(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6811480号
(P6811480)
(45)発行日　令和3年1月13日(2021.1.13)　(24)登録日　令和2年12月17日(2020.12.17)

(51)Int.Cl.　F I
C12N 5/09 (2010.01)　C12N 5/09
C12Q 1/686 (2018.01)　C12Q 1/686 Z

請求項の数 4　(全 11 頁)

(21)出願番号　特願2017-37161(P2017-37161)
(22)出願日　平成29年2月28日(2017.2.28)
(65)公開番号　特開2018-139562(P2018-139562A)
(43)公開日　平成30年9月13日(2018.9.13)
審査請求日　令和1年8月27日(2019.8.27)

特許法第３０条第２項適用　平成２８年９月６日～８日　日本大学生物資源科学部において開催された第１５９回日本獣医学会学術集会において発表（要旨集発行日：平成２８年８月３０日）

微生物の受託番号　NPMD　NITE P-02437

(73)特許権者　591281220
日本全薬工業株式会社
福島県郡山市安積町笹川字平ノ上１番地の１
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(74)代理人　100111741
弁理士　田中　夏夫
(72)発明者　前田　貞俊
岐阜県岐阜市柳戸１－１　国立大学法人岐阜大学　応用生物科学部内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】イヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
受託番号NITE P-02437である、イヌの皮膚Ｔ細胞リンパ腫由来である、CCR4を発現するイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株。
【請求項２】
以下の特性を有する、請求項１記載のイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株：
(i)　イヌの皮膚T細胞リンパ腫由来である；
(ii)　細胞異型性を有し、細胞質内に顆粒を含む；
(iii)　CD8α陽性である;及び
(iv)　CCR4を機能的な受容体として発現する。
【請求項３】
さらに、インターロイキン-２陽性である、請求項１または２に記載のイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株。
【請求項４】
さらに、CD3陽性、CD4陰性、CD18陽性、CD45RA陽性、かつMHCII陽性である、請求項１～３のいずれか１項に記載のイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明はイヌの皮膚Ｔ細胞リンパ腫（以下、CTCLと称することがある）由来のＴ細胞株

に関する。
【背景技術】
【０００２】
犬の皮膚Ｔ細胞リンパ腫（CTCL: cutaneous T cell lymphoma）は皮膚に主要病変を形成するリンパ腫である（非特許文献１及び非特許文献２）。腫瘍細胞は症例の97%でCD3陽性、80%でCD8陽性を示すことがわかっており、細胞傷害性Ｔ細胞の免疫表現型を持つと考えられている。
【０００３】
現在、CTCLに対して有効な治療法はなく、平均生存期間が3～6カ月と非常に短いことから、小動物臨床における難治性疾患として認識されている。犬のCTCLは、治療に対する反応性が低いことから、病態に基づいた治療法の開発が求められている。病態解明には細胞株による異種移植実験系の確立等が必要であるが、現時点において有用なCTCL由来細胞株は存在しない。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００４】
【非特許文献１】J.Fontaine et al., Veterinary and Comparative Oncology, 2009, 7, 1, 1-14
【非特許文献２】J.Fontaine et al., Veterinary Dermatology, 2010, 21, 267-275
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
本発明はイヌCTCL由来細胞株の提供を目的とする。
【課題を解決するための手段】
【０００６】
CTCLの病態解明および病態に基づいた新規治療法の開発が求められていた。病態解明を進めるにあたり、症例由来細胞株樹立および細胞株を用いた異種移植実験系の確立が重要となる。
しかし、イヌCTCLにおいては、現在利用可能な細胞株がなく、病態解明が進んでいない。
そこで、本発明者らはイヌCTCL由来細胞株を樹立しようと鋭意検討を行った。
【０００７】
本発明者らは、CTCL症例から採取した細胞について、3日毎の継代培養およびセルソーティングによるクローニングを実施した。樹立した細胞株について、細胞表面抗原の発現とサイトカイン、ケモカインおよび細胞傷害性因子に関連する遺伝子群の転写量を解析した。さらに、ケモカイン受容体であるCCR4については、cDNAのシークエンス、タンパク発現および細胞遊走能を解析した。
【０００８】
初代培養より7ヶ月、70継代を経て細胞株を樹立した。本細胞株はCD3、CD8、CD18、CD45RAおよびMHC IIを発現していた。遺伝子転写量について、その他のCD8を発現するＴ細胞リンパ腫由来細胞株と比較したところ、本細胞株においてはIL-2およびCCR4 mRNAの転写量の増加が特徴的であった。本細胞株のCCR4 cDNAに変異は認められず、細胞膜上におけるCCR4タンパク発現は健常CD4陽性リンパ球に比べて増加していた。また、リガンドであるTARC/CCL17に対する走化性を示したことから、本細胞株は機能的なCCR4を有していることが明らかとなった。
このようにして、本発明者らはCTCL由来細胞株の樹立に成功し、本発明を完成させるに至った。
【０００９】
すなわち、本発明は以下のとおりである。
[１] イヌの皮膚Ｔ細胞リンパ腫由来である、CCR4を発現するイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細

胞株。
[２] 以下の特性を有する、[１]のイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株：
(i) イヌの皮膚Ｔ細胞リンパ腫由来である；
(ii) 細胞異型性を有し、細胞質内に顆粒を含む；
(iii) CD8α陽性である;及び
(iv) CCR4を機能的な受容体として発現する。
[３] さらに、インターロイキン-２陽性である、[１]または[２]のイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株。
[４] さらに、CD3陽性、CD4陰性、CD18陽性、CD45RA陽性、かつMHCII陽性である、[１]～[３]のいずれかのイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株。
[５] 受託番号NITE P-02437である、[１]～[４]のいずれかのイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株。
【発明の効果】
【００１０】
本発明において、CTCL病態解明に向けた研究に利用可能なCTCL由来細胞株の樹立に成功した。本発明の細胞株は、現在利用可能な、唯一のイヌCTCL由来細胞株である。
本細胞株はリンパ球の表皮向性を制御するCCR4を高発現していることから、CTCL細胞の動態を解析する上で極めて有用なツールになり得、CTCL病態解明に向けた研究に利用することができる。
【図面の簡単な説明】
【００１１】
【図１】イヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株の位相差顕微鏡像を示す写真である。
【図２】イヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株のメイギムザ染色像を示す写真である。
【図３】CD3（Ａ）、CD4（Ｂ）およびCD8α（Ｃ）のフローサイトメトリー分析の結果を示す図である。
【図４】本発明の細胞株CTCL（Ａ）とUL-1（Ｂ）およびCLK（Ｃ）の病型、形態およびCD8α発現を示す図である。
【図５】本発明の細胞株CTCLとUL-1およびCLKについて、転写解析を行った遺伝子のリストを示す図である。
【図６－１】ワードクラウド（word cloud)による転写解析における、転写解析に用いた数値データ(相対転写量）を示す図である。
【図６－２】ワードクラウド（word cloud)による転写解析における、可視化した比較転写量Ｘを求める式を示す図である。
【図７】可視化した転写解析の結果を示す図である。
【図８】本発明の細胞株CTCL（Ａ）とUL-1（Ｂ）およびCLK（Ｃ）についてのCCR4タンパク質の発現の解析の結果を示す図である。
【図９】本発明の細胞株のCCR4 cDNA（Ａ）およびgenomic DNA（Ｂ）は野生型と100%相同であることを示す図である。
【図１０】ケモタキシスアッセイの方法を示す図である。
【図１１】本発明の細胞株について行ったケモタキシスアッセイの結果を示す図である。図１１ＡはヒトTARCを用いたときの結果、図１１ＢはマウスTARCを用いたときの結果を示す。
【発明を実施するための形態】
【００１２】
以下、本発明を詳細に説明する。
本発明は、イヌの皮膚Ｔ細胞リンパ腫（CTCL)由来であるイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株であり、CCR4（CCケモカイン受容体4）の発現が大きい細胞株である。
【００１３】
本発明のイヌの皮膚Ｔ細胞リンパ腫（CTCL)由来である、CCR4を発現するイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株は、イヌのCTCLの腫瘍細胞を含む組織を組織培養して得られる。例えば

、50～100回、好ましくは60～80回、さらに好ましくは70回継代培養して得られる。トータルの培養日数は、210日以上、好ましくは250日以上、さらに好ましくは300日以上である。

【００１４】

培養中の倍化時間は、10～40時間、好ましくは15～30時間、さらに好ましくは20～26時間である。

【００１５】

本発明のイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株が発現するCCR4をコードするDNA配列は野生型のCCR4をコードするDNA配列と100％の配列同一性を有する。また、該CCR4は正常な機能、すなわち野生型のCCR4と同じ受容体としての機能を有しており、リガンドであるTARC/CCL17（TARC(Thymus Activation-Regulated Chemokine)）に対して走化性を示し、TARCと結合する。なお、TARCの産生細胞としてケラチノサイト、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、線維芽細胞があり、CCR4は皮膚でのリンパ球遊走関連分子として知られている。

【００１６】

本発明のイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株は、さらにインターロイキン-２を発現する。CCR4およびインターロイキン-２の発現量は、例えば、公知のイヌリンパ腫由来の細胞株であるUL-1(腎リンパ腫細胞）やCLK（腹腔型リンパ腫細胞）に比較して大きい。発現量の大きさは、例えば、CCR4遺伝子やインターロイキン-２遺伝子の転写量を指標にして判断することができる。転写量はリアルタイムRT-PCR等により遺伝子転写量を測定すればよい。

【００１７】

CCR4を発現する細胞株やインターロイキン-２を発現する細胞株をCCR4陽性の細胞株やインターロイキン-２陽性の細胞株ということもできる。

【００１８】

本発明のイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株は、高度の細胞異型性を有している。ここで、異型性とは、光学顕微鏡を使って観察した場合に、形態が正常細胞から隔たっていることをいう。本発明のイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株は、正常なリンパ球と比較して、大型の細胞で、核は不整であり、内部に明瞭な核小体を複数持ち、細胞質内に顆粒を認めるという特徴を有する。細胞の異型性は、位相差顕微鏡による観察やメイギムザ染色をしての顕微鏡観察により判断することができる。

【００１９】

さらに、本発明のイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株は、CD8α陽性、CD3陽性、CD4陽性であり、この発現特性はCTCL腫瘍細胞の特性と同じである。さらに、本発明のイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株は、CD18陽性、CD45RA陽性およびMHCII陽性である。ここで、CD8αは細胞傷害性Ｔ細胞のマーカーであり、CD3は成熟Ｔ細胞のマーカーであり、CD4はヘルパーＴ細胞のマーカーである。また、CD18はCD11a/b/cと複合体を形成し得る接着分子であり、CD45RAはＴ細胞やＢ細胞の接着分子であり、MHCIIは活性化Ｔ細胞、樹状細胞、マクロファージ、単球、Ｂ細胞の細胞表面に発現する。

【００２０】

ここで、ある抗原が陽性であるとは、細胞表面抗原であるその抗原を有していること、すなわち、該表面抗原を細胞表面に発現していることをいう。これらの表面抗原が陽性か陰性か、発現が弱いかどうかは、これらの抗原に対する１次抗体を反応させた後、発色酵素、蛍光化合物等で標識した２次抗体を用いて細胞が染色されたか否かを顕微鏡観察等により調べることにより決定することができる。例えば、これらの抗体を用いて細胞を免疫染色して、表面抗原の有無を決定することができ、また該抗体を結合させた磁気ビーズを用いても決定することができる。また、FACSまたはフローサイトメーターを用いても表面抗原が存在するかどうかを決定することができる。FACS、フローサイトメーターとしては例えばFACS vantage(ベクトン・ディッキンソン社製)、FACS Calibur(ベクトン・ディッキンソン社製)等を用いることができる。

【００２１】

本発明のイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株は、不死化しており、不死化しているかどうか

は、継代培養を繰り返しても細胞がシネッセンス（senescence）に陥らないことにより確認することができ、シネッセンスに陥ったか否かは例えばβ-gal染色により染色されないことを指標に確認することができる。

【００２２】

本発明のイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株は、2017年2月24日付で、独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE)特許微生物寄託センター（NPMD)（日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に受託番号NITE P-02437（「識別の表示」は、「EO-1」）で寄託した。

【００２３】

本発明の細胞株は、以下の方法によりイヌCTCL組織から単離することができる。すなわち、イヌCTCLの腫瘍細胞を含む組織を50～100回、好ましくは60～80回、さらに好ましくは70回継代培養する。そのときのトータルの培養日数は、210日以上、好ましくは250日以上、さらに好ましくは300日以上である。培養細胞の中から、以下の(a)の特性を有することを指標に単離すればよい。また、以下の(a)と(b)、あるいは(a)～(c)の特性を有することを指標に単離することもでき、さらに、以下の(a)～(d)の特性、あるいは以下の(a)～(e)の特性を有することを指標に単離することができる。

(a) CCR4を発現する。

(b) 高度な細胞異型性を持ち、細胞内に顆粒を含む。

(c) CD8α陽性のＴ細胞である。

(d) CD3陽性、CD4陰性、CD18陽性、CD45RA陽性、かつMHCII陽性である。

(e) インターロイキン-２を発現する。

【００２４】

本発明のイヌの皮膚Ｔ細胞リンパ腫由来である、CCR4を発現するイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株を用いて異種移植実験系を確立することができ、イヌCTCLの病態解明に用いることができる。

【実施例】

【００２５】

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【００２６】

[実施例１] CTCL症例犬の選定と組織の採材

岐阜大学動物病院にてCTCL（High grade）と診断した症例から、腫瘍細胞を含む組織を採材し、採材組織の培養を開始した。症例の犬種は、６歳７ケ月齢の未避妊雌ブルドックであり、掻痒を伴うプラーク病変を主訴としていた。

右膝窩リンパ節コア生検を実施し、細分した採材組織を培養した。

RPMI 1640(10% FBS, 1% PS, 1% L-Glutamine)を培地として用い、定法に従って培養を行った。３日毎に継代培養を行った。継代数は70回、培養日数は210日を超えた。細胞の倍化時間は28.4時間であった。

樹立に成功した細胞株に対して、1)細胞形態、2)細胞表面抗原発現、3) 遺伝子転写量の比較等の特性解析を行った。

【００２７】

[実施例２] 細胞形態の解析

位相差顕微鏡観察及びメイギムザ染色により細胞形態の解析を行った。

図１は、位相差顕微鏡像を示し、正常リンパ球では認めない仮足形成を認めた。

図２は、サイトスピンを用いて単層塗抹標本を作製し、メイギムザ染色を行った顕微鏡像図を示す。

本細胞は、大型の細胞で、核は不整、内部に明瞭な核小体を複数持ち、細胞質内には顆粒を認めた。

【００２８】

[実施例３] 細胞表面抗原発現解析

免疫表現型を解析するため、フローサイトメトリーを用いて、細胞表面抗原に対する標識抗体を用いて、細胞表面抗原発現解析を実施した。用いた抗体クローンは、CD3についてはCA17.2A12、CD4についてはYKIX302.9、CD8αについてはYCATE55.9であった(BD biosciences）。

その結果、本細胞株はCD3陽性，CD4陰性，CD8α陽性であり、CTCL腫瘍細胞の特徴と一致して、CD8陽性T細胞であることが明らかとなった。図３にCD3、CD4およびCD8αのフローサイトメトリー分析の結果を示す。また本細胞株はCD18、CD45RAおよびMHCII陽性であった。

【００２９】

[実施例４] 他の細胞株との比較解析

現在利用可能なCD8陽性の細胞株としては、UL-1(腎リンパ腫細胞）やCLK（腹腔型リンパ腫細胞）というイヌリンパ腫由来の細胞株が存在する。図４に本発明の細胞株CTCL、とUL-1及びCLKの病型、形態およびCD8α発現を示す。

この病型の異なる二つの細胞株を比較として、転写プロファイルから、本発明の細胞株の特徴を評価するため、total RNAを抽出し、リアルタイムRT-PCRを用いて、サイトカインやケモカイン受容体、細胞傷害性因子等の遺伝子転写量を定量した。

図５に解析に使用した分子を示す。

結果を、ワードクラウド（word cloud)を用いてデータを可視化した。ワードクラウドは出現頻度が高い単語を複数選び出し、その頻度に応じた大きさで図示する手法であり、ワードクラウドによる解析により、UL-1およびCLKと比較して、本細胞株で転写量が高値である分子ほど、大きく示される。図６－１に転写解析に用いた数値データ(相対転写量）を示す。比較転写量Ｘを、Ｘ=本発明の細胞株の転写量／｛(UL-1の転写量＋CLKの転写量）/２｝により求め、ワードクラウドで可視化することにより、比較転写量が公知を示した分子が大きく表示される(図６－２）。

可視化した転写解析の結果を図７に示す。図７に示すように、本発明の細胞株では、ケモカイン受容体CCR4（CCケモカイン受容体4）およびリンパ球の増殖因子であるIL-2（サイトカイン）の遺伝子転写量の高値が特徴であることが明らかとなった。

CCR4はTARC/CCL17（以下TARC）をリガンドに持つ。

TARCの産生細胞としてケラチノサイト、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、線維芽細胞があり、CCR4は皮膚でのリンパ球遊走関連分子として知られている。

このCCR4が、CTCL病態において重要である可能性が考えられたため、以降、細胞株のCCR4に着目し、解析を進めた。

【００３０】

[実施例５] CCR4発現および機能解析

まずフローサイトメトリーを用いて、CCR4タンパク発現を解析した。用いた抗体クローンは1G1であった（BD biosciences）。その結果、本細胞株においてCCR4タンパク質の発現を認めた。また、UL-1およびCLKにおいてCCR4タンパク発現は認められなかった（図８）。

続いて、本発明の細胞株のCCR4が機能的な受容体であるかを解析した。

まず、本細胞株のCCR4 cDNAおよびヒトの研究より予想されるプロモーター領域を含むgenomic DNAのシーケンスを行った。その結果、本発明の細胞株のCCR4 cDNAおよびgenomic DNAは野生型と100%相同であることが明らかとなった（図９）。

そこで、細胞遊走能を評価するため、CCR4のリガンドに、ヒトおよびマウスTARCを用いたトランスウェルケモタキシスアッセイを行った。

ヒトおよびマウスのTARC(Thymus Activation-Regulated Chemokine)をそれぞれ500nM，100nM，10nM，1nM，0.1nMに調整し、ウェル(下段ウェル）に分注した。そのウェルに細胞の入った5μmの穴が空いたトランスウェル（上段ウェル）を入れ、3時間インキュベートした後、上段ウェルと下段ウェル中の細胞数を測定した。走化性は、走化性%=下段ウェル細胞数／上段ウェル細胞数×100で評価した。ケモタキシスアッセイの方法を図１０に示す。

結果を図１１に示す。図１１ＡはヒトＴＡＲＣを用いたときの結果、図１１ＢはマウスTARCを用いたときの結果を示す。図１１に示すように、100 nM以上のヒトおよびマウスTARCで走化性を示した。

よって、本細胞株のCCR4が機能的な受容体であることが明らかとなった。

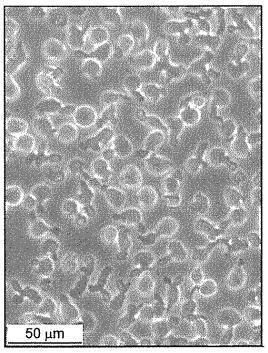
このことから、本細胞株は、高度な細胞異型性を持ち、細胞質内に顆粒を含む、CD8α陽性T細胞であることが明らかとなった。また、CCR4遺伝子転写量の高値が特徴であり、発現しているCCR4は機能的な受容体であることが確認された。

【産業上の利用可能性】

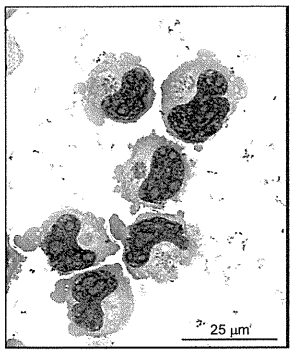
【００３１】

本発明のイヌの皮膚Ｔ細胞リンパ腫由来である、CCR4を発現するイヌ皮膚Ｔ細胞リンパ腫細胞株はCTCL病態解明に向けた研究に用いることができる。

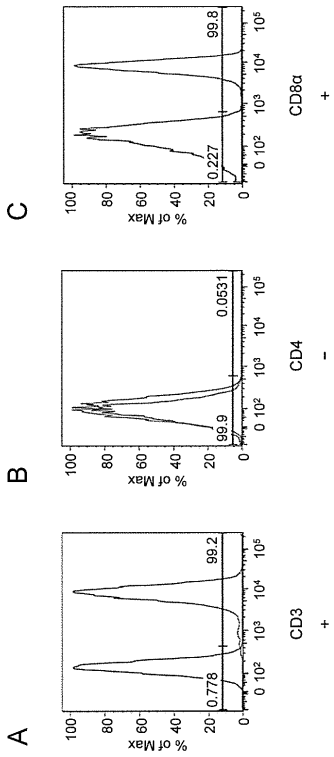
【図１】



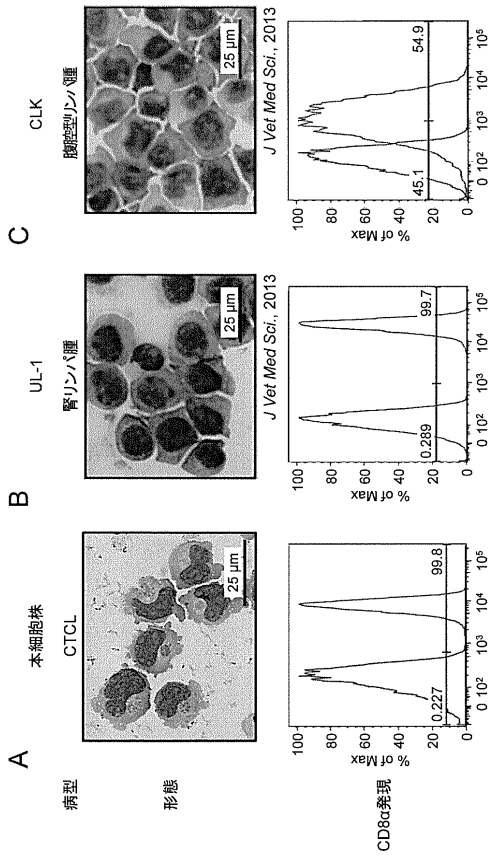
【図２】



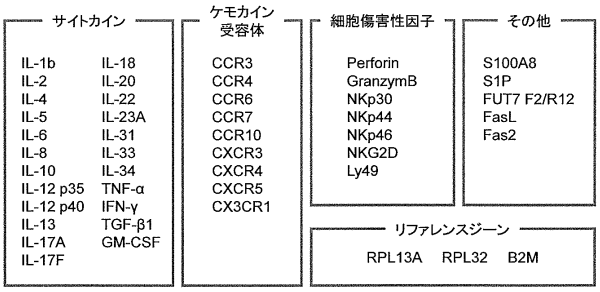
【図３】



【図４】



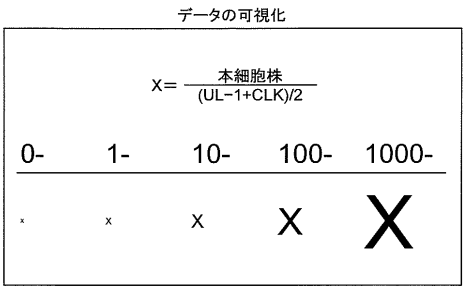
【図５】



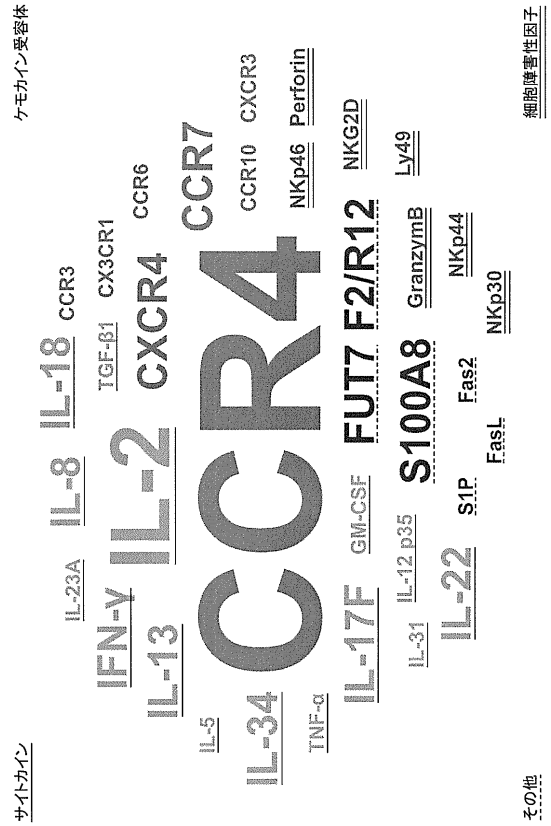
【図６－１】

		本細胞株	UL-1	CLK
サイトカイン	IL1b	0	0	0.3120819
	IL2	0.7269858	0.001162677	0.04786114
	IL4	0	0	0
	IL5	0.237336	1.134193	0.2245334
	IL6	0	0.8898711	1.453974
	IL8	0.02426469	0	0.02701682
	IL10	0	0	0.04024636
	IL12P35	0.08218395	1.134193	0.274523
	IL12P40	0	0	1.898684
	IL13	1	0.9670532	0
	IL17A	0	0	0
	IL17F	1	0.9942388	0
	IL18	1	0.5554265	1.176908
	IL20	0	0	0
	IL22	1	0.003699814	1.370783
	IL23A	0.5528655	1.134193	0.8735734
	IL31	0.4931162	1.134193	0.7071071
	IL33	0	0	1.898684
	IL34	0.9460564	1.134193	0.07510225
	TNFa	0.2773923	0.08636954	1.898684
	IFNr	1	0.5535045	0.6372807
	TGFb1	0.3498966	1.134193	1.515715
	GM-CSF	0.1182574	0.1923313	1.898684
ケモカイン受容体	CCR3	0.01099761	0.3314051	0.9771612
	CCR4	1.135505	0.000405409	0.002544623
	CCR6	0.001034633	0.01149115	0.00274623
	CCR7	0.1664699	0.04424521	0.2748405
	CCR10	0.08323507	0.07138019	1.150027
	CXCR3	0.4532362	0.2925322	1.150027
	CXCR4	0.235424	0.1851371	0.04943464
	CXCR5	0	0	0.03865146
	CX3CR1	0.005955073	0.000196479	0.01380819
細胞傷害性因子	PRF1	0.4891442	1.174191	0.8565836
	GranzymB	0.007155818	0.02274457	0.009496866
	NKp30	0.007081806	0.01347722	0.6248865
	NKp44	0.1489948	0.000565442	1.150027
	NKp46	0.4113207	0.002110303	1.150027
	NKG2D	0.007331541	1.174191	0.1519496
	Ly49	0.1071969	0.5291193	0.1048697
その他	S100A8	0.4393172	0.4180266	0.004732007
	S1P	0.2078097	1.174191	0.3337106
	FUT7 F2/R12	1.104455	0.3873388	1.150027
	FasL	0.010155	1.174191	0.0506486
	Fas2	0.5315717	0	1.150027

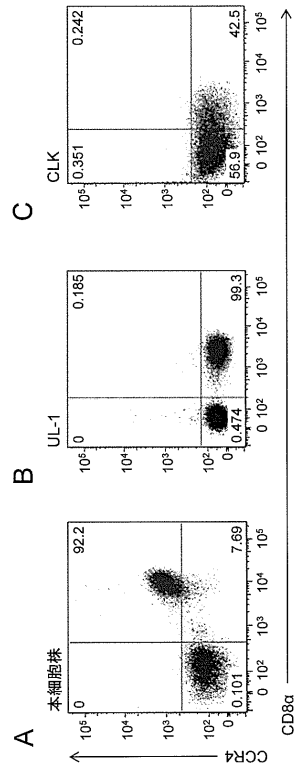
【図６－２】



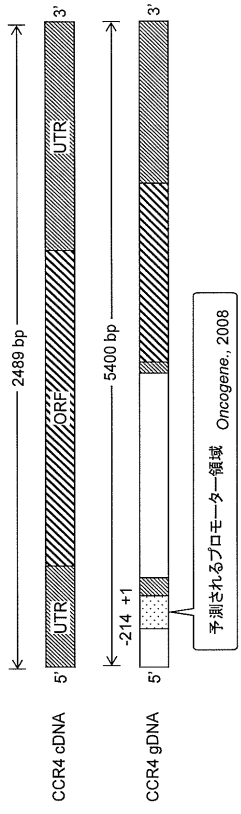
【図７】


サイトカイン
ケモカイン受容体
その他
細胞障害性因子
IL-23A
IL-8
IL-18
CCR3
IFN-γ
IL-2
TGF-β1
CX3CR1
IL-13
CXCR4
CCR6
IL-5
CCR4
CCR7
IL-34
TNF-α
CCR10
CXCR3
IL-17F
GM-CSF
FUT7
F2/R12
NKG2D
IL-31
IL-12 p35
S100A8
GranzymB
Ly49
IL-22
S1P
Fas2
NKp44
FasL
NKp30
NKp46
Perforin

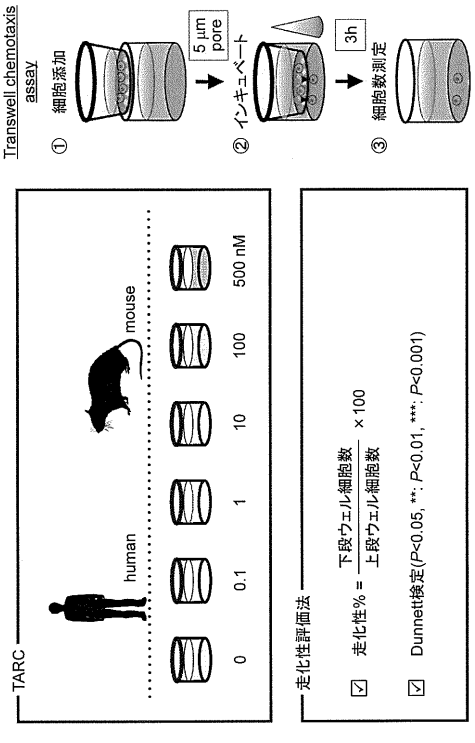
【図８】


A
B
C
本細胞株
UL-1
CLK
CCR4
CD8α
0
92.2
0.101
7.69
0
0.185
0.474
99.3
0.351
0.242
56.9
42.5

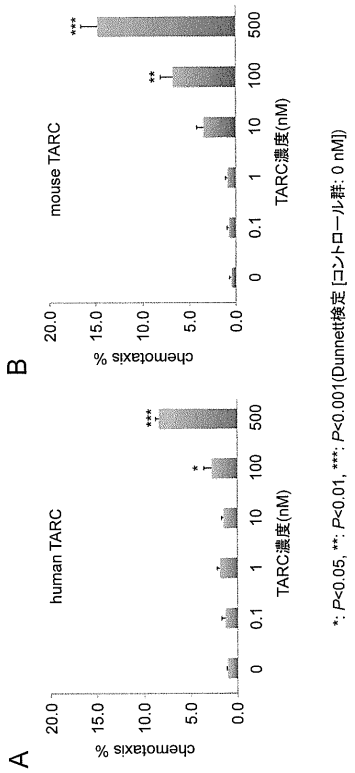
【図９】


A
B
CCR4 cDNA
CCR4 gDNA
5'
3'
UTR
ORF
UTR
2489 bp
-214 +1
5400 bp
予測されるプロモーター領域 Oncogene., 2008

【図１０】


Transwell chemotaxis assay
① 細胞添加
② インキュベート
③ 細胞数測定
5 μm pore
3h
TARC
human
mouse
0
0.1
1
10
100
500 nM
走化性評価法
走化性% = 下段ウェル細胞数 / 上段ウェル細胞数 × 100
Dunnett検定(P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001)

【図１１】



*; $P<0.05$, **; $P<0.01$, ***; $P<0.001$(Dunnett検定 [コントロール群: 0 nM])

フロントページの続き

(72)発明者　原　恭平
岐阜県岐阜市柳戸１－１　国立大学法人岐阜大学　応用生物科学部内

審査官　鈴木　崇之

(56)参考文献　国際公開第２０００／０７００２４（WO，Ａ２）
特表２０１４－５１３５１９（ＪＰ，Ａ）
Leukemia，１９９９年，Vol．13，pp．1281-1290
Vet．Immunol．Immunopathol．，２０１１年，Vol．144，pp．329-336
Journal of Dermatological Science，２０１７年，Vol．88，pp．254-256

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　　１／００－７／０８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＰｕｂＭｅｄ