

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-208977

(P2016-208977A)

(43) 公開日 平成28年12月15日(2016.12.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06 Z N A	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 5
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48 M	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	

審査請求 有 請求項の数 9 O L (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-106050 (P2016-106050)	(71) 出願人	511145937
(22) 出願日	平成28年5月27日 (2016. 5. 27)		エビオンティス ゲーエムベーハー
(62) 分割の表示	特願2013-506682 (P2013-506682) の分割		ドイツ, 1 2 4 8 9 ベルリン, ルードア ー ショッセ 2 9
原出願日	平成23年4月29日 (2011. 4. 29)	(74) 代理人	100088904
(31) 優先権主張番号	61/329, 229		弁理士 庄司 隆
(32) 優先日	平成22年4月29日 (2010. 4. 29)	(72) 発明者	オレク, スヴェン
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ドイツ, 1 2 2 0 7 ベルリン, ボオート ストラッセ 1 6
		F ターム (参考)	2G045 AA24 CA17 CA18 CA19 CA25 DA13 FB01 FB02 FB06 4B063 QA19 QA20 QQ03 QQ42 QQ52 QR08 QS34 QX02 4B065 AA90X AC20 CA46

(54) 【発明の名称】 遺伝子 C C R 6 及び B L R 1 の DNA メチル化分析による免疫細胞、特に T 細胞の検出

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 遺伝子 C C R 6 及び / 若しくは B L R 1 又はそのオーソログ遺伝子若しくはパラログ遺伝子内の少なくとも 1 つの C p G 位置のメチル化状態を分析することを含む、特に *in vitro* 方法の、哺乳動物の或る特定の免疫細胞を同定する方法の提供。

【解決手段】 前記哺乳動物の免疫細胞、又は T 細胞及び / 若しくは B 細胞、又は活性化 T 細胞を同定する方法であって、前記遺伝子 *c c r 6* 及び / 若しくは *b l r 1* 又は前記そのオーソログ遺伝子若しくは前記パラログ遺伝子内の少なくとも 1 つの C p G 位置のメチル化状態を分析することを含む、哺乳動物の免疫細胞、又は T 細胞及び / 若しくは B 細胞、又は活性化 T 細胞を同定する方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物の免疫細胞、又は T 細胞及び / 若しくは B 細胞、又は活性化 T 細胞を同定する方法であって、遺伝子 *ccr6* 及び / 若しくは *blr1* 又はそのオーソログ遺伝子若しくはパラログ遺伝子内の少なくとも 1 つの CpG 位置のメチル化状態を分析することを含む、哺乳動物の免疫細胞、又は T 細胞及び / 若しくは B 細胞、又は活性化 T 細胞を同定する方法。

【請求項 2】

非活性化 T 細胞と比較した場合の脱メチル化が、安定に活性化された T 細胞、NK 細胞、記憶 T 細胞、又は CD4⁺ 記憶 T 細胞若しくは CD8⁺ 記憶 T 細胞、記憶細胞傷害性 T 細胞、ナイーブ B 細胞及び記憶 B 細胞から選択される細胞の指標となる、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

遺伝子 *ccr6* における脱メチル化が、CCR6⁺CD4⁺ T 細胞若しくは CCR6⁺CD8⁺ T 細胞、又は安定に活性化された CCR6⁺CD4⁺ T 細胞若しくは CCR6⁺CD8⁺ T 細胞から選択される細胞の指標となり、前記方法が任意で CD3⁺ 細胞を単離する工程を更に含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記遺伝子 *ccr6* 及び / 若しくは *blr1* 又はそのオーソログ遺伝子若しくはパラログ遺伝子内の少なくとも 1 つの CpG 位置のメチル化状態が、記憶 T 細胞、ナイーブ B 細胞及び / 又は記憶 B 細胞におけるそれぞれの CpG 位置と比較した場合の顆粒球、単球、NK 細胞、ナイーブ T 細胞、ナイーブ細胞傷害性 T 細胞及び記憶細胞傷害性 T 細胞における遺伝子 *blr1* 又はそのオーソログ遺伝子若しくはパラログ遺伝子のメチル化の増大、並びに NK 細胞、記憶 T 細胞、記憶細胞傷害性 T 細胞、ナイーブ B 細胞及び / 又は記憶 B 細胞におけるそれぞれの CpG 位置と比較した場合の顆粒球、単球、ナイーブ T 細胞及びナイーブ細胞傷害性 T 細胞における遺伝子 *ccr6* 又はそのオーソログ遺伝子若しくはパラログ遺伝子のメチル化の増大から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記メチル化状態の分析が、遺伝子 *ccr6* 及び / 若しくは *blr1* 又はそのオーソログ遺伝子若しくはパラログ遺伝子の転写開始領域、プロモーター領域、イントロン及び / 若しくはエクソン / イントロン境界より上流の 5' 領域内、又は配列番号 13 による遺伝子 *ccr6* のプロモーター領域又はそのオーソログ領域若しくはパラログ領域と重複する領域内の少なくとも 1 つの CpG 位置のメチル化状態を分析することを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 6】

前記メチル化状態の分析が、メチル化特異的酵素消化、バイサルファイトシーケンシング、MSP、HeavyMethyl、Methylight、Ms-SNuPE、又は増幅 DNA の検出に基づく他の方法から選択される方法を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 7】

サンプルのプールを、少なくとも 1 つの CpG 位置のメチル化状態について分析する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記遺伝子 *ccr6* のメチル化状態の分析が、配列番号 1 及び配列番号 2、配列番号 3 及び配列番号 4、配列番号 5 及び配列番号 6、配列番号 7 及び配列番号 8、並びに配列番号 11 及び配列番号 12、並びにそのオーソログプライマー対若しくはパラログプライマー対から選択されるプライマー対のうち少なくとも 1 つを用いた増幅を含むか、又は前記メチル化状態の分析が、配列番号 5 及び配列番号 6、配列番号 7 及び配列番号 8、配列番号 11 及び配列番号 12、並びにそのオーソログプライマー対若しくはパラログ

50

プライマー対から選択されるプライマー対のうち少なくとも1つを用いた増幅を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記メチル化状態の分析が、配列番号1及び配列番号2のプライマー対によって増幅されるアンプリコンの71位、98位、106位、135位、178位、193位、277位、316位及び339位、配列番号3及び配列番号4のプライマー対によって増幅されるアンプリコンの23位、36位、38位、53位及び114位、配列番号5及び配列番号6のプライマー対によって増幅されるアンプリコンの23位、109位、161位、193位、217位及び245位、配列番号7及び配列番号8のプライマー対によって増幅されるアンプリコンの62位、101位、124位、202位、246位及び251位、配列番号11及び配列番号12のプライマー対によって増幅されるアンプリコンの71位、98位、106位、135位、178位、193位、277位及び316位、並びにそのオーソログスCpG位置又はパラログスCpG位置からなる群から選択される少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態を分析することを含む、請求項8に記載の方法。

10

【請求項10】

前記遺伝子BLR1のメチル化状態の分析が、配列番号9及び配列番号10、並びにそのオーソログスプライマー対又はパラログスプライマー対から選択されるプライマー対のうち少なくとも1つを用いた増幅を含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記メチル化状態の分析が、配列番号9及び配列番号10のプライマー対によって増幅されるアンプリコンの23位、25位、46位、51位、109位、157位、177位、183位、199位、229位、244位、247位、287位及び360位、並びにそのオーソログスCpG位置又はパラログスCpG位置からなる群から選択される少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態を分析することを含む、請求項10に記載の方法。

20

【請求項12】

前記哺乳動物がマウス、ラット、サル又はヒトである、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

哺乳動物の免疫状態を診断する方法であって、

- a) 免疫細胞を含有するサンプルを診断対象の前記哺乳動物から得る工程と、
 - b) 請求項1～12のいずれか一項に記載の方法により、前記免疫細胞における遺伝子CCR6及び/若しくはBLR1又はそのオーソログス遺伝子若しくはパラログス遺伝子内の少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態を分析する工程と、
 - c) 前記サンプル中に存在する免疫細胞の量を前記メチル化状態に基づいて特定する工程と、
 - d) 特定された前記量に基づいて前記哺乳動物の免疫状態について結論付ける工程と、
- を含む、哺乳動物の免疫状態を診断する方法。

30

【請求項14】

前記サンプルが血液サンプル、血中リンパ球のサンプル若しくはその画分、又はCD3⁺細胞の画分から選択される、請求項13に記載の方法。

40

【請求項15】

前記哺乳動物が自己免疫疾患、同種移植レシピエントにおける有害作用、腫瘍性疾患、卵巣がん、慢性移植片対宿主病、アレルギー性喘息、多発性硬化症、炎症、炎症関節、関節リウマチ、乾癬性疾患、炎症性腸疾患、脳症、及びX連鎖免疫調整異常・多発性内分泌障害腸症候群(IPEX)から選択される疾患を患う患者である、請求項13又は14に記載の方法。

【請求項16】

前記免疫細胞がナイーブT細胞、記憶T細胞、及びCCR6⁺CD4⁺T細胞若しくはCCR6⁺CD8⁺T細胞、又は安定に活性化されたCCR6⁺CD4⁺T細胞若しくはCCR6⁺CD8⁺T細胞から選択される活性化T細胞である、請求項13～15のい

50

れか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記 T 細胞における遺伝子 C C R 6 及び / 又は B L R 1 の発現を調整する化学物質及び / 又は生体物質に応じた前記 T 細胞の量を測定及び / 又はモニタリングすることを更に含む、請求項 13 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

患者への移植に対する *in vitro* で生成した又は展開させた免疫細胞の適合性を決定する *in vitro* 方法であって、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法と、分析される CpG 位置が少なくとも 80 %、又は 90 %、又は 95 % までメチル化されているか否かを検出することを含む、患者への移植に対する *in vitro* で生成した又は展開させた免疫細胞の適合性を決定する *in vitro* 方法。

10

【請求項 19】

免疫細胞における C C R 6 及び / 又は B L R 1 の発現を調整する化学物質及び / 又は生体物質を同定する *in vitro* 方法であって、前記化学物質及び / 又は生体物質の 1 つ又は複数を免疫細胞と接触させることと、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法を行うことと、前記化学物質及び / 又は生体物質が、分析される CpG 位置のメチル化を調整するか否かを検出することを含む、免疫細胞における C C R 6 及び / 又は B L R 1 の発現を調整する化学物質及び / 又は生体物質を同定する *in vitro* 方法。

【請求項 20】

前記物質が、分析される CpG 位置の少なくとも 80 %、又は 90 %、又は 95 % までの脱メチル化をもたらす、請求項 19 に記載の化学物質及び / 又は生体物質を同定する方法。

20

【請求項 21】

配列番号 1 ~ 配列番号 12 のいずれか 1 つによるオリゴヌクレオチド、若しくは配列番号 1 及び配列番号 2、配列番号 3 及び配列番号 4、配列番号 5 及び配列番号 6、並びに配列番号 7 及び配列番号 8、並びに配列番号 9 及び配列番号 10、並びに配列番号 11 及び配列番号 12 から選択されるプライマー対によって増幅されるアンプリコン、又は配列番号 13 によるアンプリコン、又はオーソロガス若しくはパラロガスなオリゴマー若しくはアンプリコン。

【請求項 22】

活性化 T 細胞若しくは B 細胞、又はナイーブ T 細胞若しくは記憶 T 細胞を、遺伝子 C C R 6 及び / 又は B L R 1 内の CpG 位置のメチル化状態の分析に基づいて同定するためのキットであって、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法を行うための材料を含む、活性化 T 細胞若しくは B 細胞、又はナイーブ T 細胞若しくは記憶 T 細胞を、遺伝子 C C R 6 及び / 又は B L R 1 内の CpG 位置のメチル化状態の分析に基づいて同定するためのキット。

30

【請求項 23】

免疫細胞、又は安定した活性化 T 細胞若しくは B 細胞を検出及び / 又は同定するための請求項 21 に記載のオリゴマー若しくはアンプリコン、又は請求項 22 に記載のキットの使用。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子 C C R 6 及び / 若しくは B L R 1 又はそのオーソロガス遺伝子若しくはパラロガス遺伝子内の少なくとも 1 つの CpG 位置のメチル化状態を分析することを含む、哺乳動物の或る特定の免疫細胞を同定する方法、特に *in vitro* 方法、並びに或る特定の免疫細胞の検出並びに品質保証及び品質管理のためのタンパク質 C C R 6 及び / 又は B L R 1 の遺伝子の DNA メチル化分析の使用に関する。特に、本発明は、T 細胞における遺伝子 C C R 6 内の少なくとも 1 つの CpG 位置のメチル化状態を分析することに関する。さらに、本発明は、上記の方法を行うためのキット及びそれぞれの使用に関する

50

る。

【0002】

本発明の目的上、本明細書中で引用される全ての参考文献及び配列表は、その全体が参照により援用される。

【背景技術】

【0003】

初めにパーキットリンパ腫細胞において同定された、ケモカイン（C-X-Cモチーフ）受容体5（CXCR5）としても知られるパーキットリンパ腫受容体1（BLR1）遺伝子は、リンパ球に特異的な発現パターンを有するGタンパク質共役受容体のスーパーファミリーの最初のメンバーであった。BLR1は、ケモカイン（IL-8、MIP-1）及び神経ペプチドの受容体と重要な関係を示す。成熟B細胞発生が著しく損なわれたSCIDマウスは、脾臓においてBlr1特異的RNAレベルの強い低下を示す。B細胞系統の異なる段階を示すマウスリンパ系腫瘍細胞株の分析から、B細胞リンパ腫におけるBlr1の発現は上昇するが、プレBリンパ腫又は形質細胞腫においては上昇しないことが明らかとなる。マウスBLR1は、成熟Bリンパ球の再循環に対する調節的機能を有するサイトカイン/神経ペプチド受容体となる場合もある（非特許文献1、非特許文献2）。

10

【0004】

データベースエントリABK41953は、GTP結合タンパク質（ケモカイン（C-X-Cモチーフ）受容体5）であるヒトパーキットリンパ腫受容体1のアミノ酸配列を開示するものであり、データベースエントリEF064770は、GTP結合タンパク質（ケモカイン（C-X-Cモチーフ）受容体5）であるヒトパーキットリンパ腫受容体1（BLR1）遺伝子のヌクレオチド配列を開示するものである。

20

【0005】

特許文献1及び特許文献2は、ケモカイン受容体であるパーキットリンパ腫受容体1（BLR1）と、そのリガンドであるBリンパ球走化性因子（BLC）との相互作用を調整する作用物質を同定するため、及びBLR1ポリペプチドとBLCポリペプチドとの相互作用を変調するための方法及び組成物を記載している。BLR1：BLC変調因子を同定する方法が、市販薬のスクリーニングに特に適用されるとして記載されている。

【0006】

ケモカイン受容体発現の特異的なパターンは、免疫細胞が定常状態及び炎症状態の両方でそれらの標的組織へとホーミングする、全身の白血球の組織的な遊走を確実にする。ケモカイン受容体CCR6は、ヒトの血液及び組織中の白血球、中でも樹状細胞、CD45RO⁺エフェクター/記憶T細胞、CD25^{high}調節性T細胞（Treg）、ナイーブB細胞及び記憶B細胞、NK細胞及びNK細胞のサブセットで広範に発現される（非特許文献3）。記憶T細胞では、CCR6は自己反応性IL-10産生細胞集団（非特許文献4）並びに皮膚ホーミング細胞及び粘膜ホーミング細胞の大部分で発現される。幾つかの研究から、CCR6が炎症性IL-17産生CD4⁺T細胞で一貫して発現されることが更に示されており（非特許文献5）、この細胞はマウス及びヒトにおける関節リウマチ、乾癬性疾患、炎症性腸疾患又は脳症等の多様な有害な炎症性疾患に関与する（非特許文献5、非特許文献6、非特許文献7、非特許文献8、非特許文献9、非特許文献10、非特許文献11、非特許文献12）。

30

40

【0007】

特殊化した記憶サブセットへのT細胞の分化が、ホーミング受容体レポーター及びケモカイン受容体レポーターの獲得及び安定した発現も伴い、これらのサブセットの組織又は炎症に特異的な輸送を可能にすることが広く考えられている（非特許文献13）。しかしながら、一部の研究では、ホーミング受容体の発現における相当な可塑性も報告されている。このことがCCR6の発現にも当てはまるか否かは知られていない。CCR6発現は、TGF- β と組み合わせた炎症誘発性サイトカインのカクテルによってTCR刺激性ナイーブT細胞で新たに誘導されることがある（非特許文献14）。

【0008】

50

安定した表現型及び機能を有する異なる系統へのT細胞の分化が、重要なエフェクター分子（非特許文献15、非特許文献16、非特許文献17）又はTregにおけるFoxp3等の系統特異的な転写因子（非特許文献18、非特許文献19、非特許文献20）の後成的調節を伴うことの証拠が近年ますます提供されている。ごく少数の研究が、輸送に關与する分子がT細胞（非特許文献21、非特許文献22）又はがん細胞（非特許文献23、非特許文献24）において後成的調節を受けることの証拠を提供している。

【0009】

非特許文献25はCCR6の同定を記載している。データベースエントリNP_004358は、ヒトケモカイン（C-Cモチーフ）受容体6のアミノ酸配列を開示するものである。

10

【0010】

非特許文献26は、ヒト結腸直腸がんにおけるCCL20/CCR6発現と結腸直腸肝転移の促進との間の関連性を提示している。これについては、結腸直腸組織に由来する30個のヒトがんサンプル、結腸直腸肝転移巣に由来する30個のヒトサンプル、及び隣接非腫瘍性肝組織が、定量リアルタイムPCR、ウエスタンブロット分析、組織化学、顕微解剖及び酵素結合免疫吸着法（ELISA）を用いてスクリーニングされた。全てのケモカイン受容体の過剰発現がCRCにおいて見られ、結腸直腸肝転移巣では、ケモカイン受容体CXCR4及びCCR6だけが顕著に上方調節されていた。

【0011】

特許文献3は、細胞ウイルス受容体に類似するCCR6及び上記受容体を使用する方法を記載している。

20

【0012】

CCR6及び/又はBLR1のメチル化と、或る特定のタイプの免疫細胞、特にT細胞との間の関係性は記載されていない。

【0013】

個体のほとんどの細胞はDNAコードの全く同じ相補体含有するが、高等生物では様々な組織型において異なるパターンの遺伝子発現を行い、維持する必要がある。大抵の遺伝子調節は、現在の細胞の状態及び外部刺激の変化に応じた一時的なものである。一方で、持続的調節は、DNAの基本的な遺伝コードを変更しない遺伝性の調節パターンであるエピジェネティクスの主要な役割である。DNAメチル化は後成的調節の典型的な形態である。DNAメチル化は安定した細胞記憶として働き、様々な細胞型の長期にわたる同一性を維持するうえで重要な役割を果たす。

30

【0014】

メチル化の主要な標的は、2ヌクレオチド配列シトシン-グアニン（「CpG部位」）である。これに関して、シトシン（C）は単純な化学修飾を受け、5-メチル-シトシンとなる場合がある。ヒトゲノムにおいては、CG配列は、「CpG島」と呼ばれる或る特定の比較的密なクラスターの場合を除き、予想されるよりもはるかに稀である。CpG島はしばしば遺伝子プロモーターを伴い、ヒト遺伝子の半数以上がCpG島を有すると推定されている（非特許文献27）。

【0015】

DNAの異常メチル化は、しばしば健常細胞からがん性細胞への形質転換に伴って生じる。観察される影響にはゲノム規模の低メチル化、腫瘍抑制遺伝子のメチル化の増大及び多くのがん遺伝子の低メチル化がある（非特許文献28、非特許文献29、非特許文献30によって概説される）。メチル化プロファイルは腫瘍特異的である（すなわち、特定の遺伝子又は更には個々のCpGのメチル化パターンにおける変化は、特定の腫瘍型に特徴的である）ことが認識されており、現在では膀胱がん、乳がん、結腸がん、食道がん、胃がん、肝臓がん、肺がん及び前立腺がんに対する診断マーカーの大規模なコレクションが存在する（非特許文献30によって要約される）。

40

【0016】

メチル化による後成的制御は、胚発生、X染色体不活性化、及び父性対立遺伝子又は母

50

性対立遺伝子のいずれかのインプリンティング（単一对立遺伝子サイレンシング）を含む初期発生に必須である（非特許文献31）。生殖細胞系では活性であるが、体細胞ではメチル化によってサイレンシングされる或る種の遺伝子も存在する（非特許文献32、非特許文献33）。

【0017】

組織特異的なメチル化は成体の細胞型/段階の調節においても役割を果たし、メチル化と遺伝子発現との間の因果関係が確立されている場合もある。以下は、メチル化の変化が組織特異的な遺伝子発現の制御に強く関与する遺伝子のリストの一部である：乳酸脱水素酵素C（精巣）、オキシトシン受容体（血液及び肝臓）、チロシニアミノ転移酵素（肝臓）、GFAP（星状細胞）及びロイコシアリン（白血球）。他の場合では、メチル化は幾つかの他の主要な調節の副産物であり得るか、又は遺伝子を「オフ」状態に固定するために必要とされる（非特許文献31）。本願（免疫細胞の同定（複数も可））については、因果（生物学的）関係は必要とされず、メチル化パターンと細胞型との間の強い相関関係が必要とされるだけである。

【0018】

或る特定の遺伝子領域のこのような細胞型及び細胞状態に特異的な修飾のこれまで公表された例は、T細胞からヘルパーT細胞（Th1又はTh2）への分化系列決定時に見られる。ナイーブ（未刺激）CD4⁺T細胞は、抗原と遭遇すると活性化され、インターロイキンによる更なる刺激によって選択的細胞運命を受けることができる。2つのタイプのヘルパーT細胞は遺伝子発現の相互パターンを示す。Th1はインターフェロン- γ （IFN- γ ）を産生し、IL-4をサイレンシングするが、Th2はIL-4を産生し、IFN- γ をサイレンシングする（非特許文献15）。両方の選択的細胞運命について、これらの遺伝子の発現は、近位CpG部位のメチル化と逆相関する。Th2及びナイーブT細胞では、IFN- γ プロモーターがメチル化されるが、IFN- γ が発現されるTh1細胞ではメチル化されない（非特許文献34）。一方で、IL-4の全転写領域はTh2誘導条件下で脱メチル化され、これはIL-4の効率的な転写と強く相関する。Th1細胞では、この大規模な脱メチル化は起こらないが、特定の非転写領域が次第に大幅にメチル化され、IL-4は発現されない（非特許文献35）。さらに、非特許文献36は、ナイーブT細胞においてIL-2プロモーターが大幅にメチル化され、不活性となるが、ナイーブT細胞の活性化後には、IL-2遺伝子が6つの連続したCpGで急速かつ特異的な脱メチル化を受けることを実証している。このメチル化パターンの変更は、細胞分化及びIL-2産物の産生増加と同時に起こる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0019】

【特許文献1】国際公開第99/28468号

【特許文献2】米国特許第6,110,695号

【特許文献3】国際公開第03/014153号

【非特許文献】

【0020】

【非特許文献1】Kaiser E, Foerster R, Wolf I, Ebensperger C, Kuehl WM, Lipp M. The G-protein-coupled receptor BLR1 is involved in murine B cell differentiation and is also expressed in neuronal tissues. *Eur J Immunol.* 1993 Oct;23(10):2532-9.

【非特許文献2】Foerster R, Wolf I, Kaiser E, Lipp M. Selective expression of the murine homologue of the G-protein-coupled receptor BLR1 in B cell differentiation, B cell neoplasia and defined areas of the cerebellum. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1994 May;40(3):381-7

【非特許文献3】Berahovich RD, Lai NL, Wei Z, Lanier LL, Schall TJ. Evidence for NK cell subsets based on chemokine receptor expression. *J Immunol.* 2006;177:7833-7840.

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 4】Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med*. 1998;188:373-386.
- 【非特許文献 5】Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, et al. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med*. 2007;204:2803-2812.
- 【非特許文献 6】Ruth JH, Shahrara S, Park CC, et al. Role of macrophage inflammatory protein-3alpha and its ligand CCR6 in rheumatoid arthritis. *Lab Invest*. 2003;83:579-588.
- 【非特許文献 7】Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, et al. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol*. 2000;164:6621-6632. 10
- 【非特許文献 8】Hedrick MN, Lonsdorf AS, Shirakawa AK, et al. CCR6 is required for IL-23-induced psoriasis-like inflammation in mice. *J Clin Invest*. 2009;119:2317-2329.
- 【非特許文献 9】Kaser A, Ludwiczek O, Holzmann S, et al. Increased expression of CCL20 in human inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol*. 2004;24:74-85.
- 【非特許文献 10】Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol*. 2009;10:514-523. 20
- 【非特許文献 11】Varona R, Cadenas V, Flores J, Martinez AC, Marquez G. CCR6 has a non-redundant role in the development of inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol*. 2003;33:2937-2946.
- 【非特許文献 12】Matsui T, Akahoshi T, Namai R, et al. Selective recruitment of CCR6-expressing cells by increased production of MIP-3 alpha in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2001;125:155-161.
- 【非特許文献 13】Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 1996;272:60-66.
- 【非特許文献 14】Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*. 2007;8:639-646. 30
- 【非特許文献 15】Ansel KM, Lee DU, Rao A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol*. 2003;4:616-623.
- 【非特許文献 16】Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112:1557-1569.
- 【非特許文献 17】Wilson CB, Rowell E, Sekimata M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:91-105.
- 【非特許文献 18】Floess S, Freyer J, Siewert C, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol*. 2007;5:e38.
- 【非特許文献 19】Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol*. 2009;9:83-89. 40
- 【非特許文献 20】Baron U, Floess S, Wiczorek G, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells. *Eur J Immunol*. 2007;37:2378-2389.
- 【非特許文献 21】Scotet E, Schroeder S, Lanzavecchia A. Molecular regulation of C-C chemokine receptor 3 expression in human T helper 2 cells. *Blood*. 2001;98:2568-2570.
- 【非特許文献 22】Syrbe U, Jennrich S, Schottelius A, Richter A, Radbruch A, Hama nn A. Differential regulation of P-selectin ligand expression in naive versus memor 50

y T cells: evidence for epigenetic regulation of involved glycosyltransferase genes. Blood. 2004;104:3243-3248.

【非特許文献 2 3】Sato N, Matsubayashi H, Fukushima N, Goggins M. The chemokine receptor CXCR4 is regulated by DNAmethylation in pancreatic cancer. Cancer Biol Ther. 2005;4:70-76.

【非特許文献 2 4】Mori T, Kim J, Yamano T, et al. Epigenetic up-regulation of C-C chemokine receptor 7 and C-X-C chemokine receptor 4 expression in melanoma cells. Cancer Res. 2005;65:1800-1807

【非特許文献 2 5】Baba et al. (Baba, M., Imai, T., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Hieshima, K., Nomiyama, H. and Yoshie, O. Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC J. Biol. Chem. 272 (23), 14893-14898 (1997))

【非特許文献 2 6】Rubie et al. (Rubie, C., Oliveira, V., Kempf, K., Wagner, M., Tilton, B., Rau, B., Kruse, B., Konig, J. and Schilling, M. Involvement of chemokine receptor CCR6 in colorectal cancer metastasis Tumour Biol. 27 (3), 166-174 (2006))

【非特許文献 2 7】Antequera and Bird, Proc Natl Acad Sci U S A. 90:11995-9, 1993

【非特許文献 2 8】Jones and Laird, Nature Genetics 21:163-167, 1999

【非特許文献 2 9】Esteller, Oncogene 21:5427-5440, 2002

【非特許文献 3 0】Laird, Nature Reviews/Cancer 3:253-266, 2003

【非特許文献 3 1】Erlich, J Cellular Chem 88:899-910, 2003

【非特許文献 3 2】Bird, Genes and Dev 16:6-21, 2002

【非特許文献 3 3】Li, Nature Reviews/Genetics 3:662-673, 2002

【非特許文献 3 4】Attwood et al., CMLS 59:241-257, 2002

【非特許文献 3 5】Lee et al., Immunity 16:649-660, 2002

【非特許文献 3 6】Bruniquel and Schwartz (Nat Immunol. 4:235-40, 2003)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

本発明の目的の1つは、哺乳動物の及び/又は哺乳動物における或る特定の免疫細胞、好ましくはT細胞及び/又はB細胞を確実に同定するために、脊椎動物における細胞型及び細胞状態の指標として従来の方法論を補完するか、又はそれにとって代わることのできる優れたツールとして、特にその検出並びに品質保証及び品質管理のために、タンパク質CCR6及び/又はBLR1の遺伝子の発現分析、特にDNAメチル化分析に基づく発現分析の改良された方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0022】

その第1の態様によると、本発明は、BLR1及び/又はCCR6に陽性の哺乳動物の免疫細胞、好ましくはNK細胞、記憶T細胞、記憶細胞傷害性T細胞、ナイーブB細胞又は記憶B細胞、最も好ましくは安定した活性化T細胞を同定する方法であって、上記哺乳動物における遺伝子CCR6及び/若しくはBLR1又はそのオーソログ遺伝子若しくはパラログ遺伝子内の少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態を分析することを含む、BLR1及び/又はCCR6に陽性の哺乳動物の免疫細胞、好ましくはNK細胞、記憶T細胞、記憶細胞傷害性T細胞、ナイーブB細胞又は記憶B細胞、最も好ましくは安定した活性化T細胞を同定する方法を提供することによって上記の目的を解決するものである。

【0023】

驚くべきことに、CCR6及び/又はBLR1の脱メチル化がTリンパ球の安定した活性化の指標となることが見出された。当該技術分野で既知のように、T細胞又はTリンパ球は細胞性免疫において中心的役割を果たし、T細胞受容体(TCR)と呼ばれるそれら

の細胞表面上の特有の受容体の存在によって、B細胞及びナチュラルキラー細胞等の他のリンパ球型と識別することができる。「活性化」という用語も当業者に既知であり、CD4⁺T細胞の活性化は、それぞれAPC（抗原提示細胞）上の主要組織適合性複合体ペプチド及びB7ファミリーメンバーによる、T細胞上のT細胞受容体及びCD28の両方の連結によって起こる。細胞傷害性T細胞はウイルス感染細胞及び腫瘍細胞を破壊し、移植片拒絶反応にも関与する。これらの細胞はCD8糖タンパク質をこれらの表面に発現するため、CD8⁺T細胞としても知られる。細胞傷害性T細胞の活性化は、T細胞の表面上に発現された分子とAPCの表面上に発現された分子との間の幾つかの同時相互作用に依存する。

【0024】

「一時的な」活性化とは対照的な「安定した」活性化は、近年本発明者らによってTreg特異的転写因子FOXP3について実証されたように（非特許文献19）、免疫細胞がそれらの表現型、特にCCR6及び/又はBLR1の発現を長時間にわたって維持することを意味する。

【0025】

本発明による方法は*in vitro*及び/又は*in vivo*で行うことができる。非活性化T細胞と比較した場合の脱メチル化が、安定に活性化されたT細胞、NK細胞、記憶T細胞、特にCD4⁺記憶T細胞若しくはCD8⁺記憶T細胞、記憶細胞傷害性T細胞、ナイーブB細胞及び記憶B細胞から選択される細胞の指標となる、本発明による方法が好ましい。

【0026】

上記BLR1及び/又はCCR6に陽性の免疫細胞、好ましくはNK細胞、記憶T細胞、記憶細胞傷害性T細胞、ナイーブB細胞又は記憶B細胞が、安定したBLR1及び/又はCCR6に陽性の免疫細胞、好ましくは安定したNK細胞、記憶T細胞、特にCD4⁺記憶T細胞又はCD8⁺記憶T細胞、記憶細胞傷害性T細胞、ナイーブB細胞及び記憶B細胞、並びにCD25^{high}CD4⁺調節性T細胞である、本発明による方法が更に好ましい。BLR1遺伝子座及び/又はCCR6遺伝子座の接近可能性の分析は、単なるBLR1及び/又はCCR6の発現以外にも、どの程度まで例えば記憶T細胞系統への変換が起こるかという更なる情報を提供する。

【0027】

遺伝子ccr6における脱メチル化が、CCR6⁺CD4⁺T細胞若しくはCCR6⁺CD8⁺T細胞、特に安定に活性化されたCCR6⁺CD4⁺T細胞若しくはCCR6⁺CD8⁺T細胞から選択される細胞の指標となり、上記方法が任意でCD3⁺細胞を単離する工程を更に含む、本発明による方法が更に好ましい。

【0028】

ヒトT細胞上の安定したCCR6又はBLR1の発現が後成的機構によって制御されるか否かについては、これまでに研究されていない。概して、CCR6の転写調節は十分に理解されていない。プロモーター活性を有する領域がマウスCCR6遺伝子において同定されており（Kucharzik T, Hudson JT, 3rd, Waikel RL, Martin WD, Williams IR. CCR6 expression distinguishes mouse myeloid and lymphoid dendritic cell subsets: demonstration using a CCR6 EGFP knock-in mouse. *Eur J Immunol.* 2002;32:104-112）、Th17細胞のマスター調節因子である転写因子ROR γ tの過剰発現が、ヒト及びマウスのT細胞上でのCCR6発現をもたらす（Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, et al. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med.* 2007; 204:2803-2812、Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR-gamma-t. *Nat Immunol.* 2008;9:641-649）。本発明者らはしたがって、CCR6遺伝子座のDNAメチル化を含む後成的機構が、ヒトT細胞における安定したCCR6発現の調節に寄与するか否かを調査した。本発明者らは、一次T細胞において転写活性を有し、ヒトのCC

10

20

30

40

50

R6⁻T細胞及びCCR6⁺T細胞において差次的にメチル化される、CCR6遺伝子内の非コード領域を同定することができた。これらの観察結果及びDNAメチル化阻害剤5'-アザシチジンの誘導効果から、後成的機構がヒト免疫細胞、特にCCR6陽性記憶T細胞における安定したCCR6発現の調節、及び異なるホーミング特性のインプリメンティングに關与することが示唆される。関節リウマチに關与することが報告されている細胞集団であるIL17陽性画分がCCR6陽性であることが示されたため、このマーカーは特に診断的価値がある(下記を参照されたい)。このマーカーの脱メチル化を測定する完全に定量的なメチル化アッセイを行う用途が好ましい。

【0029】

好ましくは、上記メチル化状態の分析は、遺伝子CCR6及び/若しくはBLR1又はそのオーソログ遺伝子若しくはパラログ遺伝子の転写開始領域、プロモーター領域、イントロン及び/若しくはエクソン/イントロン境界より上流の5'領域内、特に配列番号13による遺伝子CCR6のプロモーター領域又はそのオーソログ領域若しくはパラログ領域と重複する領域内の少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態を分析することを含む。

【0030】

本発明者らは、免疫細胞におけるCCR6及び/又はBLR1の発現の調節に機能的に關与する遺伝子CCR6及び/又はBLR1内の特定の(particular)領域を同定した。この領域は、例えばバイサルファイトシーケンシング方法を用いて、BLR1を発現する細胞、好ましくは記憶T細胞、ナイーブB細胞若しくは記憶B細胞、及び/又はCCR6を発現する細胞、好ましくはNK細胞、記憶T細胞、記憶細胞傷害性T細胞、ナイーブB細胞若しくは記憶B細胞を、CCR6及び/又はBLR1を発現しない細胞と比較した場合に、差次的メチル化状態を示す多くのCpGモチーフを含有する。本発明者らは、CCR6⁻細胞及びBLR1⁻細胞では遺伝子CCR6及び/又はBLR1のCpGモチーフがそれぞれ、ほぼ完全に(すなわち70%超、好ましくは80%超、好ましくは90%超、最も好ましくは95%超まで)メチル化されているが、同じモチーフが例えばCCR6⁺T細胞では完全に脱メチル化されていることを実証することができた。

【0031】

上述の領域内のCpGモチーフの差次的メチル化は、CCR6及び/又はBLR1の発現と強く相関する。このため、CCR6遺伝子座及び/又はBLR1遺伝子座のメチル化状態の決定は、関節リウマチ、自己免疫疾患、移植片拒絶又はアレルギーの治療における臨床用途に必要とされる、選択的な免疫細胞の安定した集団を同定するのに有益なツールである。

【0032】

CCR6は、mRNA転写産物を用いて分析を行った場合及びタンパク質に対する抗体を用いて分析を行った場合の両方で、その遺伝子発現が活性化免疫細胞において観察されるため、上記細胞のマーカーとして記載されている。しかしながら、これらの同定手段は、単にその時点で(またそのため一時的に)活性化された細胞を認識するものである。このアッセイシステムは、安定に活性化されたT細胞と、刺激を受けたのみであり、これが誘発された後間もなく機能的表現型を失う(lose)T細胞とを識別することは可能ではない。第1の群は、CCR6を永久的に発現するこれらのリンパ球を構成し、したがって活性化コンパートメントを構成する。安定したCCR6を発現する中期/長期の活性化リンパ球のみが脱メチル化されるため、リンパ球のメチル化パターンの分析によってのみ2つの種類/サブグループ間の識別が可能となる。したがって、実際には、メチル化分析によってのみ、CCR6⁺活性化リンパ球によって示される真の免疫応答及び機能を構成する安定したCCR6⁺細胞が同定される。

【0033】

活性化Tリンパ球の陽性同定については、この状況では全てのB細胞が永久的にCCR6⁺であり、したがってバックグラウンド「ノイズ」を構成するため、CD3陽性細胞の事前単離(例えば、例えば細胞選別を用いた精製)が必要とされ得る。しかしながら、T

10

20

30

40

50

リンパ球コンパートメント内では、脱メチル化されたCCR6細胞のみを完全かつ安定に活性化されているとみなすことができる。細胞培養物中では永久的に活性化されたCCR6+細胞を(FACS、MACS及びmRNAを用いて)単離培養形態で同定することができるが、この測定では単一の時点でのCCR6陽性(及びBLR1+)細胞、したがって安定に活性化された細胞及び一時的に活性化された細胞の両方が同定されるため、血液サンプル又はそのT細胞含有画分ではこれを達成することはできない。血液中での識別のためのマーカーは現在知られていない。驚くべきことに、一時的なCCR6/BLR1タンパク質産生細胞がメチル化されたままである一方で、永久的に(安定した)CCR6陽性/BLR1陽性の対応物は脱メチル化されるため、本発明のメチル化マーカーは識別を達成することができる。

10

【0034】

上記遺伝子CCR6及び/若しくはBLR1又はそのオーソログ遺伝子若しくはパラログ遺伝子内の少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態が、記憶T細胞、ナイーブB細胞及び/又は記憶B細胞におけるそれぞれのCpG位置と比較した場合の顆粒球、単球、NK細胞、ナイーブT細胞、ナイーブ細胞傷害性T細胞及び記憶細胞傷害性T細胞における遺伝子BLR1又はそのオーソログ遺伝子若しくはパラログ遺伝子のメチル化の増大、並びにNK細胞、記憶T細胞、記憶細胞傷害性T細胞、ナイーブB細胞及び/又は記憶B細胞におけるそれぞれのCpG位置と比較した場合の顆粒球、単球、ナイーブT細胞及びナイーブ細胞傷害性T細胞における遺伝子CCR6又はそのオーソログ遺伝子若しくはパラログ遺伝子のメチル化の増大から選択される、本発明による方法が好ましい。

20

【0035】

本発明との関連で、「遺伝子」という用語は、CCR6及びBLR1等の或る特定のタンパク質をコードし、上記遺伝子の調節に關与する他の遺伝要素を含有する染色体DNAの領域、例えば配列番号13による遺伝子CCR6のプロモーター領域又はそのオーソログ領域若しくはパラログ領域と重複する領域を意味するものとする。このため、遺伝子はイントロン、エンハンサー、プロモーター配列、及び遺伝子の5'非翻訳領域も含む。本発明の場合では、遺伝子は、本明細書中に示されるアクセッション番号で与えられる配列だけでなく、その上流及び下流の非翻訳領域も含む。

30

【0036】

本発明について行われる一部の分析は、マウス系において行われた。しかし、BLR1⁻細胞及びBLR1⁺細胞並びに/又はCCR6⁻細胞及びCCR6⁺細胞の間でCpGモチーフの差次的メチル化を示す領域は、哺乳動物間、特にマウスとヒトとの間で高度に保存されている。加えて、実験から、ヒト系においてもマウスのBLR1⁺細胞及び/又はCCR6⁻細胞と同じ及び/又は相同なCpGモチーフが脱メチル化されることが示されている。本発明との関連で、この事実は「オーソログ」遺伝子又は「パラログ」遺伝子という用語によって説明される。「オーソログ」は共通祖先から進化した2つ以上の種における遺伝子であり、オーソログ遺伝子とも呼ばれる。本発明との関連で、ヒト(Homo sapiens)CCR6はしたがって、ハツカネズミ(Mus musculus)CCR6遺伝子及び/又はタンパク質のオーソログである。「パラログ」はゲノム内の重複によって関連する遺伝子であり、パラログ遺伝子とも呼ばれる。オーソログは進化の過程で同じ機能を保持するが、パラログは元の遺伝子と関連していても新たな機能を進化させている。「パラログ」という用語には、正常遺伝子に類似するが、機能的な最終産物を産生しないヌクレオチド配列である「偽遺伝子」が含まれる。偽遺伝子には2つの変形がある。第1の変形では最終産物がタンパク質である必要がある。第2の変形では最終産物はRNAとなる。

40

【0037】

本明細書中で与えられる情報に基づいて、当業者は容易にオーソログ遺伝子又はパラログ遺伝子を(例えば、ClustalWプログラム等の配列をアラインメントするためのコンピュータプログラムを用いて)比較し、(両方の)遺伝子において同じ領域内に

50

及び/又は更には同じ等価位置に見ることができる領域及び/又はC p G位置を同定することが可能である。本発明によると、これらの領域及び/又はC p G位置はオーソロガス又はパラロガスとみなされる。通常、アラインメントは、分析される2つ(以上)のDNA断片間の配列同一性のレベルに基づく。配列同一性のレベルは、所与の断片の好ましくは約75%、より好ましくは約80%、最も好ましくは約90%である。

【0038】

C p G位置のメチル化状態を分析するために、DNAメチル化を分析する任意の既知の方法を用いることができる。本発明による方法の好ましい実施の形態では、メチル化状態の分析は、メチル化特異的酵素消化、パイサルファイトシーケンシングから選択される方法、プロモーターメチル化、C p G島メチル化、MSP、Heavy Methyl、Methyl Light、Ms-SNuPEから選択される分析、又は増幅DNAの検出に基づく他の方法を含む。これらの方法は当業者に十分に知られており、それぞれの文献中に見ることができる。さらに、(例えば5サンプル以上の)プールされたサンプルを用いることもでき、通常は、サンプルのプールを少なくとも1つのC p G位置のメチル化状態について分析する。

10

【0039】

本発明による方法の好ましい実施の形態では、上記遺伝子CCR6のメチル化状態の分析は、配列番号1及び配列番号2(「アンプリコン888」)、配列番号3及び配列番号4(「アンプリコン1201」)、配列番号5及び配列番号6(「アンプリコン1202」)、配列番号7及び配列番号8(「アンプリコン1203」)、並びに配列番号11及び配列番号12(「DMR」)、並びにそのオーソロガスプライマー対若しくはパラロガスプライマー対から選択されるプライマー対のうち少なくとも1つを用いた増幅を含み、好ましくは上記メチル化状態の分析が、配列番号5及び配列番号6、配列番号7及び配列番号8、配列番号11及び配列番号12、並びにそのオーソロガスプライマー対若しくはパラロガスプライマー対から選択されるプライマー対のうち少なくとも1つを用いた増幅を含む。

20

【0040】

本発明による方法の別の好ましい実施の形態では、上記遺伝子BLR1のメチル化状態の分析が、配列番号9及び配列番号10(「アンプリコン1037」すなわち配列番号29)、並びにそのオーソロガスプライマー対又はパラロガスプライマー対から選択されるプライマー対のうち少なくとも1つを用いた増幅を含む。

30

【0041】

好ましくは、増幅はポリメラーゼ酵素、PCR若しくは化学増幅反応、又は当業者に既知であり、例えばMSP、Heavy Methyl若しくはMethyl Lightとの関連で下記に記載されるような他の増幅方法を含む。本発明の別の態様では、配列番号1~配列番号12のいずれかによるオリゴマー、若しくは配列番号1及び配列番号2、配列番号3及び配列番号4、配列番号5及び配列番号6、並びに配列番号7及び配列番号8、並びに配列番号9及び配列番号10、並びに配列番号11及び配列番号12から選択されるプライマー対によって増幅される(例えば配列番号13による)アンプリコン、又はオーソロガス若しくはパラロガスなオリゴマー若しくはアンプリコンが、本発明の好ましい実施の形態を構成する。

40

【0042】

当業者は、上記の情報及びマウス系から得られるデータに基づいて、上記のプライマーと好ましくは約75%、より好ましくは約80%、最も好ましくは約90%の配列同一性を有するオーソロガスプライマー対又はパラロガスプライマー対を設計することができる。上記メチル化状態の分析が配列番号5及び配列番号6、配列番号7及び配列番号8、配列番号11及び配列番号12、並びにそのオーソロガスプライマー対又はパラロガスプライマー対から選択されるプライマー対のうち少なくとも1つを用いた増幅を含む、本発明による方法が特に好ましい。

【0043】

50

上記メチル化状態の分析が、配列番号1及び配列番号2のプライマー対によって増幅されるアンプリコンのヌクレオチド位置71、98、106、135、178、193、277、316及び339、配列番号3及び配列番号4のプライマー対によって増幅されるアンプリコンの23位、36位、38位、53位及び114位、配列番号5及び配列番号6のプライマー対によって増幅されるアンプリコンの23位、109位、161位、193位、217位及び245位、配列番号7及び配列番号8のプライマー対によって増幅されるアンプリコンの62位、101位、124位、202位、246位及び251位、配列番号11及び配列番号12のプライマー対によって増幅されるアンプリコンの71位、98位、106位、135位、178位、193位、277位及び316位、並びにそのオーソログス Cp G 位置又はパラログス Cp G 位置からなる群から選択される少なくとも1つの Cp G 位置のメチル化状態を分析することを含む、本発明による方法が更に好ましい。

10

【0044】

メチル化状態の分析が、配列番号9及び配列番号10のプライマー対によって増幅されるアンプリコンの23位、25位、46位、51位、109位、157位、177位、183位、199位、229位、244位、247位、287位及び360位、並びにそのオーソログス Cp G 位置又はパラログス Cp G 位置からなる群から選択される少なくとも1つの Cp G 位置のメチル化状態を分析することを含む、本発明による方法が更に好ましい。これらの位置の大部分が活性化T細胞において脱メチル化されていることを実験で示すことができた。当業者はさらに、分析対象の部位、例えばアンプリコン888上に存在する全ての部位、及び/又はアンプリコン1037上に存在する全ての部位、又はDMR、又はそのオーソログス Cp G 位置若しくはパラログス Cp G 位置の量を最小限に抑えるために、CpG位置の特定のサブセットを選択することが可能である。

20

【0045】

本発明による方法は、遺伝子BLR1及び/若しくはCCR6又はそのオーソログ若しくはパラログを有する任意の哺乳動物を用いて行うことができ、上記哺乳動物がマウス、ラット、サル又はヒトである本発明による方法が好ましい。

【0046】

本発明の別の態様では、本発明は、哺乳動物の免疫状態を診断する方法であって、a) 免疫細胞を含有するサンプルを診断対象の上記哺乳動物から得る工程と、b) 本発明による方法により、上記免疫細胞における遺伝子CCR6及び/若しくはBLR1又はそのオーソログス遺伝子若しくはパラログス遺伝子内の少なくとも1つの Cp G 位置のメチル化状態を分析する工程と、c) 上記サンプル中に存在する免疫細胞の量及び/又はタイプを上記メチル化状態に基づいて特定する工程と、d) 特定された上記量及び/又はタイプに基づいて上記哺乳動物の免疫状態について結論付ける工程とを含む、哺乳動物の免疫状態を診断する方法を提供する。

30

【0047】

本方法の一態様では、(種々のタイプの免疫細胞を含有する)サンプル中のT細胞の全集団を、CCR6遺伝子及び/又はBLR1遺伝子におけるそれらのメチル化状態について分析する。部位の全メチル化頻度の結果に基づいて、例えば分析した集団内の記憶T細胞の比率及び/又は量を決定することができる。上記結果から、診断対象の哺乳動物の免疫状態及び/又はT細胞状態について結論付けることができる。方法は*in vitro*及び/又は*in vivo*で行うことができる。概して、好適なT細胞を含有する限り、全ての生体サンプルを使用することができる。上記サンプルが血液サンプル、血中リンパ球のサンプル又はその画分から選択される方法が好ましい。最も好ましくは、サンプルはCD3によって、好ましくは細胞選別又は磁性ビーズ(MACS)を用いて精製されたT細胞を含む。本方法を用いて、分析用のB細胞含有サンプルを生成することもできる。

40

【0048】

本発明による方法は、遺伝子ccr6及び/若しくはblr1又はそのオーソログ若しくはパラログを有する任意の哺乳動物を用いて行うことができ、上記哺乳動物がマウス、

50

ラット、サル又はヒトである本発明による方法が好ましい。上記哺乳動物が自己免疫疾患、自己免疫疾患における有害作用、同種移植レシピエントにおける有害作用、腫瘍性疾患、卵巣がん、慢性移植片対宿主病、アレルギー性喘息、多発性硬化症、炎症、炎症関節、関節リウマチ、乾癬性疾患、炎症性腸疾患、脳症、及びX連鎖免疫調整異常・多発性内分泌障害腸症候群（IPEX）から選択される疾患を患う患者である、方法が好ましい。好ましくは、上記疾患は関節リウマチである。これらの疾患及び免疫細胞とのそれらの関係は、それぞれの文献に記載されている。

【0049】

B L R 1⁺免疫細胞及び/又はB L R 6⁺免疫細胞、好ましくは活性化T細胞、NK細胞、記憶T細胞、記憶細胞傷害性T細胞、ナイーブB細胞又は記憶B細胞の量が、少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%までの分析対象のCpG位置の脱メチル化に相当する方法が更に好ましい。免疫細胞におけるCCR6及び/又はBLR1の発現を調整する化学物質及び/又は生体物質に応じた上記免疫細胞の量及び/又は比率を測定及び/又はモニタリングすることを更に含む方法がまた更に好ましい。すなわち、例えば疾患（例えば本明細書中に記載される）の治療、並びに免疫細胞に対する効果の点での上記治療の成功及び/又は進行によって生じる免疫細胞の量又は比率における変化は、本方法を用いて追跡することができる。本明細書中のマーカーに基づく免疫細胞のメチル化パターンの追跡調査は、上記化学物質及び/又は生体物質に対する応答による細胞における変化を指摘するものであり、場合によっては表現型変化の前であっても観察することができる。次いで、この情報を、基礎疾患又は関連疾患（例えば本明細書中で言及される）に対する治療法の調整に使用し、それにより副作用を回避及び/又は低減することを含む、改良されたより効果的な治療及び/又は予防を可能にすることができる。

10

20

【0050】

本発明の更に別の態様では、本発明は、患者への移植に対する*in vitro*で生成した又は展開させた免疫細胞の適合性を決定する方法であって、本発明による方法と、分析されるCpG位置が少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%までメチル化されているか否かを検出することを含む、患者への移植に対する*in vitro*で生成した又は展開させた免疫細胞の適合性を決定する方法を提供する。方法は*in vitro*及び/又は*in vivo*で行うことができる。例えば、CCR6及び/又はBLR1の発現の変調、特に低下を示すと思われる免疫細胞は、通常は安定であるとはみなされず、更に使用されることはない。

30

【0051】

本発明の更に別の態様では、本発明は、免疫細胞におけるCCR6及び/又はBLR1の発現を調整する化学物質及び/又は生体物質を同定する方法であって、上記化学物質及び/又は生体物質の1つ又は複数を免疫細胞と接触させることと、本明細書中に記載される本発明による方法を行うことと、上記化学物質及び/又は生体物質が、分析されるCpG位置のメチル化を調整するか否かを検出することを含む、免疫細胞におけるCCR6及び/又はBLR1の発現を調整する化学物質及び/又は生体物質を同定する方法を提供する。方法は*in vitro*及び/又は*in vivo*で行うことができる。この態様では、本発明は、調節性T細胞に特異的な薬物療法及びそれぞれの医薬組成物の開発の出発点として用いることのできる、CCR6及び/又はBLR1の発現を変調する化学物質及び/又は生体物質を同定することを目的とする、「スクリーニング方法」と呼ばれる場合もある方法を包含する。本方法は、CCR6遺伝子及び/又はBLR1遺伝子が、NK細胞、記憶T細胞、記憶細胞傷害性T細胞、ナイーブB細胞又は記憶B細胞等の本明細書中に記載されるような免疫細胞の発生に中心的役割を果たすことが広く認められているという事実に基づく。したがって、CCR6及び/又はBLR1の発現を変調する因子は、自己免疫疾患又は同種移植レシピエントを治療するための興味深いツールでもある。CCR6及び/又はBLR1の発現を防止する因子であっても、BLR1⁺免疫細胞及び/又はCCR6⁺免疫細胞、好ましくはNK細胞、記憶T細胞、記憶細胞傷害性T細胞、ナイーブB細胞又は記憶B細胞が、強い抗腫瘍応答を防止することが示されている腫瘍患者の

40

50

治療にとっては興味深い。CCR6及び/又はBLR1の発現の安定した修飾をもたらすかかる因子は、本発明において記載される方法を用いて検出することができる。さらに、免疫細胞の分化を促進し、自己免疫障害及びアレルギー障害の緩和をもたらすことのできる因子を本発明の方法を用いて同定することができる。スクリーニング化合物として好適な化学物質及び/又は生体物質は当業者に既知であり、例えば小分子、ペプチド及びタンパク質、並びに抗体又はその断片が挙げられる。さらに、スクリーニングは商用の (commercial) 化合物ライブラリーを、最も有利にはロボット等の好適な自動装置とともに用いて行うことができる。化学物質及び/又は生体物質を同定する方法の好ましい1つの実施の形態では、上記物質は、分析されるCpG位置の少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%までの脱メチル化をもたらす。

10

【0052】

本発明による別の好ましい方法は、遺伝子CCR6及び/又はBLR1の異常発現と関連する疾患を診断する方法であって、本明細書中に記載される本発明による方法と、分析されるCpG位置が少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは95%まで脱メチル化されているか否かを検出することを含み、疾患が自己免疫疾患、同種移植レシピエントにおける有害作用、腫瘍性疾患、卵巣がん、慢性移植片対宿主病、アレルギー性喘息及びIPEX症候群から選択される、遺伝子CCR6及び/又はBLR1の異常発現と関連する疾患を診断する方法である。本方法は*in vitro*及び/又は*in vivo*で行うことができる。

20

【0053】

本発明の別の好ましい態様は、免疫細胞、例えば活性化T細胞、好ましくはナイーブT細胞又は記憶T細胞を、遺伝子CCR6及び/又はBLR1内のCpG位置のメチル化状態の分析に基づいて同定するためのキットであって、本発明による方法を行うための材料を含む、免疫細胞、例えば活性化T細胞、好ましくはナイーブT細胞又は記憶T細胞を、遺伝子CCR6及び/又はBLR1内のCpG位置のメチル化状態の分析に基づいて同定するためのキットに関する。本発明による好ましい1つの実施の形態では、キットは、a) パイサルファイト試薬と、b) 上述したCpG位置のメチル化分析のための材料とを含む。当業者はさらに、分析対象の部位、例えばアンプリコン888上に存在する全ての部位、及び/又はアンプリコン1037上に存在する全ての部位、及び/又は配列番号13によるアンプリコン(DMR)上に存在する全ての部位、又はそのオーソログCpG位置若しくはパラログCpG位置の量を最小限に抑えるために、CpG位置の特定のサブセットの材料を選択することが可能である。キットは診断キットであってもよい。

30

【0054】

本発明によるキットは好ましくは、以下のものを含有してもよい：1. 細胞サンプルを処理するための化学物質(パイサルファイト等)；2. 手順プロトコル；3. 特定の細胞型と関連するマーカーを検出する本発明によるオリゴヌクレオチドプローブ、アンプリコン、遮断剤又は伸長プライマー。オリゴヌクレオチドは、リアルタイムPCR(RT-PCR)又は一塩基伸長法(SBE)等の一般に利用可能な検出プラットフォーム上でシグナルを生成するように構成され得る。各々のシグナルは、サンプル中の特定の標的部位でのメチル化のレベルを示す。代案として、記載の核酸によるプローブをチップ上で使用するために作製することができる；4. 結果を処理するための生物情報学ツール。これ、例えばソフトウェアは、生データからシグナルを正規化するか、読み出し値の解釈のための結果の行列を含有するか、又は例えば細胞型の割合若しくは有効性予測を計算する様々なアルゴリズムを実行するものであり得る。

40

【0055】

本発明の更に別の好ましい態様は、免疫細胞、好ましくはナイーブT細胞又は記憶T細胞を検出及び/又は同定するための、上記に記載したものと同様の本発明によるオリゴマー若しくはアンプリコン又は本発明によるキットの使用に関する。

【0056】

本発明の更に別の好ましい態様は、CCR6及び/又はBLR1の発現に関連する疾患

50

、自己免疫疾患、同種移植レシピエントにおける有害作用、腫瘍性疾患、卵巣がん、慢性移植片対宿主病、アレルギー性喘息、多発性硬化症、炎症、炎症関節、関節リウマチ、乾癬性疾患、炎症性腸疾患、脳症、及びX連鎖免疫調整異常・多発性内分泌障害腸症候群（IPEX）、好ましくは関節リウマチ、乾癬性疾患、炎症性腸疾患、最も好ましくは関節リウマチを治療する方法に関する。該方法は、CCR6及び/又はBLR1の発現を用いて本発明によって特徴付けられる有効量の免疫細胞を、それを必要とする上記患者に投与することを含む。有効量の免疫細胞を投与する方法は文献に記載されており（例えば、Bharat A, Fields RC, Mohanakumar T. Regulatory T cell-mediated transplantation tolerance. *Immunol Res.* 2006; 33(3):195-212、June CH, Blazar BR. Clinical application of expanded CD4(+)25(+) cells. *Semin Immunol.* 2006 Jan 31、Khazaie K, von Boehmer H. The impact of CD4(+)CD25(+) Treg on tumor specific CD8(+) T cell cytotoxicity and cancer. *Semin Cancer Biol.* 2006 Apr;16(2):124-136. Epub 2006 Jan 26、及びそれらにおいて引用される参考文献）、当業者は本発明との関連でこれらの方法を適用することが可能である。「治療」という用語は、上記CCR6及び/又はBLR1の発現に関連した疾患の予防も含む。

10

【0057】

CCR6遺伝子座及び/又はBLR1遺伝子座内の領域のメチル化状態の分析は、細胞集団がCCR6遺伝子及び/又はBLR1遺伝子を安定に発現するか否かについての予測の改善を可能にする。したがって、本方法は、自己免疫疾患を患うか、又は同種移植を受けている患者への養子移入前に、*in vitro*で生成した又は展開させた免疫細胞の品質管理として用いることができる。CpGモチーフが或る程度まで脱メチル化されている場合に限り、これらの細胞がCCR6遺伝子及び/又はBLR1遺伝子を安定に発現し、しばらくした後でCCR6及び/又はBLR1の発現を失うことはないことが確信される。養子移入した細胞の調節性表現型の安定性に関するかかる「品質管理」は不可欠であり、CCR6遺伝子座及び/又はBLR1遺伝子座の上述の領域（複数も可）のメチル化状態の分析によってのみ達成することができる。

20

【0058】

本発明の1つの実施の形態では、本明細書中に記載されるように、CCR6遺伝子座及び/又はBLR1遺伝子座のメチル化状態をバイサルファイトシークエンシングによって分析し、顆粒球、単球、ナイーブT細胞又はナイーブ細胞傷害性T細胞と、NK細胞、記憶T細胞、記憶細胞傷害性細胞、ナイーブB細胞又は記憶B細胞との著しい違いが明らかになった。CCR6については、アンプリコン888及びアンプリコン1203（実施例を参照されたい）は通常（conventional）顆粒球、単球、ナイーブT細胞又はナイーブ細胞傷害性T細胞内で高度のメチル化（ほぼ100%）を示した（図8A、図8B及び図9）。アンプリコン1204（配列番号26；実施例を参照されたい）は、通常ナイーブT細胞及びナイーブ細胞傷害性T細胞内で高度のメチル化（ほぼ100%）を示した。アンプリコン1201及びアンプリコン1202（実施例を参照されたい）においては、脱メチル化プロセスはナイーブB細胞及び記憶B細胞のみで起こり、脱メチル化が無作為事象ではなく、規定の領域に限定されることが示される。特に、CCR6⁺CD4⁺記憶T細胞及びCD8⁺記憶T細胞内で高度の脱メチル化（ほぼ100%）を示す領域がCCR6遺伝子座において同定された（配列番号13を参照されたい）。

30

40

【0059】

BLR1遺伝子座と同様に、アンプリコン1037（実施例を参照されたい）は、通常顆粒球、単球、NK細胞、ナイーブT細胞、記憶細胞傷害性T細胞又はナイーブ細胞傷害性T細胞内で高度のメチル化（ほぼ100%）を示した（図8）。

【0060】

免疫細胞上の異なるケモカイン受容体の差次的発現により、リンパ系組織及び非リンパ系組織への及びそれらの内部での様々な機能的サブセット及び分化段階のエフェクター細胞及び調節性細胞の組織的な時空的分布が確実になる。移行性の表現型、とりわけT細胞及びB細胞の一部は、分化時に見かけ上永久的にインプリンティングされ、身体の特定の

50

コンパートメントへの記憶集団の選択的な送達（「ホーミング」）が可能となる。T細胞及びB細胞の子孫において安定したホーミング表現型がどのように獲得され、維持されるかについては十分に理解されていない。後成的機構、とりわけ本明細書中に記載されるようなDNA領域のメチル化/脱メチル化は転写調節に関与し、「遺伝性」メチル化シグネチャーのインプリンティングによる表現型変化の長期記憶をもたらすのに理想的に適している。本発明との関連では、本発明者らはこのため、差次的DNAメチル化が一次ヒトT細胞における安定したCCR6発現の獲得に関与し得るか否かを調査した。

【0061】

本発明との関連では、驚くべきことに、白血球の亜集団間で差次的にメチル化されるCCR6遺伝子座内の領域（配列番号13、DMR）が、DMH手法によって初めに同定され（非特許文献20）、選別されたヒト血球サブセットのメチル化状態をバイサルファイト変換を用いて分析することによって検証された。観察されたメチル化パターンは、様々なリンパ球サブセットにおけるCCR6の発現に概ね一致し、CD56⁺NK細胞及びNK T細胞、一部のCD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞、成熟B細胞及びCD4⁺Treg等のCCR6発現細胞が、部分的に又は更には完全に脱メチル化されたCCR6領域を示したが、この遺伝子座はCCR6発現を欠く休止期のCD14⁺単球及びCD15⁺顆粒球では完全にメチル化された。

10

【0062】

しかし、CD4⁺記憶T細胞及びCD8⁺記憶T細胞では、CCR6領域の脱メチル化は、表面上にCCR6タンパク質を発現するこれらのサブセットに限定され、CCR6調節におけるこの遺伝要素及びそのメチル化状態に対する役割が示唆される。

20

【0063】

本発明者らがTreg特異的転写因子FOXP3について近年実証することができたように（非特許文献19）、DNAの脱メチル化は通常、安定した遺伝性の発現パターンのシグネチャーとして見られる。

【0064】

他の多くの炎症性ケモカインの受容体と同様、CCR6は循環記憶T細胞の大部分で発現されるが、ナイーブT細胞には見られず（Liao F, Rabin RL, Smith CS, Sharma G, NutmanTB, Farber JM. CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subset of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3alpha. J Immunol. 1999; 162:186-194.、Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, et al. Chemokine receptor expressions and responsiveness of cord blood T cells. J Immunol. 2001;166:1659-1666）、CCR6発現がT細胞プライミング時に獲得されることが示唆される。CCR6発現は、IL-1、IL-6、TGF- β 及びTNF- α を含有するサイトカインカクテルを用いてナイーブCCR6⁺CD4⁺T細胞から新たに誘導することができる（非特許文献14、Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, et al. Chemokine receptor expressions and responsiveness of cord blood T cells. J Immunol. 2001;166:1659-1666）。

30

【0065】

CCR6⁺細胞の割合が誘導条件下での反復刺激によって増大するにもかかわらず、達成されるCCR6発現は、*ex vivo*で選別されたCCR6⁺記憶T細胞とは対照的に長期の培養時に安定であることが見出されず、CCR6領域の脱メチル化と関連もしていなかったため、これらはCCR6⁺記憶集団に特徴的であることが判明した。本発明者らがIL-17分泌CCR6⁺細胞及びIL-17非分泌CCR6⁺細胞におけるCCR6領域の脱メチル化について考えるところでは、記憶細胞におけるメチル化状態は機能的表現型から独立したものであり得る。まとめると、本発明によって提供されるデータから、CD4⁺T細胞において安定したCCR6発現プロファイルをインプリンティングするには、特異的なこれまでに知られていないシグナルが必要とされることが示唆される。

40

【0066】

最後に、DNAメチル化とCCR6の実際の発現との間の相関関係の欠如が、TCR刺

50

激後のCD4⁺記憶T細胞上のCCR6の下方調節について見出された。CCR6発現の一時的な喪失は、メチル化パターンの変化を伴わなかった。ここでも、CCR6がTCR刺激の除去及びIL-2の添加の後に急速に再発現されたことから、発現の変化は安定していなかった。しかしながら、この場合、CCR6下方調節がCCR6発現の転写調節ではなく(rather than)受容体の変調によるものであることを排除することはできない。これらのデータから、CCR6遺伝子座の重要な領域におけるDNAメチル化が、記憶T細胞における永久的にCCR6を発現する表現型の獲得に關与することが示される。

【0067】

CCR6遺伝子座における調節性遺伝子要素のメチル化状態がCCR6発現の長期安定性を決定付けるという結果を、人工DNA低メチル化を用いる実験によって更に裏付けた。T細胞刺激時のDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤5'-アザシチジンの適用は、外因性CCR6誘導サイトカインの非存在下であってもCCR6発現を増大させただけでなく、*in vitro*展開時に安定したCCR6発現を示すCCR6⁺細胞を生じ、これは以前に*in vitro*で誘導されたTregにおけるFoxp3発現についても観察された所見である(Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. Eur J Immunol. 2008; 38:1654-1663)。

10

【0068】

本明細書で、本発明者らは、CCR6を発現する記憶CD4⁺T細胞及び記憶CD8⁺T細胞、並びにCD25^{high}FOXp3⁺Tregにおいて非メチル化CpGモチーフを示すヒトCCR6遺伝子座の非コード領域を同定し、特徴付けた。CCR6⁺記憶CD4⁺T細胞でのCCR6発現は、サイトカイン誘導増殖時に安定であり、TCR刺激後に僅かに下方調節された。しかしながら、かかるCCR6下方調節は単に一時的なものであり、CCR6遺伝子座内の調節性領域の再メチル化を伴わなかった。一方で、炎症性サイトカインの存在下でのTCR刺激によるナイーブCD4⁺T細胞におけるCCR6発現の*in vitro*誘導は不安定なCCR6発現をもたらし、CCR6遺伝子座のメチル化状態における変化を示さなかった。特に、DNAメチル化阻害剤5'-アザシチジンによる処理は、CCR6発現の増大及び部分的な安定をもたらした。レポーター遺伝子プラスミドにクローニングすると、この差次的にメチル化される領域は、*ex vivo*で単離したCCR6⁺一次T細胞へのトランスフェクション後に構成的転写活性を示し、これがCCR6発現を調節するエンハンサー要素として働き得ることが実証された。

20

30

【0069】

要するに、本発明者らは、後成的機構によって安定したCCR6発現を媒介する、CCR6⁺T細胞において構成的転写活性を示すヒトCCR6遺伝子の非コード領域を同定した。本発明は、後成的機構がケモカイン受容体の転写活性を調節するだけでなく、さらに永久的な発現パターンのインプリンティングにおいて重要な役割を果たし、それにより分化した記憶T細胞に組織分布的記憶を与え、それらの長期にわたる移行挙動を形作るものであり得るという実験的証拠を初めて提供する。

【0070】

ここで、本発明を以下の実施例において添付の図面及び配列表を参照して更に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

40

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1】CCR6遺伝子内の好ましい非コード領域がヒトPBMCにおいて差次的メチル化を示すことを示す図である。A)ヒトCCR6遺伝子座内のCpGリッチ領域の局在化。Ensemblデータベース(GRCh37)から得られた推定CCR6転写産物のエクソン構造を、予測プロモーター領域(Genomatrix)、及びCCR6遺伝子座内の同定された差次的にメチル化される領域とともに表示した。CCR6転写産物における灰色の(gray shaded)ボックスは非コードエクソン領域を表し、黒色のボックスはコード領域を含有する。B)CCR6のDNAメチル化パターンを、プールしたPBMC(5人のドナー)から分析し、CD4⁺CD45RA⁺及びCD4⁺CD25^{high}に選別した。各

50

々の列は1つの血球サブセットを表し、各々の行は単一のCpG部位を表す。DNAメチル化はパイサルファイトシーケンシングを用いて測定した。CpGメチル化レベルを、薄灰色(0%のメチル化)から濃灰色(100%のメチル化)までのカラースケールに従って色分けした。

【図2】好ましいCCR6領域の脱メチル化が、ヒトのCD4細胞及びCD8細胞におけるCCR6発現と相関することを示す図である。A) CD4⁺CD25⁻リンパ球及びCD8⁺CD25⁻リンパ球に対するCCR6及びCD45RAの代表的なFACS染色。B) CD4⁺細胞及びCD8⁺細胞をPBMCから単離し、CCR6⁻ナイーブ細胞並びにCCR6⁻記憶細胞及びCCR6⁺記憶細胞に選別し、純度が95%を超えるサブセットを得た。選別したサブセットのメチル化分析を、1人の代表的なドナーについて示す。下のグラフは、CD4⁺T細胞については5人又は6人のドナー、CD8⁺T細胞については3人のドナーのそれぞれに由来するCpG部位からのメチル化の平均を示す。

【図3】CCR6⁺T細胞が*in vitro*展開時にCCR6を安定に発現し、脱メチル化されたCCR6領域を維持することを示す図である。A) CFSE標識CCR6⁺CD4⁺記憶T細胞を、TGF- β を添加した及び添加しない、組み換えヒトIL-7及びIL-15(どちらも10ng/ml)又は抗CD3/抗CD28 Dynabeads(商標)を含有する培地中で6日間培養し、CCR6発現について再分析した。4人のうち1人の代表的なドナーについて示す。B) CCR6⁺CD4⁺記憶T細胞を、中性条件下で又はTGF- β (10ng/ml)を添加して、抗CD3/抗CD28 Dynabeads(商標)で刺激した。6日後、CCR6発現を再分析した。灰色の曲線(曲線)はアイソタイプ対照を示す。C) CCR6領域のメチル化分析を、2人のドナーについてBと同様に6日間培養したCCR6⁺細胞について評価した。D) CCR6⁺細胞を中性条件下で抗CD3/抗CD28 Dynabeads(商標)で刺激し、6日目にCCR6⁻細胞及びCCR6⁺細胞に選別し、IL-2(1000U/ml)を含有する培地中で更に3日間培養した。データは2人のドナーの代表的なものである。

【図4】*in vitro*で誘導されたCCR6が不安定であり、好ましいCCR6領域の脱メチル化をもたらさないことを示す図である。A) ナイーブCD4⁺T細胞を、炎症誘発性サイトカイン及びTGF- β を添加せずに(白色のバー)又は添加して(黒色のバー)4日間刺激し、続いてIL-2(1000U/ml)中で培養した。6日~7日後、細胞をCCR6発現について分析した(n=21、左のグラフ)。サイトカインカクテルを添加して(+)及び添加せずに(-)培養したCD4⁺T細胞のメチル化プロファイルを右のグラフに示す(n=2)。B) Aと同様にサイトカインカクテルで刺激した細胞をCCR6⁺細胞及びCCR6⁻細胞に選別し(1人の代表的なドナーについて示す)、CCR6領域のメチル化について分析した。C) Dに示すように刺激した後のCCR6領域のCCR6発現(上)及びメチル化分析(下)(1人の代表的なドナー)。D) ナイーブCD4⁺T細胞をAと同様に培養し、左のパネルに示すように7日目、10日目及び24日目にCCR6発現について分析するか(n=4)、又は右のパネルに示すように、6日~7日後に1回目の刺激と同じ条件下で再刺激し、CCR6発現について分析した(n=11)。

【図4-2】図4のつづき

【図5】DNAメチル化の阻害が部分的に安定したCCR6発現をもたらすことを示す図である。A) ナイーブCD4⁺T細胞を、炎症誘発性サイトカイン及びTGF- β を添加せずに(n=18、左のパネル)又は添加して(n=6、右のパネル)刺激した。48時間後、Azaを更に48時間培地に添加した。CCR6の発現を6日目に分析した。B) ナイーブCD4⁺T細胞を、Azaを添加し、サイトカインを添加せずにAと同様に刺激した。6日後、細胞をそれらのCCR6発現に応じて選別し、中性条件下、Azaの非存在下で更に5日間再刺激し、続いてCCR6発現を再分析した。示したデータは、2回の独立して行った実験の代表的なものである。

【図6】好ましい差次的にメチル化されるCCR6領域が転写活性を有することを示す図である。全CD4⁺T細胞に、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の前にSV40最小プロ

モーターを含有する p G L 3 - プロモータープラスミド、又は C C R 6 領域を S V 4 0 プロモーターの前にクローニングした p G L 3 - C C R 6 をトランスフェクトした。ヌクレオフェクション後に、細胞を、I L - 2 を含有する培地中で培養するか（白色のバー）、又は P M A 及びイオノマイシンで 4 時間刺激した（灰色のバー）。ルシフェラーゼ相対発光量をウミシイタケルシフェラーゼ活性に対して正規化した。p G L 3 - プロモータープラスミドの値を 1 に設定し、x 倍の活性化を得た。バーは 5 人の異なるドナーに由来する細胞の平均ルシフェラーゼ活性を示し、ラインは単一値の分布域を示す。

【図 7】第 6 染色体上のヒト C C R 6 脱メチル化領域 (D M R) を、予測される因子結合部位とともに示す図である。

【図 8 A】種々の白血球細胞型 (B C S T 1 8 : 顆粒球、B C S T 1 9 : 単球、B C S T 2 0 : N K 細胞、B C S T 2 1 : ナイーブ T 細胞、B C S T 2 2 : 記憶 T 細胞、B C S T 2 3 : ナイーブ細胞傷害性 T 細胞、B C S T 2 4 : 記憶細胞傷害性 T 細胞、B C S T 2 5 : ナイーブ B 細胞、B C S T 2 6 : 記憶 B 細胞) における C C R 6 遺伝子及び B L R 1 遺伝子のプロモーター内の特定の C p G 位置のメチル化を示す図である。アンプリコン内の特定の位置を、アンプリコンの後の番号によって示す、すなわち A M P 8 8 8 : 7 1 はアンプリコン 8 8 8 の 7 1 位である。A m p 8 8 8 内の C p G 1 7 8 から始めて C p G 7 1 に至るまで、厳密に細胞型に依存するメチル化を観察することができる。ナイーブ T 細胞は、それらの C D 4 及び C D 8 の発現状態にかかわらずメチル化の増大を示す。対照的に、C C R 6 によって選別された記憶 T 細胞は、C C R 6 を発現しない画分及び C C R 6 を発現する画分によって規定される、中程度から完全にメチル化された画分に分別され、同時に測定された遺伝子座で完全に脱メチル化される。B L R 1 (アンプリコン 1 0 3 7) 内の高度のメチル化を顆粒球、単球、N K 細胞、ナイーブ T 細胞、ナイーブ細胞傷害性 T 細胞及び記憶細胞傷害性 T 細胞において見ることができる。

【図 8 B】種々のドナーの種々の白血球細胞型における C C R 6 遺伝子のプロモーター内の特定の C p G 位置のメチル化を示す図である。メチル化状態がドナーに依存しないことを観察することができる。

【図 9】C C R 6 遺伝子の様々な異なる位置での C C R 6 遺伝子座のメチル化分析を示す図である。この比較は、細胞傷害性 T 細胞及びヘルパー T 細胞以外の様々な白血球細胞型を含む。データは、A m p 1 2 0 1 において脱メチル化は記憶 B 細胞及びナイーブ B 細胞のみで観察されるが、C D 1 5 + 顆粒球、C D 1 4 + 単球、C D 5 6 + N k 細胞及び全ての T 細胞画分を含む他の全ての白血球画分は完全にメチル化されていることを示す。アンプリコン 8 8 8 においては、C D 4 T 細胞及び C D 8 T 細胞の両方の記憶画分に加えて、N K 細胞及び B 細胞が脱メチル化されている。

【図 1 0】ヒトゲノムの第 6 染色体上に表示した場合の図 1 及び図 2 に示される分析された様々なアンプリコンを示す図である。アンプリコンを示し、アンプリコン 1 つ当たりの C p G の数を丸の中に示す。

【図 1 1】2 人のドナーから分析し、C D 4 + C D 4 5 R A + 及び C D 4 + C D 4 5 R A - に選別した、C C R 6 に対する D N A メチル化パターン (アンプリコン 8 8 8) の再現性を示す図である。各々の列は 1 つの血球サブセットを表し、各々の行は単一の C p G 部位 (左側に示すアンプリコンにおける位置) を表す。D N A メチル化はバイサルファイトシーケンシングを用いて測定した。C p G メチル化レベル (左のバー) は、薄灰色 (0 % のメチル化) から濃灰色 (1 0 0 % のメチル化) までのカラースケールに従って色分けしている。

【図 1 2】種々の白血球細胞型 (B C S T 1 8 : 顆粒球、B C S T 1 9 : 単球、B C S T 2 0 : N K 細胞、B C S T 2 1 : ナイーブヘルパー T 細胞、B C S T 2 2 : 記憶ヘルパー T 細胞、B C S T 2 3 : ナイーブ細胞傷害性 T 細胞、B C S T 2 4 : 記憶細胞傷害性 T 細胞、B C S T 2 5 : ナイーブ B 細胞、B C S T 2 6 : 記憶 B 細胞、T N V E : ナイーブヘルパー T 細胞、T r e g : 調節性 T 細胞) における B L R 1 遺伝子のプロモーター領域内の特定の C p G 位置のメチル化レベルを示す図である。アンプリコン内の特定の位置を、アンプリコンの後の番号によって示す、すなわち A M P 1 0 3 7 : 2 3 はアンプリコン 1

10

20

30

40

50

037の23位である。Amp1037内のCpG23から始めてCpG360まで、厳密に細胞型に依存するメチル化を観察することができる。BLR1(アンプリコン1037)内の高度のメチル化を顆粒球、単球、NK細胞、ナイーブヘルパーT細胞、ナイーブ細胞傷害性T細胞及び記憶細胞傷害性T細胞において見ることができる。低度のメチル化を記憶ヘルパーT細胞、記憶B細胞及びナイーブB細胞、並びに調節性T細胞において見ることができる。

【0072】

配列番号1～配列番号12及び配列番号14～配列番号28は、実施例において使用されるプライマー及びプローブを示す。

【0073】

配列番号13は、本発明による遺伝子ccr6のプロモーター領域と重複する領域を示す。

【0074】

配列番号29はアンプリコン1037の配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0075】

以下の実施例は主に、遺伝子CCR6の好ましい脱メチル化領域の分析との関連で行ったが、これらの実験をCCR6及びBLR1に関して本明細書中に記載される遺伝子の他の関連領域のメチル化分析に容易に適合させることができることは、当業者には理解される。

【0076】

材料及び方法

細胞、抗体及びフローサイトメトリー

バフィーコート(DRK Blutspendedienst, Berlin, Germany)及び末梢血サンプルを、地方倫理委員会の承認に従ってインフォームドコンセント後に健常ドナーから得た。フィコールハイパック勾配(Sigma-Aldrich)を用いてPBMCを分離した。細胞表面抗原を、以下のモノクローナル抗体を用いて、単一パラメーター又は多重パラメーターの蛍光活性化細胞選別装置(FACS)分析によって分析した: PE-抗CCR6(11A9)及びAlexa700-抗CD4(RPA-T4)(どちらもBD Biosciences製)。APC-抗CD25(BC96)はebioscienceから購入した。Beckman Coulter製のPE-Cy5-抗CD8(B9.11)、PE-Cy5-抗CD56(N901)及びFITC-抗CD25(B1.49.9)。社内(DRFZ, Berlin)で生成された抗体: FITC-抗CD45RA(4G11)、Alexa405-抗CD4(TT1)及びAlexa405-抗CD3(OKT3)。一部の試験では、CCR6発現をビオチン化CCR6(11A9、BD Biosciences)を用いた間接免疫蛍光法によって検出し、続いてAPC結合ストレプトアビジン(SouthernBiotech)を用いて染色した。染色は非特異的な結合を遮断するために、0.5%ウシ血清アルブミンを含有するリン酸緩衝生理食塩水中で行った。FACSCanto II(BD Biosciences)をデータ取得に用い、FlowJoソフトウェア(Treestar)を使用して分析を行った。

【0077】

T細胞の単離及びFACS(商標)選別

抗CD4磁性ビーズ又は抗CD8磁性ビーズのそれぞれ及び自動MACS分離システム(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)をメーカーの使用説明書に従って用いて、全CD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞をPBMCから富化した。抗CD4、抗CD8、抗CD25、抗CD45RA及び抗CCR6を用いた続く染色の後、以下の細胞集団をFACS Aria(商標)又はFACS Diva(商標)細胞選別装置(BD Biosciences)で選別した: ナイーブCD4⁺T細胞(CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺)、CD4⁺Treg(CD4⁺CD25^{hi}ig^h)、CCR6⁻ナイーブCD4⁺T細胞、CCR6⁻記憶CD4⁺T細胞(CD4⁺CD25⁻CD45RA⁺)、CCR6⁺記憶CD

10

20

30

40

50

4⁺ T細胞、CCR6⁻ ナイーブCD8⁺ T細胞 (CD8⁺ CD25⁻ CD45RA⁺)、CCR6⁻ 記憶CD8⁺ T細胞 (CD8⁺ CD25⁻ CD45RA⁻) 及びCCR8⁺ 記憶CD8⁺ T細胞。再分析の際に、選別した細胞は常に98%を超える純度を示した。ex vivoで単離した細胞を、メチル化分析又はin vitro細胞培養(下記を参照されたい)のいずれかに使用した。

【0078】

ナイーブCD4⁺ T細胞及び記憶CD4⁺ T細胞のT細胞培養

in vitro培養アッセイについては、100 U/mlのペニシリン、100 µg/mlのストレプトマイシン、1 mMピルビン酸ナトリウム、非必須刺激(non-essential stimulation)、β-メルカプトエタノール及び5%ヒト血清を含有するRPMI 1640 GlutaMax培地(Invitrogen)(完全培地(CM))中で細胞を培養した。ナイーブCD4⁺ T細胞の刺激については、1 × 10⁵個の細胞を平底マイクロタイタープレート内で、抗CD3及び抗CD28でコーティングされた1 × 10⁵個の磁性ビーズ(Dynabeads, Invitrogen)とともに、20 ng/mlのIL-2 (R&D Systems)並びにIL-4、IL-12及びIFN-γに対する2 µg/mlの中和抗体を添加したCM(中性条件、抗体はBD Biosciences製)中で4日間培養し、続いて1000 U/mlのIL-2 (Proleukin, Chiron)を含有するCMに移した。ナイーブCD4⁺ 細胞でのCCR6の誘導については、以下のサイトカインを培養の初めに添加した: 10 ng/mlのTGF-β、10 ng/mlのIL-6、10 ng/mlのIL-1、10 ng/mlのTNF-α (R&D)。一部の実験では、細胞の刺激を同じ条件下で最大3回繰り返した。メチル化阻害薬5'-アザシチジン(Aza, Sigma-Aldrich)によるナイーブCD4⁺ 細胞でのCCR6の誘導については、48時間の培養後に5 µMのAzaを添加した。

【0079】

記憶CD4⁺ CCR6⁺ 細胞及び記憶CD4⁺ CCR6⁻ 細胞を、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)を用いて染色し、上記に記載されるような磁性ビーズ、又は10 ng/mlのIL-7及び10 ng/mlのIL-15 (R&D Systems)を含有するCM中で培養した。4日後、Dynabeadsを含有する培養物のみを、1000 U/mlのIL-2 (Proleukin, Chiron)を含有するCMに移した。培養の終了時に、細胞をフローサイトメトリーによって分析し、メチル化分析(下記を参照されたい)に使用した。

【0080】

ルシフェラーゼレポートアッセイ

ヒトCCR6遺伝子座の差次的にメチル化される領域を、鋳型としてヒトcDNA、及び以下のプライマーを用いたPCRによって増幅した: (A) 5'-GACTACGCGTCAGTAAGGGGGAGCCACTG-3' (配列番号11)、(B) 5'-GACTAGATCTCAAGGAAGCAGCTGACGA-3' (配列番号12)。増幅された501 bpの要素を、MluI及びBglIIによってpGL3プロモーターベクター(Promega)に、最小SV40プロモーターの前にクローニングし、pGL3-CCR6を生成した。クローニングした領域のシーケンシングから、Ensemblに保管されたヒトゲノムのCCR6領域配列との100%の同一性が明らかになった。

【0081】

MACSによって選別された全CD4⁺ T細胞を、2.5 µgのpGL3プロモーターベクター又はpGL3-CCR6ベクターを用いてトランスフェクトした。合成ウミシイタケルシフェラーゼレポートベクター(pRL-TK, Promega)(1.5 µg)を、トランスフェクション効率の内部対照として使用した。ヌクレオフェクション(Lonza)によるトランスフェクションの4時間後に、細胞をIL-2を含有するRPMI 1640培地中で培養するか、又はPMA(10 ng/ml, Sigma)及びイオノマイシン(500 ng/ml, Sigma)で4時間刺激した。48時間の培養後に細胞を採取し、デュアルルシフェラーゼアッセイシステム(Promega)を用いてルシフェラーゼ活性を測定した

。データをウミシイタケルシフェラーゼ活性に対して正規化した。

【 0 0 8 2 】

プライマー、DNA調製、バイサルファイト変換、PCR及びシーケンシング

プライマーをバイサルファイト特異的PCR及びシーケンシング反応に使用した。ゲノムDNAを、選別されたT細胞サブセットからDNeasy組織キット(Qiagen)を用いて、培養動物細胞用のプロトコルに従って単離した。ゲノムDNAのバイサルファイト処理を、これまでに記載されているように行った(Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphitebased cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996;24:5064-5066.)。PCRを、1×PCRバッファー、1UのTaq DNAポリメラーゼ(Qiagen)、200µM dNTP、各12.5pmolのフォワードプライマー及びリバースプライマー、並びに7ngのバイサルファイト処理したゲノムDNAを含有する25µLの最終容量で、95で15分間、並びに95で1分間、55で45秒間及び72で1分間の40サイクル、及び72で10分間の最終伸長工程で行った。PCR産物をExoSAP-IT(USB Corp.)を用いて精製し、PCRプライマー及びABI Big Dye Terminator v1.1ケミストリ(Applied Biosystems)を適用してシーケンシングし、続いてABI 3100遺伝子分析装置でキャピラリー電気泳動を行った。ESMEを用いてABI 1ファイルを解釈した(Lewin J, SchmittAO, Adorjan P, Hildmann T, Piepenbrock C. Quantitative DNA methylation analysis basedon four-dye trace data from direct sequencing of PCR amplicates. Bioinformatics. 2004; 20:3005-3012.)。

10

20

【 0 0 8 3 】

好ましいプライマー及びプローブの例は以下の通りである：

アンプリコン888の増幅プライマー(バイサルファイトシーケンシング用)：

フォワード：(888p) GTTAGTGGGGTTGAGTAGGATA (配列番号1)

リバース：(888o) AAAACCCCTAAATCACAAACTA (配列番号2)

アンプリコン1201の増幅プライマー(バイサルファイトシーケンシング用)：

1201q TTGGTAATGTTTGTGGAAAG (配列番号3)

1201r CTCCTAAATCCCTCAACATCTA (配列番号4)

アンプリコン1202の増幅プライマー(バイサルファイトシーケンシング用)：

1202o AAACTCACAACTTCCTTCACTC (配列番号5)

1202p AAGGGTAGTGTTAGAGGGTATTT (配列番号6)

アンプリコン1203の増幅プライマー(バイサルファイトシーケンシング用)：

1203o CACCTAATCTTCAATAACAACA (配列番号7)

1203p GGTATAGTGTATTGGGAAGTGG (配列番号8)

アンプリコン1204の増幅プライマー(バイサルファイトシーケンシング用)：

1204r TCTCTTTTCTTATCACCTTTACCA (配列番号27)

1204q TGTTTTTAGGAAGGAAGTTTG (配列番号28)

アンプリコン1037の増幅プライマー(配列番号29；バイサルファイトシーケンシング用)：

1037o CCTTATCTACTTCTTCCACAAAAT (配列番号9)

1037p AGTGATGAGTTGTGAGGTAGGT (配列番号10)

DMRの増幅プライマー(バイサルファイトシーケンシング用)：

CpG(メチル化)特異的PCRシステム

フォワードプライマー GAGATGATAAGGGGTGC (配列番号14)

リバースプライマー ACACCTCACCTAAATCG (配列番号15)

プローブ HEX-TTTAGGC GTGAGGACGTGGAGTT-BHQ1 (配列番号16)

TpG(脱メチル化)特異的PCRシステム

30

40

50

フォワードプライマー G A G A T G A T A A G G G G T G T (配列番号 17)
 リバースプライマー A C C A C A C C T C A C C T A A A T C A (配列番号 18)
 プローブ F A M - A T T T A G G T G T G A G G A T G T G G A G T T T A G G G - B
 H Q 1 (配列番号 19)
 【 0084 】

CCR6 DMRアッセイのゲノム標的領域は太字で示し、CpGには下線を引いている：

G C C A G T G G G G T T G A G C A G G A C A C A G G T C C T G C T G T G T C T A
 G C T G G T T C C C C A G A G A G A T G A T A A G G G G T G C G C T C C A G C T
 T C T C A G G C T C A C T C A G G C G T G A G G A C G T G G A G C T C A G G G C
 T C T G C A G G A A G G A G C G A C C C A G G T G A G G T G T G G T C A A G A T
 A G A G C A G A G C T G G G C A G C G G G C A G T G G A G C C T C G T G G G C A
 G C C T G G G G G T G G G G A G G C A C A G T G C A C T G G G A A G T G G A G A
 A A G T G T G A G T C C A T C A G G C T G G C T G A G A A T T G A T C A C G A A
 C C T A T T G T C T G T A A A A C T T T T G T T A T T T C C T G A G A C G T G G
 T T C A C A G C A A C C C A G G T G C G A A C A G C C T T G T G A T T C T A G G
 G T T C T (配列番号 13)

【 0085 】

コンピュータによる分析

推定転写因子結合部位の予測については、MatInspectorツール (Genomatix) を用いた。

【 0086 】

統計

データは平均 ± SDとして表す。群間差を、指定のマンホイットニー検定又はウィルコクソン順位検定を用いて評価した。0.05未満のP値は有意であるとみなした。

【 0087 】

実施例 1

CCR6遺伝子座内の非コード領域は、CCR6発現と相関して差次的メチル化を示す

本発明者らは以前に、差次的メチル化ハイブリダイゼーション (DMH) 技法を用いて通常のナイーブCD4⁺T細胞とCD25^{high}CD4⁺Tregとを比較することによって、ヒトTregにおける後成的に調節される遺伝子のスクリーニングを行った (非特許文献20)。このDMHスクリーニングでは、CCR6が差次的にメチル化される遺伝子の一つであることが分かった。好ましい差次的にメチル化される領域は、報告された2つのCCR6転写産物の上流に位置し、推定CCR6プロモーターと重複する (図1A)。DMHのデータを確認するために、本発明者らは、ヒト末梢血から単離された通常のナイーブCD45RA⁺CD4⁺T細胞及びCD25^{high}CD4⁺Tregに由来するゲノムDNAを用いてパイサルファイトシーケンシングを行った。CD25^{high}CD4⁺Tregは、大部分が脱メチル化されたCCR6領域を示したが (平均メチル化率23.8%)、通常のナイーブT細胞はほぼ完全にメチル化されていた (平均メチル化率81%) (図1B)。

【 0088 】

Treg (Kleinewietfeld M, Puentes F, Borsellino G, Battistini L, Rotzschke O, Falk K. CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25+CD4+ T-cell subset. Blood. 2005;105:2877-2886.) に加えて、CCR6の発現はCD4⁺記憶T細胞及びCD8⁺記憶T細胞の両方について報告されている。CCR6遺伝子座の観察された脱メチル化が、ex vivoでCCR6を発現する細胞の画分に限定されるか否かを理解するために、CD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞のサブセットを、CCR6及びCD45RAの発現に従って選別し (図2A)、CCR6遺伝子座のパイサルファイトシーケンシングによって分析した。CCR6発現を欠くナイーブCD45RA⁺CD4⁺T細胞、及びCCR6⁻CD45RA⁻CD4⁺記憶T細胞の両方が強くメ

10

20

30

40

50

チル化されたが、CCR6を発現するCD4⁺記憶T細胞は、分析したCCR6領域のほぼ完全な脱メチル化を示した(図2B)。CD8⁺T細胞は全体的に低いDNAメチル化レベルを示したが、CCR6⁺CD8⁺記憶T細胞は明らかにCCR6⁻CD8⁺記憶T細胞と比較して低いメチル化CCR6領域を示した(図2B)。これらのデータに一致して、休止期のCD14⁺単球及びCD15⁺顆粒球等のCCR6発現を欠く末梢白血球サブセットは、ほぼ完全にメチル化されたCCR6領域を示したが(平均メチル化率84%超)、CCR6を発現するCD56⁺NK細胞及びNK細胞並びに成熟B細胞は、この部位で完全に脱メチル化されていた。まとめると、本発明者らのデータは、CCR6発現がヒト白血球においてCCR6領域の脱メチル化と相関することを示している。

【0089】

CCR6⁺T細胞は、*in vitro*展開時にCCR6を安定に発現し、脱メチル化されたCCR6領域を維持する

CD4⁺記憶T細胞上のCCR6発現及び分析したCCR6領域の対応するメチル化パターンの両方が、細胞分裂時に安定しているかを調べるために、選別されたCCR6⁺CD25⁻CD45RA⁻CD4⁺T細胞をCFSEで標識し、記憶細胞の恒常的代謝回転を媒介するサイトカインを用いて、又はTCRによって誘発することによって刺激した。以前の報告(Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J Exp Med*. 2001;194:1711-1719)と一致して、記憶T細胞がIL-7及びIL-15等の恒常性サイトカインの存在下で増殖し、多数の細胞分裂の後であっても全ての増殖細胞が高レベルのCCR6発現を維持していた(図3A)。TCR刺激はCCR6発現の下方調節をもたらした(Sallusto F, Kremmer E, Palermo B, et al. Switch in chemokine receptorexpression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *Eur J Immunol*. 1999;29:2037-2045)、これはTGF- β によって阻害され、IL-4によって促進された(図3A及び図3B)。しかしながら、試験した全ての刺激条件下で、CCR6領域のメチル化状態は変化しないままであり、同等の低レベルのメチル化を示した(図3C)。重要なことには、TCR刺激の際にCCR6発現を失ったCCR6⁻/^{low}細胞が、TCR刺激の非存在下での培養後にCCR6を急速に再発現したため、TCRによって誘導されるCCR6発現の下方調節は一時的でしかなかった(図3D)。このため、CCR6領域の脱メチル化はCCR6発現の長期安定性に関連する。

【0090】

CCR6発現の*in vitro*誘導は不安定であり、CCR6領域の脱メチル化をもたらさない

CCR6発現は、炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6、IL-1)+TGF- β のカクテルの存在下での活性化によって、ナイーブCD4⁺T細胞の画分に対して*in vitro*で誘導することができる。本発明者らは、この新たなCCR6発現の誘導が、CCR6領域の脱メチル化と関連しているか否かについて分析した。ナイーブCD4⁺T細胞を、炎症性サイトカイン及びTGF- β の存在下で抗CD3/抗CD28 Dynabeads(商標)で刺激した。*in vitro*培養の6日目に、サイトカインの非存在下で刺激したT細胞と比較して有意に高いT細胞の画分がCCR6を発現した(図4A)。しかしながら、両方の細胞集団がCCR6領域内でほぼ完全にメチル化され、未刺激ナイーブT細胞に対して違いを示さなかった(図1B及び図2B)。CCR6⁻細胞及びCCR6⁺細胞への選別後も、新たに誘導されたCCR6⁺細胞においてCCR6領域の選択的な脱メチル化は観察することができなかった(図4B)。サイトカインカクテルの存在下での反復刺激はCCR6⁺細胞の頻度を更に増大したが、CCR6領域の脱メチル化は依然として検出可能ではなく(図4C及び図4D)、炎症性サイトカインのカクテルがCCR6発現の誘導には十分であるが、CCR6遺伝子座の脱メチル化には十分でないことが示された。*ex vivo*で単離したCD4⁺記憶T細胞とは対照的に、炎症性サイトカインの存在下でのTCR刺激によるナイーブT細胞におけるCCR6の新たな誘

10

20

30

40

50

導は、一時的なCCR6発現しかもたらず、ほぼ全ての細胞が誘導性サイトカインの非存在下での長期の*in vitro*培養の際にCCR6発現を失った(図4D)。

【0091】

DNAメチル化の阻害は培養ナイーブT細胞において部分的に安定したCCR6発現をもたらす

DNAメチル化状態は、5'-アザシチジン(Aza)等のDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤の存在下でのDNA複製の誘導によって薬理的に操作することができる。分析されるCCR6領域の脱メチル化が、CCR6発現の安定化に關与するか否かを更に調べるために、本発明者らは、ナイーブCD4⁺T細胞をAzaの存在下で抗CD3及び抗CD28 Dynabeads(商標)を用いて活性化した。驚くべきことに、Aza 10
処理は、外因性サイトカインの非存在下であっても相当な割合の細胞においてCCR6発現を誘導し、これらのAza処理細胞においてCCR6領域の明らかな脱メチル化を検出することができた(図5A)。興味深いことに、Azaによって誘導されたCCR6⁺細胞を選別し、Azaの非存在下で中性条件下にて再刺激すると、CCR6発現の顕著な安定性がこれらの細胞において観察され、CCR6遺伝子座の脱メチル化がT細胞において安定したケモカイン受容体の発現を制御することが更に示された。

【0092】

CCR6遺伝子座の差次的にメチル化される要素は転写活性を有する

CCR6遺伝子座の好ましい差次的にメチル化される領域は、2つの予測CCR6転写産物の444/446塩基上流に位置する(図1A)。CCR6領域は、コンピュータにより予測されたプロモーター領域と部分的に重複する。転写開始部位のようなプロモーターに典型的な要素はCCR6領域においては検出されなかったが、転写調節因子PPAR、GATA、AHR、ETS1又はRXR(それらの一部、例えばETS1はメチル化依存的にそれらの標的配列に結合する)の推定結合部位が検出された(Maier H, Colbert J, Fitzsimmons D, Clark DR, Hagman J. Activation of the early B-cell-specific mb-1 (Ig-alpha) gene by Pax-5 is dependent on an unmethylated Ets binding site. Mol Cell Biol. 2003;23:1946-1960, and own unpublished observations)。

【0093】

CCR6発現の転写調節に対するCCR6領域の役割を分析するために、本発明者らはこの要素を、転写活性を有するエンハンサー要素の検出を可能にするSV40最小プロモーターを含有するルシフェラーゼレポーターベクターにクローニングした。末梢血から単離された全CD4⁺T細胞へのトランスフェクション後、ルシフェラーゼレポーター構築物を含有するCCR6領域の転写活性は、空の対照ベクターと比較して約2.4倍増大した(図6)。興味深いことに、PMA+イオノマイシンによるトランスフェクトしたCD4⁺T細胞の刺激が同等の結果をもたらしたため、CCR6領域の転写活性は細胞の活性化状態に依存しなかった。これらの発見から、CCR6遺伝子座の差次的にメチル化される領域が、TCR媒介シグナルとは独立してエンハンサー活性を示すことが実証され、この要素が記憶T細胞における安定したCCR6発現の維持に機能的に關与することが示唆される。

【0094】

実施例2

種々のT細胞種を2人の独立したドナーから精製し、FACS選別した。細胞傷害性T細胞及びヘルパーT細胞の分別のためのマーカーとしてCD4及びCD8を用いて、細胞を分離した。次いで、CD45RAを用いてこれらの集団をナイーブ細胞集団及び記憶細胞集団に更に分離した。記憶集団をCCR6陽性集団及びCCR6陰性集団に更に分離した。結果を以下の表1にまとめる。

【0095】

表1：本発明による遺伝子のメチル化パターン(図8を参照されたい)

10

20

30

40

【表 1】

Cell type 細胞型	BLR-1 (アンプリコン1037) のメチル化、図8	CCR-6 (アンプリコン888) のメチル化、図8
Granulocytes 顆粒球	+	+
Monocytes 単球	+	+
NK-cells NK細胞	-	-
Naïve T-cells ナイーブT細胞	+	+
Memory T-cells 記憶T細胞	-	-
Naïve cytotoxic T-cells ナイーブ細胞傷害性T細胞	+	+
Memory cytotoxic T-cells 記憶細胞傷害性T細胞	-	-
Naïve B-cells ナイーブB細胞	-	-
Memory B-cells 記憶B細胞	-	-

10

【0096】

図11に示されるパイサルファイトシーケンシングデータを確認するために、アンプリコン888におけるCCR6のCpG位置71、98、106及び135を対象にするqPCR分析にサンプルを更に供した。使用したメチル化特異的な(「CpG」特異的)プライマー対を配列番号14/配列番号15に示し、対応するプローブを配列番号16に示す。脱メチル化された配列(「TpG」特異的)を検出するために、配列番号17/配列番号18に示すプライマー対を、配列番号19のプローブとともに使用した。結果を表2にまとめる。図11に示されるパイサルファイトシーケンシング結果を、qPCRアッセイにおいて確認することができた。

20

【0097】

表2: 2人のドナーで分析し、CD4⁺CD45RA⁺及びCD4⁺CD45RA⁻に選別したCCR6のDNAメチル化パターン(アンプリコン888)を示す

【表 2】

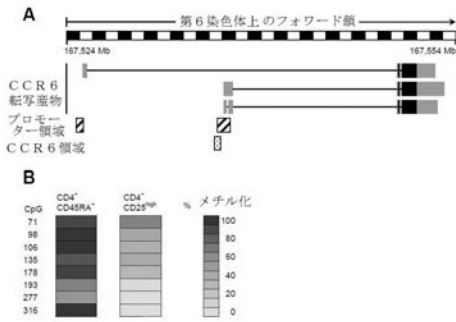
Samples サンプル	データ分析						モード: 二次導関数	
	「TpG」特異的			「CpG」特異的				
内容	CP	S.D.	コピー数	CP	S.D.	コピー数	"TpG". [%]	"CpG". [%]
12.500 Copies	25,29	0,02	13968,04	25,65	0,03	12676,28	脱メチル化	メチル化.
2.500 Copies	27,92	0,01	2265,25	28,00	0,01	2583,61		
500 Copies	30,27	0,15	449,02	30,33	0,09	532,49		
100 Copies	32,55	0,09	92,37	33,15	0,01	78,44		
20 Copies	34,61	0,03	22,26	34,89	0,23	24,33		

30

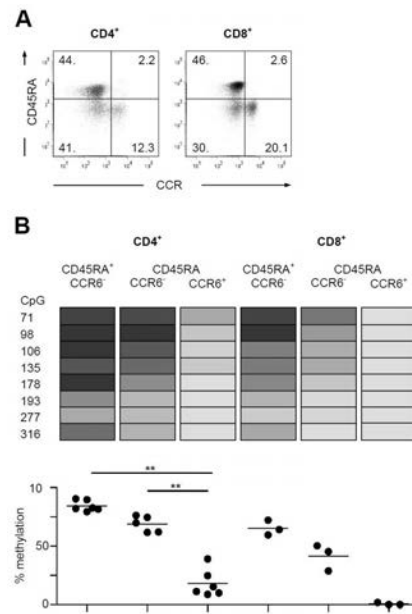
CD4+CD45RA+CCR6- Donor #1	33,95	0,50	36,44	27,15	0,18	4615,12	0,8	99,2
CD4+CD45RA-CCR6+ Donor #1	27,24	0,38	3697,32	27,92	0,16	2721,32	57,6	42,4
CD4+CD45RA-CCR6- Donor #1	31,21	0,45	242,03	26,73	0,12	6126,05	3,8	96,2
CD4+CD45RA+CCR6- Donor #2	33,84	0,32	38,41	26,47	0,24	7338,90	0,5	99,5
CD4+CD45RA-CCR6+ Donor #2	29,07	0,24	1039,11	29,59	0,06	873,96	54,3	45,7
CD4+CD45RA-CCR6- Donor #2	34,50	0,23	24,11	27,67	0,10	3228,76	0,7	99,3

40

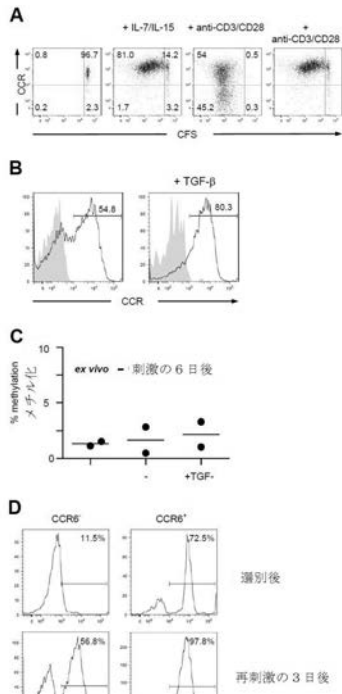
【 図 1 】



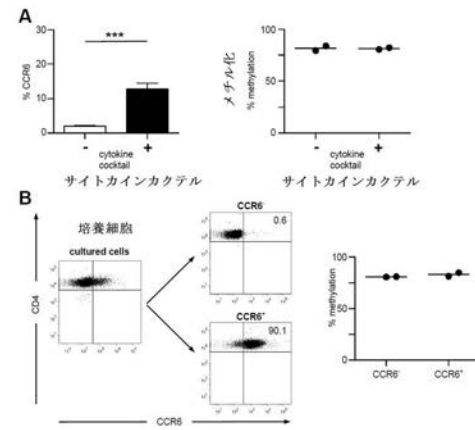
【 図 2 】



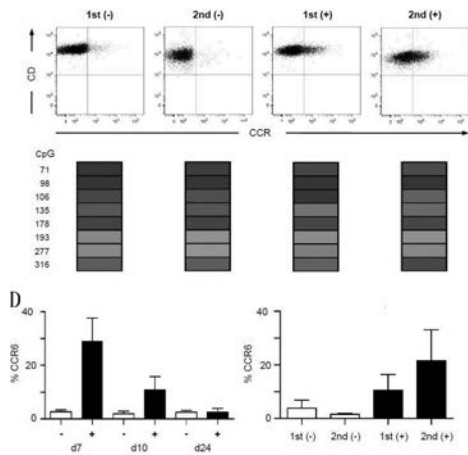
【 図 3 】



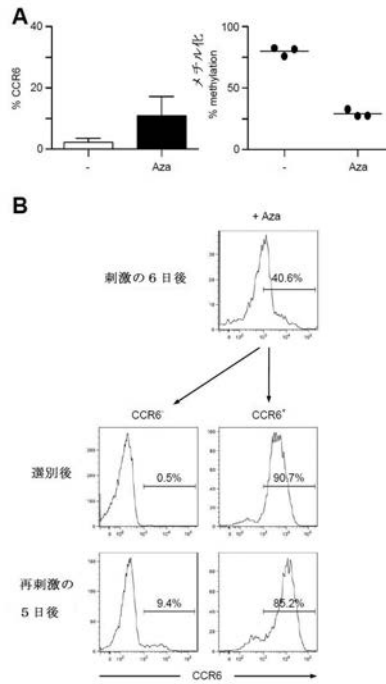
【 図 4 】



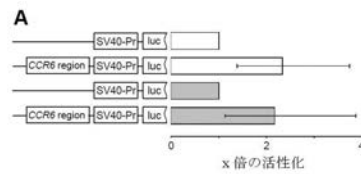
【 図 4 - 2 】



【 図 5 】



【 図 6 】

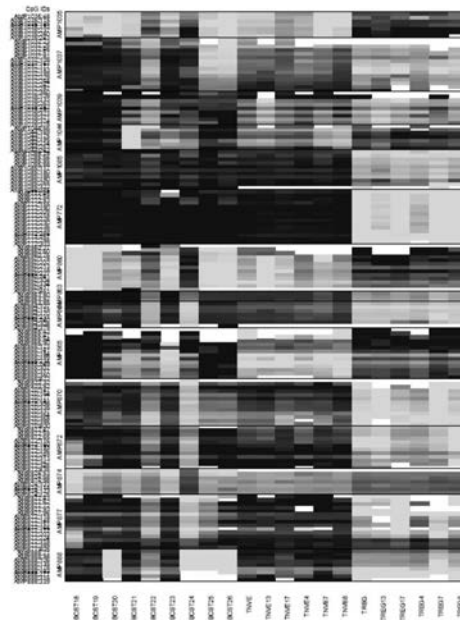


【 図 7 】

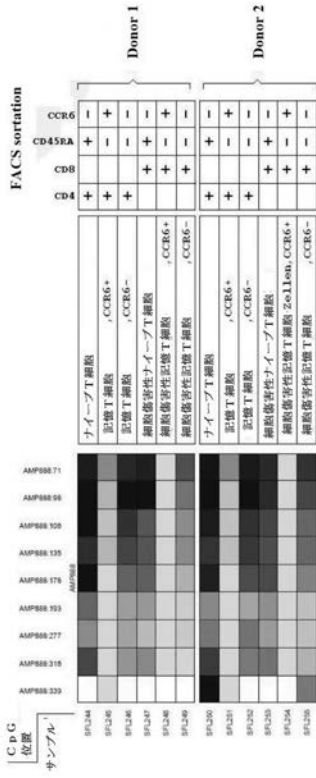
human CCR6 Amplicon
 Chromosome 6: 167,535,449 – 167,535,813

GCCAGTGGGGTTGAGCAGGACACAGGCTCTGCTGTGCTAGCTGGTCCCCAGAGAGATGATAAGG
 RXR 98 106 GATA
 GGTCCTCCAGCTTCTCAGGCTCCTCAGCGGAGGCTGAGCTCAGGCTCAGGCTCTGAGGAGG
 AP1* AHRR 178 193 ETS1
 ACCGACCCAGGTGAGGTGGTCAAGATAGAGCAGAGCTGGCAGGGCAGTGGAGCCCTCGAGG
 RXR GATA AHRR
 CAGCCTGGCGGTGGGAGCAGAGTGCCTGGGAAGGGAGAAAAGTGTGAGTCCATCAGGCTGGCT
 SPI1 277 RBP2 ETS1 RXR 316
 GAGAAATTGATCCGAAACCTATTGCTGTAAAACCTTAGTATTCCCTGAGAGCGGGTTCACAGCAA
 FKHD* NFAT* ETS1*
 CCCAGGTGCGAACAGCCTTGTGATTCTAGGGTTCT
 PPAR

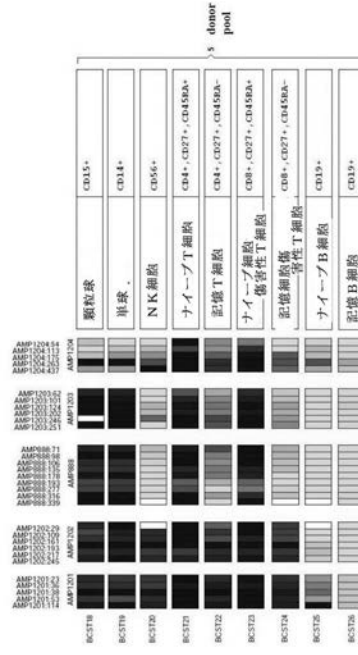
【 図 8 A 】



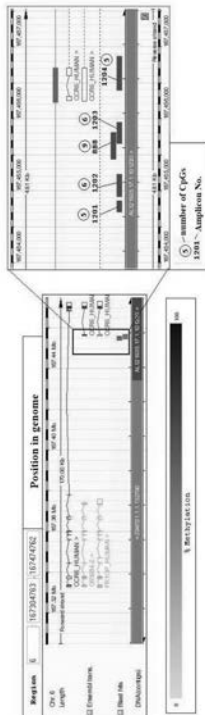
【 8 B 】



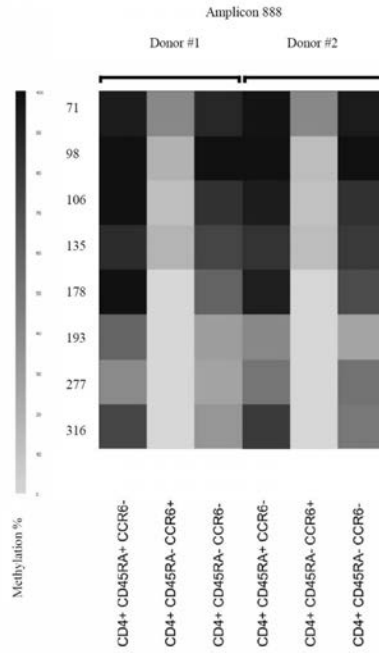
【 9 】



【 1 0 】



【 1 1 】



【 図 1 2 】



【 配列表 】

2016208977000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成28年6月22日(2016.6.22)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

哺乳動物のNK細胞、記憶T細胞、記憶細胞傷害性T細胞、ナイーブB細胞及び/又は記憶B細胞を同定する方法であって、遺伝子ccr6の配列番号1及び配列番号2のプライマー対によって増幅されるアンプリコン888及び/又は配列番号7及び配列番号8のプライマー対によって増幅されるアンプリコン1203から選択されるアンプリコン内の少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態を分析することを含み、非活性化T細胞と比較した場合の脱メチル化状態が、NK細胞、記憶T細胞、記憶細胞傷害性T細胞、ナイーブB細胞及び/又は記憶B細胞の指標となる、方法。

【 請求項 2 】

遺伝子ccr6における脱メチル化が、CCR6⁺CD4⁺T細胞若しくはCCR6⁺CD8⁺T細胞、又は安定に活性化されたCCR6⁺CD4⁺T細胞若しくはCCR6⁺CD8⁺T細胞から選択される細胞の指標となり、前記方法が任意でCD3⁺細胞を単離する工程を更に含む、請求項1に記載の方法。

【 請求項 3 】

メチル化状態の分析が、メチル化特異的酵素消化、バイサルファイトシーケンシング

、プロモーターメチル化、CpG島メチル化、メチル化特異的PCR、Heavy Methyl、Methylight、又はMs-SNuPEから選択される方法を含む、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

サンプルのプールを、少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態について分析する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

遺伝子CCR6のメチル化状態の分析が、配列番号1及び配列番号2、並びに配列番号7及び配列番号8から選択されるプライマー対のうち少なくとも1つを用いた増幅を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

メチル化状態の分析が、配列番号1及び配列番号2のプライマー対によって増幅されるアンプリコン888の71位、98位、106位、135位、178位、193位、277位、316位及び339位、配列番号7及び配列番号8のプライマー対によって増幅されるアンプリコン1203の62位、101位、124位、202位、246位及び251位からなる群から選択される少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態を分析することを含む、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

哺乳動物がマウス、ラット、サル又はヒトである、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

非活性化T細胞におけるCCR6の発現を調整する化学物質及び/又は生体物質を同定するin vitro方法であって、前記化学物質及び/又は生体物質の1つ又は複数を免疫細胞と接触させることと、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法を行うことと、前記化学物質及び/又は生体物質が、分析されるCpG位置のメチル化を調整するか否かを検出することを含む、方法。

【請求項9】

物質が、分析されるCpG位置の少なくとも80%、又は90%、又は95%までの脱メチル化をもたらす、請求項8に記載の化学物質及び/又は生体物質を同定する方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)	C 1 2 N	5/0783	
C 1 2 N	5/0781	(2010.01)	C 1 2 N	5/0781	
C 1 2 N	5/078	(2010.01)	C 1 2 N	5/078	

专利名称(译)	基因ccr6和blr1的DNA甲基化分析检测免疫细胞，特别是t细胞		
公开(公告)号	JP2016208977A	公开(公告)日	2016-12-15
申请号	JP2016106050	申请日	2016-05-27
申请(专利权)人(译)	EPION塞维利亚有限公司		
[标]发明人	オレクスヴェン		
发明人	オレク,スヴェン		
IPC分类号	C12Q1/06 C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/48 G01N33/53 C12N5/0783 C12N5/0781 C12N5/078		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/154 C12Q1/686 C12Q1/6869 C12Q1/6876 C12Q2523/125		
FI分类号	C12Q1/06.ZNA C12Q1/68.A C12N15/00.A G01N33/48.M G01N33/53.M C12N5/0783 C12N5/0781 C12N5/078 C12Q1/686.C C12Q1/686.Z C12Q1/6869.C C12Q1/6869.Z C12Q1/6876.C C12Q1/6876.Z C12Q1/6883.C C12Q1/6883.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/CA17 2G045/CA18 2G045/CA19 2G045/CA25 2G045/DA13 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB06 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QS34 4B063/QX02 4B065/AA90X 4B065/AC20 4B065/CA46		
代理人(译)	庄司隆		
优先权	61/329229 2010-04-29 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供诊断哺乳动物的某些免疫细胞的方法，特别是体外方法，其包括分析基因CCR6和/或BLR1或其直系同源基因或旁系同源基因中至少一个CpG位置的甲基化状态。提供识别方法。 解决方案：这种鉴定所述哺乳动物的免疫细胞，T细胞和/或B细胞或活化T细胞的方法的特征在于所述基因ccr6和/或blr1或所述直系同源基因或所述旁系同源基因或T细胞和/或B细胞，或活化的T细胞，包括分析哺乳动物的至少一个CpG位置的甲基化状态。 【选择图】无

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公開特許公報 (A)	(11) 特許出願公開番号 特開2016-208977 (P2016-208977A)
	(43) 公開日	平成28年12月15日 (2016. 12. 15)
(5) Int. Cl.	F I	ターマコード (参考)
C 1 2 Q 1 / 0 6 (2006. 01)	C 1 2 Q 1 / 0 6	Z N A 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1 / 6 8 (2006. 01)	C 1 2 Q 1 / 6 8	A 4 B 0 6 3
C 1 2 N 1 5 / 0 9 (2006. 01)	C 1 2 N 1 5 / 0 9	A 4 B 0 6 5
G 0 1 N 3 3 / 4 8 (2006. 01)	G 0 1 N 3 3 / 4 8	M
G 0 1 N 3 3 / 5 3 (2006. 01)	G 0 1 N 3 3 / 5 3	M
	審査請求 有	請求項の数 9 O L (全 34 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2016-106050 (P2016-106050)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成28年5月27日 (2016. 5. 27)	エピオンティス ゲーエムベーハー
(62) 分割の表示	特願2013-506882 (P2013-506882) の分割	ドイツ, 1 2 4 8 9 ベルリン, ルードア ー ショッセ 2 9
原出願日	平成23年4月29日 (2011. 4. 29)	(74) 代理人
(31) 優先権主張番号	61/329, 229	弁理士 庄司 隆
(32) 優先日	平成22年4月29日 (2010. 4. 29)	オレク, スヴェン
(33) 優先権主張国	米国 (US)	ドイツ, 1 2 2 0 7 ストラッセ 1 6
		F ターム (参考)
		2G045 AA24 CA17 CA18 CA19 CA25 DA13 FB01 FB02 FB06 4B063 QA19 QA20 QQ03 QQ42 QQ52 QR08 QS34 QX02 4B065 AA90X AC20 CA46
(54) 【発明の名称】	遺伝子CCR6及びBLR1のDNAメチル化分析による免疫細胞、特にT細胞の検出	