chr3	25443900	25445400	1500	3.44	22.97	9.65E-50	19.53	FN
18	APC	chr5:112100999-112101943	945	過剰メチル化	0.71	45.78	45.06	chr5	112100300	112101800	1500	3.59	48.09	0.00E+00	44.50	TP
19	DAB2IP_ori	chr9:121541221-121541460	240	過剰メチル化	84.87	52.63	32.24	chr9	121540400	121541500	1100	85.21	36.86	5.2605E-10	48.35	TP
20	DAB2IP_ex	chr9:123128261-123129077	817	過剰メチル化	95.09	32.99	62.10	chr9	123127700	123129200	1500	90.72	50.61	1.4706E-19	40.11	TP
21	THY1	chr11:118798952-118799382	431	過剰メチル化	0.88	39.32	38.44	chr11	118797600	118799600	2000	2.25	27.28	0.00E+00	25.03	TP
22	PTPN6	chr12:6930211-6933772	3562	過剰メチル化	1.52	79.80	78.29	chr12	6930000	6934000	4000	4.26	80.13	0.00E+00	75.87	TP
23	PYCARD_ex	chr16:31121808-31122146	339	過剰メチル化	4.90	46.51	41.61	-	-	-	-	-	-	-	FN	
24	chr18A	chr18:55090284-55090606	323	過剰メチル化	6.14	31.79	25.65	chr18	55089700	55094200	4500	4.78	22.91	0.00E+00	18.13	FN
25	chr21A	chr21:39279723-39280004	282	過剰メチル化	12.80	64.02	51.21	chr21	39279300	39279800	500	4.74	62.07	7.17E-62	57.33	TP
26	chr21B	chr21:44161027-44161371	345	過剰メチル化	0.86	83.90	83.04	chr21	44160700	44161700	1000	11.06	77.32	0.00E+00	66.26	TP
27	chr21C	chr21:33320544-33320829	286	過剰メチル化	5.49	37.92	32.43	chr21	33316400	33323900	7500	4.52	23.85	0.00E+00	19.33	FN
28	chr21D	chr21:42189223-42189683	461	過剰メチル化	13.02	85.84	72.82	chr21	42188700	42189700	1000	7.78	81.67	3.62E-77	73.89	TP
29	chr21Ei	chr21:42355712-42355908	197	過剰メチル化	0.00	57.85	57.85	chr21	42355000	42357500	2500	5.21	62.23	0.00E+00	57.02	TP
30	chr21Eii	chr21:42357215-42357341	127	過剰メチル化	3.57	48.25	44.68	chr21	42355000	42357500	2500	5.21	62.23	0.00E+00	57.02	TP
31	chr21H	chr21:32268803-32268943	141	過剰メチル化	0.49	78.84	78.35	chr21	32268300	32269300	1000	20.49	85.25	4.9563E-34	64.76	TP
32	chr21I	chr21:44079235-44079535	301	過剰メチル化	1.23	67.44	66.21	chr21	44079400	44080400	1000	15.19	68.06	4.9E-59	52.87	TP
33	SERPIN5_P	chr18:59294811-	465	過剰メチル化	91.96	39.71	52.25	chr18	59294800	59296300	1500	88.47	40.76	3.3294E-	47.71	TP

FIG. 15A

1500

【図 15 B】

No. <sup>a</sup>	遺伝子座	BS-Seq			DMR <sup>c</sup>									メチル化 <sup>d</sup>
		母体血液細胞	胎盤	メチル化差異 <sup>b</sup>	Chr	開始	終了	サイズ	母体血液細胞	胎盤	P値	メチル化差異		
1	RASSF1A	0.00	60.84	60.84	chr3	50352100	50354100	2000	2.16	62.21	0.00E+00	60.05	TP	
2	CGI009	0.08	20.50	20.43	chr21	25855600	25857100	1500	2.04	24.37	0.00E+00	22.33	TP	
3	CGI028	3.51	17.38	13.86	-	-	-	-	-	-	-	-	TN	
4	CGI051	4.26	13.93	9.67	-	-	-	-	-	-	-	-	TN	
5	CGI071	3.09	24.85	21.76	chr21	41139900	41141400	1500	6.83	29.28	0.00E+00	22.45	TP	
6	CGI113	1.27	40.24	38.97	chr21	44948500	44954700	6200	7.18	45.00	0.00E+00	37.82	TP	
7	CGI137	94.00	37.10	56.90	chr21	46248400	46250400	2000	92.28	43.85	1.66E-76	48.43	TP	
8	CGI149	0.40	22.19	21.79	chr21	46911200	46912700	1500	5.31	25.73	0.00E+00	20.42	TP	
9	HLCS	3.77	58.49	54.72	chr21	37274200	37275200	1000	7.33	56.83	0.00E+00	49.50	TP	
10	PDE9A	95.01	32.41	62.60	chr21	42978900	42990100	11200	90.89	44.38	0.00E+00	46.51	TP	
11	-	95.17	19.92	75.24	chr21	36589200	36590200	1000	94.49	22.66	0.00E+00	71.83	TP	
12	SERPINB5	93.64	28.06	65.57	chr18	59294500	59295500	1000	92.11	36.53	3.85E-31	55.58	TP	
13	VAPA	3.63	73.88	70.25	chr18	10022100	10023100	1000	11.67	75.76	0.00E+00	64.09	TP	
14	CABLES1	33.47	81.40	47.93	-	-	-	-	-	-	-	-	FN	
15	B4GALT6	11.34	88.57	77.23	chr18	27485800	27486800	1000	28.97	90.00	4.3779E-59	61.03	TP	
16	CASP8	0.52	56.27	55.75	chr2	201830200	201832200	2000	3.77	57.60	1.33E-52	53.83	TP	
17	RARB	2.28	38.18	35.90	chr3	25444000	25445000	1000	2.36	24.42	8.00E-54	22.06	TP	
18	APC	0.71	34.89	34.18	chr5	112100700	112101700	1000	0.38	32.97	0.00E+00	32.59	TP	
19	DAB2IP_ori	84.87	40.28	44.60	chr9	121540400	121541400	1000	84.79	30.63	1.7338E-14	54.16	TP	
20	DAB2IP_ex	95.09	16.14	78.95	chr9	123128600	123129100	500	95.14	17.42	9.6247E-47	77.72	TP	
21	THY1	0.88	22.28	21.40	chr11	118797800	118799300	1500	1.22	20.50	0.00E+00	19.28	FN	
22	PTPN6	1.52	81.33	79.82	chr12	6930000	6934000	4000	4.26	81.58	0.00E+00	77.32	TP	
23	PYCARD_ex	4.90	48.73	43.83	chr16	31121700	31122200	500	4.85	32.87	1.1158E-34	28.02	TP	
24	chr18A	6.14	16.25	10.10	-	-	-	-	-	-	-	-	TN	
25	chr21A	12.80	74.65	61.85	chr21	39278300	39280300	2000	9.96	75.07	0.00E+00	65.11	TP	
26	chr21B	0.86	81.56	80.70	chr21	44160700	44161700	1000	11.06	78.6	0.00E+00	67.54	TP	
27	chr21C	5.49	14.91	9.42	-	-	-	-	-	-	-	-	TN	
28	chr21D	13.02	88.71	75.70	chr21	42188700	42189700	1000	7.78	84.42	3.5806E-77	76.64	TP	
29	chr21Ei	0.00	73.21	73.21	chr21	42355300	42357800	2500	4.66	79.19	0.00E+00	74.53	TP	
30	chr21Eii	3.57	84.00	80.43	chr21	42355300	42357800	2500	4.66	79.19	0.00E+00	74.53	TP	
31	chr21H	0.49	77.49	77.00	chr21	32268400	32268900	500	18.4	83.85	2.1972E-30	65.45	TP	
32	chr21i	1.23	58.62	57.39	chr21	44079300	44080300	1000	12.16	72.55	2.3559E-60	60.39	TP	
33	SERPINB5_P	91.96	28.61	63.35	chr18	59294500	59295500	1000	92.11	36.53	3.85E-31	55.58	TP	

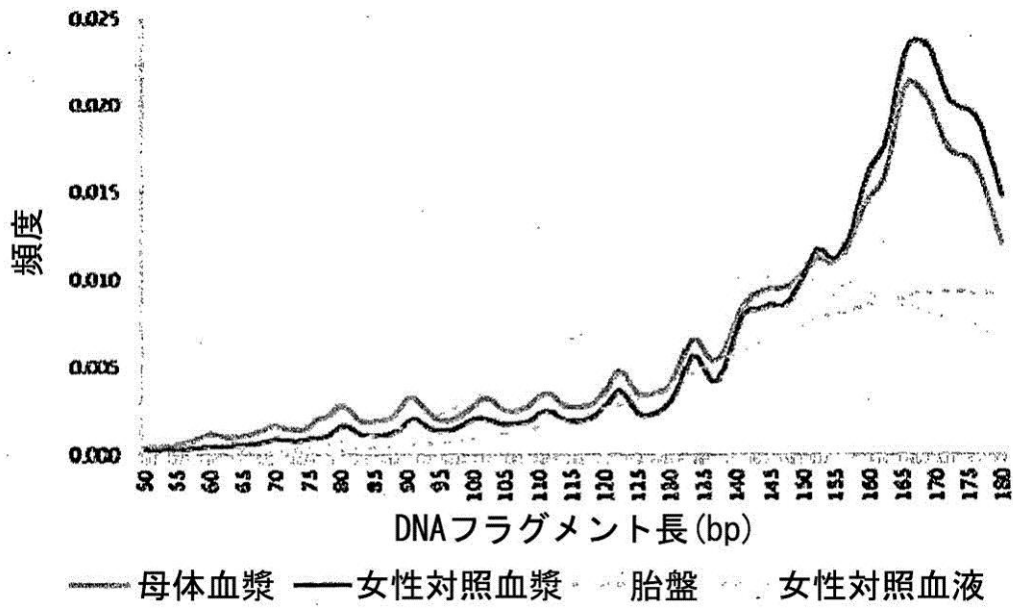
FIG. 15B

【図16】

	第一期母体血漿		第三期母体血漿	
	過剰メチル化 <sup>a</sup>	過剰メチル化 <sup>b</sup>	過剰メチル化 <sup>a</sup>	過剰メチル化 <sup>b</sup>
予測遺伝子座 の数	3081	44455	1746	14930
胎盤組織 <sup>c</sup> データで メチル化密度が >40%である 遺伝子座の数	1,678	なし	1,525	なし
胎盤組織 <sup>c</sup> データで メチル化密度が >60%である 遺伝子座の数	なし	23468	なし	13475
胎盤組織 <sup>c</sup> 及び 母体血液の 細胞データから 引き出される DMRと オーバーラップ する遺伝子座 の数	1457	21812	1279	12677

FIG. 16

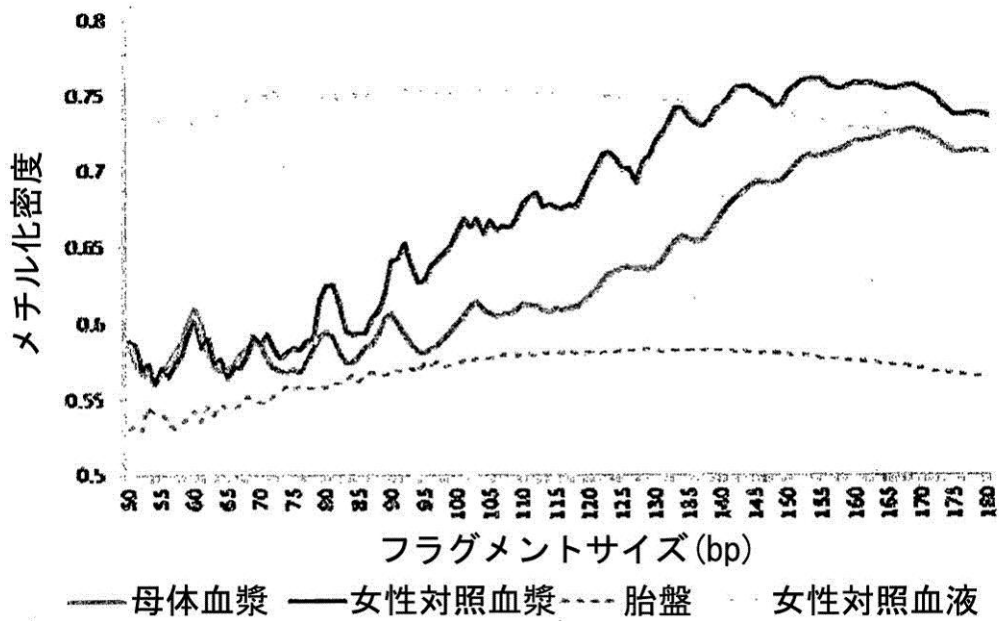
【図17A】



1700

FIG. 17A

【図17B】



1750

FIG. 17B

【図 18 A】

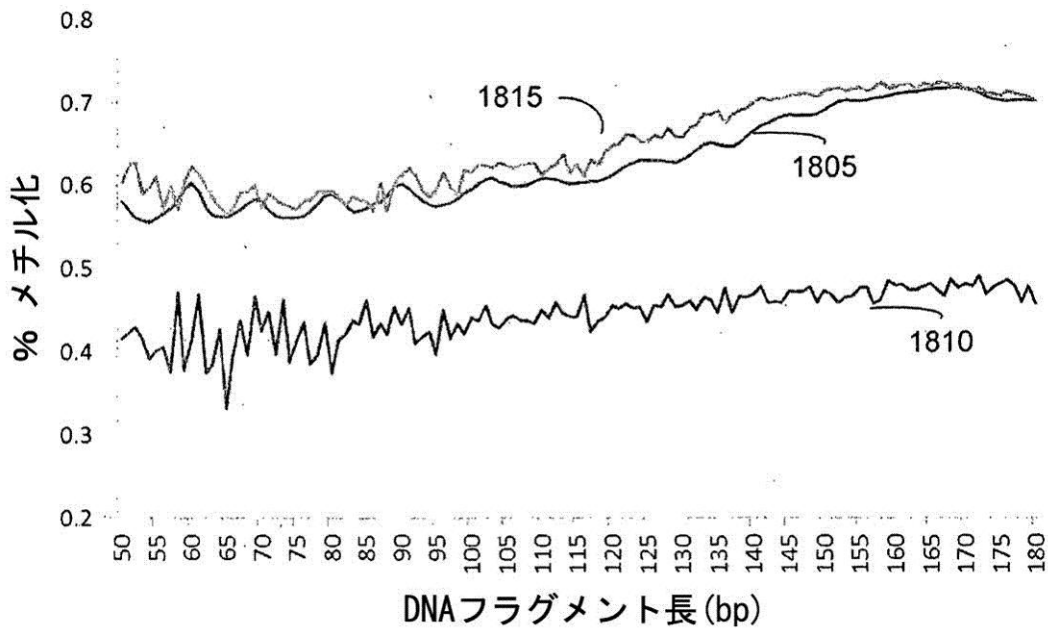


FIG. 18A  
1800

【図 18 B】

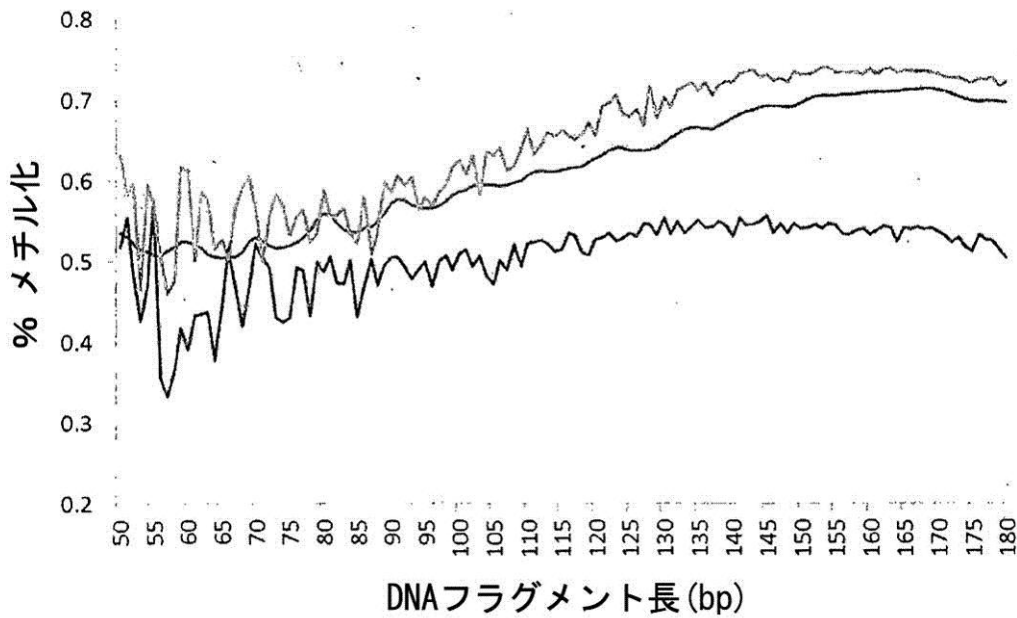


FIG. 18B  
1850

【図19A】

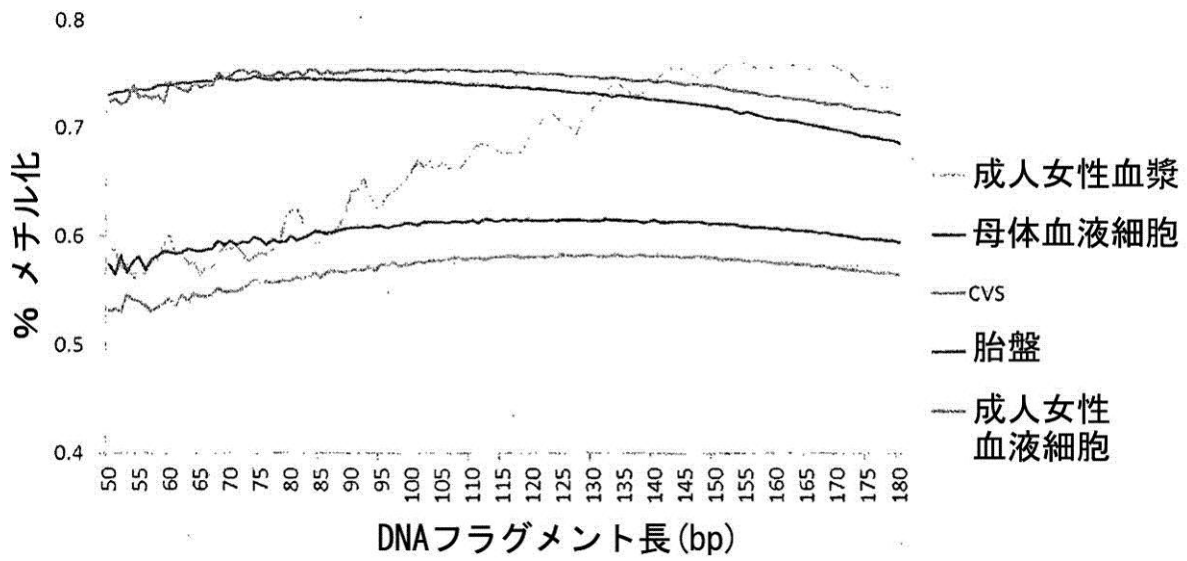
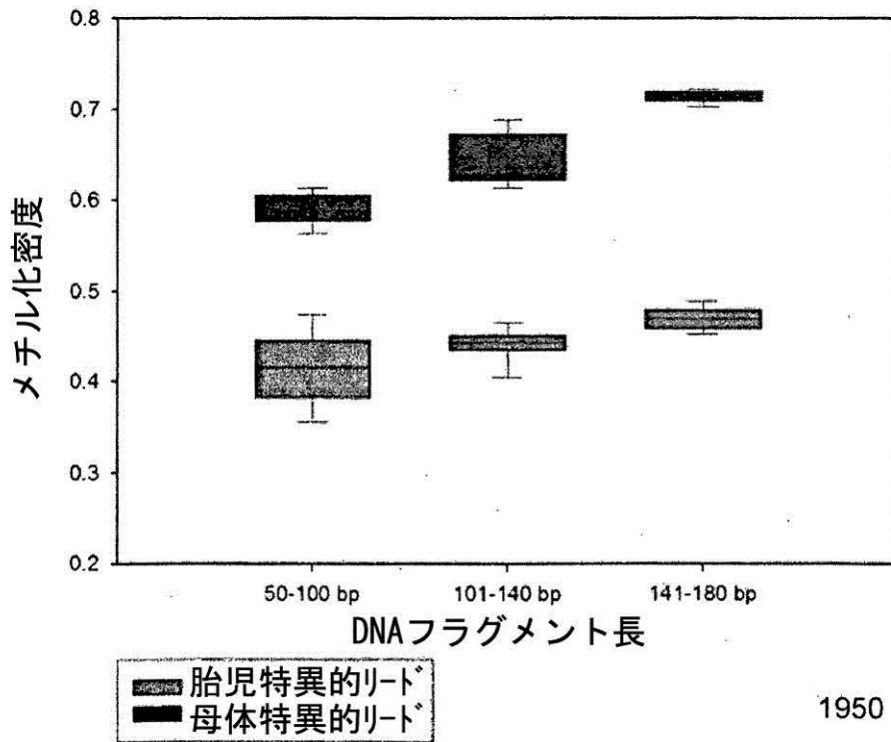


FIG. 19A

1900

【図19B】



1950

FIG. 19B

【図20】

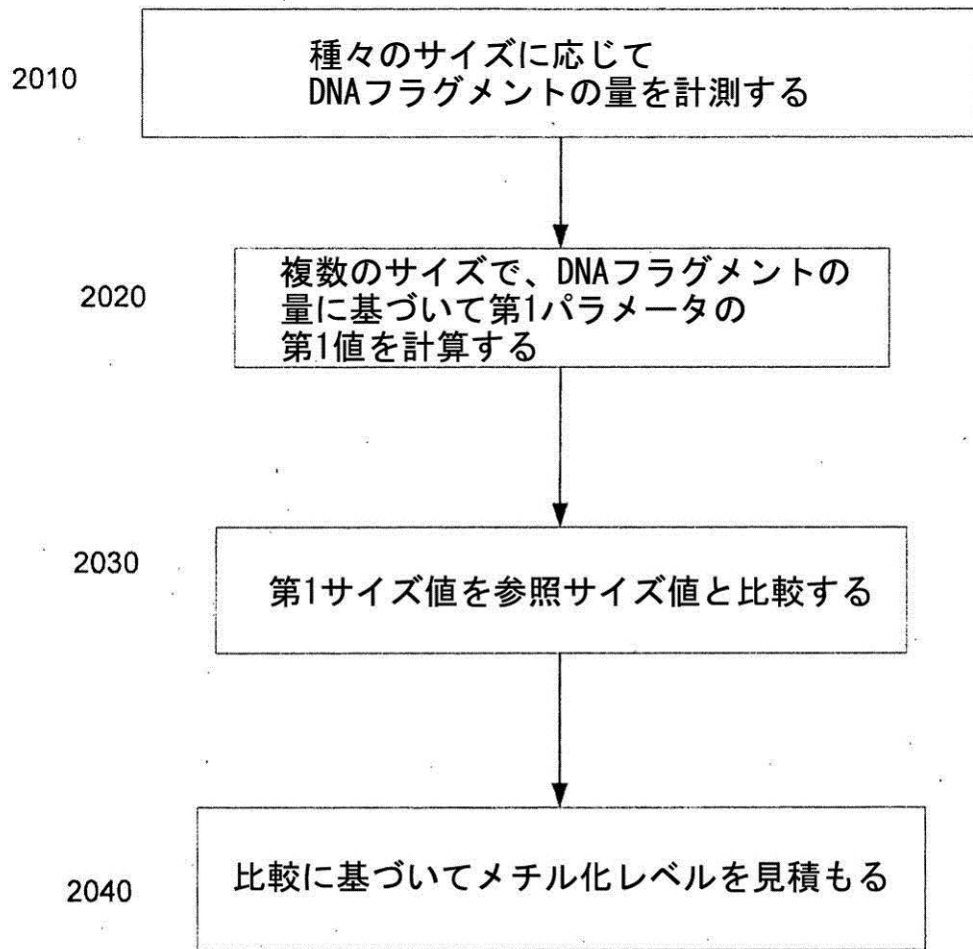


FIG. 20

【図 2 1 A】

染色体	HCC患者			
	バフィーコート	非腫瘍 肝臓組織	腫瘍組織	手術前血漿
1	65.4%	65.7%	44.1%	60.2%
2	68.3%	68.2%	42.0%	58.6%
3	68.2%	68.5%	44.6%	60.9%
4	68.9%	67.7%	37.8%	56.9%
5	67.4%	66.7%	37.8%	56.9%
6	67.4%	67.7%	43.2%	59.9%
7	69.1%	68.8%	43.0%	60.0%
8	69.1%	68.0%	40.4%	60.0%
9	66.4%	66.2%	44.9%	60.6%
10	68.9%	68.2%	40.8%	58.5%
11	65.5%	65.6%	41.6%	58.5%
12	67.6%	67.4%	45.9%	62.0%
13	69.8%	68.8%	40.6%	60.2%
14	66.4%	66.2%	41.4%	59.2%
15	66.1%	66.8%	44.6%	61.0%
16	68.9%	67.6%	45.6%	60.7%
17	64.0%	64.9%	45.8%	60.2%
18	69.9%	69.1%	42.9%	60.0%
19	62.3%	62.7%	47.5%	61.0%
20	66.0%	65.3%	39.1%	57.8%
21	61.8%	61.1%	39.9%	57.7%
22	67.9%	67.6%	49.1%	63.8%
全常染色体	67.1%	66.9%	42.9%	59.7%

FIG. 21A

2100

【 図 2 1 B 】

	生リード カウンタ	マッピング された リードカウンタ	非重複 フラグメント (常染色体 のみ)	利用可能 リードの 割合 %	鎖当たりの 深度	CpG 被覆率%	鎖当たりの、 リードが カバーされた CpG部位に 対する深度
一覽							
対照1	159554637	56323206	41653660	26%	1.12	54.86%	3.56
対照2	118056735	49232079	45741385	39%	1.23	60.26%	3.24
対照3	181913746	75753907	68081010	37%	1.82	65.74%	4.37
対照4	142782870	50195168	42370350	30%	1.13	59.15%	3.14
C06	262763161	197344994	88266088	33%	2.11	64.31%	3.65
バイコート	579329822	439663895	375814248	65%	10.07	78.49%	21.67
非がん肝臓 組織	549773334	417736311	355154964	65%	9.51	84.89%	18.21
腫瘍組織	568004640	487494291	176985129	31%	4.74	83.48%	8.32
手術前血漿	796183998	637735722	474751039	60%	12.72	87.18%	18.69
手術後血漿	921833848	624851729	550104801	60%	14.73	89.94%	24.81

FIG. 21B

2150

【図 2 2】

Chr	血漿DNAメチル化密度					
	HCC患者		対照1	対照2	対照3	対照4
	手術前	手術後				
1	60.2%	69.6%	70.0%	70.3%	70.1%	71.3%
2	58.6%	71.9%	72.2%	72.4%	72.3%	73.5%
3	60.9%	72.3%	72.7%	73.1%	72.9%	73.9%
4	56.9%	71.8%	71.9%	72.2%	72.2%	73.4%
5	56.9%	70.9%	71.0%	71.3%	71.3%	72.6%
6	59.9%	71.2%	71.6%	71.9%	71.7%	72.8%
7	60.0%	72.2%	72.8%	72.8%	72.5%	73.9%
8	60.0%	72.0%	72.6%	72.6%	72.4%	73.7%
9	60.6%	70.4%	71.0%	71.1%	71.0%	72.2%
10	58.5%	71.7%	72.0%	72.1%	72.0%	73.2%
11	58.5%	69.6%	70.2%	70.4%	70.2%	71.6%
12	62.0%	71.0%	71.6%	71.7%	71.5%	72.7%
13	60.2%	72.8%	73.2%	73.4%	73.2%	74.3%
14	59.2%	70.2%	70.7%	70.9%	70.8%	72.0%
15	61.0%	70.5%	70.6%	71.0%	70.9%	72.0%
16	60.7%	71.3%	72.4%	71.8%	71.6%	73.3%
17	60.2%	68.6%	69.3%	69.4%	69.3%	70.8%
18	60.0%	72.7%	72.9%	73.1%	73.0%	74.2%
19	61.0%	66.9%	68.1%	68.1%	67.6%	69.3%
20	57.8%	69.6%	70.3%	70.3%	70.3%	71.6%
21	57.7%	67.0%	64.0%	64.5%	65.7%	67.4%
22	63.8%	71.4%	72.5%	72.0%	71.9%	73.3%
全 常染色体	59.7%	70.8%	71.2%	71.3%	71.2%	72.5%

FIG. 22

2200

【図 2 3 A】

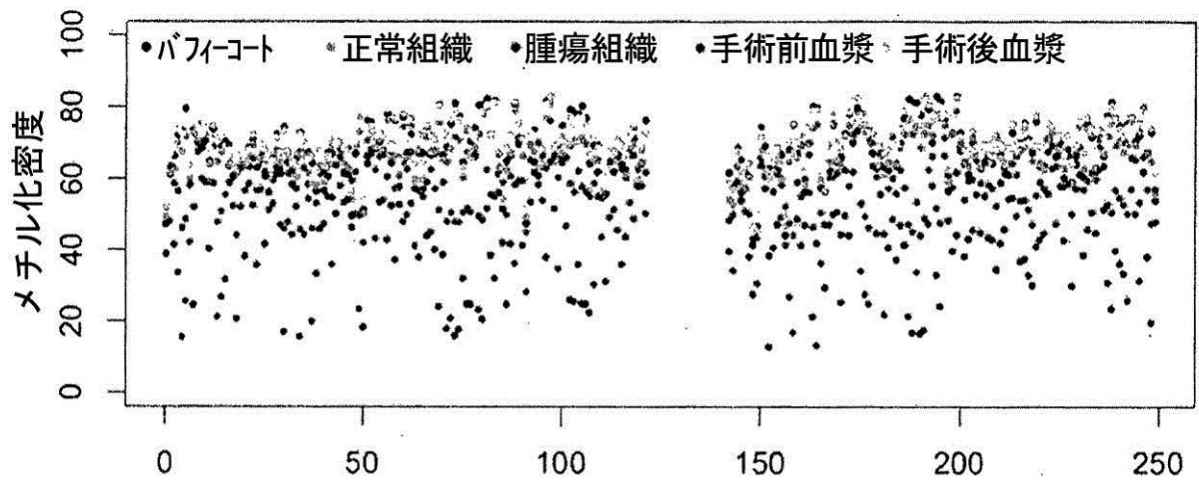


FIG. 23A

chr1 (Mb)

2300

【図 2 3 B】

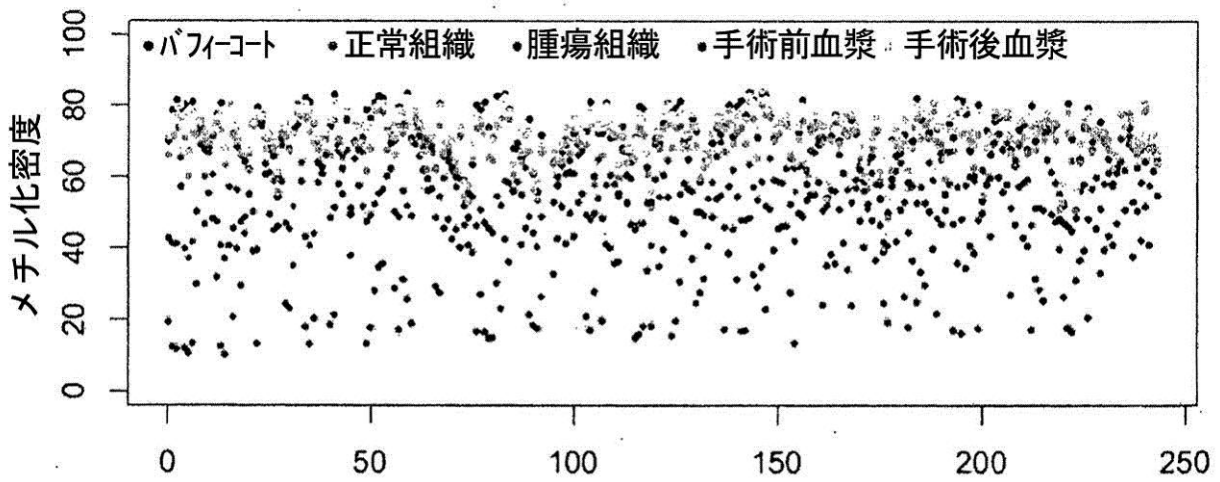


FIG. 23B

chr2 (Mb)

2350

【 図 2 4 A 】

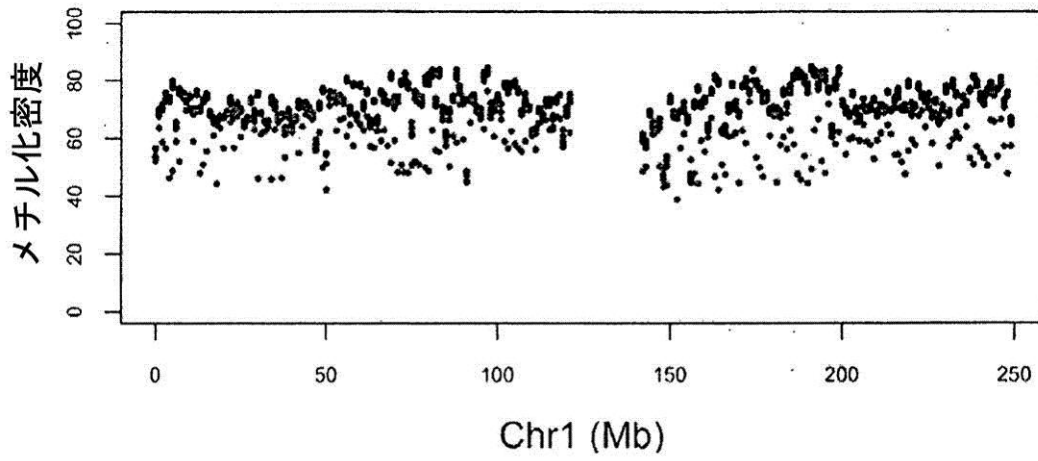


FIG. 24A

2400

【 図 2 4 B 】

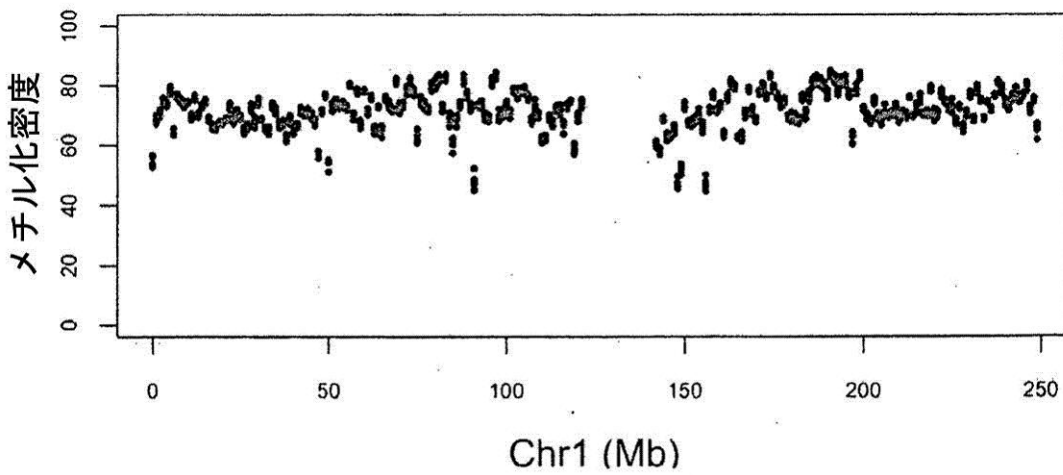


FIG. 24B

2450

【 図 2 5 A 】

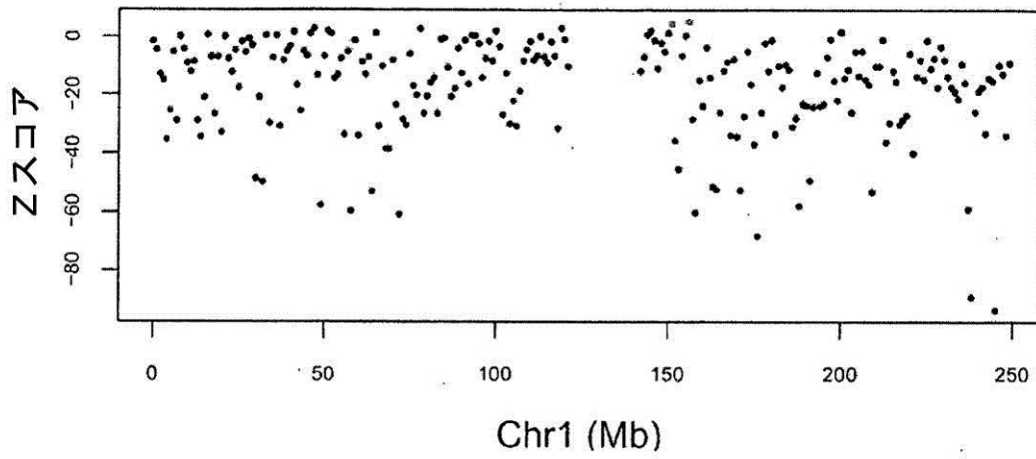


FIG. 25A

2500

【 図 2 5 B 】

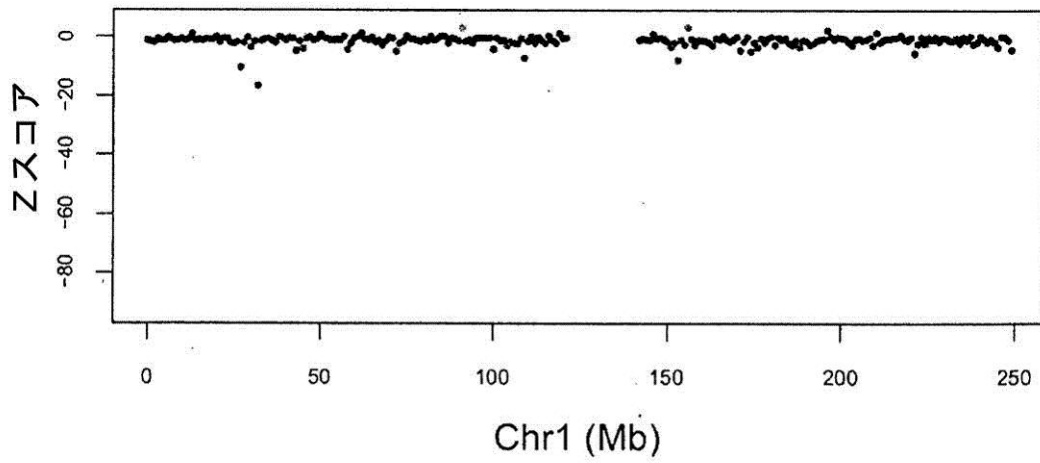


FIG. 25B

2550

【図 26A】

Zスコア	手術前血漿 (ビン数)	手術後血漿 (ビン数)
<-3	186 (80.9%)	19 (8.3%)
-3 to 3	42 (18.3%)	209 (90.3%)
>3	2 (0.9%)	2 (0.9%)
合計	230 (100%)	230 (100%)

FIG. 26A

2600

【図 26C】

Z スコア	手術前 血漿 (ビン数)	手術後 血漿 (ビン数)	C06	対照1 (ビン数)	対照2 (ビン数)	対照3 (ビン数)	対照4 (ビン数)
<-3	2330 (85.2%)	171 (6.3%)	29 (1.1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
-3 to 3	362 (13.3%)	2556 (93.5%)	2688 (98.3%)	2734 (100%)	2734 (100%)	2734 (100%)	2734 (100%)
>3	42 (1.5%)	7 (0.2%)	17 (0.62%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
合計	2734 (100%)	2734 (100%)	2734 (100%)	2734 (100%)	2734 (100%)	2734 (100%)	2734 (100%)

FIG. 26C.

2640

【図 26D】

	メチル化 CHHの 割合	メチル化 CHGの 割合	メチル化 シトシンの 割合	メチル化CpG の割合 (メチル化密度)
バフィーコートHCC患者	0.13	0.14	5.74	67.08
非腫瘍肝臓組織	0.16	0.15	5.45	66.85
腫瘍組織	0.09	0.09	3.29	42.88
手術前血漿	0.09	0.10	3.99	59.67
手術後血漿	1.25	0.96	6.52	70.75
対照血漿1	0.12	0.12	6.38	71.17
対照血漿2	0.10	0.10	5.62	71.33
対照血漿3	0.09	0.09	5.57	71.20
対照血漿4	0.10	0.10	5.93	72.48

FIG. 26D

2660

【図 271】

FIG. 271

	生リード カウンタ	マッピング された リードガット	非重複 フラグメント	利用可能 リードの 割合 %	鎖当たり の深度	CpG 被覆率 %	鎖当たり のリードが カバーされた CpG部位に 対する 深度
CL1	120807588	91750018	76890830	64%	0.69	33.32%	2.87
CL2	101344850	76473792	66246435	65%	0.59	30.26%	2.79
NPC1	101883643	75281330	57236188	56%	0.51	27.87%	2.72
NPC2	102745073	74211781	56841611	55%	0.51	28.74%	2.70
CRC1	87732645	66456695	56112543	64%	0.50	27.38%	2.63
CRC2	109955730	82594007	67253101	61%	0.60	29.91%	2.90
NE1	105514000	79923333	64534726	61%	0.58	27.86%	2.58
SMS1	94727279	71698718	64426529	68%	0.58	29.23%	2.79

2780

【図 27 J】

Zスコア	CL1	CL2	NPC1	NPC2	CRC1	CRC2	NE1	SMS1
< -3	34.9%	33.9%	17.6%	54.3%	13.5%	9.8%	98.1%	11.2%
-3 to 3	65.0%	65.9%	82.4%	45.6%	86.5%	90.2%	1.7%	70.8%
>3	0.07%	0.15%	0.04%	0%	0.07%	0%	0.15%	18.0%

FIG. 27J

2790

【 図 2 8 】

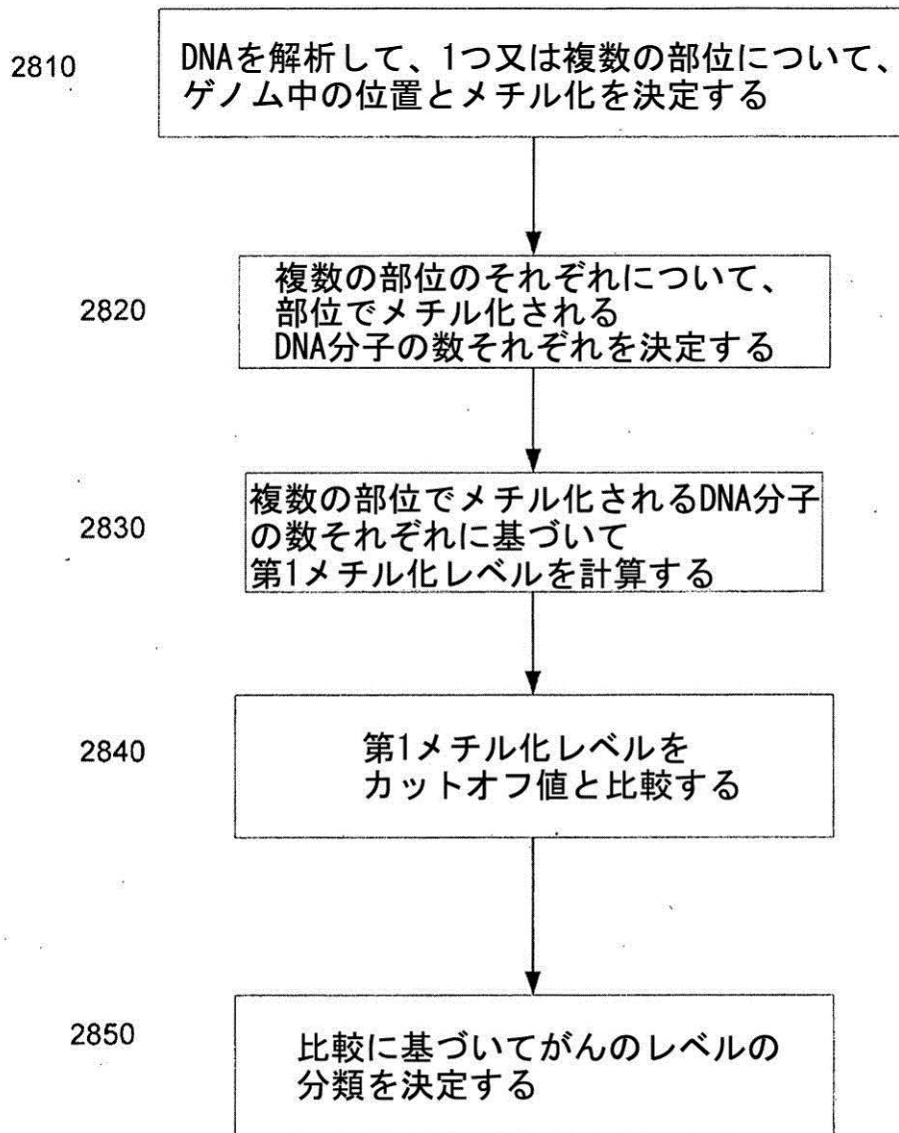
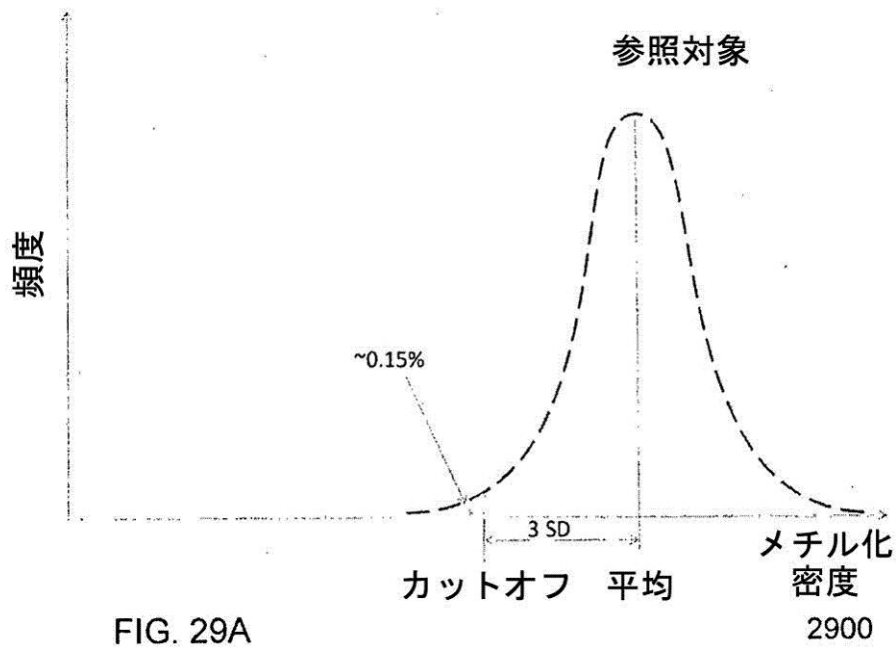


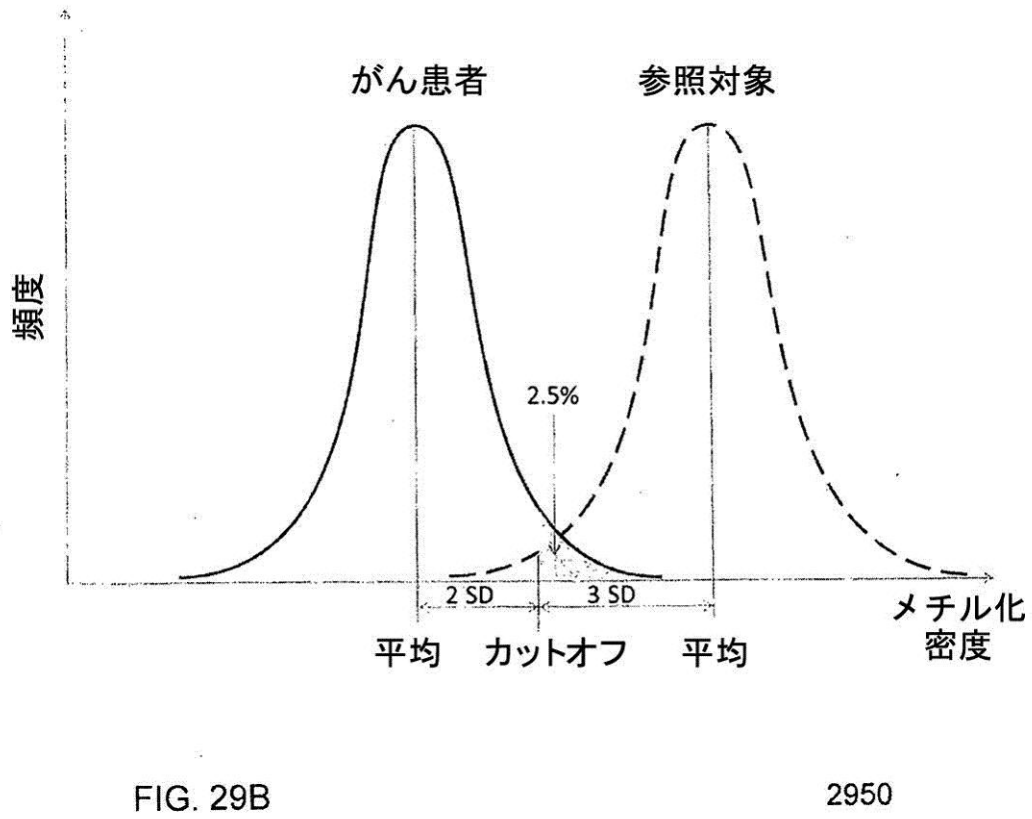
FIG. 28

2800

【図 29 A】



【図 29 B】



【 図 3 0 】

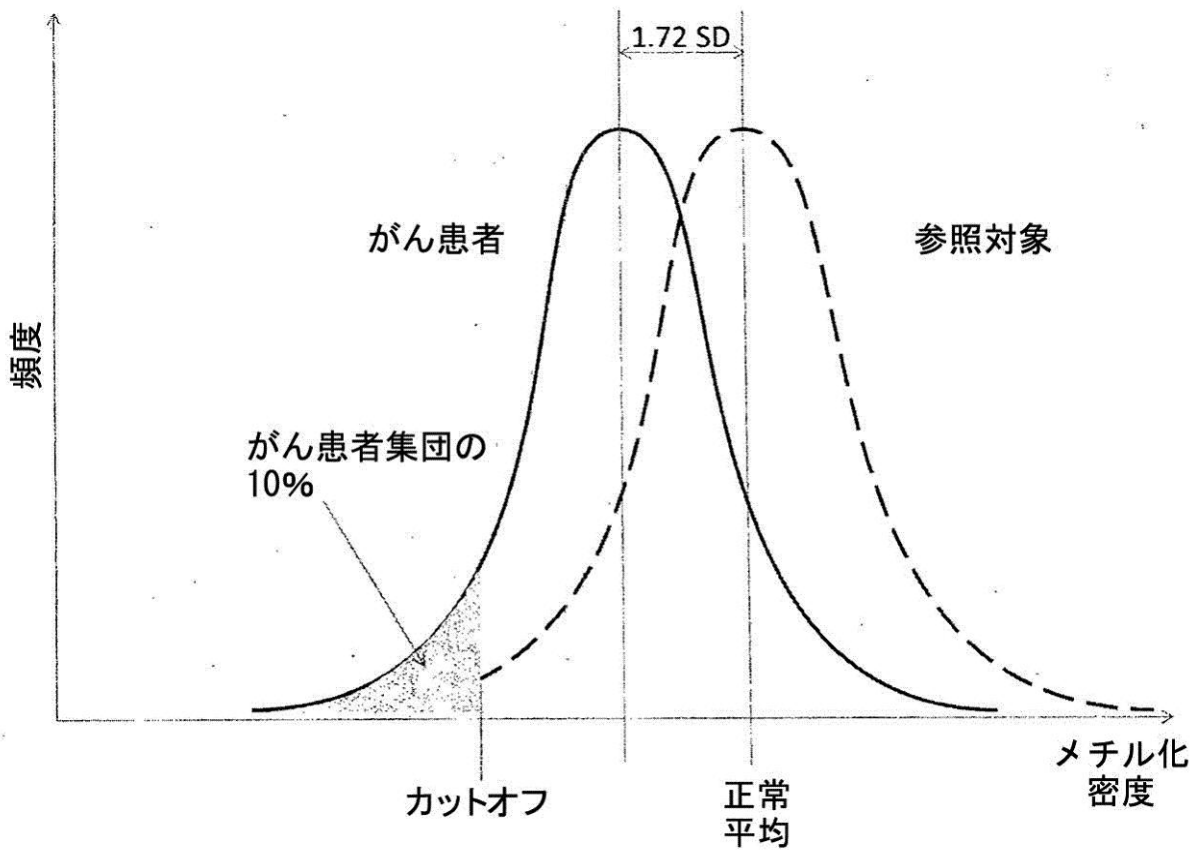
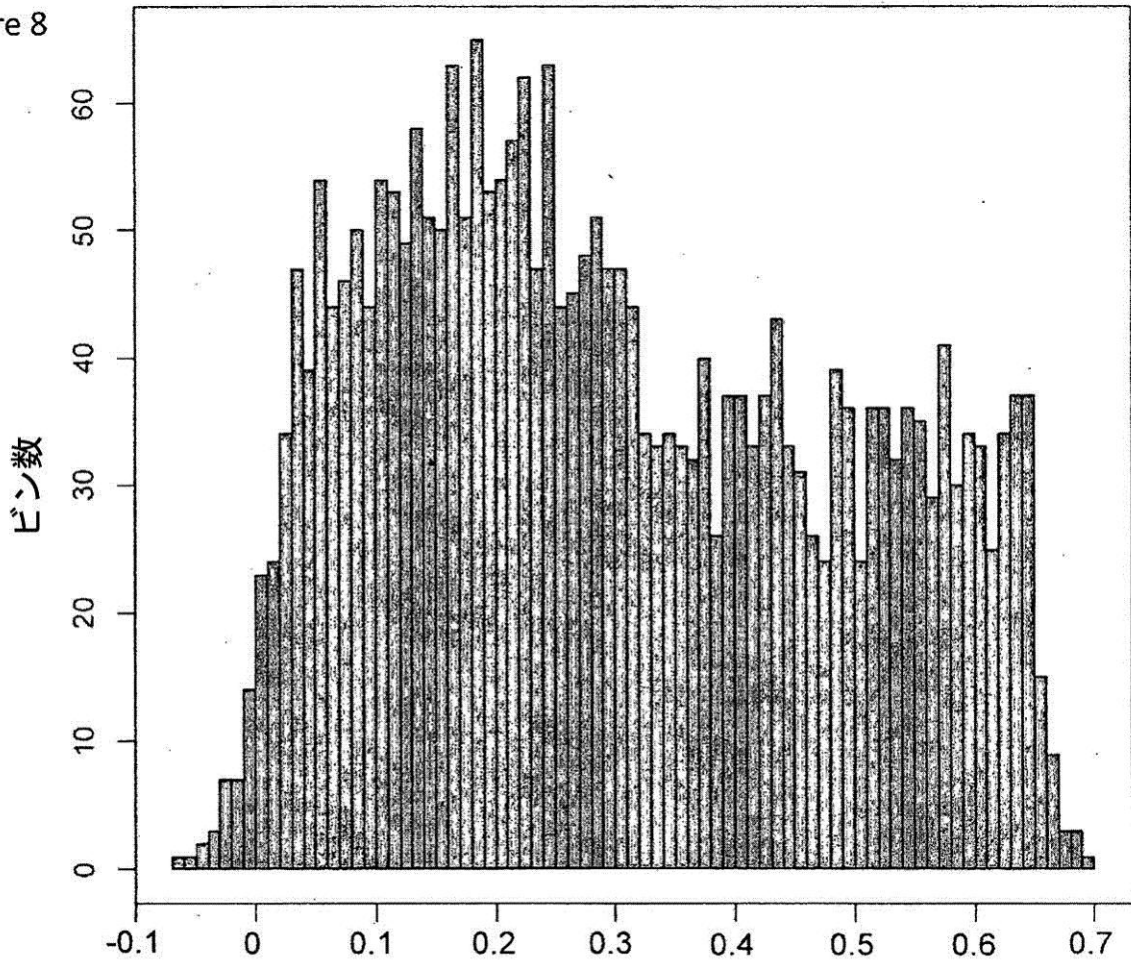


FIG. 30

3000

【 図 3 1 】

Figure 8



健康な対象の血漿DNAの平均と  
がん患者の腫瘍組織とのメチル化密度差異

FIG. 31

3100

【図 3 2 A】

深度希釈因数5%	シーケンシング 深度 ( $\times$ 一倍体ゲノム)	手術前血漿中の 低メチル化ビン (Zスコア<-3) の数	手術前血漿中の 低メチル化ビン (Zスコア<-3)の%
0.8	1.76	1314	48.06
0.6	1.32	1323	48.39
0.4	0.88	1220	44.62
0.2	0.44	1094	40.01
0.1	0.22	900	32.92
0.05	0.11	645	23.59
0.01	0.022	207	7.57

深度希釈因数2%	シーケンシング 深度 ( $\times$ 一倍体ゲノム)	手術前血漿中の 低メチル化ビン (Zスコア<-3) の数	手術前血漿中の 低メチル化ビン (Zスコア<-3)の%
0.8	1.76	491	17.96
0.6	1.32	493	18.03
0.4	0.88	460	16.83
0.2	0.44	439	16.06
0.1	0.22	356	13.02
0.05	0.11	297	10.86
0.01	0.022	231	8.45

FIG. 32A

3200

【 図 3 2 B 】

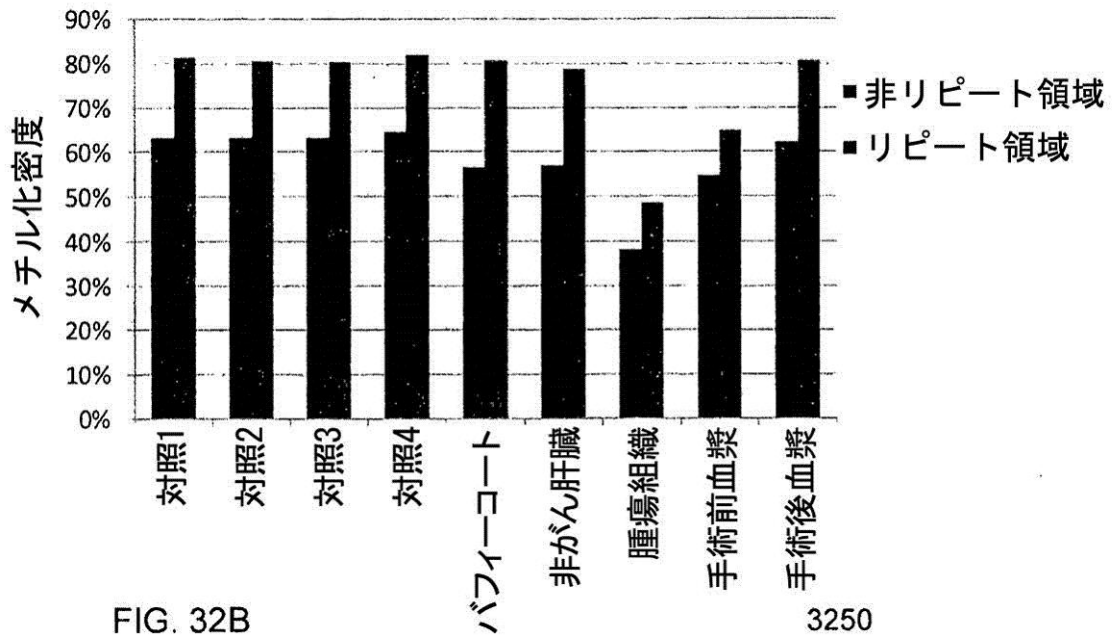


FIG. 32B

3250

【図 33】

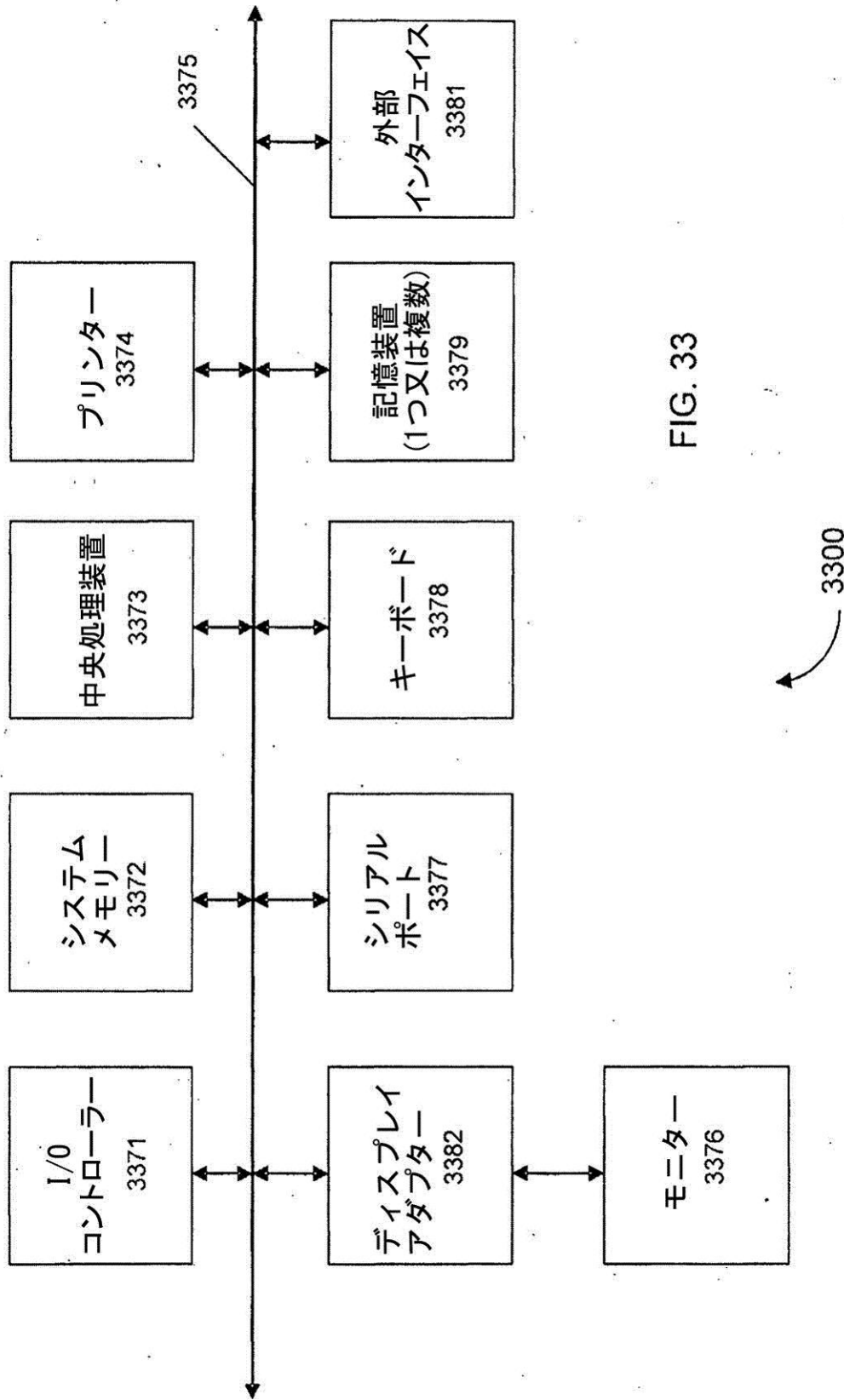


FIG. 33

【図 3 4 A】

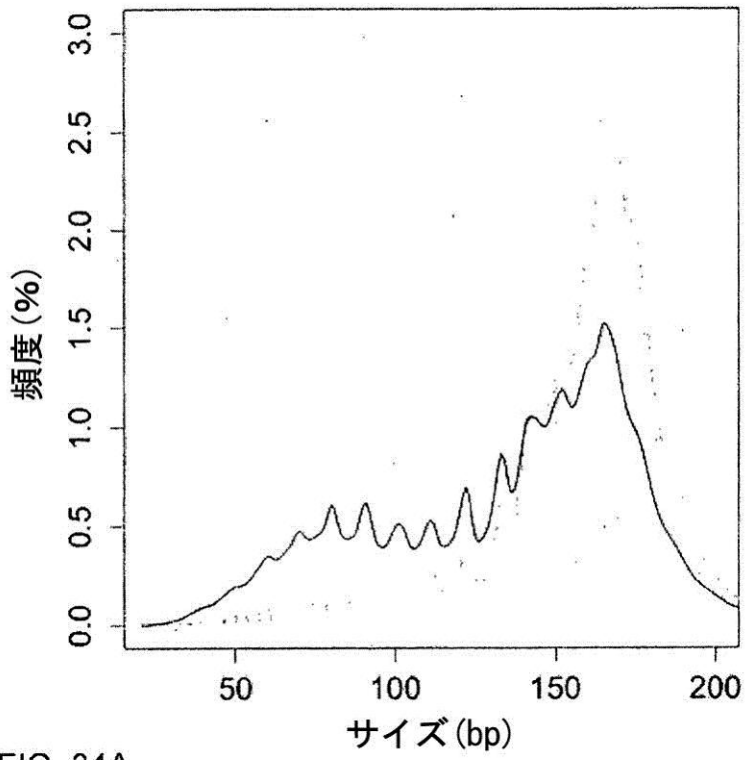
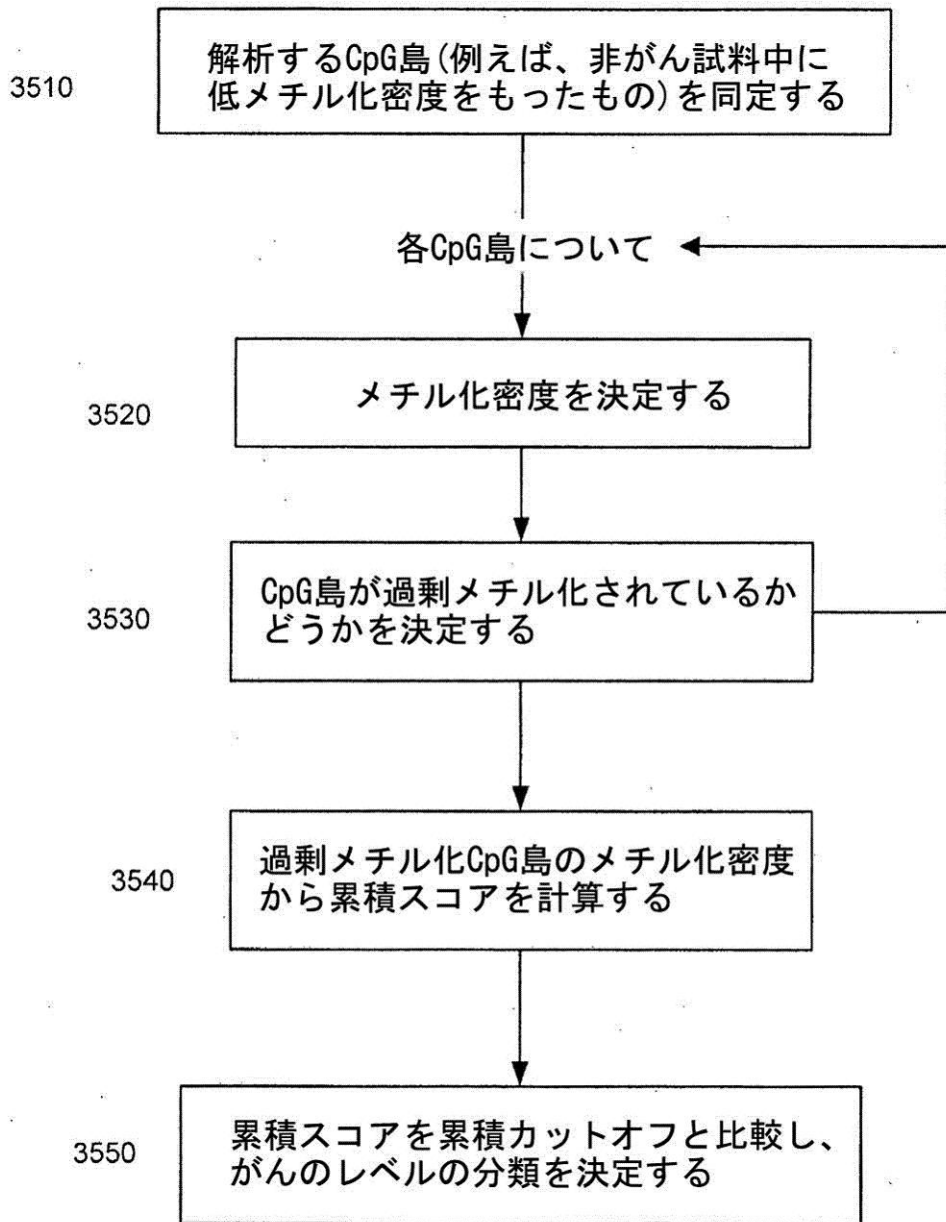


FIG. 34A

【 図 3 5 】



3500

FIG. 35

【図 36】

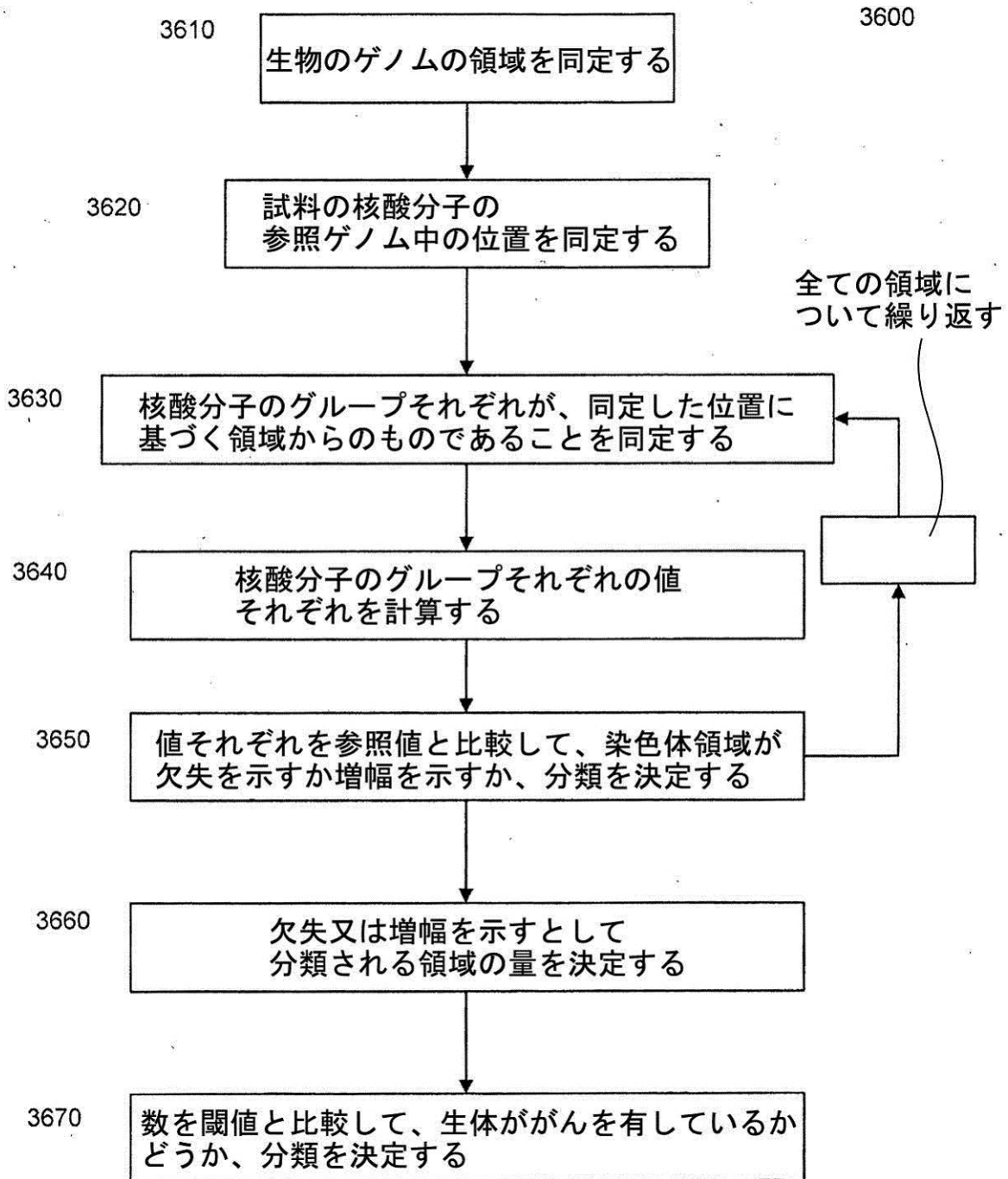


FIG. 36

【図37A】

試料:TBR36  
腫瘍DNA画分:40%  
内から外へ向かって:  
1) 腫瘍CNA  
2) 血漿CNA(非BS)  
3) 血漿CNA(BS)

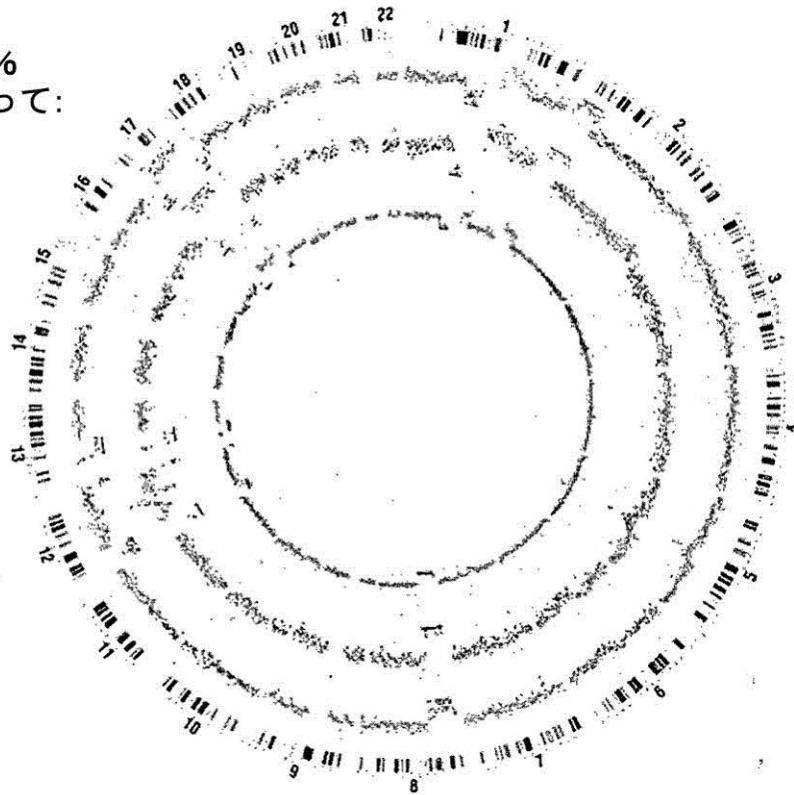


FIG. 37A

【図37B】

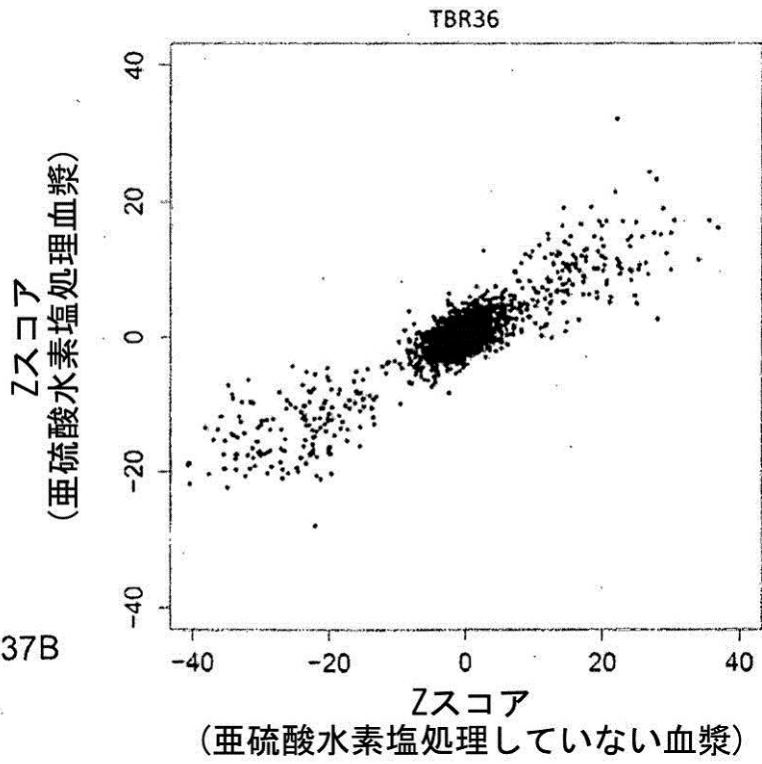


FIG. 37B

【 図 3 8 A 】

試料:TBR34  
腫瘍DNA画分:30%  
内から外へ向かって:  
1) 腫瘍CNA  
2) 血漿CNA(非BS)  
3) 血漿CNA(BS)

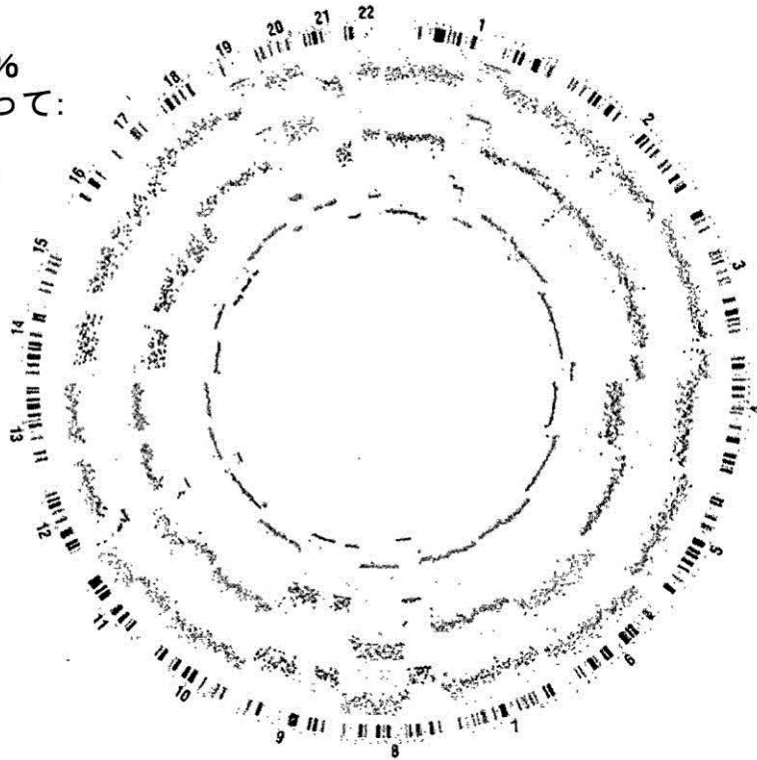


FIG. 38A

【 図 3 8 B 】

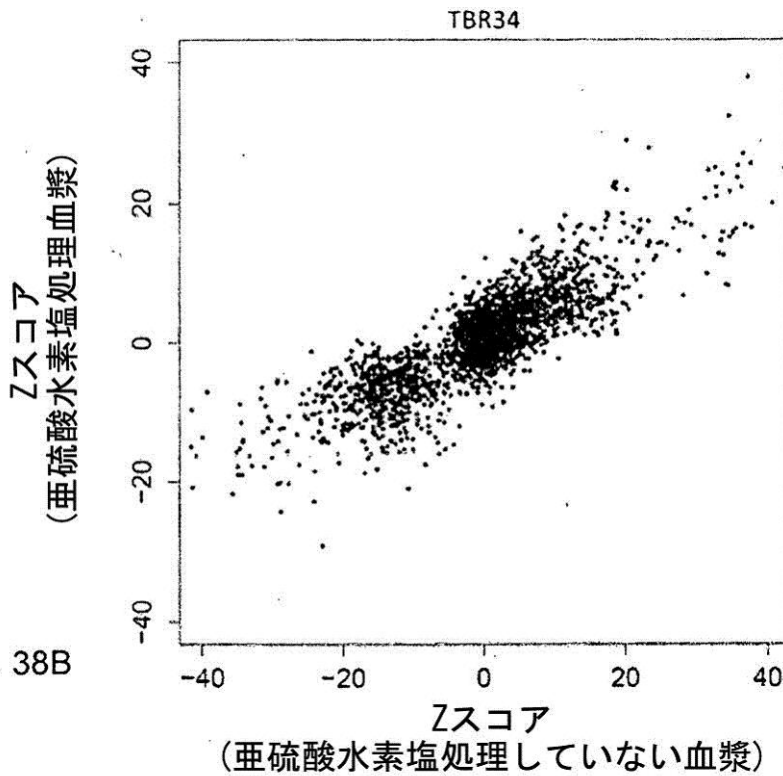


FIG. 38B

【図39A】

試料:TBR240  
腫瘍サイズ:2.8cm×2.3cm  
内から外へ向かって:  
1) 血漿CNA Zスコア  
2) 血漿メチル化Zスコア

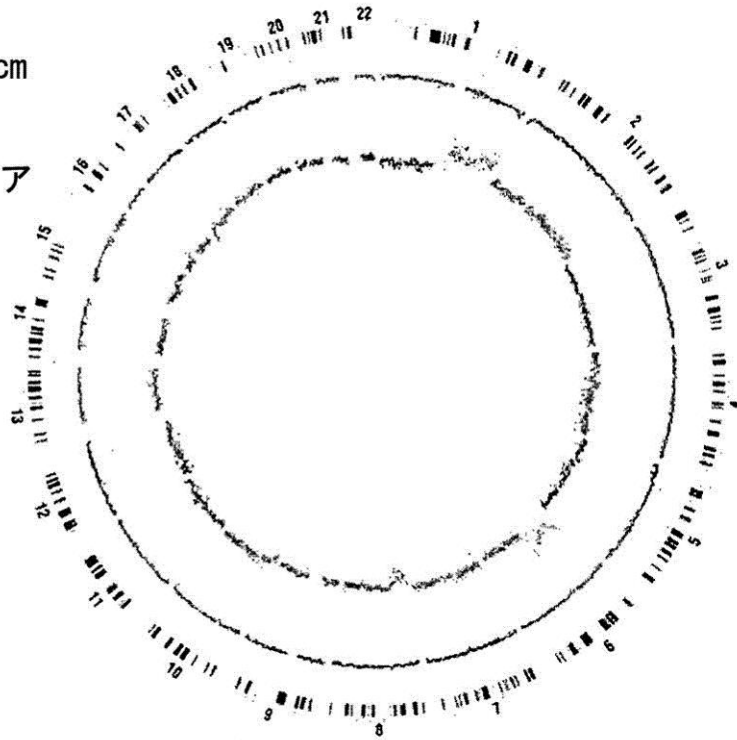


FIG. 39A

【図40A】

内側の輪:  
治療前血漿  
外側の輪:  
治療後血漿

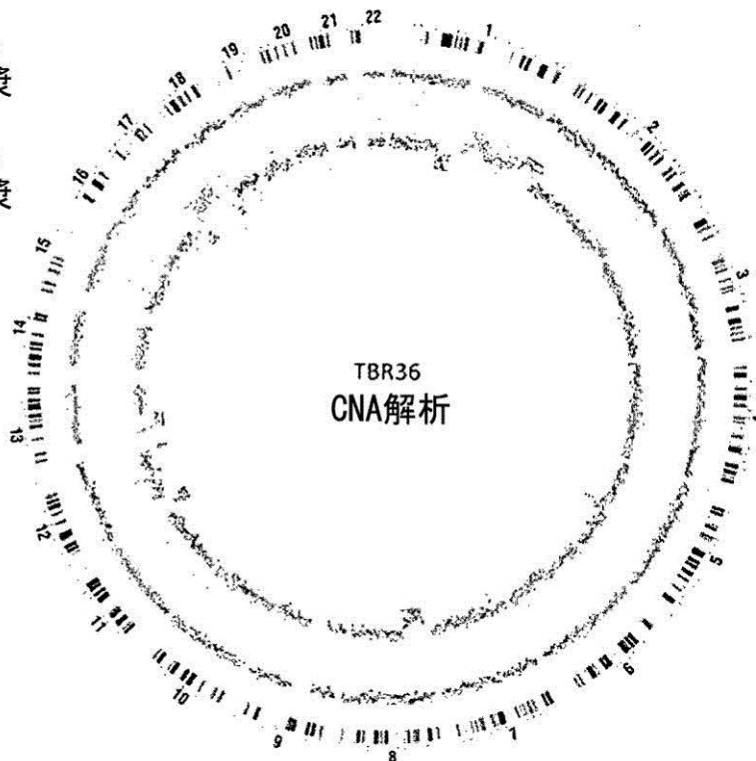


FIG. 40A

【図40B】

内側の輪：  
治療前血漿

外側の輪：  
治療後血漿

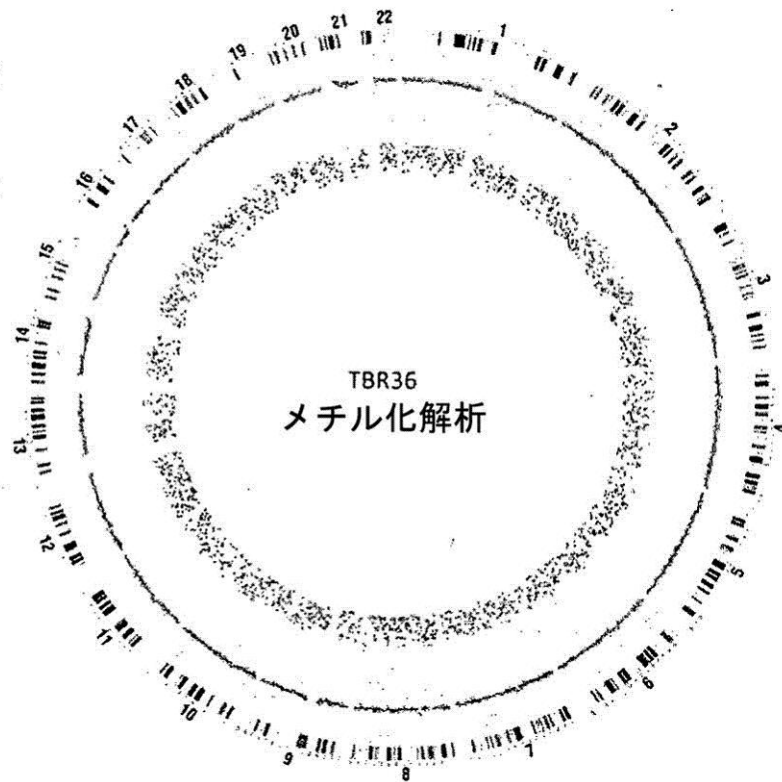


FIG. 40B

【図41A】

試料:TBR34  
腫瘍DNA画分:30%  
外から内に向かって:  
1)手術後CNV  
2)手術前CNV

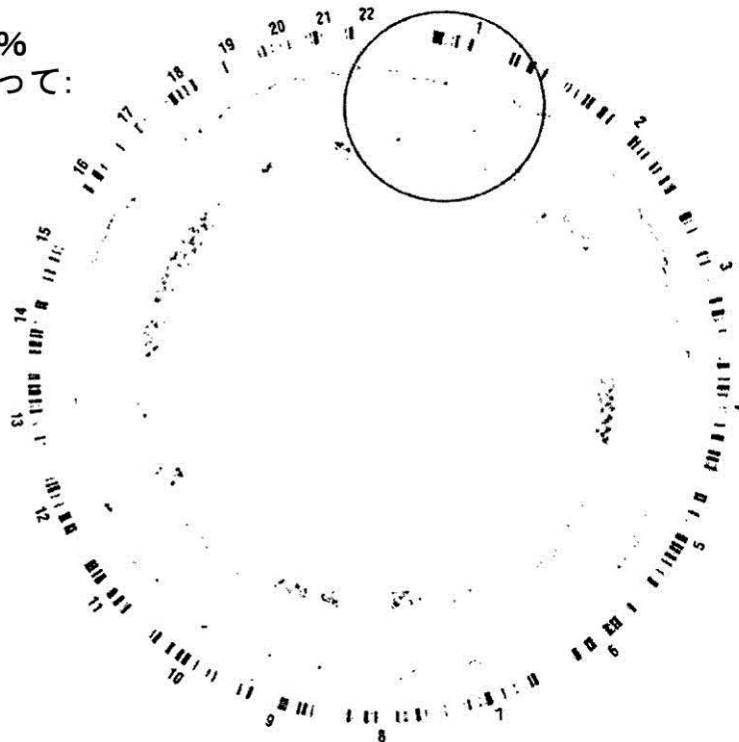


FIG. 41A

【 図 4 1 B 】

内側の輪：  
治療前血漿

外側の輪：  
治療後血漿

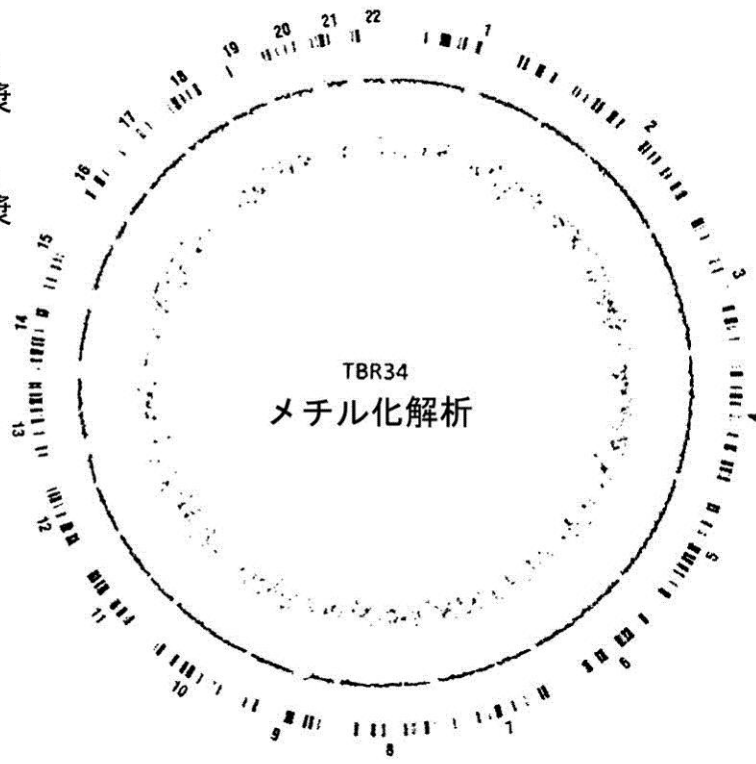


FIG. 41B

【 図 4 2 】

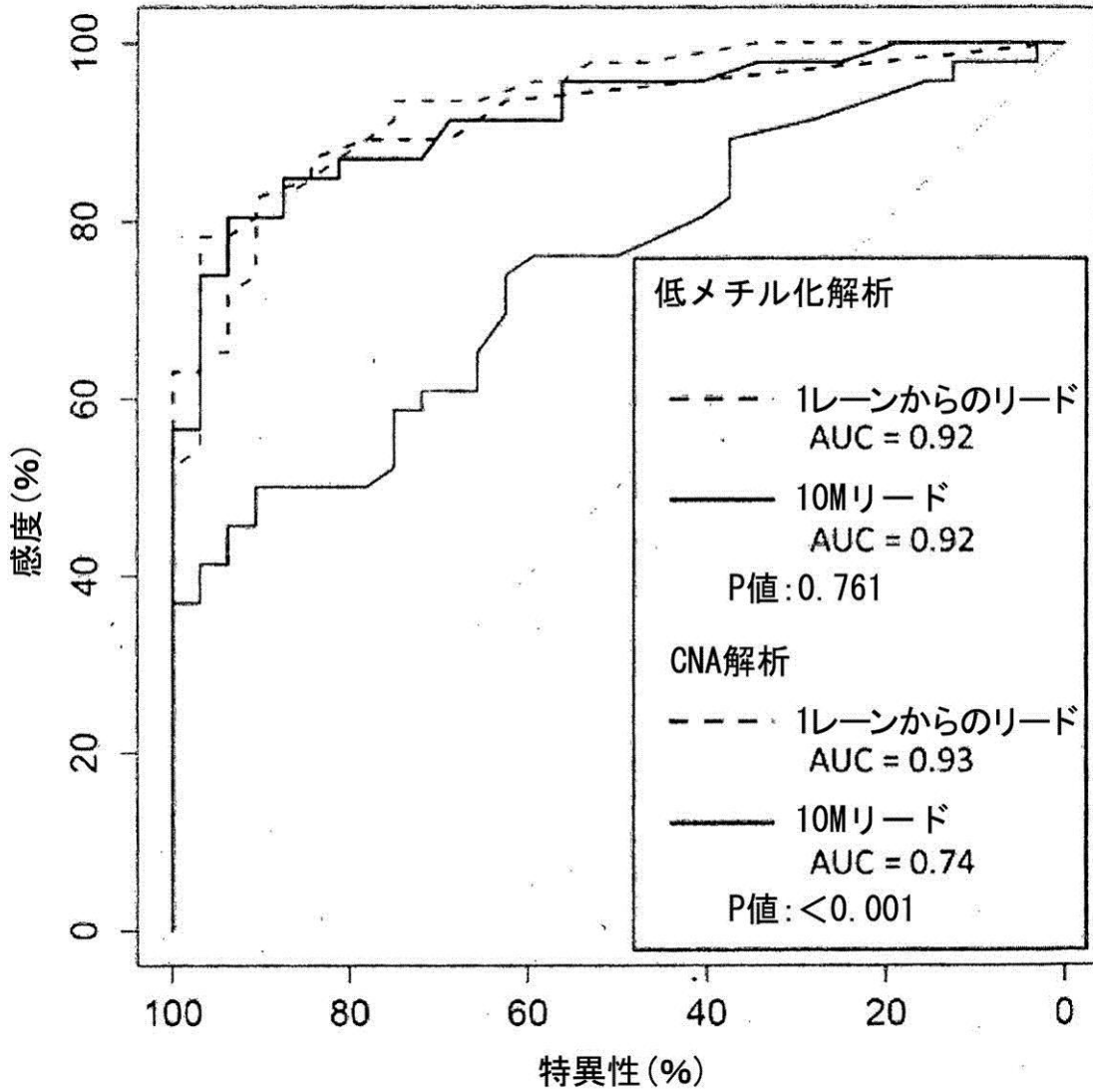


FIG. 42

【 図 4 3 】

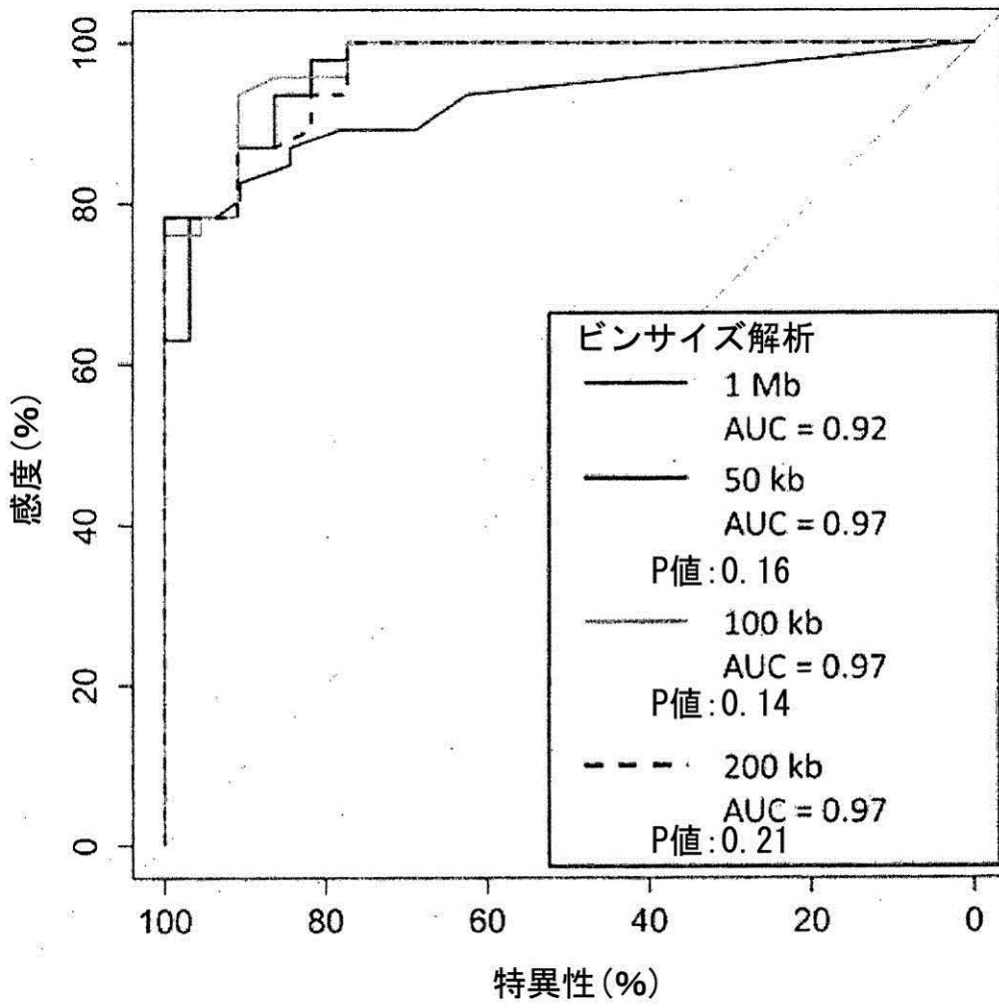


FIG. 43

【 図 4 4 A 】

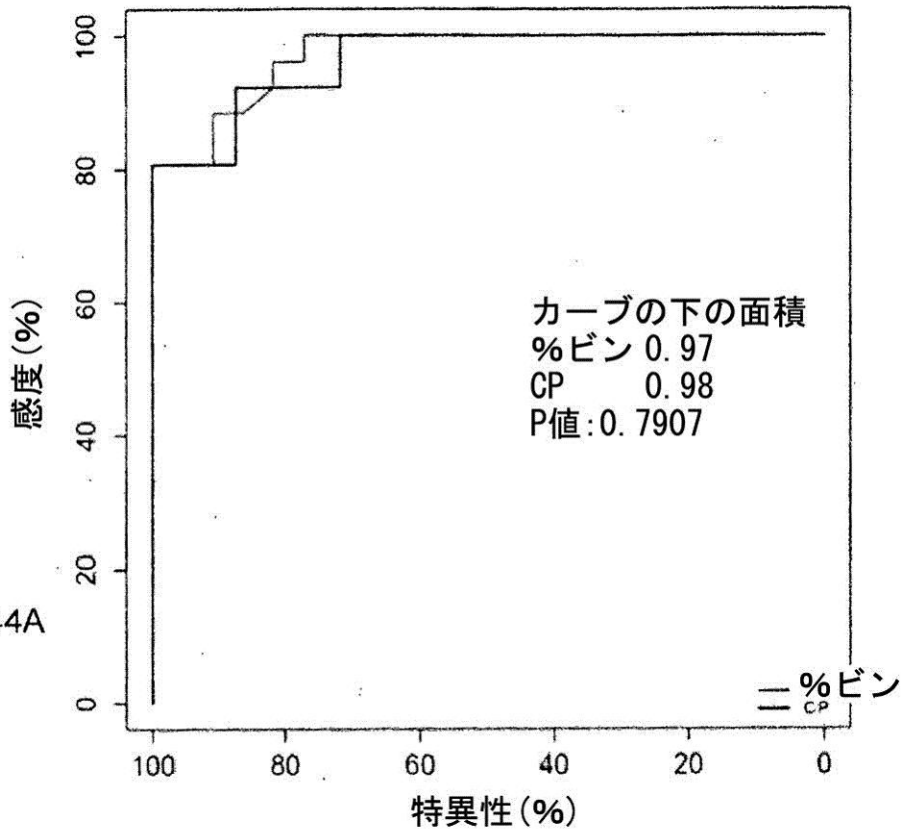
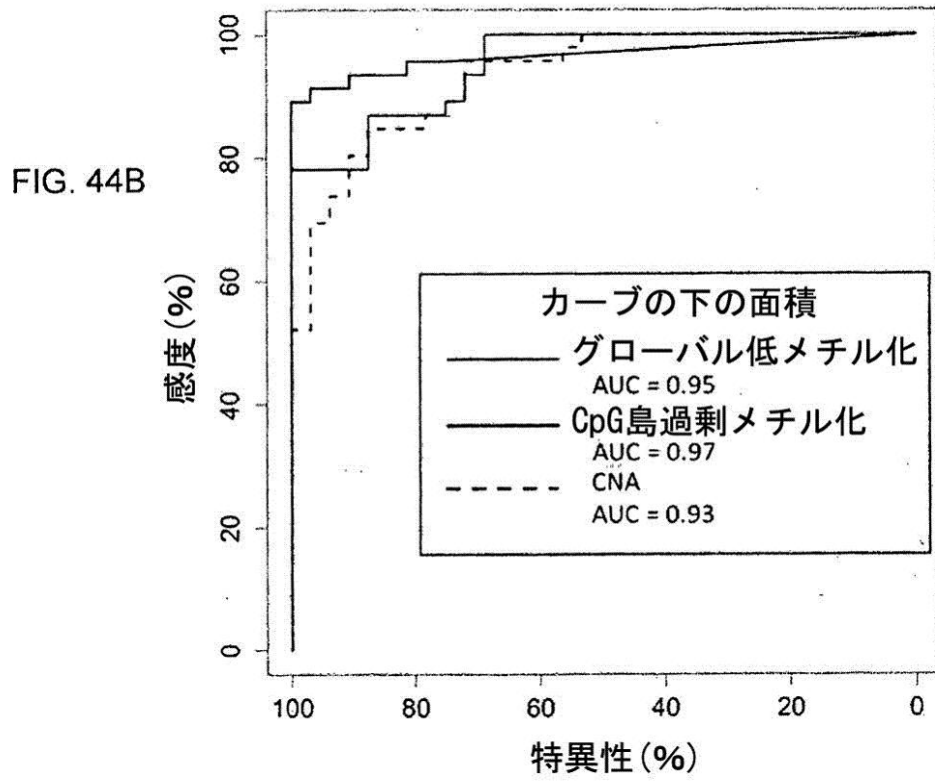


FIG. 44A

【 図 4 4 B 】



【図45】

ケース no	BCLC 病期	腫瘍 (1つ又は 複数) 最大寸法 (cm)	CPスコア			何らかの タイプの 変化の存在
			ジェネラル 低メチル化	CpG島の過剰 メチル化	CNA	
TBR36	A1	16	<u>88585</u>	<u>80.9</u>	<u>3777</u>	ポジティブ
TBR34	A1	13	<u>37573</u>	<u>221.7</u>	<u>8650</u>	ポジティブ
HOT198	A1	12	<u>93132</u>	<u>52.5</u>	<u>6803</u>	ポジティブ
HOT205	A1	6	<u>1146</u>	1.7	175	ポジティブ
HOT192	A1	5.5	<u>25914</u>	<u>119.5</u>	<u>1668</u>	ポジティブ
HOT227	A1	5.5	<u>36333</u>	<u>155.4</u>	<u>5008</u>	ポジティブ
HOT238	A1	5.5	<u>12187</u>	<u>105.3</u>	<u>1978</u>	ポジティブ
HOT197	B	5.3	<u>1714</u>	<u>9.5</u>	28	ポジティブ
HOT156	A1	5	<u>16529</u>	<u>115.9</u>	<u>1947</u>	ポジティブ
HOT236	A1	3.7	<u>7993</u>	<u>5.9</u>	85	ポジティブ
HOT170	A1	3.5	<u>22271</u>	<u>81.9</u>	<u>1542</u>	ポジティブ
HOT229	A1	3.1	383	<u>5.4</u>	71	ポジティブ
HOT233	A1	3	189	<u>7.5</u>	<u>322</u>	ポジティブ
HOT240	A1	2.8	<u>1277</u>	<u>14.0</u>	<u>972</u>	ポジティブ
HOT222	A1	2.6	<u>18832</u>	<u>10.5</u>	172	ポジティブ
HOT162	A1	2.5	<u>26112</u>	<u>41.0</u>	<u>3048</u>	ポジティブ
HOT172	A1	2.5	<u>12909</u>	<u>98.1</u>	<u>1305</u>	ポジティブ
HOT164	A1	2.3	<u>12604</u>	<u>4.8</u>	210	ポジティブ
HOT215	A1	2.3	<u>25824</u>	<u>54.8</u>	<u>714</u>	ポジティブ
HOT207	A1	2.1	<u>3377</u>	<u>12.0</u>	101	ポジティブ
HOT224	A1	2	367	0.0	13	ネガティブ
HOT159	A1	1.5	<u>1367</u>	1.4	26	ポジティブ
HOT204	A1	1.5	102	<u>4.5</u>	198	ポジティブ
HOT151	A1	1.5	153	2.8	9	ネガティブ
HOT208	A1	1.2	<u>5867</u>	<u>4.7</u>	<u>214</u>	ポジティブ
HOT167	A1	1	<u>21544</u>	<u>4.5</u>	54	ポジティブ

FIG. 45

【図46】

がん型	ケース no	病期/ 腫瘍 最大 寸法	CPスコア			いづれ かのタイプ の変化 の存在
			ジェネラル 低メチル化	CpG島の過剰 メチル化	CNA	
乳がん	TBR150	転移	<u>14581</u>	<u>146.7</u>	<u>5123</u>	ポジティブ
	TBR126	T2N1MD 4.5 cm	<u>10415</u>	<u>34.9</u>	<u>1951</u>	ポジティブ
	TBR127	T2N1MD 2.5 cm	<u>2598</u>	<u>4.3</u>	54	ポジティブ
	TBR128	T2N0MD 2 cm	157	<u>7.7</u>	<u>2250</u>	ポジティブ
	TBR111	T1N0MD 0.9 cm	298	0.0	128	ネガティブ
平滑筋肉腫	TBR051	転移	<u>4787</u>	<u>79.8</u>	<u>7986</u>	ポジティブ
神経内分泌 腫瘍	TBR052	転移	<u>112518</u>	<u>119.8</u>	<u>14681</u>	ポジティブ
肺がん	TBR164	転移	<u>51818</u>	<u>47.3</u>	<u>4714</u>	ポジティブ
	TBR012	転移	<u>4351</u>	<u>7.7</u>	<u>2213</u>	ポジティブ
	TBR014	転移	<u>2356</u>	<u>12.2</u>	<u>825</u>	ポジティブ
	TBR177	T2N1MD 3.9 cm	<u>1072</u>	<u>10.6</u>	25	ポジティブ
上咽頭がん	TBR031	転移	<u>1028</u>	<u>4.4</u>	<u>1860</u>	ポジティブ
	TBR125	転移	<u>20949</u>	<u>162.5</u>	<u>6708</u>	ポジティブ
	TBR124	T4N1	270	<u>4.9</u>	37	ポジティブ
	TBR123	T1N2MD	<u>6871</u>	<u>11.8</u>	80	ポジティブ
	TBR062	T3N1MD	111	<u>30.9</u>	41	ポジティブ
	TBR108	T3N1MD	93	<u>7.7</u>	26	ポジティブ
	TBR107	T3N0MD	<u>2439</u>	<u>41.2</u>	205	ポジティブ
	TBR106	T1N1MD	<u>2281</u>	<u>5.9</u>	97	ポジティブ
	TBR099	T1N0MD	<u>6187</u>	<u>10.2</u>	26	ポジティブ

FIG. 46

【図48A】

試料:TBR36  
腫瘍DNA画分:40%  
内から外へ向かって:  
1) CNA Zスコア  
2) メチル化Zスコア

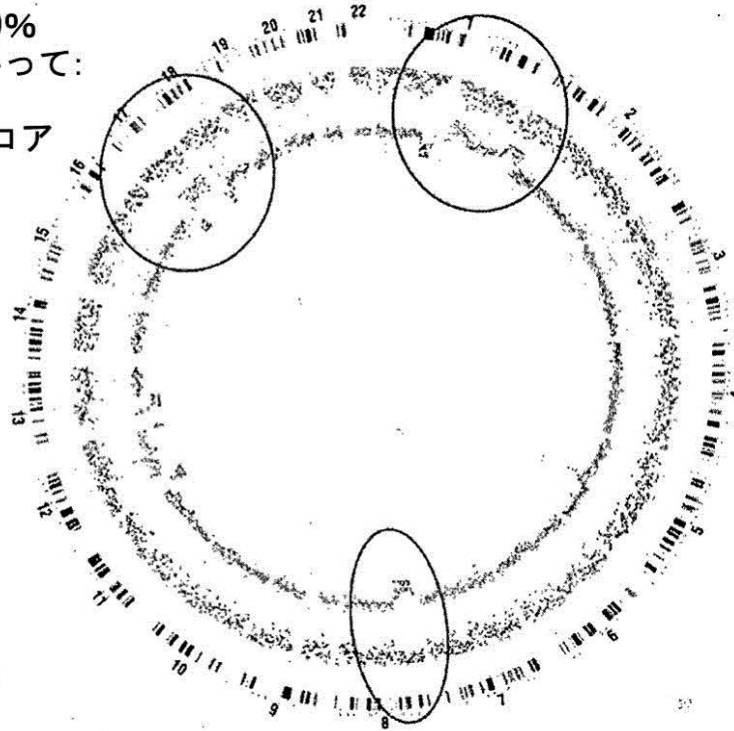


FIG. 48A

【図48B】

試料:TBR36  
腫瘍DNA画分:40%

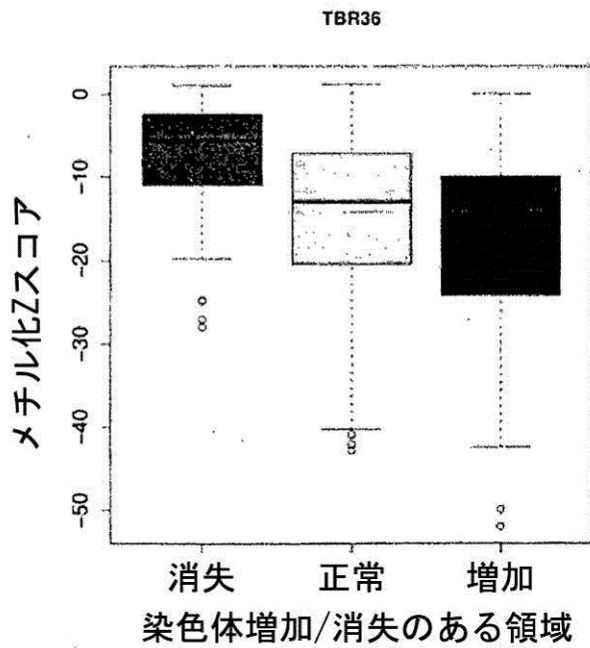


FIG. 48B

【図49A】

試料:TBR34  
腫瘍DNA画分:30%  
内から外へ向かって:  
1) CNA Zスコア  
2) メチル化Zスコア

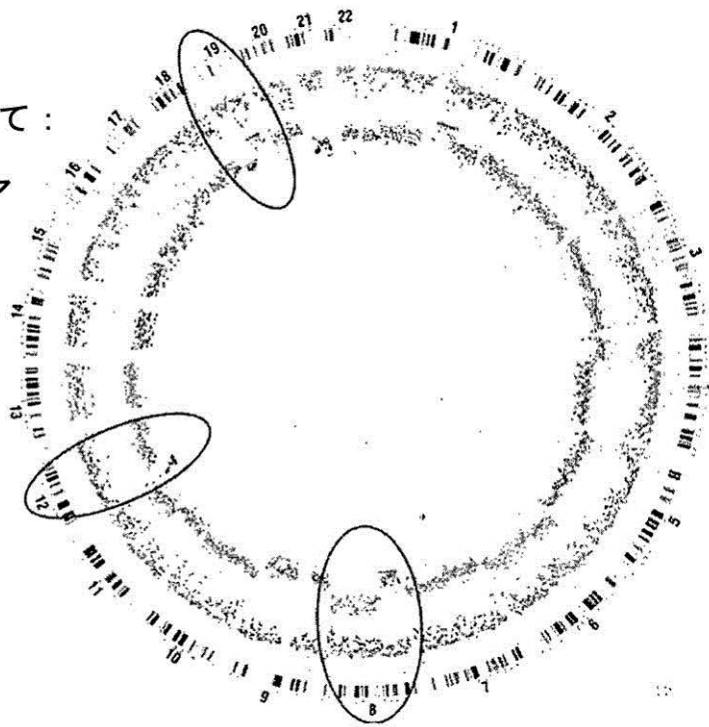


FIG. 49A

【図49B】

試料:TBR34  
腫瘍DNA画分:30%

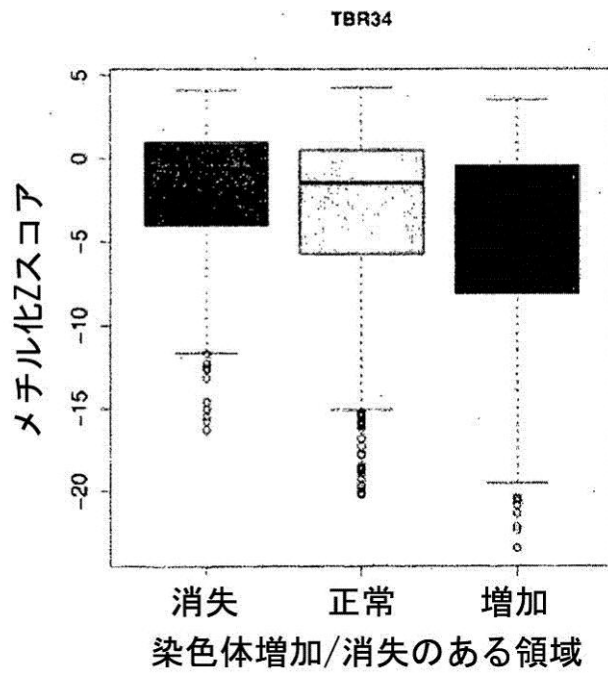


FIG. 49B

【 図 5 1 A 】

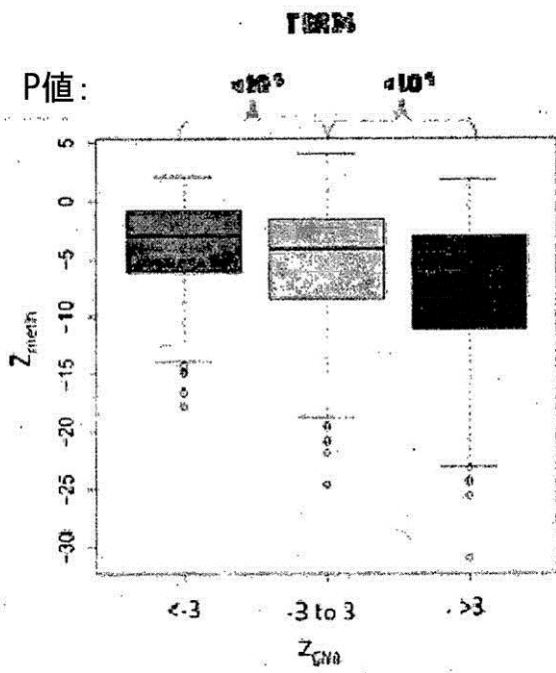


FIG. 51A

【 図 5 1 B 】

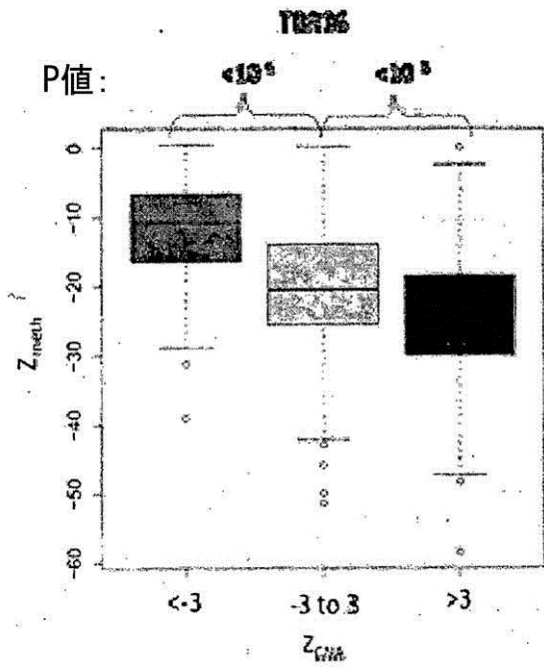


FIG. 51B

【 図 5 1 C 】

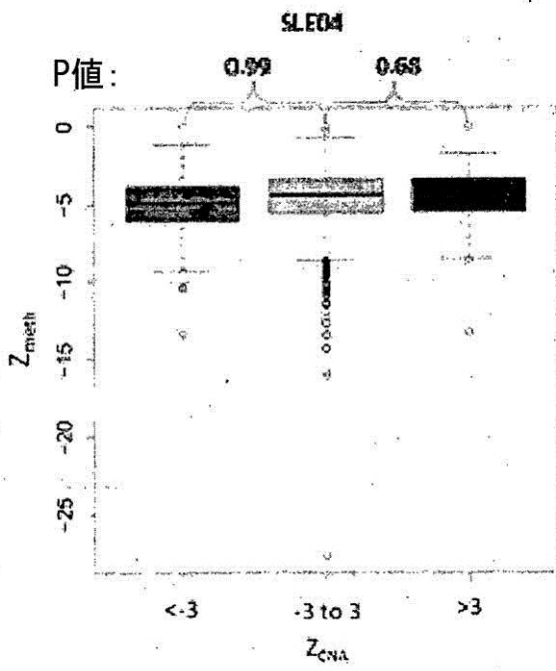


FIG. 51C

【 図 5 1 D 】

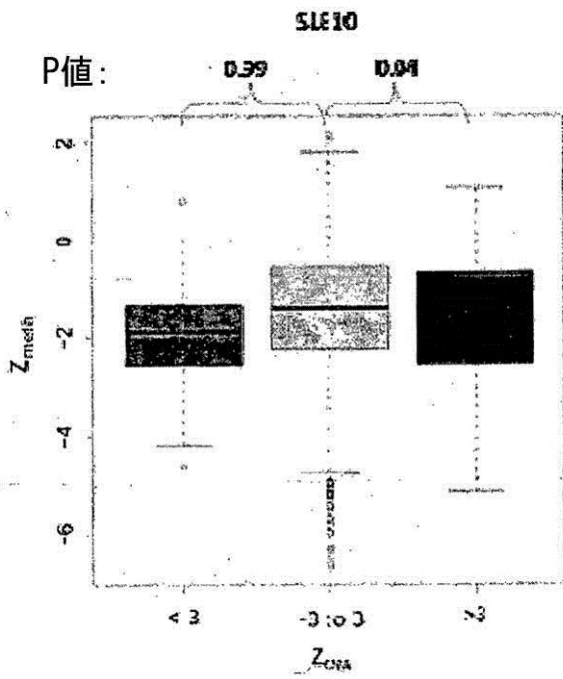


FIG. 51D

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/AU2013/001088</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
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) WPI, EPODOC, MEDLINE, HCAPLUS, BIOSIS, EMBASE: Keywords: (DNA S METHYL+), (CANCER+), (METHYLATION S PROFIL+), (DOWN+ 3D SYNDROME) and like words.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Documents are listed in the continuation of Box C		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" 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	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 12 February 2014	Date of mailing of the international search report 12 February 2014	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No.: +61 2 6283 7999	Authorised officer David Hennessy AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 6283 2450	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/AU2013/001088
--

**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:  
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including
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 Supplemental Box for Details**

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 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.:  
**1-44 (in full), 45-53 (in part), 54-93 (in full), 116-134 (in full)**

**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 SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2013/001088
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FLANAGAN, J.M. ET AL., 'DNA methylome of familial breast cancer identifies distinct profiles defined by mutation status', <i>The American Journal of Human Genetics</i> , 2010, vol. 86, pp420-433 Abstract; page 420, first column, last paragraph; page 421, 'Material and Methods' section; page 423, 'Statistical Analysis' section; page 427, 'Integration of Methylation, Copy-number and Gene-Expression Data' section; table 1; figures 2, 5	1-44, 54-72, 80-89, 91-93, 116-123, 128-134
A	OGOSHI, K. ET AL., 'Genome-wide profiling of DNA methylation in human cancer cells', <i>Genomics</i> , 2011, vol.98, pp280-287. Abstract; page 281, paragraphs 2.2-2.4; figures 1, 2, 4	69
X	US 2011/0028333 A1 (CHRISTENSEN ET AL.) 03 February 2011 Paragraphs [0004], [0007], [0010], [0016]-[0019], [0030], [0055]-[0066], [0091],[0145]-[0146], table 7, example 11	1-7, 9-29, 33-44, 54-63
A	YUEN, R.K.C. ET AL., 'Genome-wide mapping of imprinted differentially methylated regions by DNA methylation profiling of human placentas from triploidies', <i>Epigenetics &amp; Chromatin</i> , 2011, vol. 4 article no. 10. Abstract; table 2; figure 5(A)-5(H)	69, 77, 89-93
X	WO 2011/092592 A2 (NIPD GENETICS LTD) 04 August 2011 Page 1, line 28- page 2, line 11; pages 38-39, table 4; page 47, table 7; page 55, line 14 - page 57, line 19; page 59, table 9; figures 6, 9	69, 71-72, 77-79, 81-87, 116-127, 129-134
A	SAIED, M.H. ET AL., 'Genome wide analysis of acute myeloid leukemia reveal leukemia specific methylome and subtype specific hypomethylation of repeats', <i>PLoS ONE</i> , March 2012, vol.7 no. 3, article no. e33213 Abstract; section 'Methylation of localized genomic regions discriminates AML and its subtypes'; section 'MeDIP-seq data statistical workflow'; figures 1, 2, S10; table S8	1-44, 54-72, 80-89, 91-93, 116-123, 128-134
A	KUO, H. ET AL., 'DBCAT: database of CpG islands and analytical tools for identifying comprehensive methylation profiles in cancer cells', <i>Journal of Computational Biology</i> , 2011, vol. 18 no.8, pp1013-1017. Abstract; paragraphs 2.2-2.3; figure 1	1, 2, 54-63, 88
A	PRICE, E.M. ET AL., 'Different measures of "genome-wide" DNA methylation exhibit unique properties in placental and somatic tissues', <i>Epigenetics</i> , June 2012, vol. 7 no.6, pp 652-663. Abstract; page 652, paragraph bridging columns 1 and 2; page 661, section 'Methods'; figures 1-5	69, 71-72, 77, 81-87
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. <b>PCT/AU2013/001088</b>
<b>Supplemental Box</b>	
<p><b>Continuation of: Box III</b></p> <p>This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.</p> <p>This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into distinct groups:</p> <p>Group 1: Claims 1-44 (all in full), 45-53 (in part), 54-93, 116-134 (all in full) are directed to methods of determining DNA methylation levels, profiles or densities across multiple chromosomes, loci or sites and then utilising this to determine a chromosomal abnormality or a classification of cancer.</p> <p>Group 2: Claims 45-53 (in part), 108-115 (all in full) are directed to methods of estimating DNA methylation levels using size based analysis including paired-end sequencing and statistical parameters in a computer system.</p> <p>Group 3: Claims 94-107 (all in full) are directed to kits of oligonucleotides defined in relation to tables S2A-S3D, relating to hypo- or hyper- methylated sequences across the human genome.</p> <p>PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.</p> <p>When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention.</p> <p>In relation to group 3, the claims lack unity <i>a priori</i>, because the kits of oligonucleotides have no limiting unifying feature with claims in either group 1 or 2, the oligonucleotides not being limited by a use in common with either of these groups of claims, and these other groups of claims not being directed to oligonucleotides. In this regard, the term 'for' does not limit the kits of oligonucleotides defined according to the use defined, as per PCT Guidelines.</p> <p>In relation to groups 1 and 2, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. The only feature common to all of the claimed inventions and which provides a technical relationship among them is analysis of biological samples that contain a mixture of genomes for DNA methylation.</p> <p>However this feature does not make a contribution over the prior art because it is disclosed in WO 2007/132166 A2 (The Chinese University of Hong Kong) 22 November 2007. The citation discloses the analysis of DNA methylation in a mixture of genomes (fetal and maternal) from a single sample (see paragraphs [0051]-[0052], [0079]).</p> <p>As a result of the applicant's failure to furnish additional search fees this search and accompanying opinion has been limited to the first named invention of claims 1-44 (all in full), 45-53 (in part), 54-93, 116-134 (all in full).</p>	
Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2009)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2013/001088	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
US 2011/0028333 A1	03 Feb 2011	None	
WO 2011/092592 A2	04 Aug 2011	CA 2786174 A1	04 Aug 2011
		CN 102892899 A	23 Jan 2013
		EA 201290716 A1	28 Jun 2013
		EP 2529032 A2	05 Dec 2012
		JP 2013517789 A	20 May 2013
		KR 20120107512 A	02 Oct 2012
		SG 182322 A1	30 Aug 2012
		US 2012282613 A1	08 Nov 2012
		WO 2011092592 A2	04 Aug 2011
<b>End of Annex</b>			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

## 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, 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, IS, JP, KE, KG, 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, 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, UZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. イーサネット
2. J A V A

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 ロッサ ワイ クン チウ

中華人民共和国, 香港特別行政区, ニュー テリトリーズ, シャーティン マー ロク パス 5  
2, ハウス 31ダブル ヘブン

(72)発明者 チャン クワン チー

中華人民共和国, 香港特別行政区, カウルーン, メイ フォー スウン チュウエン, ブロードウ  
エイ ストリート 34 フラット エー 13/エフ ブロック

(72)発明者 ロー ユク - ミン デニス

中華人民共和国, 香港特別行政区, ホマンティン カウルーン, 7キング タク ストリート フ  
ォース フロア

(72)発明者 ルン ミウ ファン

中華人民共和国, 香港特別行政区, エステートクワイ チョン, ヤット キング ハウスライ キ  
ング ルーム 1116

(72)発明者 チャン ベイヨン

中華人民共和国, 香港特別行政区, ニュー テリトリーズ, シャーティン シウ レック ユエン  
ロード コートナンバーズ 62 - 66 (ナンバー 62), ブロック ピークウオン ラム,  
フラット 7, ファースト フロア

(72)発明者 チャン ワイ マン

中華人民共和国, 香港特別行政区, アルドリッチ ガーデン - シャウケイワン フラット エー  
31/エフブロック 6

Fターム(参考) 2G045 AA26 DA13

4B024 AA11 AA12 CA01 CA09 CA20 HA08 HA14 HA20

4B063 QA01 QA08 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QR08 QR42

QR55 QR62 QS16 QS25 QS34 QS40 QX01

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015536639A5</a>	公开(公告)日	2016-08-25
申请号	JP2015532250	申请日	2013-09-20
[标]申请(专利权)人(译)	香港中文大学		
申请(专利权)人(译)	香港大学中国		
[标]发明人	ロツサワイクンチウ チャンクワンチー ローユクミンデニス ルンミウファン チャンベイヨン チャンワイマン		
发明人	ロツサワイクンチウ チャンクワンチー ローユク-ミンデニス ルンミウファン チャンベイヨン チャンワイマン		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6869 C12Q1/6881 C12Q1/6886 C12Q2600/154 C12Q2523/125		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.Z C12N15/00.A C12Q1/68.A G01N33/50.P G01N33/53.M		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/DA13 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/HA08 4B024/HA14 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS40 4B063/QX01		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 武井良太郎 喀米·金加繆拉		
优先权	61/703512 2012-09-20 US 13/842209 2013-03-15 US 61/830571 2013-06-03 US		
其他公开文献	JP6317354B2 JP2015536639A		

摘要(译)

该系统，方法和设备可以确定和使用各种组织和样品的甲基化性质。提供示例。可以基于血浆甲基化（或其他具有无细胞DNA的样品）与孕妇/患者甲基化谱的比较来估计胎儿/肿瘤组织的甲基化谱。如果样品中含有DNA混合物，则可以使用组织特异性等位基因从胎儿/肿瘤中鉴定DNA，并确定该胎儿/肿瘤组织的甲基化谱。甲基化谱可用于确定胎儿/肿瘤基因组中的拷贝数变异。胎儿的甲基化标记已通过多种技术鉴定。甲基化谱可以通过确定DNA片段的大小分布的大小参数来确定，并且该大小参数的参考值可以用于确定甲基化水平。另外，甲基化水平可用于确定癌症水平。[选择图]无

