

(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2012-507306
(P2012-507306A)

(43) 公表日 平成24年3月29日 (2012. 3. 29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 M	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 82 頁)

(21) 出願番号 特願2011-535530 (P2011-535530)
 (86) (22) 出願日 平成21年11月5日 (2009. 11. 5)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年7月5日 (2011. 7. 5)
 (86) 国際出願番号 PCT/NL2009/050669
 (87) 国際公開番号 W02010/053363
 (87) 国際公開日 平成22年5月14日 (2010. 5. 14)
 (31) 優先権主張番号 PCT/NL2008/050698
 (32) 優先日 平成20年11月5日 (2008. 11. 5)
 (33) 優先権主張国 オランダ (NL)

(71) 出願人 511111046
 シュティッヒティング・サンコン・ブロード
 フォールジーニング
 オランダ・NL-1066・セイクス・
 アムステルダム・プレスマンラーン・12
 5
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸配列を調査するための手段および方法

(57) 【要約】

本発明は、核酸配列を調査するための改善された方法であって、標的核酸の(偽)遺伝子変異体に特異的な少なくとも1個の追加的プローブが使用される方法を提供する。

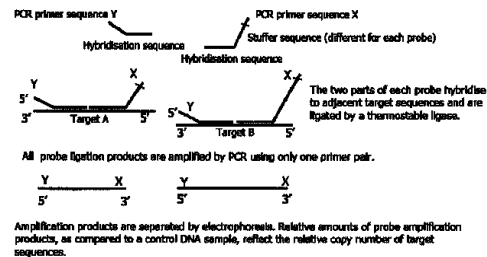


Fig. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中の少なくとも1個の標的核酸配列の存在について選別するための方法であって、
a) 前記試料に少なくとも2個の異なるプローブセットを添加するステップであって、各プローブセットが、

前記標的核酸配列の第1領域に相補的な第1核酸配列と、その5'側に位置し、第1プライマー結合部位を含む非相補的核酸配列とを含む第1核酸プローブ、および

前記標的核酸配列の第2領域に相補的な第2核酸配列と、その3'側に位置し、第2プライマー結合部位を含む非相補的核酸配列とを含む第2核酸プローブ

を含み、

10

前記プローブセットの少なくとも1個が、前記標的核酸配列の第3領域に相補的な第3核酸配列を含む第3核酸プローブを含み、

前記プローブセット中に前記第3プローブが存在する場合、前記標的核酸の前記第1および前記第3領域が相互に本質的に隣接して位置し、前記標的核酸の前記第3および前記第2領域が相互に本質的に隣接して位置し、

前記プローブセット中に前記第3プローブが存在しない場合、前記標的核酸の前記第1および前記第2領域が相互に本質的に隣接して位置するステップ、

b) 前記少なくとも2個の異なるプローブセットを前記試料の相補的核酸とハイブリダイズさせるステップ、

c) 前記試料の核酸をライゲーション反応に供するステップ、

20

d) 前記試料の核酸を、前記第1プライマー結合部位に特異的に結合できる少なくとも1個のプライマーおよび前記第2プライマー結合部位に特異的に結合できる少なくとも1個のプライマーを使用する核酸増幅反応に供するステップ、ならびに

e) 増幅された核酸が存在するかどうかを測定し、それにより前記少なくとも1個の標的核酸配列が前記試料中に存在するかどうかを測定するステップ

を含み、

少なくとも1個の第3核酸プローブが、遺伝子特異的ヌクレオチドおよび/もしくは偽遺伝子特異的ヌクレオチド、ならびに/または遺伝子特異的配列および/もしくは偽遺伝子特異的配列、ならびに/または所与の遺伝子もしくは偽遺伝子中の追加的多型を含む標的核酸領域に相補的であり、前記多型が好ましくはSNPを含む、方法。

30

【請求項2】

3個の核酸プローブを含むプローブセットにおいて、第3核酸プローブが、遺伝子特異的ヌクレオチドおよび/もしくは偽遺伝子特異的ヌクレオチド、ならびに/または遺伝子特異的配列および/もしくは偽遺伝子特異的配列、ならびに/または所与の遺伝子もしくは偽遺伝子中の多型を含む標的核酸領域に相補的であり、前記多型が好ましくはSNPを含み、第1核酸プローブまたは第2核酸プローブが、遺伝子特異的ヌクレオチドおよび/もしくは偽遺伝子特異的ヌクレオチド、ならびに/または遺伝子特異的配列および/もしくは偽遺伝子特異的配列、ならびに/または所与の遺伝子もしくは偽遺伝子中の多型を含む別の標的核酸領域に相補的であり、前記多型が好ましくはSNPを含む、請求項1に記載の方法。

40

【請求項3】

少なくとも2個、好ましくは少なくとも5個、より好ましくは少なくとも10個の異なる第3核酸プローブが使用される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

第3核酸プローブの少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%が、遺伝子変異体または偽遺伝子変異体を含む標的核酸領域に相補的である、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記第3核酸プローブの少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%が、少なくとも1個の遺伝子変異体または偽遺伝子変異体を含む他の標的核酸領域に相補的である第1核酸プローブまたは第2核酸プロ

50

ープと組み合わせられる、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

15から150ヌクレオチドの間の長さ、好ましくは19から110ヌクレオチドの間の長さを有する第3核酸プローブが使用される、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記核酸プローブが合成によって作製される、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記少なくとも2個の異なるプローブセットの前記第1核酸プローブの前記非相補的核酸配列の長さにおける差異、および/または前記少なくとも2個の異なるプローブセットの前記第2核酸プローブの前記非相補的核酸配列の長さにおける差異が、核酸6個より少ない、好ましくは核酸4個より少ない、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項9】

前記第1核酸プローブの非相補的核酸配列が本質的に同一の第1プライマー結合部位を含み、かつ/または前記第2核酸プローブの非相補的核酸配列が本質的に同一の第2プライマー結合部位を含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

試料中の少なくとも1個の標的核酸配列の存在について選別するための複数のプローブセットの使用であって、前記プローブセットのそれぞれが、

前記標的核酸配列の第1領域に相補的な第1核酸配列と、その5'側に位置し、第1プライマー結合部位を含む非相補的核酸配列とを含む第1核酸プローブ、および

20

前記標的核酸配列の第2領域に相補的な第2核酸配列と、その3'側に位置し、第2プライマー結合部位を含む非相補的核酸配列とを含む第2核酸プローブ

を含み、

前記プローブセットの少なくとも1個が前記標的核酸配列の第3領域に相補的な第3核酸配列を含む第3核酸プローブを含み、

前記プローブセット中に前記第3プローブが存在する場合、前記標的核酸の前記第1および前記第3領域が相互に本質的に隣接して位置し、前記標的核酸の前記第3および前記第2領域が相互に本質的に隣接して位置し、

30

前記プローブセット中に前記第3プローブが存在しない場合、前記標的核酸の前記第1および前記第2領域が相互に本質的に隣接して位置し、

少なくとも1個の第3核酸プローブが、遺伝子特異的ヌクレオチドおよび/もしくは偽遺伝子特異的ヌクレオチド、ならびに/または遺伝子特異的配列および/もしくは偽遺伝子特異的配列、ならびに/または所与の遺伝子もしくは偽遺伝子中の追加的多型を含む標的核酸領域に相補的であり、前記多型が好ましくはSNPを含む使用。

【請求項11】

対象の核酸のコピー数を測定するための少なくとも1個のプローブセットの使用であって、少なくとも1個のプローブセットが1つまたは複数の位置に縮重塩基を有するプローブを含み、かつ/または少なくとも1個のプローブセットが、A、T、G、CおよびUからなる群から選択される少なくとも2個、好ましくは少なくとも3個、より好ましくは少なくとも4個の塩基に結合できる代替塩基を含む、使用。

40

【請求項12】

前記代替塩基がデオキシイノシン三リン酸(dITP)またはその機能的等価物を含む、請求項11に記載の使用。

【請求項13】

前記標的核酸配列がキラー免疫グロブリン様受容体(KIR)遺伝子座に存在する、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項14】

少なくとも1個のKIR遺伝子の(相対的)コピー数多型および/または少なくとも1個のKIR偽遺伝子のコピー数多型が測定される、請求項1から13のいずれか一項に記載の方法また

50

は使用。

【請求項 15】

図3A、3B、3Cまたは3Dに示される少なくとも1個のプローブ、好ましくは図3Cまたは3Dに示される少なくとも1個のプローブが使用される、請求項1から14のいずれか一項に記載の方法および/または使用。

【請求項 16】

前記少なくとも2個のプローブセットが、図3A、3B、3Cまたは3Dのプローブセットから選択され、好ましくは図3Cまたは3Dのプローブセットから選択される、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法および/または使用。

【請求項 17】

図3A、3B、3Cまたは3Dに列挙するプローブまたはプローブセットから選択され、好ましくは図3Cまたは3Dのプローブセットから選択されるプローブまたはプローブセット。

【請求項 18】

請求項17に記載の少なくとも2個のプローブまたはプローブセットを含む核酸混合物。

【請求項 19】

請求項17または18に記載のプローブまたはプローブセットまたは核酸混合物を含む、試料中の少なくとも1個の標的核酸配列の存在を検出するためのキット。

【請求項 20】

前記少なくとも1個の標的核酸配列がKIR遺伝子座に存在する核酸配列を含む、請求項19に記載のキット。

【請求項 21】

核酸配列5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGAおよびTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'またはその相補物に対して少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するPCRプライマーセットをさらに含む、請求項19または20に記載のキット。

【請求項 22】

個体における白血病の素因を測定するための方法であって、前記個体の核酸試料中のKIR2DS4および/またはKIR2DS3の存在または欠如を図3Aまたは3Bまたは3Cまたは3Dに列挙する少なくとも1個のプローブセットで測定するステップを含み、KIR2DS4の存在または欠如が慢性骨髄性白血病の素因に関する指標であり、KIR2DS3の欠如が急性リンパ性白血病の素因に関する指標である、方法。

【請求項 23】

図3Cおよび/または3Dに示されるプローブセット540A/540Cおよび/もしくは513B/513Dならびに/またはプローブセット504A/504B、および/もしくは708K/708L/708M/708NがKIR多型の存在または欠如を測定するために使用される、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

個体の炎症性腸疾患(IBD)および/またはクローン病の素因を測定するための方法であって、

前記個体の核酸試料中のKIR2DL2およびKIR2DL3の存在または欠如を図3Aまたは3Bまたは3Cまたは3Dに列挙する少なくとも1個のプローブセットで測定するステップ、および
前記個体の試料中のHLA C1および/またはC2リガンドの存在または欠如を測定するステップ

を含み、

C1ホモ接合性との組合せでのKIR2DL2、KIR2DL3ヘテロ接合性がIBDおよび/またはクローン病の素因に関する指標であり、C2ホモ接合性との組合せでのKIR2DL2、KIR2DL3ヘテロ接合性がIBDおよび/またはクローン病の防御に関する指標である、方法。

【請求項 25】

図3Cおよび/または3Dに示されるプローブセット415B/415C/415Dおよび/もしくは417A/417B/417Cならびに/またはプローブセット420A/420Bおよび/もしくは706A/706BがKIR多型の存在または欠如を測定するために使用される、請求項24に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 26】

疾患の経過への個体の易罹患性、ならびに/または慢性感染、好ましくはレトロウイルス感染、ヘルペスウイルス感染および肝炎ウイルス感染における治療への応答を測定するための方法であって、前記個体の核酸試料中のKIR2DL3、KIR3DL1および/またはKIR3DS1のコピー数を図3Aまたは3Bまたは3Cまたは3Dに列挙する少なくとも1個のプローブセットで測定するステップを含み、個体におけるKIR3DL1および/またはKIR3DS1の高いコピー数が個体におけるKIR3DL1および/またはKIR3DS1の低いコピー数と比較して疾患の経過の改善および/または慢性感染の治療への応答に関する指標であり、個体におけるKIR2DL3の低いコピー数が個体におけるKIR2DL3の高いコピー数と比較して疾患の経過の改善および/または慢性感染の治療への応答に関する指標である、方法。

10

【請求項 27】

図3Cおよび/または3Dに示されるプローブセット409A/409B/409Cおよび/もしくは711A/711B/711C/711Dならびに/またはプローブセット418A/418B/418Dおよび/もしくは709C/709D/709E/709Gならびに/またはプローブセット415B/415C/415Dおよび/もしくは417A/417B/417CがKIR遺伝子のコピー数を測定するために使用される、請求項26に記載の方法。

【請求項 28】

死亡率、移植片対宿主、移植片対腫瘍および移植後のレシピエントの移植後臓器生存などの移植関連評価項目の素因を測定するための方法であって、前記レシピエントのためのドナーの核酸試料中のKIR2DS4の存在または欠如を図3Aまたは3Bまたは3Cまたは3Dに列挙する少なくとも1個のプローブセットで測定するステップを含み、前記ドナーにおけるKIR2DS4の存在が、KIR2DS4が欠如しているドナーでの死亡率、移植片対宿主反応、移植片対腫瘍反応およびレシピエントの移植後臓器生存と比較して低下した死亡率、低下した移植片対宿主反応、増加した移植片対腫瘍反応および前記レシピエントにおける増加した移植後臓器生存に関する指標である、方法。

20

【請求項 29】

図3Cおよび/または3Dに示されるプローブセット504A/504Bおよび/または708K/708L/708M/708Nが、KIR多型の存在または欠如を測定するために使用される、請求項28に記載の方法。

【請求項 30】

関節外症状およびリウマチ性血管炎を伴う関節リウマチについての個体の素因を測定するための方法であって、前記個体の核酸試料中のKIR2DS2および/またはKIR2DL2のコピー数を図3A、3B、3Cおよび/または3Dに列挙する少なくとも1個のプローブセットで測定するステップを含み、前記個体におけるKIR2DS2および/またはKIR2DL2の高いコピー数が、個体におけるKIR2DL2および/またはKIR2DS2の低いコピー数と比較して関節外症状およびリウマチ性血管炎を伴う関節リウマチの素因に関する指標である、方法。

30

【請求項 31】

図3Cおよび/または3Dに示されるプローブセット420A/420Bおよび/もしくは706A/706Bならびに/またはプローブセット703A/703B/703Cおよび/もしくは544A/544Bが、KIR遺伝子のコピー数を測定するために使用される、請求項30に記載の方法。

【請求項 32】

個体における自己炎症、好ましくはHLA-B27関連腱付着部炎関連関節炎および反応性関節炎、乾癬の素因を測定するための方法であって、
a). 前記個体の核酸試料中において前記障害に関する指標であるKIR遺伝子の存在または欠如および/またはコピー数を図3Aまたは3Bまたは3Cまたは3Dに列挙する少なくとも1個のプローブセットで測定するステップ、ならびに
b). ステップa)において得られた結果を前記素因の存在または欠如と関連させるステップを含む、方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、生物学、分子生物学、生物工学および医学の分野に関する。

【背景技術】

【0002】

核酸配列は、さまざまな応用において調査される。例えば、病原体感染の診断用に個体の試料は病原体核酸の存在についてしばしば選別される。さらに核酸配列調査は、例えばブラダー・ウィリー症候群、アンジェルマン症候群およびデュシェンヌ型筋ジストロフィーなどの遺伝的障害の診断のためにしばしば実施される。染色体配列の欠損または重複の検出のために広く使用される方法は、定量的多重PCRおよび定量的サザンプロット法である。これらの方法の欠点は、それらが多大な時間を要し、結果の解釈が難しいことである。

10

【0003】

核酸配列の調査のために特に適している1つの技術は、多重ライゲーション依存性プローブ増幅(multiplex ligation dependent probe amplification) (MLPA)である。この技術は、プローブが増幅された後でのプローブの標的核酸へのハイブリダイゼーションに基づいている。現在使用されているMLPAアッセイにおいて、各MLPAプローブセットは、2個のハーフプローブ(half probe)からなる。これら2個のハーフプローブは、標的特定の配列および核酸増幅プライマー(好ましくはPCRプライマー)が結合できるプライマー結合部位配列を含有する。1個のハーフプローブは、典型的にはもう1個より長さが短い。もう1個のハーフプローブはハイブリダイズしないスタッファー配列のためにより長い。各プローブセットのスタッファー配列は長さが固有であり、電気泳動によって分離できる長さが異なる増幅産物(典型的には130から480塩基対の間)を生じる。MLPAアッセイにおいて、典型的には複数のプローブセットが使用される。各プローブセットの2個のハーフプローブは、典型的には変性された試料核酸に添加され、それらの標的配列上で相互に直接隣接してハイブリダイズする。続いて得られた核酸をライゲーション反応に供する。通例では、標的配列に完全にマッチするハーフプローブだけをライゲーションするリガーゼが使用される(例えば熱安定性リガーゼ-65など)。ライゲーション部位でのハーフプローブのミスマッチは、ライゲーションおよび増幅を妨げる。その結果プローブの増幅産物は検出されない。これはMLPAが単一のヌクレオチドだけで異なる配列を判別することを可能にする。したがって偽遺伝子または関連遺伝子由来の配列は識別されうる。ライゲーションしたハーフプローブ(「ライゲーションしたプローブ」とも称される)は、好ましくはPCRによって、プローブのプライマー結合部位配列に特定の結合できるプライマーを使用して増幅される。ライゲーションした各プローブの増幅産物は、例えば電気泳動によって、分離および分析される。好ましくは増幅産物は別々のピークによって図表で表される。各ピークは増幅されたMLPAライゲーションしたプローブの産物であり、対照試料と対象の試料との間のピーク強度の相対的差異(高さまたは面)は、コピー数多型を示す。図1AはMLPA反応を模式的に概説する。

20

30

【0004】

MLPAは、核酸(偽)遺伝子変異体、(偽)遺伝子特定のヌクレオチドおよび/またはコピー数多型を検出するために特に適している。MLPAは、いくつかの研究、例えばブラダー・ウィリー症候群またはアンジェルマン症候群の診断のため、胎児の染色体異常の出生前診断のためおよびデュシェンヌ型筋ジストロフィー遺伝子におけるエキソン欠損および/もしくは重複の検出のために使用されている。総合的に結論は、MLPAがその比較的平易さ、再現性および速度によって染色体異常の選別のために使用されている既存の方法に置き換わりうることであった。

40

【0005】

MLPAアッセイにおいて、遺伝子特定のまたは偽遺伝子特定の標的核酸は、好ましくはハーフプローブのライゲーション部位に存在する。遺伝子特定のまたは偽遺伝子特定のヌクレオチドがライゲーション部位に(またはから3ヌクレオチド以内に)存在する場合、これは完全にマッチしたハーフプローブだけが相互にライゲーションすることを保証する。ライゲーション部位でのハーフプローブのミスマッチは、ライゲーションおよび増幅

50

を妨げ、一方ライゲーション部位でのハーフプローブの完全なマッチはライゲーションおよび増幅を可能にする。既に記載したとおりこれは、MLPAが単一のヌクレオチドにおいてだけで異なる配列間を判別できるようにする。ライゲーション部位から4~6ヌクレオチド離れたミスマッチは、ライゲーションステップに影響をほとんど及ぼさないと報告されている。

【0006】

したがってハーフプローブは好ましくは、3'末端側が標的配列とハイブリダイズするハーフプローブ(本明細書において「左プローブ」または「左ハーフプローブ」と称される)が標的配列の遺伝子特異的配列または偽遺伝子特異的配列に相補的であるように設計される。この標的配列の遺伝子特異的配列または偽遺伝子特異的配列は、プローブを所与の遺伝子または偽遺伝子に特異的にする少なくとも1個であるが、好ましくはそれより多くのヌクレオチドを含む。好ましくは前記左ハーフプローブの3'末端ヌクレオチドの少なくとも1個は、標的配列の少なくとも1個の遺伝子特異的ヌクレオチドおよび/または少なくとも1個の偽遺伝子特異的ヌクレオチドに相補的であり、それにより、(偽)遺伝子特異的ヌクレオチドまたは所与の(偽)遺伝子中の単一ヌクレオチド多型は、前記左ハーフプローブのライゲーション部位に(またはライゲーション部位から3ヌクレオチド以内に)存在する。この場合、前記左ハーフプローブと、5'末端側が標的配列とハイブリダイズするプローブ(本明細書において「右プローブ」または「右ハーフプローブ」と称される)とは、左ハーフプローブの配列がその標的配列に完全にマッチする場合にだけ相互にライゲーションする。

10

20

【0007】

本明細書において使用される用語「遺伝子特異的ヌクレオチド」または「遺伝子特異的配列」は、前記遺伝子中に存在するが、少なくとも1個の他の関連遺伝子または偽遺伝子中の対応する位置には存在しないヌクレオチドまたは配列をそれぞれ意味する。用語「偽遺伝子特異的ヌクレオチド」または「偽遺伝子特異的配列」は、前記偽遺伝子中に存在するが、少なくとも1個の他の関連遺伝子または偽遺伝子中の対応する位置には存在しないヌクレオチドまたは配列をそれぞれ意味する。したがって少なくとも1個の他の(偽)遺伝子は、その位置に別のヌクレオチドまたは配列を含む。したがって、(偽)遺伝子中の(偽)遺伝子特異的ヌクレオチドまたは(偽)遺伝子特異的配列の存在は、前記(偽)遺伝子を少なくとも1個の他の(偽)遺伝子から、他の(偽)遺伝子が前記(偽)遺伝子と全体的な高い同一性を有する場合であっても識別する。

30

【0008】

本明細書において偽遺伝子は、野生型、機能性のタンパク質をコードしない核酸配列として定義される。用語「偽遺伝子」は、タンパク質をまったくコードしない核酸配列を包含する。追加的に用語「偽遺伝子」は、修飾(例えば挿入または欠損)を含み、それにより同種の野生型タンパク質と比較して顕著に損なわれたまたは失われた機能を有するタンパク質またはタンパク質の一部をコードする対立遺伝子を包含する。そのような対立遺伝子は、例えば少なくとも1個のヌクレオチドの挿入および/または欠損によって生じたフレームシフトの結果としての、または早期終止コドンによって生じた切断型タンパク質をコードする。

40

【0009】

リガーゼは相互に隣接しているハーフプローブだけをライゲーションすることから、ハーフプローブは、それらの標的配列上で相互に直接隣接してハイブリダイズできるように設計される必要がある。これは、標的核酸上の左ハーフプローブのハイブリダイゼーション位置がしばしば標的核酸の(偽)遺伝子特異的部位によって(上に説明のとおり)決定されることから常に都合の良いことではない。そのような場合、右ハーフプローブが前記(偽)遺伝子特異的ヌクレオチドに直接隣接する前記標的核酸の領域とハイブリダイズできるべきであることから、対応する右ハーフプローブの配列も同様に決定される。しかしそのような領域は、試料の核酸配列中にごく一般に存在する配列を含む可能性がある。結果としてそのような共通配列に相補的である配列を有する右ハーフプローブは、試料中に存在す

50

る核酸の多数の異なる部位でハイブリダイズする。そのような場合、標的核酸の所与の対象部位に対してより特異的な配列を有する右ハーフプローブを設計することはさらに魅力的である。しかし左ハーフプローブおよび右ハーフプローブが標的核酸の隣接領域とハイブリダイズしない場合、慣用されるリガーゼは、ライゲーション反応を実行できない。Sc houten名義の特許出願WO 01/61033は、(左ハーフプローブと右ハーフプローブとの間のギャップを埋める)短い第3プローブを反応混合物に添加することによるこの課題の解法を開示している。そのような第3プローブは、左および右ハーフプローブの間にある標的核酸の領域とハイブリダイズするように設計される。そのような第3プローブのハイブリダイゼーション後、左ハーフプローブは第3プローブを介して右ハーフプローブと連結され、ライゲーションが可能になる。第3ハーフプローブは、リガーゼ反応が生じるように左ハーフプローブと右ハーフプローブとを連結する限りは、左および右ハーフプローブの間にある標的核酸の領域に完全に相補的である必要はない。さらに第3プローブは小さいことから、左および右ハーフプローブと比較して標的核酸とより容易にハイブリダイズする。したがって第3プローブと標的核酸との間のミスマッチは許容される。このように1個の同じ第3プローブが、さまざまなプローブセットの左および右ハーフプローブを連結するために適している。

10

【0010】

第3プローブを使用する代わりにWO 01/61033は、標的配列へのハーフプローブのハイブリダイゼーション後に左ハーフプローブの3'末端が伸長され、それにより左ハーフプローブと右ハーフプローブとの間のギャップが埋められる実施形態も開示している。得られた伸長した左ハーフプローブは右ハーフプローブと隣接し、リガーゼ反応が可能になる。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】WO 01/61033

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】H.Li、PLoS Genetics、2008、4、11:e1000254

【非特許文献2】M.Uhrberg、Eur.J.Imm.Highlights、2005、35:10~15

【非特許文献3】M.Carington、The KIR Gene Cluster、2003

30

【非特許文献4】K.Hsu、Imm.Reviews、2002、190:40~52

【非特許文献5】www.mpla.com.

【非特許文献6】www.ihwg.org

【非特許文献7】http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/xslcgi.fcgi?id=1347&cmd=kirped&locus_group=1

【非特許文献8】www.allele frequencies.net

【非特許文献9】<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir>

【非特許文献10】www.mlpa.com/protocols.htm

【非特許文献11】<http://www.softgenetics.com/papers/MLPA>

40

【非特許文献12】www.biolegio.com

【非特許文献13】www.invitrogen.com

【非特許文献14】www.cephb.fr

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

さまざまなプローブセットの増幅物(amplificate)の間の判別を可能にするために、現在使用されているMLPAプローブセットは、得られた増幅物が異なる長さを有するように設計されている。ライゲーションしたプローブの長さにおける差異は、典型的にはハーフプローブの内の1個のハイブリダイズしないスタッファー配列を使用することによって実現される。各プローブセットのハーフプローブのスタッファー配列は、長さが固有であり、

50

電気泳動によって分離されるさまざまな長さの増幅産物を生じる。典型的には異なる増幅産物間の識別を可能にするために、ライゲーションした異なるプローブ間の長さの差異は、少なくとも5ヌクレオチドである。通常のMLPAアッセイが、多種多様な(偽)遺伝子変異体を検出できるようにするために多数の異なるプローブセットの使用を含むことから、これは長いプローブが作製される必要があることを意味している。これは、多数の(偽)遺伝子特異的ヌクレオチドを保持している複合遺伝子座が適切な遺伝子型判定について調査されるおよび/または追加的単一ヌクレオチド多型が特定の遺伝子型におけるわずかな遺伝的変異の検出についてならびに偽遺伝子およびこれらの偽遺伝子中の単一ヌクレオチドの存在について調査される場合は特にそうである。そのような調査は、多数の異なるプローブセットの使用を必要とする。これはプローブが化学的に合成される場合に、合成プローブの欠点がクローン化されたプローブとの比較で(不完全に合成されたプローブの混入によって)より低品質であることから好都合ではない。これらの不完全に合成されたプローブは、1ヌクレオチド欠いているまたは増されており、スタッターピーク(stutter peak)または分裂ピークを生じる。これらの混入物を除去するための方法は、合成されたプローブを例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)によって精製することである。短いおよび長いプローブが化学的に合成された場合、より長いプローブほどより高い割合で不完全なオリゴヌクレオチドによる影響をさらに受けやすく、合成プローブの大きさに限界をもたらす。合成プローブの上限は、典型的には約100塩基対である。

10

20

30

40

50

【0014】

一方では合成プローブの使用は、それらを得ることが容易であり費用効率が高いことから好ましいが、バクテリオファージベクターにおいてクローニングによってプローブを生成することは時間のかかる工程であり高価である。

【課題を解決するための手段】**【0015】**

したがって、現在使用されるMLPAアッセイで良い結果が得られているが、代替および改善を提供することは、特に複合(偽)遺伝子座が多数のプローブセットの使用を含んで調査される場合に望ましい。

【0016】

本発明の目的は、代替のおよび改善されたMLPA法およびMLPA様の方法を提供することである。

【0017】

したがって本発明は、第1核酸プローブ(「左プローブ」または「左プローブ部分」)、第2核酸プローブ(「右プローブ」または「右プローブ部分」)および第3核酸プローブ(「第3プローブ」または「中央プローブ」または「中央プローブ部分」)を含む少なくとも1個のプローブセットが使用され、少なくとも1個の第3プローブが(偽)遺伝子特異的ヌクレオチドまたは(偽)遺伝子特異的配列を含む標的核酸領域に相補的である、MLPAアッセイおよびMLPA様のアッセイを提供する。

【0018】

本発明は、先行技術と比較して異なる手法を提供する。MLPA法およびMLPA様の方法は、ここに提供され、少なくとも1個の第3プローブ(しかし好ましくは複数の第3プローブ)が標的核酸の少なくとも1個の(偽)遺伝子特異的ヌクレオチドを検出するために使用される。したがって追加的プローブが、(偽)遺伝子特異的標的核酸に特異的な少なくとも1個のプローブセットにおいて使用される。本明細書において使用されるMLPA様の方法は、少なくとも2個のプローブの標的核酸へのハイブリダイゼーションステップおよび少なくとも2個のプローブのライゲーションステップを含む方法として定義される。好ましくは前記MLPA様の方法は、ライゲーションしたプローブの増幅も含む。

【0019】

本発明によるMLPA法およびMLPA様の方法は、現在の方法と比較していくつかの有利点を有する。例えばプローブセットの左プローブおよび第3プローブの両方が、(偽)遺伝子特異的ヌクレオチドおよび/または追加的単一ヌクレオチド多型を含む標的核酸領域に相補

的である場合、2個の異なる(偽)遺伝子特異的標的ヌクレオチドまたは2個のSNPまたは1個の(偽)遺伝子特異的標的ヌクレオチドと1個のSNPとの組合せが1個のプローブセットを使用して選別される。標的核酸の約150ヌクレオチドの領域内に位置する少なくとも2個の(偽)遺伝子変異を選別するために1個のプローブセットを使用することが可能になる。対照的に現在使用されているMLPAアッセイでは、2個の別々のプローブセットが標的核酸中の2個の変異体を選別するために必要である。これは、以下の実施例によって例示される。標的(偽)遺伝子が(偽)遺伝子変異体を位置Aおよび位置Bに含有する場合、個体は以下の対立遺伝子:a-b、a-B、A-bおよびA-Bを含む可能性がある。対立遺伝子a-Bが前記個体の試料中に存在するかどうかを測定するために、現在使用されているMLPAアッセイは「a」および/または「A」(偽)遺伝子変異体に特異的なプローブセットおよび「B」および/または「b」(偽)遺伝子変異体に特異的なプローブセットを必要とする。「a」に特異的なプローブセットおよび「B」に特異的なプローブセットの両方が陽性結果を呈する場合、対立遺伝子a-Bが前記個体において存在することが結論される。しかし本発明によるMLPA法では、左プローブが「a」(偽)遺伝子変異体に特異的であり、第3プローブが「B」(偽)遺伝子変異体に特異的である1個だけのプローブセットが必要とされる。増幅産物が得られる場合は、対立遺伝子a-Bが前記個体において存在することが直ちに結論づけられる。対立遺伝子a-Bが存在しない場合、本発明による前記プローブセットは増幅産物を生じない。したがって所与の対立遺伝子についてより特異的に選別することが可能になる。

10

20

30

40

50

【0020】

さらに本発明の方法は、2個の(偽)遺伝子変異が相互に近接して位置する場合に追加的有利点を提供する。位置Aおよび位置Bの(偽)遺伝子変異体が相互に近接している場合、従来のMLPA技術による2個の異なるプローブセットの使用は、2個のプローブセットがそれらの近接近により相互に妨げることから不都合であるかまたは全く不可能でさえある。これは、2個のプローブセットの効率の劣るハイブリダイゼーションを生じ、(2個の(偽)遺伝子変異体が1個だけのプローブセットを使用して検出されうる)本発明による方法と比較してより低いシグナルを生じる。したがって本発明による方法は、(偽)遺伝子変異体が相互に近接して位置する場合に、より感受性が高い(実際にはこの効果は(偽)遺伝子変異体が相互に20~100ヌクレオチドの間で位置する場合に最も強い)。(現在使用されているMLPAアッセイにおいてと同様に)同じ位置での変異体を検出するために2個のプローブを有することは、(偽)遺伝子変異体の存在およびプローブの結合に依存してシグナル強度における変化を生じる。1つの位置に対して2個を超えるプローブの使用は勧められていない。図1Bは、プローブ3個からなるプローブセットがSNP 2個を検出するために使用される本発明によるMLPA反応を模式的に概説している。図1Cは、SNP 2個を検出するための本発明による2個の特異的プローブセットの非限定的例を示す。

【0021】

別の例として、個体が上で述べた(偽)遺伝子についてヘテロ接合性である場合、個体は例えば対立遺伝子a-BおよびA-bを含有する。従来のMLPAアッセイは4個のプローブセット(1個は「a」に特異的、1個は「A」に特異的、1個は「b」に特異的および1個は「B」に特異的)を使用する。4個すべてのプローブセットがハイブリダイズし、増幅産物を生じることから、4個の陽性結果が得られる。しかしそのような場合、個体が対立遺伝子a-bおよびA-Bまたは対立遺伝子a-BおよびA-bのいずれを含むのかは未知のままである。しかし本発明による方法では、前記個体の対立遺伝子を直接同定することが可能になる。例えば本発明の第1プローブセットは、「a」に特異的な左プローブおよび「b」に特異的な第3プローブを含み、「a」に特異的な左プローブおよび「B」に特異的な第3プローブを含む本発明の第2プローブセットならびに「A」に特異的な左プローブおよび「b」に特異的な第3プローブを含む本発明の第3プローブセットならびに「A」に特異的な左プローブおよび「B」に特異的な第3プローブを含む本発明の第4プローブセットと共に使用される。本発明によるこれらのプローブセットの2個、すなわち、「a」に特異的な左プローブおよび「B」に特異的な第3プローブを含む本発明の第2プローブセットならびに「A」に特異的な左プローブおよび「b」に特異的な第3プローブを含む本発明の第3プローブセットは増幅産物を生

じる。本発明による第1および第4プローブセットは、(顕著な)増幅産物を生じない。このようにいずれの対立遺伝子が前記個体に存在するかは直ちに明らかになる。これも、特に多数の(偽)遺伝子特異的ヌクレオチドを有する複合遺伝子座および所与の(偽)遺伝子中の追加的単一ヌクレオチド多型が調査される場合に、そのような場合にはそのような(偽)遺伝子変異体の多数の異なる組合せが選別される必要があることから、現在使用されている方法と比較しての有利点である。

【0022】

本発明による方法の別の有利点は、ライゲーションしたプローブの長さにおけるさらなる多様性が得られるという事実である。本発明の少なくとも1個のプローブセット、しかし好ましくは本発明の複数のプローブセットが第3プローブを含むことから、生じるライゲーションしたプローブの長さにも多様性が得られるようにプローブセットを設計することが可能になる。これは、スタッファー配列の必要性を除去する。結果として、本発明によるプローブセットの個々のプローブはより短いままであることができ、化学的に合成されたプローブが使用される場合に長いプローブの化学的作製が上に記載のとおり煩雑であることから、特に有利である。このように本発明による方法は、比較的短いプローブを有するプローブセットの使用を可能にし、得られるライゲーションしたプローブは多くの大きさの多様性を考慮して十分に長い。したがって本発明は、得ることが容易であり費用効率が高い合成プローブの使用を、複合遺伝子座が調査される場合であっても可能にし、交差反応性または明瞭でない結果の場合にアッセイを適用するためのより大きな自由度を与える。

10

20

【0023】

例えば、20(偽)遺伝子変異体が調査される場合に、4~100ヌクレオチドのさまざまな長さスタッファー配列を有するプローブが、得られる増幅産物をサイズによって識別できるようにするために従来のMLPAアッセイにおいては使用される必要がある。標的配列とハイブリダイズするプローブ配列が典型的には約30ヌクレオチドであること、およびプローブのプライマー結合配列が典型的には約15~25ヌクレオチドであることから、これは45~125ヌクレオチドのさまざまな長さを有するプローブを含むプローブセットが合成される必要があることを意味する。プローブが化学的に合成される場合、これらの長さを有する信頼性のあるプローブセットを得ることは困難である。しかし本発明による方法では、種々の増幅物間での長さの差異をプローブセット中のスタッファー配列の使用によって得る必要はない。代わりに少なくとも1個の第3プローブが使用され、好ましくは複数の第3プローブが使用される。3個のプローブの組合せを変化させることによって(任意選択で2個のプローブからなるプローブセットとの組合せで)ライゲーションしたプローブの長さ全体の差異は相当に変化するが、好都合な長さを有する化学的に合成されたプローブを含んだプローブセットが使用されうる。当然のことながらこれは、スタッファー配列の使用が排除されることを意味しない。しかし当業者は、長さの多様性のためだけにこれらのスタッファー配列を、もはや当てにする必要はない。スタッファー配列が本発明による方法において使用される場合、これらの配列を可能な限り短く維持することは好ましい。

30

【0024】

したがって本発明は、試料中の少なくとも1個の標的核酸配列の存在について選別するための方法であって、

40

a)前記試料に少なくとも2個の異なるプローブセットを添加するステップであって、各プローブセットが、

前記標的核酸配列の第1領域に相補的な第1核酸配列を含む第1核酸プローブ(「左プローブ」)、および

前記標的核酸配列の第2領域に相補的な第2核酸配列を含む第2核酸プローブ(「右プローブ」)

を含み、

前記プローブセットの少なくとも1個が前記標的核酸配列の第3領域に相補的な第3核酸配列を含む第3核酸プローブを含み、

50

前記プローブセット中に前記第3プローブが存在する場合、前記標的核酸の前記第1および前記第3領域が相互に本質的に隣接して位置し、前記標的核酸の前記第3および前記第2領域が相互に本質的に隣接して位置し、

前記プローブセット中に前記第3プローブが存在しない場合、前記標的核酸の前記第1および前記第2領域が相互に本質的に隣接して位置するステップ、

b)前記少なくとも2個の異なるプローブセットを前記試料の相補的核酸とハイブリダイズさせるステップ、

c)前記試料の核酸をライゲーション反応に供するステップ、ならびに

d)前記少なくとも1個の標的核酸配列が前記試料中に存在するかどうかを測定するステップ

を含み、

少なくとも1個の第3核酸プローブが(偽)遺伝子変異を含む標的核酸領域に相補的である方法を提供する。

【0025】

本発明による少なくとも3個のプローブを含むプローブセットの有利点は、少なくとも2個の異なるSNPが1個のプローブセットで検出されうることである。例えば3個のプローブを含むプローブセットにライゲーションのための2個の部位が存在する。左プローブと中央プローブとがライゲーションされ、中央プローブと右プローブとがライゲーションされる。各ライゲーション部位でSNPが検出されうる。したがって、2個のSNPを検出するために使用されるように同じプローブセットの2個のプローブを設計することが可能である。この場合、MLPAおよび本発明による3個のプローブを含むプローブセットを使用すると、試料中に両方のSNPが存在する場合にだけ(その場合にだけライゲーションが両方のライゲーション部位で生じうるため)産物が得られる。

【0026】

2個のプローブからなる従来のMLPAプローブセットでは、ライゲーションのための部位が1個だけ存在することから1個だけのSNPが検出されうる。WO 01/61033に記載のとおり従来のMLPAにおける追加的第三プローブ部分は、場合により2個のハーフプローブを架橋するために使用される。そのような追加的第三プローブ部分は、SNP特異的ではない。したがって本発明による少なくとも3個のプローブを含むプローブセットの有利点は、従来のMLPAにおいてそのような追加的第三プローブ部分を架橋目的で使用する場合には得られない。

【0027】

したがって、本発明の好ましい実施形態においてプローブセットは、3個の核酸プローブを含み、少なくとも2個の核酸プローブそれぞれが異なる(偽)遺伝子変異に特異的である。好ましくは本発明によるプローブセットの第1(または第2)核酸プローブは、遺伝子特異的ヌクレオチドおよび/もしくは偽遺伝子特異的ヌクレオチド、ならびに/または遺伝子特異的配列および/もしくは偽遺伝子特異的配列、ならびに/または所与の遺伝子もしくは偽遺伝子中の多型を含む標的核酸領域に相補的であり、同じプローブセットの第3核酸プローブは、遺伝子特異的ヌクレオチドおよび/もしくは偽遺伝子特異的ヌクレオチド、ならびに/または遺伝子特異的配列および/もしくは偽遺伝子特異的配列、ならびに/または所与の遺伝子もしくは偽遺伝子中の多型を含む別の標的核酸領域に相補的である。前記多型は、好ましくはSNPを含む。

【0028】

好ましくはライゲーションしたプローブは増幅される。したがって本発明は、試料中の少なくとも1個の標的核酸配列の存在について選別するための方法であって、

a)前記試料に少なくとも2個の異なるプローブセットを添加するステップであって、各プローブセットが、

前記標的核酸配列の第1領域に相補的な第1核酸配列と、その5'側に位置し、第1プライマー結合部位を含む非相補的核酸配列とを含む第1核酸プローブ(「左プローブ」)、および

前記標的核酸配列の第2領域に相補的な第2核酸配列と、その3'側に位置し、第2プライ

10

20

30

40

50

マー結合部位を含む非相補的核酸配列とを含む第2核酸プローブ(「右プローブ」)を含み、

前記プローブセットの少なくとも1個が前記標的核酸配列の第3領域に相補的な第3核酸配列を含む第3核酸プローブを含み、

前記プローブセット中に前記第3プローブが存在する場合、前記標的核酸の前記第1および前記第3領域が相互に本質的に隣接して位置し、前記標的核酸の前記第3および前記第2領域が相互に本質的に隣接して位置し、

前記プローブセット中に前記第3プローブが存在しない場合、前記標的核酸の前記第1および前記第2領域が相互に本質的に隣接して位置するステップ、

b)前記少なくとも2個の異なるプローブセットを前記試料の相補的核酸とハイブリダイズさせるステップ、

c)前記試料の核酸をライゲーション反応に供するステップ、

d)前記試料の核酸を、前記第1プライマー結合部位に特異的に結合できる少なくとも1個のプライマーおよび前記第2プライマー結合部位に特異的に結合できる少なくとも1個のプライマーを使用する核酸増幅反応に供するステップ、ならびに

e)増幅された核酸が存在するかどうかを測定し、それにより前記少なくとも1個の標的核酸配列が前記試料中に存在するかどうかを測定するステップ

を含み

少なくとも1個の第3核酸プローブが(偽)遺伝子変異を含む標的核酸領域に相補的である方法を提供する。

【0029】

本明細書において使用される用語「(偽)遺伝子変異」は、(偽)遺伝子特異的ヌクレオチドおよび/または(偽)遺伝子特異的配列を包含する。一実施形態において前記(偽)遺伝子変異は、所与の(偽)遺伝子中の追加的多型を含む。前記追加的多型は、好ましくはSNPを含む。

【0030】

したがって本発明は、少なくとも1個のプローブセット(しかし好ましくは複数のプローブセット)が3個のプローブを含むプローブセットを使用する。プローブは、対象の標的核酸の領域に相補的である配列を含む。本明細書において使用される用語「相補的」は、前記プローブ配列が、前記領域または前記領域の相補物に対して少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有することを意味する。用語「%配列同一性」は本明細書において、2つの配列を配列比較し(必要であれば)最大の同一性百分率を得るためにギャップを導入した後に、参照配列における残基と同一であるヌクレオチド配列中の残基の百分率として定義される。配列比較のための方法およびコンピュータプログラムは当技術分野において周知である。候補配列がこの定義範囲内であるかどうかを決定する目的のために使用されうるまたは適用されうる1つのコンピュータプログラムは、Autoassembler 2.0 (ABI Prism、Perkin Elmer)である。

【0031】

各プローブセットの第1および第2プローブは、プライマー結合部位も含み、それにより生じたライゲーションしたプローブは増幅されうる。好ましくは各プローブセットの第1核酸プローブのプライマー結合部位は、同じプライマーが結合できるように設計される。これは、ステップd)における第1プローブのプライマー結合部位への結合のための同じプライマーの使用を可能にする。同様に、各プローブセットの第2核酸プローブのプライマー結合部位が、同じプライマーが結合できるように設計されることは好ましい。最も好ましくはプローブセットは、第1プライマーが各プローブセットの第1核酸プローブのプライマー結合部位に特異的に結合でき、第2プライマーが各プローブセットの第2核酸プローブのプライマー結合部位に特異的に結合できるように設計される。この実施形態は、ステップd)における1個だけのプライマー対の使用を可能にする。しかし、これは必要ではなく：異なるプローブセットに対して異なるプライマーの使用も可能である。しかし異なるブラ

10

20

30

40

50

イマーの数は、可能な限り少なく維持される。

【0032】

したがって好ましい一実施形態は、各プローブセットの第1核酸プローブの第1プライマー結合部位が同じプライマーに特異的に結合でき、かつ/または各プローブセットの第2核酸プローブの第2プライマー結合部位が同じプライマーに特異的に結合できる、本発明による方法を提供する。好ましくは各プローブセットの第1核酸プローブおよび/または第2核酸プローブは本質的に同一のプライマー結合配列を含む。したがってさらに提供されるのは、前記第1核酸プローブの非相補的核酸配列が本質的に同一の第1プライマー結合部位を含み、かつ/または前記第2核酸プローブの非相補的核酸配列が本質的に同一の第2プライマー結合部位を含む、本発明による方法である。本質的に同一のプライマー結合配列を使用することは、同じプライマーが異なるプローブに結合できることを確実にする。用語「本質的に同一のプライマー結合配列」は、本明細書において、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を相互に含むプライマー結合配列として定義される。

10

【0033】

既に記載のとおり本発明による方法は、種々の(偽)遺伝子特異的ヌクレオチドおよび/または、複合遺伝子座などの(偽)遺伝子変異体を有する核酸配列を調査するために特に適している。したがって複数の第3プローブを使用することは好ましく、それにより多数の(偽)遺伝子変異体組合せが調査される。したがって、少なくとも2個、好ましくは少なくとも5個、より好ましくは少なくとも10個の異なる第3核酸プローブが使用される本発明による方法が好ましくは提供される。実施例に例示するとおり、本発明によるさまざまな第3プローブを含む複数のプローブセットは、KIR遺伝子座などの複合遺伝子座の選別を可能にする。すべての第3プローブが標的核酸の遺伝的変異に特異的である必要はない。変異体特異的の第3プローブと(偽)遺伝子変異に特異的ではない第3プローブとの組合せを使用することも可能である。同様にすべての第1プローブが標的核酸の変異体に特異的である必要はない。変異体特異的の第1プローブと(偽)遺伝子変異に特異的ではない第1プローブとの組合せを使用することも可能である。任意のこれらの組合せが、例えば得られるライゲーションしたプローブの長さをより大きな程度で変化させるために使用される。したがって本発明の好ましい一実施形態において、第3核酸プローブの少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%が、(偽)遺伝子変異を含む標的核酸領域に相補的である。一実施形態においてすべての第3プローブは、(偽)遺伝子変異体を含む標的核酸領域に相補的である。好ましくは第2プローブ(「右プローブ」)は、(偽)遺伝子変異体特異的配列を含有するようには設計されないが、本発明による方法において変異体特異的右プローブの使用は排除されない。

20

30

【0034】

好ましくは、(偽)遺伝子変異を含む標的核酸領域に相補的である第3核酸プローブの少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%は、(偽)遺伝子変異を含む別の標的核酸領域に相補的である第1核酸プローブまたは第2核酸プローブと、1つのMLPAアッセイまたはMLPA様のアッセイで多数の変異体について選別できるようにするために組み合わせられる。一実施形態において、(偽)遺伝子変異を含む標的核酸領域に相補的である第1核酸プローブまたは第2核酸プローブと組み合わせられるすべての第3プローブは、(偽)遺伝子変異体を含む標的核酸領域に相補的である。当然のことながらこれらのプローブは、好ましくは異なる変異体に特異的である。

40

【0035】

好ましい一実施形態において、第3プローブの(偽)遺伝子変異体特異的配列は、第3プローブのヌクレオチドの最後の3個またはヌクレオチドの最初の3個中に少なくとも位置する。これは、ヌクレオチドの最後の3個および/またはヌクレオチドの最初の3個が標的核酸の(偽)遺伝子変異に特異的な少なくとも1個のヌクレオチドを含むことを意味する。この実施形態において前記(偽)遺伝子変異は、第3プローブのライゲーション部位に存在し、それによりライゲーションは、第3プローブの配列が前記(偽)遺伝子変異に正確に相補的

50

である場合にだけ可能である。これは、既に記載のとおりMLPA法の特異性を増強する。好ましくは前記第3プローブのヌクレオチドの最後の3個および/またはヌクレオチドの最初の3個は、標的ヌクレオチドの(偽)遺伝子変異体に特異的であるヌクレオチド1個を含む。

【0036】

本発明によるプローブセットは、好ましくは90から300ヌクレオチドの間の長さを有する。クローニングされたプローブは、500ヌクレオチド程度の長さでありうる。しかし好ましくは化学的に合成されたプローブがそれらが迅速に合成され、容易に得られ、かつ費用効率が高いことから使用される。本発明によるプローブを合成によって作製することを可能にするために、20から100ヌクレオチドの間の長さを有する第3核酸プローブが使用される本発明による方法が好ましくは提供される。最も好ましくは19から110ヌクレオチドの間の長さを有する第3核酸プローブが使用される。3個の核酸プローブを含む、本発明の少なくとも1個のプローブセット(しかし好ましくは本発明による複数のプローブセット)が使用されることから、得られるライゲーションしたプローブの長さにおける十分な多様性および特異性が確実にあり、それにより多数の(偽)遺伝子変異が同時に調査されうる。

【0037】

得られたライゲーションしたプローブのこれらの長さの多様性は、既に記載のとおりスタッファー配列の必要性を排除する。したがって、標的核酸に相補的ではない第1および/または第2プローブの部分がほぼ同じ長さを有するようにプローブセットを設計することは可能である。この実施形態により、すべての第1プローブの非相補的配列の長さは、各プローブセットにおいてほぼ同じであり、かつ/またはすべての第2プローブの非相補的配列の長さは、各プローブセットにおいてほぼ同じである。これらの長さは、それらが相互に10ヌクレオチドを超えて異ならない場合にほぼ同じである。好ましくはそれらは相互に6ヌクレオチドを超えて異ならず、最も好ましくはそれらは相互に4ヌクレオチドを超えて異ならない。これも、プローブの合成による作製を促進する。したがってさらに提供されるのは、前記少なくとも2個の異なるプローブセットの前記第1核酸プローブの前記非相補的核酸配列の長さにおける差異、および/または前記少なくとも2個の異なるプローブセットの前記第2核酸プローブの前記非相補的核酸配列の長さにおける差異が、核酸6個より少ない、好ましくは核酸4個より少ない本発明による方法である。

【0038】

(偽)遺伝子特異的ヌクレオチドおよび追加的単一ヌクレオチド多型の分析に加えて、MLPA技術またはMLPA様の技術は、相対的(偽)遺伝子コピー数測定のために特に適している。対象の(偽)遺伝子(または対象の任意の他の標的核酸)の複数の複製物は、試料核酸分子中に存在し、各複製物は、検出可能な特異的プローブによって原理上は結合される。プローブが増幅される場合に元の試料核酸中に複数の複製物が存在すると、複製物が1個だけ存在する場合と比較してより多い増幅産物が存在する。したがって増幅産物の量の分析は、対象の標的核酸のコピー数についての情報を提供する。これは、別々のピークとして図表に表される増幅産物によってしばしばなされる。各ピークは、増幅されたMLPAでライゲーションしたプローブの産物であり、対照試料と対象の試料との間のピーク強度(高さまたは表面)における相対的差異はコピー数多型を示す。複合遺伝子座が調査される場合、対象の(偽)遺伝子の複数の複製物は、高度に多型の領域に存在しうる。そのような場合、(偽)遺伝子コピー数が測定される場合に(偽)遺伝子変異体の多数の異なる組合せが考慮される必要がある。これは、(偽)遺伝子変異体の各組合せが検出されうることを確実にするために多種多様な異なるプローブセットの使用を含む。しかし本発明による一実施形態において、対象の核酸の相対的コピー数が概算される場合に改善された手法が提供される。この実施形態により、少なくとも1個のプローブが1つまたは複数の位置に縮重塩基を有して使用される。これは、異なるヌクレオチドが1つまたは複数の位置に存在できるプローブの混合物が使用されることを意味する。それにより、いくつかのプローブが所与の位置Xに特定のヌクレオチドを有し、いくつかのプローブが前記位置Xに別のヌクレオチドを有することを除いて同じ配列を有するプローブの混合物は使用される。そのような縮重塩基は、図2に示すとおりIUBヌクレオチドコードによって一般に表される。縮重塩基を含むプ

10

20

30

40

50

ローブの使用は、対象の核酸のコピー数の効率的な概算を、高度に多様な領域においてさえも可能にする。したがってさらに提供されるのは、対象の核酸のコピー数を測定するための方法であって、1つまたは複数の位置に縮重塩基を有するプローブを含む少なくとも1個のプローブセットが使用される方法である。好ましくは最大で20プローブ位置がそのような複数の代替を、対象の所与の標的領域に対するプローブの特異性を保持するために有する。対象の核酸のコピー数を測定するための少なくとも1個のプローブセットの使用であって、少なくとも1個のプローブセットが1つまたは複数の位置に縮重塩基を有するプローブを含む使用もこの方法において提供される。好ましい一実施形態において、縮重塩基を有するプローブを含む少なくとも1個のプローブセットは、本発明によるMLPA法またはMLPA様の方法において使用される。したがってさらに提供されるのは、1つまたは複数の位置に縮重塩基を有するプローブを含む少なくとも1個のプローブセットが使用される本発明による方法である。

10

20

30

40

50

【0039】

代替としてまたは追加的に、A、T、G、CおよびUからなる群から選択される少なくとも2個の塩基に結合できる代替塩基を含むプローブセットが使用される。好ましくは前記代替塩基は、A、T、G、CおよびUからなる群から選択される少なくとも3個、最も好ましくは少なくとも4個の塩基に結合できる。そのような代替塩基は、縮重塩基に対する代替として適している。当然のことながら、そのような代替塩基を縮重塩基と組み合わせることも可能である。特に好ましい実施形態において前記代替塩基は、AおよびTおよびGおよびCおよびUに結合できるデオキシイノシン三リン酸(dITP)またはその機能的等価物である。したがってさらに提供されるのは、対象の核酸のコピー数を測定するための方法であって、A、T、G、CおよびUからなる群から選択される少なくとも2個、好ましくは少なくとも3個、より好ましくは少なくとも4個の塩基に結合できる代替塩基を含む少なくとも1個のプローブセットが使用される方法である。既に記載のとおり前記代替塩基は、好ましくはデオキシイノシン三リン酸(dITP)またはその機能的等価物を含む。対象の核酸のコピー数を測定するための少なくとも1個のプローブセットの使用であって、少なくとも1個のプローブセットがA、T、G、CおよびUからなる群から選択される少なくとも2個、好ましくは少なくとも3個、より好ましくは少なくとも4個の塩基に結合できる代替塩基を含む使用もこれにより提供される。好ましい実施形態において、そのような代替塩基を含む少なくとも1個のプローブセットは、本発明によるMLPA法またはMLPA様の方法において使用される。したがってさらに提供されるのは、A、T、G、CおよびUからなる群から選択される少なくとも2個、好ましくは少なくとも3個、より好ましくは少なくとも4個の塩基に結合できる代替塩基を含む少なくとも1個のプローブセットが使用される本発明による方法である。既に記載のとおり前記代替塩基は、好ましくはデオキシイノシン三リン酸(dITP)またはその機能的等価物を含む。

【0040】

本発明は、試料中の少なくとも1個の標的核酸配列の存在についての選別のための代替のおよび改善された方法であって、(偽)遺伝子変異を含む標的核酸領域に相補的である少なくとも1個の第3プローブが使用される方法を提供する。少なくとも3個の核酸プローブを含むプローブセットの使用であって、試料中の少なくとも1個の標的核酸配列の存在について選別するために、少なくとも1個の第3プローブが遺伝子変異体および/または偽遺伝子変異体を含む標的核酸領域に相補的である使用も、したがって提供される。好ましくは本発明による複数のプローブセットが使用される。したがってさらに提供されるのは試料中の少なくとも1個の標的核酸配列の存在について選別するための複数のプローブセットの使用であって、前記各プローブセットは：

前記標的核酸配列の第1領域に相補的な第1核酸配列と、その5'側に位置し、第1プライマー結合部位を含む非相補的核酸配列とを含む第1核酸プローブ、および

前記標的核酸配列の第2領域に相補的な第2核酸配列と、その3'側に位置し、第2プライマー結合部位を含む非相補的核酸配列とを含む第2核酸プローブを含み、

前記プローブセットの少なくとも1個が、前記標的核酸配列の第3領域に相補的な第3核酸配列を含む第3核酸プローブを含み、かつ

前記プローブセット中に前記第3プローブが存在する場合、前記標的核酸の前記第1および前記第3領域が相互に本質的に隣接して位置し、前記標的核酸の前記第3および前記第2領域が相互に本質的に隣接して位置し、

前記プローブセット中に前記第3プローブが存在しない場合、前記標的核酸の前記第1および前記第2領域が相互に本質的に隣接して位置し、

少なくとも1個の第3核酸プローブが、遺伝子特異的ヌクレオチドおよび/もしくは偽遺伝子特異的ヌクレオチド、ならびに/または遺伝子特異的配列および/もしくは偽遺伝子特異的配列、ならびに/または所与の遺伝子もしくは偽遺伝子中の追加的多型を含む標的核酸領域に相補的であり、前記多型は好ましくはSNPを含む使用である。

10

【0041】

本発明による方法は、補体因子(例えばH因子、およびFH様遺伝子、HLAクラスIII領域中のC4AおよびC4B)、ケモカインおよびそれらの受容体対立遺伝子(例えばCCL3L1、CCL4L1、CCR5またはCCR5デルタ32)、HLAクラスIおよびII、SIRPおよびLILRをコードする遺伝子などの複合遺伝子座における(偽)遺伝子変異の分析および(偽)遺伝子コピー数測定のために特に適している。

【0042】

好ましい一実施形態において本発明による方法は、キラー細胞免疫グロブリン様受容体(KIR)遺伝子座を調査するために使用される。KIRはナチュラルキラー(NK)細胞およびT細胞のサブセットによって発現される。NK細胞は、リンパ系の細胞であるが、しかし抗原特異的受容体を提示しない。それらの主な機能は、宿主細胞をMHCクラスI分子の存在についてモニターすることであり、これは例えばウイルスに感染した細胞または腫瘍細胞から健康な細胞を識別するために重要である。NK細胞とMHCクラスI分子との間の相互作用は、KIRによって調節される。ヒトにおけるKIR遺伝子座は、多遺伝子性かつ高度に多型であり、それにより個体のKIR(偽)遺伝子プロファイルの正確かつ効率的な特徴付けは、煩雑である。KIR(偽)遺伝子プロファイルおよび多数の疾患におけるそれらの役割の決定において、KIRの遺伝子型判定のための効率的かつ信頼性のある方法は、しかしながら重要である。今日まではKIR遺伝子型判定は、ポリメラーゼ連鎖反応配列特異的プライマー(PCR-SSP)(Sunら、2004)、多重PCR(Vilchesら、2007)およびPCR配列特異的オリゴヌクレオチドプローブ(PCR-SSOP)(Crumら、2000)に基づいている。PCR-SSPのためには高品質のゲノムDNAが必要であり、個体の完全なKIRプロファイルを作成するために複数の反応が必要とされる。個体でのKIR2DL4およびKIR3DL1/S1の複数の複製物がPCR-SSOPで報告されている(Williamsら、2003)。複数の遺伝子複製物の検出は、これらの遺伝子の遺伝子複製物が異なる対立遺伝子からなることから可能であった。しかし、個体が遺伝子についてホモ接合性である場合、高度に相同または同一の配列の複数の遺伝子複製物は、この分子検出系またはクローニング法では識別可能ではない(Williamsら、2003)。

20

30

【0043】

実施例において示すとおり本発明による方法は、個体のKIR遺伝子座を調査するために特に適している。この遺伝子座は高度に多型であるが、(偽)遺伝子変異体およびコピー数多型は本発明による方法で効率的に検出される。したがって好ましい一実施形態は、前記標的核酸配列がKIR遺伝子座に存在する本発明による方法または使用を提供する。好ましくは少なくとも1個のKIR遺伝子および/または少なくとも1個のKIR偽遺伝子のコピー数多型は測定される。図3AおよびBは、特に良い結果を提供するKIR特異的プローブを提供する。したがってこれらのプローブは、KIR遺伝子座が調査される場合に好ましい。図3CおよびDは、図3AおよびBに列挙したプローブよりもさらに良い結果を提供するKIR特異的プローブの広範な表を提供する。したがってこれらのプローブは、KIR遺伝子座が調査される場合にさらに好ましい。したがってさらに提供されるのは、図3A、3B、3Cまたは3D、好ましくは図3Cまたは3Dに示される少なくとも1個のプローブが使用される、本発明による方法および/または使用である。好ましくは図3に示される少なくとも2個のプローブが使用

40

50

される。別の好ましい実施形態において図3A、3B、3Cまたは3Dに示される少なくとも4個のプローブ、より好ましくは少なくとも6個のプローブが使用される。

【0044】

特に好ましい実施形態において図3のプローブセットが使用される。前記プローブセットは、好ましくは3個のプローブを含む。図3のプローブセットは、同じ数字を有し文字A、B、C、D、E、G、K、L、MまたはNが後に付く図3に示す2個または3個の別個のプローブによって形成される。例えばプローブセット408はプローブ408A、408Bおよび408Cから形成される。任意選択により同じ数字を持つ異なる4個のプローブが図3のプローブセットに指定される。この場合左、中央および右プローブは前記4個のプローブから選択される。したがってさらに提供されるのは、プローブセット408、プローブセット507、プローブセット419、プローブセット528、プローブセット413、プローブセット416、プローブセット415およびプローブセット418からなる群から選択される図3Aに示す少なくとも1個のプローブセットが使用される、本発明による方法および/または使用である。特に好ましい実施形態においてプローブセット408、プローブセット507、プローブセット528、プローブセット413、プローブセット416およびプローブセット415からなる群から選択される図3Aに示す少なくとも1個のプローブセットが使用される。これらのプローブセットは、KIR遺伝子座の(偽)遺伝子変異体に特異的な第3プローブを含有する。同様に提供されるのは、プローブセット409、プローブセット506、プローブセット507、プローブセット538、プローブセット417およびプローブセット517からなる群から選択される図3Bに示す少なくとも1個のプローブセットが使用される、本発明による方法および/または使用である。特に好ましい実施形態においてプローブセット409、プローブセット506、プローブセット507、プローブセット538、プローブセット417およびプローブセット517からなる群から選択される図3Bに示す少なくとも1個のプローブセットが使用される。これらのプローブセットは、KIR遺伝子座の(偽)遺伝子変異体に特異的な第3プローブも含有する。同様に提供されるのは、プローブセット415、プローブセット703、プローブセット413、プローブセット419、プローブセット702、プローブセット711、プローブセット408、プローブセット507、プローブセット710、プローブセット528、プローブセット418およびプローブセット416からなる群から選択される図3Cに示す少なくとも1個のプローブセットが使用される、本発明による方法および/または使用である。特に好ましい実施形態においては、プローブセット415、プローブセット703、プローブセット413、プローブセット419、プローブセット702、プローブセット711、プローブセット408、プローブセット507、プローブセット710、プローブセット528、プローブセット418およびプローブセット416からなる群から選択される図3Cに示す少なくとも1個のプローブセットが使用される。これらのプローブセットは、KIR遺伝子座の(偽)遺伝子変異体に特異的な第3プローブも含有する。同様に提供されるのは、プローブセット506、プローブセット417、プローブセット517、プローブセット409、プローブセット507、プローブセット710、プローブセット709、プローブセット708、プローブセット704およびプローブセット538からなる群から選択される図3Dに示す少なくとも1個のプローブセットが使用される。これらのプローブセットは、KIR遺伝子座の(偽)遺伝子変異体に特異的な第3プローブも含有する。

【0045】

図3から選択される少なくとも2個のプローブセットを使用することは好ましく、それにより種々のKIR(偽)遺伝子変異体が良い結果と共に選別される。より好ましくは、図3から選択される少なくとも3個のプローブセットが使用される。さらに好ましくは、図3から選択される少なくとも4個、より好ましくは少なくとも5個、最も好ましくは少なくとも6個のプローブセットが使用される。前記少なくとも2、3、4、5または6個のプローブセットはプローブセット408、プローブセット507、プローブセット528、プローブセット413、プ

10

20

30

40

50

プローブセット416、プローブセット415、プローブセット418、プローブセット419、プローブセット409、プローブセット506、プローブセット538、プローブセット417、プローブセット517、プローブセット703、プローブセット702、プローブセット711、プローブセット710、プローブセット709およびプローブセット704からなる群から、これらのプローブセットがKIR遺伝子座の(偽)遺伝子変異体に特異的な第3プローブを含有することから好ましくは選択される。一実施形態において図3Aおよび/または3Bおよび/または3Cおよび/または3Dに示すすべてのプローブセットが使用される。好ましい実施形態においては図3Cおよび/または3Dに示すすべてのプローブセットが使用される。

【0046】

図3に示す少なくとも1個のプローブの配列をある程度改変することは、当然のことながら可能である。例えばこれは、最適化の目的のために実施される。したがってさらに提供されるのは、図3に示すプローブに対して少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する少なくとも1個のプローブが使用される、本発明による方法および/または使用である。好ましくは、図3に示すプローブに対して少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する少なくとも2個、より好ましくは少なくとも4個、最も好ましくは少なくとも6個のプローブが使用される。一実施形態において、図3に示すプローブに対して少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する少なくとも20個のプローブが使用される本発明による方法または使用が提供される。(偽)遺伝子1個あたり最小2個の特異的プローブがコピー数多型(CNV)を測定するために好ましい。

【0047】

好ましくは、図3A、3B、3Cまたは3Dに示すプローブセットに基づく、好ましくは図3Cおよび/または3Dに示すプローブセットに基づくプローブセットが使用される。前記プローブセットは、好ましくは3個のプローブを含む。そのようなプローブセットの1つまたは複数のプローブは、上に記載のとおりある程度改変されうる。したがってさらに提供されるのは、図3に示すプローブセットに対して少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する少なくとも1個のプローブセットが使用される、本発明による方法および/または使用である。これは、前記プローブセットのプローブが、図3の少なくとも1個のプローブセットの対応するプローブに対して少なくとも70%の配列同一性を有することを意味する。好ましくは、プローブセット408、プローブセット507、プローブセット419、プローブセット528、プローブセット413、プローブセット416、プローブセット415、プローブセット418、プローブセット419、プローブセット409、プローブセット506、プローブセット538、プローブセット417、プローブセット517、プローブセット703、プローブセット702、プローブセット711、プローブセット710、プローブセット709およびプローブセット704からなる群から選択される図3に示すプローブセットに対して少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するプローブセットが、これらのプローブセットがKIR核酸配列に特異的な第3プローブを含有することから使用される。好ましくは少なくとも2個、より好ましくは少なくとも3個、より好ましくは少なくとも4個、より好ましくは少なくとも5個、最も好ましくは少なくとも6個のそのようなプローブセットが使用され、それにより種々のKIR(偽)遺伝子変異体が良い結果と共に選別される。

【0048】

KIR遺伝子座の(偽)遺伝子変異体分析および(偽)遺伝子コピー数測定のために特に適している新規プローブおよびプローブセットも提供される。これらのプローブおよびプローブセットは、上に記載のとおり図3A、B、CおよびDに列挙されている。したがってさらに提供されるのは、図3A、3B、3Cまたは3Dに示すプローブおよびプローブセット、ならびに

10

20

30

40

50

図3A、3B、3Cまたは3Dに示すプローブまたはプローブセットに対して少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するプローブおよびプローブセットである。核酸の混合物(前記核酸は本発明による少なくとも2個のプローブセットを含む)も提供される。好ましくは前記混合物は、本発明による少なくとも4個、より好ましくは少なくとも6個のプローブセットを含む。既に記載のとおりそのようなプローブセットは、図3A、3B、3Cまたは3Dに対して少なくとも70%の配列同一性を示すプローブまたはプローブセットに有する。一実施形態は、図3A、3B、3Cまたは3Dに示す少なくとも2個、好ましくは少なくとも4個、より好ましくは少なくとも6個のプローブセットを含む核酸の混合物を提供する。

10

【0049】

さらに提供されるのは、本発明によるプローブセットまたは核酸の混合物を含む、試料中の少なくとも1個の標的核酸配列の存在を検出するためのキットである。前記少なくとも1個の標的核酸配列は、好ましくはKIR遺伝子座に存在する核酸配列を含む。本発明によるキットは、核酸配列5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGAおよびTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'またはこれらの相補物に対して少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するPCRプライマーセットを好ましくはさらに含む。これらのプライマーは図3に示すプローブセットを増幅するために特に適している。

20

【0050】

KIR多型は、疾患と関連している。KIR多型と白血病のサブタイプとの間の関連は、Zhangら(Zhangら、2009)によって調査された。KIR2DS4の存在が慢性骨髄性白血病(CML)の素因であるとして実証され、KIR2DS3の欠如は急性リンパ性白血病(ALL)の素因であった。KIR2DS4はハプロタイプAに存在し、一方KIR2DS3はハプロタイプBに存在する。KIR2DS4の存在およびKIR2DS3の欠如は、白血病サブタイプの素因である。したがってハプロタイプAの特徴が白血病サブタイプへの素因である。本発明は、KIR2DS4およびKIR2DS3を含むKIR遺伝子を検出するために特に十分に適切であるプローブを提供する。したがって図3A、3B、3Cおよび/または3Dから選択される本発明によるプローブで試料中のKIR2DS4およびKIR2DS3の存在および/または欠如は特に十分に測定される。図3Cおよび/または3Dに示される好ましいプローブセット540A/540Cおよび/または513B/513Dおよび/または504A/504Bおよび/または708K/708L/708M/708NはKIR2DS3および/またはKIR2DS4多型を検出するために使用される。したがって図3から選択されるプローブで白血病サブタイプへの素因は特に十分に測定される。

30

【0051】

したがって一実施形態において本発明は、個体の白血病への素因を測定するための方法であって、前記個体の核酸試料中のKIR2DS4および/またはKIR2DS3の存在または欠如を図3A、3B、3Cおよび/または3Dに列挙する少なくとも1個のプローブセットで測定するステップを含み、KIR2DS4の存在は慢性骨髄性白血病の素因に関する指標であり、KIR2DS3の欠如は急性リンパ性白血病の素因に関する指標である方法を提供する。好ましい実施形態において、図3Cおよび/または3Dに示すプローブセット540A/540Cおよび/もしくは513B/513Dならびに/またはプローブセット504A/504Bおよび/もしくは708K/708L/708M/708Nは、KIR多型の存在または欠如を測定するために使用される。本明細書において使用される用語「核酸試料」は、核酸を含有する試料を意味する。前記試料は、当然のことながら例えばタンパク質などの他の成分をさらに含む。好ましくは核酸は、本発明による方法に供される前に前記試料から少なくとも部分的に単離される。

40

【0052】

KIR多型と炎症性腸疾患(IBD)および/またはクローン病との間の関連は、十分に確立されている(Hollenbachら、2009)。KIR2DL2/KIR2DL3ヘテロ接合性遺伝子型は、それらのHLA-Cリガンドの存在に依存してクローン病の素因となるまたは防御する。KIR2DL2/KIR2DL3ヘテロ接合性は、C1との組合せでクローン病への素因となり、一方KIR2DL2/KIR2DL3ヘテ

50

口接合性は、C2との組合せでIBDおよび/またはクローン病から防御する。KIR2DL2/KIR2DL3ヘテロ接合性は、C1/C2ヘテロ接合性との組合せで素因への中間の効果を有する(Hollenbachら、2009)。C1および/またはC2の存在または欠如を測定するための非限定的例は、C1および/またはC2タンパク質をコードする核酸配列を例えば核酸増幅反応を使用して検出すること、またはC1および/またはC2タンパク質を例えばウエスタンブロット分析を使用して検出することである。

【0053】

本発明は、KIR2DL2およびKIR2DL3を含むKIR遺伝子を検出するために特に適切であるプローブを提供する。したがって図3A、3B、3Cおよび/または3Dから選択される本発明によるプローブで、試料中のKIR2DL2/KIR2DL3ヘテロ接合性は、特に十分に測定される。好ましくは図3Cおよび/または3Dに示すプローブセット415B/415C/415Dおよび/もしくは417A/417B/417Cならびに/またはプローブセット420A/420Bおよび/もしくは706A/706BはKIR2DL3および/またはKIR2DL2多型を検出するために使用される。したがって図3から選択されるプローブでクローン病への素因は特に十分に測定される。

【0054】

したがって一実施形態において本発明は、個体のIBDおよび/またはクローン病への素因を測定するための方法であって、前記個体の核酸試料中のKIR2DL2および/またはKIR2DL3の存在または欠如を図3A、3B、3Cおよび/または3Dに列挙する少なくとも1個のプローブセットで測定するステップおよび前記個体の試料中のHLA C1および/またはC2リガンドの存在または欠如を測定するステップを含み、KIR2DL2、KIR2DL3ヘテロ接合性がC1ホモ接合性との組合せでクローン病の素因に関する指標であり、KIR2DL2、KIR2DL3ヘテロ接合性がC2ホモ接合性との組合せでクローン病の防御に関する指標である方法を提供する。好ましい実施形態において、図3Cおよび/または3Dに示すプローブセット415B/415C/415Dおよび/もしくは417A/417B/417Cならびに/またはプローブセット420A/420Bおよび/もしくは706A/706BはKIR多型の存在または欠如を測定するために使用される。

【0055】

KIR2DL3、KIR3DL1およびKIR3DS1のコピー数多型は、レトロウイルス感染、ヘルペスウイルス感染および肝炎ウイルス感染、より具体的にはHIV、CMV、EBV、HSV、HBVおよびHCVなどの慢性感染における疾患の経過に関連する(Martinら、2007およびKhakooら、2004)。個体でのKIR3DL1および/またはKIR3DS1の低いコピー数と比較して、個体でのKIR3DL1および/またはKIR3DS1のより高いコピー数は疾患の経過の改善および/または慢性感染の治療への応答に関する指標であり、個体でのKIR2DL3の高いコピー数と比較して個体でのKIR2DL3の低いコピー数は疾患の経過の改善および/または慢性感染の治療への応答に関する指標である。したがって個体でのKIR3DL1および/またはKIR3DS1のより高いコピー数は、慢性感染における生存の増加に関する指標であり、個体でのKIR2DL3のより低いコピー数は慢性感染における生存の増加に関する指標である。

【0056】

本発明は、KIR3DL1およびKIR3DS1を含むKIR遺伝子のコピー数多型を測定するために特に十分に適しているプローブを提供する。したがって図3A、3B、3Cおよび/または3Dから選択される本発明によるプローブで、試料中のKIR3DL1およびKIR3DS1およびKIR2DL3のコピー数は、特に十分に測定される。好ましくは図3Cおよび/または3Dに示すプローブセット409A/409B/409Cおよび/もしくは711A/711B/711C/711Dおよび/もしくは418A/418B/418Dおよび/もしくは709C/709D/709E/709Gならびに/またはプローブセット415B/415C/415Dおよび/もしくは417A/417B/417Cは、KIR3DL1および/またはKIR3DS1および/またはKIR2DL3のコピー数を概算するために使用される。図3から選択されるプローブで、個体の疾患の経過への易罹患性および/または慢性感染における治療への応答がしたがって特に十分に測定される。

【0057】

したがって本発明は、個体の疾患の経過への易罹患性、ならびに/または慢性感染、好ましくはレトロウイルス感染、ヘルペスウイルス感染および肝炎ウイルス感染における治

10

20

30

40

50

療への応答を測定するための方法であって、前記個体の核酸試料中のKIR2DL3、KIR3DL1および/またはKIR3DS1のコピー数を図3Aまたは3Bまたは3Cまたは3Dに列挙する少なくとも1個のプロープセットで測定するステップを含み、個体におけるKIR3DL1および/またはKIR3DS1の高いコピー数が個体におけるKIR3DL1および/またはKIR3DS1の低いコピー数と比較して疾患の経過の改善および/または慢性感染の治療への応答に関する指標であり、個体におけるKIR2DL3の低いコピー数が個体におけるKIR2DL3の高いコピー数と比較して疾患の経過の改善および/または慢性感染の治療への応答に関する指標である方法を提供する。好ましくは前記慢性感染は、HIV、CMV、EBV、HSV、HBVおよびHCVを含む。好ましい実施形態において、図3Cおよび/または3Dに示すプロープセット409A/409B/709D/409Cおよび/もしくは711A/711B/711C/711Dおよび/もしくは418A/418B/418Dおよび/もしくは709C/709E/709Gならびに/またはプロープセット415B/415C/415Dおよび/もしくは417A/417B/417Cは、KIR遺伝子のコピー数を測定するために使用される。

10

【0058】

ドナーにおけるKIR2DS4の存在は、死亡率、移植片対宿主、移植片対腫瘍および移植後のレシピエントにおける移植後臓器生存などの移植関連評価項目に関連する。ドナーにおけるKIR2DS4の存在は、ドナーにおけるKIR2DS4の欠如と比較して低下した死亡率、低下した移植片対宿主、増加した移植片対腫瘍および移植後のレシピエントにおける増加した移植後臓器生存に関する指標である。本発明は、KIR3DL1およびKIR3DS1を含むKIR遺伝子のコピー数多型を測定するために特に十分に適しているプロープを提供する。したがって図3A、3B、3Cおよび/または3Dから選択される本発明によるプロープで、試料中のKIR2DS4のコピー数は特に十分に測定される。好ましくは図3Cおよび/または3Dに示すプロープセット504A/504Bおよび/または708K/708L/708M/708Nは、KIR2DS4の存在または欠如のために使用される。図3から選択されるプロープで移植関連評価項目への素因は、したがって特に十分に測定される。

20

【0059】

したがって本発明は、死亡率、移植片対宿主、移植片対腫瘍および移植後のレシピエントにおける移植後臓器生存などの移植関連評価項目の素因を測定するための方法であって、前記レシピエントのためのドナーの核酸試料中におけるKIR2DS4の存在または欠如を図3Aまたは3Bまたは3Cまたは3Dに列挙する少なくとも1個のプロープセットで測定するステップを含み、前記ドナーにおけるKIR2DS4の存在が、KIR2DS4が欠如しているドナーでの死亡率、移植片対宿主反応、移植片対腫瘍反応およびレシピエントの移植後臓器生存と比較して低下した死亡率、低下した移植片対宿主反応、増加した移植片対腫瘍反応および前記レシピエントにおける増加した移植後臓器生存に関する指標である方法を提供する。好ましい実施形態において、図3Cおよび/または3Dに示すプロープセット504A/504Bおよび/または708K/708L/708M/708Nは、KIR多型の存在または欠如を測定するために使用される。

30

【0060】

KIR2DL2およびKIR2DS2のコピー数と関節外症状およびリウマチ性血管炎を伴う関節リウマチ(RA)との間の関連は確立されている。個体におけるKIR2DL2および/またはKIR2DS2のより高いコピー数は、関節外症状およびリウマチ性血管炎を伴う関節リウマチに関する素因であることが実証された(Majorczykら2007、Yenら2001)。追加的にKIR2DL3について陽性でありKIR2DS3について陰性である関節リウマチ患者は、より早期に疾患を診断された(Majorczykら2007)。

40

【0061】

本発明は、KIR2DL2、KIR2DS2、KIR2DL3およびKIR2DS3を含むKIR遺伝子の存在または欠如およびコピー数多型を測定するために特に十分に適しているプロープを提供する。したがって、図3A、3B、3Cおよび/または3Dから選択される本発明によるプロープで、試料中のKIR2DL2、KIR2DS2、KIR2DL3およびKIR2DS3の存在または欠如およびコピー数は特に十分に測定される。好ましくは図3Cおよび/または3Dに示されるプロープセット420A/420Bおよび/もしくは706A/706Bならびに/またはプロープセット703A/703B/703Cおよび/または544A/544Bは、KIR2DL2および/またはKIR2DS2のコピー数を概算するために使用される。好まし

50

くは図3Cおよび/または3Dに示されるプローブセット415B/415C/415Dおよび/もしくは417A/417B/417Cならびに/またはプローブセット513B/513Dおよび/または540A/540Cは、KIR2DL3および/またはKIR2DS3のコピー数を概算するために使用される。したがって図3から選択されるプローブで、関節外症状およびリウマチ性血管炎を伴う関節リウマチ(RA)に関する個体の易罹患性は、特に十分に測定される。

【0062】

したがって一実施形態において本発明は、関節外症状およびリウマチ性血管炎を伴う関節リウマチについての個体の素因を測定するための方法であって、前記個体の核酸試料中のKIR2DS2および/またはKIR2DL2のコピー数を図3A、3B、3Cおよび/または3Dに列挙する少なくとも1個のプローブセットで測定するステップを含み、前記個体におけるKIR2DS2および/またはKIR2DL2の高いコピー数が、個体におけるKIR2DL2および/またはKIR2DS2の低いコピー数と比較して関節外症状およびリウマチ性血管炎を伴う関節リウマチの素因に関する指標である方法を提供する。好ましい実施形態において、図3Cおよび/または3Dに示されるプローブセット420A/420Bおよび/もしくは706A/706Bならびに/またはプローブセット703A/703B/703Cおよび/または544A/544Bは、KIR遺伝子のコピー数を測定するために使用される。

10

【0063】

最後に、KIR遺伝子の存在もしくは欠如またはコピー数と、HLA-B27関連腱附着部炎関連関節炎および反応性関節炎、乾癬などの自己炎症への個体における素因との間に関連が見出されている。例えばKIR3DL2は、脊椎関節炎および若年性腱附着部炎関連関節炎(juvenile enthesitis-related arthritis)において増加する(Chanら2005、Brown 2009)。本発明は、KIR遺伝子の存在または欠如およびコピー数多型を測定するために特に十分に適しているプローブを提供する。したがってHLA-B27関連腱附着部炎関連関節炎および反応性関節炎、乾癬などの自己炎症への個体の易罹患性は、図3から選択されるプローブで、特に十分に測定される。

20

【0064】

したがって一実施形態において本発明は、個体における自己炎症、好ましくはHLA-B27関連腱附着部炎関連関節炎および反応性関節炎、乾癬の素因を測定するための方法であって、a)前記個体の核酸試料中において前記障害に関する指標であるKIR遺伝子の存在もしくは欠如および/またはコピー数を図3Aまたは3Bまたは3Cまたは3Dに列挙する少なくとも1個のプローブセットで測定するステップ、ならびにb)ステップa)において得られた結果を前記素因の存在または欠如と関連させるステップを含む方法を提供する。

30

【0065】

別の実施形態において本発明は、個体の脊椎関節炎および/または若年性腱附着部炎関連関節炎への素因を測定するための方法であって、前記個体の核酸試料中のKIR3DL2のコピー数を図3A、3B、3Cおよび/または3Dに列挙する少なくとも1個のプローブセットで測定するステップを含み、前記個体におけるKIR3DL2の高いコピー数が前記個体におけるKIR3DL2の低いコピー数と比較して脊椎関節炎および/または若年性腱附着部炎関連関節炎への素因に関する指標である方法を提供する。好ましい実施形態において図3Cおよび/または3Dに示されるプローブセット404A/404Bおよび/または538A/538B/538Dは、KIR遺伝子のコピー数を測定するために使用される。

40

【0066】

本発明は、以下の実施例においてさらに説明される。これらの実施例は、本発明の範囲を限定せず、本発明を明確にする役割を果たすにすぎない。

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1A1】従来のMLPA反応の模式的概略を示す図である。図は、www.mpl.comから翻案。

【図1A2】従来のMLPA反応の模式的概略を示す図である。図は、www.mpl.comから翻案。

50

【図1B】具体的な標的配列上で2個のSNPを同時に1個のプローブセット(Tri-Ligプローブ)で検出するための、1個のプローブセット中の2個のライゲーション部位の使用を例示する図である。下左に示すとおり、正しいSNPが両方のライゲーション部位に存在する場合は、3個のプローブ部分は共にライゲーションされ1個のPCR産物を生じる。下右に示すとおり、正しくないSNPが1つまたは両方のライゲーション部位に存在する場合は、PCR産物は形成されない。

【図1C】第1ライゲーション部位に他のすべてのKIR3DL1 WT対立遺伝子および第2ライゲーション部位に他のすべてのKIR遺伝子でのバックグラウンド中において、特定の一遺伝子KIR3DL1*024Nを検出するための、1個のTri-Ligプローブ中の2個のライゲーション部位の使用を例示する図である。第1ライゲーション部位での異なるSNPによって、1aプローブはすべてのWT KIR3DL1対立遺伝子(1a)を検出し、一方1bプローブはKIR3DL1*024N対立遺伝子(1b)だけを検出する。部分的KIR遺伝子配列2~12は、1aおよび1bプローブによっては、これらのプローブが第2ライゲーション部位でKIR3DL1遺伝子に対してだけ特異的である(第2ライゲーション部位での異なるSNPのため)ことから検出されない。

【図2】縮重塩基のIUBヌクレオチド符号を示す表である。

【図3A1】KIR特異的プローブセットを示す表である。KIRプローブ混合物1。太字のヌクレオチドは、2個のSNPの検出のために使用される3個のプローブからなるプローブセットの一部であるプローブを表す。

【図3A2】KIR特異的プローブセットを示す表である。KIRプローブ混合物1。太字のヌクレオチドは、2個のSNPの検出のために使用される3個のプローブからなるプローブセットの一部であるプローブを表す。

【図3B1】KIR特異的プローブセットを示す表である。KIRプローブ混合物2。太字のヌクレオチドは、2個のSNPの検出のために使用される3個のプローブからなるプローブセットの一部であるプローブを表す。

【図3B2】KIR特異的プローブセットを示す表である。KIRプローブ混合物2。太字のヌクレオチドは、2個のSNPの検出のために使用される3個のプローブからなるプローブセットの一部であるプローブを表す。

【図3C1】KIR特異的プローブセットを示す表である。伸長されたKIRプローブ混合物1。太字のヌクレオチドは、プライマー結合部位を表す。2個のSNPが3個のプローブからなる本発明による1個のプローブセットを使用して検出されるKIR遺伝子は図13に示される。

【図3C2】KIR特異的プローブセットを示す表である。伸長されたKIRプローブ混合物1。太字のヌクレオチドは、プライマー結合部位を表す。2個のSNPが3個のプローブからなる本発明による1個のプローブセットを使用して検出されるKIR遺伝子は図13に示される。

【図3C3】KIR特異的プローブセットを示す表である。伸長されたKIRプローブ混合物1。太字のヌクレオチドは、プライマー結合部位を表す。2個のSNPが3個のプローブからなる本発明による1個のプローブセットを使用して検出されるKIR遺伝子は図13に示される。

【図3C4】KIR特異的プローブセットを示す表である。伸長されたKIRプローブ混合物1。太字のヌクレオチドは、プライマー結合部位を表す。2個のSNPが3個のプローブからなる本発明による1個のプローブセットを使用して検出されるKIR遺伝子は図13に示される。

【図3D1】KIR特異的プローブセットを示す表である。伸長されたKIRプローブ混合物2。太字のヌクレオチドは、プライマー結合部位を表す。2個のSNPが3個のプローブからなるこのプローブ混合物の1個のプローブセットを使用して検出されるKIR遺伝子は図13に示される。

【図3D2】KIR特異的プローブセットを示す表である。伸長されたKIRプローブ混合物2。太字のヌクレオチドは、プライマー結合部位を表す。2個のSNPが3個のプローブからなるこのプローブ混合物の1個のプローブセットを使用して検出されるKIR遺伝子は図13に示される。

【図3D3】KIR特異的プローブセットを示す表である。伸長されたKIRプローブ混合物2。太字のヌクレオチドは、プライマー結合部位を表す。2個のSNPが3個のプローブからなるこのプローブ混合物の1個のプローブセットを使用して検出されるKIR遺伝子は図13に示

10

20

30

40

50

される。

【図3D4】KIR特異的プローブセットを示す表である。伸長されたKIRプローブ混合物2。太字のヌクレオチドは、プライマー結合部位を表す。2個のSNPが3個のプローブからなるこのプローブ混合物の1個のプローブセットを使用して検出されるKIR遺伝子は図13に示される。

【図3E】対照プローブ混合物を示す表である。

【図4】KIRタンパク質構造を示す図である。大楕円で示されるのは細胞外Ig様ドメイン、四角はITIMおよび薄灰色の小円は細胞質側末端の荷電残基である(IPD KIRdatabase)。抑制KIRおよび活性化KIRは、それぞれ「+」および「-」によって示される。

【図5】KIR3DL1のエキソン構造を示す図である。エキソンは黒四角で、イントロンは線で示され、ほぼ一定の縮小率で描かれている(Vilchesら、2002)。

10

【図6】KIR遺伝子座の組成を示す図である。a:フレームワーク遺伝子KIR3DL3、KIR2DL4およびKIR3DL2は黒で示され、遺伝子座の最初、中央近くおよび末端に見出される。偽遺伝子KIR2DP1およびKIR3DP1(フレームワーク遺伝子でもある)はそれぞれ白および黒で示され、フレームワーク遺伝子間の領域は可変であり、これらのKIR遺伝子は灰色で示し、活性化KIRは黒文字、抑制KIRは白で示す。b:ハプロタイプAの一例。c:ハプロタイプBの一例(Parhamら、2003)。

【図7】KIR参照パネルIからの12ファミリーの系図である(ファミリー1347および1349は、それぞれ図11および12に示されている)。系図の上の4個の番号はCEPHファミリー番号であり、枠内の番号は個々の番号であり、これらの番号はtable 4(表4)の番号に対応している。

20

【図8】プローブセット1の電気泳動像である。2種のドナー:8080(上)および5911(下)についてのプローブのピークパターン。KIRプローブピーク17個すべてがドナー8080において存在し、KIRプローブピーク10個がドナー5911において存在する。すべてのドナーにおいて、対照プローブ9個(Ctr2~10)および4個のフレームワーク遺伝子: KIR3DL3、KIR3DP1、KIR3DL2およびKIR2DL4(黒矢印で示す)上のプローブがシグナルを生成した。プローブセット2の電気泳動像はこれらの2個のプローブ群と類似していた(データ未記載)。

【図9】KIR2DS2(上)に対する真の陽性と偽陽性(下)との間でのプローブ2DS2(黒矢印)のピーク強度の比較を示す図である。

【図10】プローブ2DL5(左矢印)および2DL5A(右矢印)のピークプロファイルを示す図である。上:プローブ2DL5由来のピークの存在によって示されるKIR2DL5に対して陽性である試料、2DL5A由来のピークはKIR2DL5Aまたは3DP1*004の存在について識別され得ない。下:この試料はプローブ2DL5の欠如によって示されてKIR2DL5について陰性であり、2DL5AのピークはKIR3DP1*004の存在を示している。

30

【図11A】ファミリー1347の系図である。左:上左系図の個々の番号は表中のDNA試料番号に対応する。下にハプロタイプが文字で記され、ハプロタイプについての説明が下に示されている(www.ihwg.org)。2個のプローブセットそれぞれによって別々に定量された、いくつかの遺伝子のCNV、「/」より前の番号はプローブセット1、後はプローブセット2に対してである。

【図11B1】ファミリー1347の系図である。CEPH-IHWG由来のSSP-PCRデータおよび従来のKIRハプロタイプモデルに基づく解釈(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/xslcgi.fcgi?id=1347&cmd=kirped&locus_group=1も参照されたい)。

40

【図11B2】ファミリー1347の系図である。CEPH-IHWG (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/xslcgi.fcgi?id=1347&cmd=kirped&locus_group=1)から得たSSP-PCRデータに基づく新規ハプロタイプモデル。

【図11B3-1】ファミリー1347の系図である。従来のKIRハプロタイプモデル(table 1(表1))および新規KIRハプロタイプモデル(table 2(表2))に基づいたCEPH-IHWGから得たSSP-PCRデータを使用して測定したKIR遺伝子のコピー数多型ならびに伸長プローブセット1ならびに2および新規KIRハプロタイプモデル(table 3(表3))を使用したKIR-MLPAによって測定したKIR遺伝子コピー数多型。

50

【図1 1 B 3 - 2】ファミリー-1347の系図である。従来のKIRハプロタイプモデル(table 1(表1))および新規KIRハプロタイプモデル(table 2(表2))に基づいたCEPH-IHWGから得たSP-PCRデータを使用して測定したKIR遺伝子のコピー数多型ならびに伸長プローブセット1ならびに2および新規KIRハプロタイプモデル(table 3(表3))を使用したKIR-MLPAによって測定したKIR遺伝子コピー数多型。

【図1 2 A】ファミリー-1349の系図である。左:上左系図の個々の番号は表中のDNA試料の番号に対応する。下にハプロタイプが文字で記され、ハプロタイプについての説明が下に示されている(www.ihwg.org)。2個のプローブセットそれぞれによって別々に定量された、いくつかの遺伝子のCNV、「/」より前の番号はプローブセット1、後はプローブセット2に対してである。

【図1 2 B 1】ファミリー-1349の系図である。CEPH-IHWG由来のSSP-PCRデータおよび従来のKIRハプロタイプモデルに基づく解釈(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/xslcgi.fcgi?id=1347&cmd=kirped&locus_group=1も参照されたい)。

【図1 2 B 2】ファミリー-1349の系図である。CEPH-IHWG (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/xslcgi.fcgi?id=1347&cmd=kirped&locus_group=1)から得たSSP-PCRデータに基づく新規ハプロタイプモデル。

【図1 2 B 3 - 1】ファミリー-1349の系図である。従来のKIRハプロタイプモデル(table 1(表1))および新規KIRハプロタイプモデル(table 2(表2))に基づいたCEPH-IHWGから得たSP-PCRデータを使用して測定したKIR遺伝子のコピー数多型ならびに伸長したプローブセット1および2ならびに新規KIRハプロタイプモデル(table 3(表3))を使用したKIR-MLPAによって測定したKIR遺伝子コピー数多型。

【図1 2 B 3 - 2】ファミリー-1349の系図である。従来のKIRハプロタイプモデル(table 1(表1))および新規KIRハプロタイプモデル(table 2(表2))に基づいたCEPH-IHWGから得たSP-PCRデータを使用して測定したKIR遺伝子のコピー数多型ならびに伸長したプローブセット1および2ならびに新規KIRハプロタイプモデル(table 3(表3))を使用したKIR-MLPAによって測定したKIR遺伝子コピー数多型。

【図1 3】KIR対立遺伝子およびKIRコピー数多型の検出を示す表である。

【発明を実施するための形態】

【0068】

(実施例)

(実施例1)

この実施例は、KIR遺伝子型判定のための新たな方法を提示する。KIRは、ナチュラルキラー(NK)細胞およびT細胞のサブセットによって発現される。NK細胞は、リンパ系の細胞であるが、抗原特異的受容体を提示しない。それらの主な機能は、宿主細胞をMHCクラスI分子の存在についてモニターすることであり、これは例えばウイルスに感染した細胞または腫瘍細胞から健康な細胞を識別するために重要である。例えばウイルスペプチドのCD8 T細胞への提示を抑制するウイルス調節下方制御の結果としてウイルス感染の際に生じる場合がある宿主細胞でのMHCクラスI分子の低い発現は、細胞傷害性攻撃を開始するためにNK細胞を刺激する。この現象は「自己喪失」理論としても周知である。

【0069】

NK細胞は、KIRおよびCD94/NKG受容体多重遺伝子ファミリーのメンバーを含むMHCクラスI分子との相互作用を調節する種々の受容体を発現する。MHCクラスI分子とこれらの受容体と間の相互作用は、一般に抑制シグナルの生成を通じてNK細胞傷害性を制御する。ヒトおよびマウスでのKIRおよびCD94/NKGファミリー間の構成は、ヒトにおいてはKIRが遺伝的変異および遺伝子数多型の大部分を構成して相当に異なる。

【0070】

KIRは、最初にナチュラルキラー細胞によるウイルス感染との闘いでのそれらの役割において発見されたが、それらはT細胞サブセットによっても発現される。KIR遺伝子クラスターは染色体19q13.4白血球受容体複合体(LCR)中に位置し、約150kbの領域にわたる。15個に及ぶ遺伝子に加えて2個の偽遺伝子が今日までに同定されている。KIR遺伝子クラスター

10

20

30

40

50

一の特徴は、可変的な遺伝子含有量および相当な程度対立遺伝子変異体である。無関係な個体間での遺伝子含有量は、存在するKIR(偽)遺伝子の量においてのみならず活性化および抑制(偽)遺伝子の数においても相当に異なる場合がある。非相互性の組換えによる収縮および拡大が、KIR多様化の原因の主な機序である。KIRは、2個のハプロタイプAおよびBに分けることができ、ハプロタイプBは遺伝子含有量により大きな多様性を有し、より多くの活性化KIR遺伝子を有する。さまざまな民族的集団の研究は、これらの2個のハプロタイプの分布において顕著な差異を示す。さまざまな病原体への暴露などの選択圧および急速に進化するMHCクラスI分子は、そのような遺伝子多様化の原因となる力であると考えられる。機能的類似物は、マウスにおいてはLy49遺伝子ファミリーであるが、KIRとLy49とは構造的に異なるタンパク質である。KIRは、さまざまな霊長類種において同定されているが、それらは種特異的であり、さまざまな種の間で遺伝子含有量が異なる。これらの発見は、この遺伝子ファミリーの急速な進化および拡大についての証拠を提供する。

10

【0071】

関連する別のレベルの多様性は、個々のNK細胞によるKIRの発現レベルである。各NK細胞は、そのKIR遺伝子レパートリーのサブセットだけを発現し、HLAリガンドの存在は同族リガンドを発現するNK細胞の発生頻度に影響すると考えられる。個体において抑制KIRを発現するNK細胞のより高い発生頻度は、それらの同族HLAリガンドが存在する場合に見出されている。いくつかのKIRのリガンド、具体的には活性化潜在力を有するものは、まだ決定されていない。

20

【0072】

これらの活性化KIRのいくつかは、それらに関連する抑制受容体と比較してそれらの同族HLAクラスIリガンドに対してより低い親和性を有すると考えられる。

【0073】

KIRは、いくつかの疾患と関連しているが、集団におけるおよび集団間の遺伝的多様性ならびにNK細胞によるKIR発現の差異のため、それらの役割の明確な理解はまだ解明されていない。KIRは、白血病の治療において使用される同種間造血幹細胞移植(HSCT)において役割を演じると報告されている。ドナーKIRとレシピエントHLAリガンドとの間の意図的ミスマッチが移植片抗腫瘍効果を与えることが示唆される。KIR3DS1およびKIR3DL1はAIDSおよび、C型肝炎ウイルス(HCV)、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)などのいくつかの他のウイルス感染のより遅い進行と関連すると報告されている。熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)での原虫感染もマラリアにおけるKIRの役割に関連する。自己免疫および自己炎症状態において、特定のKIRおよび同族リガンドは宿主のより高い易罹患性または防御を生じる可能性がある。

30

【0074】

KIR遺伝子クラスター

頭字語KIRは、最初に発見されたKIRがNK細胞に抑制効果を有していたことから、最初はキラー細胞抑制受容体を表した。今日ではKIRは、このファミリーが抑制および活性化の受容体の両方を含むことから、キラー細胞免疫グロブリン様受容体に対する略語である。The HUGO Genome Nomenclature Committee (HGNC)がKIR遺伝子の命名に責任をもっている。現在KIR遺伝子ファミリーは、Table 1(表1)に列挙する15遺伝子および2偽遺伝子からなる(Marshら、2002)。KIR遺伝子はそれらがコードするタンパク質構造に従って命名される。「D」は、「ドメイン」を意味し、その前の番号2または3は細胞外Ig様ドメインの数を示す。「L」は「長い」細胞質側末端を示し、「S」は「短い」細胞質側末端を示し、「P」は「偽遺伝子」を示す。文字LまたはSの次の番号はこの構造をコードしている遺伝子を意味する。したがってKIR2DL1は、2個のIg様ドメインおよび長い細胞質側末端を有する構造をコードしている。KIR2DL5AおよびKIR2DL5Bは、例外であり;それらは1個の遺伝子KIR2DL5として最初に同定された。しかしこれら2個の構造的に類似している変異体は、KIR遺伝子クラスターの異なる領域に位置していることが発見され、別々に遺伝する場合がある(Gomez-Lozanoら、2002)。

40

【0075】

50

長い細胞質側末端を有するKIRは、2個の免疫受容体チロシンベースの抑制モチーフ(ITIM)により、NK細胞に抑制シグナルを伝達する(図4)。これらの受容体のHLAクラスI分子との結合は、ITIM中のチロシン残基のリン酸化をもたらす。次いでチロシンホスファターゼ(SHP-1)が動員され、ITIMによって活性化され、細胞活性化と関連するリン酸化事象を抑制または阻害する。NK細胞調節細胞傷害性およびサイトカイン分泌阻害は、主な下流効果である。短い細胞質側末端は、ITIMを欠いており、膜貫通ドメインにリシンなどの塩基性荷電アミノ酸を有する。この正に荷電したアミノ酸残基は、DAP12などのアダプター分子との会合を可能にする。DAP12は、1個の免疫受容体活性化チロシンモチーフ(ITAM)を有する。ITAM中のチロシン残基がリン酸化されると、ZAP70のSH2ドメインに対するドッキング部位およびSykチロシンキナーゼが生成される。これらのキナーゼの作用は、NK調節細胞溶解を促進する下流シグナル伝達カスケードの引き金を引く(Middletonら、2005)。KIR2DL4は、膜貫通領域に荷電したアミノ酸アルギニンを含む長い細胞質側末端を有することからKIRにおいて特有である。したがってKIR2DL4は、活性化シグナルと抑制シグナルとの両方を誘発できる可能性がある。

10

【0076】

エキソンおよびイントロン構造

3個の細胞外Ig様ドメインを有するKIR3DL1およびKIR3DL2は、それから他のすべてが誘導されうる原型KIRを表す。KIR遺伝子は、9個のエキソンから構成され、これらのエキソンの順番はタンパク質の異なる機能領域に対応している(図5)。最初の2個のエキソンはシグナルペプチドをコードし、エキソン3、4および5はIg様ドメイン、D0、D1およびD2をそれぞれコードする。エキソン6はエキソン7によってコードされる膜貫通領域を有するD2ドメインに連結した基部またはリンカーをコードする。エキソン8および9は細胞質側末端をコードする。1型KIRは、2個のIg様ドメインD1およびD2、KIR2DL1~3およびKIR2DS1~5を有する。1型のタンパク質産物は、エキソン3が偽エキソンであることから、D0ドメインを欠失している。このエキソンは、おそらく3塩基対欠損のためにRNA転写物から切り出される。2型KIRは、D0およびD2ドメイン、KIR2DL4~5を有し、エキソン4はこれらのKIR遺伝子においては欠如しており、D1ドメインを有さないタンパク質を生じる。

20

【0077】

KIR2DP1においてエキソン3は、偽エキソンであり、エキソン4は早期終止コドンをも有する。KIR2DP1は転写されると、Ig(D2)ドメインを1個だけ有するKIRタンパク質を生じうる。KIR3DP1においては、エキソン2は欠失により失われている。ストーク(stalk)、TMおよび細胞質側領域をコードするエキソンも欠如している。Ig様ドメインをコードする3個のエキソンは完全であるが、リーダー配列は失われている。KIR2DP1(Trowsdaleら、2001)およびKIR3DP1について転写物は見出されておらず、後者は通常はサイレントであるが、KIR2DL5AおよびKIR3DP1の組換え体は転写されることが見出されており、細胞膜に固着するよりは分泌されることが予測される(Gomez-Lozano、2005)。

30

【0078】

遺伝子型

Uhrbergら(Uhrbergら、1997)は、ヒトにおけるKIR遺伝子座が多遺伝子性かつ多型であると考えられることを確認した。個体は、全KIR遺伝子数における差異ならびに活性化および抑制KIR遺伝子の量における差異を通じて生じるさまざまなKIR遺伝子含有量を有する。KIR多様化の原因である機構は、KIR遺伝子座の拡大および収縮を導く非対立遺伝子間の非相互性組換えである。相互性交差事象も多様性に寄与すると想定される。KIR遺伝子座は、セントロメア末端のKIR3DL3および中央のKIR3DP1の半分と、中央のKIR2DL4およびテロメア末端のKIR3DL2のもう半分との2個の部分に分けることができる。これら2個の部分のKIR遺伝子座内で遺伝子は、いっそう強い連鎖不均衡にあるように位置しており、相同組換え事象を支持している(Uhrberg 2005)。

40

【0079】

集団におけるKIR遺伝子の存在または欠如を測定するためにゲノムDNAを使用する世界的研究は、莫大な量のKIR遺伝子型プロファイリングデータに寄与している。これらの研究

50

は、さまざまな民族的背景の集団におけるKIR遺伝子の発生頻度における差異を示し、www.allelefrequencys.netに見出すことができる。KIR遺伝子型判定のために使用される方法は、配列特異的プライマーでのポリメラーゼ連鎖反応(PCR-SSP)、配列特異的オリゴヌクレオチドプローブ、PCR(PCR-SSOP)、多重PCR、自動化配列決定および質量分析である。

【0080】

ハプロタイプ

KIR遺伝子は、ハプロタイプAおよびBに分けることができる(Carringtonら、2003)。両方のハプロタイプは、フレームワーク遺伝子KIR3DL3、KIR3DP1、KIR2DL4およびKIR3DL2を含有する。これらの遺伝子は、保存されかつ事実上すべての個体に存在する。ハプロタイプAは、遺伝子含有量に関して均一であり、図6に示すとおり5個の抑制遺伝子(KIR3DL3、KIR2DL3、KIR2DL1、KIR2DL4KIR3DL1およびKIR3DL2ならびに唯一の活性化KIR2DS4から構成される。しかし中央のフレームワーク遺伝子KIR2DL4は、活性化機能も有しうる。一方、細胞表面に発現されないKIR2DS4およびKIR2DL4の両方のヌル変異体を有するハプロタイプAがあり、厳密にはこれらのハプロタイプは、機能的な活性化KIRを事実上含有しない。

【0081】

ハプロタイプBは、ハプロタイプAよりさらに可変性であり、以下の1つまたは複数の遺伝子:KIR2DS2、KIR2DL2、KIR2DL5、KIR2DS3、KIR3DS1、KIR2DL5A、KIR2DS5およびKIR2DS1によって特徴付けられ、反対にハプロタイプAはこれらの遺伝子の欠如によって特徴付けられる。両ハプロタイプの発生頻度は、さまざまな民族的背景の集団において比較的一定である。ハプロタイプの定義が著者の間で異なっており、かつハプロタイプのハイブリッドが可能であることから、いくつかのハプロタイプがこれら2つの分類に位置付けることができない可能性がある(Vilchesら、2002)。AおよびBハプロタイプの間の区別は、ハプロタイプAよりもハプロタイプBが活性化KIRをコードするより多くの遺伝子を有することから、生物学的および医学的環境において有用である。ハプロタイプは、ファミリー分離分析、ゲノム配列決定および遺伝子順序分析(gene-order analysis)によって構築されている(Shillingら、2002)。図6は、KIR遺伝子座の構成を示す。

【0082】

遺伝子変異

KIRファミリーに別のレベルの遺伝的多様性を加えているのは、すべてのKIR遺伝子によって示される相当な程度の遺伝子変異である。対立遺伝子多様性は、ヌクレオチドの置換、組換えまたは遺伝子変換および点変異によって作製される。活性化KIRおよび抑制KIRは、高い配列相同性を共有する。活性化KIRは、抑制KIRから配列の変更、終止コドンの上流での荷電残基の作製およびITIMの除去によって誘導されると考えられている。それらのまだ間もない進化により、抑制KIRと比較した場合に活性化KIRの対立遺伝子多様性は相当に限定的であるが、民族的集団にわたる活性化受容体の多様性はより広範囲である。

【0083】

現在、計335個のKIR対立遺伝子が同定されており、ウェブサイト: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir>に見出すことができる(table 2(表2))。KIR対立遺伝子配列は、遺伝子名の後にアスタリスクによって記されている。コードされるタンパク質配列における差異は、最初の3個の数字によって識別され、次の2個の数字はコード配列中の同義差異(synonymous differences)(すなわちアミノ酸置換を生じない)によって異なる対立遺伝子を記すために使用され、最後の2個の数字は、イントロンおよびプロモーターなどの非コード領域中に差異を有する対立遺伝子について使用される。したがって3DL1*009と3DL1*010とは異なるタンパク質産物をコードする対立遺伝子であり、3DL1*00101と3DL1*00102とは同じタンパク質産物をコードする対立遺伝子であるが、これらの対立遺伝子はコード領域中の同義DNA置換によって異なる(Marshら、2002)。

【0084】

発現およびHLA

抑制KIRについてのリガンドは、MHCクラスI分子であり、大部分の健康な細胞によって恒常的に発現されているが、腫瘍細胞および感染した細胞において下方制御される場合が

あり、NK細胞によって死滅させられる。MHCと抑制受容体との相互作用は、自己に対するNK細胞の寛容を確実にする。MHCクラスI分子は、染色体6p21.3に位置するヒト白血球抗原(HLA)遺伝子によってコードされ、多型であり、顕著な変異を提示する。KIR遺伝子およびHLA遺伝子は、それらが異なる染色体に位置することから、減数分裂中に非依存的に分離する。これは1個体によって遺伝されるHLAとKIRとの興味深い組合せを生じ得るが、しかし受容体と同族リガンドとの間の機能的相互作用を得るためにはそれらは一緒に発現される必要がある。これは、KIRおよびHLAをコードする遺伝子の間に関連が存在するかどうかの疑問をもたらす。活性化KIRに対するリガンド特異性は、十分に定義されていない。いくつかの活性化KIRのリガンドは、いまだ同定されていない。KIR2DS2およびKIR2DS1の活性化受容体は、それらに密接に関連する抑制受容体よりも低い結合親和性をHLA-Cに有すると報告された。非HLAリガンドがこれらの活性化KIRについて存在する可能性もある。明確な同族リガンドを有するKIRをtable 3(表3)に示す。

10

20

30

40

50

【0085】

個体におけるKIR表面タンパク質レパートリーは、KIR遺伝子によって主に決定されている。したがって発現の欠失は下方制御によってよりもその遺伝子の欠損によってより生じやすい。ヒトでの個々のNK細胞は異なる組合せのKIRを有し、KIR遺伝子は各個体で発現される全KIR遺伝子レパートリーのサブセットを伴ってクローン様式(clonal manner)でNK細胞によって発現される。KIR2DL4は、注目すべき例外の1つであり、この遺伝子はNK細胞において一様に発現されている。発現される各KIRの発生頻度は、個体ごとに異なる場合があるが、経時的には一定である。例えば遺伝子KIR2DL1は、個体AのNK細胞集団の50%において発現される場合があるが、個体BにおけるKIR2DL1の発現は、そのNK細胞集団の14%であることが見出されている。この差異についての1つの説明は、遺伝子の特定の対立遺伝子が遺伝子の多数の複製物の存在のためにより高頻度で発現されることである可能性がある。

【0086】

この実施例は、多重ライゲーション依存性プローブ増幅(MLPA)でのKIR遺伝子型判定のための新規方法を表す。この方法でKIR遺伝子型判定の迅速かつ好都合な方法が実施され、KIR遺伝子の相対的コピー数も定量される。コピー数多型(CNV)は、遺伝的変異の実質的な量の原因となり、例えば転写レベルにおける顕著な表現型多様性を生じ、それにより機能的に関連する。

【0087】

本発明者らは、17個のKIR遺伝子のうちの16個KIR2DL1~5、KIR2DS1~5、KIR3DL1~3、KIR3DS1、KIR3DP1およびKIR2DP1を判定するための2個の合成MLPAプローブセットを開発した。KIR遺伝子のためのプローブは、大部分の対立遺伝子を検出するために異なる遺伝子座について設計した。プローブセット1および2を図3Aおよび3Bに列挙する。プローブの特異性は、PCR-SSOPおよびPCR-SSP法で得られたKIR遺伝子型についての試料の比較によって検証し、相対的遺伝子コピー数を定量するためのプローブの能力を、大部分のKIR対立遺伝子について遺伝子型判定されており、2個の親および2個の子孫からそれぞれなる12ファミリーについて調査した。

【0088】

材料と方法

DNA選択/単離

無関係に無作為選択したコーカサス人種のドナー由来のDNAを、プローブのピークプロファイルを検査するこの研究のために得た。プローブの検証のために、SSP-PCR KIR判定ゲノムDNA試料5個および10¹¹ International Histocompatibility Workshopから得たEBV形質転換B細胞系11個、JVM、T7507、OLGA、SAVC、JBUSH、BM16、LBUF、AMALA、BM90、TAB089およびKAS116を使用した(Cookら、2003)。Centre de'Etude du Polymorphism Humain (CEPH)由来の(親2個および子2個を含む)12ファミリーからの試料48個を含むIHWG由来のKIR参照パネルIもこの目的のために使用したが(table 4(表4):試料48個のKIR判定および図7:系図)、その主な目的はプローブのコピー数定量の能力を測定することであった。ゲノム

DNAおよび細胞系由来のDNAは、製造者の説明書に従ってQiagen(blood kit)で単離した。

【0089】

プローブ設計

プローブは、一般的指示(www.mlpa.com/protocols.htm)に従って設計した。すべてのプローブは、Invitrogen(Carsblad, CA)によって製造された。ライゲーション後のプローブ(「ライゲーションしたプローブ」)の大きさは、各増幅産物を配列決定用ゲル上で分離するために4~5ヌクレオチド間隔があいており、増幅産物の大きさは95~223ヌクレオチドの範囲になる。すべてのMLPAプローブは、ユニバーサルプライマー対によって認識されるPCRプライマー配列を含有する。PCRプライマー配列は:フォワード5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGG-3'およびリバーズ5'-TCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'。

10

【0090】

KIRプローブは、KIR2DL5Bを除く(この遺伝子については特異的なプローブを設計できなかった。)table 1(表1)に列挙するKIR遺伝子17個の間を同定および判別するために設計した。KIR2DL5に対するプローブは、現在遺伝子KIR2DL5AおよびKIR2DL5Bの両方を検出する。追加的に代替配列およびイントロン配列についてのプローブをbasic local alignment sequence tool searchesおよびthe IPD/KIR Database、<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir>を使用して設計した。KIRプローブの大きさは、table 5(表5)および6(表6)に見出さる。

【0091】

9個の対照プローブの標的は、ヒトゲノムの保存遺伝子FGF3、BCAS4、LMNA、PARK2、MSH6、GALT、SPG4、IL-4およびNF2上にある。これらの標的遺伝子を、Sanquinでの先行するMLPA研究におけるドナー間で大きな変化がないことを示すために検査した。最初は対照1および10はそれぞれ88bpおよび130bpであったが、KIRプローブ中でより均等に対照プローブを分布させるために180bpおよび223bpに伸長した。Table 7(表7)は、対照プローブの遺伝子および大きさの一覧を示す。

20

プローブのシグナルがキャピラリー電位泳動装置による検出でスケール外であった場合に競合プローブを設計し、table 8(表8)に列挙する。

【0092】

MLPA反応

すべてのDNA試料を水で20ng/ μ lに希釈し、5 μ lを200 μ lチューブ中で98 $^{\circ}$ C、5分間、加熱された蓋を備えるBiometra T-1 Thermoblockで変性させた。

30

【0093】

MLPA reagents(EK kit 5)をMRC-Holland(アムステルダム、オランダ)から得た。SALSA MLPA緩衝液(2 μ l)およびプローブ混合物中(1 μ l)の各MLPAプローブ1~10fmolを添加し、合計容量10 μ l中で95 $^{\circ}$ C、1分間に続いて60 $^{\circ}$ C、16時間インキュベートした。ハイブリダイズしたプローブのライゲーションは、Ligase-65混合物(リガーゼ緩衝液A 3 μ l、リガーゼ緩衝液B、Ligase-65 1 μ lおよび水25 μ l)32 μ lを添加する前に温度を54 $^{\circ}$ Cに低下させ、15分間インキュベートすることによって実施した。98 $^{\circ}$ C、5分間での酵素の不活性化後、リガーゼ混合物10 μ lを4 $^{\circ}$ C、200 μ lチューブ中でPCR緩衝液4 μ lおよび水26 μ lで希釈した。PCR反応用にポリメラーゼ混合物10 μ l(ポリメラーゼ0.5 μ l、SALSA酵素希釈緩衝液2 μ l、SALSA PCRプライマー2 μ lおよび水5.5 μ l)を60 $^{\circ}$ Cで添加した。ライゲーションしたMLPAプローブのPCR増幅は、36サイクル(95 $^{\circ}$ C 30秒間、60 $^{\circ}$ C 30秒間、72 $^{\circ}$ C 60秒間)実施し、72 $^{\circ}$ C、20分間のインキュベーションが続いた。

40

【0094】

電気泳動

PCR産物1 μ lをPromega Rox size standard 60~400bp 0.4 μ l + High Definition buffer 8.6 μ lを含有する新たなチューブに添加する。産物をApplied Biosystems Genetic Analyzer 3130XLキャピラリー電位泳動によって、その分子量に応じて分離し、得られた電気泳動像は各プローブに対応する特異的ピークを示す。

【0095】

分析

50

データをGenemapper v3.6で描出し、内部対照プローブ標準化を使用してSoft genetics Genemarker v1.6で標準化した(<http://www.softgenetics.com/papers/MLPA>)。最後にこれらのデータをExcelファイルにエクスポートした。

【0096】

結果

プローブシグナルの検出

最初にすべてのMLPAプローブを無作為に選択したドナーで検査した。本発明者らは最初にプローブがシグナルを生成するかどうかおよびこれらのシグナルが各プローブに予測される大きさに対応するかどうかを検査した。対照プローブピークおよび4個のフレームワーク遺伝子KIR2DL4、KIR2DL3、KIR3DL3およびKIR3DP1についてのプローブピークは、予測されたとおりすべての試料中で生じた。個体間のKIR遺伝子含有量の多様性が、さまざまな試料を比較した場合に観察された、図8。プローブ強度をy軸に任意単位(AU)によって記し、プローブの大きさをx軸に塩基対(bp)で表した。本発明者らは、データを定量するためにピーク高さを使用したが、他ではプローブ面積を提案する場合もある。

【0097】

第2に、プローブシグナルの強度を検査した。ピークパターンは、標準化の前にピーク強度を観察するためにGenemapperで描出した。Genemarkerをデータを標準化し、これをより大きなプローブの崩壊に関して補正するために使用するが、シグナルがスケール外である際は示さなかった。より信頼できるDQ値を得るために500~6000AUの間のプローブシグナルを有することは好ましい。さらに、500AUより低いシグナルを有する蛍光ピークは、さらなるプローブが反応に添加される場合では常には検出されない可能性がある。6000AUを超える蛍光ピークは、配列決定機によってスケール外であると検出される場合があり、他のプローブのシグナルを相対的に減少させる。いくつかの示唆がプローブ強度を増強するまたは低下させるために記載されており、PCRプライマータグ部位の隣のヌクレオチド組成および/またはプローブのGC含有量が影響しうるいくつかの要因である(www.mlpa.com/protocols.htm)。一般に競合物はプローブシグナルの低減のために、およびより高いプローブ濃度はシグナル増加のために使用される。競合物は、左側または右側のいずれを選択したかに依存してフォワードまたはリバースのプライマー配列を含まないMLPAプローブの一部と同一のオリゴヌクレオチドである。競合物は、同じ標的に対するMLPAプローブと競合するが、それらがプライマー配列を欠いていることから、これらのライゲーションしたプローブの増幅物は生じない。結果は、より少ないプローブ増幅産物が検出され、より低いピーク強度が得られることである。

【0098】

競合物は、対照プローブ2、3、4、7および9に対して、および第1位置についてはKIRプローブ2DL4、3DL3(プローブセット1)および3DL2(プローブセット2)に対しても設計された。これらのプローブは、それぞれ長さ96bp、100bpおよび108bpを有する。しかし本発明者らは、事実上プローブの大きさの増大に対応してピーク強度の減少を観察した。より長い合成プローブは、より高い割合の不完全なオリゴヌクレオチドをより含有しやすい。したがって高いピーク強度を有するプローブでは長さを伸長する、および低いピーク強度を有するプローブではこれを短縮することは選択肢であると考えられる。プローブ2DL4を170bpに、3DL3を154bpに再設計し、より低いピーク強度がその結果であった。プローブ3DL3(100bp)によって生成されたピークは、その競合物によって影響されず、プローブ2DS3(108bp)の産物であると(このプローブをプローブセット1から除いた場合にスケールを外れたシグナルが正常値に減少したことから)考えられた。

さらに長さ30bpを有する競合物は、長さ50bpを有するものよりも影響を有さず、その場合プローブシグナルを低下させるためにより高い投与量が必要であった(データ未記載)。

【0099】

シグナルを生成しないまたはシグナルが不十分であるプローブについては、以下を実施した;3~10倍濃度のこれらのプローブを使用し、配列に高度の重複を有するプローブを1個のプローブセットに含めなかった。フォワードプライマーの後ろに2個のシトシンヌク

10

20

30

40

50

レオチドを配置することはプローブシグナルを増加させ、チロシン塩基はこれを減少させることがMLPA設計手順に報告された。しかし本発明者らの実験においていくつかのプローブは、シトシン2個をフォワードプライマーの後ろに含有するように再設計したが、同じ結果を生じなかった。前述の処置および多数のドナーでの検査の後にシグナルをまだ生成しなかったプローブは、標的遺伝子の逆鎖上のプローブまたはその遺伝子上で異なる標的位置を有するプローブによって置き換えた。

【0100】

検査試料での各KIR遺伝子プローブピークの頻度を、www.allelefrequencies.netで入手できるコーカサス人種集団におけるKIR遺伝子頻度と比較した(table 9(表9))。集団での頻度と相反する頻度が観察されたプローブは、偽陰性または偽陽性結果を生じたと推定し、新たな設計で置き換えた。これらは、プローブのライゲーション部位での遺伝子変異によって生じると推定された。

10

【0101】

KIRプローブによって検出されうる対立遺伝子およびプローブによる全KIR対立遺伝子の適用範囲の表をtable 10(表10)に示す。

【0102】

ピーク強度に干渉する他の要因
プローブ品質

本発明者らは、異なる企業で製造されたプローブによるさまざまなプローブ品質を経験した。対照プローブ9個を以前ここで行ったC4 MLPAプロジェクト用にもこれらを供給したBiologio(www.biologio.com)に最初に発注した。すべてのKIR MLPAプローブは、Invitrogen(www.invitrogen.com)に発注した。対照プローブセットは2個の混合物、対照プローブ1(IL-4)、2(FGF3)、3(BCAS4)、4(LMNA)、5(PARK2)および7(MSH6)の1つならびに対照プローブ8(GALT)、9(SPG4)およびCtrl 10(NF2)のもう1つに分けた。各対照プローブについての必要な濃度はさまざまに0.5fmol~6fmolの範囲であり、さまざまな濃度の競合物も必要であった。

20

【0103】

KIR MLPAのために使用される対照プローブは、Invitrogenに発注した。各対照について前述と同じピーク強度を得るためには、対照プローブ5(3fmol)を除いては1fmolが必要で、プローブを2個の混合物に分ける必要はない。より良いプローブ品質によりプローブセットを作製する時間が省かれた。

30

【0104】

鋳型DNA量

MLPA反応をDNA 50ngで実施し、この研究全体を通じて使用される100ngでのものと比較した。20ngのDNA量を使用するMLPA反応がSchoutenら(Schoutenら、2002)によって報告されている。ピークプロファイルを比較した場合、これらの2つの反応の間に著しい差異は観察されなかった。9個の対照プローブのDQを各試料について算出し、DNA 100ngを含む試料を参照とした。DNA 50ngを含有する8個の試料から7個が、3個より多い対照プローブについて範囲[0.8~1.2]外、1試料中で[0.3~1.5]の範囲のDQ値を示した。DNA 100ngの試料8個すべてが9個すべての対照プローブについて許容範囲[0.8~1.2]内のDQを有したが、この範囲を外れた2個の対照プローブDQ値を有した1個の試料を除く。ここで本発明者らは、同じ試料のDQ値が異なるDNA量で同じスコアを生じなかったことから、異なるDNA量でのMLPA反応は相互に比較できないことを結論付けた。

40

【0105】

次にDNA 50ngの試料を、DNA 100ngの試料を参照として比較した。観察されたのは、8個の試料の内3個が3個を超える対照プローブを範囲[0.8~1.2]を外れるDQ値で有したことであった。1個の試料の9個の対照DQ値を分析した場合、[0.5~1.7]の間の値が見出された。したがって、プローブのDQ値が試料間および1個の試料中でDNA 100ngを含有する試料においては観察されなかった大きな変動を示したことから、DNA 50ngで実施したMLPA反応は信頼できないと考えられた。この研究のためにより多い量のDNAが必要であることは、Schou

50

tenら (Schoutenら、2002) によって使用されたプローブセットとは対照的に本発明者らが完全に合成プローブセットを使用するという事実によって説明できる。さらにほとんどの研究は、少量のDNAで実施され、組換えまたは変異などの染色体異常だけをしばしば分析し、コピー数を定量しなかった。

【0106】

再現性

対照プローブのDQが算出された場合に、異なる実施回の試料が常に比較できるわけではない。説明は、ヒトの操作またはプローブシグナルの再現性における差異によって実験条件が各実施回で変動する場合があることである。したがって同じ実施回での試料は、好ましくは異なる実施回の試料でのデータと比較する前にまず標準化され、分析される。事実上確立された相対的遺伝子コピー数を有する参照試料は、参照にするために好ましくは各実験に含まれる。

10

【0107】

KIR判定DNA試料での検証

KIRプローブの特異性をthe 10th International Histocompatibility Workshop (IHW) (Cookら、2003) によってKIR遺伝子型判定されたEBV形質転換細胞系11個を検査することによって検証した。細胞系は、PCR-SPPおよびPCR-SSOPを使用してKIR遺伝子判定され、3カ所の別々の研究所において実施された。細胞系は、遺伝子KIR2DL5A、KIR3DL3、KIR2DP1およびKIR3DP1については遺伝子型判定されず、遺伝子KIR2DL1、KIR2DL4、KIR3DL1、KIR3DL2およびKIR2DS4についての陰性対照も含まなかった。

20

【0108】

加えて、5個体からのDNA試料をさらなる検証のためにPCR-SSPによって遺伝子型判定した。これらの試料5個も遺伝子KIR3DL3およびKIR3DP1について遺伝子型判定し、KIR2DL1およびKIR2DP1についての真の陰性遺伝子型判定結果を含有することを見出した。2個のプローブセットの検証結果をtable 11~14(表11~14)に示す。

【0109】

プローブセット1

プローブセット1でのKIR遺伝子型判定は、プローブ2DL1~5、2DS1、2DS3~5、3DL1~2および3DS1に対して細胞系10個でのthe 10th IHWと一致することが見出された。すべての細胞系は遺伝子KIR2DP1、KIR3DP1およびKIR3DL3について陽性に判定され、最初のは94~100%の間の頻度を有しtable 9(表9)、後の2個は常に存在するフレームワーク遺伝子である。5個体の遺伝子型判定は、プローブ2DS2についてを除いてPCR-SSPで同じ結果が得られた。

30

【0110】

2DL5Aについてのプローブ(プローブセット2において同じプローブ)

KIR遺伝子型判定についてのほとんどの研究は、KIR2DL5の存在を検出し、この遺伝子を2個の遺伝子KIR2DL5AおよびKIR2DL5Bの間で判別しない。これらの2個の遺伝子は、1%だけのヌクレオチド配列の差異を示す。本発明者らは、KIR2DL5BをKIR2DL5Aおよび他のKIR遺伝子から判別するための特異的ライゲーション部位を見出せなかったことからKIR2DL5Bについてのプローブを設計できなかった。KIR2DL5Aのために設計されたプローブは、この対立遺伝子がプローブの範囲内の配列に他の差異を含有しないことから、対立遺伝子KIR3DP1*004も検出し(table 10(表10))、したがってプローブセットは、KIR2DL5Aの選択的検出のための特異的プローブを含有しない。実際にはKIR3DP1*004は発現されず、KIR2DL5AのプロモーターとKIR3DP1のコード領域とのハイブリッドを形成する。プローブ2DL5AがMLPAにおいてシグナルを生成する場合、これは、KIR2DL5AおよびKIR3DP1*004の両方または2KIR2DL5AもしくはKIR3DP1*004のいずれか単独での存在を示唆できる。しかしプローブ2DL5は、プローブ2DL5Aと同じKIR2DL5A対立遺伝子を検出する。プローブ2DL5が結合せず、プローブ2DL5Aがする場合、KIR2DL5Aの欠如およびKIR3DP1*004の存在が実証される。これは、細胞系JVM、SAVC、JBUSH、BM16、TAB089、KAS116ならびに個体33_8025および33_8588によって明確に実証される(図10)。

40

50

【 0 1 1 1 】

プローブセット2

プローブセット2は、より小さな部分のプローブを含有する。より大きな部分のプローブは、重複配列を有し、10個のKIRプローブの内の7個が500AUを超えるピーク強度を得るために他より10倍高い濃度を必要とした。

【 0 1 1 2 】

プローブ2DS5および3DS1

プローブ2DS5および3DS1は、KIR2DS5およびKIR3DS1について陰性と遺伝子型判定されたものに含まれるすべての試料に結合し、プローブの非特異的ライゲーションを示唆した。プローブ2DL5および3DS1は、以前使用されたプライマー配列に基づかず、KIRデータベースでのプローブ検索ツールおよびBLAST結果は、他のKIR遺伝子とのマッチを示さず、これらのプローブはKIR2DS5およびKIR3DS1に特異的であると考えられた。これらのプローブが偽陽性結果を示すことの説明は見出せなかった。これらのプローブをプローブセット2から排除した。

10

【 0 1 1 3 】

プローブ2DS1

KIR2DS1に対して陰性の細胞系6個の内3個は、このプローブによって陽性と判定された、一方でPCR-SSP判定された個体からの陰性2個は、正しく判定された。プローブ2DS1標的はイントロン上にあり、イントロン配列についてはわずかな情報しか利用できない。他のKIR遺伝子がこの位置に同じ配列を有する可能性があるとの事実は排除できず、したがってこのプローブをプローブセットに含めない。

20

【 0 1 1 4 】

プローブ3DP1

プローブセット2のプローブ3DP1は、エキソン2の欠損を検出し、KIR3DP1のこの対立遺伝子は、KIR3DP1*003と記載され、コーカサス人種集団において0.72の頻度を有する。PCR-SSP判定個体の試料33_8588は、KIR3DP1についてMLPAプローブによって陰性と判定され、PCR-SSPによって陽性と判定された(table 14(表14))。これら2つの方法の間での矛盾する判定結果は、この試料中のエキソン2の存在によって説明されうる。

【 0 1 1 5 】

細胞系LBUF

両方のプローブセットは、この細胞系をKIR2DL3について陽性、KIR2DL5およびKIR2DSについて陰性と遺伝子型判定している。追加的にプローブセット1はLBUFをKIR2DS1、KIR2DS5およびKIR3DS1について陰性と判定した(table 11および13(表11および13))。検査した細胞系LBUFがthe 10th IHWによって以前発表されたものと同じではないと推定することは合理的である。LBUFは、Hsuら、2002 (Hsuら、2002)によってKIR遺伝子型判定されており、彼らの判定は本発明者らと一致した。さらにLBUFおよび他の細胞系は、標準的PCR-SSP法でKIR遺伝子型判定され、これらの結果は11個すべての細胞系での遺伝子KIR3DL3、KIR2DP1およびKIR3DP1での陽性判定結果を含むMLPAでの本発明者らの発見を確認した。

30

【 0 1 1 6 】

遺伝子コピー数の定量

遺伝子コピー数定量の検証のために、KIR遺伝子のコピー数が十分に明確にされた試料が必要であった。これらが入手できないことから、本発明者らはこの目的のために、それぞれ親2個および子供2個の12ファミリーを含むKIR参照パネルIを使用した。これらの参照試料48個は、15カ所の異なる研究グループによってPCR-SSPおよびPCR-SSOPを利用してKIR遺伝子型判定されている。The Centre de' Etude du Polymorphism Humain (CEPH)、Fondation Jean Dausset、パリ、フランス(www.cephb.fr)は、これらのファミリーのリンパ芽球細胞系(LCL)を調製した。International Histocompatibility Working Group (IHWG) Cell and DNA Bankは、このパネルを商業的使用のために利用できるようにしている(www.ihwg.org)。

40

【 0 1 1 7 】

50

すべての試料をKIR遺伝子16個ならびにKIR3DP1の変異体2個(KIR3DP1*003およびKIR3DP1)ならびにKIR2DS4の変異体2個(KIR1D別名KIR2DS4*003およびKIR2DS4)の存在または欠如について確認した(table 4(表4))。一方KIR参照パネルIのKIR3DP1は、エキソン2の欠如によって特徴付けられ、KIR3DP1はKIR3DP1対立遺伝子の残存を示す。KIR1Dは、22bp欠損をIg様ドメインD2に含有し、切断型タンパク質産物をもたらすフレームシフトおよび早期終止コドンを生じる(Hsuら、2002)。

【0118】

これらのファミリー6個のハプロタイプも図7に示すとおり入手可能であった。追加的にこの図は、ファミリー12個の系図を示す。ハプロタイプについての情報により、本発明者らはいくつかの試料はKIR遺伝子の少なくとも2個の複製物を示すことを推定できた。これらのコピー数の遺伝様式は、血統情報から推定した。参照パネルは、同時にプローブの特異性についての追加確認ステップとしても利用された。

10

【0119】

KIR遺伝子型判定における特異性

両方のプローブセットにおいて、KIR参照パネルでのMLPA実験の信頼できるデータを作製することに困難が経験され、これが以前の実験のゲノムDNA試料では生じなかったことから、恐らくこれはDNA試料の品質の低さによって生じている。対照プローブのDQ値は、提案される通常範囲[0.8~1.2]の外より高い頻度を有した。したがって多数の試料のデータが失われ、これらの試料は将来において検査されるべきである。

20

【0120】

プローブセット1

プローブ16個:2DL1~5A、2DS1および2DS3~5、3DL1~3、3DS1、2DP1および3DP1を検査し、プローブ2DP1および2DL5でのいくつかの差異を除いて(これらの試料はプローブセット2によって正確に判定された。)大部分のプローブが報告されているとおりKIR参照パネルを遺伝子型判定した。

【0121】

プローブセット2

プローブ: 2DL1~5A、2DS2、2DS4、3DL1~3、3DS1、2DP1および3DP1、合計14プローブを参照パネルで検査した。プローブ3DP1はKIR3P1*003(table 4(表4)で3DP1と記載)のために設計され、この対立遺伝子についての特異性を参照パネルで確認した。プローブ2DL2はおよそ58%を偽陽性と判定し、プローブ2DL1は陰性のパネル4個の内3個を陽性と判定したので、これら2個のプローブではさらなる検査は行なわれていない。プローブ2DS2は約15%を不正確に陰性と判定したが、対照のDQ値のため除外された以前の実験ではこれらの試料2個は陽性と判定された。これらの試料は、プローブ2DS2についての結論を導くことができる前に修正される必要がある。プローブ2DS4は、偽陰性結果を1個生じた(試料1333-8281)。9個の対立遺伝子の内1個におけるライゲーション部位から4塩基離れている遺伝子変異体のためにKIR2DS4対立遺伝子の80%だけがこのプローブによって検出できる。このプローブの右部分はこの位置でのUIBコードで再設計される。

30

【0122】

CNVの定量

両方のプローブセットでKIR遺伝子型判定について正確であることが実証されているプローブは、コピー数定量におけるそれらの能力について分析されている。プローブ1個でのCNVの相対的定量は、プローブのライゲーション部位近傍の遺伝子変異がDQ値の結果に影響する可能性があることから単純には信頼できない。これは、それらが99%までの相同性を示す一方で高いレベルの遺伝子変異を示すことから、KIR配列について特にあてはまる。特定のプローブは、異なるKIR遺伝子をそれらのライゲーション部位でのヌクレオチド1個の差異によってだけで判別する。標的遺伝子のライゲーション部位近傍での遺伝子変異体は、より低いプローブシグナルを導く場合がある。別法として、他のKIR遺伝子の1個での遺伝子変異体は、この遺伝子をその標的として認識するプローブを生じ、したがってプローブシグナルを増強し得る。したがって報告されたハプロタイプおよびプローブ2

40

50

個の完全なMLPAデータを有するファミリーのKIR遺伝子だけをコピー数について分析した。

【0123】

各試料での両方のプローブセットの対照プローブのDQ値をMLPAデータが信頼できるかどうかを点検するために比較した。対照プローブ9個はこれらの対照プローブが両方のプローブセットにおいて同じであり同じ試料について検査することから、同じDQ値を生じるべきである。プローブセット2個の間で同程度の対照プローブDQ値が7個より少ない試料は、排除した。次にKIRプローブのDQ値を評価した。本発明者らは以下の通り解釈した;DQ値 $0.3 <$ はその遺伝子0コピー、DQ[0.4~0.7]は1コピー、DQ[0.8~1.2]は2コピー、DQ[1.3~1.7]は3コピー、DQ[1.8~2.2]は4コピー、DQ[2.3~2.7]は5コピーなど。0.7のDQなどの境界線上の値は疑わしく、第2プローブがこの遺伝子を明らかに1コピーと定量した場合は0.7は1コピーと考え、同様の手法を境界線上の他の値に適用する。

10

【0124】

図11Aおよび12Aはそれぞれファミリー1347および1349の系図を示し、ハプロタイプについての説明を下に示す。KIR遺伝子のコピー数を図11Aおよび12Aの系図の隣に示す。

【0125】

正確なコピー数の定量における差異を試料:1347~8445、1347~8436および1349~8398においてKIR3DP1に対するプローブで観察した。プローブセット1は、プローブセット2よりもこの遺伝子においてより多いコピーを検出すると考えられ、それらの設計と一致する。プローブ3DP1(1)はすべてのKIR3DP1()対立遺伝子を検出し、プローブ3DP1(2)は説明で3DP1と記載される(エキソン2欠損を示す)KIR3DP1*003だけを検出する。プローブセット1におけるプローブ2DL3および2DL4は、プローブセット2のそれらの対応物よりも少ないコピー数を検出する。プローブ2DL3およびプローブ2DL4はそれらの標的配列での遺伝子変異体の存在から問題を有し得るが、プローブセット2でのこれらのプローブはプローブ標的配列に遺伝子変異体を有さず、100%の適用範囲(table 10(表10))を与える。KIR3DL1についてのプローブは、ファミリー1349のメンバーを異なって定量する。プローブセット1のプローブは、プローブセット2におけるプローブとは異なる対立遺伝子を網羅し、ライゲーション部位から10塩基より多く離れたそれらの標的配列に遺伝子変異体が存在する(結合効率、それによりピーク高に影響する場合がある)ことにより適用範囲率はそれぞれ78%および41%である。ここでもプローブ配列にIUBコードを加えることは個体間でのコピー数差異の誤った解釈の問題を克服する。

20

30

【0126】

多数のプローブでのコピー数定量における差異にもかかわらず、遺伝子コピーの全体的な遺伝様式は、ハプロタイプの遺伝様式と一致した。例えばフレームワーク遺伝子4個KIR3DL3、KIR3DP1、KIR2DL4およびKIR3DL2は、すべての試料において存在し、これらの各遺伝子の少なくとも2コピーが見出されている。これは、これらの遺伝子が各対立遺伝子で少なくとも1コピー存在しており、両方の親から遺伝することを示している。ファミリー1347の調査は、父(ハプロタイプa/b(試料8440))が1個の対立遺伝子ハプロタイプbに遺伝子KIR2DL5のコピー3個を有し、かつ1個を他方のハプロタイプaに有し、3コピーを有するハプロタイプbを子供(試料8436)に移し、1コピーを有する対立遺伝子ハプロタイプaを他の子供(試料8412)に移したことを明らかにした。ファミリー1349については、KIR2DS4の1コピーが1個の対立遺伝子ハプロタイプcに、2つが他(母(試料8399)のハプロタイプd)にあると考えられる。両方の子供がハプロタイプcを有することから、両方の子供それぞれハプロタイプb/cおよびハプロタイプa/c(試料8393および8636)には、それらの母からコピー2個を含む対立遺伝子を遺伝し、1つの子供(試料8636)はその父からこの遺伝子ハプロタイプaの1コピーを遺伝した。同様に遺伝子の残りのコピー数の遺伝様式を分析した際に、ハプロタイプの遺伝様式に矛盾は見出されなかった。遺伝様式およびコピー数を分析することができる前に、完全に報告されたハプロタイプを有する他のファミリーを、1個のファミリー中のすべてのメンバーの完全なデータを得るために再度検査すべきである。

40

【0127】

50

考察

本発明より前は、KIR遺伝子型判定用の合成MLPAプローブの設計における主な問題は、標的遺伝子に十分に特異的であるが、集団に存在する大部分の対立遺伝子を検出するためにまだ十分に感受性であるプローブを設計することであった。KIR遺伝子は、エキソンおよびイントロンの両方の配列において非常に高いレベルの相同性(85~99%)を有し、かつ相当な程度の遺伝子変異を示す。

【0128】

ライゲーション部位で1ヌクレオチドだけ異なる標的配列を判別できることからMLPAは良い方法である。本発明者らは、第2のライゲーション部位を加える3個のプローブ部分からなる合成MLPAプローブを設計し、それにより追加の判別点が提供された。追加的にこれら3つの部分のプローブは、ライゲーションしたプローブの大きさを伸長することを可能にし、この研究において検査した最も長いプローブは、223bpであった(Ctr 10)。プローブおよび3個の部分のプローブのより良い品質によって、本発明による合成MLPAプローブセットにおけるプローブの数は、ライゲーションしたプローブの大きさによってあまり制限されない。

10

【0129】

この研究は、2個の合成プローブセットを有するMLPAがこれら2個のプローブセットが3種の独立した手法によって十分に検証されていることから、KIR遺伝子型判定において信頼できることを実証している。2個のプローブセットは、KIR対立遺伝子の検出および適用範囲において相互に補足し、検証のために使用したすべての試料においてもはや偽陰性を生じない。偽陽性を生じる場合があるプローブのプローブセットからの排除後でも、16個すべてのKIR遺伝子をそれらの存在または欠如について一貫して検出できる。これは、この実施例で定性的に使用されるMLPA法をPCR-SSPおよびPCR-SSOP法に匹敵するものにする。しかし、2つだけの反応が完全なKIR遺伝子型判定プロファイルを作製するために必要であることから、時間および作業は実施された実施例では省かれる。

20

【0130】

要約すると、プローブセット1は、プローブ2DL1~5、2DS1および2DS3~5、3DL1~3、3DS1、2DP1および3DP1、合計15個のプローブを含む。プローブセット2は、プローブ2DL3~5、2DS2~4、3DL1~3、2DP1および3DP1、合計11個のプローブを含む。合わせてこれら2個のプローブセットは16個のKIR遺伝子の判定についておよび少なくとも9個のKIR遺伝子の相対的コピー数を定量することについて正確である。

30

【0131】

(実施例2)

この実施例は、多重ライゲーション依存性プローブ増幅(MLPA)でのKIR遺伝子型判定およびコピー数多型分析のための追加的プローブを提示する。本明細書においてプローブは、17個すべてのKIR遺伝子、KIR2DL5 およびKIR2DL5、KIR3DP1 およびいくつかのヌル対立遺伝子を含むKIR2DL1~5、KIR2DS1~5、KIR3DL1~3、KIR3DS1、KIR3DP1およびKIR2DP1について提示される。伸長したプローブセット1および2を図3Cおよび3Dにそれぞれ列挙する。実施例1においてと同様に、プローブの特異性をPCR-SSOPおよびPCR-SSP法で得たKIR遺伝子型判定についての試料の比較によって検証し、相対的遺伝子コピー数を定量するプローブの能力を、大部分のKIR対立遺伝子について遺伝子型判定されており、親2個および子孫2個からそれぞれなる12ファミリーで調査した。

40

【0132】

材料および方法

競合物を使用せず、内部対照プローブ標準化(<http://www.softgenetics.com/papers/MLPA>)および合成参照物を使用するSoft genetics Genemarker v1.85でデータを標準化したことを除いて、実施例1の材料および方法によるDNA選択/単離、プローブ設計、MLPA反応、電気泳動および分析。

【0133】

結果

50

伸長したプローブセット

伸長したプローブセット1および2ですべてのKIR遺伝子およびいくつかのKIR遺伝子変異体を検出した。

【0134】

図3Cに示す伸長したプローブセット1は実施例1のプローブセット1と同じ遺伝子を検出するが、追加的プローブを加え、それにより追加的KIR遺伝子変異体がここで検出される。加えた追加的プローブは2DL5B、2DL4N(2DL4^{*}007、008、009、011)、3DL1^{*}024Nである。

【0135】

図3Dに示す伸長したプローブセット2は、実施例1のプローブセット2と同じ遺伝子を検出するが、追加的プローブを加え、それにより追加的KIR遺伝子変異体がここで検出される。加えた追加的プローブは2DL5B、3DS1^{*}049Nおよび2DS4N(2DS4^{*}004、^{*}006、^{*}007、^{*}008および^{*}009)である。KIR2DS4NはKIR1Dとも称される。

10

【0136】

プローブ3DP1

伸長したプローブセット2中のプローブ3DP1は、エキソン2の欠損を検出し、KIR3DP1のこの対立遺伝子はKIR3DP1^{*}003、KIR3DP1^{*}005またはKIR3DP1^{*}006と記される。

【0137】

2DL5Aおよび2DL5Bに対するプローブ

伸長したプローブセット1および2で、KIR2DL5Aおよび2DL5Bもここで検出される。KIR2DL5AおよびKIR2DL5Bについて設計されたプローブも、対立遺伝子KIR3DP1変異体を検出する(table 10(表10)、KIR3DP1^{*})。プローブ2DL5Aまたは2DL5BがMLPAでシグナルを生成する場合に、これはKIR2DL5AおよびKIR3DP1^{*} またはKIR2DL5BおよびKIR3DP1^{*} の両方の存在をそれぞれ示す場合がある。別法として、プローブ2DL5Aまたは2DL5BがMLPAでシグナルを生成する場合、KIR2DL5AもしくはKIR3DP1^{*} のいずれか単独(プローブ2DL5Aで)での、またはKIR2DL5BもしくはKIR3DP1^{*} の単独(プローブ2DL5Bで)での存在が示される。したがってこれらのプローブ2DL5Aおよび2DL5Bで、1個より多いKIR遺伝子が検出される。したがってこれらのプローブは、コピー数多型を測定するためには適さない(図13を参照されたい)。

20

【0138】

コピー数多型(CNV)

KIR3DP1変異体(KIR3DP1^{*})、KIR2DL5Aおよび2DL5Bを除くすべてのKIR対立遺伝子についてコピー数多型を伸長したプローブセット1および2で測定した(図13)。

30

【0139】

CNVの定量

実施例1と比較する正確なコピー数の定量における差異を伸長したプローブセットでの研究によって詳細に調べた。プローブセットの最適化は、最初に図11Aにおいて使用され、いまや実施例1の遺伝子型判定された系図中の検証されたKIRデータと100%完全なマッチをもたらしている。ファミリー1347および1349の分析によって例示されるとおり検査した10th ICWファミリーにおいて偽陽性シグナルまたは偽陰性シグナルを生じたMLPAプローブは無かった(図11Bおよび12B)。したがってプローブセット1および/または2の両方ならびに伸長したプローブセット1および/または2は、KIR遺伝子の検出および相対的コピー数多型の測定に適しているが、図3Cおよび3Dに示すとおり伸長したプローブセット1および/または2が好ましい。

40

【0140】

KIRハプロタイプ判定のための特異性および定量

系図中のMLPAデータから、ハプロタイプ判定は推定できる。最初にハプロタイプAおよびBの両方における第1ブロックについてのフレームワーク遺伝子KIR3DL3およびKIR3DP1(図6)ならびにKIR2DL4およびKIR3DL2は2個の遺伝子の一定のコピー数で存在する。しかしKIR3DP1は、いわゆるKIR3DP1^{*} 変異体として存在する場合がある(図7も参照されたい、灰色四角はハプロタイプAおよびBの両方におけるフレームワークKIR遺伝子を表す)。ハプロタイプBの場合、KIR遺伝子の存在は大きく変動する場合があり(図6)、このハプロタイプ

50

をKIR遺伝子クラスター中の多様性に顕著に寄与させる。

【0141】

ファミリー1347において本発明者らは、伸長したプローブセットを使用して系図から正確かつ完全なKIRハプロタイプ分析を推定している(図11B)。単一遺伝子レベルで、MLPA結果は遺伝様式についての洞察を提供する。同胞は、それらの親から異なるKIRハプロタイプを遺伝し、(例えば)KIR2DL5遺伝子含有量における多様性を生じる。したがって両方の同胞は、父(KIR2DL5遺伝子を合計4個保有する)由来の2個のKIR2DL5遺伝子および母由来のヌルハプロタイプ1個を含有するこれらの遺伝子2個を有する。文献からの現在のデータまたは現在のMLPAデータからでは、両方の同胞が遺伝したKIR2DL5遺伝子2個が同じ対立遺伝子であるかどうかまたは、KIR2DL5がいわゆるBハプロタイプの第1もしくは第2ブロックに位置するかどうかは、まだ識別できない(図6も参照されたい)。

10

【0142】

ハプロタイプレベルで遺伝様式は、この系図において残っている非フレームワークKIR遺伝子、例えばハプロタイプBの第1ブロック中のKIR2DL3、KIR2DS2、KIR2DL2、KIR2DP1およびKIR2DL1遺伝子(一般にフレームワーク遺伝子KIR3DL3とKIR3DP1遺伝子との間に位置する)について推定される(図6も参照されたい)。

【0143】

ハプロタイプBの第1ブロックの場合、結果は、父からのKIR2DL3-KIR2DP1-KIR2DL1ハプロタイプおよび母からのKIR2DS2-KIR2DL2-KIR2DP1-KIR2DL1ハプロタイプブロックの遺伝によって説明される。ハプロタイプBの第2ブロックの場合、KIR3DS1-KIR2DS3-KIR2DS1ハプロタイプが父から、KIR3DL1-KIR2DS4が母から遺伝していることは明白である。依然として1個の同胞(8436)は、本発明者らによるMLPA分析によりKIR3DL1遺伝子を欠失しているはずである。Sib8436は、本発明者らのMLPAに存在する通常の3DL1を有するが、sib8412は通常の3DL1遺伝子の代わりに3DL1N変異体遺伝子を遺伝している。これは、単に通常の遺伝によるものであって例外ではない。

20

【0144】

SSP-PCRは、3DL1変異体間を区別できない(3DS1変異体遺伝子間および2DL4変異体遺伝子間もできない)。

【0145】

ハプロタイプレベルで遺伝様式はファミリー1349の系図に関して同様に推定される(図12B)。この系図におけるフレームワークKIR遺伝子とは別に、非フレームワーク遺伝子は「全体で」遺伝するハプロタイプBを形成する。

30

【0146】

これら2個の同胞1349-8393および-8636の場合、KIR変異は両親から異なるKIRハプロタイプを遺伝することによって十分に説明されうる。

【0147】

ハプロタイプBの第1ブロックに関して、結果は父親由来のその2個の類似するKIR2DL3-KIR2DP1-KIR2DL1対立遺伝子の1個および母親由来の1個(この雌もより小さなKIR2DL3-KIR2DP1ハプロタイプブロックを保持している)の遺伝によって説明される。

40

【0148】

ハプロタイプBの第2ブロックの場合、父親がKIR3DL1-KIR2DS4組合せを1個の対立遺伝子上におよび別のKIR2DS3-KIR2DS4-KIR2DS1ハプロタイプ(2個の同胞によって異なって遺伝された)を他の対立遺伝子上に保持し、一方母親は2個の同一のKIR3DL1-KIR2DS4対立遺伝子を保持していることは明白である。

【0149】

図11および12において、標準的SSP PCR結果を伸長したプローブセット1&2での本発明者らのMLPAデータとCEPHファミリー1347および1349の系図において比較する。

【0150】

2種のKIRハプロタイプモデルが記載されている(例えば:H.Li、PLoS Genetics、2008、4、11:e1000254;M.Uhrberg、Eur.J.Imm.Highlights、2005、35:10~15;M.Carington、The

50

KIR Gene Cluster, 2003; K.Hsu, Imm.Reviews, 2002, 190:40~52を参照されたい)。従来のKIRハプロタイプモデルは、2個のハプロタイプAおよびBがあることを仮定する。両方のハプロタイプAおよびBは、フレームワーク遺伝子3DL3、3DP1、2DL4および3DL2を含有する。さらに両方のハプロタイプについて共通であるKIR遺伝子2DP1、2DL1および2DS4が存在するが、ハプロタイプAだけが2DL3、3DL1および2DS4を含有する。ハプロタイプBはより可変性であり、KIR遺伝子2DS1、2DS2、2DS3、2DS4、2DS5、3DS1、2DL2および2DL5を(前述のフレームワーク遺伝子とは別に)含有できる。96%を超える全世界の人口においてKIR遺伝子クラスターのAハプロタイプは、KIR遺伝子3DL3、2DL3、2DP1、2DL1、3DP1、2DL4、3DL1、2DS4および3DL2を含有する(www.allelefrequencies.netも参照されたい)。

【0151】

10

新規KIRハプロタイプモデルは、ハプロタイプAおよびBが2個の異なる染色体に存在することを仮定する。したがって任意の個体は、遺伝子型AA、ABまたはBBを示しうる。その個体のDNA試料に存在する遺伝子に基づいて、いずれのハプロタイプが存在するかを結論でき、アッセイからの陽性遺伝子は、特定のKIR遺伝子が、本質的に上に述べたとおり、ハプロタイプAまたはBの一方にだけ存在する法則により両方のハプロタイプに分けることができる。

【0152】

SSP-PCRデータについて2個のハプロタイプモデルを陽性CNV結果を解釈するためにそれぞれ示す、図11B1および12B1に従来のKIRハプロタイプモデル、図11B2および12B2に新規KIRハプロタイプモデル。図11B3および12B3は、伸長したプローブセット1&2での本発明者らのMLPAデータの結果を、従来のKIRハプロタイプモデルおよび新規KIRハプロタイプモデルによる両方のSSP PCRデータと比較して示す。

20

【0153】

従来のKIRハプロタイプモデルにおいて図11B1および12B1中のKIR遺伝子領域は、フレームワーク遺伝子(3DL3、3DP1、2DL4および3DL2)、AおよびBの両方のハプロタイプに存在しうる遺伝子(2DP1、2DL1および2DS4)ならびにハプロタイプ特異的遺伝子によって記される。KIR遺伝子2DL3、3DL1および2DS4はハプロタイプAに特異的であり、一方KIR遺伝子2DL5、2DS1、2DS2、2DS3、2DS5、3DS1および2DL2はハプロタイプBに特異的である。ハプロタイプAは高度に定常である。96%を超える全世界の人口においてハプロタイプAは3DL3、2DL3、2DP1、2DL1、3DP1、2DL4、3DL1、2DS4および3DL2からなる(www.allelefrequencies.net)。ハプロタイプBはより可変であり、より多い活性化KIR遺伝子を保持している。

30

【0154】

図11B2および12B2は、新規KIRハプロタイプモデルおよびCEPH-IHWG由来のSSP-PCRデータに基づいた各ファミリーについての解釈を示す。

【0155】

図11B3および12B3は、各ファミリーについてのコピー数多型を示す。table 3(表3)においてMLPAによるKIR遺伝子のコピー数多型が、各遺伝子について2個のプローブでN-変異体遺伝子(定義による単一プローブ検出)を除いて(アスタリスクによって印を付けたこれらの遺伝子を含んで)測定される。

【0156】

3DP1v遺伝子変異体について3個のプローブの組合せが設計されている。CNVは2DL5、2DL5aおよび2DL5bについてのプローブの結果間の比較から仮定されうる。

40

【0157】

2DS4N KIRプローブはKIR-2DS4欠損変異体遺伝子*003~*009を検出するために設計されるが、SSP-PCRは2DS4変異体*003(1Dと記す)だけを検出する。

【0158】

図12B3においてKIR3DP1変異体はMLPAを使用して検出される(table 3(表3))が、KIR3DP1変異体はSSP-PCRが使用される場合は検出されない。KIR3DP1vのSSP-PCRは、3DP1遺伝子から得られる1672bpのバンドを生じる。これが検出が難しいことが分かっている大きな断片であるためである。したがってDNA試料は、MLPAが使用される場合はKIR3DP1vに対して陽

50

性である場合があるが、SSP-PCRが使用される場合にはKIR3DP1vについて陰性であると考えられる。

【0159】

結論

伸長されたプローブセット1は、プローブ2DL1~5、2DS1~5、3DL1~3、3DS1、2DP1および3DP1を合計20プローブで含有する。伸長されたプローブセット2は、プローブ2DL1~5、2DS1~5、3DL1~3、3DS1、2DP1および3DP1を合計20プローブで含有する。合わせてこれら2個のプローブセットは17個すべてのKIR遺伝子および7個の変異体KIR遺伝子変異体(すなわち2DL5a、2DL5b、3DP1vおよびヌル変異体2DL4N、3DL1N、3DS1Nおよび2DS4N)の判定に関しておよび少なくとも17個すべての異なるKIR遺伝子および4個のヌル変異体(2DL4N、3DL1N、3DS1Nおよび2DS4N)の相対的コピー数の定量に関して正確である(図13を参照されたい)。

10

【0160】

(実施例3)

本発明による3個のプローブ部分を含むプローブセットの有利点は、少なくとも2個の異なるSNPが1個のプローブセットで検出されうることである。例えば3個のプローブ部分からなるプローブセットにおいてライゲーションのために2個の部位が好ましくは存在する。左プローブ部分と中央プローブ部分とはライゲーションされ、追加的に中央プローブ部分と右プローブ部分がライゲーションされる。各ライゲーション部位でSNPが検出されうる。2個のハーフプローブからなる従来のMLPAプローブセットでは、ライゲーションのための部位が1個だけ存在することから、プローブセット1個あたり1個だけのSNPが検出されうる。

20

【0161】

この実施例において、3個のプローブ(左プローブ部分1個、中央プローブ部分1個および右プローブ部分1個)からなるプローブセットでのKIR3DL1のヌル対立遺伝子の検出が記載される。この実施例を図1Cに例示する。

【0162】

材料および方法

KIR3DL1*024Nと称されるヌル対立遺伝子をKIR3DL1から本発明の3個のプローブを使用して判別する。この実施例において使用する部分プローブ(プローブ番号は図3Cに示すとおり):

30

711A-KIR3DL1 WT左プローブ部分:5'-P04

GGTTCCTAAGGGTTGGACCCCTCACGCCTCGTTGGACA-3'

711D-KIR3DL1*024N左プローブ部分:5'-P04-

GGGTTCCCTAAGGGTTGGACAAGGACCCCTCACGCCTCGTTGGAC-3'

711B-KIR3DL1中央プローブ部分:5'-P04-

GATCCATGATGGGGTCTCCAAGGCCAATTTCTCCATCGGTCCCATGATGCT-3'

711C-KIR3DL1右プローブ部分:5'-P04-

GCCCTTGCAGGGACCTACAGATGCTACGGTTCTGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'

【0163】

DNA選択/単離、プローブ設計、MLPA反応、電気泳動および分析について、実施例1の材料および方法を参照されたい。

40

【0164】

これらの部分プローブで2個のプローブセットを形成できる。これら2個のプローブセットは異なる左プローブ部分からなるが、中央および右プローブ部分は共有する。

【0165】

結果および考察

中央プローブ部分711Bの最後の塩基はチミンである。このチミンはKIR3DL1遺伝子に特異的である一方で他のすべてのKIR遺伝子はこの位置に異なる塩基を有する。したがってプローブ部分711BでKIR3DL1は他のKIR遺伝子から判別される。中央プローブ部分(711B)と

50

右プローブ部分(711C)との間のライゲーションは、KIR3DL1遺伝子が存在する場合にだけ生じる。

左プローブ部分711Aの最後の塩基はアデニンである。この塩基は野生型KIR3DL1遺伝子において存在するがKIR3DL1ヌル対立遺伝子KIR3DL1*024Nにおいては欠損している。したがって最終塩基位置にアデニンを含有するプローブ部分711Aは野生型KIR3DL1遺伝子に特異的であり、711A左プローブ部分と中央プローブ部分(711B)との間のライゲーションは、KIR3DL1野生型遺伝子が存在する場合にだけ生じる。左プローブ部分711Dにおいて最終アデニンは除去されている。したがってプローブ部分711Dはヌル対立遺伝子KIR3DL1*024Nに特異的であり、711D左プローブ部分と中央プローブ部分(711B)との間のライゲーションは、KIR3DL1*024Nが存在する場合にだけ生じる。

10

【0166】

したがってこれら2個のプローブセットは、左プローブ部分および中央プローブ部分の両方がSNP特異的であることからそれぞれ2個のSNP、すなわちKIR3DL1野生型遺伝子およびヌル対立遺伝子KIR3DL1*024Nに特異的なSNPを検出する。

【0167】

【表1】

Table 1. KIR 遺伝子およびタンパク質の名称、出典 KIR Nomenclature report 2002 (Marshら、2002)

遺伝子記号	タンパク質 記号	別名
<i>KIR2DL1</i>	KIR2DL1	cl-42, nkat1, 47.11, p58.1, CD158a
<i>KIR2DL2</i>	KIR2DL2	cl-43, nkat6, CD158b1
<i>KIR2DL3</i>	KIR2DL3	cl-6, nkat2, nkat2a, nkat2b, p58, CD 158b2
<i>KIR2DL4</i>	KIR2DL4	103AS, 15.212, CD158d
<i>KIR2DL5A</i>	KIR2DL5A	KIR2DL5.1, CD158f
<i>KIR2DL5B</i>	KIR2DL5B	KIR2DL5.2, KIR2DL5.3, KIR2DL5.4
<i>KIR2DS1</i>	KIR2DS1	EB6ActI, EB6ActII, CD158h
<i>KIR2DS2</i>	KIR2DS2	cl-49, nkat5, 183ActI, CD158j
<i>KIR2DS3</i>	KIR2DS3	nkat7
<i>KIR2DS4</i>	KIR2DS4	cl-39, KKA3, nkat8, CD158i
<i>KIR2DS5</i>	KIR2DS5	nkat9, CD158g
<i>KIR2DP1</i>	KIR2DP1	KIRZ, KIRY, KIR15, KIR2DL6
<i>KIR3DL1</i>	KIR3DL1	cl-2, NKB1, cl-11, nkat3, NKB1B, AMB11, KIR, CD158e1
<i>KIR3DL2</i>	KIR3DL2	cl-5, nkat4, nkat4a, nkat4b, CD158k
<i>KIR3DL3</i>	KIR3DL3	KIRC1, KIR3DL7, KIR44, CD158z
<i>KIR3DS1</i>	KIR3DS1	nkat10, CD158e2
<i>KIR3DP1</i>	KIR3DP1	KIRX, KIR48, KIR2DS6, KIR3DS2P, CD158c

20

30

40

【0168】

【表 2】

Table 2. 各 KIR 遺伝子について現在周知である対立遺伝子およびそれらがコードする異なるタンパク質産物の数(IPD KIR database、<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir>)

遺伝子	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DS1	2DS2	2DS3
対立遺伝子	25	11	9	25	21	12	12	9
タンパク質	28	7	8	12	11	8	6	3
遺伝子	2DS4	2DS5	3DL1	3DS1	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1
対立遺伝子	20	12	52	14	45	55	5	8
タンパク質	13	9	46	12	40	31	0	0

10

【 0 1 6 9 】

【表 3】

Table 3. KIR およびそれらの同族リガンド(Carrington ら、2003; 中央 ton ら、2005; Du ら、2007)。他の KIR のリガンドは未知または不明である。

抑制 KIR	リガンド	活性 KIR	リガンド
2DL1	HLA-C 群 2、 アロタイプ Cw1、4、 5、6、17、18	2DS1	HLA-C 群 2、 アロタイプ Cw1、4、 5、6、17、18
2DL2 および 2DL3	HLA-C 群 1、 アロタイプ Cw1、3、 7、8、13、14	2DS2	HLA 群 1、 アロタイプ Cw1、3、 7、8、13、14
2DL4	HLA-G	2DS4	HLA-C
3DL1	HLA-B, Bw4	3DS1	HLA-B, Bw4
3DL2	HLA-A3 および A11 アロタイプ		

20

30

【 0 1 7 0 】

【表 5】

Table 5. プローブセット 1 のために設計および検査した KIR プローブ 17 個。全長 MLPA プローブの大きさおよび個々のプローブ部分の大きさおよび使用した濃度をこの表に列挙する。

符号	プローブ	大きさ [bp]	プローブ部分	大きさ [bp]	濃度 (fmol)
420A	2DL2	96	左	48	1
420B			右	48	
512A	3DL3	100	左	50	1
512B			右	50	
540A	2DS3	108	左	54	10
540B			右	54	
404A	3DL2	112	左	56	1
404B			右	56	
405A	2DP1	121	左	65	1
405B			右	56	
406A	3DP1	125	左	66	1
406B			右	59	
504A	2DS4	137	左	61	1
504B			右	76	
408A	2DL5	142	左	57	1
408B			中央	32	
408C			右	53	
514A	3DL1	149	左	74	1
514B			右	75	
526A	2DS2	154	左	57	1
526B			中央	34	
526C			右	63	
507A	2DL5A	165	左	66	1
507B			中央	32	
507C			右	67	
419A	2DL4	170	左	59	1
419B			中央	54	
419C			右	57	
528A	2DS5	185	左	67	1
528B			中央	47	
528C			右	71	
413A	2DL1	189	左	72	1
413B			中央	64	
413C			右	53	
416A	2DS1	195	左	78	10
416B			中央	67	
416C			右	50	
415A	2DL3	213	左	75	10
415B			中央	69	
415C			右	69	
418A	3DS1	218	左	81	10
418B			中央	64	
418C			右	73	

【表 6】

Table 6. プローブセット 2 のために設計および検査した KIR プローブ 17 個。全長 MLPA プローブの大きさおよび個々のプローブ部分の大きさおよび使用した濃度をこの表に列挙する。

符号	プローブ	大きさ [bp]	プローブ部分	大きさ [bp]	濃度 (fmol)
543A	2DS1	96	左	48	10
543B			右	48	
544A	2DS2	100	左	50	1
544B			右	50	
537A	2DL5	108	左	54	1
537B			右	54	
513D	2DS3	112	左	52	10
513B			右	60	
518A	3DP1	121	左	61	1
518B			右	60	
542A	2DP1	125	左	60	1
542B			右	65	
541A	3DS1	134	左	67	10
541B			右	67	
524A	2DS4	137	左	66	10
524B			右	71	
545A	2DS5	144	左	68	10
545B			右	76	
409A	3DL1	149	左	60	10
409B			中央	34	
409C			右	55	
506A	3DL3	154	左	54	10
506B			中央	48	
506C			右	52	
507A	2DL5A	165	左	66	1
507B			中央	32	
507C			右	67	
539A	2DL2	170	左	60	1
539B			中央	46	
539C			右	64	
525A	2DL1	190	左	64	10
525B			中央	62	
525C			右	64	
538A	3DL2r	195	左	70	1
538B			中央	60	
538C			右	65	
417A	2DL3	213	左	75	10
417B			中央	69	
417C			右	69	
517A	2DL4	218	左	73	10
517B			中央	68	
517C			右	77	

【表 7】

Table 7. 2 個のプローブセットにおいて使用した対照プローブ。全長 MLPA プローブの大きさおよび個々のプローブ部分の大きさおよびプローブセットに使用した濃度をこの表に列挙する。

符号	プローブ (遺伝子)	大きさ [bp]	プローブ部分	大きさ [bp]	濃度 (fmol)
201	Ctrl 2 (FGF3)	92	左	45	1
			右	47	
202	Ctrl 3 (BCAS4)	104	左	52	1
			右	52	
203	Ctrl 4 (LMNA)	116	左	58	1
			右	58	
204	Ctrl 5 (PARK2)	130	左	44	3
			中央	41	
			右	45	
205	Ctrl 7 (MSH6)	160	左	59	1
			中央	42	
			右	59	
206	Ctrl 8 (GALT)	175	左	58	1
			中央	59	
			右	58	
207	Ctrl 9 (SPG4)	180	左	60	1
			中央	60	
			右	60	
210	Ctrl 1 (IL-4)	208	左	73	1
			中央	69	
			右	66	
209	Ctrl 10 (NF2)	223	左	78	1
			中央	69	
			右	76	

【 0 1 7 4 】

【表 8】

Table 8. 対照プローブの競合物。競合物の大きさ、使用した対照プローブの部分およびプローブセットに使用した濃度をこの表に列挙する。

符号	遺伝子	長さ [bp]	プローブ部分	濃度 (fmol)
201X	Ctrl 2 (FGF3)	30	左	10
202X	Ctrl 3 (BCAS4)	30	左	10
203X	Ctrl 4 (LMNA)	30	左	3
205X	Ctrl 7 (MSH6)	50	左	0
207X	Ctrl 9 (SPG4)	50	左	1

【 0 1 7 5 】

【表 9】

Table 9. コーカサス人種集団における KIR 遺伝子頻度。頻度は、コーカサス人種集団において世界的に実施されたいくつかの研究に由来し、www.allelfrequencies.net で入手できる。

<i>KIR2DL1</i>	<i>KIR2DL2</i>	<i>KIR2DL3</i>	<i>KIR2DL4</i>	<i>KIR2DL5</i>	<i>KIR2DS1</i>	<i>KIR2DS2</i>	<i>KIR2DS3</i>
88-100%	39-63%	57-94%	100%	36-61%	27-49%	25-63%	19-42%

<i>KIR2DS4</i>	<i>KIR2DS5</i>	<i>KIR3DL1</i>	<i>KIR3DL2</i>	<i>KIR3DL3</i>	<i>KIR3DS1</i>	<i>KIR2DP1</i>	<i>KIR3DP1</i>
87-98%	21-46%	76-98%	99-100%	99-100%	26-50%	94-100%	97-100%

10

【 0 1 7 6 】

【表 10 A】

Table 10. プローブによって検出された KIR 対立遺伝子および、プローブセット 1 および 2 による全 KIR 対立遺伝子の適用範囲(3DP1v を除く) (図 3A および 3B に記載のとおり)。3DP1v を含むすべての KIR 対立遺伝子も伸長されたプローブセット 1 および 2 によって検出される (図 3C および 3D に記載のとおり)。100%より低い適用範囲は、プローブが結合する標的配列中に存在する遺伝子変異体によって生じる。プローブによって検出できる本表に示す対立遺伝子は、プライマーまたは IPD KIR データベースのプローブ blast ツールで作製される。プローブによって網羅されうる全 KIR 対立遺伝子の百分率は、各プローブについての対立遺伝子の数をウェブサイトで報告されている全対立遺伝子の数で割ることによって算出される。標的配列中に存在する遺伝子変異体のために両方のプローブセットでの適用範囲が 100%ではない場合に、その対立遺伝子に下線を付ける。

10

プローブセット 1				プローブセット 2				プローブ セット 1+2
プロ ーブ	対立遺伝子		適用 範囲	プロ ーブ	対立遺伝子		適用 範囲	適用範囲
2DL1	2DL1*001 2DL1*002 2DL1*00301 2DL1*0030201 2DL1*0030202 2DL1*00303 2DL1*0040101 2DL1*0040102	2DL1*00402 2DL1*005 2DL1*006 2DL1*007 2DL1*008 2DL1*009 2DL1*010	100%	2DL1	2DL1*001 2DL1*002 2DL1*00301 2DL1*0030201 2DL1*0030202 2DL1*00303 2DL1*0040101 2DL1*0040102	2DL1*00402 2DL1*005 2DL1*006 2DL1*007 2DL1*008 2DL1*009 2DL1*010	100%	100%
2DL2	2DL2*001 2DL2*002 2DL2*003	2DL2*004 2DL2*005	100%	2DL2	2DL2*001 2DL2*002	2DL2*003 2DL2*005	80%	100%
2DL3	2DL3*001 2DL3*002 2DL3*003	2DL3*004 2DL3*005 2DL3*006	86%	2DL3	2DL3*001 2DL3*002 2DL3*003 2DL3*004	2DL3*005 2DL3*006 2DL3*007	100%	100%
2DL4	2DL4*00101 2DL4*00102 2DL4*00105 2DL4*00201 2DL4*00202 2DL4*003 2DL4*004	2DL4*00501 2DL4*00601 2DL4*00602 2DL4*007 2DL4*0080101 2DL4*0080102 2DL4*0080103 2DL4*0080104 2DL4*0080201 2DL4*0080202 2DL4*0080203 2DL4*009 2DL4*010 2DL4*011	54%	2DL4	2DL4*00101 2DL4*00102 2DL4*0010301 2DL4*0010302 2DL4*00104 2DL4*00105 2DL4*00201 2DL4*00202 2DL4*00203 2DL4*003 2DL4*004 2DL4*00501 2DL4*00502	2DL4*00601 2DL4*00602 2DL4*007 2DL4*0080101 2DL4*0080102 2DL4*0080103 2DL4*0080104 2DL4*0080201 2DL4*0080202 2DL4*009 2DL4*010 2DL4*011 2DL4*012	100%	100%
2DL5	2DL5A*0010101 2DL5A*0010102 2DL5A*0050101 2DL5A*0050102 2DL5B*0020101 2DL5B*0020102 2DL5B*0020103	2DL5B*003 2DL5B*004 2DL5B*00601 2DL5B*007 2DL5B*00801 2DL5B*009	100%	2DL5	2DL5A*0010101 2DL5A*0010102 2DL5B*003 2DL5B*004	2DL5B*00601 2DL5B*007 2DL5B*00801	54%	100%
2DL5A	2DL5A*0010101 2DL5A*0010102	2DL5A*0050101 2DL5A*0050102	100%	2DL5A	プローブセット 1 と同じプローブ		100%	100%
	3DP1*004 3DP1v		14%					

20

30

40

【表 10B】

プローブセット 1				プローブセット 2				プローブ セット 1+2
プロー ブ	対立遺伝子	適用範 囲		プロー ブ	対立遺伝子	適用 範囲		適用範囲
2DS1	KIR データベースにマッチは見出されなかつた。BLAST は KIR2DS1v 別名 KIR2DS1*002 にマッチを生じた。			2DS1	KIR データベースにマッチは見出されなかつた。イントロン 6 について設計されたプローブ。			
2DS2	2DS2*0010101	2DS2*002	90%	2DS2	KIR データベースにマッチは見出されなかつた。イントロン 2 および 3 について設計されたプローブ。			90%
	2DS2*0010102	2DS2*003						
	2DS2*0010103	2DS2*004						
	2DS2*00102	2DS2*005						
	2DS2*00103							
2DS3	2DS3*00101	2DS3*002	100%	2DS3	2DS3*00101	2DS3*002	100%	100%
	2DS3*00102	2DS3*003N			2DS3*00102	2DS3*003N		
	2DS3*00103	2DS3*004			2DS3*00103	2DS3*004		
	2DS3*00104				2DS3*00104			
2DS4	2DS4*0010101	2DS4*003	100%	2DS4	2DS4*0010101	2DS4*003	80%	100%
	2DS4*0010102	2DS4*004			2DS4*0010102	2DS4*006		
	2DS4*0010103	2DS4*006			2DS4*0010103	2DS4*007		
	2DS4*00102	2DS4*007			2DS4*00102	2DS4*009		
	2DS4*00103	2DS4*009						
2DS5	2DS5*001	2DS5*004	100%	2DS5	2DS5*001	2DS5*004	100%	100%
	2DS5*0020101	2DS5*005			2DS5*0020101	2DS5*005		
	2DS5*0020102	2DS5*006			2DS5*0020102	2DS5*006		
	2DS5*0020103	2DS5*007			2DS5*0020103	2DS5*007		
	2DS5*003	2DS5*008			2DS5*003	2DS5*008		
3DL1	3DL1*00101	3DL1*027	78%	3DL1	3DL1*00101	3DL1*021	41%	88%
	3DL1*00102	3DL1*028			3DL1*002	3DL1*022		
	3DL1*002	3DL1*029			3DL1*00401	3DL1*023		
	3DL1*00401	3DL1*030			3DL1*00402	3DL1*024N		
	3DL1*00402	3DL1*031			3DL1*00501	3DL1*025		
	3DL1*00501	3DL1*032			3DL1*00502	3DL1*026		
	3DL1*00502	3DL1*033			3DL1*006	3DL1*027		
	3DL1*007	3DL1*034			3DL1*007	3DL1*028		
	3DL1*008	3DL1*035			3DL1*008	3DL1*029		
	3DL1*009	3DL1*036			3DL1*009	3DL1*030		
	3DL1*01501	3DL1*037						
	3DL1*01502	3DL1*038						
	3DL1*016	3DL1*039						
	3DL1*01701	3DL1*040						
	3DL1*01702	3DL1*041						
	3DL1*018	3DL1*042						
	3DL1*024N	3DL1*043						
	3DL1*025	3DL1*044						
	3DL1*026	3DL1*057						
3DL2	3DL2*00101	3DL2*00902	47%	3DL2	3DL2*00101	3DL2*010	45%	61%
	3DL2*002	3DL2*013			3DL2*002	3DL2*011		
	3DL2*00301	3DL2*014			3DL2*00301	3DL2*012		
	3DL2*004	3DL2*016			3DL2*004	3DL2*013		
	3DL2*005	3DL2*017			3DL2*005	3DL2*015		
	3DL2*0070101	3DL2*018			3DL2*006	3DL2*016		
	3DL2*0070102	3DL2*019			3DL2*0070101	3DL2*020		
	3DL2*008	3DL2*020			3DL2*0070102	3DL2*021		
	3DL2*00901	3DL2*021			3DL2*008			

10

20

30

40

【 0 1 7 8 】

【表 10C】

プローブセット 1				プローブセット 2				プローブ セット 1+2
プロー ブ	対立遺伝子		適用範 囲	プロー ブ	対立遺伝子		適用 範囲	適用範囲
3DL3	3DL3*00101	3DL3*01102	75%	3DL3	3DL3*00101	3DL3*01303	100%	100%
	3DL3*00102	3DL3*012			3DL3*00102	3DL3*01304		
	3DL3*00103	3DL3*01301			3DL3*00103	3DL3*01305		
	3DL3*00201	3DL3*01303			3DL3*00201	3DL3*01306		
	3DL3*00203	3DL3*01304			3DL3*00202	3DL3*01307		
	3DL3*00204	3DL3*01401			3DL3*00203	3DL3*01401		
	3DL3*00205	3DL3*01403			3DL3*00204	3DL3*01402		
	3DL3*00207	3DL3*01405			3DL3*00205	3DL3*01403		
	3DL3*0030101	3DL3*015			3DL3*00206	3DL3*01404		
	3DL3*0030102	3DL3*016			3DL3*00207	3DL3*01405		
	3DL3*00401	3DL3*017			3DL3*0030101	3DL3*015		
	3DL3*00402	3DL3*018			3DL3*0030102	3DL3*016		
	3DL3*005	3DL3*020			3DL3*00401	3DL3*017		
	3DL3*00601	3DL3*021			3DL3*00402	3DL3*018		
	3DL3*00602	3DL3*022			3DL3*005	3DL3*019		
	3DL3*00801	3DL3*023			3DL3*00601	3DL3*020		
	3DL3*00802	3DL3*024			3DL3*00602	3DL3*021		
	3DL3*00901	3DL3*025			3DL3*007	3DL3*022		
	3DL3*00902	3DL3*026			3DL3*00801	3DL3*023		
	3DL3*010	3DL3*028			3DL3*00802	3DL3*024		
3DL3*01101		3DL3*00901	3DL3*025					
		3DL3*00902	3DL3*026					
		3DL3*010	3DL3*027					
		3DL3*01101	3DL3*028					
		3DL3*01102	3DL3*029					
		3DL3*012	3DL3*030					
		3DL3*01301	3DL3*031					
		3DL3*01302						
3DS1	3DS1*010	3DS1*046	71%	3DS1	3DS1*010	3DS1*045	71%	86%
	3DS1*01301	3DS1*047			<u>3DS1*011</u>	3DS1*046		
	3DS1*01302	3DS1*048			<u>3DS1*012</u>	3DS1*047		
	<u>3DS1*014</u>	3DS1*049N			3DS1*01301	3DS1*048		
	3DS1*045	<u>3DS1*055</u>			3DS1*01302	3DS1*049N		
2DP1	2DP1*00101	2DP1*0020102	100%	2DP1	2DP1*00101	2DP1*0020102	100%	100%
	2DP1*00102	2DP1*003			2DP1*00102	2DP1*003		
	2DP1*0020101				2DP1*0020101			
3DP1	3DP1*001	3DP1*004	100%	3DP1	KIR データベースにマッチは見出されなかつた。エキソン 2 の欠損を検出。		100%	
	3DP1*002	3DP1*005						
	3DP1*00301	3DP1*006						
	3DP1*00302							

10

20

30

【 0 1 7 9 】

【表 1 1】

Table 11. 10th IHW によって KIR 遺伝子型判定された細胞系 11 個での KIR MLPA プロブセット 1 の検証

10th IHW によって KIR 遺伝子型判定された細胞系、プロブセット 1 の結果

符号	名称	2D	2D	2D	2D	2D	2D	2D	2D	2D	2D	20	3D	3D	3D	3D	2D	3D
		L1	L2	L3	L4	L5	L5	S1	S2	S3	S4	S5	L1	L2	L3	S1	P1	P1
231	JVM	1	1	1	1	0	4	0	1	0	1	0	1	1	4	0	4	4
240	T7507	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	0	1	1	4	1	4	4
343	OLGA	1	0	1	1	1	4	1	2	0	1	1	1	1	4	1	4	4
423	SAVC	1	0	1	1	0	4	0	2	0	1	0	1	1	4	0	4	4
712	JBUSH	1	0	1	1	0	4	0	2	0	1	0	1	1	4	0	4	4
723	BM16	1	0	1	1	0	4	0	2	0	1	0	1	1	4	0	4	4
773	LBUF	1	1	2	1	3	4	3	1	3	1	3	1	1	4	3	4	4
931	AMALA	1	1	1	1	1	4	1	1	0	1	1	1	1	4	1	4	4
1042	BM90	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	4	1	4	4
1102	TAB089	1	0	1	1	0	4	0	2	0	1	0	1	1	4	0	4	4
122	KAS116	1	0	1	1	0	4	0	2	0	1	0	1	1	4	0	4	4

10

20

0=MLPA および 10th IHW によって陰性
 1=MPLA および 10th IHW によって陽性
 2=MLPA によって陽性かつ 10th IHW によって陰性
 3=MLPA によって陰性かつ 10th IHW によって陽性
 4=10th IHW によって判定されなかったが MLPA によって陽性

2カ所の研究所において陰性だが 1カ所において陽性に判定

【 0 1 8 0 】

30

【表 1 2】

Table 12. PCR-SSP で KIR 判定された試料 5 個での KIR MLPA プロブセット 1 の検証

PCR-SSP KIR 判定 DNA、プロブセット 1 の結果

試料	2D	2D	2D	2D	2D	2D	2D	2D	2D	2D	2D	3D	3D	3D	3D	2D	3D
	L1	L2	L3	L4	L5	L5	S1	S2	S3	S4	S5	L1	L2	L3	S1	P1	P1
33_7536	1	0	1	1	1	3	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
33_8025	1	0	1	1	0	3	0	2	0	1	0	1	1	1	0	1	1
33_8037	1	0	1	1	1	3	1	2	0	1	1	1	1	1	1	1	1
33_8588	0	1	0	1	0	3	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1
33_9097	1	1	0	1	1	3	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1

40

0=MLPA および SSP によって陰性
 1=MPLA および SSP によって陽性
 2=MLPA によって陽性かつ SSP によって陰性
 3=MLPA によって陽性かつ SSP によって判定されなかった

【 0 1 8 1 】

50

【表 1 3】

Table 13. 10th IHW によって KIR 遺伝子型判定された細胞系 11 個での KIR MLPA プローブセット 2 の検証

10th IHW によって KIR 遺伝子型判定された細胞系、プローブセット 2 の結果

符号	名称	2D	2D	2D	2D	2D	2D	2D	2D	2D	2D	3D	3D	3D	3D	2D	3D	
		L1	L2	L3	L4	L5	L5	S1	S2	S3	S4	S5	L1	L2	L3	S1	P1	P1
231	JVM	1	1	1	1	0	4	0	1	0	1	2	1	1	4	2	4	4
240	T7507	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	2	1	1	4	1	4	4
343	OLGA	1	0	1	1	1	4	1	0	0	1	2	1	1	4	1	4	4
423	SAVC	1	0	1	1	0	4	0	0	0	1	2	1	1	4	2	4	4
712	JBUSH	1	0	1	1	0	4	0	0	0	1	2	1	1	4	2	4	4
723	BM16	1	0	1	1	0	4	2	0	0	1	2	1	1	4	2	4	4
773	LBUF	1	1	2	1	3	4	1	1	3	1	1	1	1	4	1	4	4
931	AMALA	1	1	1	1	1	4	1	1	0	1	1	1	1	4	1	4	4
1042	BM90	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1	1	4	1	4	4
1102	TAB089	1	0	1	1	0	4	2	0	0	1	2	1	1	4	2	4	4
122	KAS116	1	0	1	1	0	4	2	0	0	1	2	1	1	4	2	4	4

10

0=MLPA および 10th IHW によって陰性

1=MPLA および 10th IHW によって陽性

2=MLPA によって陽性かつ 10th IHW によって陰性

3=MLPA によって陰性かつ 10th IHW によって陽性

4=10th IHW によって判定されなかったが MLPA によって陽性

20

2カ所の研究所において陰性だが 1カ所において陽性に判定

【 0 1 8 2】

【表 1 4】

Table 14. PCR-SSP で KIR 判定された試料 5 個での KIR MLPA プローブセット 2 の検証

30

PCR-SSP KIR 判定患者、プローブセット 2 の結果

試料	2D	2D	2D	2D	2D	2D	2D	2D	2D	2D	2D	3D	3D	3D	3D	2D	3D
	L1	L2	L3	L4	L5	L5	S1	S2	S3	S4	S5	L1	L2	L3	S1	P1	P1
33_7536	1	0	1	1	1	4	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
33_8025	1	0	1	1	0	4	0	0	0	1	2	1	1	1	2	1	1
33_8037	1	0	1	1	1	4	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
33_8588	2	1	0	1	0	4	0	1	0	1	2	1	1	1	2	0	3
33_9097	1	1	0	1	1	4	1	1	1	0	1	2	1	1	1	1	1

40

0=MLPA および SSP によって陰性

1=MPLA および SSP によって陽性

2=MLPA によって陽性かつ SSP によって陰性

3=MLPA によって陰性かつ SSP によって陽性

4=MLPA によって陽性、SSP によって判定されなかった

(参考文献)

References

Brown MA. Genetics and the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol.* 2009; 21:318-23.

Carrington M, Norman P. The KIR gene cluster 2003

Chan AT, Kollnberger SD, Wedderburn LR, Bowness P. Expansion and enhanced survival of natural killer cells expressing the killer immunoglobulin-like receptor KIR3DL2 in spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* 2005;52:3586-95.

10

Cook MA, Norman PJ, Curran MD, Maxwell LD, Briggs DC, Middleton D, Vaughan RW. A multi-laboratory characterization of the KIR genotypes of the 10th International Histocompatibility Workshop cell lines. *Human Immunology* 2003: 64, 567-571

Crum KA, Logue S.E, Curran MD, Middleton D. Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoire. *Tissue Antigens* 2000: 56: 313-326.

20

Du Z, Gjertson DW, Reed EF, Rajalingam R. Receptor-ligand analyses define minimal killer cell Ig-like receptor (KIR) in humans. *Immunogenetics* 2007;59:1-15

Gomez-Lozano N, Gardiner CM, Parham P, Vilches C. Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. *Immunogenetics* 2002: 54 (5): 314-9

30

Gómez-Lozano N, Estefanía E, Williams F, Halfpenny I, Middleton D, Solís R, Vilches C. The silent KIR3DP1 gene (CD158c) is transcribed and might encode a secreted receptor in a minority of humans, in whom the KIR3DP1, KIR2DL4 and KIR3DL1/KIR3DS1 genes are duplicated. *European Journal Immunology* 2005: 35(1):16-24

40

Hollenbach JA, Ladner MB, Saeteurn K, Taylor KD, Mei L, Haritunians T, McGovern DPB, Erlich HA, Rotter JI, Trachtenberg EA. Susceptibility to Crohn's disease is mediated by *KIR2DL2/KIR2DL3* heterozygosity and the HLA-C ligand. *Immunogenetics* 2009; 61(10): 663-671

Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ, Dupont B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *Journal of Immunology* 2002; 1; 169(9):5118-29

10

Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev.* 2002 Dec;190:40-52.

Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004; 305: 872-4.

20

Li H, Pascal V, Martin MP, Carrington M, Anderson SK. Genetic control of variegated KIR gene expression: polymorphisms of the bi-directional KIR3DL1 promoter are associated with distinct frequencies of gene expression. *PLoS Genet.* 2008 Nov;4(11):e1000254.

Majorczyk E, Pawlik A, Łuszczek W, Nowak I, Wiśniewski A, Jasek M, Kuśnierczyk P. Associations of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with complications of rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 2007; 8:678-83.

30

Marsh S, Parham P, Dupont B, Geraghty D, Trowsdale J, Middleton D, Vilches C, Carrington M, Witt C, Guethlein L, Shilling H, Garcia C, Hsu K, Wain H. Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) Nomenclature Report. *Human Immunology* 2002; 64, 648-654.

Martin MP, Qi Y, Gao X, Yamada E, Martin JN, Pereyra F, et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet* 2007; 39:733-40.

Middleton D, Williams F, Halfpenny IA. KIR genes. *Transplant Immunology* 2005; 14(3-4):135-42

Parham P, McQueen KL. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nature reviews Immunology* 3 2003: doi: 10.1038/nri999

10

Shilling HG, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Rodriguez R, Tyán D, Parham P. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *Journal of Immunology* 2002; 1:168(5):2307-15

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acid Research*. 2002; 15:30(12):e57

20

Sun JY, Gaidulis L, Miller MM, Goto RM, Rodriguez R, Forman SJ, Senitzer D. Development of a multiplex PCR-SSP method for Killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping. *Tissue Antigens* 2004; 64: 462-468.

Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart CA, Beck S, Wilson MJ. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. 2001. *Immunological Reviews* volume 181: 20-38

30

Urhberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, Tyán D, Lanier LL, Parham P. *Immunity* volume 1997: 7, 753-763

Uhrberg M. The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. *European Journal of Immunology* 2005; 35:10-15

Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annual Reviews Immunology* 2002; 20:217-51

Vilches C, Castano J, Gomez-Lozano N, Estefania E. facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments. 2007. *Tissue Antigens* 70, 415-422.

Williams F, Maxwell LD, Halfpenny IA, Meenagh A, Sleator C, Curran MD, Middleton D. Multiple copies of KIR 3DL/S1 and KIR 2DL4 genes identified in a number of individuals. *Human Immunology* 2003; 64, 729-732.

10

Yen JH, Moore BE, Nakajima T, Scholl D, Schaid DJ, Weyand CM, Goronzy JJ. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med.* 2001; 193:1159-67.

20

Zhang Y, Wang B, Shihui Y, Liu S, Liu M, Shen C, Teng Y, Qi J. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene polymorphisms in patients with leukemia: Possible association with susceptibility to the disease. *Leuk Res* 2009, doi10.1016/j.leukres.2009.04.022.

【 図 1 A 1 】

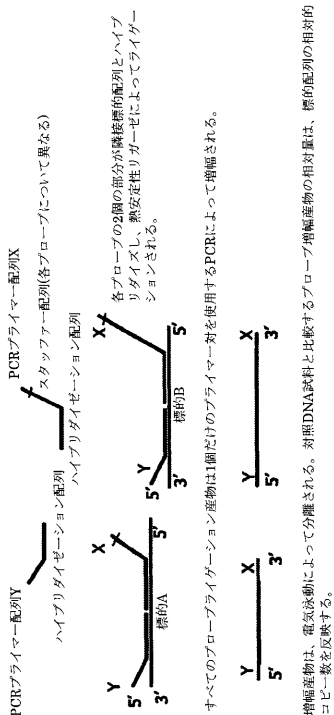


Fig. 1A

【 図 1 A 2 】

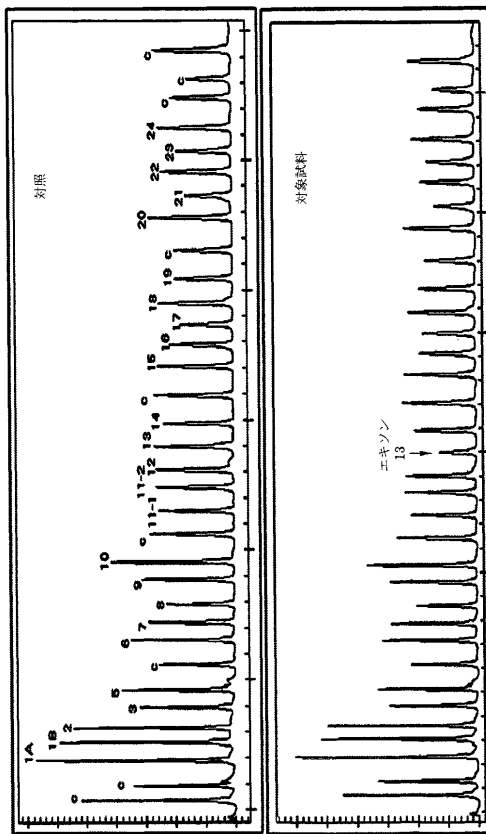


Fig. 1A, contd.

【 図 1 B 】

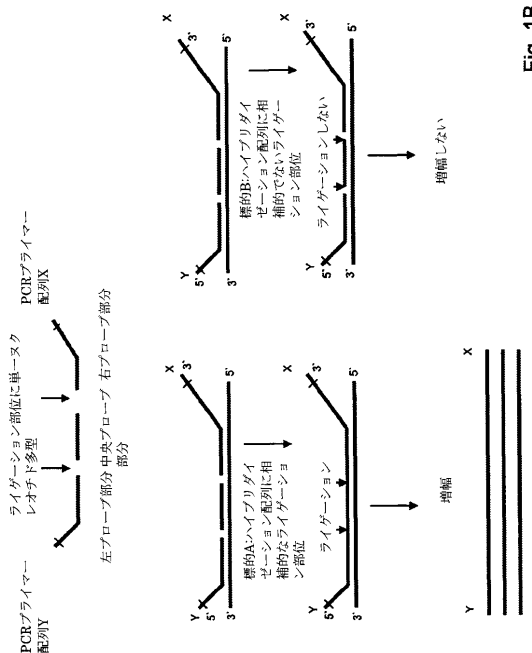


Fig. 1B

【 図 1 C 】

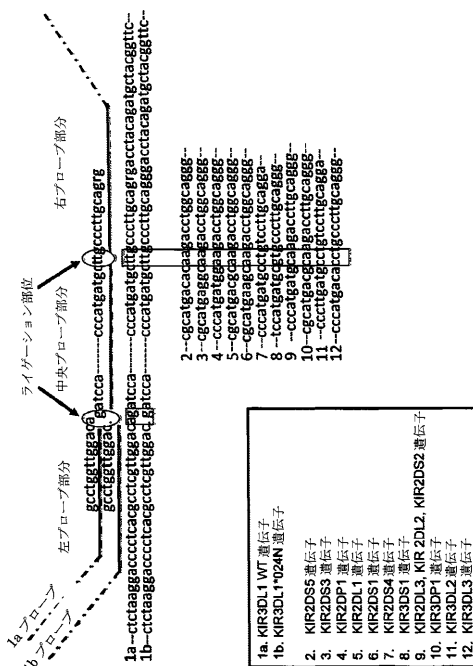


Fig. 1C

【 3 C 4 】

41B	A	30S1	左	81	219	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
41B <td>B <td>30S1 <td>中央</td> <td>64</td> <td>219 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td>	B <td>30S1 <td>中央</td> <td>64</td> <td>219 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td>	30S1 <td>中央</td> <td>64</td> <td>219 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td>	中央	64	219 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
41B <td>D <td>30S1 <td>左</td> <td>74</td> <td>219 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td>	D <td>30S1 <td>左</td> <td>74</td> <td>219 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td>	30S1 <td>左</td> <td>74</td> <td>219 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td>	左	74	219 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
50A <td>A <td>20S4 <td>左</td> <td>61 <td>137 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td></td>	A <td>20S4 <td>左</td> <td>61 <td>137 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td>	20S4 <td>左</td> <td>61 <td>137 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td>	左	61 <td>137 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td>	137 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
50A <td>B <td>20S4 <td>右</td> <td>75 <td>137 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td></td>	B <td>20S4 <td>右</td> <td>75 <td>137 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td>	20S4 <td>右</td> <td>75 <td>137 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td>	右	75 <td>137 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td>	137 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
416 <td>A <td>20S1 <td>左</td> <td>78 <td>195 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td></td>	A <td>20S1 <td>左</td> <td>78 <td>195 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td>	20S1 <td>左</td> <td>78 <td>195 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td>	左	78 <td>195 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td>	195 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
416 <td>B <td>20S1 <td>中央</td> <td>67 <td>195 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td></td>	B <td>20S1 <td>中央</td> <td>67 <td>195 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td>	20S1 <td>中央</td> <td>67 <td>195 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td>	中央	67 <td>195 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td>	195 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
416 <td>C <td>20S1 <td>右</td> <td>50 <td>195 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td></td>	C <td>20S1 <td>右</td> <td>50 <td>195 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td>	20S1 <td>右</td> <td>50 <td>195 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td>	右	50 <td>195 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td>	195 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
40A <td>A <td>30L2 <td>左</td> <td>55 <td>111 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td></td>	A <td>30L2 <td>左</td> <td>55 <td>111 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td>	30L2 <td>左</td> <td>55 <td>111 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td>	左	55 <td>111 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td>	111 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
40A <td>B <td>30L2 <td>右</td> <td>56 <td>111 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td></td>	B <td>30L2 <td>右</td> <td>56 <td>111 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td>	30L2 <td>右</td> <td>56 <td>111 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td>	右	56 <td>111 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td>	111 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA

Fig. 3C, contd.

【 3 D 1 】

プロンプト	番号	順位	プロンプト	中央	プロンプト	全長	5'プロンプト
506	A	30L3	左	54	154	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
506	D	30L3	中央	48	154	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
506	C	30L3	右	62	154	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
417 <td>A <td>20L3 <td>左 <td>75 <td>214 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td></td></td>	A <td>20L3 <td>左 <td>75 <td>214 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td></td>	20L3 <td>左 <td>75 <td>214 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td>	左 <td>75 <td>214 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td>	75 <td>214 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td>	214 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
417 <td>B <td>20L3 <td>中央 <td>89 <td>214 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td></td></td>	B <td>20L3 <td>中央 <td>89 <td>214 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td></td>	20L3 <td>中央 <td>89 <td>214 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td>	中央 <td>89 <td>214 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td>	89 <td>214 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td>	214 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
417 <td>C <td>20L3 <td>右 <td>70 <td>214 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td></td></td>	C <td>20L3 <td>右 <td>70 <td>214 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td></td>	20L3 <td>右 <td>70 <td>214 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td>	右 <td>70 <td>214 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td>	70 <td>214 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td>	214 <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
54A <td>A <td>20S2 <td>左 <td>50 <td>100</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td></td>	A <td>20S2 <td>左 <td>50 <td>100</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td>	20S2 <td>左 <td>50 <td>100</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td>	左 <td>50 <td>100</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td>	50 <td>100</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td>	100	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
54A <td>B <td>20S2 <td>右 <td>50 <td>100</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td></td>	B <td>20S2 <td>右 <td>50 <td>100</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td>	20S2 <td>右 <td>50 <td>100</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td>	右 <td>50 <td>100</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td>	50 <td>100</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td>	100	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
706 <td>A <td>20L2 <td>左 <td>74</td> <td>145</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td>	A <td>20L2 <td>左 <td>74</td> <td>145</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td>	20L2 <td>左 <td>74</td> <td>145</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td>	左 <td>74</td> <td>145</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td>	74	145	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
706 <td>B <td>20L2 <td>右 <td>71</td> <td>145</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td>	B <td>20L2 <td>右 <td>71</td> <td>145</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td>	20L2 <td>右 <td>71</td> <td>145</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td>	右 <td>71</td> <td>145</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td>	71	145	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
542 <td>A <td>20P1 <td>左 <td>60</td> <td>125</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td>	A <td>20P1 <td>左 <td>60</td> <td>125</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td>	20P1 <td>左 <td>60</td> <td>125</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td>	左 <td>60</td> <td>125</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td>	60	125	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
542 <td>B <td>20P1 <td>右 <td>65</td> <td>125</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td></td>	B <td>20P1 <td>右 <td>65</td> <td>125</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td></td>	20P1 <td>右 <td>65</td> <td>125</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> </td>	右 <td>65</td> <td>125</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td> <td>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</td>	65	125	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA

Fig. 3D

【 3 D 2 】

705	A	20L1	左	47	97	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
705 <td>B <td>20L1</td> <td>右 <td>50 <td>97 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td>	B <td>20L1</td> <td>右 <td>50 <td>97 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	20L1	右 <td>50 <td>97 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	50 <td>97 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	97 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
516 <td>A <td>30P1</td> <td>左 <td>61 <td>121 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td>	A <td>30P1</td> <td>左 <td>61 <td>121 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	30P1	左 <td>61 <td>121 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	61 <td>121 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	121 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
516 <td>B <td>30P1</td> <td>右 <td>60 <td>121 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td>	B <td>30P1</td> <td>右 <td>60 <td>121 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	30P1	右 <td>60 <td>121 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	60 <td>121 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	121 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
517 <td>A <td>20L4 <td>左 <td>73 <td>218 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td></td>	A <td>20L4 <td>左 <td>73 <td>218 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td>	20L4 <td>左 <td>73 <td>218 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	左 <td>73 <td>218 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	73 <td>218 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	218 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
517 <td>B <td>20L4 <td>中央</td> <td>68 <td>218 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td>	B <td>20L4 <td>中央</td> <td>68 <td>218 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	20L4 <td>中央</td> <td>68 <td>218 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	中央	68 <td>218 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	218 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
517 <td>C <td>20L4 <td>右 <td>77 <td>218 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td></td>	C <td>20L4 <td>右 <td>77 <td>218 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td>	20L4 <td>右 <td>77 <td>218 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	右 <td>77 <td>218 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	77 <td>218 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	218 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
409 <td>A <td>30L1 <td>左 <td>60 <td>150 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td></td>	A <td>30L1 <td>左 <td>60 <td>150 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td>	30L1 <td>左 <td>60 <td>150 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	左 <td>60 <td>150 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	60 <td>150 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	150 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
409 <td>B <td>30L1 <td>中央</td> <td>34 <td>150 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td>	B <td>30L1 <td>中央</td> <td>34 <td>150 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	30L1 <td>中央</td> <td>34 <td>150 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	中央	34 <td>150 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	150 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
409 <td>C <td>30L1 <td>右 <td>56 <td>150 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td></td>	C <td>30L1 <td>右 <td>56 <td>150 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td>	30L1 <td>右 <td>56 <td>150 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	右 <td>56 <td>150 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	56 <td>150 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	150 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
537 <td>C <td>20L5 <td>左 <td>54 <td>109 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td></td>	C <td>20L5 <td>左 <td>54 <td>109 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td>	20L5 <td>左 <td>54 <td>109 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	左 <td>54 <td>109 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	54 <td>109 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	109 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
537 <td>B <td>20L5 <td>右 <td>54 <td>109 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td></td>	B <td>20L5 <td>右 <td>54 <td>109 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td>	20L5 <td>右 <td>54 <td>109 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	右 <td>54 <td>109 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	54 <td>109 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	109 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA

Fig. 3D, contd.

【 3 D 3 】

507	A	20L5/30P1V	左	68	168	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
507 <td>B <td>20L5/30P1V</td> <td>中央</td> <td>32 <td>168 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	B <td>20L5/30P1V</td> <td>中央</td> <td>32 <td>168 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	20L5/30P1V	中央	32 <td>168 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	168 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
507 <td>C <td>20L5/30P1V</td> <td>右 <td>67 <td>168 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td>	C <td>20L5/30P1V</td> <td>右 <td>67 <td>168 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	20L5/30P1V	右 <td>67 <td>168 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	67 <td>168 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	168 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
710 <td>A <td>20L5b</td> <td>左 <td>80 <td>229 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td>	A <td>20L5b</td> <td>左 <td>80 <td>229 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	20L5b	左 <td>80 <td>229 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	80 <td>229 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	229 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
710 <td>B <td>20L5b</td> <td>中央</td> <td>79 <td>229 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	B <td>20L5b</td> <td>中央</td> <td>79 <td>229 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	20L5b	中央	79 <td>229 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	229 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
710 <td>C <td>20L5b</td> <td>右 <td>70 <td>229 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td>	C <td>20L5b</td> <td>右 <td>70 <td>229 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	20L5b	右 <td>70 <td>229 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	70 <td>229 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	229 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
513 <td>D <td>20S3</td> <td>左 <td>62 <td>112 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td>	D <td>20S3</td> <td>左 <td>62 <td>112 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	20S3	左 <td>62 <td>112 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	62 <td>112 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	112 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
513 <td>B <td>20S3</td> <td>右 <td>60 <td>112 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td>	B <td>20S3</td> <td>右 <td>60 <td>112 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	20S3	右 <td>60 <td>112 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	60 <td>112 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	112 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
707 <td>A <td>20S5</td> <td>左 <td>76 <td>141 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td>	A <td>20S5</td> <td>左 <td>76 <td>141 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	20S5	左 <td>76 <td>141 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	76 <td>141 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	141 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA
707 <td>C <td>20S5</td> <td>右 <td>65 <td>141 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td></td>	C <td>20S5</td> <td>右 <td>65 <td>141 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td></td>	20S5	右 <td>65 <td>141 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td></td>	65 <td>141 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th> </td>	141 <th>666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA</th>	666TTTCCCTAAAGGGTTTGGACTTGTTCATCAOAA

Fig. 3D, contd.

【 7 - 2 】

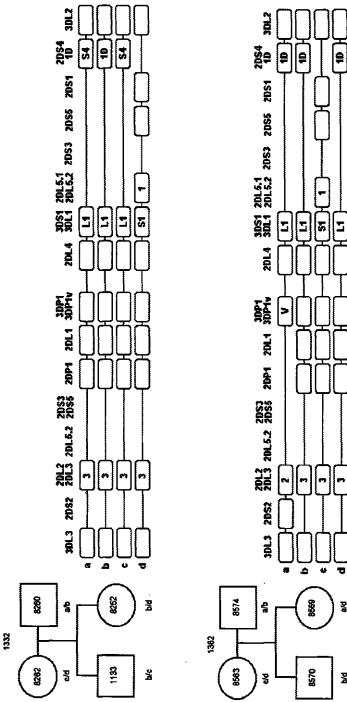


Fig. 7, cond.

【 7 - 3 】

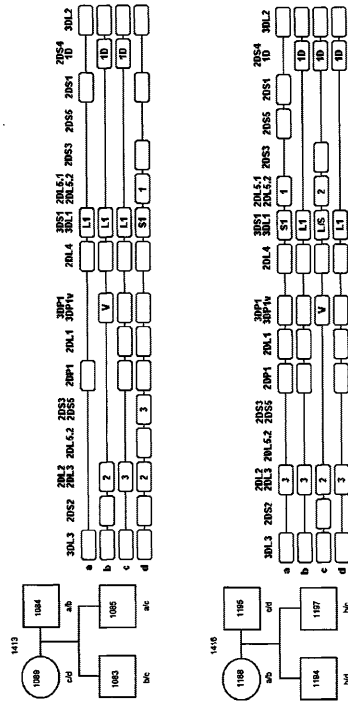


Fig. 7, cond.

【 6 】

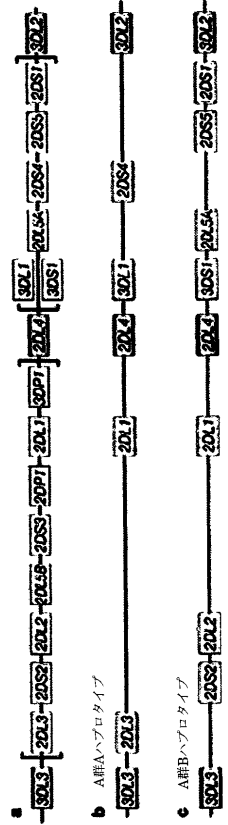


Fig. 6

【 7 - 1 】

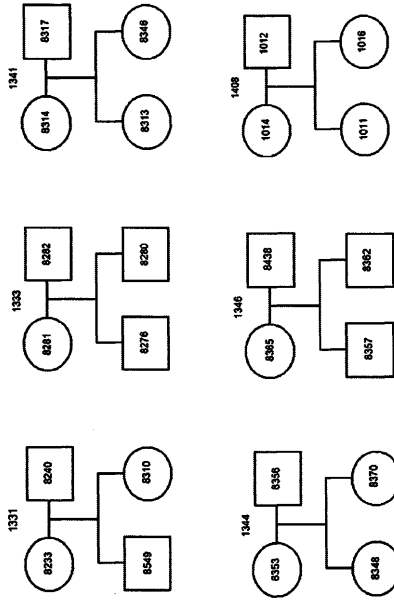


Fig. 7

【 8 】

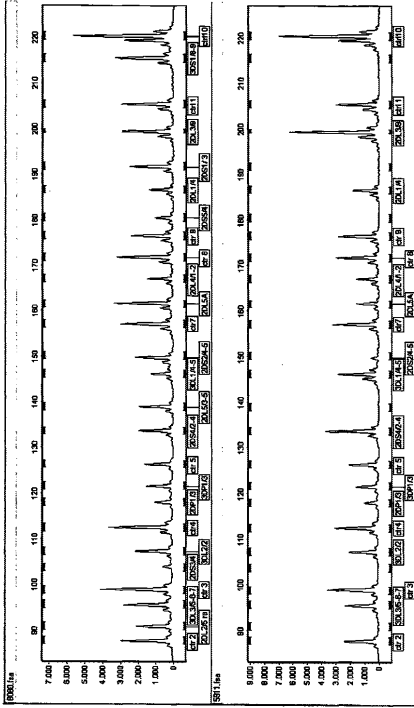


Fig. 8

【 9 - 1 】

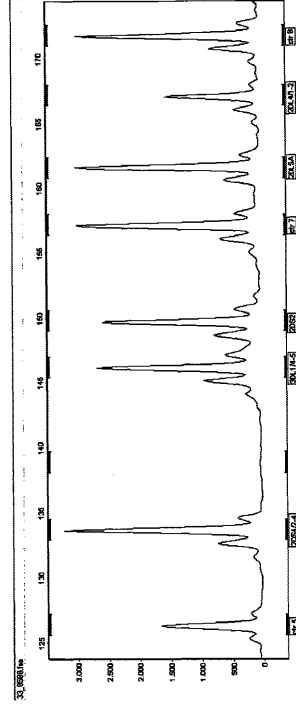


Fig. 9

【 9 - 2 】

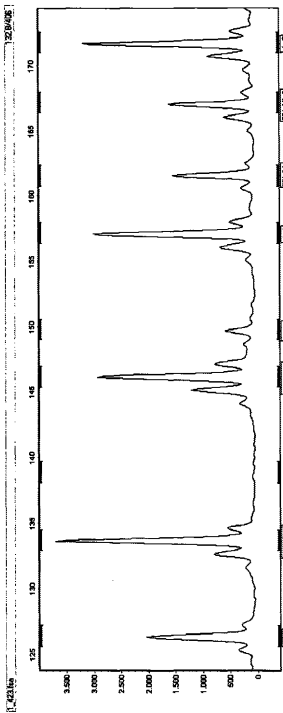


Fig. 9, cond.

【 10 - 1 】

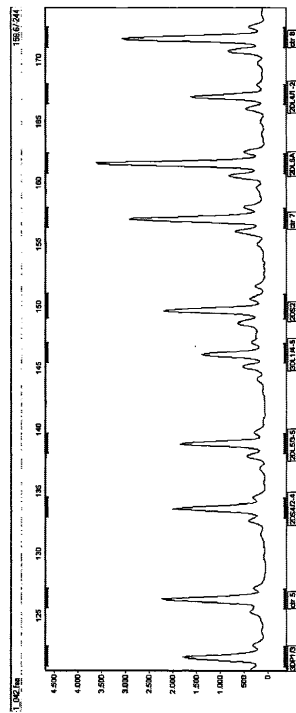


Fig. 10

【 10 - 2 】

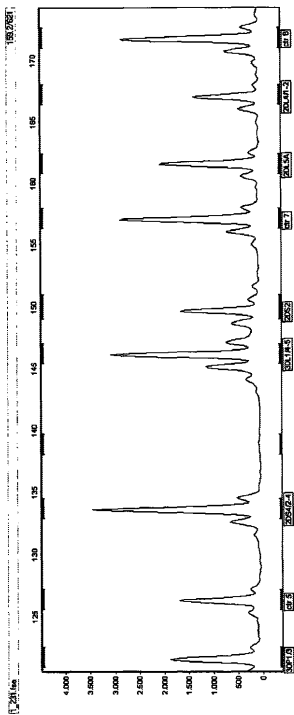


Fig. 10, cond.

【 11 A 】

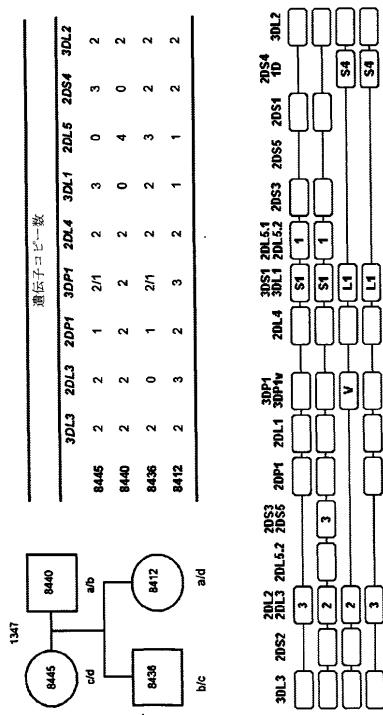


Fig. 11A

【 11 B 1 】

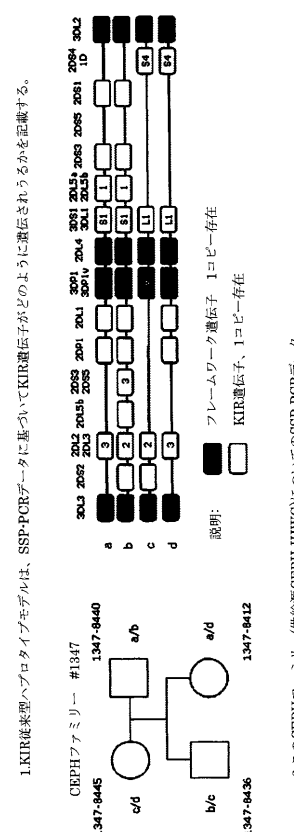


Fig. 11B1

【 11 B 3 - 1 】

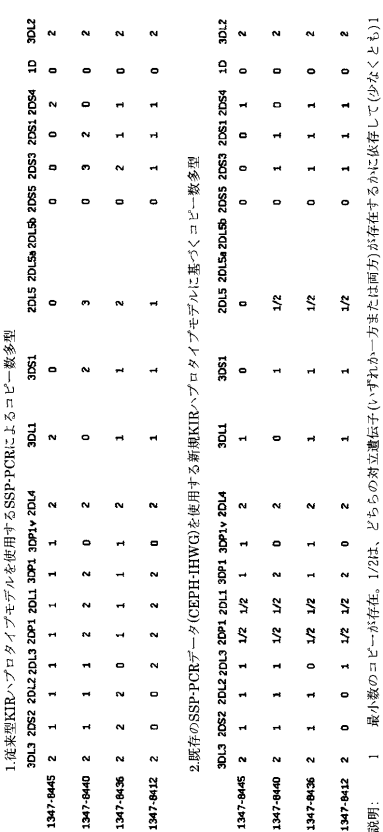


Fig. 11B3

【 ☒ 1 1 B 3 - 2 】

3.新たに伸長したKIRプロローブセット1および2を使用するKIR-MILPAによるコピー数多型

3D.L3	2D.S2*	2D.L2	2D.L3	2D.P1	2D.L1	3D.P1	3D.P1V	2D.L4	2D.U.N	3D.L1	3D.S1	3D.S1N	2D.L5	2D.L5B	2D.S5	2D.S3	2D.S1	2D.S4	2D.S4N	3D.L2	
1347-8445	2	1	1	1	1	2	1	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	2	0	2
1347-8440	2	1	1	1	2	2	0	2	0	0	0	2	0	4	0	2	2	0	0	0	2
1347-8436	2	1	1	0	1	1	2	1	2	0	1	0	1	2	0	1	2	1	2	1	0
1347-8432	2	0	0	2	2	2	2	0	2	0	0	1	1	0	2	0	1	2	1	0	2

Fig. 11B3, contd.

【 ☒ 1 2 B 1 】

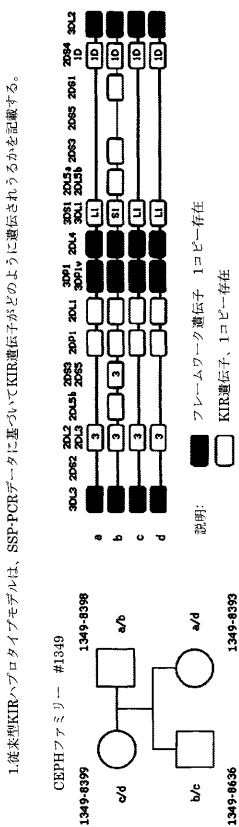


Fig. 12B1

2.このCEPHファミリー(単線源CEPH-IHWG)についてのSSP-PCRデータ

3D.L3	2D.S2	2D.L2	2D.L3	2D.P1	2D.L1	3D.P1	2D.L4	3D.S1	3D.L1	2D.L5	2D.S3	2D.S5	2D.S1	2D.S4	1D	3D.L2
1349-8399	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	0	0	+	+
1349-8398	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+
1349-8636	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	0	0	0	0	+	+
1349-8393	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+

0 KIR遺伝子不在、+ KIR遺伝子存在

【 ☒ 1 2 A 】

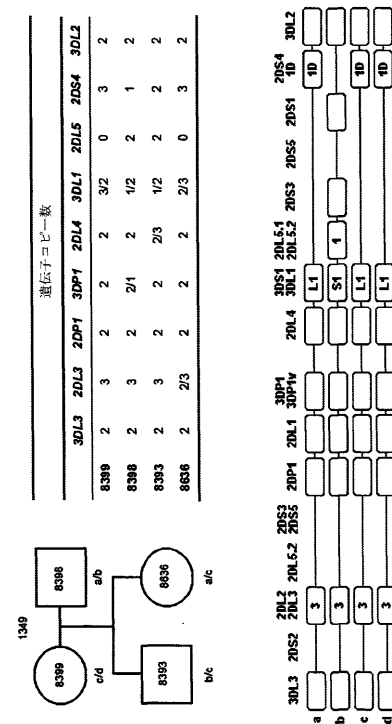


Fig. 12A

【 ☒ 1 2 B 3 - 1 】

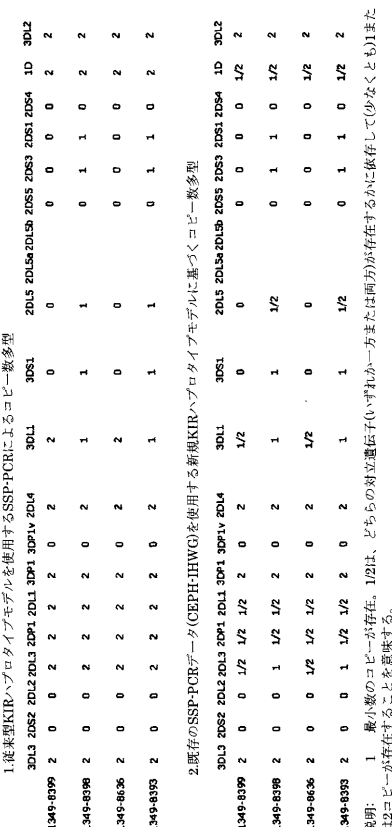


Fig. 12B3

【 ☒ 1 2 B 3 - 2 】

3.新たに伸長したKIRプロブセット1および2を使用するKIR-MLPAによるコピー数多型

	3DL3	2DS2*	ZDL2	2DL3	2DP1	3DL1	3DP1	3DP1v	2DL4	2DL4N	3DL1N	3DS1	3DS1N	2DL5*	2DL5a*	2DL5b*	2DS3	2DS5*	2DS4*	2DS4N*	2DS1*	3DL2*		
1349-6399	2	0	0	2	2	2	1	2	0	2	1	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2
1349-6398	2	0	0	1	2	2	0	2	0	1	0	1	0	2	0	0	1	1	0	1	1	0	0	2
1349-6396	2	0	0	2	2	2	2	1	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
1349-6395	2	0	0	1	2	2	2	0	2	0	1	1	0	2	0	0	1	1	1	1	1	0	0	2

Fig. 12B3, contd.

【 ☒ 1 3 】

Fig. 13

遺伝子	SSP		MLPA	
	KIR遺伝子型		KIR遺伝子型	MLPA KIR GNV
3DL3*,#	+		+	+
2DL3*	+		+	+
2DS2*,#	+		+	+
2DL2	+		+	+
2DP1	+		+	+
2DL1*	+		+	+
3DP1	+		+	+
3DP1v	+		+	+
2DL4*,#	+		+	+
2DL4N*,#,#			+	+
3DL1*,#	+		+	+
3DL1N*,#,#			+	+
3DS1*,#	+		+	+
3DS1N*,#,#			+	+
2DL5*	+		+	+
2DL5a*,#,#			+	+
2DL5b*,#			+	+
2DS3	+		+	+
2DS5*,#	+		+	+
2DS4*,#	+		+	+
2DS4N*,#	+		+	+
2DS1*,#	+		+	+
3DL2*,#	+		+	+

* 図3Cおよび3Dに記載のとおりこれらの遺伝子についてのプロブは、記載のMLPAプロブセット中のTri-lig型である。
 † Tri-ligプロブによってのみ検出されるKIR変異体遺伝子
 ‡ 2種の異なるSNPをライゲーション部位で各1個ずつ検出するTri-ligプロブ

【 図 1 2 B 2 】

個体あたり2染色体を描出した新規KIRハプロタイプモデル(SSP-PCRデータに基づく)

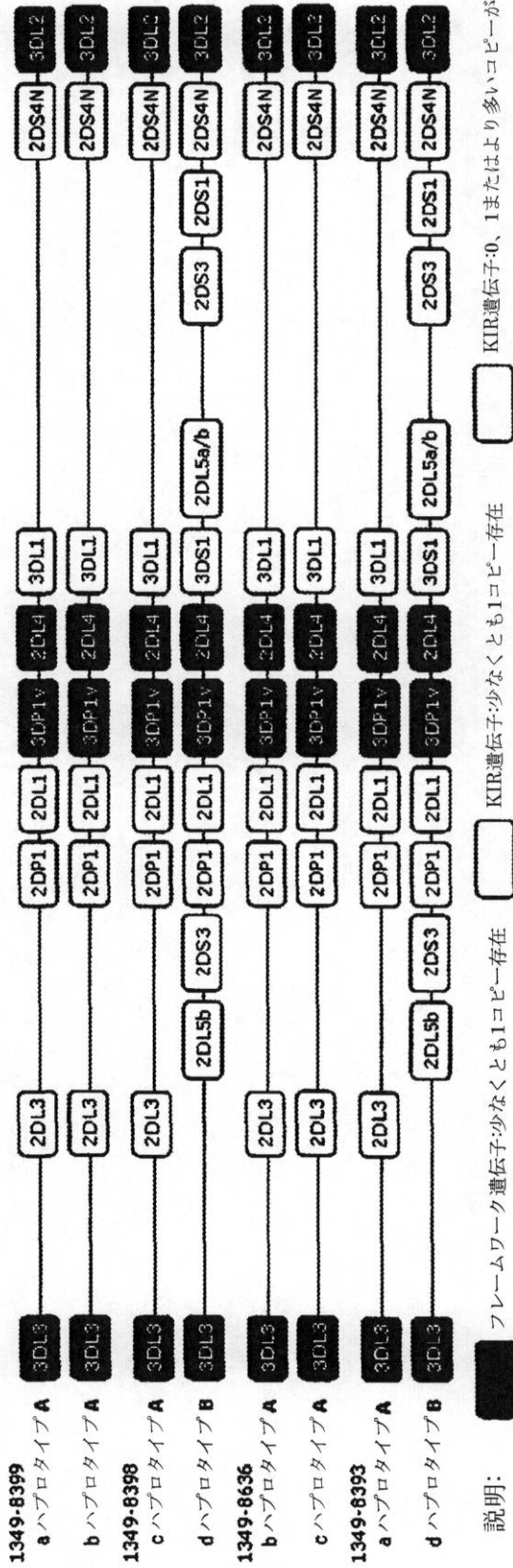


Fig. 12B2

【 配 列 表 】

2012507306000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平成23年7月7日 (2011.7.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中の少なくとも1個の標的核酸配列の存在について選別するための方法であって、
a)前記試料に少なくとも2個の異なるプローブセットを添加するステップであって、各プローブセットが、

前記標的核酸配列の第1領域に相補的な第1核酸配列と、その5'側に位置し、第1プライマー結合部位を含む非相補的な核酸配列とを含む第1核酸プローブ、および

前記標的核酸配列の第2領域に相補的な第2核酸配列と、その3'側に位置し、第2プライマー結合部位を含む非相補的な核酸配列とを含む第2核酸プローブ
を含み、

前記プローブセットの少なくとも1個が、前記標的核酸配列の第3領域に相補的な第3核酸配列を含む第3核酸プローブを含み、

前記プローブセット中に前記第3プローブが存在する場合、前記標的核酸の前記第1および前記第3領域が相互に本質的に隣接して位置し、前記標的核酸の前記第3および前記第2領域が相互に本質的に隣接して位置し、

前記プローブセット中に前記第3プローブが存在しない場合、前記標的核酸の前記第1および前記第2領域が相互に本質的に隣接して位置するステップ、

b)前記少なくとも2個の異なるプローブセットを前記試料の相補的な核酸とハイブリダイズさせるステップ、

c)前記試料の核酸をライゲーション反応に供するステップ、

d)前記試料の核酸を、前記第1プライマー結合部位に特異的に結合できる少なくとも1個のプライマーおよび前記第2プライマー結合部位に特異的に結合できる少なくとも1個のプライマーを使用する核酸増幅反応に供するステップ、ならびに

e)増幅された核酸が存在するかどうかを測定し、それにより前記少なくとも1個の標的核酸配列が前記試料中に存在するかどうかを測定するステップ

を含み、

少なくとも1個の第3核酸プローブが、遺伝子特異的なヌクレオチドおよび/もしくは偽遺伝子特異的なヌクレオチド、ならびに/または遺伝子特異的な配列および/もしくは偽遺伝子特異的な配列、ならびに/または所与の遺伝子もしくは偽遺伝子中の追加的多型を含む標的核酸領域に相補的であり、前記多型が好ましくはSNPを含む、方法。

【請求項2】

3個の核酸プローブを含むプローブセットにおいて、第3核酸プローブが、遺伝子特異的なヌクレオチドおよび/もしくは偽遺伝子特異的なヌクレオチド、ならびに/または遺伝子特異的な配列および/もしくは偽遺伝子特異的な配列、ならびに/または所与の遺伝子もしくは偽遺伝子中の多型を含む標的核酸領域に相補的であり、前記多型が好ましくはSNPを含み、第1核酸プローブまたは第2核酸プローブが、遺伝子特異的なヌクレオチドおよび/もしくは偽遺伝子特異的なヌクレオチド、ならびに/または遺伝子特異的な配列および/もしくは偽遺伝子特異的な配列、ならびに/または所与の遺伝子もしくは偽遺伝子中の多型を含む別の標的核酸領域に相補的であり、前記多型が好ましくはSNPを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

少なくとも2個、好ましくは少なくとも5個、より好ましくは少なくとも10個の異なる第3核酸プローブが使用される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

第3核酸プローブの少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%が、遺伝子変異体または偽遺伝子変異体を含む標

的核酸領域に相補的である、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記第3核酸プローブの少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%が、少なくとも1個の遺伝子変異体または偽遺伝子変異体を含む他の標的核酸領域に相補的である第1核酸プローブまたは第2核酸プローブと組み合わせられる、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

15から150ヌクレオチドの間の長さ、好ましくは19から110ヌクレオチドの間の長さを有する第3核酸プローブが使用される、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記核酸プローブが合成によって作製される、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記少なくとも2個の異なるプローブセットの前記第1核酸プローブの前記非相補的核酸配列の長さにおける差異、および/または前記少なくとも2個の異なるプローブセットの前記第2核酸プローブの前記非相補的核酸配列の長さにおける差異が、核酸6個より少ない、好ましくは核酸4個より少ない、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記第1核酸プローブの非相補的核酸配列が本質的に同一の第1プライマー結合部位を含み、かつ/または前記第2核酸プローブの非相補的核酸配列が本質的に同一の第2プライマー結合部位を含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

試料中の少なくとも1個の標的核酸配列の存在について選別するための複数のプローブセットの使用であって、前記プローブセットのそれぞれが、

前記標的核酸配列の第1領域に相補的な第1核酸配列と、その5'側に位置し、第1プライマー結合部位を含む非相補的核酸配列とを含む第1核酸プローブ、および

前記標的核酸配列の第2領域に相補的な第2核酸配列と、その3'側に位置し、第2プライマー結合部位を含む非相補的核酸配列とを含む第2核酸プローブ

を含み、

前記プローブセットの少なくとも1個が前記標的核酸配列の第3領域に相補的な第3核酸配列を含む第3核酸プローブを含み、

前記プローブセット中に前記第3プローブが存在する場合、前記標的核酸の前記第1および前記第3領域が相互に本質的に隣接して位置し、前記標的核酸の前記第3および前記第2領域が相互に本質的に隣接して位置し、

前記プローブセット中に前記第3プローブが存在しない場合、前記標的核酸の前記第1および前記第2領域が相互に本質的に隣接して位置し、

少なくとも1個の第3核酸プローブが、遺伝子特異的ヌクレオチドおよび/もしくは偽遺伝子特異的ヌクレオチド、ならびに/または遺伝子特異的配列および/もしくは偽遺伝子特異的配列、ならびに/または所与の遺伝子もしくは偽遺伝子中の追加的多型を含む標的核酸領域に相補的であり、前記多型が好ましくはSNPを含む使用。

【請求項11】

対象の核酸のコピー数を測定するための少なくとも1個のプローブセットの使用であって、少なくとも1個のプローブセットが1つまたは複数の位置に縮重塩基を有するプローブを含み、かつ/または少なくとも1個のプローブセットが、A、T、G、CおよびUからなる群から選択される少なくとも2個、好ましくは少なくとも3個、より好ましくは少なくとも4個の塩基に結合できる代替塩基を含む、使用。

【請求項12】

前記代替塩基がデオキシイノシン三リン酸(dITP)またはその機能的等価物を含む、請求項11に記載の使用。

【請求項13】

前記標的核酸配列がキラー免疫グロブリン様受容体(KIR)遺伝子座に存在する、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項14】

少なくとも1個のKIR遺伝子の(相対的)コピー数多型および/または少なくとも1個のKIR偽遺伝子のコピー数多型が測定される、請求項1から13のいずれか一項に記載の方法または使用。

【請求項15】

図3A、3B、3Cまたは3Dに示されるプローブに対して少なくとも70%の配列同一性を有する少なくとも1個のプローブ、好ましくは図3Cまたは3Dに示されるプローブに対して少なくとも70%の配列同一性を有する少なくとも1個のプローブが使用される、請求項1から14のいずれか一項に記載の方法および/または使用。

【請求項16】

前記少なくとも2個のプローブセットが、図3A、3B、3Cまたは3Dの少なくとも2個のプローブセットに対して、好ましくは図3Cまたは3Dの少なくとも2個のプローブセットに対して少なくとも70%の配列同一性を有する、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法および/または使用。

【請求項17】

図3A、3B、3Cまたは3Dに列挙するプローブまたはプローブセットに対して、好ましくは図3Cまたは3Dのプローブまたはプローブセットに対して少なくとも70%の配列同一性を有するプローブまたはプローブセット。

【請求項18】

請求項17に記載の少なくとも2個のプローブまたはプローブセットを含む核酸混合物。

【請求項19】

請求項17または18に記載のプローブまたはプローブセットまたは核酸混合物を含む、試料中の少なくとも1個の標的核酸配列の存在を検出するためのキット。

【請求項20】

前記少なくとも1個の標的核酸配列がKIR遺伝子座に存在する核酸配列を含む、請求項19に記載のキット。

【請求項21】

核酸配列5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGAおよびTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'またはその相補物に対して少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するPCRプライマーセットをさらに含む、請求項19または20に記載のキット。

【請求項22】

個体における白血病の素因を測定するための方法であって、前記個体の核酸試料中のKIR2DS4および/またはKIR2DS3の存在または欠如を図3Aまたは3Bまたは3Cまたは3Dに列挙するプローブセットに対して少なくとも70%の配列同一性を有する少なくとも1個のプローブセットで測定するステップを含み、KIR2DS4の存在または欠如が慢性骨髄性白血病の素因に関する指標であり、KIR2DS3の欠如が急性リンパ性白血病の素因に関する指標である、方法。

【請求項23】

図3Cおよび/または3Dに示されるプローブセット540A/540Cおよび/もしくは513B/513Dならびに/またはプローブセット504A/504B、および/もしくは708K/708L/708M/708Nに対して少なくとも70%の配列同一性を有するプローブセットがKIR多型の存在または欠如を測定するために使用される、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

個体の炎症性腸疾患(IBD)および/またはクローン病の素因を測定するための方法であって、前記個体の核酸試料中のKIR2DL2およびKIR2DL3の存在または欠如を図3Aまたは3Bまたは3Cまたは3Dに列挙するプローブセットに対して少なくとも70%の配列同一性を有する少なく

とも1個のプローブセットで測定するステップ、および前記個体の試料中のHLA C1および/またはC2リガンドの存在または欠如を測定するステップを含み、

C1ホモ接合性との組合せでのKIR2DL2、KIR2DL3ヘテロ接合性がIBDおよび/またはクローン病の素因に関する指標であり、C2ホモ接合性との組合せでのKIR2DL2、KIR2DL3ヘテロ接合性がIBDおよび/またはクローン病の防御に関する指標である、方法。

【請求項 25】

図3Cおよび/または3Dに示されるプローブセット415B/415C/415Dおよび/もしくは417A/417B/417Cならびに/またはプローブセット420A/420Bおよび/もしくは706A/706Bに対して少なくとも70%の配列同一性を有するプローブセットがKIR多型の存在または欠如を測定するために使用される、請求項24に記載の方法。

【請求項 26】

疾患の経過への個体の易罹患性、ならびに/または慢性感染、好ましくはレトロウイルス感染、ヘルペスウイルス感染および肝炎ウイルス感染における治療への応答を測定するための方法であって、前記個体の核酸試料中のKIR2DL3、KIR3DL1および/またはKIR3DS1のコピー数を図3Aまたは3Bまたは3Cまたは3Dに列挙するプローブセットに対して少なくとも70%の配列同一性を有する少なくとも1個のプローブセットで測定するステップを含み、個体におけるKIR3DL1および/またはKIR3DS1の高いコピー数が個体におけるKIR3DL1および/またはKIR3DS1の低いコピー数と比較して疾患の経過の改善および/または慢性感染の治療への応答に関する指標であり、個体におけるKIR2DL3の低いコピー数が個体におけるKIR2DL3の高いコピー数と比較して疾患の経過の改善および/または慢性感染の治療への応答に関する指標である、方法。

【請求項 27】

図3Cおよび/または3Dに示されるプローブセット409A/409B/409Cおよび/もしくは711A/711B/711C/711Dならびに/またはプローブセット418A/418B/418Dおよび/もしくは709C/709D/709E/709Gならびに/またはプローブセット415B/415C/415Dおよび/もしくは417A/417B/417Cに対して少なくとも70%の配列同一性を有するプローブセットがKIR遺伝子のコピー数を測定するために使用される、請求項26に記載の方法。

【請求項 28】

死亡率、移植片対宿主、移植片対腫瘍および移植後のレシピエントの移植後臓器生存などの移植関連評価項目の素因を測定するための方法であって、前記レシピエントのためのドナーの核酸試料中のKIR2DS4の存在または欠如を図3Aまたは3Bまたは3Cまたは3Dに列挙するプローブセットに対して少なくとも70%の配列同一性を有する少なくとも1個のプローブセットで測定するステップを含み、前記ドナーにおけるKIR2DS4の存在が、KIR2DS4が欠如しているドナーでの死亡率、移植片対宿主反応、移植片対腫瘍反応およびレシピエントの移植後臓器生存と比較して低下した死亡率、低下した移植片対宿主反応、増加した移植片対腫瘍反応および前記レシピエントにおける増加した移植後臓器生存に関する指標である、方法。

【請求項 29】

図3Cおよび/または3Dに示されるプローブセット504A/504Bおよび/または708K/708L/708M/708Nに対して少なくとも70%の配列同一性を有するプローブセットが、KIR多型の存在または欠如を測定するために使用される、請求項28に記載の方法。

【請求項 30】

関節外症状およびリウマチ性血管炎を伴う関節リウマチについての個体の素因を測定するための方法であって、前記個体の核酸試料中のKIR2DS2および/またはKIR2DL2のコピー数を図3A、3B、3Cおよび/または3Dに列挙するプローブセットに対して少なくとも70%の配列同一性を有する少なくとも1個のプローブセットで測定するステップを含み、前記個体におけるKIR2DS2および/またはKIRDL2の高いコピー数が、個体におけるKIR2DL2および/またはKIR2DS2の低いコピー数と比較して関節外症状およびリウマチ性血管炎を伴う関節リ

ウマチの素因に関する指標である、方法。

【請求項3 1】

図3Cおよび/または3Dに示されるプローブセット420A/420Bおよび/もしくは706A/706Bならびに/またはプローブセット703A/703B/703Cおよび/もしくは544A/544Bに対して少なくとも70%の配列同一性を有するプローブセットが、KIR遺伝子のコピー数を測定するために使用される、請求項30に記載の方法。

【請求項3 2】

個体における自己炎症、好ましくはHLA-B27関連腱附着部炎関連関節炎および反応性関節炎、乾癬の素因を測定するための方法であって、

- a). 前記個体の核酸試料中において前記障害に関する指標であるKIR遺伝子の存在または欠如および/またはコピー数を図3Aまたは3Bまたは3Cまたは3Dに列挙するプローブセットに対して少なくとも70%の配列同一性を有する少なくとも1個のプローブセットで測定するステップ、ならびに
- b). ステップa)において得られた結果を前記素因の存在または欠如と関連させるステップを含む、方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2009/050669

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68		
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) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 130 113 A (SCHOUTEN JOHANNES PETRUS [NL]) 5 September 2001 (2001-09-05) cited in the application the whole document	1-10, 13-14
A	WO 03/048732 A (ILLUMINA INC [US]; FAN JIAN-BING [US]) 12 June 2003 (2003-06-12) figure 6	1-19
X	VILCHES C ET AL: "Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments." TISSUE ANTIGENS NOV 2007, vol. 70, no. 5, November 2007 (2007-11), pages 415-422, XP002533250 ISSN: 0001-2815 cited in the application the whole document	15-19
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 document 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. "B" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 February 2010		Date of mailing of the international search report 20/04/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Cornelis, Karen

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2009/050669

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 2007/041067 A (CHILDRENS HOSP & RES CT OAK [US]; TRACHTENBERG ELIZABETH A [US]; HOUTC) 12 April 2007 (2007-04-12) abstract	15-19
A	GIEBEL S ET AL: "Association of KIR2DS4 and its variant KIR1D with leukemia." LEUKEMIA : OFFICIAL JOURNAL OF THE LEUKEMIA SOCIETY OF AMERICA, LEUKEMIA RESEARCH FUND, U.K NOV 2008, vol. 22, no. 11, 8 May 2008 (2008-05-08), pages 2129-2130 ; DI, XP002569478 ISSN: 1476-5551 the whole document	22-23
A	MAJORCZYK E ET AL: "Associations of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with complications of rheumatoid arthritis" GENES AND IMMUNITY, vol. 8, no. 8, December 2007 (2007-12), pages 678-683, XP002569479 ISSN: 1466-4879 cited in the application abstract	30-32
A	YU-LIAN JIAO ET AL: "Polymorphisms of KIRs Gene and HLA-C Alleles in Patients with Ankylosing Spondylitis: Possible Association with Susceptibility to the Disease" JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NE, vol. 28, no. 4, 23 February 2008 (2008-02-23), pages 343-349, XP019608236 ISSN: 1573-2592 the whole document	32
A	VERHEYDEN S ET AL: "Susceptibility to myeloid and lymphoid leukemia is mediated by distinct inhibitory KIR-HLA ligand interactions." LEUKEMIA : OFFICIAL JOURNAL OF THE LEUKEMIA SOCIETY OF AMERICA, LEUKEMIA RESEARCH FUND, U.K AUG 2006, vol. 20, no. 8, August 2006 (2006-08), pages 1437-1438, XP002569480 ISSN: 0887-6924 the whole document	22-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/NL2009/050669**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-10(completely); 13-21(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-10(completely); 13-21(partially)

Methods to screen for the presence of a target using multiplex ligation dependent amplification and use of probe sets in such methods, including using probe sets of Figure 3, Probes and probe sets, and a kit with probes from Figure 3.

2. claims: 11-12(completely); 13-21(partially)

use of probe sets with a universal base for determining copy number, and specific probes and probe sets relating to Kir2.

3. claims: 22-23(completely); 13-21(partially)

methods to detect a predisposition to leukemia by detecting the presence of Kir2DS4 or Kir2DS3, and use of probes for the detection, probes and kit.

4. claims: 24-25(completely); 13-21(partially)

methods to detect the predisposition to Crohn's disease or inflammatory bowel disease by detecting the presence of Kir2DL2 or Kir2DL3, and use of probes for the detection, probes and kit.

5. claims: 26-27(completely); 13-21(partially)

methods to determine susceptibility to disease by detecting the copy number of Kir2DL3, Kir3DL1 or Kir3DS1, and use of probes for the detection, probes and kit.

6. claims: 28-29(completely); 13-21(partially)

methods to determine predisposition to transplantation outcome complications by detecting the presence of Kir2DS4, and use of probes for the detection, probes and kit.

7. claims: 30-31(completely); 13-21(partially)

methods to determine the predisposition to rheumatoid arthritis by determining the copy number of Kir2DS2 or Kir2DL2, and use of probes for the detection, probes and kit.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

8. claims: 32(completely); 13-21(partially)

methods to determine a predisposition to auto inflammatory disease by determining the presence or copy number of a Kir gene. and use of probes for the detection, probes and kit.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/NL2009/050669

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1130113	A	05-09-2001	AU 4643901 A	27-08-2001
			CA 2400240 A1	23-08-2001
			WO 0161033 A2	23-08-2001
			US 2003108913 A1	12-06-2003
WO 03048732	A	12-06-2003	NONE	
WO 2007041067	A	12-04-2007	US 2008213787 A1	04-09-2008

フロントページの続き

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

(72)発明者 タコ・ウィレム・コイパース
オランダ・1181・ゼッター・アムステルフェーン・ミスター・エフ・アー・ファン・ハルウ
エーク・18

(72)発明者 マーティン・ドゥ・ボア
オランダ・1695・セーハー・プロカー・クウェケリー・13

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA09 HA12
4B063 QA05 QA13