

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年5月18日(18.05.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/082254 A1

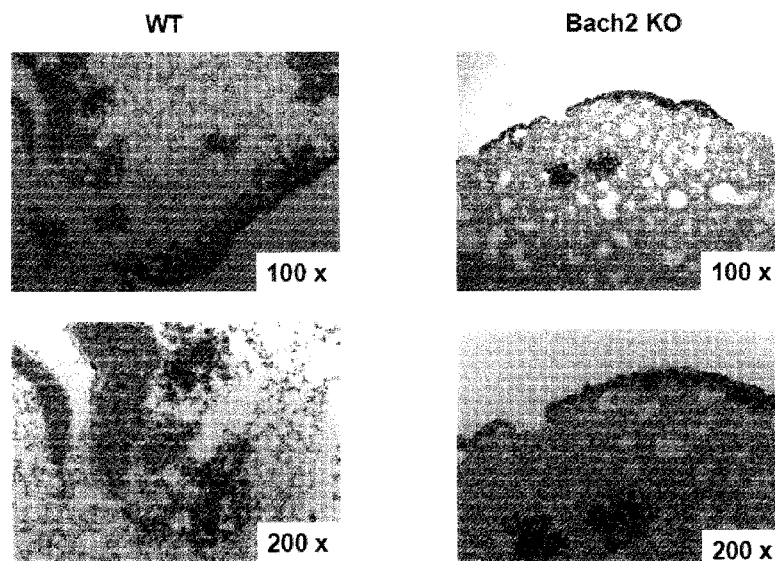
- (51) 国際特許分類:
C07K 16/18 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/083130
- (22) 国際出願日: 2016年11月8日(08.11.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-219945 2015年11月9日(09.11.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東北大学(TOHOKE UN-
IVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区
片平二丁目1番1号 Miyagi (JP).
- (72) 発明者: 五十嵐 和彦(IGARASHI, Kazuhiko); 〒
9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1
号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 武藤
哲彦(MUTO, Akihiko); 〒9808577 宮城県仙台市青
葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大
学内 Miyagi (JP). 落合 恭子(OCHIALI, Kyoko); 〒
9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1
号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 島 弘
季(SHIMA, Hiroki); 〒9808577 宮城県仙台市青葉
区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学

- 内 Miyagi (JP). 安藤 亮(ANDO, Ryo); 〒9808577 宮
城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大
学法人東北大学内 Miyagi (JP). 佐藤 好宏(SATO,
Yoshihiro); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二
丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi
(JP). 玉原 亨(TAMAHARA, Toru); 〒9808577 宮城
県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学
法人東北大学内 Miyagi (JP). 佐藤 勇樹(SATO,
Yuki); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目
1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki
et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋三丁目4
番10号 アクロポリス21ビル8階 Tokyo
(JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): 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, 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,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: ANTI-PHOSPHORYLATED-BACH2 ANTIBODY AND METHOD FOR SCREENING ANTITUMOR IMMUNO-
ACTIVATORS

(54) 発明の名称: 抗リン酸化B a c h 2抗体及び抗腫瘍免疫活性化剤のスクリーニング方法



(57) Abstract: An antitumor immunoactivator is obtained by screening compounds that inhibit the function of Bach2, where Bach2 or the expression level of a target gene thereof or the phosphorylation of Bach2 is used as an indicator. The phosphorylation of Bach2 is preferably measured using an anti-phosphorylated-Bach2 antibody.

(57) 要約: Bach2 もしくはその標的遺伝子の発現レベルまたは Bach2 のリン酸化を指標とし、Bach2 の機能を阻害する化合物をスクリーニングすることにより、抗腫瘍免疫活性化剤を得る。Bach2 のリン酸化は好ましくは抗リン酸化 Bach2 抗体を用いて測定される。

WO 2017/082254 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

抗リン酸化B a c h 2 抗体及び抗腫瘍免疫活性化剤のスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は抗腫瘍免疫活性化剤のスクリーニング方法およびそれに使用できる抗リン酸化Bach2抗体に関する。

背景技術

[0002] Bach2はB細胞やT細胞などの免疫細胞で発現する転写抑制因子で、B細胞から形質細胞への分化制御や制御性T細胞の分化制御への関与が報告されている（非特許文献1～4）。さらに、Bach2遺伝子における多型がアレルギー疾患や炎症性疾患や自己免疫疾患などに相関することが報告されている（非特許文献5～11）。

また、本発明者らは、Bach2遺伝子の機能が阻害されたマウスを作製し、このマウスが炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群のモデル動物として有用であることを報告している（特許文献1）。しかしながら、Bach2の機能阻害によって抗腫瘍免疫を活性化できることやリン酸化との関係は知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：再表2005/110433

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Immunity 39, 136-147

非特許文献2：Nature 498, 506-510

非特許文献3：Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 10735-10740

非特許文献4：Nat Commun 4, 2830

非特許文献5：PLoS Genet. 2011 Aug;7(8):e1002216

非特許文献6：Nat Genet. 2010 Dec;42(12):1118-25

非特許文献7：Nat Genet. 2010 Apr;42(4):295-302

非特許文献8 : PLoS Genet. 2014 Feb 27;10(2):e1004123

非特許文献9 : Arthritis Rheum. 2013 Dec;65(12):3058-62

非特許文献10 : Lancet. 2011 Sep 10;378(9795):1006-14

非特許文献11 : Nat Genet. 2012 May 6;44(6):676-80

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、新規な抗腫瘍免疫活性化剤のスクリーニング方法を提供することおよびその目的で利用できる試薬を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、Bach2の機能を阻害することにより細胞障害性のCD8⁺T細胞が腫瘍部位に誘導されること、およびBach2の転写抑制活性はBach2のリン酸化・脱リン酸化によって制御されていることを見出し、それにより、Bach2のリン酸化等を指標としてBach2の機能を阻害する薬剤をスクリーニングすることにより腫瘍免疫活性化剤が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0007] すなわち、本発明は、以下を提供する。

[1] 配列番号2の536位に相当するセリン残基がリン酸化されたリン酸化Bach2を特異的に認識する抗体。

[2] 配列番号25の7位に相当するセリン残基がリン酸化されたペプチドに結合する、[1]に記載の抗体。

[3] H鎖CDRの配列として、

配列番号18または22の、

アミノ酸番号18～26の配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、アミノ酸番号44～50の配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、および

アミノ酸番号89～95の配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、を含む、[1]または[2]に記載の抗体。

[4] H鎖CDRの配列として、

配列番号 18 の

アミノ酸番号 18～26 の配列もしくはその 1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、アミノ酸番号 44～50 の配列もしくはその 1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、および

アミノ酸番号 89～95 の配列もしくはその 1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、または

配列番号 22 の

アミノ酸番号 18～26 の配列もしくはその 1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、アミノ酸番号 44～50 の配列もしくはその 1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、および

アミノ酸番号 89～95 の配列もしくはその 1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、を含む、[3]に記載の抗体。

[5] H鎖の配列として、

配列番号 18 のアミノ酸配列もしくはその 1～数個のアミノ酸残基が置換、欠失、付加または挿入された配列、または

配列番号 22 のアミノ酸配列もしくはその 1～数個のアミノ酸残基が置換、欠失、付加または挿入された配列を含む、[3]に記載の抗体。

[6] L鎖CDRの配列として、

配列番号 20 または 24 の

アミノ酸番号 32～42 の配列もしくはその 1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、アミノ酸番号 60～63 の配列もしくはその 1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、および

アミノ酸番号 99～107 の配列もしくはその 1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、

を含む、[1]～[5]のいずれかに記載の抗体。

[7] L鎖CDRの配列として、

配列番号 20 の

アミノ酸番号 32～42 の配列もしくはその 1～数個のアミノ酸残基が置換

された配列、アミノ酸番号60～63の配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、および
アミノ酸番号99～107の配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、

または

配列番号24のアミノ酸番号32～42の配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、アミノ酸番号60～63の配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、および

アミノ酸番号99～107の配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、

を含む、[6]に記載の抗体。

[8] L鎖の配列として、配列番号20のアミノ酸配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換、欠失、付加または挿入された配列、または
配列番号24のアミノ酸配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換、欠失、付加または挿入された配列、

を含む、[6]に記載の抗体。

[9] ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である[1]～[8]のいずれかに記載の抗体。

[10] モノクローナル抗体が、マウスモノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体またはヒトモノクローナル抗体およびその、 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv (variable fragment of antibody)、ジスルフィド結合 Fv 、一本鎖抗体 (scFv)、およびこれらの重合体である、[9]に記載の抗体。

[11] Bach2の機能を阻害する化合物を選択する工程を含む、抗腫瘍免疫活性化剤のスクリーニング方法。

[12] Bach2を発現する細胞に被検化合物を添加する工程、Bach2のリン酸化レベルを測定する工程、およびBach2のリン酸化レベルを増加させる化合物を選択する工程を含む、[11]に記載のスクリーニング方法。

[13] リン酸化レベルの測定が配列番号2の536位に相当するセリン残基のリン酸化レベルを測定することによる、[12]に記載のスクリーニング方法。

[14] 抗リン酸化Bach2抗体を用いてBach2のリン酸化レベルが測定される、[12]または[13]に記載のスクリーニング方法。

[15] 抗リン酸化Bach2抗体が[1]～[10]のいずれかに記載の抗体である、[14]に記載のスクリーニング方法。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、腫瘍免疫活性化剤を効率よくスクリーニングできる。さらには、腫瘍免疫活性化剤のスクリーニングのみならず、Bach2の機能解析をはじめとした免疫研究や診断目的でも使用可能な抗リン酸化Bach2抗体も提供される。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]腫瘍が移植された、野生型マウスとBach2ノックアウトマウスにおける腫瘍部位の免疫染色結果を示す顕微鏡写真。

[図2]腫瘍が移植された、野生型マウスとBach2ノックアウトマウスにおける腫瘍容積の経時変化を示すグラフ。

[図3]腫瘍が移植された、野生型マウスとBach2ノックアウトマウスの腫瘍組織における、各種免疫細胞をFACSによって解析した結果を示す図。縦軸は解析した細胞10000個あたりの個数を示す。

[図4]腫瘍が移植された、野生型マウスとBach2ノックアウトマウスの腫瘍組織に誘導されたCD8⁺T細胞における各種遺伝子の発現レベルをRT-PCRで解析した結果を示す図。

[図5]腫瘍が移植された、野生型マウスとBach2ノックアウトマウスの腫瘍組織に誘導されたCD8⁺T細胞のメラノーマ細胞に対する殺傷効果を示す図。

[図6]野生型Bach2、リン酸化部位置換Bach2を発現する細胞に対する抗Bach2抗体を用いたウエスタンブロットの結果を示す写真。

[図7]野生型Bach2またはリン酸化部位置換Bach2を導入した細胞における標的

遺伝子の発現をRT-PCRによって解析した結果を示す図。mockの発現を1として発現量の比を表している。

[図8]抗リン酸化Bach2抗体を用いた野生型Bach2またはリン酸化部位置換Bach2に対するウエスタンブロットの結果を示す図（写真）。

[図9]抗リン酸化Bach2抗体を用いたウエスタンブロットによる、基質のリン酸化に対する各薬剤の影響の解析結果を示す図（写真）。

発明を実施するための形態

[0010] <Bach2>

本発明において使用可能なBach2タンパク質としては、哺乳類由来のBach2タンパク質が好ましく、例えば、ヒトのBach2タンパク質としては配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられ、マウスのBach2タンパク質としては配列番号26のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。ただし、転写抑制因子としての機能を維持する限り、配列番号2または26のアミノ酸配列において、1または数個（好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個）のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質、または配列番号2または26の全長配列に対して90%以上（好ましくは95%以上）の同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質であってもよい。

[0011] Bach2タンパク質をコードする遺伝子としては配列番号1の塩基配列を有する遺伝子が挙げられる。ただし、転写抑制因子としての機能を有するタンパク質をコードする限り、配列番号1の塩基配列の相補配列を有するDNAとストリンジেন্টな条件でハイブリダイズするDNAであってもよい。ここで、ストリンジেন্টな条件としては、通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度で洗浄する条件が挙げられる。

[0012] <抗腫瘍免疫活性化剤>

抗腫瘍免疫活性化剤は、Bach2の転写抑制因子としての機能を抑制することにより、Bach2によって転写制御されているGranzyme Bやインターフェロンγ等

の標的遺伝子の発現を増加させ、CD8⁺T細胞等の細胞障害性T細胞を腫瘍組織に誘導して腫瘍を殺傷するものであることが好ましい。

[0013] 本発明の抗腫瘍免疫活性化剤の投与対象となる「腫瘍（がん）」としては、治療すべき悪性腫瘍であれば特に制限されないが、例えば脾臓がん、大腸がん、肝臓がん、胃がん、胆嚢がん、胆管がん、食道がん等の消化器系腫瘍、例えば悪性黒色腫等の皮膚腫瘍、肺がん、乳がん、卵巣がん、子宮がん、腎がん等を挙げることができる。

[0014] <スクリーニング方法>

スクリーニング方法としては、Bach2の発現量に基づくスクリーニング、Bach2の標的遺伝子の発現量に基づくスクリーニング、Bach2のリン酸化に基づくスクリーニング、などが例示される。

[0015] <Bach2の発現量に基づくスクリーニング>

本発明における抗腫瘍免疫活性化剤のスクリーニング方法の態様の一つは、Bach2遺伝子の発現を抑制する化合物のスクリーニングに関するものである。Bach2遺伝子を発現する細胞におけるBach2のmRNA量を測定してもよいし、Bach2遺伝子のエンハンサーやプロモーター領域の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合したDNAを有する細胞を使用してレポーター遺伝子の発現を測定してもよい。細胞の種類は哺乳動物由来の細胞であることが好ましく、培養T細胞がより好ましい。Bach2遺伝子のエンハンサーやプロモーター領域は公知のゲノム情報を参考にして得ることができ、例えば、データベース上で、Bach2 cDNA配列とBach2ゲノム配列を照らしあわせることで抽出することができるが、Bach2遺伝子の転写開始点より上流に存在する100bp～10kbpの領域が例示される。なお、「機能的に結合した」とは、Bach2遺伝子のエンハンサーやプロモーター領域に転写因子が結合することにより、レポーター遺伝子の発現が誘導されるように、Bach2遺伝子のエンハンサーやプロモーター領域とレポーター遺伝子とが結合していることをいう。

[0016] レポーター遺伝子としては、その発現が検出可能なものであれば特に制限されず、例えば、当業者において一般的に使用されるCAT遺伝子、lacZ遺伝子、

ルシフェラーゼ遺伝子、 β -グルクロニダーゼ遺伝子（GUS）およびGFP遺伝子等を挙げることができる。

[0017] 細胞に被検化合物を接触させ、該細胞または該細胞抽出液におけるBach2のmRNA量またはレポーター遺伝子の発現レベルを測定する。mRNAの発現レベルはノーザンハイブリダイゼーション法、RT-PCR法、マイクロアレイを用いたハイブリダイゼーション法などにより測定を行うことができる。レポーター遺伝子の発現レベルは、使用するレポーター遺伝子の種類に応じて、当業者に公知の方法により測定することができる。例えば、レポーター遺伝子がCAT遺伝子である場合には、クロラムフェニコールのアセチル化を検出することにより、レポーター遺伝子がlacZ遺伝子である場合には、該遺伝子発現産物の触媒作用による色素化合物の発色を検出することにより、また、ルシフェラーゼ遺伝子である場合には、該遺伝子発現産物の触媒作用による蛍光化合物の蛍光を検出することにより、また、GFP遺伝子である場合には、GFPタンパク質による蛍光を検出することにより、レポーター遺伝子の発現レベルを測定することができる。

[0018] 被検化合物を投与していない場合と比較して、Bach2のmRNAまたは該レポーター遺伝子の発現レベルを減少させる化合物を選択する。Bach2のmRNAまたはレポーター遺伝子の発現レベルを減少させる化合物は、Bach2の機能を抑制して抗腫瘍免疫を向上させるための薬剤として利用できる。

[0019] なお、スクリーニングに供される化合物（医薬候補物質）としては特に制限はなく、例えば、低分子合成化合物であってもよいし、天然物に含まれる化合物であってもよい。また、ペプチドや核酸であってもよい。スクリーニングには個々の被検物質を用いてもよいが、これらの物質を含む化合物ライブラリーを用いてもよい。

[0020] <Bach2の標的遺伝子の発現量に基づくスクリーニング>

本発明における抗腫瘍免疫活性化剤のスクリーニング方法の他の態様は、Bach2による転写を制御する化合物のスクリーニングに関するものである。すなわち、Bach2によって転写制御を受ける標的遺伝子の発現量を指標とする。具

体的には、まず、Bach2と、Bach2標的遺伝子またはBach2標的遺伝子の上流に存在する転写制御領域の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合したDNAを有する細胞を提供する。次いで、該細胞に被検化合物を接触させる。なお、Bach2や標的遺伝子を本来的に発現する細胞を使用してもよいし、Bach2遺伝子やレポーター遺伝子を導入した細胞を使用してもよい。細胞の種類は哺乳動物由来の細胞であることが好ましく、培養T細胞がより好ましい。次いで、該細胞または該細胞抽出液におけるBach2標的遺伝子のmRNA量やレポーター遺伝子の発現レベルを測定する。測定は上記と同様にして行うことができる。

[0021] なお、Bach2標的遺伝子としては、Granzyme B (Gzmb) (J Biol Chem, 1998 Dec 25;273(52):35326-31.) やインターフェロン γ やFas Lなどが挙げられる。

[0022] 被検化合物を投与していない場合と比較して、Bach2標的遺伝子のmRNAまたは該レポーター遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物を選択する。通常、Bach2は転写抑制因子として標的遺伝子の発現を抑制しているため、Bach2のmRNAまたはレポーター遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物は、Bach2の機能を阻害して抗腫瘍免疫を向上させるための薬剤として利用できる。

[0023] <Bach2のリン酸化に基づくスクリーニング>

本発明者らの検討により、Bach2の活性はリン酸化によって制御されていることが分かった。すなわち、Bach2はリン酸化を受けて不活性化され、それにより、細胞障害性に関与するような標的遺伝子の発現抑制が解除され、その結果、CD8⁺T細胞が活性化して抗腫瘍免疫効果が発揮されると考えられる。よって、Bach2のリン酸化を促進する化合物を阻害する化合物をスクリーニングすることにより、抗腫瘍免疫活性を有する化合物が得られる。

[0024] したがって、本発明のスクリーニング方法の他の態様は、このようなBach2のリン酸化を指標にしたものである。すなわち、Bach2を発現する細胞またはその抽出物に化合物を添加し、Bach2のリン酸化レベルを測定し、Bach2のリン酸化レベルが化合物非添加時または対照化合物添加時と比較して増加した時に、その化合物を抗腫瘍免疫活性を有する化合物（候補化合物）として選択

することができる。Bach2は細胞内でmTORC1のリン酸化を受けることが推定されたので、スクリーニング系にmTORC1を共存させることが好ましい。さらにBach2はmTORC2によるリン酸化を受ける可能性もあるので、mTORC2を共存させてもよい。mTORC1およびmTORC2は内因性のものでもよいし、外因性のものでもよい。

[0025] Bach2のリン酸化部位としては、好ましくは、535位のセリン（配列番号2の536位のセリンに相当するセリン）が挙げられる。なお、配列番号2の536位のセリンに相当するセリンとは、対象配列を配列番号2とアラインメントしたときに配列番号2の536位のセリンの位置に配置されるセリン残基をいう。例えば、536位よりもN末端側でアミノ酸残基の欠損や付加が起こった時はそれに応じてN末端から数えた位置は変化するが、そのような場合も当然に含む。マウスの配列（配列番号26）においては、535位のセリンに該当する。

[0026] リン酸化されたBach2を特異的に検出するための方法としては、電気泳動における移動度の差を指標に検出する方法や、抗リン酸化セリン抗体を用いる方法でもよいが、リン酸化されたBach2を特異的に認識する抗体を用いる方法が好ましい。

[0027] <抗リン酸化Bach2抗体>

リン酸化されたBach2を特異的に認識する抗体としては、Bach2のリン酸化部位を含む約10～20アミノ酸のペプチドであって、当該部位がリン酸化されたペプチドを用意し、それを抗原として、該抗原をマウス等の哺乳動物に免疫して得られるポリクローナル抗体やモノクローナル抗体、遺伝子組換え技術を用いて製造されるマウスモノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体、並びにヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造されるヒトモノクローナル抗体などが含まれる。

[0028] ポリクローナル抗体は、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。例えば、上記のような抗原を非ヒト哺乳動物に免疫することで該免疫感作動物から得た血清などから取得することができる。

[0029] モノクローナル抗体は、当業者に周知方法を用いて得ることができる（例えば、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons(1987))、Antibodies: A Laboratory Manual, Ed.Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988))。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの調製は、上記のような抗原をマウスなどの非ヒト哺乳動物に投与し、免疫感作された哺乳動物から取得される脾臓に含まれる抗体産生細胞と、ミエローマ細胞を細胞融合させることにより調製される。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、ウェルの培養上清の免疫抗原に対する反応性をE L I S A等の免疫化学的方法によって測定することにより行うことができる。そして、目的の抗体を産生するハイブリドーマを含むウェルから更に、限界希釈法によってクローニングを行い、クローンを得ることができる。ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロで培養するか、またはマウス、ラット等の哺乳動物の腹水中等でのインビボで増殖させ、得られた培養上清、または哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。モノクローナル抗体の単離、精製は、既知の方法を用いればよく、例えば、硫酸分画法、PEG分画法、エタノール分画法、陰イオン交換体、アフィニティークロマトグラフィー等の手段により容易に達成することができる。

[0030] モノクローナル抗体は遺伝子組み換え技術で得られるものでもよい。マウスモノクローナル抗体も含まれるが、キメラモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体およびヒトモノクローナル抗体でもよい。さらに、 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv (variable fragment of antibody)、ジスルフィド結合 Fv 、一本鎖抗体 (scFv)、およびこれらの重合体等の抗体フラグメントでもよい。

[0031] 例えば、535位のセリンがリン酸化されたリン酸化Bach2を認識する抗リン酸化Bach2抗体を得るためには、535位のセリンを含む10～20アミノ酸

のペプチドを抗原に使用することができる。そのようなペプチドとしては、E DSGGG(pS)PCSLPL（配列番号 25）のペプチドが例示される。

[0032] 本発明のモノクローナル抗体として具体的には、H鎖（重鎖）可変領域のCDRに配列番号 18 または 22 のアミノ酸番号 18～26（HCDR1）、配列番号 18 または 22 のアミノ酸番号 44～50（HCDR2）および配列番号 18 または 22 のアミノ酸番号 89～95（HCDR3）のアミノ酸配列を含み、L鎖（軽鎖）可変領域のCDRに配列番号 20 または 24 のアミノ酸番号 32～42（LCDR1）、配列番号 20 または 24 のアミノ酸番号 60～63（LCDR2）および配列番号 20 または 24 のアミノ酸番号 99～107（LCDR3）のアミノ酸配列を含むものが挙げられる。

なお、リン酸化Bach2を特異的に認識する限り、これらのCDRの1つ以上において、1～数個のアミノ酸が置換されてもよい。ここで、1～数個とは、例えば、1個または2個である。CDRの配列を改変して特異性が改変前と同等以上に向上した抗体を得ることは、公知のファージディスプレイなどの技術によって行うことができる。

[0033] CDR以外の領域は抗体としての構造を維持し、機能を発揮できる配列であれば特に制限されず、マウス由来の配列、ヒト由来の配列、他の哺乳動物由来の配列、それらのキメラ配列、人工配列のいずれであってもよい。定常領域を含む場合においては、H鎖およびL鎖の定常領域のアミノ酸配列は、Nucleic Acids Research vol.14, p1779, 1986、The Journal of Biological Chemistry vol.257, p1516, 1982 およびCell vol.22, p197, 1980 に記載のものが例示される。

[0034] これらのCDRを有するマウス抗体としては、H鎖に配列番号 18 または 22 のアミノ酸配列を、L鎖に配列番号 20 または 24 のアミノ酸配列を有する抗体が例示される。なお、これらのアミノ酸配列においては、リン酸化Bach2を特異的に認識する機能が維持される限り、1～数個のアミノ酸（1～20個、1～10個または1～5個）の置換、欠失、付加または挿入があってもよい。このような置換、欠失、付加はCDRに導入されてもよいが、CDR以外の領域

に導入されることが好ましい。

[0035] 本発明の抗リン酸化Bach2抗体は、抗腫瘍免疫活性化剤のスクリーニング以外に、研究用試薬や臨床検査用試薬としても使用しうる。例えば、免疫疾患の検査薬としても使用しうる。

[0036] 以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明する。しかしながら、本発明は以下の実施例の態様には限定されない。

実施例

[0037] <Bach2ノックアウトによる抗腫瘍効果とその細胞メカニズムの解析>

野生型マウス（C57BL/6、8-10週齢）またはBach2ノックアウトマウス（再表2 005/110433）に、マウスメラノーマ細胞株である B16-F10 細胞（ 0.5×10^6 個）を皮下に移植し、腫瘍投与後10日目に腫瘍組織を取り出し、組織切片を作成し、抗PNL2（メラノーマ特異的に発現しているタンパク質）抗体を用いて、免疫染色を行った。その結果、図1に示すように、野生型マウスでは腫瘍が広範囲に見られたのに対し、Bach2ノックアウトマウスでは腫瘍は縮小していた。

[0038] 図2では、野生型マウスとBach2ノックアウトマウスにおける腫瘍容積の経時変化を示した。腫瘍容積は体表から形成された腫瘍の長径と短径を測定し、簡易式（長径×短径²）/2で算出した。

[0039] これらの結果から、Bach2の機能を阻害することにより、抗腫瘍免疫効果が達成されることが示唆された。

[0040] 次に、図1，2の現象を解析するために、腫瘍部位における免疫細胞の解析を行った。すなわち、腫瘍投与後13日に野生型マウスおよびBach2ノックアウトマウスから腫瘍組織を取り出し、CD45抗体を用いて腫瘍をホモジナイズしたサンプルを精製し、各免疫細胞のマーカー分子に対する抗体を用いてFACS（細胞ソーター）で解析を行った。その結果、図3に示すように、Bach2ノックアウトマウスの腫瘍組織ではCD8⁺T細胞が特異的に誘導され、これにより抗腫瘍効果が発揮されていることが示唆された。

[0041] <Bach2ノックアウトマウスにおける標的遺伝子の転写レベルの解析>

また、上記腫瘍投与13日後の野生型およびBach2ノックアウトマウスの腫瘍組織に誘導されたCD8⁺T細胞において、各種遺伝子の発現をRT-PCRによって解析した。

解析した遺伝子と使用したプライマーは下記の通り。

[0042] Gzmb (Granzyme B)

Forward : GACCCAAAGACCAAACGTGC (配列番号3)

Reverse : TGAAAGCACGTGGAGGTGAA (配列番号4)

[0043] Prf1 (perforin 1 (pore forming protein))

Forward : CCCACTCCAAGGTAGCCAAT (配列番号5)

Reverse : GAGCTGTAAAGTTGCGGGG (配列番号6)

[0044] Ifng (Interferon gamma)

Forward : AGCGTCATTGAATCACACCTG (配列番号7)

Reverse : GAATGCTTGGCGCTGGAC (配列番号8)

[0045] GITR (glucocorticoid-induced TNFR family related gene)

Forward : ATCTGCAAGCACTACCCCTG (配列番号9)

Reverse : ACAGGCAACACACCGGAAG (配列番号10)

[0046] PD-1 (Programmed death-1)

Forward : GCCCTAGCTGTCTTCTGCTC (配列番号11)

Reverse : CACACTAGGGACAGGTGCTG (配列番号12)

[0047] CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)

Forward : CTTGTGCGAGTTAGCTTGGG (配列番号13)

Reverse : GACCCCTGTTGTAAGAGGACTT (配列番号14)

[0048] 4-1BB

Forward : CCGTGCAGAACTCCTGTGAT (配列番号15)

Reverse : TTACAGTTCGGCTGTCCACC (配列番号16)

[0049] その結果、図4に示すように、Bach2ノックアウトマウスにおいて特にGZMBとIFNGの発現が上昇していることが分かった。これらはBach2に標的遺伝子であり、細胞障害性に関与する。

[0050] <Bach2ノックアウトマウスにおけるCD8⁺T細胞の細胞障害性の評価>

次に、野生型マウスおよびBach2ノックアウトマウスの腫瘍組織に誘導されたCD8⁺T細胞が細胞障害性を示すかについて調べた。

具体的には、まず、30000個のCD8⁺T細胞を、野生型マウスとBach2ノックアウトマウスに移植したB16F10の腫瘍塊からソーティングした。次いで、Target用細胞として、高濃度のCTV (CTV-high) (Life technologies 社) で標識したB16F10細胞3000個とCD8⁺T細胞を5時間共培養した。また、T細胞を加えないCTV-highで標識したB16F10細胞3000個をcontrolとして5時間培養した。

同時にReference用細胞として、低濃度の (CTV-low) (Life technologies 社) で標識したB16F10細胞を3000個を5時間培養した。(こちらにはT細胞なし) Target 細胞とReference細胞を混合し、CTV-highとCTV-highのB16B10細胞の割合を測定し、 $\text{Specific lysis} = (\text{Reference} - \text{Target}) / \text{Reference}$ の式でCD8陽性T細胞の細胞障害性を評価した。その結果、図5に示すように、Bach2ノックアウトマウスの腫瘍組織に誘導されたCD8⁺T細胞はメラノーマ細胞に対して細胞障害性を有することが確かめられた。

[0051] <Bach2のリン酸化部位の解析>

次に、Bach2のリン酸化部位を調べるため、野生型Bach2またはリン酸化部位と思われるセリン残基およびスレオニン残基をアラニンに置換した変異型Bach2をFLAGタグを付した融合タンパク質として (HEK293細胞) で発現させ、細胞抽出物を電気泳動にかけたのち、抗Bach2抗体で検出した。

その結果、図6に示すように、535位のセリン (配列番号2の536位のセリンに相当) を置換したBach2では、野生型で見られるリン酸化によるバンドシフトが消失した。この結果から、Bach2のリン酸化部位として535位が含まれることが分かった。

[0052] <Bach2のリン酸化の転写抑制活性への影響>

次に、Bach2のリン酸化と転写抑制活性の関係を調べるため、野生型Bach2またはS535A Bach2 (配列番号2の536位のセリンをアラニンに置換) による標的遺伝子の転写への影響を調べた。具体的には、野生型マウスの脾臓から

単離したCD8⁺T細胞を抗CD3/CD28抗体で24時間刺激した後に、野生型Bach2、S535A変異Bach2またはmockをインフェクションして24時間後に細胞を回収して、RT-PCRを行った。

その結果、図7に示すように、535位が置換されたリン酸化されない変異型Bach2が導入された細胞では、細胞障害性に関わる遺伝子の発現が増加することがわかった。

[0053] <抗リン酸化Bach2抗体の作製と評価>

抗リン酸化Bach2抗体を以下の通り作製した。535位のセリンを含み、当該セリンがリン酸化されたペプチド（配列番号25）を合成し、マウスに免疫してハイブリドーマを作製し、その中から、リン酸化Bach2を特異的に認識するクローンを選択し、その中の2クローンを限界希釈し、リン酸化Bach2特異的抗体産生ハイブリドーマ株として選択した（クローン7、クローン17）。

[0054] 該ハイブリドーマ株より抗体を精製し、以下の手順でリン酸化Bach2に対する特異性を評価した。

PlatE細胞（293細胞由来レトロウイルスパッケージング細胞株）にpcDNA-Bach2あるいはpcDNA-Bach2S535A（当該セリンをアラニンに置換）をトランスフェクション

24時間後に全細胞抽出液を調製

一部はフォスファターゼ（CIAP）で37℃1時間処理

5 μ g相当抽出液を電気泳動→ウエスタンブロッティングへ

膜は0.5% BSA in T-TBSでブロック処理した後で各抗体（0.1マイクログラム/ml）と反応

二次抗体はanti-mouse HRP結合抗体

HRP検出はPierce Pico ECLキットを使用

[0055] その結果、図8に示すように、クローン7および17はいずれも野生型Bach2に結合し、その結合バンドのシグナルはCIAP処理によって減少した。一方、535位が変異したリン酸化を受けないBach2ではシグナルがほとんど見られ

なかった。これらのことから、クローン7および17は535位がリン酸化されたBach2を特異的に認識していると考えられた。

[0056] クローン7および17より抗体をコードするDNAを単離し、通常の方法で、抗体をコードするDNAの配列を解析した。

その結果、クローン7のH鎖のアミノ酸配列は配列番号18であり、CDRの配列は、アミノ酸番号18～26、44～50および89～95であった。

クローン7のL鎖のアミノ酸配列は配列番号20であり、CDRの配列は、アミノ酸番号32～42、60～63および99～107であった。

クローン17のH鎖のアミノ酸配列は配列番号22であり、CDRの配列は、アミノ酸番号18～26、44～50および89～95であった。

クローン17のL鎖のアミノ酸配列は配列番号24であり、CDRの配列は、アミノ酸番号32～42、60～63および99～107であった。

[0057] <抗リン酸化Bach2抗体の評価>

次に、抗リン酸化Bach2抗体（クローン17由来）を用い、B1-8^{hi}マウス（Shih et al (2002) Nature Immunology 3, 570-575）由来のB細胞中に含まれるリン酸化Bach2タンパク質の検出を行った。

[0058] B1-8^{hi}マウス由来のB細胞を、抗原免疫を刺激する試薬（以下、刺激薬）を含む培養液、前記刺激薬を含む培養液にmTORC1の阻害剤であるラパマイシンをDMSOに溶解して添加した培養液、ならびに前記刺激薬を含む培養液にmTORC1及びmTORC2の両方を阻害するAZDをDMSOに溶解して添加した培養液、にて1時間培養し、細胞を回収し、ウエスタンブロッティングを行った。なお、抗リン酸化Bach2抗体（クローン17由来）以外の各一次抗体については、以下のものを使用した。

Bach2抗体：Oyake et al (1996) Mol Cell Biol 16 6083-6095

p-FoxO1抗体：Cell Signaling社 カタログ番号 #9461

FoxO1抗体：Cell Signaling社 カタログ番号 #2880

p-p70S6 kinase抗体：Cell Signaling社 カタログ番号 #9205

p70S6 kinase抗体：Cell Signaling社 カタログ番号 #9202

α Tubulin抗体：Santa Cruz社 カタログ番号 sc-5286

[0059] その結果、図9に示すように、抗リン酸化Bach2抗体（クローン17由来）を用いたウエスタンブロッティングでは、刺激薬なし（－）ではバンドが見られなかったが、刺激薬あり（DMSO）では2本のバンドが見られた。また刺激薬とラパマイシンが共存する状況ではリン酸化Bach2に相当するバンドの消失は見られず、刺激薬とAZDが共存する状況では該バンドが消失した。mTORC2でリン酸化されることが知られているFox01について調べると、予想通り刺激薬とラパマイシンが共存する場合はp-Fox01のバンドは消失せず、刺激薬とAZDが共存する場合はバンドが消失した。一方、mTORC1でリン酸化されることが知られているp70S6 kinaseについて調べると、刺激薬とラパマイシンが共存する環境下および刺激薬とAZDが共存する環境下のいずれの場合もp-p70S6 kinaseのバンドが消失した。mTORC1はAKTにより活性化されるがmTORC2はAKTを活性化することで間接的にmTORC1活性化に関与する。AZDによりリン酸化Bach2バンドが消失することから、Bach2のS535のリン酸化は、mTORC1だけでなくmTORC2も関与することが明らかとなった。

請求の範囲

- [請求項1] 配列番号2の536位に相当するセリン残基がリン酸化されたリン酸化Bach2を特異的に認識する抗体。
- [請求項2] 配列番号25の7位に相当するセリン残基がリン酸化されたペプチドに結合する、請求項1に記載の抗体。
- [請求項3] H鎖CDRの配列として、
配列番号18または22の、
アミノ酸番号18～26の配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、アミノ酸番号44～50の配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、および
アミノ酸番号89～95の配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、を含む、請求項1または2に記載の抗体。
- [請求項4] H鎖CDRの配列として、
配列番号18の
アミノ酸番号18～26の配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、アミノ酸番号44～50の配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、および
アミノ酸番号89～95の配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、または
配列番号22の
アミノ酸番号18～26の配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、アミノ酸番号44～50の配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、および
アミノ酸番号89～95の配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換された配列、を含む、請求項3に記載の抗体。
- [請求項5] H鎖の配列として、
配列番号18のアミノ酸配列もしくはその1～数個のアミノ酸残基が置換、欠失、付加または挿入された配列、または

配列番号 22 のアミノ酸配列もしくはその 1 ～数個のアミノ酸残基が置換、欠失、付加または挿入された配列を含む、請求項 3 に記載の抗体。

[請求項6] L鎖CDRの配列として、

配列番号 20 または 24 のアミノ酸番号 32 ～42 の配列もしくはその 1 ～数個のアミノ酸残基が置換された配列、アミノ酸番号 60 ～63 の配列もしくはその 1 ～数個のアミノ酸残基が置換された配列、および

アミノ酸番号 99 ～107 の配列もしくはその 1 ～数個のアミノ酸残基が置換された配列、

を含む、請求項 1 ～5 のいずれか一項に記載の抗体。

[請求項7] L鎖CDRの配列として、

配列番号 20 のアミノ酸番号 32 ～42 の配列もしくはその 1 ～数個のアミノ酸残基が置換された配列、アミノ酸番号 60 ～63 の配列もしくはその 1 ～数個のアミノ酸残基が置換された配列、およびアミノ酸番号 99 ～107 の配列もしくはその 1 ～数個のアミノ酸残基が置換された配列、

または

配列番号 24 の

アミノ酸番号 32 ～42 の配列もしくはその 1 ～数個のアミノ酸残基が置換された配列、アミノ酸番号 60 ～63 の配列もしくはその 1 ～数個のアミノ酸残基が置換された配列、および

アミノ酸番号 99 ～107 の配列もしくはその 1 ～数個のアミノ酸残基が置換された配列、

を含む、請求項 6 に記載の抗体。

[請求項8] L鎖の配列として、

配列番号 20 のアミノ酸配列もしくはその 1 ～数個のアミノ酸残基が置換、欠失、付加または挿入された配列、または

配列番号 24 のアミノ酸配列もしくはその 1 ～数個のアミノ酸残基が置換、欠失、付加または挿入された配列、を含む、請求項 6 に記載の抗体。

[請求項9] ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の抗体。

[請求項10] モノクローナル抗体が、マウスモノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体またはヒトモノクローナル抗体およびその、 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv (variable fragment of an antibody)、ジスルフィド結合 Fv 、一本鎖抗体 (scFv)、およびこれらの重合体である、請求項 9 に記載の抗体。

[請求項11] Bach2の機能を阻害する化合物を選択する工程を含む、抗腫瘍免疫活性化剤のスクリーニング方法。

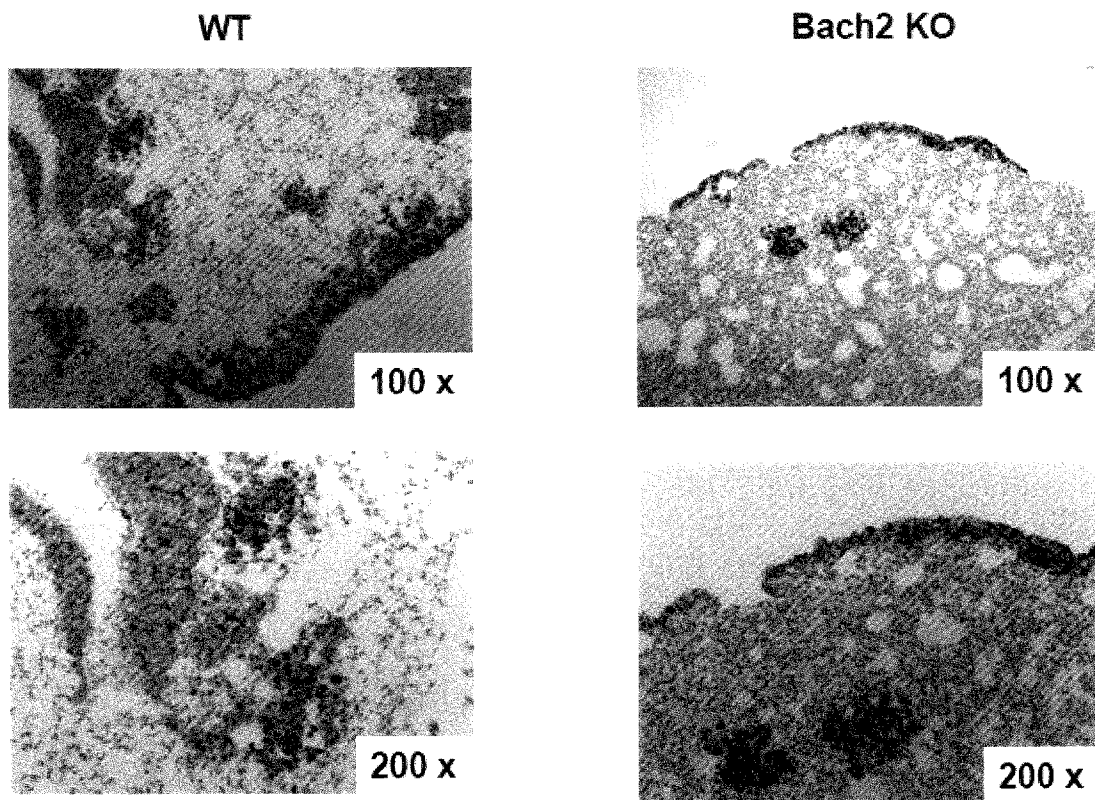
[請求項12] Bach2を発現する細胞に被検化合物を添加する工程、Bach2のリン酸化レベルを測定する工程、およびBach2のリン酸化レベルを増加させる化合物を選択する工程を含む、請求項 11 に記載のスクリーニング方法。

[請求項13] リン酸化レベルの測定が配列番号 2 の 536 位に相当するセリン残基のリン酸化レベルを測定することによる、請求項 12 に記載のスクリーニング方法。

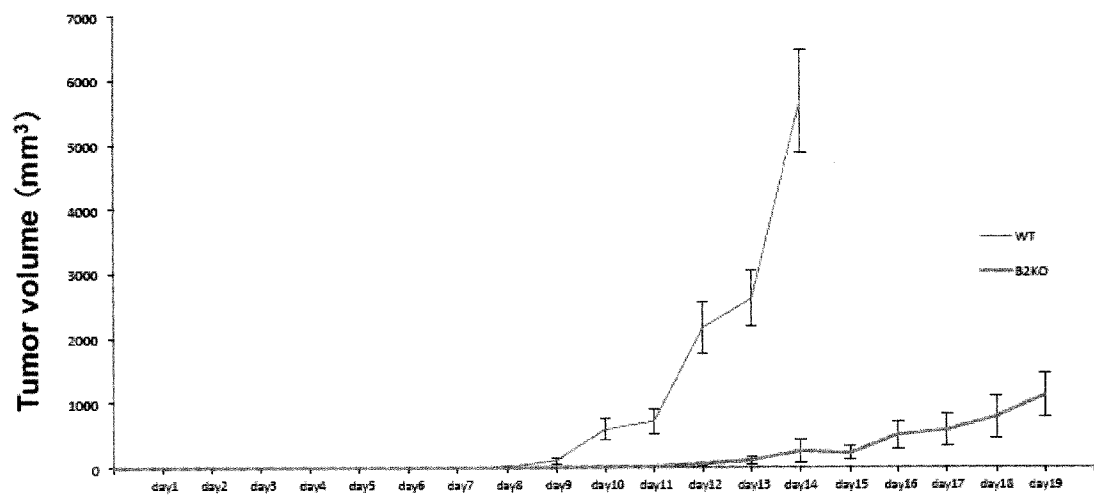
[請求項14] 抗リン酸化Bach2抗体を用いてBach2のリン酸化レベルが測定される、請求項 12 または 13 に記載のスクリーニング方法。

[請求項15] 抗リン酸化Bach2抗体が請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の抗体である、請求項 14 に記載のスクリーニング方法。

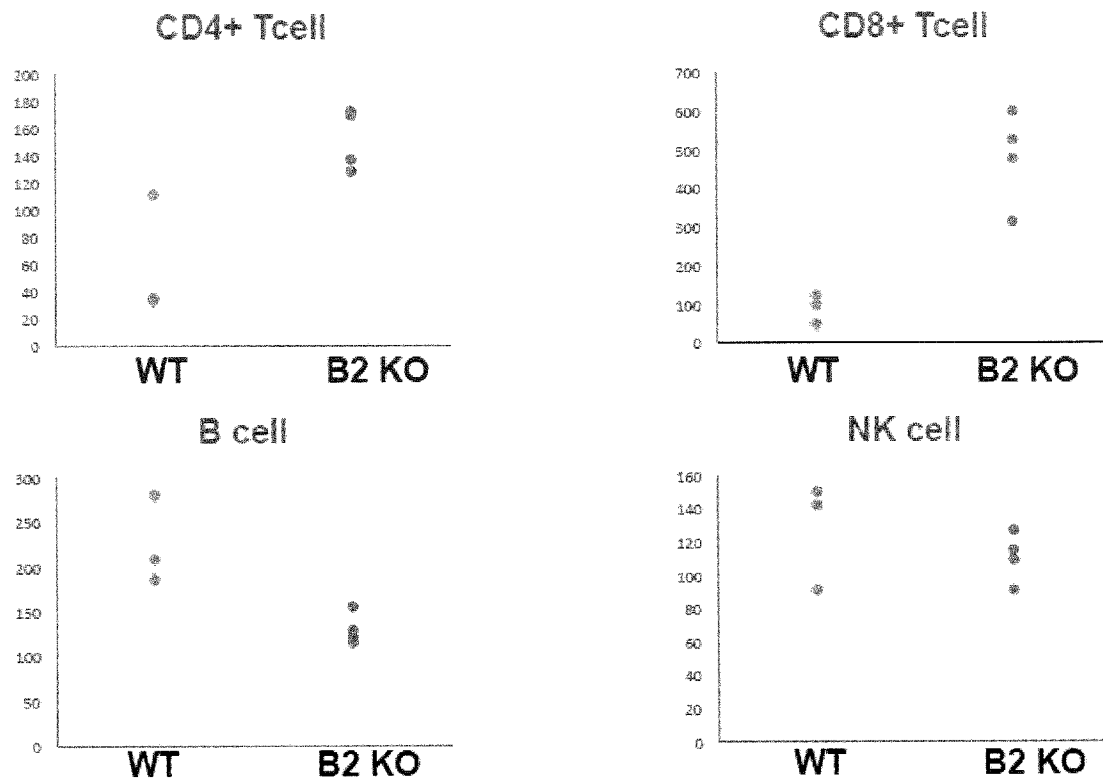
[図1]



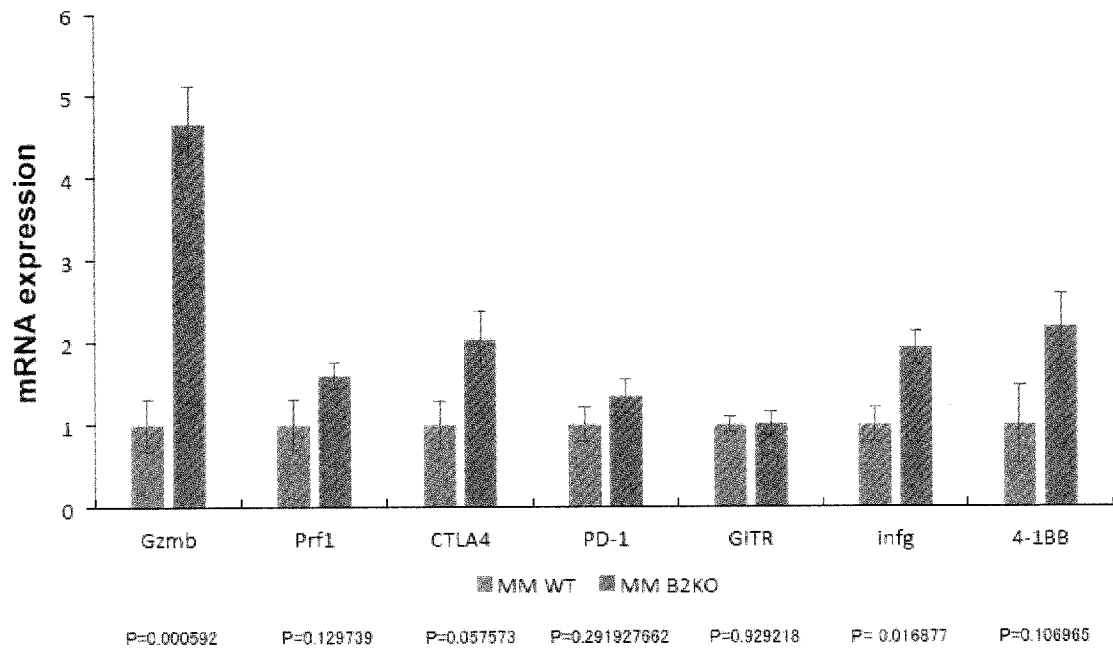
[図2]



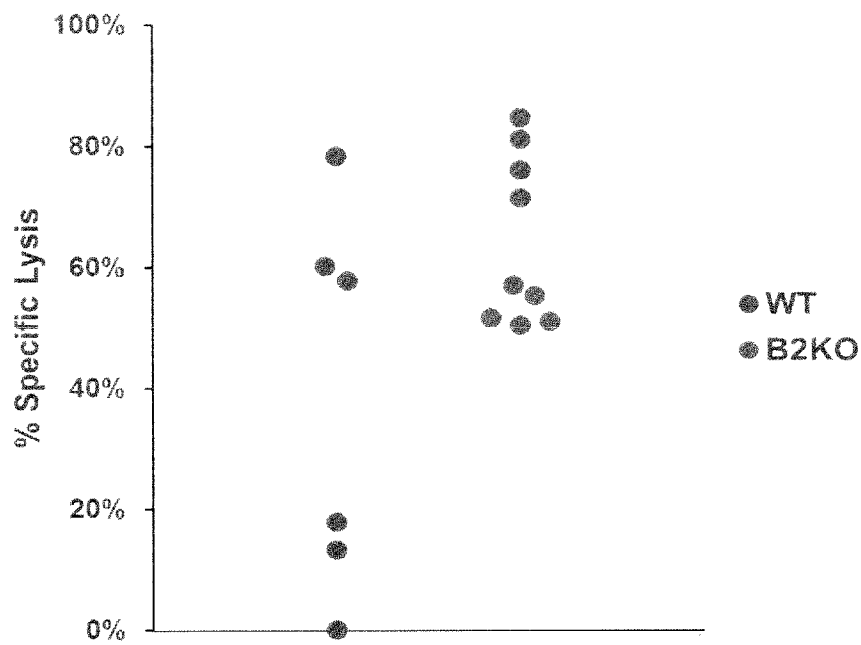
[図3]



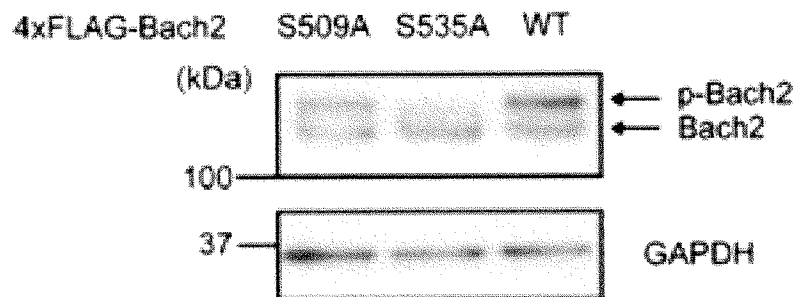
[図4]



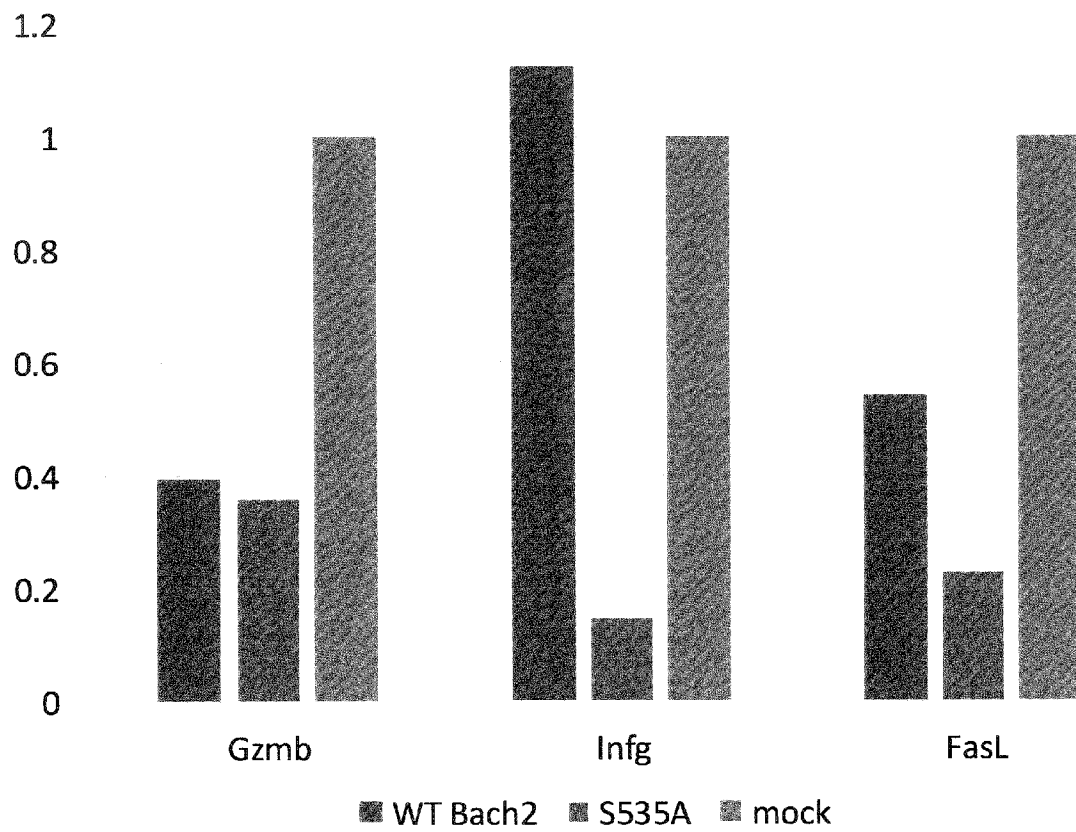
[図5]



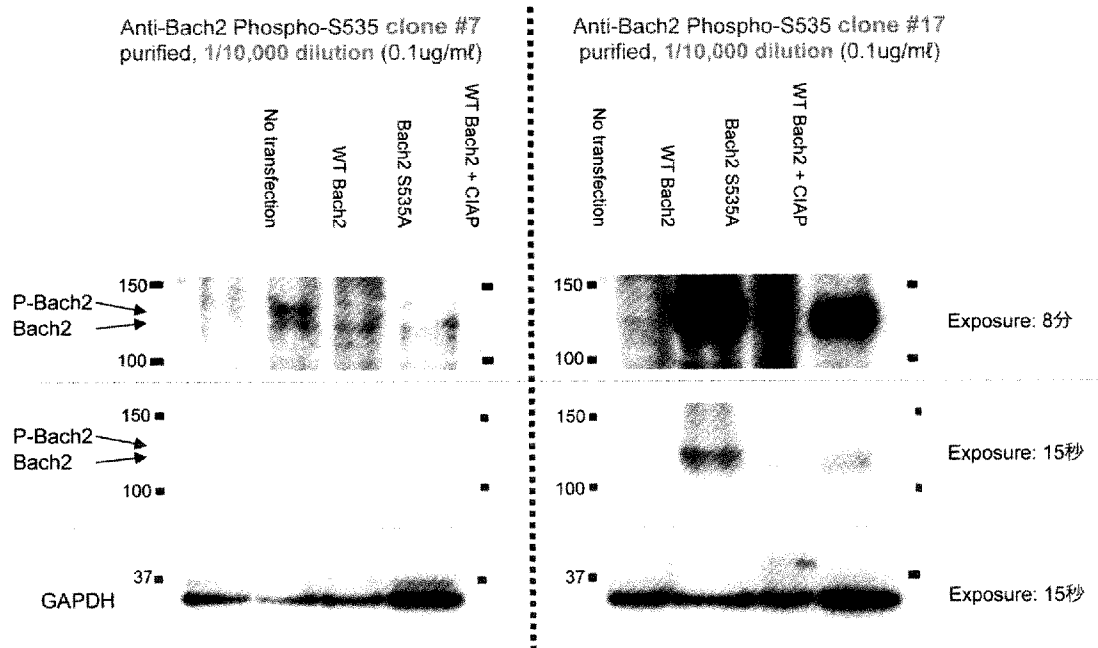
[図6]



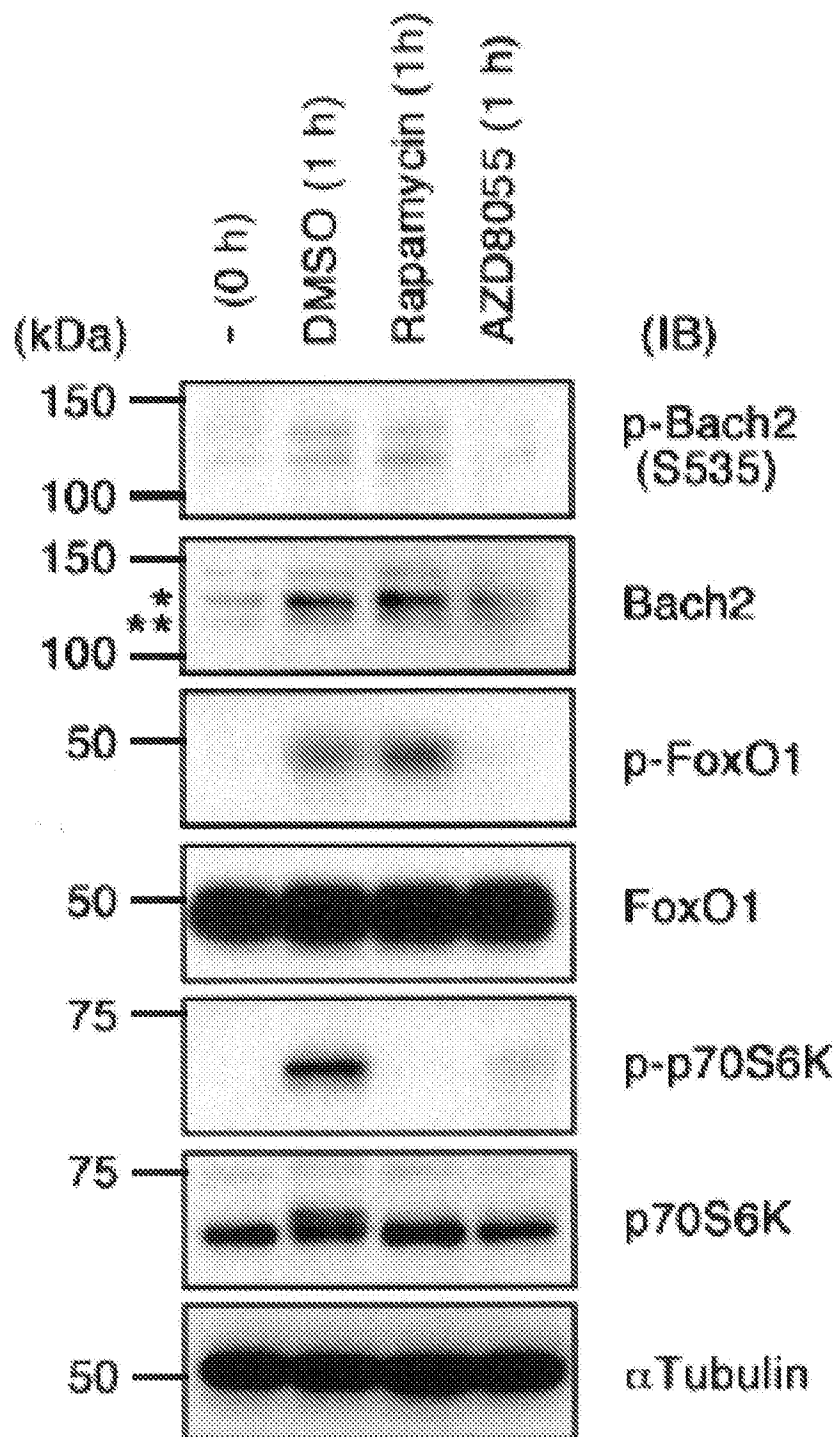
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/083130

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/18(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n

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)

C07K16/18, C07K16/46, C12N15/09, C12Q1/02, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CApus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Toru TAMAHARA et al., "Tensha Inshi Bach2 wa mTOR ni yotte Seigyo sareru", Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Program·Yoshishu, 2014, vol.37th, page 2P-0731	1-10/11-15
Y/A	Ichiro IZAWA et al., "Development of site- and phosphorylation state-specific antibodies", Protein, nucleic acid and enzyme, 2005, vol.50, no.12, pages 1555 to 1562	1-10/11-15
A	MIURA Y. et al., Transcriptional repressor Bach2 promotes B cell receptor-induced proliferation, Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Program·Yoshishu, 2011, vol.34th, page 4P-0422	1-15

☒ 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
16 December 2016 (16.12.16)

Date of mailing of the international search report
27 December 2016 (27.12.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/083130

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/110433 A1 (Kazuhiko IGARASHI et al.), 24 November 2005 (24.11.2005), claims (Family: none)	1-15
P,Y/P,A	Hiroki SHIMA et al., "Extensive analysis of protein phosphorylation : An example of transcription factor Bach2", Journal of Japanese Biochemical Society, 2016.02, vol.88, no.1, pages 31 to 35	1-10,12-15/ 11
P,Y/P,A	ANDO R. et al., The transcription factor Bach2 is phosphorylated at multiple sites in murine B cells but a single site prevents its nuclear localization, The Journal of Biological Chemistry, 2016.01, Vol.291, No.4, pp.1826-1840, Epub: 30 Nov 2015	1-10,12-15/ 11
P,X/P,Y/ P,A	ROYCHOUDHURI R. et al., The transcription factor BACH2 promotes tumor immunosuppression, The Journal of Clinical Investigation, 2016.02, Vol.126, No.2, pp.599-604, Epub: 5 Jan 2016	11/12-15/ 1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07K16/18(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07K16/18, C07K16/46, C12N15/09, C12Q1/02, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y/A	玉原亨 他, 転写因子 B a c h 2 は m T O R によって制御される, 日本分子生物学会年会プログラム・要旨集, 2014, Vol. 37th, p. 2P-0731	1-10/11-15
Y/A	井澤一郎 他, 抗リン酸化ペプチド抗体の発明とその展開, 蛋白質核酸酵素, 2005, Vol. 50, No. 12, pp. 1555-1562	1-10/11-15

☑ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 6 . 1 2 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

2 7 . 1 2 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

藤井 美穂

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

4 N

4 4 3 4

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	MIURA Y. et al., Transcriptional repressor Bach2 promotes B cell receptor-induced proliferation, 日本分子生物学会年会プログラム・要旨集, 2011, Vol.34th, p.4P-0422	1-15
A	WO 2005/110433 A1 (五十嵐和彦 他) 2005.11.24, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-15
P, Y /P, A	島弘季 他, 単一タンパク質の徹底的リン酸化解析と機能特定: 転写因子B a c h 2を例に, 生化学, 2016.02, Vol.88, No.1, pp.31-35	1-10, 12-15 /11
P, Y /P, A	ANDO R. et al., The transcription factor Bach2 is phosphorylated at multiple sites in murine B cells but a single site prevents its nuclear localization, The Journal of Biological Chemistry, 2016.01, Vol.291, No.4, pp.1826-1840, Epub: 30 Nov 2015	1-10, 12-15 /11
P, X /P, Y /P, A	ROYCHOUDHURI R. et al., The transcription factor BACH2 promotes tumor immunosuppression, The Journal of Clinical Investigation, 2016.02, Vol.126, No.2, pp.599-604, Epub: 5 Jan 2016	11 /12-15 /1-10