

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6778190号
(P6778190)

(45) 発行日 令和2年10月28日 (2020. 10. 28)

(24) 登録日 令和2年10月13日 (2020. 10. 13)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/04 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/04 Z N A
C 1 2 Q 1/6809 (2018. 01)	C 1 2 Q 1/6809 Z
C 1 2 N 15/117 (2010. 01)	C 1 2 N 15/117 Z
C 1 2 N 5/0783 (2010. 01)	C 1 2 N 5/0783

請求項の数 11 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2017-529294 (P2017-529294)	(73) 特許権者	511145937
(86) (22) 出願日	平成27年12月4日 (2015. 12. 4)		エビオンティス ゲーエムベーハー
(65) 公表番号	特表2017-537623 (P2017-537623A)		ドイツ, 1 2 4 8 9 ベルリン, ルードア
(43) 公表日	平成29年12月21日 (2017. 12. 21)		ー ショッセ 2 9
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/078725	(74) 代理人	100088904
(87) 国際公開番号	W02016/087663		弁理士 庄司 隆
(87) 国際公開日	平成28年6月9日 (2016. 6. 9)	(74) 代理人	100124453
審査請求日	平成30年10月18日 (2018. 10. 18)		弁理士 資延 由利子
(31) 優先権主張番号	14196613.5	(74) 代理人	100135208
(32) 優先日	平成26年12月5日 (2014. 12. 5)		弁理士 大杉 卓也
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100163544
			弁理士 平田 緑
		(72) 発明者	オレク, スフェン
			ドイツ, 1 2 2 0 7 ベルリン, ボオート
			シュトラーセ 1 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 濾胞性ヘルパー T (TFH) 細胞を同定するためのエピジェネティック法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプルにおける濾胞性ヘルパーT細胞を同定する方法であって、該方法が白血病阻止因子 (LIF) における哺乳動物の遺伝子領域の少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態を分析することを含み、前記少なくとも1つのCpG位置が配列番号1に示されるバイサルファイト変換された配列におけるCpG位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22及び23から選択されるものであり、前記遺伝子領域の脱メチル化が非濾胞性ヘルパーT細胞と比べたときに濾胞性ヘルパーT細胞の指標となる、方法。

【請求項 2】

メチル化特異性酵素消化、CpGアイランドメチル化状態の分析、メチル化特異的PCR (MSP)、Ms-SNUPE、及び増幅DNAの検出に基づく他の方法から選択される少なくとも1つの方法をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

濾胞性ヘルパーT細胞の相対量を、分析する領域におけるメチル化頻度の相対量と、GAPDHの対照遺伝子におけるメチル化頻度の相対量との比較に基づいて定量することを更に含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記サンプルがヒト血液サンプルを含む哺乳動物の体液、又は組織、器官若しくは細胞型の血液サンプル、血中リンパ球のサンプル若しくはその画分から選択される、請求項 1

10

20

～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

B細胞、細胞傷害性T細胞、顆粒球、単球、NK細胞及びヘルパーT細胞から選択される細胞型の全て又は少なくとも1つから前記濾胞性ヘルパーT細胞を区別することを更に含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

同定する前記細胞を、全血及び／又は非トリプシン処理組織を使用して精製及び／又は富化する工程なしに行われる、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

同定される前記濾胞性ヘルパーT細胞に基づいて前記哺乳動物の全体的な免疫活性状態を決定する指標を提供する工程を更に含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項8】

哺乳動物において濾胞性ヘルパーT細胞のレベルをモニタリングする方法であって、請求項3～7のいずれか一項に記載の方法を行うことと、同定された前記細胞の相対量を、同じ哺乳動物から先に又は並行して採取したサンプル及び／又は対照サンプルと比較することを含む、方法。

【請求項9】

前記哺乳動物に与える化学物質及び／又は生物学的物質に応じて前記濾胞性ヘルパー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1～8のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項10】

前記哺乳動物が自己免疫疾患、移植片拒絶反応、感染性疾患、癌及び／又はアレルギーを患っているか、又はそれらを患う可能性がある、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

哺乳動物から得られたサンプルにおいて濾胞性ヘルパーT細胞を、LIFの遺伝子領域のCpG位置のバイサルファイト接近性の分析に基づいて同定、定量及び／又はモニタリングするためのキットの使用であって、a) バイサルファイト試薬、及びb) 配列番号1に示されるバイサルファイト変換された配列におけるCpG位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22及び23から選択されるCpG位置のメチル

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、白血病阻止因子（LIF）における哺乳動物の遺伝子領域の少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態を分析することを含み、上記遺伝子領域の脱メチル化が非濾胞性ヘルパーT細胞と比べたときに濾胞性ヘルパーT細胞の指標となる、濾胞性ヘルパーT細胞を同定するための方法、特にin vitro方法に関する。本発明による分析は、エピジェネティックレベルでの濾胞性ヘルパーT細胞を同定し、複合サンプルにおける他の全ての細胞、例えば他の血液細胞等から濾胞性ヘルパーT細胞を区別することができる。本発明は、複合サンプルにおける濾胞性ヘルパーT細胞を定量する改良された方法を更に提供する。該方法は、好ましくは全血及び／又は非トリプシン処理組織中の細胞を精製及び／又は富化する工程なしに行うことができる。

40

【0002】

さらに、本発明は、上記の方法の実行用のキット及びそのそれぞれの使用に関する。本発明の一目的は、哺乳動物の任意の固形臓器若しくは組織内の血液又は任意の体液の濾胞性ヘルパーT細胞を定量的に検出及び測定する、新規のより確実な手段を提供することである。

【背景技術】

【0003】

50

B細胞に対するT細胞の働きには、獲得免疫（adaptive immunity：適応免疫）の基本的な側面及び免疫記憶の作製がある。濾胞性BヘルパーT細胞（単に濾胞性ヘルパーT細胞又はTFHとしても知られる）は、リンパ節、脾臓及びパイエル板等の二次リンパ器官のB細胞濾胞の周囲に見つかる抗原感作型CD4⁺ T細胞であり、通常、B細胞濾胞ホーミング受容体であるCXCR5の恒常的発現（constitutive expression：構成的発現）により同定される（非特許文献1）。

【0004】

T（FH）細胞は、マスターレギュレーターである転写因子Bcl6の発現に左右される。T（FH）細胞を区別する他の特徴は、他の分子の中でも、PD-1、SAP（SH2D1A）、IL-21及びICOSが発現することであり、またBlimp-1（prdm1）が存在しないことである。T（FH）細胞は胚中心の形成に重要である。胚中心が形成されると、T（FH）細胞は胚中心を維持し、胚中心B細胞の血漿細胞及びメモリーB細胞への分化を調節しようとする。

【0005】

高等生物は、個体のほとんどの細胞がDNAコードの全く同じ相補体含有するにもかかわらず、様々な組織型において異なるパターンの遺伝子発現を行い、維持しなければならない。大抵の遺伝子調節は細胞の現状に応じた一時的なものであり、外部刺激によって変化する。一方で、持続的な調節は、エピジェネティクス（DNAの基本的な遺伝コードを変更しない遺伝的な調節パターン）の基本的法則（role）である。DNAメチル化は後成的調節の典型的な形態であり、安定な細胞記憶として機能し、様々な細胞型の長期同一性を維持するうえで重要な役割を果たす。近年、後成的調節の他の形態が発見された。「5番目の塩基」である5-メチルシトシン（mC）に加えて、6番目の塩基（5-ヒドロキシメチルシトシン、hmC）、7番目の塩基（5-ホルミルシトシン、fC）及び8番目の塩基（5-カルボキシシトシン、cC）を見出すことができる（非特許文献2）。

【0006】

上述のDNA修飾の主要な標的は、2ヌクレオチド配列であるシトシン-グアニン（「CpG部位」）であり、この状況でシトシン（C）は簡単な化学修飾を受けてホルミル化、メチル化、ヒドロキシメチル化又はカルボキシル化し得る。ヒトゲノムにおいては、CG配列は、「CpGアイランド」と呼ばれる或る特定の比較的密なクラスター以外については予想されるよりもはるかに稀である。CpGアイランドは遺伝子プロモーターと関連することが多く、半数を超えるヒト遺伝子がCpGアイランドを有すると推定されている（非特許文献3）。

【0007】

異常なDNAメチル化は、しばしば健常細胞から癌性細胞への形質転換を伴う。観察される影響には、ゲノム規模での低メチル化、腫瘍抑制遺伝子のメチル化の増大及び多くの癌遺伝子の低メチル化がある（例えば非特許文献4、非特許文献5及び非特許文献6に概説される）。メチル化プロファイルは腫瘍特異的である（すなわち、特定の遺伝子又は更には個々のCpGのメチル化パターンの変化は、特定の腫瘍型の診断に用いられる）ことが認識されており、現在では、膀胱癌、乳癌、結腸癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、肺癌及び前立腺癌の大規模な診断マーカー群が存在する（例えば非特許文献6に要約される）。

【0008】

近年記載されているシトシンの修飾の1つである5-ヒドロキシメチル化については、CpGアイランドの5hmCをマッピング及び定量する酸化バイサルファイトシークエンシングの有用性が示されている（非特許文献2）。高レベルの5hmCが、転写調節因子と関連するCpGアイランド及び長鎖散在反復配列（long interspersed nuclearelements）に見られた。これらの領域が胚性幹細胞において後成的リプログラミングを受ける可能性があることが示唆されている。

【0009】

Hale JS et al.（非特許文献7）は、遺伝子発現プロファイル、エピジェネティック研究並びに表現型及び機能的分析に基づいて、Tfh細胞系統又はTh1細胞系統のいずれかに分化決定する個別のメモリーCD4(+) T細胞集団があることを見出した。グランザイムB遺伝

10

20

30

40

50

子座をエピジェネティックに修飾することで、TfhメモリーCD4⁺ T細胞とTh1メモリーCD4⁺ T細胞とが区別される。

【0010】

Kashiwakuma et al. (非特許文献8) は、濾胞性Th (Tfh) 細胞は非Th1エフェクターT細胞、非Th2エフェクターT細胞であり、これらの細胞がCXCR5を発現し、B細胞に働きかけてIgを産生し、またリンパ球アテニュエーター (BTLA) を発現することを開示している。

【0011】

特許文献1は、薬学的に有効な量のCD8⁺ T細胞阻害剤を投与することによって受容者において移植した組織又は細胞の免疫による拒絶を治療、阻止又は予防する方法を記載している。

10

【0012】

特許文献2は、1つ又は複数のナイーブCD4⁺ T細胞を準備する工程と、1つ又は複数のナイーブCD4⁺ T細胞をサイトカイン又はIL-6/TGF- β /IL-12若しくはIL-12若しくはTGF- β 及びIL-12から選択されるサイトカインカクテルと接触させる工程と、1つ又は複数のナイーブCD4⁺ T細胞を1つ又は複数のIL-21産生Tfh細胞に分化させる工程とを含む、ナイーブCD4⁺ T細胞から対象のIL-21産生濾胞性ヘルパーT細胞 (Tfh) の発達を促進するための方法を開示している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

20

【特許文献1】 国際公開第02/083162号

【特許文献2】 米国特許出願公開第2012-0177597号

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】 Fazilleau et al.; Mark, L; McHeyzer-Williams, LJ; McHeyzer-Williams, MG (March 2009). "Follicular helper T cells: lineage and location". *Immunity* 30 (3): 324-35

【非特許文献2】 Michael J. Booth et al. Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution *Science* 18 May 2012, Vol. 336 no. 6083 pp. 934-937

30

【非特許文献3】 Antequera and Bird, *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11995-9, 1993

【非特許文献4】 Jones and Laird, *Nature Genetics* 21:163-167, 1999

【非特許文献5】 Esteller, *Oncogene* 21:5427-5440, 2002

【非特許文献6】 Laird, *Nature Reviews/Cancer* 3:253-266, 2003

【非特許文献7】 Distinct memory CD4⁺ T cells with commitment to T follicular helper- and T helper 1-cell lineages are generated after acute viral infection. *Immunity*. 2013 Apr 18;38(4):805-17

【非特許文献8】 B and T lymphocyte attenuator suppresses IL-21 production from follicular Th cells and subsequent humoral immune responses. *J Immunol*. 2010 Sep 1;185(5):2730-6

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

上記に鑑みると、本発明の目的は、濾胞性ヘルパーT細胞をより好都合かつ確実に検出、同定、識別及び定量する優れたツールとしてのDNAメチル化分析に基づく改善された特に確実な方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明は、白血病阻止因子 (LIF) における哺乳動物の遺伝子領域の少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態 (バイサルファイト転換性) を分析することを含み、上記遺伝子領

50

域の脱メチル化が非濾胞性ヘルパーT細胞と比べたときに濾胞性ヘルパーT細胞の指標となる、サンプルにおける濾胞性ヘルパーT細胞を同定する方法を提供することにより上記の課題を解決する。

【0017】

タンパク質である白血病阻止因子（LIF又はCDF、DIA、HILDA、MLPLI）は、白血病細胞の終末分化を誘導する能力を有する。その作用には、正常及び骨髄性白血病細胞の造血細胞分化の誘導、ニューロン細胞分化の誘導及び肝細胞の急性期タンパク質合成の刺激がある。ヒトLIFにおいて、この遺伝子は、染色体22のNC_000022.11（30240447..30257381、相補鎖）において見つかった。

【0018】

本発明はさらに、本発明者らによる特異的エピジェネティックマーカーとしてのLIF遺伝子領域の驚くべき同定に基づいており、濾胞性ヘルパーT細胞の同定及び上記分析の臨床上の日常的な適用を可能にする。

【0019】

本発明に関して、配列番号5によるゲノム領域において、濾胞性ヘルパーT細胞を同定することができる。驚くべきことに、バイサルファイト変換性及び非変換性シトシンの識別パターンは、配列番号5によるゲノム領域、好ましくは配列番号1による単位複製配列を用いて示される、濾胞性ヘルパーT細胞に関わる配列番号1による領域に、特にまた排他的に限定される。

【0020】

本発明において分析するゲノム領域は配列番号1による単位複製配列を含むことが好ましく、場合により単位複製配列AMP2305の上流の約100塩基、200塩基、300塩基、400塩基、500塩基、600塩基、700塩基、800塩基、900塩基若しくは1000塩基若しくは更には1500塩基若しくは2000塩基から最大約2200の追加の塩基を更に含み、及び／又は場合により下流の約100塩基、200塩基、300塩基、400塩基、500塩基、600塩基、700塩基、800塩基、900塩基若しくは1000塩基若しくは更には1500塩基、2000塩基若しくは2500塩基から最大約2600の追加の塩基を更に含む。言い換えると、単位複製配列AMP2305（約500塩基）を含む分析するゲノム領域の長さは、約600塩基、700塩基、800塩基、900塩基、1000塩基又は1500塩基から最大約5300塩基であってよい。

【0021】

AMP2305の配列とその上流の3個のCpG及びその下流の10個のCpGを含む配列とを含むゲノム領域がより好ましい（図3に示す）。より好ましくは、下流のゲノム領域は図3に示す全てのCpGを含む。

【0022】

本発明における「約」は表示された値の $\pm 10\%$ を意味するものとする。

【0023】

本発明者らは、濾胞性ヘルパーT細胞において、CpGモチーフがほぼ完全に脱メチル化され（すなわち、70%、好ましくは80%超、好ましくは90%超、最も好ましくは95%超）、その一方で同じモチーフは、他の免疫細胞全てにおいて完全にメチル化されていることを例証することができた。

【0024】

上記の領域内のCpGモチーフのメチル化の違いは、濾胞性ヘルパーT細胞を同定するための貴重な手段であり、例えば自己免疫疾患、移植拒絶反応、癌、アレルギー、原発性及び続発性免疫不全、例えばHIV感染及びAIDS、移植片対宿主病（GvH）、造血器悪性腫瘍、関節リウマチ、多発性硬化症又は細胞傷害性T細胞関連の免疫状態等における、何らかの予測可能な（envisionable）診断において上記細胞を同定及び定量するために必要となり、／又は少なくとも何らかの基準（value）となる。このアッセイは、精製又は任意の染色手順なしに濾胞性ヘルパーT細胞の測定を可能にする。

【0025】

次いで、本発明による方法の別の好ましい態様は、上記の分析する領域のメチル化頻度

10

20

30

40

50

の相対量と、例えばGAPDH等の対照遺伝子のメチル化頻度の相対量との比較に基づいて濾胞性ヘルパーT細胞の相対量を定量することを更に含む。したがって、上記定量化は、本明細書において記載及び分析された、LIFの遺伝子領域の（例えば、配列番号5又は配列番号1の）バイサルファイト変換性DNAと非変換性DNAとの比に基づいて行われる。濾胞性ヘルパーT細胞の相対量の定量化は、LIFの細胞特異的領域のバイサルファイト変換性DNAの相対量と、細胞非特異的遺伝子（好ましくは「対照遺伝子」又は「対照領域」と呼ばれ、例えばGAPDHの遺伝子等である）のバイサルファイト変換性DNAの相対量との（好ましくは並行又は同時の）分析に基づいていることが最も好ましい。

【0026】

本発明による方法の更に好ましい実施の形態では、上記バイサルファイト転換性の分析は、配列番号5又は配列番号1に基づいて好適に設計することのできる好適なプライマー対の少なくとも1つのプライマー、好ましくは配列番号2～配列番号4のいずれかによるオリゴマーを用いた増幅を含む。

【0027】

FACS及びmRNA測定とは対照的に、本発明による方法を用いることで、精製、貯蔵、更には相当程度に組織の品質とは無関係に測定（複数の場合もある）及び分析を行うことができる。

【0028】

好ましくは、例えばMSP、HeavyMethyl、Scorpion、MS-SNUPE、MethylLight、バイサルファイトシーケンシング、メチル特異的制限アッセイ及び／又はデジタルPCR（例えば、Kristensen and Hansen PCR-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics, and Response to Treatment Clinical Chemistry 55:8 1471-1483 (2009)を参照されたい）の状況における増幅には、ポリメラーゼ酵素、PCR増幅反応若しくは化学的増幅反応、又は下に記載されるような当業者に既知の他の増幅方法が含まれる。

【0029】

増幅によって、本発明による方法（複数の場合もある）を行うための特に好ましい「手段」である、LIF遺伝子領域の単位複製配列が生成される。結果として、配列番号2～配列番号4のいずれかによるオリゴマー、又は上で言及されるような配列番号2～配列番号4に基づくプライマー対によって増幅される単位複製配列は、本発明の好ましい実施の形態を構成する。したがって、配列番号2～配列番号4の配列（必要な場合、その相補的配列）を、増幅用のプライマーを設計するため、すなわち、関連の配列の「ビーコン」として作用させるために使用することができる。同様に、追加のプライマーを配列番号1による単位複製配列に基づいて設計することができる。増幅を、ゲノム及び／又はバイサルファイト（すなわち、「変換された」）DNA配列のいずれかにおいて行うことができる。

【0030】

当業者であれば更に、分析する部位の量を最小限にするためにCpG位置の特定のサブセット、例えば配列番号1による単位複製配列のCpG位置から選択されるCpG位置の少なくとも1つを選択することができ、配列番号1による単位複製配列2305番のCpG位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22及び23から選択することが好ましい。これらの位置は、作製及び分析する単位複製配列の5'末端から数値的に数えられる。3、4、5、6、7、8、9又は10の位置の組合せが好ましく、この分析により本発明において有益となるに十分なデータ及び／又は情報が得られる。

【0031】

当業者であれば更に、分析する部位の量を最小限にするためにCpG位置の特定のサブセット、例えばLIF特異的バイサルファイト変換性領域（配列番号1）の単位複製配列2305番のCpG位置9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19及び／又は20の少なくとも1つ又は配列番号1によるバイサルファイト変換性領域に存在する全ての部位を選択することができるだろう。

【0032】

10

20

30

40

50

CpG位置のバイサルファイト転換性を分析するために、DNAメチル化を分析する任意の既知の方法を使用することができる。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、メチル化特異性酵素消化、バイサルファイトシーケンシングから選択される方法、プロモーターメチル化、CpGアイランドメチル化、MSP、HeavyMethyl、MethyLight、Ms-SNuPEから選択される分析、又は増幅DNAの検出に基づく他の方法を含む。これらの方法は当業者に既知であり、それぞれの文献中に見ることができる。

【0033】

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

10

【0034】

本発明による方法の更に別の好ましい実施の形態では、該方法は同定される上記細胞を、好ましくは全血及び／又は非トリプシン処理組織を使用して精製及び／又は富化する工程なしに行われる。

【0035】

本発明による方法の別の好ましい実施の形態では、同定には、上記濾胞性ヘルパーT細胞を全ての主要な末梢血細胞型及び／又は非血液細胞、好ましくはB細胞、細胞傷害性T細胞、顆粒球、単球、NK細胞及びヘルパーT細胞、更には血液以外の器官に由来する他の細胞型（これらに限定されない）から区別することが含まれる。

20

【0036】

本発明による方法の更に別の好ましい実施の形態では、サンプルはヒト血液サンプルを含む哺乳動物の体液、又は組織、器官若しくは白血球のサンプル、又はかかる組織、器官若しくは白血球の精製画分若しくは分離画分、又は細胞型サンプルから選択される。好ましくは、上記哺乳動物はマウス、ラット、サル又はヒトである。サンプルは必要に応じて好適にプールすることができる。

【0037】

本発明による方法の別の好ましい態様は次に、上記濾胞性ヘルパーT細胞に基づいて、上記哺乳動物の免疫状態を決定する工程を更に含む。濾胞性ヘルパーT細胞は定量することができ、更に詳細な亜集団（限定されるものではないが、CD4、Th1、Th2、Th9、Th17、Th22、Treg）を相対的に定量するための基準として使用するか、又は予測因子及び／又はスクリーニング因子及び／又は診断因子及び／又は予後因子及び／又は有害事象検出因子として使用するか、又は最終的にこの集団を検出して、全体的な免疫活性状態を決定するために使用することができる。

30

【0038】

本発明による方法の更に別の好ましい実施の形態では、哺乳動物はクルーズトリパノソーマ（*Trypanosoma cruzi*）感染、マラリア及びHIV感染、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、慢性リンパ性白血病、移植片対宿主病及び宿主対移植片病、菌状息肉腫、節外性T細胞リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、及び他のT細胞腫瘍、B細胞腫瘍及びNK細胞腫瘍（これらに限定されない）のような血液悪性腫瘍、リンパ球減少症、重症複合免疫不全（SCID）、オーメン症候群、軟骨毛髪形成不全症、後天性免疫不全症候群（AIDS）（これらに限定されない）等のT細胞欠損、並びにディジョージ症候群（DGS）、染色体切断症候群（CBS）、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、全身性硬化症、皮膚筋炎、原発性胆汁性肝硬変症、原発性硬化性胆管炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、乾癬、白斑、水疱性類天疱瘡、円形脱毛症、特発性拡張型心筋症、1型糖尿病、グレーブス病、橋本甲状腺炎、重症筋無力症、IgA腎症、膜性腎症及び悪性貧血等の遺伝性病態、並びに毛細血管拡張性運動失調症（AT）及びウィスコットアルドリッチ症候群（WAS）（これらに限定されない）等のB細胞とT細胞との複合障害、並びに乳癌、大腸癌、胃癌、膵臓癌、肝細胞癌、胆管癌、黒色腫及び頭頸部癌（これらに限定されない）等の癌（これらに限定されない）のような自己免疫疾患、移植片拒絶反応、感染性疾患、癌及

40

50

び／又はアレルギーを患っているか、又はそれらを患う可能性がある。

【0039】

本発明による方法の別の好ましい態様は次に、濾胞性ヘルパーT細胞の量を、上記哺乳動物に与える化学物質及び／又は生物学的物質に応じて、すなわち上記患者の治療に応じて測定及び／又はモニタリングすることを更に含む、上記の方法に関する。上記方法は上記のような工程と、同定された上記細胞の相対量を、同じ哺乳動物から先に又は同時に採取したサンプル及び／又は対照サンプルと比較することを含む。本発明の方法（複数の場合もある）によって得られる結果に基づき、主治医は患者の免疫状態を決定し、それに応じて基礎疾患の治療を調整することが可能である。

【0040】

上記方法は、好ましくは全血及び／又は非トリプシン処理組織、又は例えば患者への細胞移入用のサンプルのような上記濾胞性ヘルパーT細胞を潜在的に含有する任意の他の生体サンプル中の細胞を精製及び／又は富化する工程なしに行われるのが好ましい。

【0041】

本発明による方法の別の好ましい態様は次に、同定される上記濾胞性ヘルパーT細胞を患者への移植用に配合することを更に含む、上記の方法に関する。これらの目的での医薬調製物及びその製造方法は、移植医学の技術分野で既知の方法に従って行われる。

【0042】

本発明による方法の別の好ましい態様は、配列番号2～配列番号4のいずれかによるオリゴマー又は配列番号1による単位複製配列に関する。

【0043】

本発明の更に別の好ましい態様は次に、哺乳動物において濾胞性ヘルパーT細胞を、LIFの遺伝子領域のCpG位置のバイサルファイト接近性の分析に基づいて同定、定量及び／又はモニタリングするキットであって、本発明による方法の実行用の成分、特にa) バイサルファイト試薬、及びb) 配列番号5及び／又は配列番号1による領域のCpG位置から選択されるCpG位置のメチル化状態の分析用の材料、例えば配列番号2～配列番号4による配列から選択されるオリゴマーを含む、キットに関する。

【0044】

本発明は、本明細書に記載されるような哺乳動物における濾胞性ヘルパーT細胞の同定及び／又はモニタリングへの本発明によるオリゴマー又は単位複製配列又はキットの使用も包含する。

【0045】

上述のように、最近になり3つの新しいシトシン修飾が発見されている。それゆえ、今後の科学的発見により、これまでに記載されている修飾のエピジェネティックパターンが修正されることが予期される。シトシン修飾のこれらの過去のパターンは、バイサルファイト変換性（非メチル化型、非修飾型）及び非変換性（メチル化型、修飾型）シトシンを包含する。記載のように、この2つの末端は修正される必要がある。新規の科学的発見によれば、(i) 非バイサルファイト変換性シトシンは5-メチルシトシン (mC) 及び5-ヒドロキシメチルシトシン (hmC) を包含し、(ii) バイサルファイト変換性（すなわち、「バイサルファイト転換性」）シトシンは、5-ホルミルシトシン (fC)、5-カルボキシシトシン (cC) 及び非修飾型シトシンを包含する。

【0046】

さらに、過去の発明は、(i) バイサルファイト変換性シトシンと全量の染色質（細胞型非依存性、100%バイサルファイト変換性DNA遺伝子座）との比又は(ii) バイサルファイト変換性シトシン (fC、cC、非修飾型シトシン) と非バイサルファイト変換性シトシン (hmC及びmC) との比に基づいている。これらの比は、細胞型、細胞分化、細胞段階及び病理学的細胞段階を明らかにする。それゆえ、新しい技法により、新規のより詳細な比が得られ、エピジェネティック修飾の、現在の細胞に特異的なパターン、細胞段階に特異的なパターン及び病理学的パターンが補足されることから、可能性のある新規のバイオマーカーを定義することができる。バイオマーカーとして発見される新規の比は、

バイオマーカー比=a/b

【化 1】

$$a = \sum$$

(C及び／又はmC及び／又はhmC及び／又はfC及び／又はcC)

【化 2】

$$b = \sum$$

(C及び／又はmC及び／又はhmC及び／又はfC及び／又はcC)

として定義することができ、これにより、a及びbは1種～4種の修飾によりそれぞれが異なる。新規のDNA修飾の発見では、この列举が拡大されるだろう。

10

【0047】

本出願の定義において、DNA配列の「エピジェネティック修飾」は (i) バイサルファイト変換性シトシン (5-ホルミルシトシン (fC) 及び／又は5-カルボキシシトシン (cC)) 及び (ii) 非バイサルファイト変換性シトシン (5-メチルシトシン (mC)、5-ヒドロキシメチルシトシン (hmC) を含む) の専門用語により言及されるものである。それぞれをメチル化したものであるmC及びhmCはバイサルファイト変換性ではなく、これらの2つを区別することは不可能である。同様に、fC、cC及び非修飾型シトシンはバイサルファイト変換性であり、同様にそれぞれを区別することもできない。用語「メチル化された」DNAはmC及びhmCを包含する。用語「非メチル化された」DNAは、fC、cC及び非修飾型DNAを包含する。DNA修飾の新規の変異体が今後発見されることが期待される。修飾の種類はそれぞれ、バイサルファイト変換性であるか、又そうでないかのいずれかとなるだろう。しかし、本方法はこの2群を確実に区別することから、これらの新規の修飾はまた、マーカーとしても使用することができるであろう。

20

【0048】

さらに、DNA修飾とは別に、ヒストンもDNAと核タンパク質との相互作用を変える翻訳後修飾を行う。修飾にはメチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、sumo化 (sumoylation)、シトルリン化及びADP-リボース化がある。ヒストンH2A、H2B及びH3のコアも修飾することができる。ヒストン修飾は、遺伝子調節、DNA修復、染色体凝縮 (有糸分裂) 及び精子形成 (減数分裂) 等の多様な生物学的過程において作用する。また、これらの修飾において、特定の修飾パターンは様々な細胞型、細胞段階、分化状態に特異的であり、バイサルファイト変換性又は或る特定の細胞及び細胞段階を同定する同様の方法においてこのようなパターンを分析することができる。本発明はまた、これらの修飾の使用を包含する。

30

【0049】

まとめると、LIF遺伝子領域、特にマーカーとして本明細書に記載の単位複製配列を使用することにより、本発明者らは、サンプルにおける他の細胞型、例えばT-リンパ球全体に関連して濾胞性ヘルパーT細胞を非常に特異的に同定、定量、特に差別化している。

【0050】

本発明は、次に以下の実施例に基づき、また添付の図表及び配列表を参照するが、それらに限定されることなく更に説明される。本発明において、本明細書に引用される参考文献は全て引用することによりその全体が本明細書の一部をなす。

40

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図 1】 遺伝子LIF (白血病阻止因子) - 染色体22のENSG00000128342: 30240447~30246851リバース鎖上の染色体の位置及びLIFの遺伝子領域における本発明による単位複製配列AMP2305の位置を示す図である。

【図 2】 本発明による単位複製配列2305番のCpG部位の分析を示す図である。表の水平の箱図は、分析する単位複製配列のCpG位置 (例えばCpG1、CpG2等) に対応し、縦列は分析する細胞型に対応する。下部の略語は、それぞれcytotox.=細胞傷害性、Act. T helper c

50

ells=活性化ヘルパーT細胞、又は（peri.）TFH=（末梢）濾胞性ヘルパーT細胞を示す。

【図3-1】本発明による配列番号5及び本発明による単位複製配列AMP2305を太字で示し、関連のCpGモチーフを下線で示した図である。

【図3-2】同上

【発明を実施するための形態】

【0052】

配列番号1は、本発明による単位複製配列AMP2305のゲノム配列を示す。

【0053】

配列番号2～配列番号4は、本発明による特異的なオリゴマーの配列を示す。

【0054】

配列番号5は、本発明による目的の領域のゲノム配列を示し、単位複製配列AMP2305の上流の約2200塩基及び下流の約2600塩基を含む。

【実施例】

【0055】

実施例1

TFH細胞（濾胞性ヘルパーT細胞）を同定するために、以下の配列（AMP2305、配列番号1）によるヒトゲノム領域に由来するバイサルファイト変換型サンプルにqPCRを行った。

CTTCTGCCCCCTCAGTACACAGCCCAGGGGAGCCGTTCCCCAACACCTGGACAAGCTATGTGGCCCCAACGTGACGGAC
TTCCCGCCCTTCCACGCCAACGGCACGGAGAAGGCCAAGCTGGTGGAGCTGTACCGCATAGTCGTGTACCTTGGCACCTC
CCTGGGCAACATCACCCGGGACCAGAAGATCCTCAACCCCAAGTGCCTCAGCCTCCACAGCAAGCTCAACGCCACCGCCG
ACATCCTGCGAGGCCTCCTTAGCAACGTGCTGTGCCGCCTGTGCAGCAAGTACCACGTGGGCCATGTGGACGTGACCTAC
GGCCCTGACACCTCGGGTAAGGATGTCTTCCAGAAGAAGAAGCTGGGCTGTCAACTCCTGGGGAAGTATAAGCAGATCAT
CGCCGTGTTGGCCAGGCCTTCTAGCAGGAGGTCTTGAAGTGTGCTGTGAACCGAGGGATCTCAGGAGTTGGGTCCAGAT
GTGGGGGCCTGTCCAA

【0056】

以下のプライマー及びプローブをqPCRに使用した：

【0057】

【表1】

Forward Primer	q2305 TFH fw	GTTTAATGTTATTGTTGATATTTTGT (SEQ ID No. 2)
Reverse Primer	q2305 TFH rev	ACATCCACATAACCCACA (SEQ ID No. 3)
Probe	q2305_TFH_P_nm	TGTGTTGTGTTGTTTGTGTAGTAAGTATTAT (SEQ ID No. 4)

【0058】

細胞型特異性（qPCRにより測定）を以下の通りに認めた：

【0059】

10

20

30

【表 2】

Immune blood cell type 免疫血液細胞型	FACS FACS特徴付け characterization	Tissue 組織	Percentage of TFH cells (%) TFH細胞の割合 (%)
TFH06 (control) (対照)	CD3+, CD4+ CD45RA-, PD1++, CXCR5+	tonsil 扁桃腺	95.03
activated T helper cells 活性化ヘルパーT細胞	CD4+ CD69+, PD1- (TFH-)	tonsil	85.39
activated cytotoxic T cells 活性化細胞傷害性T細胞	CD8+ CD69+, PD1- (TFH-)	tonsil	15.84
pTFH01 (peri. TFH)		Peripheral blood 末梢血	94.79
pTFH02 (peri. TFH)		Peripheral blood	74.91
pTFH03 (peri. TFH)		Peripheral blood	73.82
pTFH04 (peri. TFH)		Peripheral blood	73.95
pTFH05 (peri. TFH)		Peripheral blood	91.81
pTFH06 (peri. TFH)		Peripheral blood	90.23
Granulocytes 顆粒球	CD15+	Peripheral blood	0.01
Total cytotoxic T-cells 総細胞傷害性T細胞	CD3+, CD8+	Peripheral blood	0.83
Total T helper cells 総ヘルパーT細胞	CD3+, CD4+	Peripheral blood	23.41
NK cells NK細胞	CD3-, CD56+	Peripheral blood	0.53
monocytes 単球	CD14+	Peripheral blood	0.00
Naïve CD4+ cells ナイーブCD4+細胞	CD4+, CD45RA+, CCR7+	Periphery 末梢	0.12
Terminal differential effector memory CD4+ cells 末端分化したエフェクターメモリーCD4+細胞	CD4+, CD45RA+, CCR7-	Periphery	62.94
central memory CD4+ cells セントラルメモリーCD4+細胞	CD4+, CD45RA-, CCR7+	Periphery	26.65
effector memory CD4+ cells エフェクターメモリーCD4+細胞	CD4+, CD45RA-, CCR7-	Periphery	57.18

10

20

30

【0060】

全血のqPCR測定において、以下のTFH細胞量を決定／定量した。サンプルは11名の様々な（健常）ドナー全体の末梢全血である：

【0061】

【表 3】

Sample	Copy number TFH demethylated (LIF, SEQ ID No. 1)	Copy number TFH methylated (LIF, SEQ ID No. 1)	TFH cells (%)
サンプル	脱メチル化されたTFHのコピー数 (LIF、配列番号1)	メチル化されたTFHのコピー数 (LIF、配列番号1)	TFH細胞
1	351.0	15166.7	2.26
2	260.7	16300.0	1.57
3	209.0	6680.0	3.03
4	234.7	11400.0	2.02
5	645.3	16500.0	3.76
6	462.7	14133.3	3.17
7	520.0	13633.3	3.67
8	595.7	12800.0	4.45
9	401.0	16600.0	2.36
10	339.7	14066.7	2.36
11	249.3	14500.0	1.69
Mean value 平均値			2.78

10

20

【0062】

単位複製配列AMP2305（配列番号5を参照のこと）の上流の約2200塩基内及び／又は下流の約2600塩基内にあるCpG位置を用いて同様の分析を行った場合、追加の有益なCpG位置が同定される。

【符号の説明】

【0063】

30

図1

Chromosome bands 染色体バンド

Genes 遺伝子

(Comprehensive 網羅的

BLAST/BLAT hits BLAST/BLATによるヒット

Contigs コンティグ

CCDS set CCDSセット

Constrained elements for 39 eutherian mammals 39の真獣類哺乳動物における抑制要素

antisense アンチセンス

40

No BLAST/BLAT hits on forward strand in this region BLAST/BLATではこの領域のフォワード鎖に対するヒットなし。

protein coding タンパク質コード

Forward strand フォワード鎖

図2

B-cells B細胞

Cytotox. T-cells 細胞傷害性T細胞

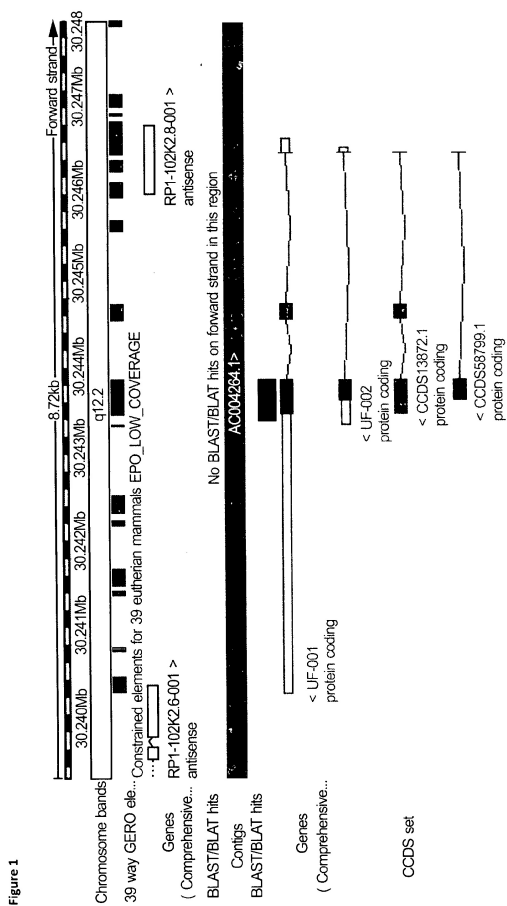
Granulocytes 顆粒球

Monocytes 単球

50

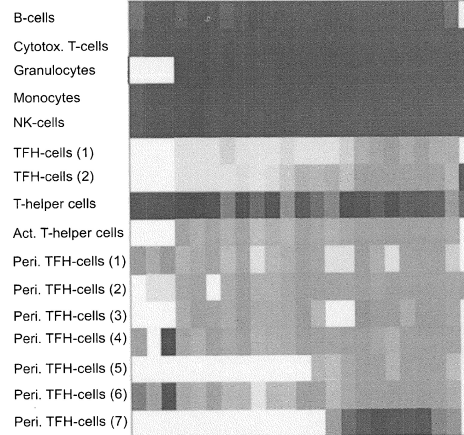
NK-cells NK細胞
 TFH-cells TFH細胞
 T-helper cells ヘルパーT細胞
 Act. T-helper cells 活性化ヘルパーT細胞
 Peri. TFH-cells 末梢TFH細胞

【図 1】



【図 2】

Figure 2



【図 3 - 1】

CTGAGGATGGGTCCCATGGGGCGAAGTCCAGGCTGGGTGGGAGAGCGACTCAGACCCAGGGCCG
CAAGGTGGGCTTGGCAGAGAGCTCCCAAGTCCAGAGGAGATGAGGTGATGGGGAGTCCAGCG
GGCCCCCGGGTGGGAATCAGCAACTCTGGTTTCCAGACAAAGTTCTCTTTCTCGAAGCCCATCC
TGGGGGAATGCAGCCAGGCCCAAGCTAAGCCGGATGAAGCGGAAGGAGAGGCGAGTCCCTGCA
TCTTGGAACAAGGTGAGTGTGGCCACATCTCAACAGCCACATCCTCTCTTGTCTTTGGGATG
GACAGATGGACAACCTCCGGGCGCAGCCCTCCACCCCAACCCAGGCGCTCAGGACCTTGCCTGCAC
ACTGCCACCGCCCATCTCAGTTAAAGTCTTAGAAGGCGAGGGAAGGTGCAAAATGAGTGA
AAAGTACATATATAGTACCATCTCTTGGGAGGAGACTTGGAGGGCGGCGAGCCGCTCAGGG
TTTGAAGAAGCCAGAAACATCTCCTCTGAGCGAGTGGCCCACTCTGCTGCTCCTTCCCTCC
CTGCTCTCAGACTGGAGGGCTTTCTCACTCGCTGGCCAGCACAAGGAAGAGATCGGGT
TCCCTGCTGGGAGCCAGCATGGGTGGGAGTGGGATGGGGTGGAGCAGGAGGGGCCACAGC
TTCTGGTCTGAGTCCAGGCACTCTGAGCCTCCCTCTCTCTCTCTTGGGAGCAATGGGAGCT
GATCCCCCAAGTCTACCCCACTCTCTGGGTCTGGCCACGCCAGGCCGCCGCACTGTATG
GGTGTCCGGGCCACAGGAGGAGCTTCCCTGCTGTGTGCGAGCATGCTGGGTGCGAGGGCAGGGT
TGTTCAGGGCGCTATTTCAGAGGCGAGCATGGGGACAGAAACAAGGACAGGCTGGGCCACAA
GGACTGTCTTGCCCACTGCTCCAGGGGGCACAAATATCTGCCAGGAACAGTGGCTCACAAAC
AATGCTGGGGCGCCAGAGACAGTGTGAACAGGCCCTTGGAATCAAGACAGAAHGGACCCG
CCTCTCCACAAATTGGCCAGCCCTCGAGCCTGAGCCTGACACCTCAAGCAAGTCAAGTA
GGGATGGGGGGGTGGAGCAAGGCCCTCTCTCACTCAGCCCTCCCATCTCTCTCAATC
CGAACCTTCTCTGAGCTTCAACCGTAAGGCTATTCTCACTGTAAACATTGTGCACTTCCAGCC
AGGCCCTGCTAAGCCCTGGCCCTGGCCCTTGTGTGGGAGCCATCATATATTTGTTAGTAG
GGACCAGGGAAAGGGGAATTAACCTTGGCCACTGAAGAGCAACAATAAGTTAATATAAATAGGATA
TCATAATAAATAGAAATCATGCCAGGTCAAGGCGCAGACAGCCTTGGAGCTCAGGGTCCCTGA
GACCTGAGCCTAAGTCTGCTCTCTGCTGGCTGGGAGCGAGAGCGGCTCTCAGTCCCTCT
CAAGTACCTCTGTGTGACCTCACAGAGGCCCTCCAGGGCTCAGATGTGAGCTGCTACTCTGAGC
TACCCACAGCCCTTCTTAGACAGCTTTACCCAGAGGAAGAGCCTGGGTCCCTCAGAACCTCTGC
ACCTGACTTAGCAACCTGCCCTGCCCTACCCACCTCCACAAACCCCTGCTCAGGTCCAGCA
TCAGACCTGGCCATCCAGGCTCGAGGGAAGATCAGGGGAGAGAACGAAGAACCTACCAAA
GCTTTCAGGCGCTCTCTCTCCCAAGTCTCTCTTCCAGGCTGAAGGTGGTTCTCTGCT
CCCCAAGAGCTGAATGGCAAGTGCCTCTCTTGGAACTCTCTGCCAGATTGTTCTATTCGCC
AAGTCTCTGATCATCTCTCAAAAGAGAGCAGCCTTCCATCCAGAGGCCCTCTCTATCTTCA
CTCATCAAACTTCTAGGGGACAGGAGCTCCTTGGGATCTAGGCCCTCTGGCCACCTAAGTC
CCAACCTAAGGGGCGACAAAGGCACAGATGATGTAATTTGTTGGGGGCTGTCCACTCCCTG
GGCCCTGCTGTCTCACCCCTGTGTGAGGCTCTTGTAGATGACTTGTGTGATTTGTCTCACTGCA
CAAGTGAACAGAGGGCCAAAGGACAGTGAAGGCAAGAGTCCAGGCCAGCTCCAGCTCCA
CAATCTCCAGAGGAAGGGGACCTTCTTCTAGTCTCCCTCCATGGAAGTTTCCACTCTGCTC
AGCTTCATCAGAGGCCAGGCCAGAGTGGATGGAGTGGCCAGGCGACCTCGGGTCTGCCAGCA
GCCCCATTGGGTTTAGCGATGCCCTGGGCCCCAGGCCCTCTGGACAGGCCCCACATCTGG
ACCCAACTCTGAGATCCCTCGGTTCAAGCAGACTTCAAGAGCTCTCTGCTAGAAAGCTCTGGG
CAKACGGCGATGATCTCTATATCTCCCGAGAGTGTGACGCCAGTCTCTCTTCTGGAG
ACATCTTACCCGAGGTCTCAGGGCGGTAGGTCACGTCCACATGGCCACGCTGTACTTCTGCG
ACAGGGCGCAGCAGCTGTTCTAAGGAGGCGTCCAGGATGTCCGGGTGGCGTGTAGCTTGTCT
GTGGAGGCTGAGGGCACTGGGGTGTAGGATCTTCTGGTCCCGGTGATGTTGCCAGGGAGGTG
CCAAGGTACAGACTATCGGTTACAGCTCCACAGCTTGGGCTTCTCCGTGCGGTTGGGCTGGA
AGGGCGGGAGGTCTGTCACCTTGGGGCACATAGCTTGTCCAGGTTGTTGGGAAAGGCTCCG
CTGGCTGTGACTGAAGGGCGAGGAGGAGTGTGGGAGTCAAGGGTCACTGTCACGCC
TGGCCCAACCTTGTGGCAGAGCTTGTGCTGTGTTTCCCACTAGCGCATGAGGACCAACT
CCTTGCCCTTAAGCATCTGAATTTGTCATGAGGCCAAACTAATTGTATGTGAGTGCCCTT
GCTAAGATCAAGAGCTGAGCATGCGGAGTCACTATATCATCATCATCATCACTACCAAC

【配列表】

0006778190000001.app

【図 3 - 2】

CTAAGGGGACAGAAGGAAAACCTCGGTGTCTAGCCCTAGCTGGGGACACACACAAGTACTTC
CATCCCTGCACCTCACAAATGTTCCGGGACGCCCTCCATGCCCCAGACCCAGGCCACTGCTC
TCAGCCGATCTCCCTGGTGCTCAGGCCATTTCCCTTCATCCCTCTCTCTCTCAGAGGA
CAATCACAAGATAAGAGTGCAGGTGCCACCTTTGCACTCAGTTCTCCCTTGTCTAAGTGG
CACCTTGGGGAAGCTTCCCTGGGAAGCTTGGGCAGGAAGTGGCGGAGTCTGGGGTGGTTTA
ATCAAGCCCTCTCCCATTTCTCTCTTCCAGGCCCAAAGGTCCCTCAACCCAGATCAGAGCA
GCCCTAATGATATTTACAGGCCCTCTCCCTGCCATCTCTCTCAGTATCCAGGGGTAACTTA
CTAGAGAATAAAGAGGGCATTGGCACTGCCATTGAGCTGTGCCAGTGTGGCTCTGATCTGGTT
CATGAGGTTGTTGTGACATGGGTGGCTTAGGCCAAGTGGCTGTGACAGGGGTGATGGGAGG
GGGCTCCCGCCCCATGTTTCCAGTGCAGAACCAACAGCAGGGGCACAACTCTTGGGACAGCT
AGGAAGAGGCCATGAGTAGAAAGGCGAGAAAGGTGGCTGGGTATGGCACACCGGATGGGG
GTCCAAACATGGCGCATGGGAGGAGCTCTGGTTCCCTCCACACTGCAGCTGTCTTCT
GGGGCTAGTCTTCACTGTGCACTGCGGTGTTTCTCTGCTCCCTTTTCTCTACCTTAGTTCT
CCCTGCTCTCTTCTGGGATGACATAAGATGAGGGCAGAGACACAAGCCATTTCACCCAAAGGG
TGCAGGTTCCAGAGAGACTCCAGCATCCCACTTTCCTCAGAGAGGCAAGGCTCTAG
GCCCTTGGCCCTCTGGCTGGAGGCCACAGGCCCCAGGCCACAGGCGACAGGAGAAAGGAG
ACCCCTCTCTTCCCACTCCCTGGTGGCGAGGTTCCTCAGACGGCTTCCCACTCACTGGCC
CATTCAGGCCAAATCTCCGAAGCCAGGCCACCATGGGGCCACGGGCGATGGGGAGTGGGA
GGAGTCTCTGGTTGACCTCATCTCCCTCCCAACCTGCCACTTGAATCTGGCTCCCTGGGCCA
ATGCCCCCAATTTGCCCGGCCGCCGATCATCTCTATCTCTCTTCCCTAGGTGCTCTCTAT
CTCACTCAAGGTCAACCCATTCTCTGGTGGGTGGCCCATCTGTCATCCCAATCAATGATTA
AACTCTCTGTGTCGCCAGCTCCGGACAGCCCTGACTCCATGCCCTTCTCCGACTCATCCGT
GTCCCTTGTCCAGGGGTTCCTCTCCCTCTAACACACACACACCCGCTCAGGGAGGGAGAGA
AATGTTGCACCAAGAGAGAGAAAGCCAAAGTGCATAGGCACTGGGTGGCGGGGAGAGAGG
AAAGTGAAGGTGACAGGAGAGCTGGAGCTGTCCGACATGTCTGTTTGGCCCTGCCCCAG
GGGGCTGTCTCCGCACTCCCCAGGCCCTTGAAGCTTTTCAAGGCTCTGAGAGG
GCACCTGAAGATGTTGGGGCCGGGTGAGGGGAGTGGGCTGGAGACTCCCCGATCC
CCCATGTCCGAAGCAGCGGGACAGGGGCCCTCTCAAGTTCACTTCTCTGGGTCCCTGTTCT
CCAGCATCCGAAGCGAGTGTGAGGCCCGGGTGGCTGGCGAGGGGGGCGACACCCCTATA
TCTCAGCTAGGCGACACACAGCTTCCAGACACACAGAGATGGAGGGGCACTGCTCCCTG
CCAGGCCGAGGTTTGAAGTGTCTGCGGCCCGGCCCTCCCTGGGAGCAGCGCGGAGCCG
CTTGAAGAGGAAGCGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAGGAGTGAATCTGG
AGAAAGGCGAGAGGAGAGGAGGAGGAGGCTCGCGGCCCTCCCTCGCGCCAGCTGCGCG
GGCGTGGGTGCTTGGGACCATGTGCGCCGCTCTCTCCGGGCCCAACCCAGGCGCTCGGT
GGCTGCGCGGGGCGCCCAAGTGTCTGTGTCTGCGCGGTTGGGCTCCGCTCGGCTTGC
AGCGCCCAAGTTGCCCGCGGCCCGCAGCGGGAGCGGAAGCGCGCGGGGCGGTTGATT
TGTCTGCGCGAGACTTCATTATG

フロントページの続き

(72)発明者 ホフミュラー, ウルリッヒ
ドイツ, 12203 ベルリン, ティーツェンヴェーク 86

審査官 小林 薫

(56)参考文献 特表2008-506407 (JP, A)
国際公開第2014/170497 (WO, A2)
国際公開第2012/063875 (WO, A1)
国際公開第2013/135454 (WO, A1)
Int. J. Oncol., 2012, Vol.40, pp.825-832
Immunity, 2013, Vol.38, No.4, p.805-817

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C12N 1/00- 7/08
C12Q 1/00- 3/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS
(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq