

(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2019-521315

(P2019-521315A)

(43) 公表日 令和1年7月25日 (2019.7.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 B O 6 3
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 Z	4 H O 4 5
C 1 2 Q 1/6806 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6806	
C O 7 K 16/44 (2006.01)	C O 7 K 16/44	
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-557336 (P2018-557336)
 (86) (22) 出願日 平成29年5月3日 (2017.5.3)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年12月28日 (2018.12.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2017/000108
 (87) 国際公開番号 W02017/190215
 (87) 国際公開日 平成29年11月9日 (2017.11.9)
 (31) 優先権主張番号 62/331,070
 (32) 優先日 平成28年5月3日 (2016.5.3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510166124
 ユニバーシティ・ヘルス・ネットワーク
 カナダ国 オンタリオ エム5ジー 2シ
 ー4, トロント, エリザベス・ストリート
 190, アール・フレイザー・エリオッ
 ト・ビルディングルーム1エス-417
 (74) 代理人 100120891
 弁理士 林 一好
 (74) 代理人 100165157
 弁理士 芝 哲央
 (74) 代理人 100205659
 弁理士 齋藤 拓也
 (74) 代理人 100126000
 弁理士 岩池 満

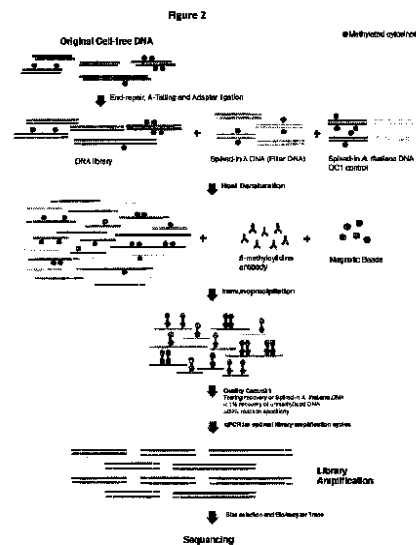
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 無細胞メチル化DNAを捕捉する方法及びその使用

(57) 【要約】

本明細書に記載するのは、100mg未満の無細胞DNAを含む試料から無細胞メチル化DNAを捕捉する方法であって、試料をライブラリ調製に供して、それに続く無細胞メチル化DNAの配列決定を可能にするステップ、第1の量のフィラーDNAを試料に添加するステップであって、フィラーDNAの少なくとも一部がメチル化されているステップ、試料を変性させるステップ、及びメチル化ポリヌクレオチドに選択的な結合剤を用いて無細胞メチル化DNAを捕捉するステップを含む、方法である。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

100 ng 未満の無細胞 DNA を含む試料から無細胞メチル化 DNA を捕捉する方法であって、

a. 前記試料をライブラリ調製に供して、それに続く前記無細胞メチル化 DNA の配列決定を可能にするステップ、

b. 第 1 の量のフィラー DNA を前記試料に添加するステップであって、前記フィラー DNA の少なくとも一部がメチル化されているステップ、

c. 前記試料を変性させるステップ、及び

d. メチル化ポリヌクレオチドに選択的な結合剤を用いて無細胞メチル化 DNA を捕捉するステップを含む、方法。

10

【請求項 2】

前記捕捉された無細胞メチル化 DNA を増幅し、続いて配列決定するステップを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記試料が 50 ng 未満の無細胞 DNA を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 1 の量のフィラー DNA が、約 5 %、10 %、15 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 % 又は 100 % メチル化フィラー DNA、好ましくは 5 % ~ 50 %、10 % ~ 40 %、又は 15 % ~ 30 % メチル化フィラー DNA を含み、残りが非メチル化フィラー DNA である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記第 1 の量のフィラー DNA が 20 ng ~ 100 ng、好ましくは 30 ng ~ 100 ng、より好ましくは 50 ng ~ 100 ng である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記試料からの前記無細胞 DNA と前記第 1 の量のフィラー DNA が一緒に、少なくとも 50 ng の全 DNA、好ましくは少なくとも 100 ng の全 DNA を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記フィラー DNA が 50 bp ~ 800 bp 長、好ましくは 100 bp ~ 600 bp 長、より好ましくは 200 bp ~ 600 bp 長である、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記フィラー DNA が二本鎖である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記フィラー DNA がジャンク DNA である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記フィラー DNA が内在又は外来 DNA である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記フィラー DNA が非ヒト DNA、好ましくは λ DNA である、請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記フィラー DNA がヒト DNA とのアラインメントがない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記結合剤が、メチル CpG 結合ドメインを含むタンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記タンパク質が MBD2 タンパク質である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

ステップ (d) が、前記無細胞メチル化 DNA を抗体を用いて免疫沈降させるステップ

50

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

少なくとも 0.05 μ g、好ましくは少なくとも 0.16 μ g の前記抗体を免疫沈降のために前記試料に添加するステップを含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記抗体が 5-MeC 抗体又は 5-ヒドロキシメチルシトシン抗体である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

免疫沈降反応を確認するためにステップ (b) の後に第 2 の量の対照 DNA を前記試料に添加するステップを更に含む、請求項 15 に記載の方法。

10

【請求項 19】

無細胞メチル化 DNA の捕捉を確認するために、ステップ (b) の後に第 2 の量の対照 DNA を前記試料に添加するステップを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

前記試料内の DNA メチル化プロファイルを測定するための請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載の方法の使用。

【請求項 21】

前記プロファイルを腫瘍組織の公知のメチル化プロファイルと関連させることによって前記試料内の癌細胞由来の無細胞 DNA の存在を確認するための、請求項 20 に記載の DNA メチル化プロファイルの使用。

20

【請求項 22】

前記プロファイルを特定の組織の公知のメチル化プロファイルと関連させることによって前記試料内の前記無細胞 DNA の起源組織を特定するための、請求項 20 に記載の DNA メチル化プロファイルの使用。

【請求項 23】

前記試料内の前記無細胞 DNA 内の前記癌細胞の起源組織を特定するための請求項 22 に記載の使用を更に含む、請求項 21 に記載の使用。

【請求項 24】

免疫療法をモニターするための請求項 20 から 23 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 25】

自己免疫状態の診断のための請求項 20 から 23 のいずれか一項に記載の使用。

30

【請求項 26】

前記試料が採取された対象における細胞回転を測定するための請求項 22 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の参照

本願は、その全体を本明細書に援用する 2016 年 5 月 3 日に出願された米国仮特許出願第 62/331,070 号の優先権を主張するものである。

40

【0002】

本発明は、無細胞 DNA の分野、より具体的には無細胞メチル化 DNA を捕捉する方法及び使用に関する。

【背景技術】

【0003】

DNA メチル化は、DNA の共有結合修飾であり、クロマチン構造において重要な役割を果たす安定な遺伝子調節機構である。ヒトにおいては、DNA メチル化は、CpG ジヌクレオチド中のシトシン残基で主に発生する。他のジヌクレオチドとは異なり、CpG は、ゲノム全体に均等に分布せず、その代わり、CpG 島と呼ばれる短い CpG リッチ DNA 領域に濃縮されている。DNA メチル化は、以下の 2 つの主な機序によって遺伝子を抑

50

制し得る：１）メチル結合ドメインタンパク質を補充し、メチル結合ドメインタンパク質は、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）を補充することができる、及び２）c-MYCなどの転写因子（TF：transcription factor）の結合部位へのアクセスを遮断する（非特許文献１）。

【０００４】

一般に、ゲノム中のCpG部位の大部分はメチル化されており、CpG島の大部分は、正常発生中及び分化組織中で非メチル化されたままである（非特許文献１）。それでも、正常一次組織においてDNAメチル化の組織特異的パターンを明らかにすることができる（非特許文献２）。さらに、悪性転換中、全体的なDNA低メチル化、及びCpG島における限局的な高メチル化が頻繁に認められる（非特許文献１）。実際には、DNAメチル化パターンは、癌患者を多数の癌タイプの中でも、グリア芽細胞腫（非特許文献３）、上衣腫（非特許文献４）、結腸直腸（非特許文献５）、乳房（非特許文献６、７）における予後予測因子（prognostic value）を有する臨床的に関連するサブグループに層別化するのに使用された。

10

【０００５】

正常分化及び癌などの疾患におけるその安定性及び役割のために、DNAメチル化は、腫瘍特性及び表現状態を表すのに使用することができる良好なバイオマーカーであり、したがって個別化医療で高い可能性がある。多数の試料タイプが、DNAメチル化マッピングに、また、とりわけ新しいFFPE腫瘍組織、血球、尿、唾液、便を含めたバイオマーカー発見に適している（非特許文献８）。より最近では、特にゲノム識別が癌（体細胞変異）（非特許文献９）、移植片（ドナー対レシピエントDNA）（非特許文献１０）、妊娠（胎児対母DNA）（非特許文献１１、１２）などに存在する状況では、バイオマーカーとしての循環無細胞DNA（cfDNA：cell-free DNA）の使用が加速している。バイオマーカーとしてのcfDNAのDNAメチル化マッピングの使用は、起源組織の同定を可能にし、癌患者を低侵襲で層別化することができるので、重大な影響を有し得る。さらに、それは、免疫応答、神経変性疾患又は心筋梗塞のモニタリングなどのゲノム識別が存在しない状況において、バイオマーカーとしてのcfDNAの使用を可能にすることができ、エピジェネティックな異常をcfDNA中に検出することができる。

20

【０００６】

さらに、cfDNAの全ゲノムDNAメチル化マッピングを使用すると、疾患を証明するX線像がない初期癌の患者において循環腫瘍DNA（ctDNA：circulating tumor DNA）を検出する際の重要な感度の問題を克服することができる。既存のctDNA検出法は、変異の配列決定に基づくが、腫瘍と正常循環cfDNAを識別するのに利用可能な反復突然変異の数が限られるため、感度が幾分限定される（非特許文献１３、１４）。一方、全ゲノムDNAメチル化マッピングは、循環腫瘍DNA（ctDNA）を正常循環無細胞DNA（cfDNA）から識別するのに使用することができる多数のエピジェネティックな変化を活用する。例えば、上衣腫などの一部の腫瘍タイプは、重要な反復体細胞変異なしに広範なDNAメチル化異常を有し得る（非特許文献４）。

30

【０００７】

さらに、The Cancer Genome Atlas（TCGA）の全癌データは、実質的にすべての腫瘍タイプにわたって腫瘍と正常組織の間の多数のDMRを示している（非特許文献１５）。したがって、これらの知見によって強調されることは、癌特異的DNAメチル化変化をctDNAから回収するのに成功したアッセイが、悪性疾患を低配列決定関連コストで検出、分類及びモニターする極めて高感度のツールとして役立ち得るということである。

40

【０００８】

しかし、cfDNA中のDNAメチル化の全ゲノムマッピングは、入手可能なDNAの量が少なく、cfDNAが200bp長未満に断片化されることから、極めて困難である（非特許文献１６）。このため、少なくとも50～100ngのDNAを必要とする従来のMeDIP-seq（非特許文献１７）、又は断片化されていないDNAを必要とする

50

Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) (非特許文献18)を行うことは不可能である。cfDNA中のDNAメチル化をマッピングする別の問題は、正常cfDNA内の目的DNAの量が少ないことである(非特許文献19)。このため、少量のDNAを捕捉するのに十分な深さの配列決定のコストが法外であるので、WGBSを行うことは非現実的である。一方、メチル化しやすいCpGリッチな特徴部を選択的に濃縮する方法は、1つのリードで入手可能な有用情報量を最大にし、コストを削減し、DNA損失を減少させる可能性がある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

10

【非特許文献1】Sharma, S., Kelly, T. K. & Jones, P. A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31, 27-36, doi:10.1093/carcin/bgp220 (2010).

【非特許文献2】Varley, K. E. et al. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res* 23, 555-567, doi:10.1101/gr.147942.112 (2013).

【非特許文献3】Sturm, D. et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* 22, 425-437, doi:10.1016/j.ccr.2012.08.024 (2012).

20

【非特許文献4】Mack, S. C. et al. Epigenomic alterations define lethal CIMP-positive ependymomas of infancy. *Nature* 506, 445-450, doi:10.1038/nature13108 (2014).

【非特許文献5】Hinoue, T. et al. Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome Res* 22, 271-282, doi:10.1101/gr.117523.110 (2012).

30

【非特許文献6】Stirzaker, C. et al. Methylome sequencing in triple-negative breast cancer reveals distinct methylation clusters with prognostic value. *Nat Commun* 6, 5899, doi:10.1038/ncomms6899 (2015).

【非特許文献7】Fang, F. et al. Breast cancer methylomes establish an epigenomic foundation for metastasis. *Sci Transl Med* 3, 75ra25, doi:10.1126/scitranslmed.3001875 (2011).

40

【非特許文献8】Mikeska, T. & Craig, J. M. DNA methylation biomarkers: cancer and beyond. *Genes (Basel)* 5, 821-864, doi:10.3390/genes5030821 (2014).

【非特許文献9】Diaz, L. A., Jr. & Bardelli, A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 32, 579-586, doi:10.1200/JCO.2012.45.2011 (2014).

【非特許文献10】Snyder, T. M., Khush, K. K., Va

50

lantine, H. A. & Quake, S. R. Universal noninvasive detection of solid organ transplant rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 6229-6234, doi:10.1073/pnas.1013924108 (2011).

【非特許文献11】Chiu, R. W. et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20458-20463, doi:10.1073/pnas.0810641105 (2008).

【非特許文献12】Fan, H. C., Blumenfeld, Y. J., Chitkara, U., Hudgins, L. & Quake, S. R. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16266-16271, doi:10.1073/pnas.0808319105 (2008).

【非特許文献13】Newman, A. M. et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 20, 548-554, doi:10.1038/nm.3519 (2014).

【非特許文献14】Aravanis, A. M., Lee, M. & Klausner, R. D. Next-Generation Sequencing of Circulating Tumor DNA for Early Cancer Detection. *Cell* 168, 571-574, doi:10.1016/j.cell.2017.01.030 (2017).

【非特許文献15】Hoadley, K. A. et al. Multiplatform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues of origin. *Cell* 158, 929-944, doi:10.1016/j.cell.2014.06.049 (2014).

【非特許文献16】Fleischhacker, M. & Schmidt, B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer - a survey. *Biochim Biophys Acta* 1775, 181-232, doi:10.1016/j.bbcan.2006.10.001 (2007).

【非特許文献17】Taiwo, O. et al. Methylome analysis using MeDIP-seq with low DNA concentrations. *Nat Protoc* 7, 617-636, doi:10.1038/nprot.2012.012 (2012).

【非特許文献18】Gu, H. et al. Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nat Protoc* 6, 468-481, doi:10.1038/nprot.2010.190 (2011).

【非特許文献19】Hung, E. C., Chiu, R. W. & Lo, Y. M. Detection of circulating fetal nucleic acids: a review of methods and appl

10

20

30

40

50

ications. J Clin Pathol 62, 308-313, doi: 10.1136/jcp.2007.048470 (2009).

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

一態様によれば、100 ng未満の無細胞DNAを含む試料から無細胞メチル化DNAを捕捉する方法であって、試料をライブラリ調製に供して、それに続く無細胞メチル化DNAの配列決定を可能にするステップ、第1の量のフィラーDNAを試料に添加するステップであって、フィラーDNAの少なくとも一部がメチル化されているステップ、試料を変性させるステップ、及びメチル化ポリヌクレオチドに選択的な結合剤を用いて無細胞メチル化DNAを捕捉するステップを含む、方法を提供する。

10

【0011】

本発明の実施形態は、以下の記述及び添付図面を参照すると最も良く理解することができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1A】cfDNAのメチローム分析が少量の入力DNA中のctDNAを濃縮し、検出する高感度な手法であることを示す図である。少なくとも1つのエピ変異をctDNA濃度(列)、検査DMR数(行)及び配列決定深さ(x軸)の関数として検出する確率のコンピュータシミュレーション。

20

【図1B】cfDNAのメチローム分析が少量の入力DNA中のctDNAを濃縮し、検出する高感度な手法であることを示す図である。血漿cfDNAを模倣するように断片化されたHCT116細胞系由来の1~100 ngの入力DNAのDNAメチル化シグナルの全ゲノムピアソン相関。各濃度は、2つの生物学的複製を有する。

【図1C】cfDNAのメチローム分析が少量の入力DNA中のctDNAを濃縮し、検出する高感度な手法であることを示す図である。HCT116由来の異なる濃度の入力DNAからのcfMeDIP-seqから得られるDNAメチル化プロファイル(緑のトラック)+ENCODE(ENCSR000DFS)から得られるReduced Representation Bisulfite Sequencing(RRBS)HCT116データ及びGEO(GSM1465024)から得られるWhole-Genome Bisulfite Sequencing(WGBS)HCT116データ。ヒートマップ(RRBSトラック)では、黄色はメチル化を意味し、青色は非メチル化を意味し、灰色はカバー度0を意味する。

30

【図1D】cfDNAのメチローム分析が少量の入力DNA中のctDNAを濃縮し、検出する高感度な手法であることを示す図である。多発性骨髄腫(MM: Multiple Myeloma)細胞系MM1.S中へのCRC細胞系HCT116の段階希釈。cfMeDIP-seqを純粋HCT116 DNA(100% CRC)、純粋MM1.S DNA(100% MM)、並びにMM DNA中に希釈された10%、1%、0.1%、0.01%及び0.001% CRC DNAにおいて行った。すべてのDNAを血漿cfDNAを模倣するように断片化した。本発明者らは、観察と予想(D)DMR数及び(E)これらDMR内のDNAメチル化シグナル(RPKM単位)のほぼ完全な線形相関($r^2 = 0.99$ 、 $p < 0.0001$)を認めた。

40

【図1E】cfDNAのメチローム分析が少量の入力DNA中のctDNAを濃縮し、検出する高感度な手法であることを示す図である。多発性骨髄腫(MM: Multiple Myeloma)細胞系MM1.S中へのCRC細胞系HCT116の段階希釈。cfMeDIP-seqを純粋HCT116 DNA(100% CRC)、純粋MM1.S DNA(100% MM)、並びにMM DNA中に希釈された10%、1%、0.1%、0.01%及び0.001% CRC DNAにおいて行った。すべてのDNAを血漿cfDNAを模倣するように断片化した。本発明者らは、観察と予想(D)DMR数及び(E)これらDMR内のDNAメチル化シグナル(RPKM単位)のほぼ完全な線形相関(r

50

$^2 = 0.99$ 、 $p < 0.0001$) を認めた。

【図 1 F】c f DNA のメチローム分析が少量の入力 DNA 中の c t DNA を濃縮し、検出する高感度な手法であることを示す図である。同じ希釈系列においては、公知の体細胞変異は、バックグラウンド配列決定装置及びポリメラーゼ誤り率を超える超深度 ($> 10,000\times$) 標的配列決定によって $1/100$ 対立遺伝子割合においてのみ検出可能である。CRC 細胞系における各変異の部位に各塩基又は挿入/欠失を含むリードの割合を示す。

【図 1 G】c f DNA のメチローム分析が少量の入力 DNA 中の c t DNA を濃縮し、検出する高感度な手法であることを示す図である。2 名の結腸直腸癌患者からの患者由来の異種移植片 (PDX: patient-derived xenograft) を有するマウスの血漿中の総 c f DNA (ヒト+マウス) に対する割合としての c t DNA (ヒト) の頻度。

【図 2】c f MeDIP-seq プロトコルの略図である。

【図 3 A - 1】配列決定飽和 (sequencing saturation) 分析及び品質管理を示す図である。図は、血漿 c f DNA を模倣するように断片化された HCT 116 DNA からの各入力濃度に対する各複製からの c f MeDIP-seq データを分析する Bioconductor パッケージ MEDIPS の飽和分析の結果を示す。

【図 3 A - 2】配列決定飽和 (sequencing saturation) 分析及び品質管理を示す図である。図は、血漿 c f DNA を模倣するように断片化された HCT 116 DNA からの各入力濃度に対する各複製からの c f MeDIP-seq データを分析する Bioconductor パッケージ MEDIPS の飽和分析の結果を示す。

【図 3 A - 3】配列決定飽和 (sequencing saturation) 分析及び品質管理を示す図である。図は、血漿 c f DNA を模倣するように断片化された HCT 116 DNA からの各入力濃度に対する各複製からの c f MeDIP-seq データを分析する Bioconductor パッケージ MEDIPS の飽和分析の結果を示す。

【図 3 B】配列決定飽和 (sequencing saturation) 分析及び品質管理を示す図である。HCT 116 細胞系の 4 つの開始 DNA 濃度 (100、10、5 及び 1 ng) の 2 つの複製において手順を試験した。反応の特異性をメチル化及び非メチル化添加シロイヌナズナ DNA を用いて計算した。濃縮倍率比を断片化 HCT 116 DNA のゲノム領域 (メチル化精巢特異的 H2B、TSH2B0 及び非メチル化ヒト DNA 領域 (GAPDH プロモーター) のプライマー) を用いて計算した。水平の点線は、濃縮倍率比閾値 2.5 を示す。エラーバーは、 ± 1 s.e.m. である。

【図 3 C】配列決定飽和 (sequencing saturation) 分析及び品質管理を示す図である。配列決定試料の CpG 濃縮スコアは、入力対照に比べて免疫沈降試料からのゲノム領域内の CpG の堅牢な濃縮を示す。CpG 濃縮スコアは、領域の CpG の相対頻度をヒトゲノムの CpG の相対頻度で除算することによって得られた。エラーバーは、 ± 1 s.e.m. である。

【図 4 A】段階希釈からの c f MeDIP-seq からの品質管理を示す図である。MM DNA (MM1.S) 中への CRC DNA (HCT 116) 希釈の略図。

【図 4 B】段階希釈からの c f MeDIP-seq からの品質管理を示す図である。各希釈の反応の特異性をメチル化及び非メチル化添加シロイヌナズナ DNA を用いて計算した。

【図 4 C】段階希釈からの c f MeDIP-seq からの品質管理を示す図である。配列決定試料の CpG 濃縮スコアは、免疫沈降試料からのゲノム領域内の CpG の強力な濃縮を示す。CpG 濃縮スコアは、領域の CpG の相対頻度をヒトゲノムにおける CpG の相対頻度で除算することによって得られた。

【図 4 D - 1】段階希釈からの c f MeDIP-seq からの品質管理を示す図である。図は、各希釈ポイントからの飽和分析の結果を示す。

【図 4 D - 2】段階希釈からの c f MeDIP-seq からの品質管理を示す図である。図は、各希釈ポイントからの飽和分析の結果を示す。

10

20

30

40

50

【図5A】cfMeDIP-seq法が膵臓腺癌患者から得られる循環cfDNA上の数千の差次的メチル化領域を同定可能であることを示す図である。実験計画。

【図5B】cfMeDIP-seq法が膵臓腺癌患者から得られる循環cfDNA上の数千の差次的メチル化領域を同定可能であることを示す図である。cfMeDIP-seqを用いた膵癌（症例、 $n = 24$ ）対健常ドナー（対照、 $n = 24$ ）からの循環cfDNAのボルケーノプロット。赤い点は、多重検定補正後に有意になった窓を示す。

【図5C】cfMeDIP-seq法が膵臓腺癌患者から得られる循環cfDNA上の数千の差次的メチル化領域を同定可能であることを示す図である。健常ドナー及び膵癌患者由来の血漿DNA中で同定された38,085個のDMRのヒートマップ。階層的クラスタリング方法：Ward。

【図5D】cfMeDIP-seq法が膵臓腺癌患者から得られる循環cfDNA上の数千の差次的メチル化領域を同定可能であることを示す図である。血漿（症例対対照）中で同定されたDMRと原発腫瘍組織（原発腫瘍対正常組織）中で同定された癌特異的DMCの予想対観察重複の頻度を推定する順列分析。ボックスプロットは、重複の帰無分布を表す。菱形は、原発腫瘍組織と循環cfDNAからのDNAメチル化の重複の実験的に観察された数である。赤い菱形は、重複の観察数が偶然に予想よりも有意に多いことを意味する。緑の菱形は重複の観察数が偶然に予想よりも有意に少ないことを意味し、青い菱形は有意でない。本発明者らは4つの可能な重複を計算した：原発腫瘍組織における高メチル化と循環cfDNAにおける高メチル化（濃縮、 P 値： 6.4×10^{-22} ）；腫瘍組織における高メチル化と循環cfDNAにおける低メチル化（欠乏、 P 値： 9.43×10^{-17} ）；腫瘍組織における低メチル化と循環cfDNAにおける低メチル化（濃縮、 P 値： 1.88×10^{-283} ）；腫瘍組織における低メチル化と循環cfDNAにおける高メチル化（ P 値： 0.105 ）。

【図5E】cfMeDIP-seq法が膵臓腺癌患者から得られる循環cfDNA上の数千の差次的メチル化領域を同定可能であることを示す図である。血漿（症例対対照）中で同定されたDMRと原発腫瘍組織（原発腫瘍対正常PBMC）中で同定された癌特異的DMCの予想対観察重複の頻度を推定する順列分析。

【図6A】膵臓腺癌患者（症例）由来の循環cfDNAからのcfMeDIP-seqの品質管理を示す図である。各症例試料の反応の特異性をメチル化及び非メチル化添加シロイヌナズナDNAを用いて計算した。濃縮倍率比は、利用可能なDNAの量が極めて限られたために計算されなかった。

【図6B】健常ドナー（対照）由来の循環cfDNAからのcfMeDIP-seqの品質管理を示す図である。各対照試料の反応の特異性をメチル化及び非メチル化添加シロイヌナズナDNAを用いて計算した。濃縮倍率比は、利用可能なDNAの量が極めて限られたために計算されなかった。

【図6C】膵臓腺癌患者（症例）由来の循環cfDNAからのcfMeDIP-seqの品質管理を示す図である。配列決定試料のCpG濃縮スコアは、免疫沈降試料からのゲノム領域内のCpGの強力な濃縮を示す。

【図6D】健常ドナー（対照）由来の循環cfDNAからのcfMeDIP-seqの品質管理を示す図である。配列決定試料のCpG濃縮スコアは、免疫沈降試料からのゲノム領域内のCpGの強力な濃縮を示す。

【図7A】上位百万の最も変わりやすい全ゲノム窓を用いた健常ドナー及び初期膵臓腺癌患者からの48の血漿cfDNAメチル化についてのPCAを示す図である。各窓では、データの中央値からの絶対偏差の中央値を返す堅牢な測定である平均絶対偏差（MAD：Mean Absolute Deviation）測定規準によって可変性を計算した。この場合、データは、所与の窓に対する全48試料にわたるRPKM値である。PC1対PC2（左）及びPC1対PC3（右）を示す。

【図7B】各主成分の変動率。

【図7C】RRBSを用いた膵臓腺癌患者由来の腫瘍対正常LCM組織のボルケーノプロット。同定された差次的メチル化CpG（DMC：Differentially Me

10

20

30

40

50

thylated CpG)の総数を示す。赤い点は、多重検定補正後に有意になった、絶対的メチル化差違(絶対的デルタベータ) > 0.25 の窓を示す。

【図7D】各重複窓のDNAメチル化差違の有意性を示す散布図。X軸は、RRBSデータからの原発膵臓腺癌腫瘍対正常組織の $\log_{10}q$ 値を示す。領域が腫瘍において高メチル化されている場合、有意性は正のスケールで示される。低メチル化領域は負のスケールで示される。Y軸は、cfMeDIP-seqデータからの膵臓腺癌患者対健常ドナーからの血漿cfDNAメチル化の $\log_{10}q$ 値を示す。青い点は、どちらも有意である。赤い線は、傾向線を示す。

【図7E】各重複窓のDNAメチル化差違を示す散布図。X軸は、RRBSデータからの原発膵臓腺癌腫瘍対正常組織のDNAメチル化差違を示す。Y軸は、cfMeDIP-seqデータからの膵臓腺癌患者対健常ドナーからの血漿cfDNAメチル化のDNAメチル化差違を示す。青い線は、傾向線を示す。

【図7F】RRBSを用いたLCM膵臓腺癌組織対正常PBMCのボルケーノプロット。同定された差次的メチル化CpG(DMC)の総数を示す。赤い点は、多重検定補正後に有意になった、絶対的メチル化差違(絶対的デルタベータ) > 0.25 の窓を示す。

【図7G】各重複窓のDNAメチル化差違の有意性を示す散布図。X軸は、RRBSデータからの原発膵臓腺癌腫瘍対正常PBMCの $\log_{10}q$ 値を示す。領域が腫瘍において高メチル化されている場合、有意性は正のスケールで示される。低メチル化領域は負のスケールで示される。Y軸は、cfMeDIP-seqデータからの膵臓腺癌患者対健常ドナーからの血漿cfDNAメチル化の $\log_{10}q$ 値を示す。青い点は、どちらも有意である。赤い線は、傾向線を示す。

【図7H】各重複窓のDNAメチル化差違を示す散布図。X軸は、RRBSデータからの原発膵臓腺癌腫瘍対正常PBMCのDNAメチル化差違を示す。Y軸は、cfMeDIP-seqデータからの膵臓腺癌患者対健常ドナーからの血漿cfDNAメチル化のDNAメチル化差違を示す。

【図8A】循環cfDNAメチル化プロファイルを使用して、転写因子(TF: transcription factor)フットプリントを同定し、起源組織中の活性転写ネットワークを推測できることを示す図である。複数のヒト組織にわたる健常ドナー由来のcfDNA中の低メチル化された領域(対照における低メチル化フットプリント)においてそのモチーフが(ソフトウェアHOMER²⁰を用いて)濃縮されたすべてのTF($n = 33$)の発現プロファイル。発現データを遺伝子型-組織発現(GTex: Genotype-Tissue Expression)プロジェクトから得た²¹。造血系において優先的に発現される幾つかのTFを同定した(PU.1、FLI1、STAT5B、KLF1)。

【図8B】循環cfDNAメチル化プロファイルを使用して、転写因子(TF: transcription factor)フットプリントを同定し、起源組織中の活性転写ネットワークを推測できることを示す図である。対照における低メチル化モチーフを有するすべてのTFの発現プロファイル($n = 33$)対全血中の33個のTFの無作為な1,000セットの発現プロファイル(GTexデータ)。

【図8C】循環cfDNAメチル化プロファイルを使用して、転写因子(TF: transcription factor)フットプリントを同定し、起源組織中の活性転写ネットワークを推測できることを示す図である。膵臓腺癌患者由来のcfDNA中の低メチル化された領域(症例における低メチル化フットプリント)においてそのモチーフが濃縮されたすべてのTF($n = 85$)の発現プロファイル。幾つかの膵臓特異的又は膵癌関連TFを同定した。さらに、膵癌の分子サブタイプを駆動するホールマークTFも同定された。

【図8D】循環cfDNAメチル化プロファイルを使用して、転写因子(TF: transcription factor)フットプリントを同定し、起源組織中の活性転写ネットワークを推測できることを示す図である。症例における低メチル化モチーフを有するすべてのTFの発現プロファイル($n = 85$)対正常膵臓中の85個のTFの無作為な1

10

20

30

40

50

、000セットの発現プロファイル（GTEXデータ）。

【図8E】循環cfDNAメチル化プロファイルを使用して、転写因子（TF：transcription factor）フットプリントを同定し、起源組織中の活性転写ネットワークを推測できることを示す図である。症例における低メチル化モチーフを有するすべてのTFの発現プロファイル（ $n = 85$ ）対膵臓腺癌組織中の85個のTFの無作為な1,000セットの発現プロファイル（TCGAデータ）。

【図9】免疫沈降前に、それぞれ90ng、95ng及び99ngのフィラーDNAと組み合わせた、又はフィラーDNAのない、10ng、5ng及び1ngの開始癌無細胞DNA量（ $n = 3$ ）を用いたcfMeDIP-seq後の添加非メチル化シロイヌナズナDNAの回収%を示す図である。使用フィラーDNAは、免疫沈降前の最終量を100ngに増加させるために、人工メチル化%と存在する非メチル化ラムダDNA%の組成が異なった。所望の添加非メチル化DNAの回収%は<1.0%であり、回収の低いほど、反応の特異性%が高くなる。

【図10】免疫沈降前に、それぞれ90ng、95ng及び99ngのフィラーDNAと組み合わせた、又はフィラーDNAのない、10ng、5ng及び1ngの開始癌無細胞DNA量（ $n = 3$ ）を用いたcfMeDIP-seq後の添加メチル化シロイヌナズナDNAの回収%を示す図である。使用フィラーDNAは、免疫沈降前の最終量を100ngに増加させるために、人工メチル化%と存在する非メチル化ラムダDNA%の組成が異なった。所望の添加メチル化DNAの最低回収%は20%である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明者らは、異なる割合のctDNA 0.001%~10%との混合物を生物情報学的にシミュレートした（図1A、列の面）。本発明者らは、ctDNAが正常cfDNAに比べて1、10、100、1000又は10000個のDMR（差次的メチル化領域）を有するシナリオもシミュレートした（図1A、行の面）。次いで、リードを様々な配列決定深さで各遺伝子座においてサンプリングした（10x、100x、1000x及び10000x）（図1A、x軸）。本発明者らは、癌ctDNAの存在量が少なく、カバー度が浅いときでも、DMR数が増加すると少なくとも1つの癌特異的事象の検出確率が高くなることを見いだした（図1A）。

【0014】

これらの難題を克服するために、本発明者らは、無細胞DNAを用いて全ゲノムDNAメチル化マッピングを行うcfMeDIP-seq（無細胞メチル化DNA免疫沈降及びハイスループット配列決定）と呼ばれる新しい方法を開発した。ここで記述するcfMeDIP-seq法は、100ngの入力DNAまで堅牢である既存の低入力MeDIP-seq手順¹⁷の改変によって開発された。しかし、血漿試料の大部分は、100ngよりはるかに少ないDNAを生成する。この難題を克服するために、本発明者らは、開始DNAの量を100ngに人為的に膨張させるために、外来λDNA（フィラーDNA）をアダプター連結cfDNAライブラリに添加した（図2）。これは、抗体による非特異的結合の量を最小にし、プラスチック製品との結合のために失われるDNAの量も最小にする。フィラーDNAは、アダプター連結cfDNAライブラリにサイズが類似したアンブリコンからなり、非メチル化DNA及びメチル化レベルの異なるインビトロメチル化DNAで構成された（図9及び図10）。異なる患者は異なる量のcfDNAを生成するので、このフィラーDNAの添加は、実用にも役立ち、入力DNA量を100ngに規準化することができる。これによって、利用可能なcfDNAの量にかかわらず、下流の手順がすべての試料で確実に正確に同じままである。

【0015】

一態様によれば、100ng未満の無細胞DNAを含む試料から無細胞メチル化DNAを捕捉する方法であって、

a. 試料をライブラリ調製に供して、それに続く無細胞メチル化DNAの配列決定を可能にするステップ、

10

20

30

40

50

b. 第1の量のフィラーDNAを試料に添加するステップであって、フィラーDNAの少なくとも一部がメチル化されているステップ、

c. 試料を変性させるステップ、及び

d. メチル化ポリヌクレオチドに選択的な結合剤を用いて無細胞メチル化DNAを捕捉するステップ

を含む、方法を提示する。

【0016】

一部の実施形態においては、この方法は、捕捉された無細胞メチル化DNAを増幅し、続いて配列決定するステップを更に含む。

【0017】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR: polymerase chain reaction)、続いてサンガー配列決定法などの様々な配列決定技術が当業者に知られている。Illumina(Solexa)配列決定法、Roche454配列決定法、Ion torrent:Proton/PGM配列決定法、SOLID配列決定法を含めて種々の配列決定技術を含む、ハイスループット配列決定法としても知られる次世代配列決定(NGS: next-generation sequencing)技術も利用可能である。NGSは、DNA及びRNAの配列決定を以前に使用されたサンガー配列決定法よりもはるかに迅速で安価にすることができる。一部の実施形態においては、前記配列決定は、ショートリード配列決定に対して最適化される。

【0018】

無細胞メチル化DNAは、血流中で自由に循環しているDNAであり、DNAの様々な公知領域でメチル化されている。試料、例えば、血漿試料は、無細胞メチル化DNAを分析するために採取することができる。

【0019】

本明細書では「ライブラリ調製」は、リスト末端修復(list end-repair)、Aテーリング、アダプター連結、又は後続のDNA配列決定を可能にするために無細胞DNA上で行われる任意の他の調製を含む。

【0020】

本明細書では「フィラーDNA」は、非コードDNAとすることができ、又はアンプリコンからなることができる。

【0021】

DNA試料は、例えば十分な熱を用いて、変性することができる。

【0022】

一部の実施形態においては、試料は、50ng未満の無細胞DNAを含む。

【0023】

一部の実施形態においては、第1の量のフィラーDNAは、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%メチル化フィラーDNAを含む。好ましい実施形態においては、第1の量のフィラーDNAは、約50%メチル化フィラーDNAを含む。

【0024】

一部の実施形態においては、第1の量のフィラーDNAは20ng~100ngである。好ましい実施形態においては、30ng~100ngのフィラーDNA。より好ましい実施形態においては、50ng~100ngのフィラーDNA。試料からの無細胞DNAと第1の量のフィラーDNAが併用されるときには、少なくとも50ngの全DNA、好ましくは少なくとも100ngの全DNAを含む。

【0025】

一部の実施形態においては、フィラーDNAは50bp~800bp長である。好ましい実施形態においては100bp~600bp長、より好ましい実施形態においては200bp~600bp長。

【0026】

10

20

30

40

50

フィラーDNAは二本鎖である。例えば、フィラーDNAをジャンクDNAとすることができる。フィラーDNAを内在又は外来DNAとすることもできる。例えば、フィラーDNAは、非ヒトDNA、好ましい実施形態においてはλDNAである。本明細書では「λDNA」とは、腸内細菌ファージλDNAを指す。一部の実施形態においては、フィラーDNAは、ヒトDNAとのアラインメントがない。

【0027】

一部の実施形態においては、結合剤は、メチルCpG結合ドメインを含むタンパク質である。1種のこうした例示的なタンパク質は、MBD2タンパク質である。本明細書では「メチルCpG結合ドメイン(MBD: Methyl-CpG-binding domain)」とは、約70残基長であるタンパク質及び酵素のある種のドメインを指し、1つ以上の対称的メチル化CpGを含むDNAに結合する。MeCP2、MBD1、MBD2、MBD4及びBAZ2のMBDは、DNAとの結合を媒介し、MeCP2、MBD1及びMBD2の場合には、メチル化CpGとの結合を優先的に媒介する。ヒトタンパク質MECP2、MBD1、MBD2、MBD3及びMBD4は、メチルCpG結合ドメイン(MBD)の各々における存在によって関連づけられる核タンパク質ファミリーを含む。これらのタンパク質の各々は、MBD3を除いて、メチル化DNAに特異的に結合することができる。

10

【0028】

別の実施形態においては、結合剤は抗体であり、無細胞メチル化DNAの捕捉は、無細胞メチル化DNAを抗体を用いて免疫沈降させることを含む。本明細書では「免疫沈降」とは、特定の抗原(ポリペプチド、ヌクレオチドなど)に特異的に結合する抗体を用いて、該抗原を溶液から沈降させる技術を指す。このプロセスは、特定のタンパク質又はDNAを試料から単離し、濃縮するのに使用することができ、抗体が手順のある時点で固体基質に結合する必要がある。固体基質としては、例えば、磁気ビーズなどのビーズが挙げられる。別のタイプのビーズ及び固体基質が当該技術分野で知られている。

20

【0029】

例示的一抗体は5-MeC抗体である。免疫沈降手順では、一部の実施形態においては、少なくとも0.05 µgの抗体を試料に添加し、より好ましい実施形態においては、少なくとも0.16 µgの抗体を試料に添加する。免疫沈降反応を確認するために、一部の実施形態においては、本明細書に記載の方法は、ステップ(b)の後に第2の量の対照DNAを試料に添加するステップを更に含む。

30

【0030】

別の例示的一抗体は、5-ヒドロキシメチルシトシン抗体である。

【0031】

別の実施形態においては、本明細書に記載の方法は、無細胞メチル化DNAの捕捉を確認するために、ステップ(b)の後に第2の量の対照DNAを試料に添加するステップを更に含む。

【0032】

本明細書では「対照」は、正と負の対照の両方、又は少なくとも正の対照を含むことができる。

40

【0033】

更なる一態様によれば、試料内のDNAメチル化プロファイルを測定するための本明細書に記載の方法の使用を提供する。

【0034】

更なる一態様によれば、プロファイルを腫瘍組織の公知のメチル化プロファイルと相関させることによって試料内の癌細胞由来の無細胞DNAの存在を確認するための本明細書に記載の方法の使用を提供する。

【0035】

更なる一態様によれば、プロファイルを特定の組織の公知のメチル化プロファイルと相関させることによって試料内の無細胞DNAの起源組織を特定するための本明細書に記載

50

のDNAメチル化プロファイルの使用を提供する。

【0036】

一部の実施形態においては、試料内の無細胞DNA内の癌細胞の起源組織を特定するための本明細書に記載の使用を更に含む使用。

【0037】

更なる一態様によれば、免疫療法をモニターするための本明細書に記載の使用を提供する。

【0038】

更なる一態様によれば、自己免疫状態の診断のための本明細書に記載の使用を提供する。

10

【0039】

更なる一態様によれば、試料が採取された対象における細胞回転を測定するための本明細書に記載の使用を提供する。

【0040】

以下の実施例は、本発明の様々な態様を説明するものであって、本明細書に開示される本発明の広範な態様を限定するものではない。

【実施例】

【0041】

方法

ドナー補充及び試料取得

20

膵臓腺癌(PDAC)患者試料をUniversity Health Network BioBankから入手し、健常対照をカナダ、トロントのMount Sinai Hospital(MSH)のFamily Medicine Centreから補充した。患者が同意して収集された全試料を、Research Ethics Board、University Health Network及びカナダ、トロントのMount Sinai Hospitalからの施設承認の下に得た。

【0042】

検体処理 - 精製腫瘍及び正常細胞

原発性PDAC試料の場合、検体を切除後すぐに処理し、代表的な切片を使用して、診断を確認した。新たな液体窒素凍結組織試料のレーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM: Laser capture microdissection)をLeica LMD7000機器上で行った。手短に述べると、気相液体窒素中で維持された凍結組織をOCT切断媒体に包埋し、クライオトームで8µm厚切片に切り出した。切片をPEN膜スライド(Leica)に載せ、ヘマトキシリンで軽く染色して、腫瘍領域の顕微鏡同定を容易にした。切片を切断して核酸の劣化を最小にした同じ日にLCMを行った。

30

【0043】

顕微解剖腫瘍細胞を重力によって無菌リボヌクレアーゼフリー微量遠心管のキャップに収集した。約150,000~200,000個の腫瘍細胞をDNA試料用に収集し、更なる処理まで-80で貯蔵した。LCMは、一般に、十分な量の精製腫瘍細胞を収集するのに1症例当たり1~2日かかった。Qiagen Cell Lysis Bufferを使用して、ゲノムDNAを抽出した。スライドガラス上の非染色凍結切片を適切なDNA抽出緩衝剤中にこすり取ることによって、組織学的に精査された対応正常参照組織を各患者で凍結十二指腸又は胃粘膜から収集した。

40

【0044】

検体処理 - cfDNA

EDTA及びACD血漿試料をBioBank及びカナダ、トロントのMount Sinai Hospital(MSH)のFamily Medicine Centreから入手した。全試料を使用まで-80又は気相液体窒素中で貯蔵した。無細胞DNAを0.5~3.5mlの血漿からQIAamp Circulating Nucle

50

ic Acid Kit (Qiagen) を用いて抽出した。抽出DNAを使用前にQubitによって定量化した。

【0045】

検体処理 - PDX c f DNA

University Health NetworkのResearch Ethics Boardによって認可されたようにUniversity Health Network Biobankから患者の同意の下で得られたヒト直腸結腸腫瘍組織を、コラゲナーゼAを用いて単細胞に消化した。単細胞を4～6週齢NOD/SCID雄性マウスに皮下注射した。マウスをCO₂吸入によって安楽死させた後、心臓穿刺によって採血し、EDTA管に貯蔵した。収集血液試料から、血漿を単離し、-80℃で貯蔵した。無細胞DNAを0.3～0.7mlの血漿からQIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) を用いて抽出した。すべての動物の作業をUniversity Health NetworkのAnimal Care Committeeによって認可された倫理規定に従って行った。

10

【0046】

R R B S

無細胞DNAが得られた同じ患者由来のLCM濃縮腫瘍及び正常試料から抽出されたゲノムDNAを軽微な変更を加えたGura、2011年¹⁸の手順に従ってRRBSに供した。手短に述べると、Qubitによって測定された10ngのゲノムDNAを制限酵素MspIで消化し、次いで末端修復、Aテーリング、及びIllumina TruSeqメチル化アダプターとのアダプター連結に供した。次いで、調製されたライブラリをZymo EZ DNAメチル化キットを用いて製造者の手順に従って亜硫酸水素塩変換に供し、続いて160bp～300bpの断片のゲルサイズ選択に供した。各精製ライブラリを増幅する最適サイクル数をqPCRを使用して決定し、その後、試料をKAPA HiFi Uracil+Mastermix (Kapa Biosystems) を用いて増幅し、AMPureビーズ(Beckman Coulter)を用いて精製した。最終ライブラリをBioAnalyzer分析に供した後、UHN Princess Margaret Genomic CentreにおいてIllumina HiSeq 2000で配列決定した。

20

【0047】

外来腸内細菌ファージλPCR産物の調製

腸内細菌ファージλDNA (ThermoFischer Scientific) を表1に示したプライマーを用いて増幅し、6種の異なるPCRアンプリコン産物を生成した。PCR反応をKAPA HiFi Hotstart Ready Mixを用いて以下の条件で行った：95℃ 3分間の酵素の活性化、30サイクルの98℃ 20秒間、60℃ 15秒間、72℃ 30秒間、及び72℃ 1分間の最終伸長。PCRアンプリコンをQIAquick PCR精製キット(Qiagen)を用いて精製し、ゲル上に流して、サイズ及び増幅を検証した。1CpG、5CpG、10CpG、15CpG及び20CpGのアンプリコンをCpG Methyltransferase (M.SssI) (ThermoFischer Scientific) を用いてメチル化し、QIAquick PCR精製キットを用いて精製した。PCRアンプリコンのメチル化を制限酵素HpyCH4IV (New England Biolabs Canada) を用いて試験し、ゲル上に流して、そのメチル化を確実にした。非メチル化(20CpGS)及びメチル化(1CpG、5CpG、10CpG、15CpG、20CpGL)アンプリコンのDNA濃度をPicoGreenを用いて測定した後、50%メチル化及び50%非メチル化λPCR産物と一緒に貯蔵した。

40

【0048】

c f MeDIP - seq

c f MeDIP - seq手順の略図を図2に示す。c f MeDIP前に、DNA試料をKapa Hyper Prep Kit (Kapa Biosystems) を用いて

50

ライブラリ調製に供した。一部変更した製造者手順に従った。手短に述べると、目的DNAを0.2 mL PCR管に添加し、末端修復及びAテーリングに供した。アダプター連結は、NEBNextアダプター(Illuminaキット用NEBNext Multiplex Oligos、New England Biolabs)を用いて最終濃度0.181 µMで従い、20 で20分間インキュベートし、AMPure XPビーズを用いて精製した。溶出ライブラリをUSER酵素(New England Biolabs Canada)で消化し、続いてMeDIP前にQiagen MinElute PCR Purification Kitを用いて精製した。

【0049】

調製ライブラリを貯蔵メチル化/非メチル化λPCR産物と組み合わせて、最終DNA量100 ngとし、一部変更したTaiwoら、2012年¹⁷の手順を用いてMeDIPに供した。MeDIPでは、Diagenode MagMeDIPキット(Cat # C02010021)を一部変更した製造者の手順に従って使用した。0.3 ngの対照メチル化及び0.3 ngの対照非メチル化シロイヌナズナDNA、(DNAの総量[cfDNA + フィラー + 対照]を100 ngにするための)フィラーDNA並びに緩衝剤をアダプター連結DNAを含むPCR管に添加後、試料を95 に10分間加熱し、次いですぐに氷水浴中に10分間置いた。各試料を2個の0.2 mL PCR管に分配した。一方は10%入力対照用であり、他方は免疫沈降に供される試料である。MagMeDIPキットからの含まれる5-mCモノクローナル抗体33D3(Cat # C15200081)を希釈抗体混合物の生成前に1:15希釈し、試料に添加した。洗浄磁気ビーズ(製造者の指示に従う)も4 で17時間のインキュベーション前に添加した。試料をDiagenode iPure Kitを用いて精製し、50 µlの緩衝剤C中に溶出させた。次のステップに進む前に、反応(QC1)の成功を、添加シロイヌナズナDNAの存在を検出するqPCRによって検証し、非メチル化添加DNAの回収% < 1%及び反応の特異性% > 99%(1 - [添加非メチル化対照DNAの回収/添加メチル化対照DNAの回収]によって計算)を確認した。各ライブラリを増幅する最適サイクル数をqPCRを使用して決定し、その後、試料をKAPA HiFi Hotstart Mastermixを用いて増幅し、NEBNext Multiplex Oligosを最終濃度0.3 µMまで添加した。ライブラリを増幅に使用されるPCR設定は以下の通りであった: 95 で3分間活性化、続いて所定のサイクルの98 20秒間、65 15秒間及び72 30秒間、並びに72 1分間の最終伸長。増幅されたライブラリをMinElute PCR精製カラムを用いて精製し、次いでゲルサイズを3%Nusieve GTGアガロースゲルを用いて選択して、アダプター二量体を除去した。配列決定に供する前に、メチル化ヒトDNA領域(精巢特異的H2B、TSH2B)及び非メチル化ヒトDNA領域(GAPDHプロモーター)の濃縮倍率を、無細胞DNA(ATCCから得られる細胞系、マイコプラズマフリー)を模倣するように剪断されたHCT116細胞系DNAから生成されるMeDIP-seq及びcfMeDIP-seqライブラリについて測定した。最終ライブラリをBioAnalyzer分析に供した後、UHN Princess Margaret Genomic CentreにおいてIllumina HiSeq 2000で配列決定した。

【0050】

フィラーDNAにおける異なるメチル化%

cfMeDIP-seqを手順のフィラー成分におけるメチル化と非メチル化ラムダDNAの異なる%を用いて以下のように実施した。

【0051】

【表 1】

DNA最終量を免疫沈降前に100ngに増加させる フィラー(ラムダ)DNA の使用。無細胞DNAの 開始量は10ng、 5ng及び1ngである。	%メチル化フィラー	%非メチル化フィラー
	100	0
	85	15
	70	30
	50	50
	30	70
	15	85
	0	100
フィラーDNA無使用－免疫沈降前の開始DNA10ng、5ng又は1ngのみ		

10

20

【0052】

図9及び10に示すように、免疫沈降前の最終量を100ngに増加させるのに使用されたフィラーDNA(ラムダDNA)は、メチル化DNAの回収の点で良好な収率を依然として得ながら(図10)、最小回収非メチル化DNAを有するために(図9)、好ましくは、幾らかの人工メチル化DNAをその組成物中に含むべきである(100%~15%)。本発明者らが100%非メチル化フィラーDNAを有する、又は存在するフィラーDNAがない試料においては、メチル化DNAの回収は本当に高いが、非メチル化DNAの回収%も高い。これは、フィラーDNA中の追加のメチル化DNAが反応中に存在する過剰の抗体を占有するのを助け、試料中に存在する非メチル化DNAとの非特異的結合の量を最小にすることを示している。メチル化DNAが試料全体でどのくらい存在するかは不明であり、これは試料ごとに大きく異なり得るので、異なる無細胞DNA試料を使用する場合には抗体量の最適化があまり経済的でなく、又は可能でさえないことを考慮すると、このフィラーDNAは、異なる開始量を規準化するのを助け、異なる無細胞DNA試料を同様に処理することができ(すなわち、等量の抗体を使用する)、それでも、良好なメチル化データをそれから回収することができる。

30

【0053】

点変異検出のための超深度標的配列決定

本発明者らは、QIAGEN Circulating Nucleic Acidキットを使用して、Princess Margaret Cancer Centreにおいて初期臨床試験登録前に作成された対応腫瘍組織分子プロファイリングデータを有する患者由来の約20mLの血漿(4~5×10mL EDTA採血管)から無細胞DNAを単離した。DNAを細胞系(CRC及びMM細胞系の希釈)からPure Gene Gentraキットを用いて抽出し、Covaris超音波処理器を用いて約180bpに断片化し、より大きいサイズ断片をAmpureビーズを用いて排除して、無細胞DNAの断片サイズを模倣した。DNA塩基配列決定ライブラリを83ngの断片化DNAからNEXTflex-96 DNA Barcodeアダプター(Bio Scientific、オースティン、TX)アダプターを利用するKAPA Hyper Prep Kit(Kapa Biosystems、ウィルミントン、MA)を用いて構築した。

40

50

既知の変異を含むDNA断片を単離するために、本発明者らは、Illumina TruSeq Amplicon Cancer Panelを用いて臨床検査室によって試験された48の遺伝子から変異ホットスポットを標的にしたビオチン化DNA捕捉プローブ(xGen Lockdown Custom Probes Mini Pool、Integrated DNA Technologies、Coralville、IA)を設計した。バーコードライブラリをプールし、次いでカスタムハイブリッド捕捉ライブラリを製造者の指示(IDT xGEN Lockdown手順バージョン2.1)に従って適用した。これらの断片をIllumina HiSeq 2000機器を用いて $>10,000\times$ リードカバー度まで配列決定した。得られたリードをbwa-memを用いて整列させ、変異をSAMtools及びmutectバージョン1.1.4を用いて検出した。

10

【0054】

腫瘍特異的特徴の数と配列決定深さによる検出確率との関係のモデル化

本発明者らは、145,000個のシミュレートされたゲノムを作製した。癌特異的メチル化DMRの割合は、0.001%、0.01%、0.1%、1%及び10%に設定され、それぞれ1、10、100、1000及び10000個の独立したDMRからなった。本発明者らは、14,500個の二倍体ゲノム(100ngのDNAに相当する)をこれらの最初の混合物から採取し、10、100、1000及び10000リード/遺伝子座を更に採取して、これらの深さにおける配列決定カバー度を表した。このプロセスをカバー度、存在量及び特徴数の各組合せで100回繰り返した。本発明者らは、パラメータ

20

【0055】

膵癌患者及び健常ドナーのcfDNAからの差次的メチル化領域の計算及び可視化

24名の膵癌(PC:Pancreatic Cancer)患者及び24名の健常ドナーからのcfDNA試料間の差次的メチル化領域(DMR)をMEDIPS Rパッケージを用いて計算した²⁵。各試料について、BAMアラインメント(対ヒトゲノムhg19)ファイルを使用して、MEDIPS R対象を作製した。次に、2セットの試料からのRPKMをt検定で比較することによってDMRを計算した。t検定からの生のp値をBenjamini-Hochberg手順によって調節した。次いで、DMRを調節p値が0.1未満であるすべての窓として定義した。38,085個の総DMRが見いだされ、6,651個が膵癌患者におけるHyper、31,544個がHypoであった。これらのDMRからのスケール付きRPKM値をヒートマップとして示した(図5C)。このヒートマップは、距離関数「ユークリッド」、列方向クラスタリングに対するクラスタリング関数「ward」、及び行方向クラスタリングの「average」で作成された。

30

【0056】

24個の膵癌組織及び5個の正常PBMCからのRRBS試料の比較

RRBSによってプロファイルされた5個の正常PBMC試料をGEOからダウンロードして(受託ID GSE89473の全対照試料)、それらのメチル化プロファイルを24個の膵癌組織RRBS試料と比較した。ダウンロードしたBEDファイルをR methylKitパッケージで構文解析し、処理した²⁶。次いで、これらの5個の試料を24名の膵癌患者からの同様に処理されたRRBS試料と比較した。カスタム機能を使用して、24個のPC試料のうち少なくとも18個、及び5個のPBMC試料のうち4個中に存在するCpGを抽出し、常染色体中のCpGのみが保持され、1,806,808個のCpGのバックグラウンドセットを作製した。これらから、Benjamini-Hochbergで調節された $p < 0.01$ 及びデルタベータ > 0.25 の基準を用いてDMCを得た。134,021個のDMCは、膵癌においてPBMCに比べてHyperであることがわかった。同様に、同じq値カットオフ及びデルタベータ < -0.25 を用い

40

50

て、本発明者らは179, 662個のHypo DMCを得た。合計313, 683個のDMCを対応するボルケーノプロットにおいて赤い点で示し(図7F)、q値の負のlog10をデルタベータに対してプロットした(負のlog10 q値=2における水平線は、DMCをコールするためのq値カットオフであり、垂直点線はデルタベータカットオフである)。

【0057】

原発腫瘍対正常PBMCからの、並びに膵癌患者及び健常ドナーのcfDNAからの差次的メチル化シグナルの重複の評価

順列分析を行って、血漿中で同定されたDMR(本発明者らのcfMeDIP-seq手順に供された循環cfDNA)と原発腫瘍組織中で同定された癌特異的DMC(RRBS)の予想対観察重複の頻度を比較した。本発明者らは、可能性のある4つの例を調べた: Hyper DMRと重複するHyper DMC、Hypo DMRと重複するHyper DMC、Hypo DMRと重複するHypo DMC、及び最後にHyper DMRと重複するHypo DMC。各例では、Hyper又はHypo DMCをHyper又はHypo DMRと重ねて、「生物学的交差」数を得た。次いで、DMCの各セットを1, 806, 808個のCpGのバックグラウンドセット全体にわたって無作為に1000回混合し、DMRの各セットと再度重複させた。これらの無作為な生物学的交差をZスコアを用いて同じスケール上に置き、それぞれボックスプロット及び菱形で示した(図5E)。これらのプロットにおける水平の点線は、ボンフェローニ補正から誘導されるq値0.05に関連するカットオフZスコアである。

【0058】

24個の膵癌組織及び24個の正常組織からのRRBS試料の比較、これらの組織から並びに膵癌患者及び健常ドナーのcfDNAからの差次的メチル化シグナルの重複の評価

5個の正常PBMC試料と比較した24個のPC試料を同じ患者由来の24個の正常組織とも別々に比較した。バックグラウンドセット(763, 874個のCpG)及びPC中のDMC Hyper & Hypo(それぞれ34, 013 & 11, 160)を同じ方法で計算し、これらを使用して、ボルケーノプロット(図7C)とボックスプロット(図5D)を同様に作成した。

【0059】

24個のPC及び24個の健常cfDNA試料上のPCAプロット

本発明者らは、上位百万の最も変わりやすい全ゲノム窓を用いた24個のPC及び24個の健常cfDNA試料についてのPCAによる目的変数なしのクラスタリング分析を行った(図7A~B)。各窓について、可変性を平均絶対偏差(MAD)測定規準によって計算した。これは、データの中央値から絶対偏差の中央値を返す堅牢な測定であり、データは、所与の窓に対するこれら48試料にわたるRPKM値である。

【0060】

24個のPC及び24個の健常cfDNA試料において低メチル化されたモチーフに関連するTFのGTEx発現プロファイルを有するヒートマップ

RNA-seqデータをGTExデータベースから全ヒト遺伝子に対する組織による中央値RPKMの形で得た(ファイルGTEx_Analysis_v6p_RNA-seq_RNA-SeQCv1.1.8_gene_median_rpkms.gct.gz under <https://gtexportal.org/home/datasets> から得た)。目的TFをそれらの遺伝子名と適合させ、ヒートマップ(図8A、8C)を全組織にわたってスケール付けされた各TFの中央値RPKMを用いて作成した。距離関数「manhattan」及びクラスタリング関数「average」を行方向クラスタリングと列方向クラスタリングの両方に使用した。

【0061】

24個のPC及び24個の健常cfDNA試料において低メチル化されたモチーフに関連するTFのGTEx発現プロファイルを有するバイオリンプロット

本発明者らが症例対対照における低メチル化領域において有意に濃縮されたモチーフを

10

20

30

40

50

検出したTFが、膵癌試料において有意に上方制御されるかどうか推定するために、本発明者らはssGSEAスコアを検定統計量とした無作為化検定を使用した。各試料について、本発明者らは、低メチル化モチーフに有意に関連することが判明した85個のTF、及び85個のTFの無作為な1,000セットを用いてスコアを計算した(全ヒットTFのリストを<http://www.tfcheckpoint.org/data/>にあるファイルTFCheckpoint_download_180515.txtから得た)。TCGA上の178名の膵臓腺癌患者からの発現レベルを使用した。

【0062】

これらのスコアの分布を関連バイオリンプロットに見ることができる(図8E)。

【0063】

次いで、ウィルコクソン順位和検定を使用して、不規則分布と観察分布を比較して、 p 値 $< 2.2 \times 10^{-16}$ を得た。

【0064】

同じ分析を正常膵臓のGTEXデータに対して行った(図8D)。全血のGTEXデータに対してそのモチーフが健常ドナーからの血漿cfDNAにおける低メチル化フットプリントとして同定されたTF($n=33$)でも分析を繰り返した(図8B)。

【0065】

結果/考察

cfDNAメチル化マッピングに適切な全ゲノム方法

ここで記述するcfMeDIP-seq法は、100ngの入力DNAまで堅牢である既存の低入力MeDIP-seq手順¹⁷の改変によって開発された。しかし、血漿試料の大部分は、100ngよりはるかに少ないDNAを生成する。この難題を克服するために、本発明者らは、開始DNAの量を100ngに人為的に膨張させるために、外来λDNA(フィラーDNA)をアダプター連結cfDNAライブラリに添加した(図2)。これは、抗体による非特異的結合の量を最小にし、プラスチック製品との結合のために失われるDNAの量も最小にする。フィラーDNAは、アダプター連結cfDNAライブラリにサイズが類似したアンプリコンからなり、非メチル化DNA及びCpG密度の異なるインビトロメチル化DNAで構成された。異なる患者は異なる量のcfDNAを生成するので、このフィラーDNAの添加は、実用にも役立ち、入力DNA量を100ngに規準化することができる。これによって、利用可能なcfDNAの量にかかわらず、下流の手順

【0066】

本発明者らは、まず、cfDNAで認められたものと類似の断片サイズに剪断されたヒト結腸直腸癌細胞系HCT116からのDNAを用いて、cfMeDIP-seq手順を確認した。HCT116を選択したのは、公的DNAメチル化データが入手可能だからであった。本発明者らは、100ngの剪断細胞系DNAを用いた最も基準となるMeDIP-seq手順¹⁷と10ng、5ng及び1ngの同じ剪断細胞系DNAを用いたcfMeDIP-seq手順を同時に行った。これを2つの生物学的複製において行った。すべての条件で、本発明者らは、99%を超える反応の特異性(1-[添加非メチル化対照DNAの回収/添加メチル化対照DNAの回収])、及び非メチル化領域(GAPDH)を超える公知メチル化領域(TSH2B0)の極めて高い濃縮を得た(図3B)。

【0067】

ライブラリを約3000~7000万リード/ライブラリ(表2)で飽和まで配列決定した(図3A)。生のリードをヒトゲノムとλゲノムの両方と整列させ、λゲノムと実質的にアラインメントがないことが判明した(表3A及び3B)。したがって、フィラーDNAとしての外来λDNAの添加は、配列決定データの生成を妨害しなかった。最後に、本発明者らは、免疫沈降ステップの品質管理手段としてCpG濃縮スコアを計算する²⁵。すべてのライブラリはCpGに対して類似の濃縮を示したが、入力対照は、予想通り、濃縮を示さず(図3C)、極低入力(1ng)でも本発明者らの免疫沈降の有効性を確認した。

10

20

30

40

50

【0068】

異なる入力DNAレベルを比較する全ゲノム相関推定によれば、MeDIP-seq (100 ng) 法とcfMeDIP-seq (10、5及び1 ng) 法の両方が極めて堅牢であり、ピアソン相関が任意の2つの生物学的複製間で少なくとも0.94であった(図1B)。分析の更に示すところによれば、5及び10 ngの入力DNAにおけるcfMeDIP-seqは、従来のMeDIP-seqによって100 ngで得られるメチル化プロファイルを堅牢に再現することができる(少なくとも0.9のペアワイズピアソン相関)(図1B)。1 ngの入力DNAにおけるcfMeDIP-seqの性能は、100 ngにおけるMeDIP-seqよりも低下するが、それでも>0.7の強いピアソン相関を示す(図1B)。本発明者らは、cfMeDIP-seq手順が、最も基準となるReduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) 及びWhole-Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) を用いたHCT116のDNAメチル化プロファイルを再現することも認めた(図1C)。要するに、発明者らのデータが示唆するところによれば、cfMeDIP-seqは、循環cfDNAなどの断片化された低入力DNA材料の全ゲノムメチル化マッピングの堅牢な手順である。

10

【0069】

cfMeDIP-seqは、腫瘍由来のctDNAの検出で高感度を示す

cfMeDIP-seq手順の感度を評価するために、本発明者らは、結腸直腸癌(CRC) HCT116細胞系DNAを多発性骨髄腫(MM) MM1.S細胞系DNAに段階希釈した。どちらもcfDNAサイズを模倣するように剪断された。本発明者らは、CRC DNAを100%、10%、1%、0.1%、0.01%、0.001%から0%に希釈し、これらの希釈の各々についてcfMeDIP-seqを行った(図4A~D)。本発明者らは、同じ試料における3点変異の検出のために超深度(10,000×中央値カバー度)標的配列決定も行った。5%偽陽性率(FDR: False Discovery rate) 閾値を用いた各CRC希釈ポイント対純粋MM DNAで同定されたDMRの観察数は、希釈係数に基づくDMRの予想数と0.001%希釈までほぼ完全に線形($r^2 = 0.99$ 、 $p < 0.0001$)であった(図1D)。さらに、これらのDMR内のDNAメチル化シグナルも、観察対予想シグナルでほぼ完全な線形性を示す($r^2 = 0.99$ 、 $p < 0.0001$)(図1E)。それに対して、1%希釈を超えると、超深度標的配列決定は、PCR又は配列決定誤差のために、CRC特異的変異体と偽変異体を確実に識別することができなかった(図1F)。したがって、cfMeDIP-seqは、癌由来のDNAの検出感度に優れ、標準手順を用いた超深度標的配列決定による変異体検出の性能を超える。

20

30

【0070】

癌DNAは、CpGリッチ領域において頻繁に高メチル化される¹。cfMeDIP-seqはメチル化CpGリッチ配列を特異的に標的にするので、本発明者らは、ctDNAが免疫沈降手順中に優先的に濃縮されると仮定した。これを試験するために、本発明者らは、2名の結腸直腸癌患者から患者由来の異種移植片(PDX: patient-derived xenograft)を作製し、マウス血漿を収集した。腫瘍由来のヒトcfDNAは、入力試料中の総cfDNAプール内で1%未満の頻度で存在し、免疫沈降後2倍の存在量で存在した(図1G)。これらの結果の示唆するところによれば、ctDNAの偏りのある配列決定によって、cfMeDIP手順は、ctDNA検出感度を更に増加させることができた。

40

【0071】

血漿cfDNAのメチローム分析は、初期膵臓腺癌患者を健常ドナーから識別する

本発明者らは、血漿cfDNAのメチローム分析を初期癌におけるctDNAの検出に使用できるかどうか検討することにした。本発明者らは、24名の初期膵癌患者(症例)並びに24名の年齢及び性別対応健常ドナー(対照)の手術前血漿のメチローム分析を行った(表4A、4B及び5)。各患者について、高腫瘍純度のレーザーキャプチャー顕微

50

解剖 (LCM: laser-capture microdissected) 腫瘍試料及び正常組織試料を調べた。cfMeDIP-seqを腫瘍及び正常組織上の循環cfDNA及びRRBSに対して行った(図5A及び図6、表6A及び6B)。t検定及びBenjamini-Hochberg補正を多重検定に使用して、本発明者らは、症例と対照cfDNAの間で38,085個のDMRを得た($p < 0.01$ 、 $q < 0.1$)(図5B~C)。

【0072】

症例と対照のcfDNAメチル化プロファイルの相違がctDNAの存在によるかどうか評価するために、外科的切除後に同じ患者から得られた原発腫瘍及び正常組織のDNAメチル化パターンをRRBSによってマップした。本発明者らは、腫瘍($n = 24$)と正常($n = 24$)組織の間で45,173個の差次的メチル化CpG(DMC: differentially methylated CpG)を同定した(図7A~C)。

10

【0073】

それらの最初の腫瘍のメチル化プロファイルを再現する際のcfDNAメチル化プロファイルの有用性を、腫瘍中のDMCとcfDNA中のDMRの組合せ(どちらも高メチル化、どちらも低メチル化、一方が高メチル化で他方が低メチル化)についてバックグラウンドに対する濃縮を調べることによって試験した。本発明者らは、cfDNAにおける一致方向の腫瘍特異的高メチル化及び低メチル化部位の有意な濃縮を認めたが、腫瘍特異的高メチル化部位はcfDNA低メチル化DMRでは提示不足であった(図5D)。実際、腫瘍中の所与の領域のDNAメチル化状態と血漿cfDNAにおけるメチル化プロファイルは相関する(図7D~E)。

20

【0074】

最後に、特に初期の、癌患者における血漿cfDNA分子の大部分は、非腫瘍由来であり、血球から放出される可能性があるので¹⁴、本発明者らは、膵臓腺癌腫瘍組織と正常末梢血単核球(PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell)のDNAメチル化差違を評価した。本発明者らは、腫瘍($n = 24$)とPBMC($n = 5$)の間で313,683個のDMCを同定した(図7F)。本発明者らは、cfDNAにおける一致方向の腫瘍特異的高メチル化及び低メチル化部位の有意な濃縮を認めたが、腫瘍特異的高メチル化部位はcfDNA低メチル化DMRでは提示不足であった(図5E)。ここでも、腫瘍中の所与の領域のDNAメチル化状態と血漿cfDNAにおけるメチル化プロファイルは相関する(図7G~H)。

30

【0075】

要するに、これらの結果の示唆するところによれば、症例と対照の循環cfDNAメチル化プロファイルの相違は、主として循環系における腫瘍由来のDNAの存在によるものであった(図5D~E及び図7C~H)。

【0076】

血漿cfDNAメチロームは、腫瘍関連活性転写因子ネットワークの推定を可能にする

症例と対照の間のDMRは、腫瘍由来のDMRでは高度に濃縮されるので(図5D~E)、本発明者らは、cfDNAメチロームが腫瘍特異的又は組織関連活性転写因子に関連したモチーフの濃縮を明らかにすると仮定した。これらのcfDNAメチロームを使用して、これらのDNA分子の起源組織における活性転写ネットワークを推測することができた。TFの大部分が標的配列のDNAメチル化状態に基づく可変の結合を示すので²⁸、活性転写ネットワークを推測するために、本発明者らは、cfDNA中のDMRが転写因子(TF)フットプリントの濃縮を明らかにし得るかどうか検討した。モチーフ分析をHOMERソフトウェア²⁰を用いて低メチル化DMRに対して、健常ドナー(図8A)と膵癌患者(図8C)で別々に行って²⁰、潜在的TFフットプリントを明らかにした。

40

【0077】

本発明者らは、膵臓腺癌症例に比べて健常ドナーにおいて33個のモチーフを低メチル化フットプリントとして同定し、健常ドナーに比べて膵臓腺癌症例において85個のモチーフを低メチル化フットプリントとして同定した。

50

【0078】

健常ドナーにおいて低メチル化フットプリントとして同定された33個のモチーフのうち、本発明者らは、PU.1、Flt1、STAT5B及びKLF1を含めて、造血系統において優先的に発現される幾つかのTFを同定した(図8A~B)。

【0079】

同様に、膵臓腺癌症例において低メチル化フットプリントとして同定された85個のモチーフのうち、本発明者らは、RBPJL、PTF1a、Onecut1(HNF6)及びNR5A2を含めて、膵臓において優先的に発現される幾つかのTFを同定した(図8C~D)。膵臓腺癌症例において低メチル化フットプリントとして同定されたTFモチーフは、TCGAからの膵臓腺癌患者においても頻繁に過剰発現された(図8E)。さらに、本発明者らは、膵癌の各分子サブタイプのドライバーとして以前に同定されたTFに対応する、膵臓腺癌症例における幾つかの低メチル化フットプリントを同定することができた^{2,4}。これらには、c-MYC及びHIF1a(扁平上皮サブタイプドライバー)、NR5A2、MAFA、RBPJL及びNEUROD1(ADEXドライバー)並びに最後にFOX A2及びHNF4A(膵臓前駆細胞サブタイプ)が含まれた。

10

【0080】

要するに、これらの結果の示唆するところによれば、循環cfDNAのメチローム分析を使用して、差次的メチル化TFフットプリントに基づく腫瘍内の活性転写ネットワークを推測することができ、健常ドナーと癌患者の間の免疫細胞集団の全身的シフトを同定できる可能性がある。

20

【0081】

ここで、発明者らは、循環無細胞DNAなどの超低入力、断片化DNAに適した新規全ゲノムDNAメチル化法を示す。本発明者らは、cfMeDIP-seqが低レベルの入力DNAにおいて極めて堅牢であり、ライブラリの迅速な作製を可能にすることを示すことができた。さらに、本発明者らの方法はメチル化DNAの濃縮に依拠するので、ライブラリを飽和まで配列決定するには、約3000万~7000万リード/ライブラリしか必要でなく、全ゲノム配列決定を不要にし、関連コストをかなり削減する。比較的低コストに加えて短い所要時間によって、cfMeDIP-seqを臨床現場に素早く移すことができる。

【0082】

さらに、cfMeDIP-seqは、ゲノム情報ではなくエピジェネティック情報に依拠するので、非悪性疾患の広範なセットにおいて組織損傷を非侵襲的にモニターするのに使用できる可能性がある。例えば、それを使用して、感染に対する、又は癌免疫療法後の、免疫応答をモニターすることができ、心筋梗塞後の循環中の心臓DNA、又は神経変性疾患初期の脳DNAをモニターすることができる。

30

【0083】

最後に、腫瘍学に関連して、複数の癌タイプが臨床的に異なるサブグループを有することが判明した。これらのサブグループは、多数の癌タイプの中でも、グリア芽細胞腫³、上衣腫⁴、結腸直腸⁵、乳房^{6,7}及び膵癌^{2,4}における予後予測因子を有する異なるDNAメチル化プロファイルによって層別化することができる。最近のデータの示唆するところによれば、膵癌患者を幾つかの機序によって駆動される4つのサブグループに層別化することができる^{2,4}：扁平上皮、膵臓前駆細胞、免疫原性、及び内分泌外分泌異常分化(ADEX: aberrantly differentiated endocrine exocrine)。膵癌患者の循環cfDNAメチロームにおいては、本発明者らは、これらのサブタイプを駆動するTFからの低メチル化フットプリントを同定することができた。例えば、本発明者らは、扁平上皮サブタイプにおいて濃縮された2つの経路MYC及びHIF1アルファ(低酸素誘導因子1-アルファ)を同定した^{2,4}。本発明者らは、前駆細胞サブタイプにおいて濃縮された2つのTF、HNF4A及びFOX A2を同定することもできた^{2,4}。最後に、本発明者らは、ADEXサブタイプにおいて濃縮された3つのTF、NR5A2、RBPJL及びMAFAを同定することもできた^{2,4}。これ

40

50

が示唆するところによれば、c f M e D I P - s e q は、癌患者を低侵襲手法で層別化するバイオマーカーとして使用することもできた。

【 0 0 8 4 】

本発明を特定の実施形態に関して記述した。本発明の精神及び範囲内にありながら変化及び変更を加え得ることは、当業者に明白であろう。本明細書に開示される特定の実施形態は、保護範囲を限定することを意図したものではなく、保護範囲は、特許請求の範囲によってのみ決定されるべきである。本明細書に開示されるすべての刊行物及び参考文献を参照によりその全体を援用する。

【 0 0 8 5 】

【表 2】

10

表1: Taiwoら、2012年からの腸内細菌ファージλ PCR産物の産生に使用されるPCRプライマー

名称	順方向プライマー	逆方向プライマー
1CpG	GAGGTGATAAAATTAAGTGC	GGCTCTACCATATCTCCTA
5CpG	CATGTCCAGAGCTCATTC	GTTTAAAATCACTAGGCGA
10CpG	CTGACCATTTCATCATTC	GTAATAAACAGGAGCCG
15CpG	ATGTATCCATTGAGCATTGCC	CACGAATCAGCGGTAAAGGT
20CpGL	GAGATATGGTAGAGCCGCAGA	TTTCAGCAGCTACAGTCAGAATTT
20CpGS	CGATGGGTAAATTCGCTCGTTGTGG	GCACAACGGAAAGAGCACTG

20

【 0 0 8 6 】

【表 3】

表2:ヒトHg19ゲノム及びλゲノムに対する、cfDNAを模倣するように剪断された様々な濃度のHCT116細胞系DNAを用いて調製された配列決定MeDIP-seq及びcfMeDIP-seqライブラリのリード数及びマッピング効率。開始濃度100ng未満の場合、試料に外来λDNAを補充して、開始量をMeDIP前に100ngに人為的に増加した。

試料	生のリード#	ヒトゲノム (Hg19) に対する 整列リード#	ヒトゲノム (Hg19) に対する マッピング 効率	λゲノム に対する 整列 リード#	λゲノムに 対する マッピング 効率
入力	74,504,053	71,343,168	95.76	12	0.00
100ng 複製1	55,396,238	50,472,273	91.11	0	0.00
100ng 複製2	66,569,209	60,770,277	91.29	1	0.00
10ng 複製1	70,054,607	64,020,441	91.39	0	0.00
10ng 複製2	58,297,539	53,308,777	91.44	0	0.00
5ng 複製1	65,845,430	60,540,743	91.94	1	0.00
5ng 複製2	64,750,879	59,358,412	91.67	0	0.00
1ng 複製1	35,102,361	32,258,451	91.90	0	0.00
1ng 複製2	33,881,118	31,194,711	92.07	0	0.00

【 0 0 8 7 】

【表 4】

表3A:ヒトHg19ゲノム及びλゲノムに対する、膵癌患者由来のcfDNAを用いて調製された配列決定cfMeDIP-seqライブラリのリード数及びマッピング効率。

症例	生のリード#	整列リード#	ヒトゲノム (Hg19) に対する マッピング効率	λゲノム に対する 整列リード#	λゲノム に対する マッピング効率
1	49,970,366	46,120,982	92.30	1	0.00
2	55,642,277	50,829,279	91.35	0	0.00
3	48,034,998	43,973,048	91.54	0	0.00
4	56,274,788	51,456,978	91.44	0	0.00
5	50,999,157	46,608,023	91.39	1	0.00
6	55,127,192	50,906,050	92.34	0	0.00
7	53,955,550	49,028,646	90.87	0	0.00
8	55,482,420	51,194,364	92.27	1	0.00
9	57,626,914	53,446,965	92.75	0	0.00
10	58,397,946	53,904,793	92.31	0	0.00
11	59,048,723	54,529,214	92.35	0	0.00
12	54,514,051	49,619,174	91.02	1	0.00
13	70,758,028	63,842,005	90.23	0	0.00
14	60,317,171	55,124,638	91.39	0	0.00
15	45,187,670	41,341,336	91.49	0	0.00
16	50,755,880	46,309,615	91.24	2	0.00
17	51,582,370	47,256,012	91.61	1	0.00
18	52,081,710	47,763,766	91.71	0	0.00
19	53,845,426	48,602,035	90.26	0	0.00
20	48,133,619	43,658,379	90.70	0	0.00
21	54,237,903	49,286,048	90.87	0	0.00
22	58,627,625	53,654,439	91.52	1	0.00
23	52,748,183	49,179,765	93.23	0	0.00
24	60,072,026	55,046,660	91.63	0	0.00

10

20

30

40

【 0 0 8 8 】

【表 5】

表 3B: ヒト Hg19 ゲノム 及び λ ゲノム に対する、健常ドナー由来の cfDNA を用いて調製された配列決定 cfMeDIP-seq ライブラリのリード数 及び マッピング効率。

対照	生のリード#	整列リード#	ヒトゲノム (Hg19) に対する マッピング効率	λゲノム に対する 整列リード#	λゲノム に対する マッピング効率
1	44,162,563	40,184,943	90.99	1	0.00
2	33,350,539	30,585,488	91.71	0	0.00
3	43,937,337	40,160,512	91.40	0	0.00
4	44,292,409	40,182,945	90.72	0	0.00
5	54,732,283	50,135,420	91.60	0	0.00
6	52,576,198	48,139,158	91.56	0	0.00
7	47,619,930	42,684,336	89.64	0	0.00
8	51,213,827	46,529,314	90.85	0	0.00
9	48,935,317	44,487,195	90.91	1	0.00
10	56,055,796	51,971,671	92.71	0	0.00
11	54,769,256	50,075,252	91.43	0	0.00
12	50,625,023	45,869,378	90.61	1	0.00
13	51,015,277	46,252,402	90.66	0	0.00
14	58,266,281	53,191,317	91.29	1	0.00
15	55,663,935	50,447,271	90.63	0	0.00
16	44,004,381	39,533,012	89.84	1	0.00
17	55,459,971	50,786,298	91.57	0	0.00
18	52,610,463	48,293,244	91.79	0	0.00
19	46,806,153	42,677,554	91.18	0	0.00
20	63,267,324	57,692,667	91.19	0	0.00
21	51,213,236	46,637,533	91.07	0	0.00
22	54,380,628	49,267,997	90.60	0	0.00
23	44,608,650	40,685,531	91.21	0	0.00
24	52,118,117	47,734,519	91.59	0	0.00

10

20

30

40

【表 6】

表4A:膵癌患者の対応する性別及び年齢

症例	性別(1=男性、2=女性)	年齢範囲
1	1	70<75
2	2	65<70
3	1	50<55
4	1	65<70
5	2	60<65
6	2	80<85
7	1	60<65
8	2	70<75
9	2	60<65
10	1	50<55
11	1	70<75
12	2	50<55
13	1	60<65
14	2	75<80
15	2	55<60
16	2	80<85
17	1	55<60
18	2	55<60
19	2	65<70
20	2	60<65
21	1	65<70
22	1	65<70
23	2	<50
24	1	65<70

10

20

30

40

【 0 0 9 0 】

【表 7】

表 4B: 健常ドナーの対応する性別及び年齢

対照	性別 (1 = 男性、2 = 女性)	年齢範囲
1	1	60<65
2	2	55<60
3	1	70<75
4	1	85+
5	2	80<85
6	2	<50
7	1	80<85
8	2	60<65
9	2	85+
10	1	60<65
11	1	70<75
12	2	55<60
13	1	50<55
14	2	70<75
15	2	70<75
16	2	80<85
17	1	50<55
18	2	70<75
19	2	70<75
20	2	70<75
21	1	75<80
22	1	<50
23	2	60<65
24	1	80<85

10

20

30

40

【 0 0 9 1 】

【表 8】

表 5: 膵臓症例試料の腺癌の病態

病期	症例数
I-II	23
III-IV	1

50

【 0 0 9 2 】

【 表 9 】

表6A:膵癌患者由来の高腫瘍純度のレーザーキャプチャーマイクロダイセクション濃縮(LCM)腫瘍試料を用いて調製された配列決定RRBSライブラリのリード数、マッピング効率、亜硫酸水素塩変換効率及びCpGカバー度。

症例 由来の 腫瘍	生のリード#	ヒトゲノム (Hg19) に対する 整列リード#	ヒトゲノム (Hg19) に対する マッピング効率	亜硫酸水素 塩変換効率	最小カバー度 が10リードの CpG#
1	36,348,593	22,050,682	60.7	99.65	1,152,313
2	56,788,591	35,512,606	62.5	98.29	1,790,326
3	55,115,742	35,229,781	63.9	98.94	1,630,272
4	58,503,145	37,373,806	63.9	99.48	1,777,824
5	54,364,708	34,274,401	63.0	98.84	2,053,577
6	57,291,238	34,912,515	60.9	99.23	2,001,726
7	42,683,835	25,509,282	59.8	97.79	1,471,270
8	51,393,779	31,437,264	61.2	99.52	1,745,355
9	66,023,766	41,284,714	62.5	99.17	1,788,895
10	37,026,164	20,805,815	56.2	98.67	1,435,724
11	40,053,025	22,116,738	55.2	99.47	1,521,135
12	42,065,012	23,591,687	56.1	98.22	1,599,425
13	34,527,362	22,101,495	64.0	99.79	733,408
14	38,624,627	23,317,534	60.4	99.82	952,714
15	36,799,407	22,072,921	60.0	98.45	1,442,393
16	33,672,535	19,735,978	58.6	98.70	1,064,718
17	51,918,938	32,239,409	62.1	99.08	1,810,260
18	26,344,807	15,531,839	59.0	99.87	792,650
19	43,744,321	26,819,066	61.3	98.45	1,510,987
20	49,861,059	28,520,788	57.2	97.75	1,852,841
21	44,061,826	27,903,839	63.3	99.68	1,368,522
22	55,029,698	33,444,993	60.8	99.10	2,006,233
23	70,468,323	45,424,428	64.5	97.86	2,331,030
24	42,043,232	24,828,943	59.1	97.44	1,520,504

10

20

30

40

【 0 0 9 3 】

【表 10】

表6B:膵癌患者健常ドナー由来のレーザーキャプチャーマイクロダイセクション濃縮(LCM)正常組織試料を用いて調製された配列決定RRBSライブラリのリード数、マッピング効率、亜硫酸水素塩変換効率及びCpGカバー度。

症例 由来の 正常組織	生のリード#	ヒトゲノム(Hg19) に対する整列リード#	ヒトゲノム (Hg19) に対する マッピング 効率	亜硫酸水素 塩変換効率	最小 カバー度が 10リードの CpG#
1	44,991,458	25,708,044	57.1	98.88	1,688,179
2	50,603,038	30,001,913	59.3	99.81	1,767,046
3	50,790,690	31,585,415	62.2	99.61	1,733,966
4	49,480,382	30,017,286	60.7	99.60	1,895,462
5	46,587,496	29,742,054	63.8	98.94	1,648,785
6	55,402,162	33,193,299	59.9	99.10	2,149,673
7	35,010,018	20,646,990	59.0	99.83	1,188,194
8	51,130,341	30,543,069	59.7	99.64	1,780,696
9	53,415,206	32,049,549	60.0	99.63	1,720,213
10	40,977,129	22,109,663	54.0	99.60	1,690,112
11	37,913,346	20,202,691	53.3	98.35	638,859
12	47,943,388	26,962,401	56.2	97.74	1,467,609
13	28,416,315	16,532,481	58.2	98.36	1,214,093
14	34,809,298	20,603,577	59.2	99.26	1,105,920
15	36,930,467	21,513,886	58.3	99.76	1,434,653
16	38,762,192	23,242,114	60.0	99.79	1,539,278
17	51,257,989	29,870,486	58.3	99.66	1,915,596
18	28,789,569	17,038,843	59.2	98.21	1,222,106
19	41,387,115	25,996,349	62.8	98.57	1,712,186
20	31,704,499	17,421,599	54.9	99.41	977,256
21	44,152,396	26,604,688	60.3	99.68	1,646,272
22	46,462,469	27,012,950	58.1	99.43	1,940,763
23	53,534,041	33,359,195	62.3	99.50	1,650,915
24	37,042,798	22,775,661	61.5	99.31	435,114

10

20

30

40

【0094】

参考文献

【0095】

【表 1 1】

- 1 Sharma, S., Kelly, T. K. & Jones, P. A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31, 27-36, doi:10.1093/carcin/bgp220 (2010).
- 2 Varley, K. E. *et al.* Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res* 23, 555-567, doi:10.1101/gr.147942.112 (2013).
- 3 Sturm, D. *et al.* Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* 22, 425-437, doi:10.1016/j.ccr.2012.08.024 (2012). 10
- 4 Mack, S. C. *et al.* Epigenomic alterations define lethal CLMP-positive ependymomas of infancy. *Nature* 506, 445-450, doi:10.1038/nature13108 (2014).
- 5 Hinoue, T. *et al.* Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome Res* 22, 271-282, doi:10.1101/gr.117523.110 (2012).
- 6 Stitzaker, C. *et al.* Methylome sequencing in triple-negative breast cancer reveals distinct methylation clusters with prognostic value. *Nat Commun* 6, 5899, doi:10.1038/ncomms6899 (2015). 20
- 7 Fang, F. *et al.* Breast cancer methylomes establish an epigenomic foundation for metastasis. *Sci Transl Med* 3, 75ra25, doi:10.1126/scitranslmed.3001875 (2011).
- 8 Mikeska, T. & Craig, J. M. DNA methylation biomarkers: cancer and beyond. *Genes (Basel)* 5, 821-864, doi:10.3390/genes5030821 (2014).
- 9 Diaz, L. A., Jr. & Bardelli, A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 32, 579-586, doi:10.1200/JCO.2012.45.2011 (2014). 30
- 10 Snyder, T. M., Khush, K. K., Valentine, H. A. & Quake, S. R. Universal noninvasive detection of solid organ transplant rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 6229-6234, doi:10.1073/pnas.1013924108 (2011).
- 11 Chiu, R. W. *et al.* Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20458-20463, doi:10.1073/pnas.0810641105 (2008).
- 12 Fan, H. C., Blumenfeld, Y. J., Chitkara, U., Hudgins, L. & Quake, S. R. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16266-16271, doi:10.1073/pnas.0808319105 (2008). 40
- 13 Newman, A. M. *et al.* An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 20, 548-554, doi:10.1038/nm.3519 (2014).
- 14 Aravanis, A. M., Lee, M. & Klausner, R. D. Next-Generation Sequencing of

【表 1 2】

- Circulating Tumor DNA for Early Cancer Detection. *Cell* 168, 571-574, doi:10.1016/j.cell.2017.01.030 (2017).
- 15 Hoadley, K. A. *et al.* Multiplatform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues of origin. *Cell* 158, 929-944, doi:10.1016/j.cell.2014.06.049 (2014).
- 16 Fleischhacker, M. & Schmidt, B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochim Biophys Acta* 1775, 181-232, doi:10.1016/j.bbcan.2006.10.001 (2007).
- 17 Taiwo, O. *et al.* Methylome analysis using MeDIP-seq with low DNA concentrations. *Nat Protoc* 7, 617-636, doi:10.1038/nprot.2012.012 (2012). 10
- 18 Gu, H. *et al.* Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nat Protoc* 6, 468-481, doi:10.1038/nprot.2010.190 (2011).
- 19 Hung, E. C., Chiu, R. W. & Lo, Y. M. Detection of circulating fetal nucleic acids: a review of methods and applications. *J Clin Pathol* 62, 308-313, doi:10.1136/jcp.2007.048470 (2009).
- 20 Heinz, S. *et al.* Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell* 38, 576-589, doi:10.1016/j.molcel.2010.05.004 (2010). 20
- 21 Consortium, G. T. Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science* 348, 648-660, doi:10.1126/science.1262110 (2015).
- 22 Su, A. I. *et al.* A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6062-6067, doi:10.1073/pnas.0400782101 (2004).
- 23 Wu, C., Jin, X., Tsueng, G., Afrasiabi, C. & Su, A. I. BioGPS: building your own mash-up of gene annotations and expression profiles. *Nucleic Acids Res* 44, D313-316, doi:10.1093/nar/gkv1104 (2016).
- 24 Bailey, P. *et al.* Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*, doi:10.1038/nature16965 (2016). 30
- 25 Lienhard, M., Grimm, C., Morkel, M., Herwig, R. & Chavez, L. MEDIPS: genome-wide differential coverage analysis of sequencing data derived from DNA enrichment experiments. *Bioinformatics* 30, 284-286, doi:10.1093/bioinformatics/btt650 (2014).
- 26 Akalin, A. *et al.* methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biol* 13, R87, doi:10.1186/gb-2012-13-10-r87 (2012).
- 27 Krueger, F. & Andrews, S. R. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics* 27, 1571-1572, doi:10.1093/bioinformatics/btr167 (2011). 40

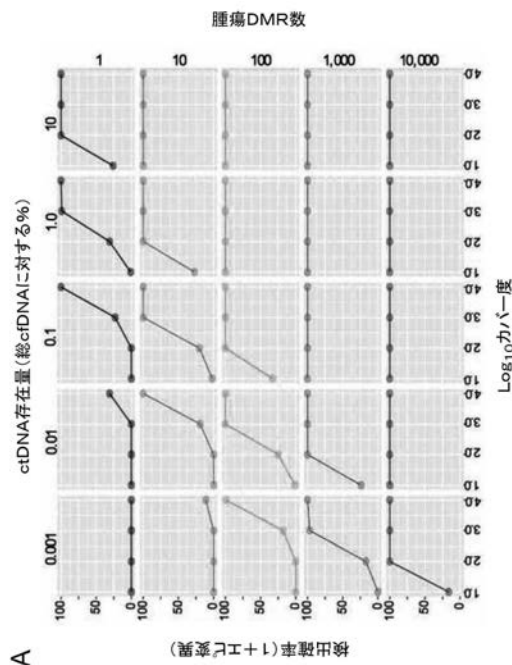
【 0 0 9 7 】

【表 1 3】

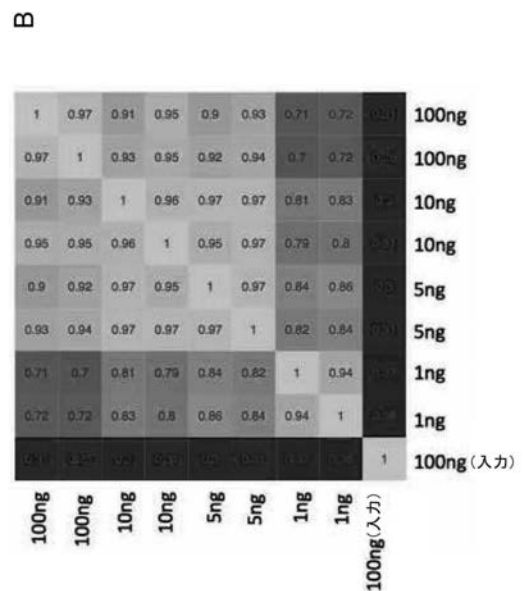
- 28 Hu, S. *et al.* DNA methylation presents distinct binding sites for human transcription factors. *Elife* 2, e00726, doi:10.7554/eLife.00726 (2013).
- 29 Lui, Y. Y. *et al.* Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem* 48, 421-427 (2002).
- 30 Snyder, M. W., Kircher, M., Hill, A. J., Daza, R. M. & Shendure, J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell* 164, 57-68, doi:10.1016/j.cell.2015.11.050 (2016).

10

【図 1 A】



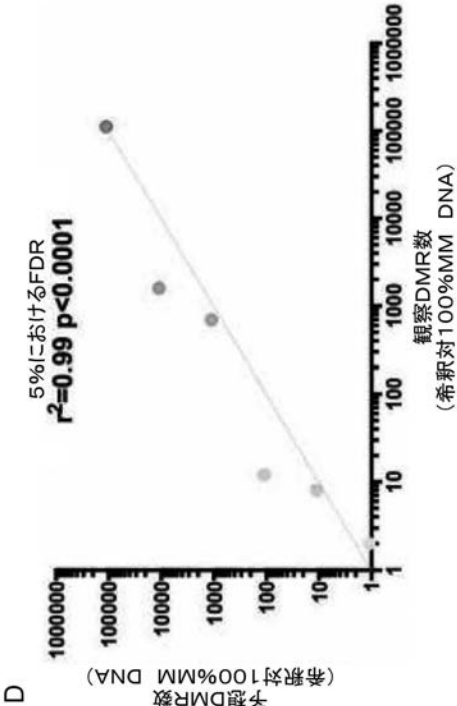
【図 1 B】



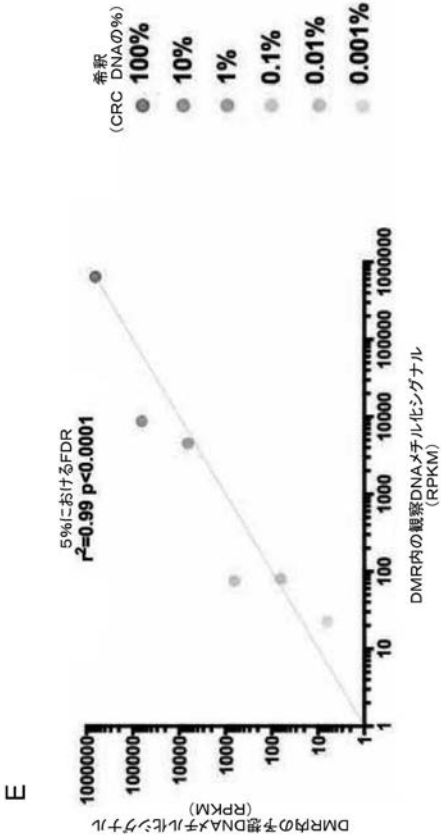
【 図 1 C 】



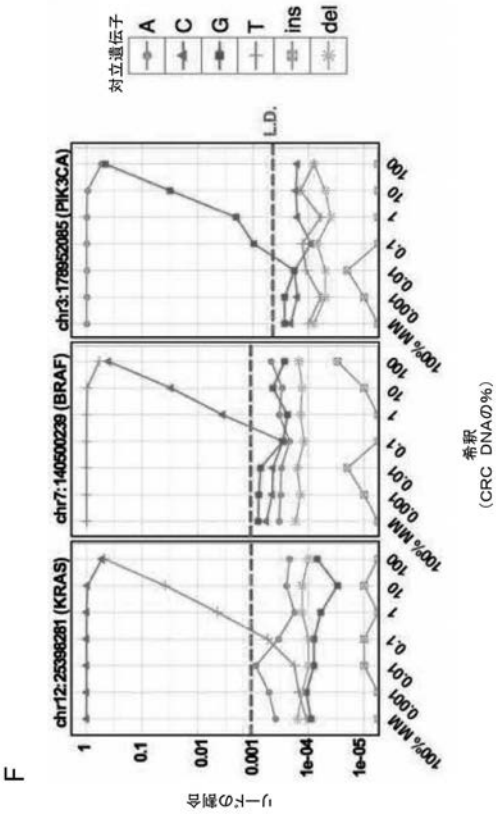
【 図 1 D 】



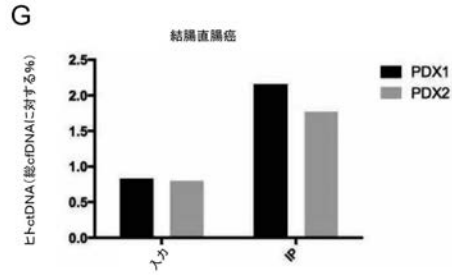
【 図 1 E 】



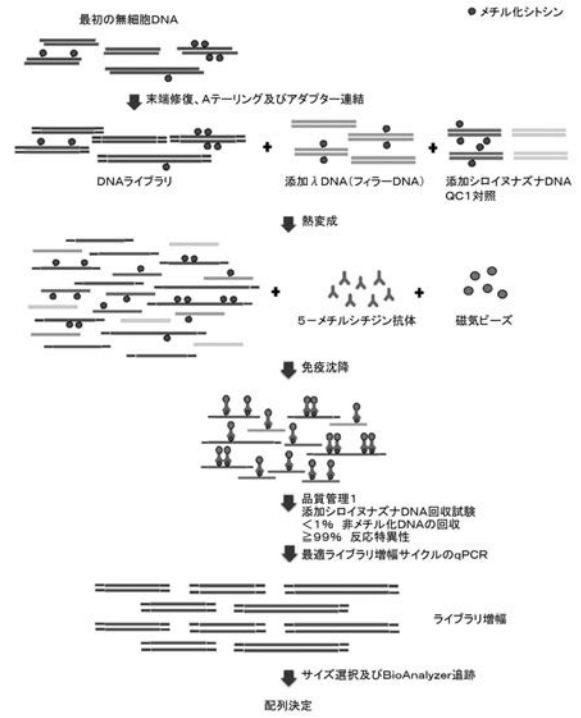
【 図 1 F 】



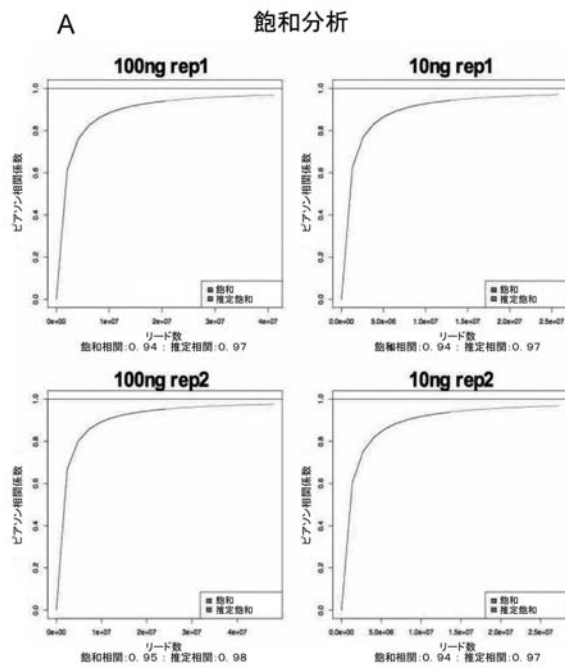
【図 1 G】



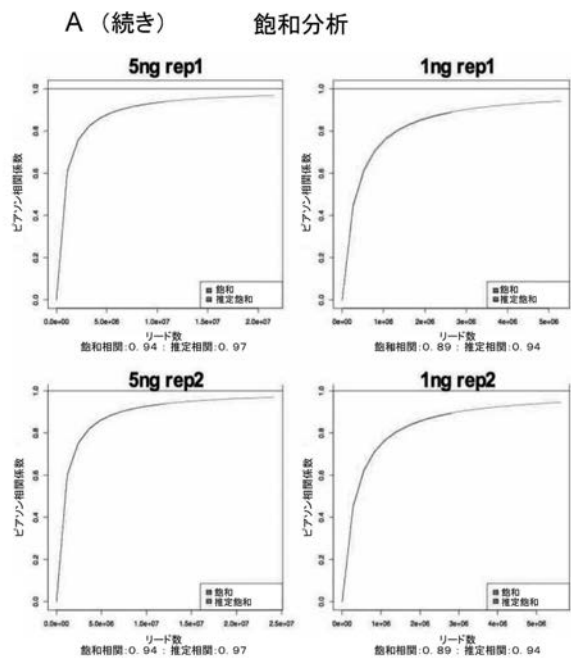
【図 2】



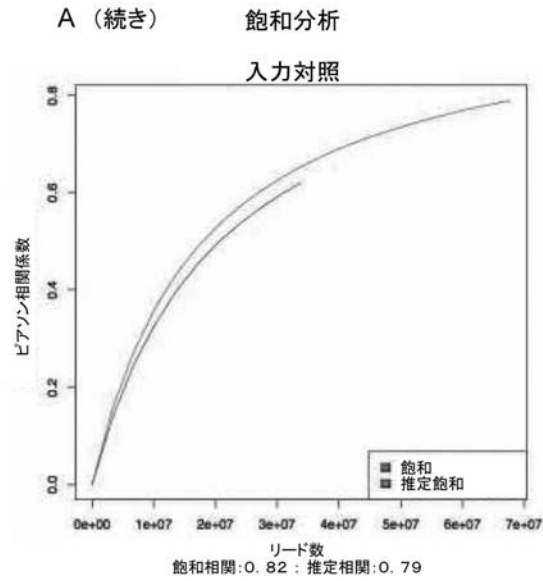
【図 3 A - 1】



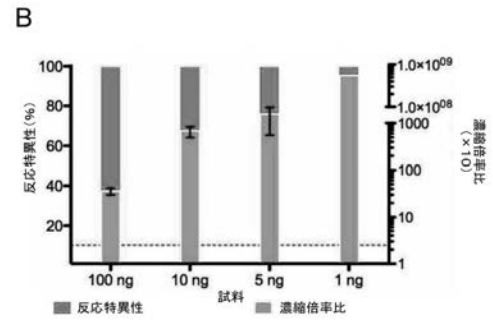
【図 3 A - 2】



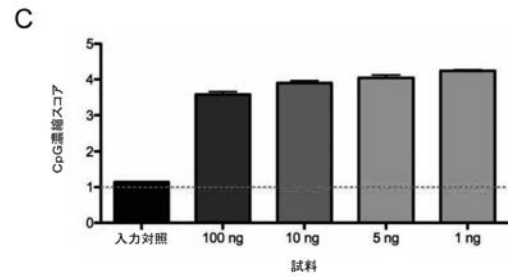
【図 3 A - 3】



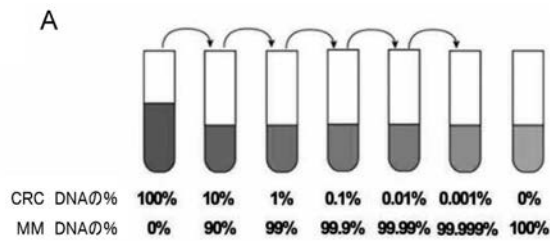
【図 3 B】



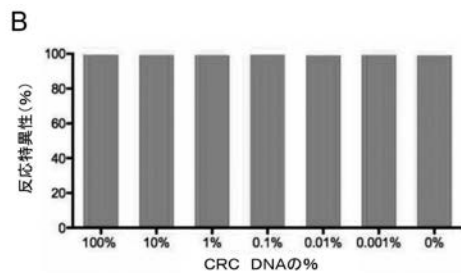
【図 3 C】



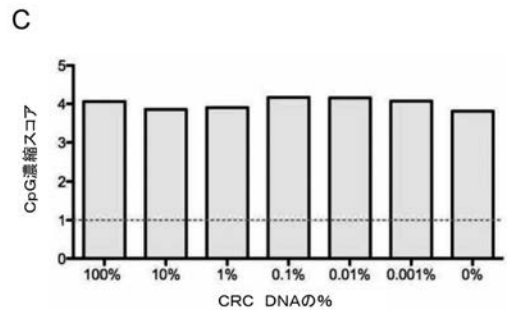
【図 4 A】



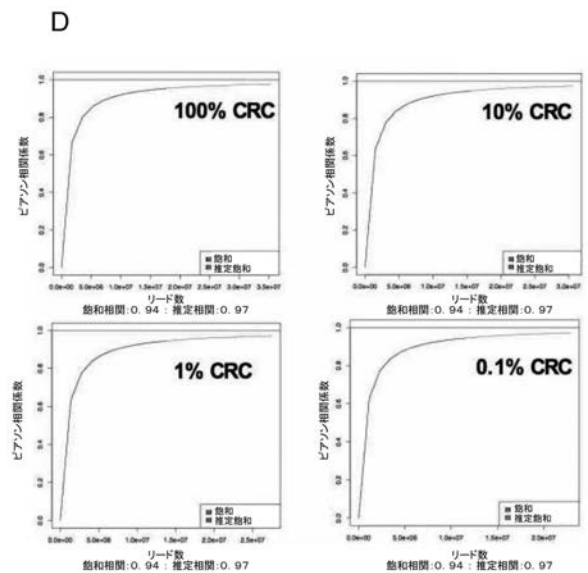
【図 4 B】



【図 4 C】

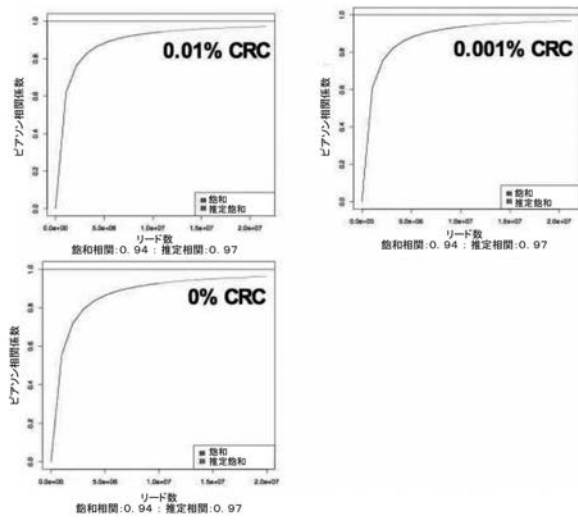


【図 4 D - 1】

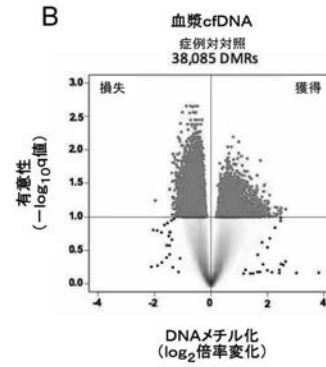


【図4D-2】

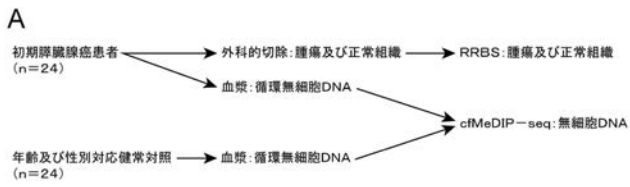
D (続き)



【図5B】

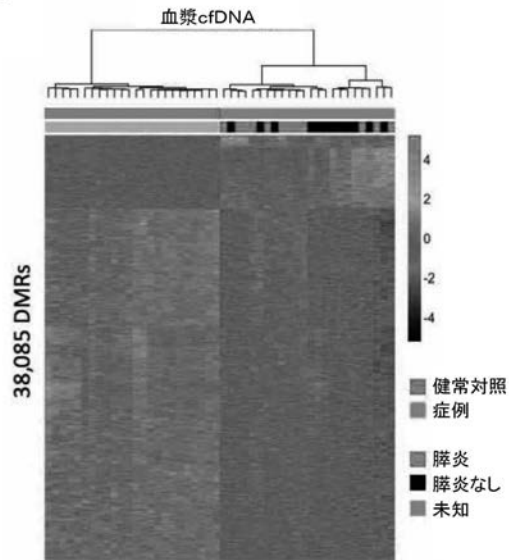


【図5A】



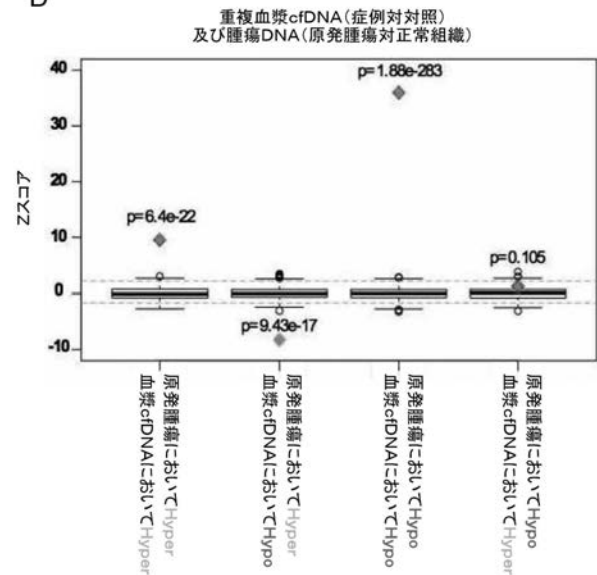
【図5C】

C

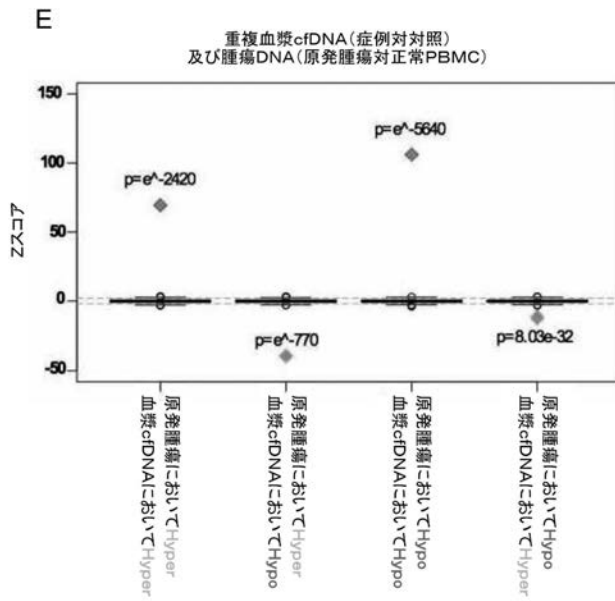


【図5D】

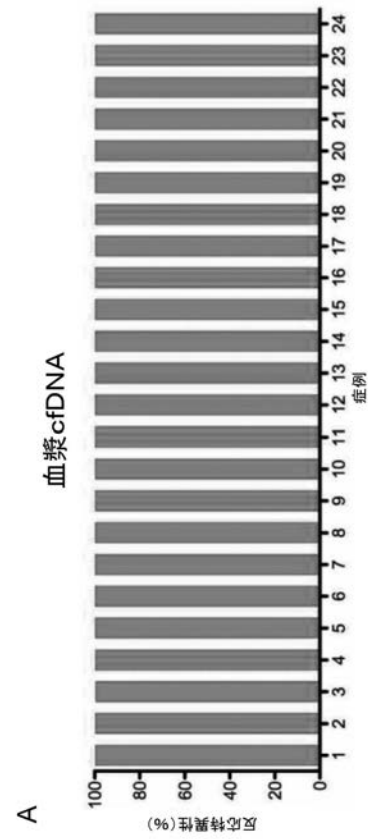
D



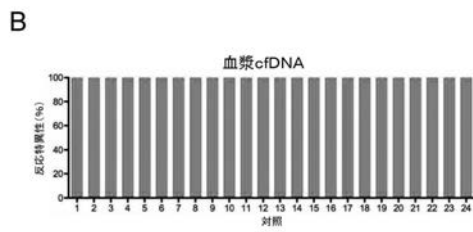
【図 5 E】



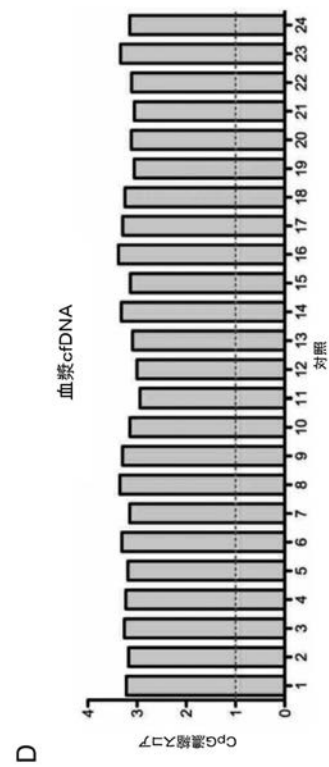
【図 6 A】



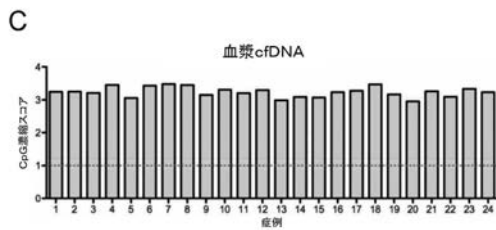
【図 6 B】



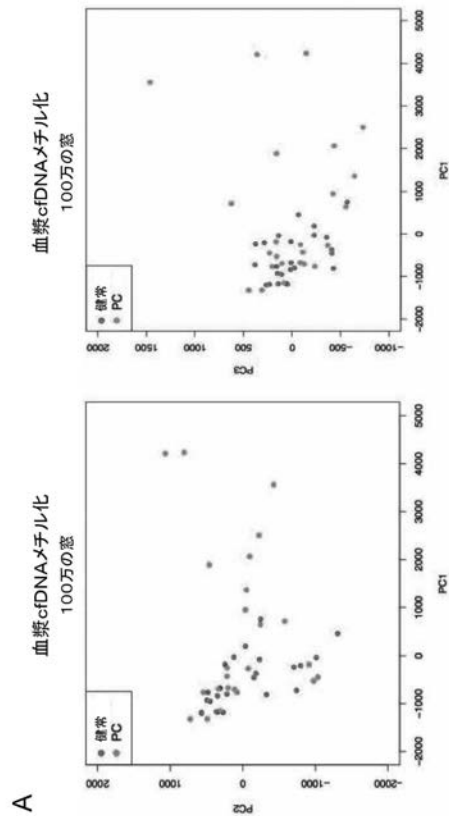
【図 6 D】



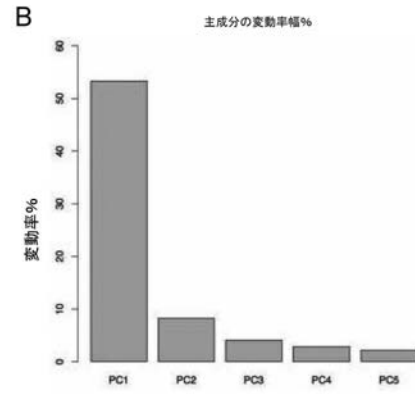
【図 6 C】



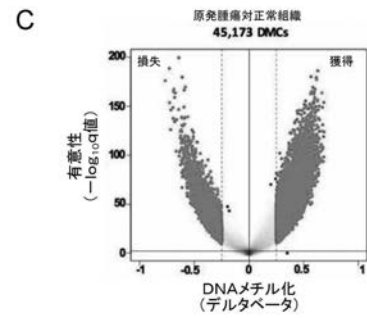
【図 7 A】



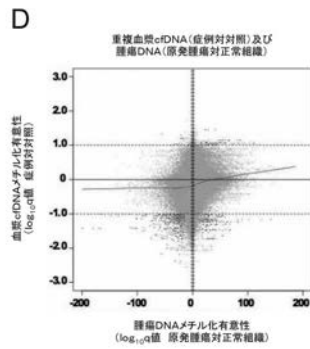
【図 7 B】



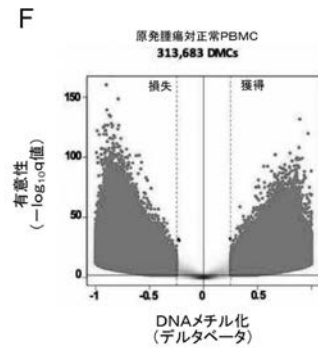
【図 7 C】



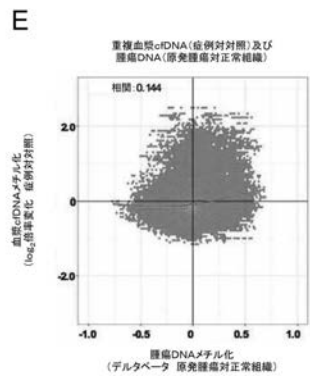
【図 7 D】



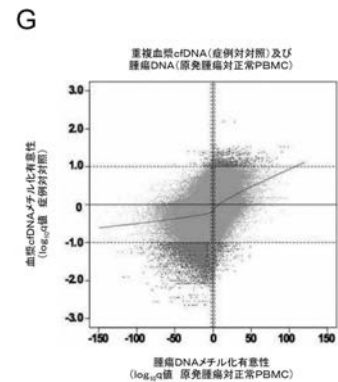
【図 7 F】



【図 7 E】

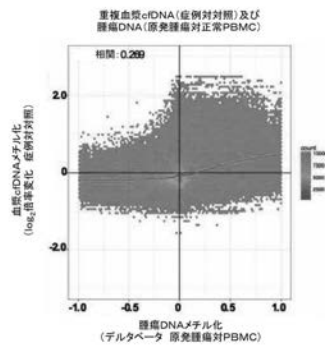


【図 7 G】

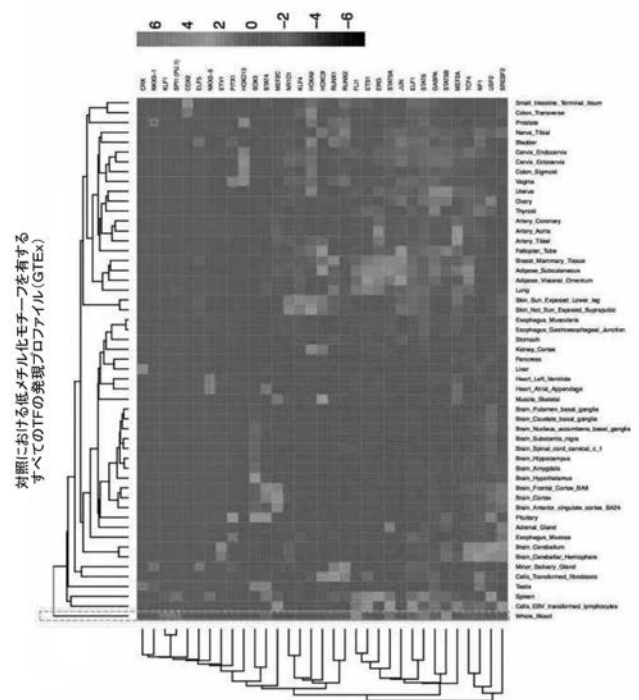


【図 7 H】

H



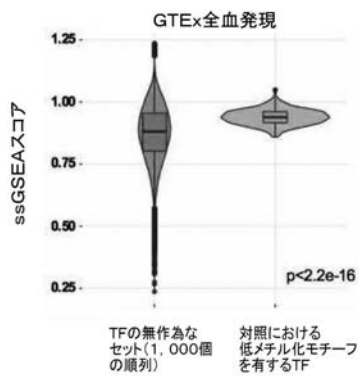
【図 8 A】



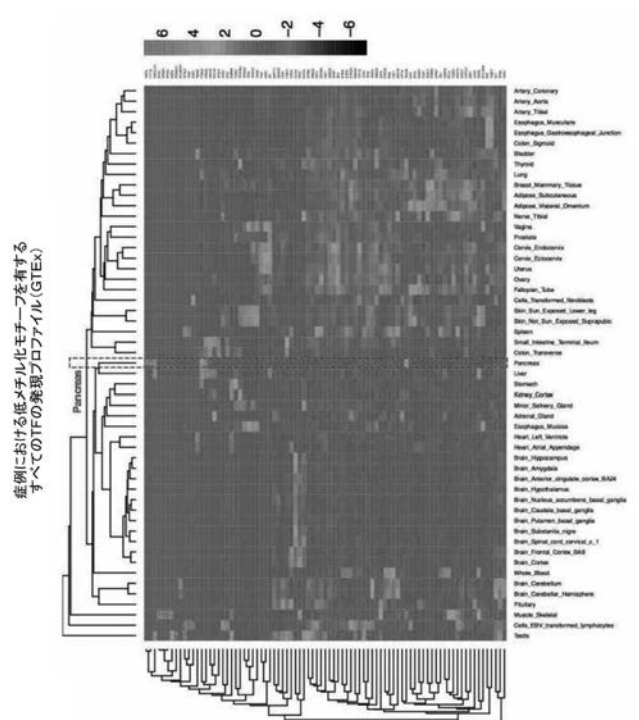
A

【図 8 B】

B

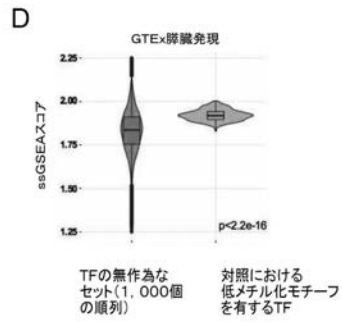


【図 8 C】

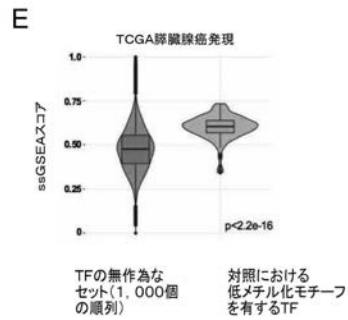


C

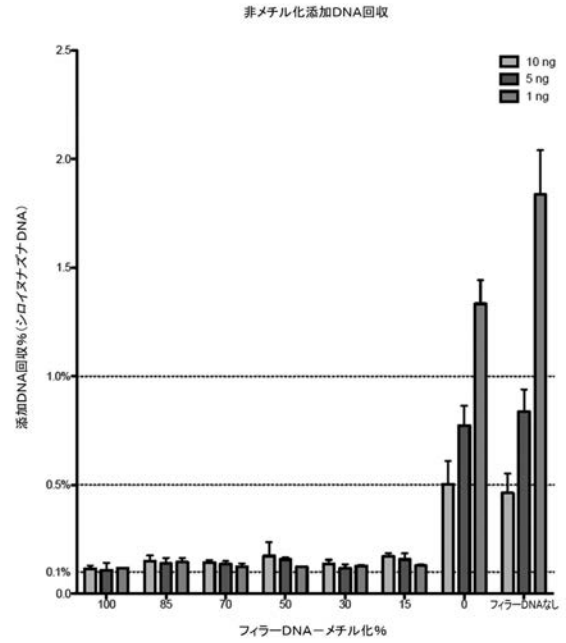
【図 8 D】



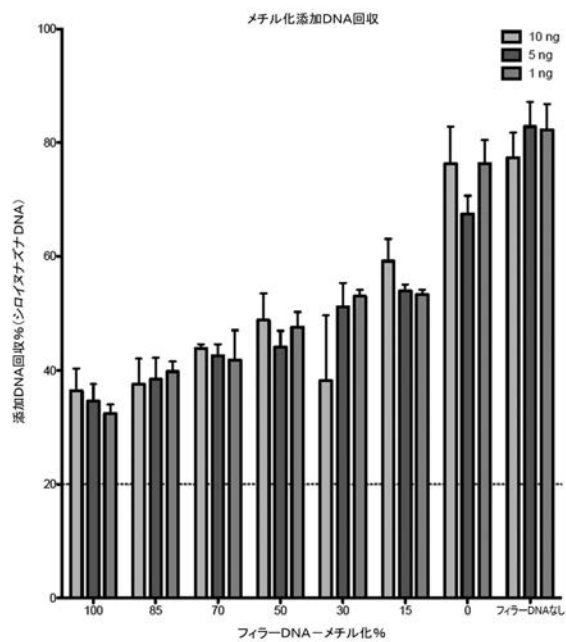
【図 8 E】



【図 9】



【図 10】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2017/000108
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C12Q 1/68</i> (2006.01), <i>C12N 15/10</i> (2006.01), <i>C40B 30/04</i> (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC (2006.01): C12Q, C12N, C40B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Scopus, Google Scholar, Questel Orbit		
Keywords: cell-free, cfDNA, methylated, methylation, MeDIP, immunoprecipitation, DNA, capture, detect, method, autoimmune		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	TAIWO, O. et al (8 March 2012) Methylome analysis using MeDIP-seq with low DNA concentrations. NATURE PROTOCOLS 7: 617-636. ISSN: 1750-2799 *whole document*	1-20 21-26
X Y	ZHAO, M-T et al (2014) Methylated DNA Immunoprecipitation and High-Throughput Sequencing (MeDIP-seq) Using Low Amounts of Genomic DNA. CELLULAR REPROGRAMMING 16: 1-10, ISSN: 2152-4998 *whole document*	1-20 21-26
Y	LEHMANN-WERMAN, R. et al (14 March 2016) Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. PNAS PLUS 113: E1826-E1834. ISSN: 1091-6490 *whole document*	21-26
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 6 June 2017 (06-06-2017)		Date of mailing of the international search report 28 June 2017 (28-06-2017)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476		Authorized officer Kerry Ferguson (819) 639-7804

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CA2017/000108

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HEYN, H. et al (4 September 2012) DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. NATURE REVIEWS GENETICS 13 : 679-692. ISSN: 1471-0064 *whole document*	21-26

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 15/10 (2006.01) C 1 2 N 15/10 1 0 0

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(74) 代理人 100185269

弁理士 小菅 一弘

(72) 発明者 デ カルヴァルホ ダニエル ディニズ

カナダ国 オンタリオ州 エム 4 イー 3 エックス 7 トロント ドラモンドビル レーン 3 1

(72) 発明者 シェン シュー イー

カナダ国 オンタリオ州 エル 3 アール 0 ヴィ 9 マーカム ミリケン メドーズ ドライブ
2 1 3

(72) 発明者 シンガニア ラジャット

カナダ国 オンタリオ州 エム 4 ワイ 1 エイチ 5 トロント ウェレスレイ ストリート イー
スト 1 0 0 アpartment 8 0 6

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA08 QA19 QQ02 QQ42 QR32 QR40 QS33 QS36

4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	捕获无细胞甲基化DNA的方法及其用途		
公开(公告)号	JP2019521315A	公开(公告)日	2019-07-25
申请号	JP2018557336	申请日	2017-05-03
[标]申请(专利权)人(译)	大学健康网络		
申请(专利权)人(译)	大学健康网络		
发明人	デ カルヴァルホ ダニエル ディニズ シェン シュー イー シンガニア ラジャット		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 C12Q1/6806 C07K16/44 C12Q1/06 C12N15/10		
CPC分类号	C12N15/1003 C12N15/1093 C12Q1/6804 C12Q1/6806 C12Q1/6886 C12Q2600/154 C12N15/10 G01N33/5308 C12Q2522/101 C12Q2525/186 C12Q2535/122 C12Q2537/164 C12Q2527/125 C40B30/04		
FI分类号	G01N33/53.M G01N33/574.Z C12Q1/6806 C07K16/44 C12Q1/06 C12N15/10.100		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR40 4B063/QS33 4B063/QS36 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	和义林 斋藤卓也 小菅一弘		
优先权	62/331070 2016-05-03 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文描述了从含有少于100mg无细胞DNA的样品中捕获无细胞甲基化DNA的方法，其中将样品进行文库制备，然后测序无细胞甲基化DNA。向样品中加入第一量填料DNA的步骤，其中至少一部分填料DNA被甲基化，使样品变性，并选择甲基化多核苷酸使用典型的结合剂捕获无细胞的甲基化DNA。[选择]图2

