

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-529026

(P2023-529026A)

(43)公表日 令和5年7月6日(2023.7.6)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	45/06 (2006.01)	A 6 1 K	45/06	4 B 0 6 3	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	4 B 0 6 5	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	4 C 0 8 4
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		4 C 0 8 5
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02		4 C 0 8 6
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全369頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-517825(P2023-517825)	(71)出願人	399052796		
(86)(22)出願日	令和3年6月1日(2021.6.1)		デyna ファーバー キャンサー インス		
(85)翻訳文提出日	令和5年1月27日(2023.1.27)		ティチュート, インコーポレイテッド		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/035205		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2		
(87)国際公開番号	WO2021/247540		2 1 5, ボストン, ブルックライン ア		
(87)国際公開日	令和3年12月9日(2021.12.9)		ベニュー 4 5 0		
(31)優先権主張番号	63/039,211	(71)出願人	522468146		
(32)優先日	令和2年6月15日(2020.6.15)		リー, パトリック シー.		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2		
(31)優先権主張番号	63/032,956		2 1 5-5 4 5 0, ボストン, ブルッ		
(32)優先日	令和2年6月1日(2020.6.1)		クライン アベニュー 4 5 0, デyna		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		ーファーバー キャンサー インスティチ		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100078282		
			弁理士 山本 秀策		
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 MHC-I発現を調節するための方法及びその免疫療法の使用

(57)【要約】

本発明は、部分的に、がん細胞上の主要組織適合性複合体(MHC)I発現を調節するための組成物及び方法に関する。

【選択図】図1A

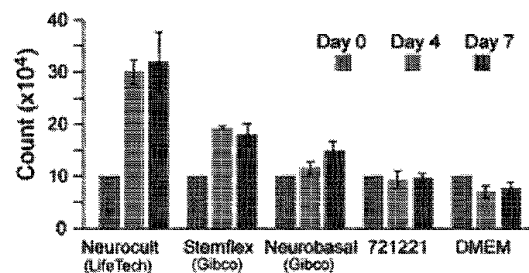


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

がん罹患している対象を治療する方法であって、前記対象に、表 1、2、3、4、若しくは 5 に列挙される 1 つ以上のバイオマーカー又はその断片のコピー数、発現レベル、及び／又は活性を修飾する治療有効量の薬剤、並びに免疫療法を投与することを含む、方法。

【請求項 2】

前記薬剤が、表 1 若しくは 4 に列挙される 1 つ以上のバイオマーカー又はその断片の前記コピー数、前記発現レベル、及び／又は前記活性を減少させる、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記薬剤が、MYCL ポリペプチド及び／若しくはポリコムリプレッサー複合体 1.1 (PRC1.1) ポリペプチド、又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの前記コピー数、前記発現レベル、及び／又は前記活性を減少させる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ポリコムリプレッサー複合体 1.1 (PRC1.1) ポリペプチドが、USP7、BCORL1、PCGF1、KDM2B、SKP1、RING1A、RING1B、RYBP、YAF2、及び／又はBCORである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記薬剤が、低分子阻害剤、CRISPR一本鎖ガイドRNA (sgRNA)、RNA 干渉剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ペプチド若しくはペプチド模倣薬阻害剤、アプタマー、抗体、又はイントラボディである、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記RNA干渉剤が、低分子干渉RNA (siRNA)、CRISPR RNA (crRNA)、低分子ヘアピンRNA (shRNA)、マイクロRNA (miRNA)、又はpiwi相互作用RNA (piRNA) である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記sgRNAが、表 1～4 に列挙される核酸配列からなる群から選択される核酸配列を含む、請求項 6 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記薬剤が、表 1、2、3、4、若しくは 5 に列挙される前記 1 つ以上のバイオマーカー及び／又は前記 1 つ以上のバイオマーカーの基質に特異的に結合する、イントラボディ又はその抗原結合断片を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

前記イントラボディ又はその抗原結合断片が、マウス、キメラ、ヒト化、複合体、若しくはヒトイントラボディ、又はその抗原結合断片である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記イントラボディ又はその抗原結合断片が、検出可能に標識されており、エフェクタードメインを含み、Fcドメインを含み、かつ／又はFv、Fav、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂、及びダイアボディ断片からなる群から選択される、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記薬剤が、表 2 又は 3 に列挙される 1 つ以上のバイオマーカー又はその断片の前記コピー数、前記発現レベル、及び／又は前記活性を増加させる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記薬剤が、免疫療法に対するがん細胞の感受性を増加させる、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

50

前記免疫療法が、前記薬剤の前、後、又はそれと同時に投与される、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記免疫療法が、抗がんワクチン及び／又はウイルスを含む、請求項 12 又は 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記免疫療法が、細胞ベースの免疫療法であり、任意に、前記細胞ベースの免疫療法が、キメラ抗原受容体（CAR-T）療法である、請求項 12 ～ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記免疫療法が、免疫チェックポイントを阻害する、請求項 12 ～ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記免疫チェックポイントが、CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIRファミリー受容体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、GITR、4-1BB、OX-40、BTLA、SIRP、CD47、CD48、2B4（CD244）、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、ブチロフィリン、IDO、CD39、CD73 及び A2aR からなる群から選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記免疫チェックポイントが、PD-1、PD-L1、及び PD-L2 からなる群から選択され、任意に、前記免疫チェックポイントが、PD-1 である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 1 つ以上のバイオマーカーが、表 5 に列挙される核酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する核酸配列を含み、かつ／又は表 5 に列挙されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有するアミノ酸配列をコードする、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記対象が、哺乳動物である、請求項 1 ～ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記対象が、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、又は家畜化哺乳動物である、請求項 1 ～ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記薬剤が、前記免疫療法に対する前記がんの感受性を増加させ、任意に、（i）前記免疫療法が、T細胞媒介であり、かつ／又は（ii）前記薬剤が、前記がん細胞を含む腫瘍における CD8+T細胞の量を増加させる、請求項 1 ～ 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記薬剤が、前記がん細胞の表面上の MHC-I のレベルを増加させる、請求項 1 ～ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記対象に、少なくとも 1 つの追加のがん療法又はレジメンを投与することを更に含む、請求項 1 ～ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記少なくとも 1 つの追加のがん療法又はレジメンが、前記薬剤及び／又は前記免疫療法より前、後、又はそれと同時に投与される、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記薬剤が、薬学的に許容される製剤で投与される、請求項 1 ～ 25 のいずれか一項に

10

20

30

40

50

記載の方法。

【請求項 27】

前記がんが、神経内分泌がんである、請求項 1～26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記神経内分泌がんが、メルケル細胞がん、神経芽細胞腫、小細胞肺がん、又は神経内分泌がんである、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

がん細胞における主要組織適合性複合体の発現を増加させる方法であって、前記がん細胞を、表 1、2、3、4、若しくは 5 に列挙される 1 つ以上のバイオマーカー又はその断片のコピー数、発現レベル、及び／又は活性を調節する薬剤と接触させることを含み、任意に、前記がん細胞、又は前記がん細胞及び免疫細胞を含む細胞の集団を、免疫療法と接触させることを更に含む、方法。

10

【請求項 30】

前記薬剤が、表 1 又は 4 に列挙される 1 つ以上のバイオマーカーの前記コピー数、前記発現レベル、及び／又は前記活性を減少させる、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記薬剤が、MYCL ポリペプチド及び／若しくはポリコムリプレッサー複合体 1.1 (PRC1.1) ポリペプチド、又は前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの前記コピー数、前記発現レベル、及び／又は前記活性を減少させる、請求項 29 に記載の方法。

20

【請求項 32】

前記ポリコムリプレッサー複合体 1.1 (PRC1.1) ポリペプチドが、USP7、BCORL1、PCGF1、KDM2B、SKP1、RING1A、RING1B、RYBP、YAF2、及び／又はBCORである、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

前記薬剤が、低分子阻害剤、CRISPR一本鎖ガイドRNA (sgRNA)、RNA 干渉剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ペプチド若しくはペプチド模倣薬阻害剤、アプタマー、抗体、又はイントラボディである、請求項 29～31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記RNA干渉剤が、低分子干渉RNA (siRNA)、CRISPR RNA (crRNA)、低分子ヘアピンRNA (shRNA)、マイクロRNA (miRNA)、又はpiwi相互作用RNA (piRNA) である、請求項 32 に記載の方法。

30

【請求項 35】

前記sgRNAが、表 1～4 に列挙される核酸配列からなる群から選択される核酸配列を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

前記薬剤が、表 1、2、3、4、若しくは 5 に列挙される前記 1 つ以上のバイオマーカー及び／又は前記 1 つ以上のバイオマーカーの基質に特異的に結合する、イントラボディ又はその抗原結合断片を含む、請求項 34 に記載の方法。

40

【請求項 37】

イントラボディ又はその抗原結合断片が、マウス、キメラ、ヒト化、複合体、又はヒトイントラボディである、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 38】

前記イントラボディ又はその抗原結合断片が、検出可能に標識されており、エフェクタードメインを含み、Fcドメインを含み、かつ／又はFv、Fav、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂、及びダイアボディ断片からなる群から選択される、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

前記薬剤が、表 2 又は 3 に列挙される 1 つ以上のバイオマーカーの前記コピー数、前記

50

発現レベル、及び／又は前記活性を増加させる、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 40】

前記薬剤が、前記免疫療法に対する前記がん細胞の感受性を増加させる、請求項 29 ～ 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記がん細胞が、前記薬剤の前、後、又はそれと同時に前記免疫療法と接触する、請求項 29 ～ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

前記免疫療法が、抗がんワクチン及び／又はウイルスを含む、請求項 39 又は 40 に記載の方法。

【請求項 43】

前記免疫療法が、細胞ベースの免疫療法であり、任意に、前記細胞ベースの免疫療法が、キメラ抗原受容体（CAR-T）療法である、請求項 39 ～ 41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

前記免疫療法が、免疫チェックポイントを阻害する、請求項 39 ～ 42 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

免疫チェックポイントが、CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIRファミリー受容体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、GITR、4-1BB、OX-40、BTLA、SIRP、CD47、CD48、2B4（CD244）、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、プチロフィリン、IDO、CD39、CD73 及び A2aR からなる群から選択される、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 46】

前記免疫チェックポイントが、PD-1、PD-L1、及び PD-L2 からなる群から選択される、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 47】

前記免疫チェックポイントが、PD-1 である、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 48】

前記バイオマーカーが、表 5 に列挙される核酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有する核酸配列を含み、かつ／又は表 5 に列挙されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の同一性を有するアミノ酸配列をコードする、請求項 29 ～ 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

前記 1 つ以上のバイオマーカーが、ヒト、マウス、キメラ、又は融合バイオマーカーである、請求項 29 ～ 47 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

前記免疫療法が、(i) T細胞媒介であり、かつ／又は(ii) 前記薬剤が、前記がん細胞を含む腫瘍における CD8+T細胞の量を増加させる、請求項 29 ～ 48 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

前記薬剤が、前記がん細胞における前記 MHC クラス I 表面発現のレベルを増加させる、請求項 29 ～ 50 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 52】

前記対象に、少なくとも 1 つの追加のがん療法又はレジメンを投与することを更に含む、請求項 29 ～ 51 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 53】

前記少なくとも 1 つの追加のがん療法又はレジメンが、前記薬剤及び／又は前記免疫療

10

20

30

40

50

法より前、後、又はそれと同時に投与される、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記薬剤が、薬学的に許容される製剤で投与される、請求項 2 9 ～ 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記がん細胞が、神経内分泌がん細胞である、請求項 2 9 ～ 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記神経内分泌がん細胞が、メルケル細胞がん、神経芽細胞腫、小細胞肺がん、又は神経内分泌がん細胞である、請求項 5 5 に記載の方法。

10

【請求項 5 7】

表 1、2、3、4、又は 5 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を調節することによって治療することができるがんに罹患しているか、又はそれを発症するリスクのある対象を特定する方法であって、対照と比較した前記対象からの細胞における主要組織適合性複合体（MHC）クラスⅠ発現の増加又は減少レベルを検出することと、それによって、表 1、2、3、4、又は 5 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーの前記コピー数、量、及び／又は活性を調節することによって治療することができるがんに罹患しているか、又はそれを発症するリスクのある前記対象を特定することと、を含み、任意に、前記対象由来の前記細胞を含む生体試料が、前記対象から得られる、方法。

20

【請求項 5 8】

前記薬剤が、表 1 又は 4 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーの前記コピー数、量、及び／又は活性を減少させる、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記特定された対象に、表 1 又は 4 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーを阻害する薬剤を推奨すること、処方すること、又は投与することを更に含む、請求項 5 7 又は 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記薬剤が、表 2 又は 3 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーの前記コピー数、量、及び／又は活性を増加させる、請求項 5 7 に記載の方法。

30

【請求項 6 1】

前記特定された対象に、免疫療法を推奨すること、処方すること、又は投与することを更に含む、請求項 5 7 ～ 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記免疫療法が、抗がんワクチン、抗がんウイルス、及び／又はチェックポイント阻害剤を含む、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記対象に、標的療法、化学療法、放射線療法、及び／又はホルモン療法からなる群から選択されるがん療法を推奨すること、処方すること、又は投与することを更に含む、請求項 5 7 ～ 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 6 4】

前記対照が、前記患者又は前記患者が属する同じ種のメンバーのいずれかに由来する、がん性又は非がん性試料に由来する試料を含む、請求項 5 7 ～ 6 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記対照が、既知の参照値である、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記がんが、神経内分泌がんである、請求項 5 7 ～ 6 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記神経内分泌がんが、メルケル細胞がん、神経芽細胞腫、小細胞肺がん、又は神経内

50

分泌がんである、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

表 1、2、3、4、若しくは 5 に列挙される 1 つ以上のバイオマーカー又はその断片を発現するがん罹患している対象の、免疫療法による治療に対する臨床転帰を予測するための方法であって、

a) 対象試料における表 1、2、3、4、又は 5 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を決定することと、

b) 良好な臨床転帰を有する対照における少なくとも前記 1 つのバイオマーカーの前記コピー数、量、及び／又は活性を決定することと、

c) 前記対象試料中及び前記対照中の前記少なくとも 1 つのバイオマーカーの前記コピー数、量、及び／又は活性を比較することと、を含み、

前記対照中の前記コピー数、量、及び／又は活性を比較した、前記対象試料中の表 1、2、3、4、又は 5 に列挙される前記少なくとも 1 つのバイオマーカーの前記コピー数、量、及び／又は活性の存在又はわずかな変化が、前記対象が不良な臨床転帰を有することを示す、方法。

【請求項 69】

表 1 又は 4 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーのコピー数及び／若しくは量を減少させ、かつ／又は前記活性を阻害する薬剤と、免疫療法とで、がんを有するか、又はがんを有する疑いのある対象の治療を監視するための方法であって、第 1 の時点での前記対象に由来する試料における MHC クラス I 発現のレベル、及びその後の時点での前記対象に由来する試料における MHC クラス I 発現の前記レベルの変化又は変化がないことを検出し、それによって、前記対象の前記治療を監視することを含む、方法。

【請求項 70】

表 2 又は 3 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーのコピー数及び／若しくは量を増加させ、かつ／又は前記活性を阻害する薬剤と、免疫療法とで、がんを有するか、又はがんを有する疑いのある対象の治療を監視するための方法であって、第 1 の時点での前記対象に由来する試料における MHC クラス I 発現のレベル、及びその後の時点での前記対象に由来する試料における MHC クラス I 発現の前記レベルの変化又は変化がないことを検出し、それによって、前記対象の前記治療を監視することを含む、方法。

【請求項 71】

対象における表 1 又は 4 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を減少させる薬剤の有効性を評価する方法であって、対象試料において、第 1 の時点と、その後の時点と比較した表 1 又は 4 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーの前記コピー数、量、及び／又は活性の変化又は変化がないことを検出することを含み、表 1 又は 4 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーの前記コピー数、量、及び／又は活性の減少が、前記薬剤が有効であることを示す、方法。

【請求項 72】

対象における表 2 又は 3 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を増加させる薬剤の有効性を評価する方法であって、対象試料において、第 1 の時点と、その後の時点と比較した表 2 又は 3 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーの前記コピー数、量、及び／又は活性の変化又は変化がないことを検出することを含み、表 2 又は 3 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーの前記コピー数、量、及び／又は活性の減少が、前記薬剤が有効であることを示す、方法。

【請求項 73】

前記第 1 の時点と、前記その後の時点との間で、前記対象が、前記がんの治療を受けた、治療を終了した、かつ／又は寛解中である、請求項 71 又は 72 に記載の方法。

【請求項 74】

治療が、前記対象に前記薬剤を投与することを含む、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 75】

前記第 1 及び／又は前記その後の試料が、エキスピボ又はインピボ試料を含む、請求項

7 1 ～ 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記第 1 及び／又は少なくとも 1 つのその後の試料が、前記対象から得られる単一試料又はプールされた試料の一部である、請求項 7 1 ～ 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記試料が、前記対象から得られた細胞、血清、腫瘍周辺組織、及び／又は腫瘍内組織を含む、請求項 7 1 ～ 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記 1 つ以上のバイオマーカーが、表 1、2、3、4、又は 5 に列挙される、請求項 7 1 ～ 7 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記がん又はがん細胞が、神経内分泌がんである、請求項 1 ～ 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記神経内分泌がんが、メルケル細胞がん、神経芽細胞腫、小細胞肺がん、又は神経内分泌がんである、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記がん又はがん細胞が、前記がんの動物モデルにある、請求項 1 ～ 8 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記動物モデルが、マウスモデルである、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記がんが、哺乳類対象にある、請求項 1 ～ 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記哺乳類対象が、マウス又はヒトである、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 8 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2020年6月1日に提出された米国仮特許出願第63／032,956号、及び2020年6月15日に提出された米国仮特許出願第63／039,211号の優先権の利益を主張し、各出願の全内容が、この参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

大きなファイル

本出願には、付属の4つの長い表の完全な内容が含まれ、これらの全ては、以下のようなASCIIテキストファイルである。2020年6月15日に作成された348,531バイトサイズの「表__1__CRISPR__Positive.txt」として本明細書とともに提出される表1、2020年6月15日に作成された292,318バイトサイズの「表__2__CRISPR__Negative.txt」として本明細書とともに提出される表2、2020年6月12日に作成された581,299バイトサイズの「表__3__ORF__Positive.txt」として本明細書とともに提出される表3、2020年6月12日に作成された855,629バイトサイズの「表__4__ORF__Negative.txt」として本明細書とともに提出される表4。これら4つの表の全ては、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 3】

政府権利の陳述

本発明は、National Institutes of Healthによって授

10

20

30

40

50

与された助成金番号 R 3 5 C A 2 3 2 1 2 8、P 0 1 C A 2 0 3 6 5 5、R 2 1 C A 2 1 6 7 7 2、N C I - S P O R E - 2 P 5 0 C A 1 0 1 9 4 2 - 1 1 A 1、R 0 1 C A 1 5 5 0 1 0、U 2 4 C A 2 2 4 3 3 1、及び R 0 1 H L 1 3 1 7 6 8 に基づく政府の支援を受けて行われた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0004】

ウイルスは、免疫系の認識を回避する一連の機構を用い、未検出の感染及び複製を可能にする。ウイルス免疫回避のための一般的な標的は、ペプチドプロセッシング（P S M B 8 / L M P 2、P S M B 9 / L M P 7）、細胞質から E R へのペプチド輸送（T A P 1、T A P 2）、及び B 2 M - H L A I 重鎖（H L A - A、H L A - B、及び H L A - C）複合体へのペプチド装填を含む、いくつかのステップの協調機能を必要とする、H L A クラス I（H L A I 又は M H C I）抗原提示経路である。この経路を妨害し、ウイルス抗原提示を回避するために、ウイルスは、他の機構の中で、E R（C M V）への H L A I 重鎖挿入を遮断するか、プロテアソーム分解（E B V）に抵抗するか、T A P（ヘルペスウイルス）を妨害するか、又は H L A 分子（H I V）のトラフィッキング及びターンオーバーを変調する。ウイルスが免疫認識を回避するこれらの戦略は、ウイルス学及びがんに関連するクラス I の提示及び制御の機構を明らかにすることができる。

【0005】

例えば、稀で侵襲性の高い神経内分泌皮膚がんであるメルケル細胞がん（M C C）は、メルケル細胞ポリオーマウイルス（M C P y V）が、M C C の症例の 8 0 % の原因物質であるため、これらの疑問を調査するための興味深い設定を提示する。M C P y V は、2 つのウイルス抗原：R B に結合し、不活性化する L T、及びクロマチン修飾複合体への M Y C L の動員を含む、多数の新たな機能を有する S T のみからなる。注目すべきことに、M C C は、一般的に低 H L A I 発現を示すが、これが媒介される機構は不明である。免疫組織化学（I H C）によって、M C C 病変の 8 4 % が、表面 H L A I 下方制御又は喪失を呈することが報告されており、同様の所見が M C C 細胞株において観察されている。しかしながら、M C C における H L A I 表面発現もまた、インターフェロン又はヒストンデアセチラーゼ（H D A C）阻害剤によってインビトロで上方制御され得るため、高度に可塑性であるように見える。したがって、がん細胞における H L A 発現を増加させるために、治療戦略が緊急に必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、少なくとも部分的に、表 1 ～ 5 に列挙される 1 つ以上のバイオマーカー、例えば、M Y C L 又は 1 つ以上の P R C 1 . 1 複合体メンバー（P C G F 1、B C O R L 1、及び U S P 7 など）の阻害又は遮断は、がん細胞における M H C クラス I 分子、例えば、H L A I 分子の発現の増加をもたらすという発見に基づいている。本発明は、表 1 ～ 5 に列挙される 1 つ以上のバイオマーカー、例えば、M Y C L 及び／又は 1 つ以上の P R C 1 . 1 複合体メンバー（例えば、P C G F 1、B C O R L 1、及び U S P 7）の調節（例えば、上方制御又は下方制御）を伴い、H L A I 分子などの M H C クラス I 分子の、がん細胞上での表面発現を増加させる。C R I S P R / C a s 9 ベースの高スループットスクリーニングシステム及びオープンリーディングフレーム（O R F）スクリーニングを使用して、表 1 ～ 5 に列挙される 1 つ以上のバイオマーカー、例えば、M Y C L 及び／又は 1 つ以上の P R C 1 . 1 複合体メンバー（例えば、P C G F 1、B C O R L 1、及び U S P 7）は、調節されると、免疫療法に対してがんを感作させる標的として特定されている。例えば、メルケル細胞がんなどのがんにおいて、H L A I などの M H C クラス I は、対照と比較して表面発現が低減し、P R C 1 . 1 成分ポリペプチド又は M Y C L などの標的を阻害すると、H L A I などの M H C クラス I の発現が増加し、それにより、これらの細胞の免疫療法に対する感受性が増加することが本明細書で実証される。表 1 ～ 5 に列挙される 1 つ以上のバイオマーカー、例えば、M Y C L 及び／又は 1 つ以上の P R C

1. 1 複合体メンバー（例えば、PCGF1、BCORL1、及びUSP7）の阻害が、HLA IなどのMHCクラスIの表面発現を増加させることができることを検証する機能的データが、本明細書に提示される。したがって、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカー、例えば、MYCL及び／又は1つ以上のPRC1. 1 複合体メンバー（例えば、PCGF1、BCORL1、及びUSP7）の調節因子は、特にがん罹患した患者において、MHCクラスIの発現を調節し、かつ免疫応答を調節する（例えば、免疫応答を増加又は減少させる）ために有用であり、同時免疫療法の設定において、がんを治療するための新規の戦略を表す。

【0007】

本発明の一態様は、がん罹患している対象を治療する方法であって、対象に、表1、2、3、4、若しくは5に列挙される1つ以上のバイオマーカー又はその断片のコピー数、発現レベル、及び／又は活性を修飾する治療有効量の薬剤、並びに免疫療法を投与することを含む、方法を提供する。

【0008】

本発明の任意の態様に適用され得、かつ／又は本明細書に記載される任意の他の実施形態と組み合わせられ得る多数の実施形態が更に提供される。例えば、一実施形態では、薬剤は、表1若しくは4に列挙される1つ以上のバイオマーカー又はその断片のコピー数、発現レベル、及び／又は活性を減少させる。別の実施形態では、薬剤は、MYCLポリペプチド及び／若しくはポリコムリプレッサー複合体1. 1（PRC1. 1）ポリペプチド、又はポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのコピー数、発現レベル、及び／又は活性を減少させる。なお別の実施形態では、ポリコムリプレッサー複合体1. 1（PRC1. 1）ポリペプチドは、USP7、BCORL1、PCGF1、KDM2B、SKP1、RING1A、RING1B、RYBP、YAF2、及び／又はBCORである。更に別の実施形態では、薬剤は、小分子阻害剤、CRISPR一本鎖ガイドRNA（sgRNA）、RNA干渉剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ペプチド若しくはペプチド模倣薬阻害剤、アプタマー、抗体、又はイントラボディである。別の実施形態では、RNA干渉剤は、低分子干渉RNA（siRNA）、CRISPR RNA（crRNA）、小ヘアピンRNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、又はpiwi相互作用RNA（piRNA）である。なお別の実施形態では、sgRNAは、表1～4に列挙される核酸配列からなる群から選択される核酸配列を含む。更に別の実施形態では、薬剤は、表1、2、3、4、若しくは5に列挙される1つ以上のバイオマーカー及び／又は当該1つ以上のバイオマーカーの基質に特異的に結合する、イントラボディ又はその抗原結合断片を含む。別の実施形態では、イントラボディ又はその抗原結合断片は、マウス、キメラ、ヒト化、複合体、若しくはヒトイントラボディ、又はその抗原結合断片である。別の実施形態では、イントラボディ又はその抗原結合断片は、検出可能に標識されており、エフェクタードメインを含み、Fcドメインを含み、かつ／又はFv、Fav、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂、及びダイアボディ断片からなる群から選択される。別の実施形態では、薬剤は、表2若しくは3に列挙される1つ以上のバイオマーカー又はその断片のコピー数、発現レベル、及び／又は活性を増加させる。なお別の実施形態では、薬剤は、免疫療法に対するがん細胞の感受性を増加させる。更に別の実施形態では、免疫療法は、薬剤の前、後、又は薬剤と同時に投与される。なお別の実施形態では、免疫療法は、抗がんワクチン及び／又はウイルスを含む。別の実施形態では、免疫療法は、細胞ベースの免疫療法であり、任意に、細胞ベースの免疫療法は、キメラ抗原受容体（CAR-T）療法である。更に別の実施形態では、免疫療法は、免疫チェックポイントを阻害する。なお別の実施形態では、免疫チェックポイントは、CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIRファミリー受容体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、GITR、4-1BB、OX-40、BTLA、SIRP、CD47、CD48、2B4（CD244）、B7. 1、B7. 2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、ブチロフィリ

10

20

30

40

50

ン、I D O、C D 3 9、C D 7 3、及びA 2 a Rからなる群から選択される。別の実施形態では、免疫チェックポイントは、P D - 1、P D - L 1、及びP D - L 2からなる群から選択され、任意に、免疫チェックポイントは、P D - 1である。更に別の実施形態では、1つ以上のバイオマーカーは、表5に列挙される核酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有する核酸配列を含み、かつ／又は表5に列挙されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする。別の実施形態では、対象は、哺乳動物である。更に別の実施形態では、対象は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、又は家畜化哺乳動物である。更に別の実施形態では、薬剤は、免疫療法に対するがんの感受性を増加させ、任意に、(i)免疫療法は、T細胞媒介であり、かつ／又は(ii)薬剤は、がん細胞を含む腫瘍におけるC D 8 + T細胞の量を増加させる。別の実施形態では、薬剤は、がん細胞の表面上のM H C - Iのレベルを増加させる。別の実施形態では、方法は、対象に、少なくとも1つの追加のがん療法又はレジメンを投与することも含む。更に別の実施形態では、少なくとも1つの追加のがん療法又はレジメンは、薬剤及び／又は免疫療法の前、後、又は同時に投与される。更に別の実施形態では、薬剤は、薬学的に許容される製剤で投与される。なお別の実施形態では、がんは、神経内分泌がんである。なお別の実施形態では、神経内分泌がんは、メルケル細胞がん、神経芽細胞腫、小細胞肺がん、又は神経内分泌がんである。

10

【0009】

別の態様は、がん細胞における主要組織適合性複合体の発現を増加させる方法を提供し、当該方法は、がん細胞を、表1、2、3、4、若しくは5に列挙される1つ以上のバイオマーカー又はその断片のコピー数、発現レベル、及び／又は活性を調節する薬剤と接触させることを含み、任意に、がん細胞、又はがん細胞及び免疫細胞を含む細胞の集団を、免疫療法と接触させることを更に含む。

20

【0010】

本発明の任意の態様に適用され得、かつ／又は本明細書に記載される任意の他の実施形態と組み合わせられ得る多数の実施形態が更に提供される。一実施形態では、表1又は4に列挙される1つ以上のバイオマーカーのコピー数、発現レベル、及び／又は活性を減少させる薬剤。別の実施形態では、薬剤は、M Y C Lポリペプチド及び／若しくはポリコムリプレッサー複合体1.1 (P R C 1.1)ポリペプチド、又はポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのコピー数、発現レベル、及び／又は活性を減少させる。更に別の実施形態では、ポリコムリプレッサー複合体1.1 (P R C 1.1)ポリペプチドは、U S P 7、B C O R L 1、P C G F 1、K D M 2 B、S K P 1、R I N G 1 A、R I N G 1 B、R Y B P、Y A F 2、及び／又はB C O Rである。なお別の実施形態では、薬剤は、小分子阻害剤、C R I S P R一本鎖ガイドRNA (s g RNA)、RNA干渉剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ペプチド若しくはペプチド模倣薬阻害剤、アプタマー、抗体、又はイントラボディである。一実施形態では、RNA干渉剤は、低分子干渉RNA (s i RNA)、C R I S P R RNA (c r RNA)、小ヘアピンRNA (s h RNA)、マイクロRNA (m i RNA)、又はp i w i相互作用RNA (p i RNA)である。別の実施形態では、s g RNAは、表1～4に列挙される核酸配列からなる群から選択される核酸配列を含む。更に別の実施形態では、薬剤は、表1、2、3、4、若しくは5に列挙される1つ以上のバイオマーカー及び／又は当該1つ以上のバイオマーカーの基質に特異的に結合する、イントラボディ又はその抗原結合断片を含む。更に別の実施形態では、イントラボディ又はその抗原結合断片は、マウス、キメラ、ヒト化、複合体、又はヒトイントラボディである。一実施形態では、イントラボディ又はその抗原結合断片は、検出可能に標識されており、エフェクタードメインを含み、F cドメインを含み、かつ／又はF v、F a v、F (a b ') 2、F a b'、d s F v、s c F v、s c (F v) 2、及びダイアボディ断片からなる群から選択される。別の実施形態では、薬剤は、表2又は3に列挙される1つ以上のバイオマーカーのコピー数、発現レベル、及び／又は活性を増加させる。更に別の実施形態では、薬剤は、免疫療法に対するがん細胞の感受性を増加させる。更に別の実施形態では、がん細胞は、薬剤の前、後、又は薬剤と同時に免疫療法と接触する

30

40

50

。なお別の実施形態では、免疫療法は、抗がんワクチン及び／又はウイルスを含む。別の実施形態では、免疫療法は、細胞ベースの免疫療法であり、任意に、細胞ベースの免疫療法は、キメラ抗原受容体（CAR-T）療法である。別の実施形態では、免疫療法は、免疫チェックポイントを阻害する。更に別の実施形態では、免疫チェックポイントは、CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIRファミリー受容体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、GITR、4-1BB、OX-40、BTLA、SIRP、CD47、CD48、2B4（CD244）、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、ブチロフィリン、IDO、CD39、CD73、及びA2aRからなる群から選択される。なお別の実施形態では、免疫チェックポイントが、PD-1、PD-L1、及びPD-L2からなる群から選択される。更に別の実施形態では、免疫チェックポイントは、PD-1である。別の実施形態では、バイオマーカーは、表5に列挙される核酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有する核酸配列を含み、かつ／又は表5に列挙されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする。更に別の実施形態では、1つ以上のバイオマーカーは、ヒト、マウス、キメラ、又は融合バイオマーカーである。別の実施形態では、免疫療法は、（i）T細胞媒介性であり、かつ／又は（ii）薬剤は、がん細胞を含む腫瘍におけるCD8+T細胞の量を増加させる。更に別の実施形態では、薬剤は、がん細胞におけるMHCクラスI表面発現のレベルを増加させる。なお別の実施形態では、方法は、対象に、少なくとも1つの追加のがん療法又はレジメンを投与することを更に含む。別の実施形態では、少なくとも1つの追加のがん療法又はレジメンは、薬剤及び／又は免疫療法の前、後、又は同時に投与される。別の実施形態では、薬剤は、薬学的に許容される製剤で投与される。一実施形態では、がん細胞は、神経内分泌がん細胞である。別の実施形態では、神経内分泌がん細胞は、メルケル細胞がん、神経芽細胞腫、小細胞肺がん、又は神経内分泌がん細胞である。

10

20

30

40

50

【0011】

本発明の別の態様は、表1、2、3、4、又は5に列挙される少なくとも1つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を調節することによって治療することができるがん罹患しているか、又はそれを発症するリスクのある対象を特定する方法であり、当該方法は、対照と比較した対象からの細胞における主要組織適合性複合体（MHC）クラスI発現の増加又は減少レベルを検出することと、それによって、表1、2、3、4、又は5に列挙される少なくとも1つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を調節することによって治療することができるがん罹患しているか、又はそれを発症するリスクのある対象を特定することと、を含み、任意に、対象由来の細胞を含む生体試料は、対象から得られる。

【0012】

本発明の任意の態様に適用され得、かつ／又は本明細書に記載される任意の他の実施形態と組み合わせられ得る多数の実施形態が更に提供される。一実施形態では、薬剤は、表1又は4に列挙される少なくとも1つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を減少させる。別の実施形態では、方法はまた、表1又は4に列挙される少なくとも1つのバイオマーカーを阻害する薬剤を、特定された対象に推奨すること、処方すること、又は投与することを含む。更に別の実施形態では、薬剤は、表2又は3に列挙される少なくとも1つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を増加させる。別の実施形態では、本方法は、特定された対象に、免疫療法を推奨する、処方する、又は投与することを更に含む。一実施形態では、免疫療法は、抗がんワクチン、抗がんウイルス、及び／又はチェックポイント阻害剤を含む。別の実施形態では、方法は、対象に、標的療法、化学療法、放射線療法、及び／又はホルモン療法からなる群から選択されるがん療法を推奨すること、処方すること、又は投与することを更に含む。更に別の実施形態では、対照は、患者又は当該患者が属する同じ種のメンバーのいずれかに由来する、がん性又は非がん性試料に由来する試料を含む。なお別の実施形態では、対照は、既知の参照値である。一実施

形態では、がんは、神経内分泌がんである。別の実施形態では、神経内分泌がんは、メルケル細胞がん、神経芽細胞腫、小細胞肺癌、又は神経内分泌がんである。

【0013】

別の態様では、表1、2、3、4、若しくは5に列挙された1つ以上のバイオマーカー又はその断片を発現するがん罹患している対象の、免疫療法による治療に対する臨床転帰を予測するための方法が提供され、当該方法は、a) 対象試料中の表1、2、3、4、又は5に列挙される少なくとも1つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を決定することと、b) 良好な臨床転帰を有する対照中の少なくとも1つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を決定することと、c) 対象試料中及び対照中の少なくとも1つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を比較することと、を含み、対照中のコピー数、量、及び／又は活性を比較した、対象試料中の表1、2、3、4、又は5に列挙される少なくとも1つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性の存在又はわずかな変化は、対象が不良な臨床転帰を有することを示す。

10

【0014】

別の態様は、表1若しくは4に列挙される少なくとも1つのバイオマーカーのコピー数及び／若しくは量を減少させ、かつ／又は活性を阻害する薬剤と、免疫療法とで、がんを有するか、又はがんを有する疑いのある対象の治療を監視するための方法を提供し、当該方法は、第1の時間点での対象に由来する試料におけるMHCクラスI発現のレベル、及びその後の時間点での対象に由来する試料におけるMHCクラスI発現のレベルの変化又は変化がないことを検出し、それによって、対象の治療を監視することを含む。

20

【0015】

更に別の態様は、表2若しくは3に列挙される少なくとも1つのバイオマーカーのコピー数及び／若しくは量を増加させ、かつ／又は活性を阻害する薬剤と、免疫療法とで、がんを有するか、又はがんを有する疑いのある対象の治療を監視するための方法を提供し、当該方法は、第1の時間点での対象に由来する試料におけるMHCクラスI発現のレベル、及びその後の時間点での対象に由来する試料におけるMHCクラスI発現のレベルの変化又は変化がないことを検出し、それによって、対象の治療を監視することを含む。

【0016】

なお別の態様では、方法は、対象における表1又は4に列挙される少なくとも1つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を減少させる薬剤の有効性を評価するために提供され、当該方法は、対象の試料において、第1の時間点で、その後の時間点と比較した表1又は4に列挙される少なくとも1つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性の変化又は変化がないことを検出することを含み、表1又は4に列挙される少なくとも1つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性の減少は、薬剤が有効であることを示す。

30

【0017】

別の態様は、対象における表2又は3に列挙される少なくとも1つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を増加させる薬剤の有効性を評価する方法を提供し、当該方法は、対象の試料において、第1の時間点で、その後の時間点と比較した表2又は3に列挙される少なくとも1つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性の変化又は変化がないことを検出することを含み、表2又は3に列挙される少なくとも1つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性の減少は、薬剤が有効であることを示す。

40

【0018】

本発明の任意の態様に適用され得、かつ／又は本明細書に記載される任意の他の実施形態と組み合わせられ得る多数の実施形態が更に提供される。一実施形態では、第1の時間点と、その後の時間点との間で、対象が、がんの治療を受けた、治療を終了した、かつ／又は寛解中である。別の実施形態では、治療は、薬剤を対象に投与することを含む。更に別の実施形態では、第1及び／又はその後の試料は、エクスピボ又はインピボ試料を含む。なお別の実施形態では、第1及び／又は少なくとも1つのその後の試料は、対象から得られる単一試料又はプールされた試料の一部である。別の実施形態では、試料は、対象から

50

得られた細胞、血清、腫瘍周辺組織、及び／又は腫瘍内組織を含む。更に別の実施形態では、表 1、2、3、4、又は 5 に列挙される 1 つ以上のバイオマーカー。一実施形態では、がん又はがん細胞は、神経内分泌がんである。別の実施形態では、神経内分泌がんは、メルケル細胞がん、神経芽細胞腫、小細胞肺がん、又は神経内分泌がんである。更に別の実施形態では、がん又はがん細胞は、がんの動物モデルにある。なお別の実施形態では、動物モデルは、マウスモデルである。一実施形態では、がんは、哺乳類対象にある。別の実施形態では、哺乳類対象は、マウス又はヒトである。更に別の実施形態では、哺乳動物は、ヒトである。

【0019】

上述の態様及び実施形態は、免疫療法と組み合わせて阻害することが、免疫療法単独で観察されるかかる利益の欠如を考慮して予期しないがんを治療するための相乗的治療利益をもたらす、表 1、4、及び 5 に列挙されるものなどの本発明のバイオマーカーの代表的な実施形態を提供するが、免疫療法と組み合わせて、阻害よりもむしろ発現の促進（例えば、枯渇させるよりも s g R N A スクリーニングで濃縮されるように識別される）が、がんを治療するための相乗的治療利益をもたらす、本明細書（特に表 1、4、及び 5）で明確に記載される特定のバイオマーカーが容易に明らかである。したがって、本明細書及び上記に記載される任意の態様及び実施形態は、免疫療法及びがんに関する診断的、予後的、治療的等の用途において、かかるバイオマーカー及びそれらの促進された発現を使用することができる。例えば、一態様では、免疫療法と組み合わせて、表 1、4、若しくは 5 に列挙される 1 つ以上のかかるバイオマーカー、又はその断片のコピー数、発現レベル、及び／又は活性を阻害するよりもむしろ促進する薬剤とがん細胞を接触させることを含む、がん細胞を死滅させる方法が提供される。別の代表的な態様では、がんに罹患しているか、又はがんを発症する危険性のある対象が、表 1、4、又は 5 に列挙されるかかる少なくとも 1 つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を促進することから利益を受けるかどうかを決定する方法が提供され、この方法は、a) 対象から生体試料を得ることと、b) 表 1 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を決定することと、c) 対照における少なくとも 1 つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を決定することと、d) ステップ b) 及び c) で検出された少なくとも 1 つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を比較することと、を含み、対照の少なくとも 1 つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性と比較して、対象試料における表 1、4、又は 5 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性の不在又は著しい減少は、がんに罹患しているか、又はがんを発症する危険性のある対象が、表 1、4、又は 5 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を促進することから利益を得るであろうことを示す。

【0020】

更に、上述の態様及び実施形態は、免疫療法と組み合わせて促進することが、免疫療法単独で観察されるかかる利益の欠如を考慮して予期しないがんを治療するための相乗的治療利益をもたらす、表 2 及び 3 に列挙されるものなどの本発明のバイオマーカーの代表的な実施形態を提供するが、免疫療法と組み合わせて、促進よりもむしろ発現の阻害（例えば、枯渇させるよりも s g R N A スクリーニングで濃縮されるように識別される）が、がんを治療するための相乗的治療利益をもたらす、本明細書（特に表 2 及び 3）で明確に記載される特定のバイオマーカーが容易に明らかである。したがって、本明細書及び上記に記載される任意の態様及び実施形態は、免疫療法及びがんに関する診断的、予後的、治療的などの用途において、かかるバイオマーカー及びそれらの促進された発現を使用することができる。例えば、一態様では、免疫療法と組み合わせて、表 2 若しくは 3 に列挙される 1 つ以上のかかるバイオマーカー又はその断片のコピー数、発現レベル、及び／又は活性を阻害するよりもむしろ促進する薬剤とがん細胞を接触させることを含む、がん細胞を死滅させる方法が提供される。別の代表的な態様では、がんに罹患しているか、又はがんを発症する危険性のある対象が、表 2 又は 3 に列挙されるかかる少なくとも 1 つのバイオ

マーカーのコピー数、量、及び／又は活性を促進することから利益を受けるかどうかを決定する方法が提供され、この方法は、a) 対象から生体試料を得ることと、b) 表 1 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を決定することと、c) 対照における少なくとも 1 つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を決定することと、d) ステップ b) 及び c) で検出された少なくとも 1 つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を比較することと、を含み、対照の少なくとも 1 つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性と比較して、対象試料における表 2 又は 3 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性の不在又は著しい減少は、がん罹患しているか、又はがんを発症する危険性のある対象が、表 2 又は 3 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーのコピー数、量、及び／又は活性を促進することから利益を得るであろうことを示す。

10

【0021】

特許出願ファイルは、カラーで仕上げられた少なくとも 1 つの図面を含有する。カラー図面を有するこの特許又は特許出願刊行物のコピーは、申請及び必要な料金の支払い後、特許庁によって提供される。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図 1 A】MCC の古典的な特徴を示し、それらの対応する元の腫瘍を再現する患者由来 MCC 株の生成を示す。【図 1 A】MCC-336 細胞株における細胞培養培地の最適化を示すグラフである。細胞は、0、4、及び 7 日目にカウントした。

20

【図 1 B】MCC マーカー SOX2 及び CK20 の染色を有する MCC 細胞株の免疫組織化学を示す画像である。1 つの代表的なウイルス陽性 (MCC-277) 及びウイルス陰性 (MCC-350) 株を示す。

【図 1 C】古典的な MCC マーカー SOX2 及び CK20 に対する染色を用いて、新たに生成された MCC 細胞株のうちの 9 つに対する免疫組織化学を示す画像を含む。

【図 1 D-1】ビルパネル (virpanel) データを示す。

【図 1 D-2】ビルパネル (virpanel) データを示す。

【図 1 E】7 つの MCC 腫瘍及び細胞株対にわたって、上位 50 個の最も頻繁に変異した遺伝子を表示する CoMut プロットである。

【図 1 F】変異プロファイルによる MCC 腫瘍及び細胞株のクラスタリングを示す。類似性スコアは、0~1 スケールでの腫瘍と細胞株との間の変異の一致した存在又は不在に基づいて計算され、スコア 1 は、同一のプロファイルを示す。

30

【図 1 G】9 つの MCC 患者腫瘍及び対応する細胞株で構成される、RNA-seq 試料の無監督階層クラスタリングを示す。分散安定化変換発現値上の距離マトリックスを使用して、ヒートマップを構築した。上トラックは、MCPyV ゲノムへの転写物読み取りマッピングの定量化を示す。

【図 1 H】対応する腫瘍-細胞株対、腫瘍-腫瘍対、細胞株-細胞株対、及び全ての他の対合についての RNA-Seq データに基づくペアワイズスピアマン相関を示すグラフである。

【図 1 I】Riboseq によって翻訳され得る翻訳された注釈なしの ORF を示す図である。

40

【図 1 J】アイソタイプ対照 (白色の棒) と比較した、ベースライン時 (ピンク色の棒) 及び IFN- γ 応答時 (赤色の棒) の両方における 11 個の MCC 株にわたる HLA-I 表面発現のフローサイトメトリー結果 (左 y 軸) を示す。上に重ねられた黒線プロットは、対応する元の腫瘍の IHC によって HLA-I 陽性に染色された腫瘍細胞のパーセンテージを示す (右 y 軸)。

【図 1 K】HLA クラス I、HLA-DR、CD4、及び CD8 のための 4 つの元の MCC 腫瘍生検体の IHC 染色を示す。

【図 1 L】MCC-301 株及び 2 つの確立された MCPyV+ 株、MKL-1 及び WaGa における HLA-ABC 表面発現 (W6/32 抗体) を測定するフローサイトメトリ

50

一実験を示す。

【図1M】フローサイトメトリーによるMCCにおける表面MHC I発現に対するI型及びII型インターフェロンの効果を示すグラフを含む。5×10⁵個のMCC細胞を、示された用量のIFN α 2b、IFN β 、又はIFN γ で24時間処理した。代表的なヒストグラムプロットは、抗HLAクラスI又はアイソタイプ抗体で染色した細胞を示す。この実験は、MCPyV⁻株MCC-290（左）及びMCPyV⁺株MCC-301（右）において行った。

【図1N】ベースライン時（薄いピンク色）及びIFN- γ 処理後（赤色）の両方で、11個のMCC株全てにおけるHLA-DR発現のフローサイトメトリー評価を示すグラフである。

【図1O】MCC腫瘍アーカイブ試料のIHCを示す。左側は、利用可能な治療前（n=6）及び治療後（n=9）の腫瘍試料内のHLA I陽性であるMCC細胞のパーセントの要約である（以前の治療については、表6を参照されたい）。MCC細胞株は、治療後の試料に由来した。MCC-301及びMCC-336という2つのHLA I-低腫瘍の代表的なIHC画像は、右側の、MCC細胞を同定するために、HLAクラスI（褐色）についてSOX2と共染色（赤色）したものである。

【図1P】新しく生成されたMCC細胞株の成長曲線を示す。100万個の細胞を0日目に3回播種し、2日目及び4日目にカウントした。

【図1Q】MCC細胞を同定するために、HLAクラスI（褐色）についてSOX2と共染色（赤色）した、親MCC腫瘍のIHC画像を示す。

【図1R】利用可能な治療前（n=6）及び治療後（n=9）の腫瘍試料内のHLA I陽性であるMCC細胞のパーセントの要約を示す（以前の治療については、表6を参照されたい）。MCC細胞株は、治療後の試料に由来した。

【図1S】MCC FFPE腫瘍組織切片の代表的な多重免疫蛍光画像を示す。プローブとしては、DAPI核（青色）、CD8（白色）、FOXP3（黄色）、PD-1（オレンジ色）、PD-L1（緑色）、及びSOX2（マゼンタ色）が挙げられる。

【図2A】このMCC株のパネルにおけるMHC I表面発現の喪失の元となる、複数のクラスI経路遺伝子の転写抑制及びNLRC5の改変を示す。[図2A] MCC株及び対照におけるクラスI抗原提示遺伝子発現のRNA-seqヒートマップを含む。RUV法（Risso et al. (2014) Nature 32(9): 896-902）を使用し、ハウスキーピング遺伝子（Eisenberg and Levanon 2013）のセットによって、カウントを正規化した。中央のヒートマップは、ベースライン時及びIFN- γ 処理後の両方で、MCC細胞株パネルのユークリッド距離による無監督のクラスターリングを示す。左のヒートマップは、以前に確立されたMCC株MKL-1及びWaGaの参照ヒートマップである。右のヒートマップは、正常な表皮角質細胞及び皮膚線維芽細胞の参照ヒートマップである。

【図2B】ベースラインとIFN- γ で処理したMCC細胞株との間の差次的発現遺伝子（FDRカットオフ0.01未満の遺伝子は黄色で示される）の火山プロットである。DESeq2を使用して差次的発現分析を行い、陰性LFCは、+IFN- γ 試料中の発現の増加を示す。IFN遺伝子は、赤色で強調表示される。

【図2C】ベースライン時及びIFN- γ 処理後の、MCC株のうちの4つにおけるクラスI経路遺伝子のプロテオミクス発現値の無監督のクラスターリングを示す。

【図2D】ベースライン時及びIFN- γ 処理後の両方で、MCC株のうちの4つにおける主要なIFN- γ 経路成分の相対的発現を示すプロテオミクスヒートマップである。

【図2E】未処理の細胞株とIFN- γ で処理した細胞株との間の正規化されたSTAT1ペプチドカウント（左）及びSTAT-Y701yホスホサイト（phosphosite）カウント（右）の標的分析を要約するグラフを含む。

【図2F】MCC-336（MCPyV⁺）及び-350（MCPyV⁻）新鮮な腫瘍試料からのscRNA-seqデータを示す。全ての細胞のUMAP（一様多様体の近似及び投影）視覚化が表示され、クラスター（左）及び試料（中央）別に着色される。右側は

10

20

30

40

50

、全てのクラスター（クラスター 0～5＝MCC 細胞、クラスター 6＝免疫細胞）にわたる HLA-A、-B、-C、及び B2M の発現レベルである。

【図 2 G】MCC-336 及び -350 腫瘍試料内の MCC マーカー SOX2、ATOH1、及びシナプトフィシン（SYN）、並びに免疫細胞マーカー PTPRC（CD45）の scRNA-seq 発現のチャートを含む。

【図 2 H】全てのクラスター（クラスター 0～5：MCC、クラスター 6：免疫細胞）にわたる追加の HLA クラス I 遺伝子の scRNA-seq 発現を示すグラフを含む。

【図 2 I】NLRC5 コピー数の損失が、MCC において一般的であることを示す。Log₂ コピー数の比は、クラス I 抗原提示遺伝子（左）及び NLRC5 が位置する染色体 16（右）について表示される。赤色及び青色は、それぞれ、コピー数の獲得及び喪失を意味する。

【図 2 J】11 個の MCC 細胞株からの RNA-seq データから生成されたクラス I 遺伝子と NLRC5 との間のピアソン相関プロットを示すグラフを含む。P 値は、多重比較のために調整されていない。

【図 2 K】全ゲノム亜硫酸水素塩配列決定から生成された、MCC 株のうちの 8 つにおけるクラス I 経路遺伝子のプロモーター平均メチル化値の無監督のクラスタリングを示す。

【図 2 L】クラス I 遺伝子の TSS+/-5 kb 及びハウスキーピング遺伝子 TBP に焦点を当てた、MCC 株のうちの 8 つにおける ATAC-seq 正規化読み取りカバレッジのグラフである。GEO 及び ENCODE からのもを含む全てのデータセットは、RPKM によって正規化された（方法を参照のこと）。

【図 2 M】シストローム DB 上の MCC 株とデータセットとの間のユニオン DNase-1 高感受性領域（DHS）内に収まるピークのパーセンテージを比較するグラフである。中央値レベル（左）及び完全分布（右）との比較を示す。

【図 2 N】MCC 株にわたる総濃縮ピーク数、5 倍濃縮ピーク数、及び 10 倍濃縮ピーク数を、シストローム DB データセットの中央値と比較するグラフである。破線は、500 のピーク数を表す。

【図 2 O-1】試料にわたるピーク保存を示すグラフである。

【図 2 O-2】試料にわたるピーク保存を示すグラフである。

【図 3 A】IFN γ が、HLA ペプチドームを増加及び改変することを示す。【図 3 A】MCC-277、-290、及び -301 の腫瘍及び細胞株試料中の各 HLA 対立遺伝子に結合することが予測されるペプチドの頻度を示すグラフを含む。

【図 3 B】HLA クラス I 上に提示される検出されたペプチドの数が、原発性腫瘍及び腫瘍由来細胞株については低い、IFN γ 処理後に増加したことを示す。

【図 3 C】モチーフ空間における腫瘍、細胞株、及び細胞株 + IFN γ のペプチド配列の相関を示すヒートマップである。

【図 3 D】MCC2314 の腫瘍及び細胞株において検出されたペプチドの対立遺伝子分布を示す円グラフを含む。

【図 3 E】MCC290 及び 301 の腫瘍、細胞株、及び細胞株 + IFN γ 試料のモチーフ変化を示すグラフを含む。この図はまた、MCC-290（MCPyV⁻）及び -301（MCPyV⁺）細胞株の未処理試料と IFN- γ 処理試料との間の 9mer モチーフの変化を示す。

【図 3 F】細胞株 + / - IFN γ で検出されたペプチドの対立遺伝子分布を示すグラフを含む。細胞株で検出された提示されたペプチドの HLA 対立遺伝子分布を、ベースライン時及び IFN- γ 処理後に示す。各 HLA 対立遺伝子は、異なる色によって表される。

【図 3 G】IFN 処理後の HLA タイプごとのペプチド提示の増加を示すグラフを含む。この図は、HLA-A（左）、-B（中央）、及び -C（右）について分析された全ての MCC 株にわたる IFN- γ 処理時に HLA 遺伝子ごとに提示されたペプチドの変化の要約を示す。

【図 3 H】細胞株 + / - IFN γ で検出されたペプチドの対立遺伝子分布を示すグラフを含む。

10

20

30

40

50

【図 3 I】IFN 処理後の HLA タイプごとのペプチド提示の増加を示すグラフを含む。

【図 3 J】MCC367 における大型 T 抗原を表すペプチドの質量スペクトルの読み出しである。

【図 3 K】ベースライン時（灰色の棒）及び IFN- γ 処理後（赤色の棒）の MCC 株において HLA-I 上に提示される検出されたペプチドの数を示す。CL = 細胞株（左）。ベースライン時及びモチーフ空間における IFN- γ 処理後の MCC 株間のペプチド配列の相関ヒートマップ（右）。

【図 3 L】ELISPOT で DMSO、HIV-GAG 陰性対照ペプチド、自己 MCC-367 腫瘍細胞、又はパネル F の MCC-367 HLA ペプチドームで同定された大型 T 抗原由来ペプチドと共培養した患者 MCC-367 からの末梢血単核細胞（PBMC）による IFN- γ 分泌を示す。左-ELISPOT 条件を 3 回実施した。右-要約統計（平均値±標準偏差）。P 値は、一元配置分散分析、続いて事後 Tukey 多重比較検定によって決定された。

【図 3 M】免疫ペプチドームワークフローの概略図を示す。HLA 分子を腫瘍及び細胞株材料から免疫沈降させ、ペプチドを HLA 複合体から溶出させ、LC-MS/MS によって分析する。データベース検索後、ペプチドは、HLAthena における予測によって、最も可能性の高い対立遺伝子に割り当てられる。

【図 3 N】ベースライン細胞株と IFN- γ 処理細胞株試料との間の 9mer のモチーフ変化を示す。

【図 4 A】MCC における MHC クラス I 表面発現の既知及び新規の制御因子を同定するための対合ゲノムスケール CRISPR 及び ORF スクリーニングを示す。【図 4 A】ゲノムスケールスクリーニングワークフローを示す。1 億 5000 万個の MCC-301 細胞を、低い感染多重度でライブラリレンチウイルス（Brunello CRISPR-KO 又はヒト ORFeome v8.14）で形質導入し、次いでピューロマイシンで 3 日間選択した。その後、細胞を抗 HLA-ABC 抗体（W6/32 クローン）で染色し、MHC I-高集団及び低集団（上位及び下位 10%）をフローサイトメトリーで選別した。各スクリーニングを 3 回繰り返した。

【図 4 B】形質導入の 2 日後及び 20 日後に、ヒト ORFeome v8.1 ライブラリレンチウイルスで形質導入された MCC-301 細胞における HLA I 表面発現（W6/32 抗体）のフローサイトメトリー評価を示すグラフを含む。対照としては、GFP ORF ウイルスで形質導入された MCC-301 細胞、ウイルスなし対照（代わりに培地が添加された）、及び非形質導入細胞が挙げられる。

【図 4 C】図 4 F の選別された各集団について、 $\log_2$ 正規化構築物スコア [$\log_2$ （構築物読み取り／総読み取り $\times 106 + 1$ ）] の分布を示すチャートである。

【図 4 D】機能獲得 ORF スクリーニングの結果を示す。遺伝子を、MHC I-高集団対低集団におけるそれらの $\log$ 倍変化濃縮に従ってランク付けした。インセット：ORF ポジティブヒットで濃縮された選択された遺伝子セットを示す GSEA 分析。

【図 4 E】機能喪失 CRISPR-KO スクリーニングの結果を示す。MHC I-高集団対低集団における $\log$ 倍率変化濃縮に基づくガイド RNA ランクを、STARS アルゴリズムに入力して、ネガティブ（右）ヒット及びポジティブ（左）ヒットの遺伝子レベルランキングを生成した。インセット：CRISPR ポジティブヒット及びネガティブヒットで濃縮された選択された遺伝子セットを示す GSEA 分析。MCC-301 ORF 株における表面 MHC I のフローサイトメトリー。

【図 4 F】ORF（左）及び CRISPR（右）スクリーニングからの細胞の選別された集団を示す。

【図 4 G】参照として示される対照非標的又は遺伝子間 sgRNA のセットの分布を有する、USP7、BCORL1、及び PCGF1 についての 3 つの最高スコアの sgRNA の平均 LFC 濃縮を示すグラフである。

【図 4 H】示される個々の ORF で形質導入された MCC-301（左）及び MCC-277（右）細胞における表面 HLA-I（W6/32 抗体）のフローサイトメトリーを示

10

20

30

40

50

す。

【図 4 I】ORFスクリーニング（上）及びCRISPRスクリーニング（下）の2つの複製物間の遺伝子レベルのLFC（全ての構築物の平均LFC）の散布図である。注目すべきスクリーニングヒットは、赤色又は青色で強調表示される。

【図 4 J】MCC-301 PRC1.1 KO株における表面MHC Iのフローサイトメトリー結果を要約するグラフである。MCC-301細胞は、Cas9、及び対照sgRNA又はPRC1.1成分BCORL1、PCGF1、若しくはUSP7を標的とするsgRNAのいずれかを含有するレンチウイルスで形質導入された。細胞をピューロマイシンで3日間選択し、Sanger配列決定及びウエスタンブロット又はqRT-PCRを介してノックアウトを確認した。細胞を抗HLA-ABC (W6/32)で染色し、BD LSRT Fortessaで分析した。各条件を技術的に3回繰り返した。

【図 4 K】PRC1.1成分及びMYCLの概略図であり、黄色はスクリーニングヒットを示し、緑色はMCPyVウイルス抗原と相互作用することも報告されているスクリーニングヒットを示す。

【図 4 L】PRC1.1 KO株のTIDE分析の表及び読み出しを含む。この表は、各ノックアウト株におけるインデルを有する細胞のパーセンテージを、TIDEソフトウェアを使用して決定したことを示す (Brinkman et al., 2014)。TIDEトレーシングは、MCC-301におけるPCGF1-2 KO株の分析例である。

【図 4 M】MYCLのレスキュー発現を有するdox誘導性対照shRNA、MYCL shRNA MYCL、又はMYCL shRNAで形質導入されたMKL-1細胞における表面HLA-Iのフローサイトメトリーを示す。上パネルは、代表的なフローヒストグラムを示し、中央パネルは、各条件 (n=3) の平均MFI (doxで処理されていない対応する試料に対して正規化) を示し、下パネルは、各細胞株におけるMYCL発現レベルのウエスタンブロットを示す。P値は、一元配置分散分析、続いて事後Tukey多重比較検定によって決定された。

【図 4 N】スクランブル対照shRNAと比較して、MYCLに対するshRNAを発現するMKL-1細胞におけるLFC発現を示すRNA-seq火山プロットを示す。p_{adj} < 0.05及びlog₂-倍率変化 (LFC) > 1を有するクラスI APM遺伝子は、赤色で強調表示され、他の注目すべきクラスI遺伝子は、黒色である。

【図 4 O】スクランブル対照shRNAと比較して、ST抗原及びLT抗原の両方に対するshRNAを発現するWaGa細胞におけるLFC発現を示すRNA-seq火山プロットを示す。p_{adj} < 0.05及びLFC > 1を有するクラスI APM遺伝子は、赤色で強調表示され、他の注目すべきクラスI遺伝子は、黒色である。

【図 4 P】IFN-γ処理後のダブルガイドPCGF1 KO株における表面HLA-Iのフローサイトメトリーを示す。

【図 4 Q】様々な濃度のIFN-γに応答する、MKL-1細胞におけるTAP1及びTAP2のウエスタンブロット定量を示す。

【図 5 A】MYCLが、MCPyV+MCCにおけるHLA Iを抑制し、MCPyV-MCC及び他のがんにおいて関連することを示す。【図 5 A】MCPyV+MKL-1細胞におけるMYCL shRNAノックダウン対スクランブルshRNA対照の火山プロットである。p_{adj} < 0.05及びLFC > 1を有するクラスI遺伝子は、赤色で強調表示され、他の注目すべきクラスI遺伝子は、黒色である。

【図 5 B】スクランブルshRNA対照と比較した、MKL-1 shMYCL細胞内で上方制御された遺伝子のGSEA分析におけるGO用語GO_ANTIGEN_BINDINGの濃縮を示す (図 3 E)。

【図 5 C】MCPyV+WaGa株における、汎T抗原shRNAノックダウン対スクランブル対照shRNAの火山プロットである。p_{adj} < 0.05及びLFC > 1を有するクラスI遺伝子は、赤色で強調表示され、他の注目すべきクラスI遺伝子は、黒色である。

【図 5 D】スクランブルshRNA対照と比較して、EP400に対する2つのshRN

10

20

30

40

50

A (s h E P 4 0 0 - 2 又は s h E P 4 0 0 - 3) のうちの 1 つで形質導入された M K L - 1 細胞の差次的発現分析を示す。赤色は、 $L F C > 1$ 及び $p a d j < 0.01$ を有する H L A - I 遺伝子を示す。三角形は、 $p a d j$ 値が $D e S e q 2$ によってゼロとして報告され、その後、データセット内の最も低い非ゼロ $p a d j$ 値でプロットされた遺伝子を示す。

【図 5 E】全ゲノム配列決定が行われたウイルス陰性 M C C 株のうちの 4 つにおける M Y C ファミリー遺伝子のコピー数変動を示す。C N の獲得及び喪失は、それぞれ赤色及び青色で示される。灰色は、C N V データがないことを示す。

【図 5 F】C a n c e r C e l l L i n e E n c y c l o p e d i a における全ての利用可能ながん細胞株にわたるクラス I 経路遺伝子及び M Y C ファミリー遺伝子の R N A - s e q 発現値の無監督のクラスタリングを示す。各がんタイプについて、そのがん分類の全ての細胞株からの発現中央値を使用した。カラースケールは、最小行～最大行である。

【図 5 G】H L A クラス I 遺伝子の R N A - s e q 分析のヒートマップと、52 個の M C C 腫瘍のコホートにわたる注目すべきスクリーニングヒットと、ピアソン相関を使用した無監視の階層クラスタリングヒートマップとを含む。上トラック：E S T I M A T E によって生成された各腫瘍の腫瘍純度スコア (Y o s h i h a r a e t a l., (2013) N a t u r e C o m m u n i c a t i o n s 4 : 2 6 1 2)。下トラック：腫瘍のウイルス状態 (オレンジ色 = 陽性、緑色 = 陰性)。右：V P 及び V N 試料におけるクラス I 遺伝子とスクリーニングヒットとの間の類似性マトリックス。青色及び赤色は、それぞれ負及び正のピアソン相関係数を示し、円サイズが大きいほど、より小さい p 値に対応する。P 値は、多重比較のために補正されていない。

【図 5 H】M C C - 3 0 1 P R C 1. 1 K O 株 (P C G F 1、U S P 7、及び B C O R L 1) における表面 H L A - I のフローサイトメトリーを示す。各遺伝子について最も高い又は 2 番目に高いスコアリング s g R N A のいずれかを使用して、ノックアウト株を作製した。W T M C C - 3 0 1 における P C G F 1 (上) 及び U S P 7 (下) のウエスタンブロット、非標的化 s g R N A 及び C a s 9 で形質導入された対照 M C C - 3 0 1 株、又は示されたノックアウトライン。

【図 5 I】非標的化 s g R N A 及び C a s 9 対照で形質導入された M C C - 3 0 1 と比較した、M C C - 3 0 1 P C G F 1 - K O 株における遺伝子発現の L F C を示す R N A - s e q 火山プロットを示す。インセット：P C G F 1 - K O 株で上方制御された遺伝子内の P R C 2 標的の濃縮を示す G S E A プロット。

【図 5 J】様々な I F N - γ 濃度の非標的化対照及び P C G F 1 - K O 株における T A P 1 タンパク質レベルを示すウエスタンブロットを示す。

【図 6 A】P R C 1. 1 成分 U S P 7 の薬理的阻害が、M C P y V + 及び M C P y V - M C C における H L A I を上方制御し、M Y C L 媒介性 H L A I 抑制を媒介することを示す。【図 6 A】M A X (赤色)、E P - 4 0 0 (青色)、M C P y V S T 抗原 (ピンク色)、及び活性化ヒストンマーク H 3 K 4 m e 3 及び H 3 K 2 7 A c (黒色) についての C h I P - s e q トラックを有する U S P 7 及び P C G F 1 のゲノムブラウザ図である。

【図 6 B】M A X (赤色)、E P - 4 0 0 (青色)、M C P y V S T 抗原 (ピンク色)、及び活性化ヒストンマーク H 3 K 4 m e 3 及び H 3 K 2 7 A c (黒色) についての C h I P - s e q トラックを有する B C O R 及び B C O R L 1 のゲノムブラウザ図である。

【図 6 C】C h I P - q P C R が、M A X (左) 又は E P 4 0 0 (右) 抗体のいずれかで免疫沈降した M K L - 1 クロマチンを使用して、U S P 7 及び P C G F 1 プロモーターを標的とすることを示すグラフを含む。

【図 6 D】U S P 7 阻害剤 X L 1 7 7 A 又は対照化合物 X L 1 7 7 B で処理した M C C 株における H L A - I 表面レベルを測定するフローサイトメトリー実験を示す。Y 軸は、阻害剤で処理した細胞において M F I (H L A - A B C) を示し、D M S O で処理した細胞の平均 M F I (H L A - A B C) に対して正規化される。試料調製及びフローサイトメ

10

20

30

40

50

リー分析は、各条件について技術的に3回行った。**は、 $P < 0.01$ であり、*は、 $P < 0.05$ であり、n.s.は、 $P \geq 0.05$ である。

【図6E】Cancer Dependency Map (DepMap) (Dempster et al., (2019) bioRxiv, doi.org/10.1101/720243)、Meyers et al., (2017) Nature Genetics 49 (12): 1779-84)からのCRISPR依存性データを示すチャート及びプロットを含み、これは、TP53変異状態 (TP53-mut (n=532) 対TP53-wt (n=235)) に基づいて層別化された。左: ポリコム遺伝子が強調表示された、USP7と共依存する上位遺伝子のピアソン相関係数及びFDR。右: TP53-WT (青色) 及びTP53-mut細胞株 (赤色) におけるUSP7対ポリコム遺伝子PCGF1及びRING1の依存性のグラフィカルな比較。

【図6F】ピアソン相関によって決定される、TP53-mutがん細胞株内のUSP7とのそれらの共依存度に基づく遺伝子のGSEA分析である (図6D)。より高い共依存性を示す遺伝子は、GO_HISTONE_UBIQUITINATION及びGO_HISTONE_H2A_UBIQUITINATIONという用語について最も高い濃縮度を有した。

【図6G】MAX (左) 又はEP400 (右) 抗体のいずれかで免疫沈降されたMKL-1クロマチンを使用して、USP7及びPCGF1プロモーターを標的とするChIP-qPCRを示す。各条件を3回繰り返し、一元配置分散分析、続いて事後ダネット多重比較検定を行うことによってp値を計算した。

【図6H】MKL-1 p53-WT対照株 (左) 又はp53-KO株 (右) におけるUSP7阻害剤の効果を評価するためのHLA-Iフローサイトメトリーを示す。細胞を、100 nMのXL177A (赤色)、XL177B (黒色)、又はDMSO (薄灰色) で処理した。

【図6I】未処理細胞 (灰色) (n=2複製) と比較した、XL177A (赤色) 又はXL177B (黒色) で処理したMCC-301細胞のHLA-I提示ペプチドーム内のペプチド存在量のヒートマップを示す。任意の2つの処理群 (2試料t検定によって決定される) の間で著しく差次的に発現されたペプチドのみを示す。

【図6J】未処理細胞と比較した、XL177A又はXL177Bで処理されたMCC-301細胞における各HLA対立遺伝子上に提示されるペプチドの頻度を示す。

【図6K】対照株 (WT、SCR、AAVS1) と比較した、3つのMKL-1 p53 KO株におけるp53のウェスタンブロットを示す。

【図6L】フローサイトメトリーによって決定された、XL177A、XL177B、又はDMSOで処理されたMKL-1 p53 KO株の細胞周期相の分布を示す。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本明細書では、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカー (例えば、MYCL) 又は1つ以上のPRC1.1複合体メンバー (PCGF1、BCORL1、及びUSP7など) の制御因子を使用して、細胞上の表面MHC-I発現を調節し、免疫応答を調節し、腫瘍免疫及び免疫療法に対する応答性を増強することができることが決定されている。例えば、(a) 表1若しくは表4に列挙される1つ以上のバイオマーカーのコピー数、発現レベル、及び/若しくは活性を減少させること、並びに/又は (b) 表2若しくは表3に列挙される1つ以上のバイオマーカーのコピー数、発現レベル、及び/若しくは活性を増加させることは、細胞上のMHC-I発現の増加、及び免疫療法に対する応答性の増加を伴う免疫応答の増加をもたらす、これは、がん、感染症などの免疫応答の増加から利益を受け得る障害を治療するのに有用である。同様に、(a) 表1若しくは表4に列挙される1つ以上のバイオマーカーのコピー数、発現レベル、及び/若しくは活性を増加させること、並びに/又は (b) 表2若しくは表3に列挙される1つ以上のバイオマーカーのコピー数、発現レベル、及び/若しくは活性を減少させることは、細胞上のMHC-I発現の減少、及び免疫療法に対する応答性の減少を伴う免疫応答の減少をもたらす、これは、

自己免疫障害のような免疫応答の減少から利益を受け得る障害を治療するのに有用である。

【0024】

したがって、いくつかの実施形態では、本開示は、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの陰性制御因子と免疫療法との組み合わせを用いて、がん、例えば、さもないと免疫療法に反応しないか、又は弱応答性のがんタイプの治療などの免疫応答を増加させる方法を提供する。本発明は、かかる制御因子を阻害する例示的なRNA干渉剤及び小分子を提供し、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの機能及び／又は能力を阻害する薬剤などの、本明細書に記載される併用療法及び他の方法で 사용할 ことができる。同様に、かかる制御因子の調節因子についてスクリーニングする方法、及びかかる阻害剤／免疫療法併用療法を伴うがんを診断、予後、及びモニタリングする方法が提供される。

10

【0025】

I. 定義

「a」及び「an」という冠詞は、冠詞の文法的目的語の1つ又は1つより多く（すなわち、少なくとも1つ）を指すために本明細書で使用される。一例として、「要素（an element）」は、1つの要素又は1つより多い要素を意味する。

【0026】

「改変した量」又は「改変したレベル」という用語は、対照試料中のバイオマーカー核酸の発現レベル又はコピー数と比較して、あるがん試料中のバイオマーカー核酸のコピー数（例えば、生殖細胞系及び／若しくは体細胞系）の増加又は減少、例えば、発現レベルの増加又は減少を指す。バイオマーカーの「改変した量」という用語は、正常対照試料中のバイオマーカータンパク質の対応するタンパク質レベルと比較した、ある試料（例えば、がん試料）中のバイオマーカータンパク質のタンパク質レベルの増加又は減少も含む。更に、バイオマーカータンパク質の改変した量は、バイオマーカータンパク質の発現又は活性に影響を及ぼし得る、マーカーのメチル化状態などの翻訳後修飾を検出することによって決定され得る。

20

【0027】

対象におけるバイオマーカーの量は、バイオマーカーの量が、それぞれ、正常レベルよりも、量を評価するために用いられるアッセイの標準誤差を超える量だけ、好ましくはその量よりも少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%高いか、又は低い場合、バイオマーカーの正常量よりも「有意に」高いか、又は低い。あるいは、対象におけるバイオマーカーの量は、その量が、それぞれ、バイオマーカーの正常量よりも少なくとも約2倍、好ましくは少なくとも約3倍、4倍、又は5倍高いか、又は低い場合、正常量よりも「有意に」高いか、又は低いとみなされ得る。かかる「有意性」は、例えば、発現、阻害、細胞毒性、細胞成長等についての本明細書に記載される任意の他の測定されたパラメータにも適用され得る。

30

【0028】

バイオマーカーの「改変した発現レベル」という用語は、発現又はコピー数を評価するために用いられるアッセイの標準誤差よりも高いか又は低く、好ましくは対照試料（例えば、関連疾患を有しない健常対象由来の試料）中のバイオマーカーの発現レベル又はコピー数、及び好ましくはいくつかの対照試料中のバイオマーカーの平均発現レベル又はコピー数の少なくとも2倍、より好ましくは3倍、4倍、5倍、若しくは10倍、又はそれ以上である、試験試料、例えば、がん罹患している患者に由来する試料中のバイオマーカーの発現レベル又はコピー数を指す。改変した発現レベルは、発現又はコピー数を評価するために用いられるアッセイの標準誤差よりも高いか又は低く、好ましくは、対照試料（例えば、関連する疾患を有していない健常対象由来の試料）中のバイオマーカーの発現レベル又はコピー数、好ましくは、いくつかの対照試料中のバイオマーカーの平均発現レベ

40

50

ル又はコピー数の少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、又はそれ以上である。いくつかの実施形態では、バイオマーカーのレベルは、バイオマーカー自体のレベル、修飾バイオマーカー（例えば、リン酸化バイオマーカー）のレベル、又は対照（例えば、リン酸化されていないバイオマーカーに対するリン酸化バイオマーカー）などの別の測定された変数に対するバイオマーカーのレベルを指す。

【0029】

バイオマーカーの「改変した活性」という用語は、正常対照試料中のバイオマーカーの活性と比較した、例えば、がん試料中の疾患状態を増加又は減少させるバイオマーカーの活性を指す。バイオマーカーの改変した活性は、例えば、バイオマーカーの改変した発現、バイオマーカーの改変したタンパク質レベル、バイオマーカーの改変した構造、又は、例えば、バイオマーカーと同じ若しくは異なる経路に関与する他のタンパク質との改変した相互作用、又は転写活性化因子若しくは阻害剤との改変した相互作用の結果であり得る。

10

【0030】

マーカーの「改変した構造」という用語は、バイオマーカー核酸又はタンパク質内の変異又は対立遺伝子バリエーション、例えば、正常若しくは野生型の遺伝子又はタンパク質と比較した、バイオマーカー核酸又はタンパク質の発現又は活性に影響を及ぼす変異の存在を指す。例えば、変異には、置換、欠失、又は付加変異が含まれるが、これらに限定されない。変異は、バイオマーカー核酸のコーディング領域又は非コーディング領域に存在し得る。

20

【0031】

本明細書で別途特定されない限り、「抗体 (antibody)」及び「抗体 (antibodies)」という用語は、「細胞内抗体」として細胞内で発現されるように適合可能な抗原結合部分を指す。(Chen et al. (1994) Human Gene Ther. 5:595-601)。一本鎖抗体 (scFv) の使用、超安定性のための免疫グロブリンVLドメインの修飾、低減する細胞内環境に抵抗するための抗体の修飾、細胞内安定性を増加させ、かつ／又は細胞内局在化を変調する融合タンパク質の生成等の、細胞内部分を標的化（例えば、阻害）するために抗体を適応させる方法は、当該技術分野において周知である。細胞内抗体は、多細胞生物の1つ以上の細胞、組織又は器官において、例えば、予防及び／又は治療目的で（例えば、遺伝子療法として）導入及び発現することもできる（少なくともPCT公開第08/020079号、同第94/02610号、同第95/22618号、及び同第03/014960号；米国特許第7,004,940号；Cattaneo and Biocca (1997) Intracellular Antibodies: Development and Applications (Landes and Springer-Verlag publs.)；Kontermann (2004) Methods 34:163-170；Cohen et al. (1998) Oncogene 17:2445-2456；Auf der Maur et al. (2001) FEBS Lett. 508:407-412；Shaki-Loewenstein et al. (2005) J. Immunol. Meth. 303:19-39を参照のこと）。

30

40

【0032】

抗体は、ポリクローナル若しくはモノクローナル、異種、同種、若しくは同系、又はこれらの改変形態（例えば、ヒト化、キメラ等）であり得る。抗体は、完全にヒトである場合もある。好ましくは、本発明の抗体は、バイオマーカーポリペプチド又はその断片に特異的に結合するか、又は実質的に特異的に結合する。本明細書で使用される「モノクローナル抗体」及び「モノクローナル抗体組成物」という用語は、抗原の特定のエピトープと免疫反応することができる1種のための抗原結合部位を含む抗体ポリペプチドの集団を指し、「ポリクローナル抗体」及び「ポリクローナル抗体組成物」という用語は、特定の抗原

50

と相互作用することができる複数の種の抗原結合部位を含む抗体ポリペプチドの集団を指す。モノクローナル抗体組成物は、典型的には、それが免疫反応する特定の抗原に対する単一結合親和性を呈する。

【0033】

抗体は、「ヒト化」されていてもよく、ヒト化とは、ヒト細胞によって作製され得る、更に厳密に似た抗体に改変された可変領域及び定常領域を有する非ヒト細胞によって作製された抗体を含むことを意図している。例えば、非ヒト抗体アミノ酸配列を改変することにより、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に見られるアミノ酸を組み込む。本発明のヒト化抗体は、例えば、CDRに、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダム若しくは部位特異的変異誘発によって、又はインビボでの体細胞変異によって導入される変異）を含み得る。本明細書で使用される「ヒト化抗体」という用語は、マウス等の別の哺乳類種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列にグラフトされた抗体も含む。

10

【0034】

「割り当てられたスコア」という用語は、患者試料中で測定された後の各バイオマーカーについて指定された数値を指す。割り当てられたスコアは、試料中のバイオマーカーの不在、存在、又は推定量と相関する。割り当てられたスコアは、手動で（例えば、目視検査によって）、又は画像取得及び分析のための計装を用いて生成され得る。特定の実施形態では、割り当てられたスコアは、定性的評価、例えば、階調スケールでの蛍光読み出しの検出、又は定量的評価によって決定される。一実施形態では、複数の測定されたバイオマーカーからの割り当てられたスコアの組み合わせを指す「集計スコア」が決定される。一実施形態では、集計スコアは、割り当てられたスコアの合計である。別の実施形態では、割り当てられたスコアの組み合わせは、それらを集計スコアに組み合わせる前に、割り当てられたスコアに対して数学的演算を行うことを含む。特定の実施形態では、集計スコアは、本明細書では「予測スコア」とも称される。

20

【0035】

「バイオマーカー」という用語は、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカー、例えば、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカー（例えば、MYCL）並びに／又は1つ以上のPRC1.1複合体メンバー（例えば、PCGF1、BCORL1、及びUSP7）の1つ以上の阻害剤を含む、併用療法の効果を予測すると決定された本発明の測定可能な実体を指す。バイオマーカーには、表、実施例、図で示されるもの、及び他の方法で本明細書に記載されているものを含む、核酸及びタンパク質が含まれ得るが、これらに限定されない。本明細書に記載されるように、コピー数、量、活性、位置、修飾（例えば、リン酸化）等の、バイオマーカーの任意の関連する特徴を使用することができる。

30

【0036】

「遮断」抗体又は抗体「アンタゴニスト」は、それが結合する抗原の少なくとも1つの生物学的活性を阻害するか、又は低減するものである。特定の実施形態では、本明細書に記載の遮断抗体又はアンタゴニスト抗体又はその断片は、抗原の所与の生物学的活性を実質的又は完全に阻害する。

【0037】

「体液」という用語は、身体から排泄又は分泌される流体、並びに通常は身体から排泄又は分泌されない流体（例えば、羊水、房水、胆汁、血液及び血漿、脳脊髄液、耳垢（cerumen）及び耳垢（earwax）、カウパー液又は前射精液、乳糜、糜粥、糞便、雌性射出液、間質液、細胞内液、リンパ液、月経、母乳、粘液、胸膜液、膿汁、唾液、皮脂、精液、血清、汗、滑液、涙、尿、腔粘滑液、硝子体液、嘔吐物）を指す。

40

【0038】

「がん」又は「腫瘍」又は「過剰増殖性」という用語は、制御不能な増殖、不死性、転移能、速い成長及び増殖速度、並びにある特定の特有の形態学的特徴等のがんを引き起こす細胞に特有の特性を有する細胞の存在を指す。特に断りのない限り、これらの用語は、化生を含む。いくつかの実施形態では、かかる細胞は、表1～5に列挙される1つ以上の

50

バイオマーカーによって制御されるシグナル伝達経路の発現及び活性に起因して、かかる特徴を部分的に又は完全に示す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるがん細胞は、免疫療法のうちの少なくとも1つに対して感受性ではない。いくつかの実施形態では、がん細胞は、本明細書に記載される発現及び／又は機能を阻害するなど、本明細書に記載されるバイオマーカーの制御因子を拮抗することができる薬剤で治療可能である。

【0039】

がん細胞は、多くの場合、腫瘍の形態にあるが、かかる細胞は、動物に単独で存在し得るか、又は白血病細胞等の非腫瘍形成性がん細胞であり得る。本明細書で使用される場合、「がん」という用語は、前がん状態及び悪性がんを含む。がんには、B細胞がん、例えば、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖病、例えば、アルファ鎖病、ガンマ鎖病、及びミュー鎖病等、良性単クローン性ガンマグロブリン血症、並びに免疫球性アミロイドーシス、黒色腫、乳がん、肺がん、気管支がん、結腸直腸がん、前立腺がん、膵臓がん、胃がん、卵巣がん、膀胱がん、脳又は中枢神経系がん、末梢神経系がん、食道がん、子宮頸がん、子宮又は子宮内膜がん、口腔又は咽頭がん、肝臓がん、腎臓がん、睾丸がん、胆道がん、小腸又は虫垂がん、唾液腺がん、甲状腺がん、副腎がん、骨肉腫、軟骨肉腫、血液学的組織がん等が含まれるが、これらに限定されない。本発明によって包含される方法に適用可能ながんのタイプの他の非限定的な例には、ヒト肉腫及びがん腫、例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑液腫瘍、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸がん、結腸直腸がん、膵臓がん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、扁平上皮がん、基底細胞がん、腺がん、汗腺がん、脂腺がん、乳頭がん、乳頭腺がん、嚢胞腺がん、髄様がん、気管支がん、腎細胞がん、肝がん、胆管がん、肝臓がん、絨毛腫、精上皮腫、胎生期がん、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、骨がん、脳腫瘍、睾丸がん、肺がん、小細胞肺がん、膀胱がん、上皮がん、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、例えば、急性リンパ性白血病及び急性骨髄性白血病（骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、及び赤白血病）、慢性白血病（慢性骨髄性（顆粒球性）白血病及び慢性リンパ球性白血病）、及び真性赤血球増加症、リンパ腫（ホジキン病及び非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、並びに重鎖病が挙げられる。いくつかの実施形態では、がんは、本来、上皮がんであり、がんには、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸がん、婦人科がん、腎臓がん、喉頭がん、肺がん、口腔がん、頭頸部がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、又は皮膚がんが含まれるが、これらに限定されない。他の実施形態では、がんは、乳がん、前立腺がん、肺がん、又は結腸がんである。なお他の実施形態では、上皮がんは、非小細胞肺がん、非乳頭状腎細胞がん、子宮頸がん、卵巣がん（例えば、漿液性卵巣がん）、又は乳がんである。上皮がんは、漿液性、類内膜、粘液性、明細胞、プレナー、又は未分化を含むが、これらに限定されない様々な他の方法で特徴付けられ得る。

【0040】

本明細書で使用される場合、「神経内分泌がん」又は「神経内分泌腫瘍」は、神経内分泌系から生じるか、又は発がん性プロセスを通じて神経内分泌細胞の特性を獲得する非神経内分泌細胞から生じるもののいずれかである。ほとんどの成人神経内分泌腫瘍は、カルチノイド、フェオクロモサイトーマ、及びメルケル細胞腫瘍を含む、既知の原発部位から生じる。カルチノイド腫瘍は、良性又は悪性であり得る。カルチノイドがんとしては、胃、膵臓、結腸、肝臓、肺（例えば、小細胞がん）、卵巣、乳がん、精巣、及び子宮頸がんが挙げられる。小細胞がんは、早期にしばしば転移する傾向がある大型の中樞を起源とする。フェオクロモサイトーマは、副腎によるカテコールアミンの過剰産生を引き起こす、副腎髄質のがんである。皮膚の神経内分泌がんであるメルケル細胞がんは、皮膚上又は皮膚下に形成されるがんである。メルケル細胞がんは、皮膚の下にある軟組織から生じ得、急速に成長し、しばしば身体他の部分に広がる。

【0041】

特定の実施形態では、がんは、メルケル細胞がんを包含する。MCCは、1972年にTokerによって、カルチノイド特徴を有する皮膚の小梁がんとして初めて記載された(Toker (1972) Arch. Dermatol. 105:107-110)。Tokerは後に、腫瘍細胞内に神経分泌顆粒、密なコアを含有する膜結合顆粒の存在を報告した。この特徴は、神経堤起源の腫瘍細胞と区別することができず、正常なメルケル細胞にも存在する(Tang et al. (1978) Cancer 42:2311-2321)。腫瘍名は、腫瘍細胞の外観がメルケル細胞に類似していることを反映するために、メルケル細胞がんに変更された(Toker (1982) Dermatopathol. 4:497-497-500、Rywlin (1982) Am. J. Dermatopathol. 4:513-515)。

10

【0042】

MCCは、肝臓、骨、膵臓、肺、及び脳を含む排出リンパ節及び遠隔臓器に頻繁に転移する、皮膚の侵襲性神経内分泌がんである(Lewis et al. (2020) Cancer Med. 9:1374-1382)。MCCは、典型的には、皮膚の皮層に急速に成長する紅斑性病変として現れる。MCCの最も一般的な出現は、太陽からの強い紫外線曝露の生涯の履歴を持つ、高齢で白い肌の成人である。MCCは、日光に曝露されていない皮膚、並びに小児、若い成人、及び暗褐色の肌の人々ではあまり頻繁に起こらない。赤道に近い緯度は、北米の男性ではMCCの発生率の増加と関連しているが、女性では関連しておらず、これは、おそらく職業的な太陽光の曝露パターンに起因する(Stang et al. (2018) Eur. J. Cancer 94:47-60)。MCCを発症する危険性は、HIV/AIDSを含む重度の免疫不全状態の患者、又は自己免疫疾患、固形臓器移植、及び他のタイプのがんの医学的治療からも増加する(Becker et al. (2017) Nat. Rev. Dis. Primers 3:17077)。AEIOUニーマニックスは、全てのMCC提示の90%を占める。無症候性／圧痛の欠如、急速に拡大、免疫抑制、50歳以上、及び紫外線曝露／白い肌(Heath et al. (2008) J. Am. Acad. Dermatol. 58:375-381)。

20

【0043】

American Joint Committee on Cancer (AJCC)、第8版からの最近のMCCステージ分類システムは、5年間の全生存率は、局所疾患で51%、リンパ節の転移で35%、転移性疾患で14%と推定している(Harms et al. (2016) Ann. Surg. Oncol. 23:3564-3571、Trinidad et al. (2019) J. Clin. Pathol. 72:337-340)。手術及び放射線療法は、局所及びリンパ節MCCに対して治療的であり得るが、広範囲、転移性、及び再発性疾患に対しては通常、全身療法が必要である。シスプラチン及びエトポシドレジメンに基づく細胞毒性化学療法は、高い奏効率を有するが、平均無増悪生存期間がわずか94日の短い期間によって制限される(Iyer et al. (2016) Cancer Med. 5:2294-2301)。MCCケアにおける革命は、PD-1又はPD-L1に対する抗体を用いたチェックポイント遮断療法が、頻繁かつ持続的な応答を誘発する可能性があることが判断されたときに始まった(Nghiem et al. (2016) N. Engl. J. Med. 374:2542-2552、Kaufman et al. (2016) Lancet Oncol. 17:1374-1385、D'Angelo et al. (2018) JAMA Oncol. 4:e180077、Nghiem et al. (2019) J. Clin. Oncol. 37:693-702)。チェックポイント遮断療法の経験が増加するにつれて、全生存期間の予測が改善され得る。

30

40

【0044】

MCCは、純粋な神経内分泌組織学から、混合された組織学的特徴を有するバリエーション形態まで変化し得る。高悪性度神経内分泌MCC細胞は、希薄な細胞質を有する高い核細胞対細胞質比を有し、ヘマトキシリン及びエオシンによって染色されたときに小さな青色細胞腫瘍の外観を与える。腫瘍核は、高い増殖速度を示す頻繁な有糸分裂の数値を伴う、

50

開放した塩胡椒に見えるクロマチンパターンを有する)。神経内分泌マーカーのためのMCCの免疫組織化学(IHC)染色は、典型的には、クロモグラニン、シナプトフィシン、CD56、及び神経フィラメントについて陽性である。MCCはまた、典型的には核傍ドット様パターンを示すCK20に対して特異的に染色する。対照的に、正常なメルケル細胞におけるCK20染色は、細胞質全体にわたってより均一に分布している。CK20染色は、MCCを、小細胞肺癌(SCLC)などの他のより一般的な神経内分泌腫瘍と区別することができる(Leech et al., (2001) J. Clin. Pathol. 54:727-729)。SCLCは、TTF-1(NKX2-1遺伝子によってコードされる甲状腺特異的転写因子1)陽性と染色され、一方MCCは、この染色に陰性である。INSM1は、MCC及びメルケル細胞、並びに他の神経内分泌がんに対して有用なIHCマーカーである(Lillo et al., (2018) Am. J. Surg. Pathol. 42:1541-1548)。

10

【0045】

「コーディング領域」という用語は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域を指し、「非コーディング領域」という用語は、アミノ酸に翻訳されないヌクレオチド配列の領域(例えば、5'及び3'非翻訳領域)を指す。

【0046】

「相補的」という用語は、2つの核酸鎖の領域間又は同じ核酸鎖の2つの領域間の相補的な配列の広範な概念を指す。第1の核酸領域のアデニン残基は、残基がチミン又はウラシルである場合に第1の領域に逆平行の第2の核酸領域の残基と特異的水素結合(「塩基対合」)を形成することができることが知られている。同様に、第1の核酸鎖のシトシン残基は、残基がグアニンである場合に第1の鎖に逆平行の第2の核酸鎖の残基と塩基対合することができることが知られている。核酸の第1の領域は、2つの領域が逆平行様式で配置されたときに、第1の領域の少なくとも1つのヌクレオチド残基が第2の領域の残基と塩基対合することができる場合、同じ又は異なる核酸の第2の領域に相補的である。好ましくは、第1の領域が第1の部分を含み、第2の領域が第2の部分を含み、それにより、第1の部分と第2の部分が逆平行様式で配置されたときに、第1の部分のヌクレオチド残基の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75%、少なくとも約90%、又は少なくとも約95%が、第2の部分のヌクレオチド残基と塩基対合することができる。より好ましくは、第1の部分の全てのヌクレオチド残基が、第2の部分のヌクレオチド残基と塩基対合することができる。

20

30

【0047】

「対照」という用語は、試験試料中の発現産物との比較を提供するのに好適な任意の参照基準を指す。一実施形態では、対照は、発現産物レベルが、検出され、試験試料由来の発現産物レベルと比較される、「対照試料」を得ることを含む。かかる対照試料は、既知の転帰を有する対照がん患者由来の試料(保管された試料若しくは先行試料測定であり得る)、健常患者若しくはがん患者等の対象から単離された正常組織若しくは細胞、がん患者の同じ臓器若しくは身体位置から得られた正常細胞/組織に隣接する、健常対象若しくはがん患者等の対象から単離された培養初代細胞/組織、健常対象から単離された組織若しくは細胞試料、又は寄託所から得られた初代細胞/組織を含むが、これらに限定されない、任意の好適な試料を含み得る。別の好ましい実施形態では、対照は、ハウスキーピング遺伝子、正常組織(又は他の以前に分析された対照試料)由来の発現産物レベル範囲、ある特定の転帰(例えば、1、2、3、4年等の生存期間)を有するか、又はある特定の治療(例えば、標準治療がん療法)を受けている患者群又は一組の患者由来の試験試料中の以前に決定された発現産物レベル範囲を含むが、これらに限定されない、任意の好適な源由来の参照基準発現産物レベルを含み得る。当業者であれば、かかる対照試料及び参照基準発現産物レベルが対照として本発明の方法と組み合わせ使用され得ることを理解するであろう。一実施形態では、対照は、正常又は非がん性細胞/組織試料を含み得る。別の好ましい実施形態では、対照は、一組の患者、例えば、一組のがん患者の発現レベル、又はある特定の治療を受けている一組のがん患者発現レベル、又はある転帰に対して別の

40

50

転帰を有する一組の患者の発現レベルを含み得る。前者の場合、各患者の特異的発現産物レベルは、発現のパーセントイルレベルに割り当てられ得るか、又は参照基準発現レベルの平均値若しくは平均よりも高い若しくは低いいずれかとして表され得る。別の好ましい実施形態では、対照は、正常細胞、併用化学療法で治療された患者由来の細胞、及び良性がんを有する患者由来の細胞を含み得る。別の実施形態では、対照は、測定値、例えば、ある集団におけるハウスキーピング遺伝子の発現レベルと比較した同じ集団における特定の遺伝子の平均発現レベルも含み得る。かかる集団は、健常対象、いずれの治療も受けていない（すなわち、未治療）がん患者、標準治療療法を受けているがん患者、又は良性がんを有する患者を含み得る。別の好ましい実施形態では、対照は、試験試料中の2つの遺伝子の発現産物レベルの比率を決定し、それを参照基準で同じ2つの遺伝子の任意の好適な比率と比較すること、試験試料中の2つ以上の遺伝子の発現産物レベルを決定し、任意の好適な対照中の発現産物レベルの差を決定すること、及び試験試料中の2つ以上の遺伝子の発現産物レベルを決定し、それらの発現を試験試料中のハウスキーピング遺伝子の発現に正規化し、任意の好適な対照と比較することを含むが、これらに限定されない、発現産物レベルの比率変換を含む。特に好ましい実施形態では、対照は、試験試料と同じ系統及び／又はタイプのものである対照試料を含む。別の実施形態では、対照は、がんを有する全ての患者等の一組の患者試料中のパーセントイルとして又はそれに基づいて群分けされる発現産物レベルを含み得る。一実施形態では、対照発現産物レベルが確立され、例えば特定のパーセントイルと比較してより高い又はより低い発現産物レベルが転帰を予測するための基礎として使用される。別の好ましい実施形態では、対照発現産物レベルが既知の転帰を有するがん対照患者由来の発現産物レベルを使用して確立され、試験試料由来の発現産物レベルが転帰を予測する基礎として対照発現産物レベルと比較される。以下のデータによって実証されるように、本発明の方法は、試験試料中の発現産物レベルを対照と比較する際の特定のカットポイントの使用に限定されない。

10

20

30

40

50

【0048】

バイオマーカー核酸の「コピー数」は、特定の遺伝子産物をコードする細胞（例えば生殖細胞系及び／又は体細胞系）中のDNA配列の数を指す。一般に、所与の遺伝子について、哺乳動物は、各遺伝子の2つのコピーを有する。しかしながら、コピー数は、遺伝子増幅若しくは複製によって増加する場合があります、又は欠失によって減少する場合があります。例えば、生殖細胞系コピー数の変化には、1つ以上のゲノム遺伝子座における変化が含まれ、この1つ以上のゲノム遺伝子座は、対照における生殖細胞系コピーの正常相補体中のコピー数（例えば、特定の生殖細胞系DNA及び対応するコピー数が決定されたものと同じ種についての生殖細胞系DNA中の正常コピー数）によって説明されない。体細胞系コピー数の変化には、1つ以上のゲノム遺伝子座における変化が含まれ、この1つ以上のゲノム遺伝子座は、対照の生殖細胞系DNA中のコピー数（例えば、体細胞系DNA及び対応するコピー数が決定されたものと同じ対象についての生殖細胞系DNA中のコピー数）によって説明されない。

【0049】

バイオマーカー核酸の「正常な」コピー数（例えば、生殖細胞系及び／若しくは体細胞系）又はバイオマーカー核酸若しくはタンパク質の「正常な」発現レベルは、生体試料、例えば、がん罹患していない対象（例えば、ヒト）由来、又はがんを有する同じ対象における対応する非がん性組織由来の生体試料、例えば、組織、全血、血清、血漿、頬搔爬物、唾液、脳脊髄液、尿、糞便、及び骨髓を含む試料における発現又はコピー数の活性／レベルである。本明細書で使用される場合、「共刺激する」という用語は、増殖又はエフェクター機能を誘導する第2の非活性化受容体媒介性シグナル（「共刺激シグナル」）を提供する共刺激ポリペプチドの能力を含む。例えば、共刺激シグナルは、例えば、T細胞－受容体媒介性シグナルを受けたT細胞におけるサイトカイン分泌をもたらし得る。例えば、活性化受容体を介して細胞－受容体媒介性シグナルを受けた免疫細胞は、本明細書で「活性化免疫細胞」と称される。

【0050】

「対象に好適な治療レジメンを決定すること」という用語は、本発明による分析の結果に基づいて又は本質的に基づいて又は少なくとも部分的に基づいて開始、変更、及び／又は終了される、対象の治療レジメン（すなわち、対象におけるがんの予防及び／又は治療のために使用される単回療法又は異なる療法の組み合わせ）の決定を意味するとみなされる。一例は、再発の危険性を低下させることを目的とする手術後にアジュバント療法を開始することであり、別の例は、特定の化学療法の投薬量を変更することであろう。決定は、本発明による分析の結果に加えて、治療される対象の個人的特徴に基づき得る。多くの場合、対象に好適な治療レジメンの実際の決定は、主治医又は医師によって行われるであろう。

【0051】

「がんを診断する」という用語は、個体におけるがん又はその亜型の存在又は不在を決定するための本発明の方法、システム、及びコードの使用を含む。この用語はまた、個体における疾患活性レベルを評価するための方法、システム、及びコードを含む。

【0052】

分子は、かなりの割合の分子が基質から解離することなく、基質が流体（例えば標準のクエン酸生理食塩水、pH 7.4）ですすがれ得るように、分子が基質に共有結合的又は非共有結合的に会合している場合、基質に「固定」又は「付着（a f f i x）」されている。

【0053】

「発現シグネチャ」又は「シグネチャ」という用語は、測定される表現型に関連する1つ以上の協調的に発現されるバイオマーカー群を指す。例えば、このシグネチャを構成する遺伝子、タンパク質、代謝物等は、特定の細胞系統、分化の段階、又は特定の生物学的応答中に発現され得る。バイオマーカーは、それらが発現する腫瘍の生物学的側面、例えば、がんの起源細胞、生検における非悪性細胞の性質、及びがんに関与するがん発生機構を反映することができる。発現データ及び遺伝子発現レベルは、コンピュータ可読媒体、例えば、マイクロアレイ又はチップ読み取りデバイスと組み合わせて使用されるコンピュータ可読媒体に記憶され得る。そのような発現データは、発現シグネチャを生成するように操作され得る。

【0054】

本明細書で使用される「相同」とは、同じ核酸鎖の2つの領域間又は2つの異なる核酸鎖の領域間のヌクレオチド配列類似性を指す。両領域におけるヌクレオチド残基位置が同じヌクレオチド残基によって占有されている場合、それらの領域は、その位置で相同である。第1の領域は、各領域の少なくとも1つのヌクレオチド残基位置が同じ残基によって占有されている場合、第2の領域と相同である。2つの領域間の相同性は、同じヌクレオチド残基によって占有されている2つの領域のヌクレオチド残基位置の割合で表される。一例として、ヌクレオチド配列5'-A T T G C C-3'を有する領域及びヌクレオチド配列5'-T A T G G C-3'を有する領域は、50%の相同性を共有する。好ましくは、第1の領域が第1の部分を含み、第2の領域が第2の部分を含み、それにより、それらの部分の各々のヌクレオチド残基位置の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75%、少なくとも約90%、又は少なくとも約95%が同じヌクレオチド残基によって占有される。より好ましくは、それらの部分の各々の全てのヌクレオチド残基位置が同じヌクレオチド残基によって占有される。

【0055】

「免疫細胞」という用語は、免疫応答において役割を果たす細胞を指す。免疫細胞は造血起源のものであり、免疫細胞には、リンパ球、例えば、B細胞及びT細胞、ナチュラルキラー細胞、骨髄細胞、例えば、単球、マクロファージ、好酸球、マスト細胞、好塩基球、及び顆粒球が含まれる。

【0056】

「免疫療法（i m m u n o t h e r a p y）」又は「免疫療法（i m m u n o t h e r a p i e s）」という用語は、対象の免疫系の特定の部分を使用して、がんなどの疾患と

10

20

30

40

50

戦うための任意の治療を指す。対象自身の免疫系は、その目的のための1つ以上の薬剤の投与の有無にかかわらず、刺激される（又は抑制される）。免疫応答を誘発又は増幅するように設計された免疫療法は、「活性化免疫療法」と称される。免疫応答を低下又は抑制するように設計された免疫療法は、「抑制免疫療法」と称される。遺伝学的に修飾された移植がん細胞に免疫系効果をもたらすと考えられる任意の薬剤をアッセイして、薬剤が免疫療法であるかを決定し、所与の遺伝子修飾が免疫応答の調節にもたらす効果を決定することができる。いくつかの実施形態では、免疫療法は、がん細胞特異的である。いくつかの実施形態では、免疫療法は、「非標的」であり得、これは、免疫系細胞と選択的に相互作用しないが、免疫系機能を調節する薬剤の投与を指す。非標的療法の代表的な例には、化学療法、遺伝子療法、及び放射線療法が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0057】

免疫療法は、例えば、がんワクチン及び／又は感作抗原提示細胞の使用を含み得る、標的療法の一形態である。例えば、腫瘍溶解性ウイルスは、正常細胞を無傷のまま残しながらがん細胞に感染して溶解させることができるウイルスであり、それらのがん療法に潜在的に有用なものにする。腫瘍溶解性ウイルスの複製は、腫瘍細胞破壊を促進し、腫瘍部位での用量増幅をもたらす。それらは、抗がん遺伝子のベクターとして作用することもでき、それらを腫瘍部位に特異的に送達させる。この免疫療法は、がん抗原又は疾患抗原に対して産生された予め形成された抗体の投与（例えば、任意に化学療法剤又は毒素に結合しているモノクローナル抗体の腫瘍抗原への投与）によって達成される宿主を短期間保護するために受動免疫を伴い得る。例えば、抗VEGF及びmTOR阻害剤は、腎細胞がんの治療に有効であることが既知である。この免疫療法は、がん細胞株の細胞毒性リンパ球によって認識されるエピトープの使用にも焦点を合わせることができる。あるいは、アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、RNA干渉分子、三重らせんポリヌクレオチド等を使用して、腫瘍又はがんの発症、進行、及び／又は病理に関連した生体分子を選択的に調節することができる。

20

【0058】

免疫療法は、がん抗原又は疾患抗原に対して産生された予め形成された抗体の投与（例えば、任意に化学療法剤又は毒素に結合しているモノクローナル抗体の腫瘍抗原への投与）によって達成される宿主の短期間保護のための受動免疫を伴い得る。この免疫療法は、がん細胞株の細胞毒性リンパ球によって認識されるエピトープの使用にも焦点を合わせることができる。あるいは、アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、RNA干渉分子、三重らせんポリヌクレオチド等を使用して、腫瘍又はがんの発症、進行、及び／又は病理に関連した生体分子を選択的に調節することができる。

30

【0059】

「免疫原性化学療法」という用語は、カルレチクリン、ATP及びHMGB1を含むが、これらに限定されない1つ以上の損傷関連分子パターン（DAMP）分子の放出によって検出可能な状態である、免疫原性細胞死を誘発することが実証されている任意の化学療法を指す（Kroemer et al. (2013), Annu. Rev. Immunol., 31: 51-72）。コンセンサス免疫原性化学療法の具体的な代表例としては、とりわけ、5'-フルオロウラシル、ドキソルビシンなどのアントラサイクリン、及び白金製剤オキサリプラチンが挙げられる。

40

【0060】

いくつかの実施形態では、免疫療法は、1つ以上の免疫チェックポイントの阻害剤を含む。「免疫チェックポイント」という用語は、抗腫瘍免疫応答を下方調節又は阻害することによって免疫応答を微調整するCD4+及び／又はCD8+T細胞の細胞表面上の分子群を指す。免疫チェックポイントタンパク質は、当該技術分野で周知であり、CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIRファミリー受容体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、GITR、4-1BB、OX-40、BTLA、SIRP、CD47、CD48、2B4（CD244）

50

、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HLA2、ブチロフィリン、IDO、CD39、CD73、及びA2aRが含まれるが、これらに限定されない（例えば、WO2012/177624を参照のこと）。この用語は、生物学的に活性なタンパク質断片、並びに全長免疫チェックポイントタンパク質及びそれらの生物学的に活性なタンパク質断片をコードする核酸を更に包含する。いくつかの実施形態では、この用語は、本明細書に提供される相同性の説明に従う任意の断片を更に包含する。一実施形態では、免疫チェックポイントは、PD-1である。

【0061】

免疫チェックポイント及びそれらの配列は当該技術分野で周知であり、代表的な実施形態が以下に記載される。例えば、「PD-1」という用語は、既知のリガンドとしてPD-L1及びPD-L2を有する共阻害受容体として機能する免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーのメンバーを指す。PD-1は、TCR誘導性活性化T細胞死中に上方制御された遺伝子を選択するためのクローニングベースの減算アプローチを使用して以前に特定された。PD-1は、PD-L1に結合するその能力に基づいた分子のCD28/CTLA-4ファミリーのメンバーである。CTLA-4と同様に、PD-1は、抗CD3に応答してT細胞の表面上で迅速に誘導される（Agata et al. 25 (1996) Int. Immunol. 8:765）。しかしながら、CTLA-4とは対照的に、PD-1はB細胞上でも誘導される（抗IgMに応答して）。PD-1は、胸腺細胞及び骨髓細胞のサブセット上でも発現される（Agata et al. (1996) (上記参照)、Nishimura et al. (1996) Int. Immunol. 8:773）。

【0062】

代表的なヒトPD-1バイオマーカーの核酸及びアミノ酸配列は、NM_005018.2及びNP_005009.2の下、GenBankデータベースで一般公開されており、表1に示されている（Ishida et al. (1992) 20 EMBO J 11:3887、Shinohara et al. (1994) Genomics 23:704、米国特許第5,698,520号も参照のこと）。PD-1は、免疫グロブリンスーパーファミリードメイン、膜貫通ドメイン、及び免疫受容体チロシンベースの阻害性モチーフ（ITIM）を含む細胞内領域（Ishida et al. (1992) EMBO J. 11:3887、Shinohara et al. (1994) Genomics 23:704、及び米国特許第5,698,520号）、並びに免疫受容体チロシンベースのスイッチモチーフ（ITSM）を有する。これらの特徴はまた、免疫阻害性受容体と呼ばれる、ポリペプチドのより大きなファミリー（これもまた、gp49B、PIR-Bを含む）、及びキラー阻害性受容体（KIR）を定義する（Vivier and Daeron (1997) Immunol. Today 18:286）。これらの受容体のチロシルリン酸化ITIM及びITSMモチーフは、SH2ドメイン含有ホスファターゼと相互作用し、これが阻害シグナルをもたらすと想定されることが多い。これらの免疫阻害性受容体のサブセットは、MHCポリペプチド、例えば、KIRに結合し、CTLA4は、B7-1及びB7-2に結合する。MHC遺伝子とB7遺伝子との間に系統発生関係があることが提案されている（Henry et al. (1999) Immunol. Today 20(6):285-8）。ヒト以外の生物中のPD-1オルソログの核酸及びポリペプチド配列が周知であり、例えば、マウスPD-1（NM_008798.2及びNP_032824.1）、ラットPD-1（NM_001106927.1及びNP_001100397.1）、イヌPD-1（XM_543338.3及びXP_543338.3）、ウシPD-1（NM_001083506.1及びNP_001076975.1）、並びにニワトリPD-1（XM_422723.3及びXP_422723.2）が含まれる。

【0063】

PD-1ポリペプチドは、阻害性シグナルを免疫細胞に伝達し、それにより、免疫細胞エフェクター機能を阻害することができる阻害性受容体であるか、又は、例えば、可溶性

モノマー形態で存在するときに、免疫細胞の共刺激（例えば、競合阻害による）を促進することができる。好ましいPD-1ファミリーメンバーは、PD-1と配列同一性を共有し、1つ以上のB7ファミリーメンバー、例えば、B7-1、B7-2、PD-1リガンド、及び／又は抗原提示細胞上の他のポリペプチドに結合する。

【0064】

「PD-1活性」という用語は、例えば、抗原提示細胞上の天然PD-1リガンドを連結することによって、活性化免疫細胞における阻害性シグナルを調節するPD-1ポリペプチドの能力を含む。免疫細胞における阻害性シグナルの調節により、免疫細胞の増殖及び／又は免疫細胞によるサイトカイン分泌の調節がもたらされる。したがって、「PD-1活性」という用語には、PD-1ポリペプチドのその天然リガンドに結合する能力、免疫細胞における共刺激又は阻害性シグナルを調節する能力、及び免疫応答を調節する能力が含まれる。

10

【0065】

「PD-1リガンド」という用語は、PD-1受容体の結合パートナーを指し、PD-L1 (Freeman et al. (2000) J. Exp. Med. 192:1027-1034) 及びPD-L2 (Latchman et al. (2001) Nat. Immunol. 2:261) の両方を含む。少なくとも2つのタイプのヒトPD-1リガンドポリペプチドが存在する。PD-1リガンドタンパク質は、シグナル配列、並びにIgVドメイン、IgCドメイン、膜貫通ドメイン、及び短い細胞質尾部を含む。PD-L1 (配列データについては、Freeman et al. (2000) を参照のこと) 及びPD-L2 (配列データについては、Latchman et al. (2001) Nat. Immunol. 2:261を参照のこと) の両方が、ポリペプチドのB7ファミリーのメンバーである。PD-L1及びPD-L2の両方が、胎盤、脾臓、リンパ節、胸腺、及び心臓で発現される。PD-L2のみが、膵臓、肺、及び肝臓で発現され、PD-L1のみが胎児肝臓で発現される。PD-L1発現はより広いが、両方のPD-1リガンドは、活性化された単球及び樹状細胞上で上方制御される。例えば、PD-L1は、マウス造血細胞（例えば、T細胞、B細胞、マクロファージ、樹状細胞(DC)、及び骨髓由来肥満細胞）並びに非造血細胞（例えば、内皮細胞、上皮細胞、及び筋肉細胞）で構成的に発現され、より高いレベルに上方制御されることが知られているが、PD-L2は、DC、マクロファージ、及び骨髓由来肥満細胞上で誘導的に発現される (Butte et al. (2007) Immunity 27:111を参照のこと)。

20

30

【0066】

PD-1リガンドは、特定の保存された構造的及び機能的特徴を有するポリペプチドのファミリーを含む。「ファミリー」という用語は、タンパク質又は核酸分子を指すために使用されるとき、本明細書で定義されるように、共通の構造ドメイン又はモチーフを有し、かつ十分なアミノ酸又はヌクレオチド配列相同性を有する2つ以上のタンパク質又は核酸分子を意味するように意図される。かかるファミリーメンバーは、天然又は非天然に存在し得、同じ種又は異なる種のいずれかに由来し得る。例えば、ファミリーは、ヒト起源の第1のタンパク質、並びにヒト起源の他の別個のタンパク質を含有し得るか、又は代替的に、非ヒト起源の相同体を含有し得る。ファミリーメンバーは、共通の機能的特徴を有する場合もある。PD-1リガンドは、ポリペプチドのB7ファミリーのメンバーである。本明細書で使用される「B7ファミリー」又は「B7ポリペプチド」という用語には、B7ポリペプチド、例えば、B7-1、B7-2、B7h (Swallow et al. (1999) Immunity 11:423)、及び／又はPD-1リガンド（例えば、PD-L1又はPD-L2）、と配列相同性を共有する共刺激ポリペプチドが含まれる。例えば、ヒトB7-1及びB7-2は、NCBIでのBLASTプログラムをデフォルトパラメータ（存在11及び延長1で設定されたギャップペナルティを有するBlossum62マトリックス）と比較したとき、約26%のアミノ酸配列同一性を共有する (NCBIウェブサイト参照のこと)。B7ファミリーという用語はまた、免疫細胞機能を調節することができるこれらのポリペプチドのバリエーションを含む。B7ファミリーの分子

40

50

は、シグナルドメイン、IgVドメイン、及びIgCドメインを含む、いくつかの保存領域を共有する。IgVドメイン及びIgCドメインは、当該技術分野で認識されているIgスーパーファミリーメンバードメインである。これらのドメインは、Igフォールドと呼ばれる明確なフォールディングパターンを有する構造単位に対応する。Igフォールドは、2つのf3シートのサンドイッチで構成され、各々が、Ig、TCR、及びMHC分子のIgCドメインが、同じタイプの配列パターンを共有し、Igスーパーファミリー内でC1セットと呼ばれる、2つのシート間の保存されたジスルフィド結合を有する5～10個のアミノ酸の逆平行f3鎖からなる。他のIgCドメインは、他のセット内に入る。IgVドメインはまた、配列パターンを共有し、Vセットドメインと呼ばれる。IgVドメインは、IgCドメインよりも長く、追加の1対のβ鎖を含む。

10

【0067】

好ましいB7ポリペプチドは、共刺激又は阻害性シグナルを免疫細胞に提供し、それにより、免疫細胞応答を促進又は阻害することができる。例えば、共刺激受容体に結合するB7ファミリーメンバーがT細胞活性化及び増殖を増加させる一方で、阻害性受容体に結合するB7ファミリーメンバーは共刺激を減少させる。更に、同じB7ファミリーメンバーがT細胞共刺激を増加させる場合も減少させる場合もある。例えば、共刺激受容体に結合すると、PD-1リガンドは、例えば、可溶性形態で存在する場合、免疫細胞の共刺激を誘導することができるか、又は免疫細胞の共刺激を阻害することができる。阻害性受容体に結合すると、PD-1は、阻害性シグナルを免疫細胞に伝達することができる。

【0068】

20

好ましいB7ファミリーメンバーには、B7-1、B7-2、B7h、PD-L1、又はPD-L2、及びそれらの可溶性断片又は誘導体が含まれる。一実施形態では、免疫細胞上の1つ以上の受容体、例えば、CTLA4、CD28、ICOS、PD-1、及び／又は他の受容体に結合するB7ファミリーメンバーは、受容体に応じて、阻害性シグナル又は共刺激シグナルを免疫細胞、好ましくは、T細胞に伝達する能力を有する。

【0069】

共刺激シグナルの調節により、免疫細胞のエフェクター機能の調節がもたらされる。したがって、「PD-1リガンド活性」という用語には、PD-1リガンドポリペプチドのその天然受容体（例えば、PD-1若しくはB7-1）に結合する能力、免疫細胞の共刺激又は阻害性シグナルを調節する能力、及び免疫応答を調節する能力が含まれる。

30

【0070】

「PD-L1」という用語は、特定のPD-1リガンドを指す。ヒトPD-L1分子の2つの形態が同定されている。1つの形態は、天然に存在するPD-L1可溶性ポリペプチド、すなわち、短い親水性ドメインを有し、膜貫通ドメインを有しないポリペプチドであり、本明細書ではPD-L1Sと称される。第2の形態は、細胞関連ポリペプチドであり、すなわち、本明細書でPD-L1Mと称される膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを有する。PD-L1Mに関する代表的なヒトPD-L1バイオマーカーの核酸及びアミノ酸配列は、NM_014143.3及びNP_054862.1の下、GenBankデータベースで一般に公開されている。PD-L1タンパク質は、シグナル配列、並びにIgVドメイン及びIgCドメインを含む。PD-L1Sのシグナル配列は、約アミノ酸1～約アミノ酸18で示される。PD-L1Mのシグナル配列は、約アミノ酸1～約アミノ酸18で示される。PD-L1SのIgVドメインは、約アミノ酸19～約アミノ酸134を示し、PD-L1MのIgVドメインは、約アミノ酸19～約アミノ酸134を示す。PD-L1SのIgCドメインは、約アミノ酸135～約アミノ酸227を示し、PD-L1MのIgCドメインは、約アミノ酸135～約アミノ酸227を示す。PD-L1Sに例示されるPD-L1の親水性尾部は、約アミノ酸228～約アミノ酸245に示される親水性尾部を含む。PD-L1Mに例示されるPD-L1ポリペプチドは、約アミノ酸239～約アミノ酸259に示される膜貫通ドメイン、及び約30アミノ酸260～約アミノ酸290に示される細胞質ドメインを含む。加えて、ヒト以外の生物中のPD-L1オルソログの核酸及びポリペプチド配列が周知であり、例えば、マウスPD-L1(N

40

50

M__021893.3及びNP__068693.1)、ラットPD-L1(NM__001191954.1及びNP__001178883.1)、イヌPD-L1(XM__541302.3及びXP__541302.3)、ウシPD-L1(NM__001163412.1及びNP__001156884.1)、並びにニワトリPD-L1(XM__424811.3及びXP__424811.3)が含まれる。

【0071】

「PD-L2」という用語は、別の特定のPD-1リガンドを指す。PD-L2は、樹状細胞、マクロファージ及び骨髄由来肥満細胞を含む、様々なAPC上に発現されるB7ファミリーメンバーである(Zhong et al. (2007) Eur. J. Immunol. 37:2405を参照のこと)。APC発現PD-L2は、PD-1のライゲーションを介してT細胞活性化を阻害することができ、PD-1非依存的機構を介してT細胞活性化を共刺激することができる(Shin et al. (2005) J. Exp. Med. 201:1531を参照のこと)。更に、樹状細胞発現PD-L2のライゲーションは、樹状細胞サイトカイン発現及び生存の増強をもたらす(Radhakrishnan et al. (2003) J. Immunol. 37:1827、Nguyen et al. (2002) J. Exp. Med. 196:1393を参照のこと)。代表的なヒトPD-L2バイオマーカーの核酸及びアミノ酸配列は、当該技術分野で周知であり、またNM__025239.3及びNP__079515.2の下、GenBankデータベースで一般に公開されている。PD-L2タンパク質は、共通の構造要素を特徴とする。いくつかの実施形態では、PD-L2タンパク質は、以下のドメイン：シグナルペプチドドメイン、膜貫通ドメイン、IgVドメイン、IgCドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞質ドメインのうちの少なくとも1つ以上を含む。例えば、PD-L2のアミノ酸1～19は、シグナル配列を含む。本明細書で使用される場合、「シグナル配列」又は「シグナルペプチド」は、かかる配列を含有するポリペプチドを脂質二重層に導く役割を果たし、分泌ポリペプチド及び膜結合ポリペプチドで切断され、分泌ポリペプチド及び膜結合ポリペプチドのN末端で発生し、多数の疎水性アミノ酸残基を含有する約15個以上のアミノ酸を含有するペプチドを含む。例えば、シグナル配列は、少なくとも約10～30個のアミノ酸残基、好ましくは約15～25個のアミノ酸残基、より好ましくは約18～20個のアミノ酸残基、更により好ましくは約19個のアミノ酸残基を含み、少なくとも約35～65%、好ましくは約38～50%、より好ましくは約40～45%の疎水性アミノ酸残基(例えば、バリン、ロイシン、イソロイシン、又はフェニルアラニン)を有する。別の実施形態では、天然ヒトPD-L2ポリペプチドのアミノ酸残基220～243及び成熟ポリペプチドのアミノ酸残基201～243は、膜貫通ドメインを含む。本明細書で使用される場合、「膜貫通ドメイン」という用語は、形質膜を貫通する約15アミノ酸残基のアミノ酸配列を含む。より好ましくは、膜貫通ドメインは、少なくとも約20、25、30、35、40、又は45個のアミノ酸残基を含み、形質膜を貫通する。膜貫通ドメインは、疎水性残基が豊富であり、典型的には、アルファらせん構造を有する。好ましい実施形態では、膜貫通ドメインのアミノ酸の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、又はそれ以上は、疎水性、例えば、ロイシン、イソロイシン、チロシン、又はトリプトファンである。膜貫通ドメインは、例えば、Zagotta, W. N. et al. (1996) Annu. Rev. Neurosci. 19:235-263に記載されている。なお別の実施形態では、天然ヒトPD-L2ポリペプチドのアミノ酸残基20～120及び成熟ポリペプチドのアミノ酸残基1～101は、IgVドメインを含む。天然ヒトPD-L2ポリペプチドのアミノ酸残基121～219及び成熟ポリペプチドのアミノ酸残基102～200は、IgCドメインを含む。本明細書で使用される場合、IgV及びIgCドメインは、当該技術分野において、Igスーパーファミリーメンバードメインとして認識される。これらのドメインは、Igフォールドと呼ばれる明確なフォールディングパターンを有する構造単位に対応する。Igフォールドは、2つのβシートのサンドイッチで構成され、各々が、全てではないがほとんどのドメインで、2つのシート間の保存されたジスルフィド結合を有する5～10個のアミノ

10

20

30

40

50

酸の逆平行（３鎖からなる。Ig、TCR、及びMHC分子のIgCドメインは、同じタイプの配列パターンを共有し、Igスーパーファミリー内のC1セットと呼ばれる。他のIgCドメインは、他のセット内に入る。IgVドメインは配列パターンも共有し、Vセットドメインと呼ばれる。IgVドメインは、Cドメインよりも長く、追加の一对の鎖を形成する。更に別の実施形態では、天然ヒトPD-L2ポリペプチドのアミノ酸残基1～219及び成熟ポリペプチドのアミノ酸残基1～200は、細胞外ドメインを含む。本明細書で使用される場合、「細胞外ドメイン」という用語は、細胞の表面から尾として延びるN末端アミノ酸を表す。本発明の細胞外ドメインは、IgVドメイン及びIgCドメインを含み、シグナルペプチドドメインを含み得る。なお別の実施形態では、天然ヒトPD-L2ポリペプチドのアミノ酸残基244～273及び成熟ポリペプチドのアミノ酸残基225～273は、細胞質ドメインを含む。本明細書で使用される場合、「細胞質ドメイン」という用語は、細胞の細胞質内に尾部として延びるC末端アミノ酸を表す。加えて、ヒト以外の生物中のPD-L2オルソログの核酸及びポリペプチド配列が周知であり、例えば、マウスPD-L2（NM__021396.2及びNP__067371.1）、ラットPD-L2（NM__001107582.2及びNP__001101052.2）、イヌPD-L2（XM__847012.2及びXP__852105.2）、ウシPD-L2（XM__586846.5及びXP__586846.3）、並びにチンパンジーPD-L2（XM__001140776.2及びXP__001140776.1）が含まれる。

【0072】

「PD-L2活性」、「PD-L2の生物学的活性」、又は「PD-L2の機能的活性」という用語は、標準的な技法に従って、インビボ又はインビトロで決定される、PD-L2応答性細胞若しくは組織上、又はPD-L2ポリペプチド結合パートナー上でPD-L2タンパク質、ポリペプチド、又は核酸分子によって発揮される活性を指す。一実施形態では、PD-L2活性は、PD-L2結合パートナーとの会合などの直接的な活性である。本明細書で使用される場合、「標的分子」又は「結合パートナー」は、PD-L2を媒介する機能が達成されるように、PD-L2ポリペプチドが自然界で結合又は相互作用する分子である。例示的な実施形態では、PD-L2標的分子は、受容体RGMbである。あるいは、PD-L2活性は、PD-L2ポリペプチドとその天然結合パートナー（すなわち、免疫機能又は他の生物学的に関連する機能に関連する生理学的に関連する相互作用巨大分子）、例えば、RGMbとの相互作用によって媒介される細胞シグナル伝達活性などの間接的活性である。PD-L2の生物学的活性は、本明細書に記載されている。例えば、本発明のPD-L2ポリペプチドは、以下の活性のうちの1つ以上を有することができる：1）受容体RGMb、PD-1、又は他のPD-L2天然結合パートナーに結合し、かつ／又はその活性を調節する、2）細胞内又は細胞間シグナル伝達を調節する、3）免疫細胞、例えば、Tリンパ球の活性化を調節する、及び4）生物、例えば、マウス又はヒト生物の免疫応答を調節する。

【0073】

「抗免疫チェックポイント療法」は、免疫チェックポイント核酸及び／又はタンパク質を阻害する薬剤の使用を指す。1つ以上の免疫チェックポイントの阻害により、阻害性シグナル伝達が遮断又はさもなければ中和され、それにより、がんをより有効に治療するために、免疫応答が上方制御され得る。免疫チェックポイントを阻害するのに有用な例示的な薬剤としては、免疫チェックポイントタンパク質に結合し、及び／又はこれを不活性化するか、又は阻害することが可能な抗体、小分子、ペプチド、ペプチド模倣薬、天然リガンド、及び天然リガンドの誘導体、又はこれらの断片、並びに免疫チェックポイント核酸の発現及び／又は活性を下方制御することが可能なRNA干渉、アンチセンス、核酸アプタマーなど、又はこれらの断片が挙げられる。免疫応答を上方制御するための例示的な薬剤としては、タンパク質とその天然受容体との間の相互作用を遮断する1つ以上の免疫チェックポイントタンパク質に対する抗体、1つ以上の免疫チェックポイントタンパク質の非活性化形態（例えば、ドミナントネガティブポリペプチド）、1つ以上の免疫チェックポイントタンパク質とその天然受容体との間の相互作用を遮断する小分子又はペプチド、

その天然受容体に結合する融合タンパク質（例えば、抗体又は免疫グロブリンのFc部分に融合した免疫チェックポイント阻害タンパク質の細胞外部分）、免疫チェックポイント核酸転写又は翻訳を遮断する核酸分子などが挙げられる。かかる薬剤は、1つ以上の免疫チェックポイントとその天然受容体（例えば、抗体）との間の相互作用を直接的に遮断し、阻害性シグナル伝達を阻止し、免疫応答を上方制御することができる。あるいは、薬剤は、1つ以上の免疫チェックポイントタンパク質とその天然受容体との間の相互作用を間接的に遮断し、阻害性シグナル伝達を阻止し、免疫応答を上方制御することができる。例えば、安定化した細胞外ドメインなどの免疫チェックポイントタンパク質リガンドの可溶性態様は、その受容体に結合して、適切なリガンドに結合するための受容体の有効濃度を間接的に低減することができる。一実施形態では、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、及び／又は抗PD-L2抗体を単独で、又は組み合わせて使用して、免疫チェックポイントを阻害する。これらの実施形態はまた、特定の免疫チェックポイントに対する特定の療法、例えば、PD-1経路（例えば、抗PD-1経路療法、別途PD-1経路阻害剤療法としても知られる）にも適用可能である。

10

【0074】

「ユビキチン特異的ペプチダーゼ7」としても知られる「USP7」という用語は、ユビキチンヒドロラーゼを含むC19ペプチダーゼファミリーのメンバーを指す。USP7は、標的タンパク質（例えば、FOXO4、p53/TP53、MDM2、ERCC6、DNMT1、UHRF1、PTEN、KMT2E/MLL5、及びDAXX）を脱ユビキチン化し、これは、脱ユビキチン化した標的タンパク質の分解を防止する。したがって、USP7は、ユビキチンリガーゼの活性に対抗する。

20

【0075】

代表的なヒトUSP7の核酸及びアミノ酸配列は、GenBankデータベース（遺伝子ID 7874）で一般に公開されており、表1に示される。いくつかの異なるアイソフォームをコードする複数の転写バリエーションが、USP7について見出されている。ヒトUSP7バリエーションとしては、アイソフォーム1をコードする転写バリエーション1（NM_003470.3及びNP_003461.2）、アイソフォーム2をコードする転写バリエーション2（NM_001286457.2及びNP_001273386.2）、アイソフォーム3をコードする転写バリエーション3（NM_001286458.2及びNP_001273387.1）、及びアイソフォーム4をコードする転写バリエーション4（NM_001321858.1及びNP_001308787.1）が挙げられる。

30

【0076】

ヒト以外の生物におけるUSP7オルソログの核酸及びポリペプチド配列が周知であり、例えば、チンパンジー（XM_024349753.1及びXP_024205521.1、XM_016929384.2及びXP_016784873.1、XM_016929385.2及びXP_016784874.1、並びにXM_016929388.2及びXP_016784877.1）、マカク（XM_015125591.2及びXP_014981077.1、XM_015125592.2及びXP_014981078.1、XM_002802389.3及びXP_002802435.1、並びにXM_002802388.3及びXP_002802434.1）、オオカミ（XM_005621558.3及びXP_005621615.1、並びにXM_005621559.3及びXP_005621616.1）、ウシ（XM_024985414.1及びXP_024841182.1、並びにXM_005224667.4及びXP_005224724.1）、マウス（NM_001003918.2及びNP_001003918.2、XM_006522138.3及びXP_006522201.1、XM_006522141.3及びXP_006522204.1、XM_006522139.3及びXP_006522202.1、並びにXM_030249116.1及びXP_030104976.1）、ラット（NM_001024790.1及びNP_001019961.1、XM_006245756.2及びXP_006245818.1、XM_006245758.3及びXP_006245820.1、XM_00624

40

50

5 7 5 7 . 3 及び X P _ 0 0 6 2 4 5 8 1 9 . 1、並びに X M _ 0 0 6 2 4 5 7 5 9 . 1
 及び X P _ 0 0 6 2 4 5 8 2 1 . 1)、ニフトリ (N M _ 0 0 1 3 4 8 0 1 2 . 1 及び N
 P _ 0 0 1 3 3 4 9 4 1 . 1、N M _ 2 0 4 4 7 1 . 2 及び N P _ 9 8 9 8 0 2 . 2、並
 びに X M _ 0 2 5 1 5 5 0 4 3 . 1 及び X P _ 0 2 5 0 1 0 8 1 1 . 1)、カエル (X M
 _ 0 1 2 9 7 0 9 2 0 . 3 及び X P _ 0 1 2 8 2 6 3 7 4 . 1、並びに X M _ 0 0 2 9 3
 9 4 4 9 . 5 及び X P _ 0 0 2 9 3 9 4 9 5 . 2)、ゼブラフィッシュ (X M _ 0 0 5 1
 6 3 9 5 7 . 3 及び X P _ 0 0 5 1 6 4 0 1 4 . 1、X M _ 6 8 6 1 2 3 . 9 及び X P _
 6 9 1 2 1 5 . 4、X M _ 0 2 1 4 7 3 8 7 1 . 1 及び X P _ 0 2 1 3 2 9 5 4 6 . 1、
 X M _ 0 0 9 2 9 9 4 6 6 . 3 及び X P _ 0 0 9 2 9 7 7 4 1 . 1、X M _ 0 0 9 2 9 9
 4 6 4 . 3 及び X P _ 0 0 9 2 9 7 7 3 9 . 2、並びに X M _ 0 0 9 2 9 9 4 6 5 . 3 及
 び X P _ 0 0 9 2 9 7 7 4 0 . 2)、並びにミバエ (N M _ 1 3 2 5 5 1 . 3 及び N P _
 5 7 2 7 7 9 . 2、並びに N M _ 0 0 1 2 9 8 2 2 0 . 1 及び N P _ 0 0 1 2 8 5 1 4 9
 . 1) が含まれる。

10

【0077】

「U S P 7 活性」という用語は、U S P 7 ポリペプチド（並びに本明細書で論じられる
 その断片、ドメイン、及び／若しくはモチーフ）がその基質に結合し、かつ／又はユビキ
 チナーゼ活性を触媒する能力を含む。

【0078】

「U S P 7 阻害剤」という用語には、U S P 7 ポリペプチド（並びに本明細書で論じら
 れるその断片、ドメイン、及び／若しくはモチーフ）の能力を低減、阻害、遮断、予防、
 及び／又は阻害することができる、ヒトによって調製、合成、製造、及び／又は精製され
 る任意の天然又は非天然の薬剤が含まれる。一実施形態では、かかる阻害剤は、U S P 7
 とその基質又は他の結合パートナーとの間の結合／相互作用を低減又は阻害し得る。なお
 別の実施形態では、かかる阻害剤は、ターンオーバー率を増加又は促進し、発現及び／若
 しくは安定性（例えば、半減期）を低減若しくは阻害し、かつ／又はU S P 7 の細胞局在
 を変化させ、少なくともU S P 7 レベル及び／又は活性の減少をもたらし得る。更に別の
 実施形態では、かかる阻害剤は、U S P 7 の触媒活性を損ない得る。なお別の実施形態で
 は、阻害剤は、U S P 7 のデユビキチナーゼ活性を阻害する。かかる阻害剤は、小分子化
 合物、抗体又はイントラボディ、RNA干渉 (RNA i) 剤（少なくともs i RNA、s
 h RNA、マイクロRNA (mi RNA)、p i w i、及び他の周知の薬剤を含む）を含
 むが、これらに限定されない任意の分子であってよい。かかる阻害剤は、U S P 7 に特異
 的であり得るか、又は結合パートナーのうちの少なくとも1つを阻害してもよい。かかる
 阻害剤としては、X L 1 7 7 A 及び／又はX L 1 8 8 を含み得る (S h a u e r e t
 a l . S c i R e p 1 0 , 5 3 2 4 (2 0 2 0))。したがって、一実施形態では、
 U S P 7 阻害剤は、X L 1 7 7 A であり、これは以下の構造を有する。

20

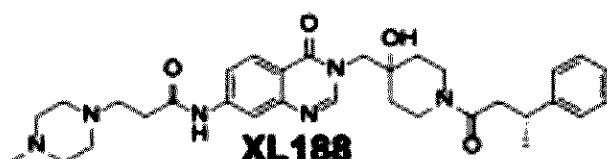
30

【0079】

別の実施形態では、U S P 7 阻害剤は、X L 1 8 8 であり、これは以下の構造を有する
 。

【化1】

40



かかる阻害剤は、P - 2 2 0 7 7 (C a s 番号 1 2 4 7 8 1 9 - 5 9 - 5) を含んでもよ
 い。追加のU S P 7 阻害剤は、当該技術分野において、例えば、P C T 公開第 2 0 1 9 /
 0 6 7 5 0 3 号、U S S N 1 6 / 6 5 0 , 7 2 7、及びP C T 公開第 2 0 2 0 / 0 8 6 5
 9 5 号において知られている。

【0080】

50

USP7ポリペプチドに対するRNA干渉は、周知であり、市販されている（例えば、Origene（Rockville, MD）からのヒト、ラット、又はマウスのshRNA/siRNA製品（カタログ番号TL308454V、TR308454、SR305301、TL308454、SR422076、TL308454V、TF308454、TL513496、SR513215、TR513496、TR702701、TL702701、TL702701V、及びTL513496V、並びにOrigene（Rockville, MD）からのCRISPRによるヒト又はマウス遺伝子ノックアウトキット（カタログ番号KN413986、KN518814、KN213986、KN318814、KN213986LP、KN213986RB、KN213986BN、KN318814LP、KN318814BN、及びKN318814RB）、並びにSanta Cruz Biotechnology（Dallas, Texas）からのsiRNA/shRNA製品（カタログ番号sc-41521及びsc-77373）。（例えば、抗USP7抗体による）USP7の検出、精製、及び／又は阻害のための方法もまた、周知であり、市販されている（例えば、Signalway Antibodyからの複数のUSP7抗体（College Park, MD、カタログ番号38401、27041、及び43178）、Sino Biological（Wayne, PA、カタログ番号11681-MM01）、Invitrogen（Carlsbad, CA、カタログ番号カタログ番号PA5-17179、カタログ番号MA5-15585等）。USP7ノックアウトヒト細胞株もまた、周知であり、Horizon（Cambridge, UK、カタログ番号HD115-028、HDR02-029、及びHDR02-028）で入手可能である。

10

20

【0081】

「MYCLがん原遺伝子、bHLH転写因子」としても知られる「MYCL」という用語は、DNA結合及び転写因子活性を有するbHLHタンパク質及びポリコム抑制複合体（PRC）1.1のメンバーを指す。効率的なDNA結合は、別のbHLHタンパク質（例えば、MAX）との二量体化を必要とする。

【0082】

「MYCL」という用語は、その断片、バリエーション（例えば、対立遺伝子バリエーション）、及び誘導体を含むよう意図されている。代表的なヒトMYCLの核酸及びアミノ酸配列は、GenBankデータベース（遺伝子ID 4610）で一般に公開されており、表1に示される。MYCLについては、いくつかの異なるアイソフォームをコードする複数の転写バリエーションが見出されている。ヒトMYCLバリエーションとしては、アイソフォーム1をコードする転写バリエーション1（NM_001033081.3及びNP_001028253.1）、アイソフォーム2をコードする転写バリエーション2（NM_005376.5及びNP_005367.2）、及びアイソフォーム3をコードする転写バリエーション3（NM_001033082.3及びNP_001028254.2）が挙げられる。

30

【0083】

ヒト以外の生物におけるMYCLオルソログの核酸及びポリペプチド配列が周知であり、例えば、チンパンジー（XM_016959814.2及びXP_016815303.2）、アカゲザル（XM_028835497.1及びXP_028691330.1、並びにXM_015136019.2及びXP_014991505.2）、イヌ（XM_022427768.1及びXP_022283476.1、XM_022427769.1及びXP_022283477.1、XM_022427775.1及びXP_022283483.1、XM_022427774.1及びXP_022283482.1、XM_022427778.1及びXP_022283486.1、XM_022427767.1及びXP_022283475.1、XM_022427772.1及びXP_022283480.1、XM_005628887.3及びXP_005628944.1、XM_022427777.1及びXP_022283485.1、XM_022427780.1及びXP_022283488.1、XM_022427771.1及びXP_022283479.1、XM_014119333.2及びXP_0

40

50

1 3 9 7 4 8 0 8 . 1、X M _ 0 2 2 4 2 7 7 7 9 . 1 及び X P _ 0 2 2 2 8 3 4 8 7 . 1、X M _ 0 2 2 4 2 7 7 7 3 . 1 及び X P _ 0 2 2 2 8 3 4 8 1 . 1、X M _ 0 2 2 4 2 7 7 7 6 . 1 及び X P _ 0 2 2 2 8 3 4 8 4 . 1、X M _ 0 2 2 4 2 7 7 8 1 . 1 及び X P _ 0 2 2 2 8 3 4 8 9 . 1、X M _ 0 0 5 6 2 8 8 8 8 . 3 及び X P _ 0 0 5 6 2 8 9 4 5 . 1、並びに X M _ 5 3 9 5 7 8 . 6 及び X P _ 5 3 9 5 7 8 . 2)、ウシ (X M _ 0 0 5 2 0 4 9 2 8 . 4 及び X P _ 0 0 5 2 0 4 9 8 5 . 1)、マウス (N M _ 0 0 1 3 0 3 1 2 1 . 1 及び N P _ 0 0 1 2 9 0 0 5 0 . 1、並びに N M _ 0 0 8 5 0 6 . 3 及び N P _ 0 3 2 5 3 2 . 1)、並びにラット (N M _ 0 0 1 1 9 1 7 6 3 . 1 及び N P _ 0 0 1 1 7 8 6 9 2 . 1)、ニワトリ (X M _ 4 2 5 7 9 0 . 6 及び X P _ 4 2 5 7 9 0 . 2)、カエル (N M _ 0 0 1 0 1 1 1 4 4 . 1 及び N P _ 0 0 1 0 1 1 1 4 4 . 1)、並びにゼブラフィッシュ (N M _ 0 0 1 0 4 5 1 4 2 . 1 及び N P _ 0 0 1 0 3 8 6 0 7 . 1) が含まれる。

10

【0084】

「MYCL 活性」という用語は、MYCL ポリペプチド（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／又はモチーフ）が DNA に結合し、かつ／又は転写を活性化する能力を含む。

【0085】

「MYCL 制御経路」という用語は、MYCL（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／又はモチーフ）が、テンプレート DNA に結合し、経路内の少なくとも1つの遺伝子の転写を活性化する経路を含む。MYCL 制御経路には、少なくとも本明細書に記載されるもの、例えば、HLA I などの MHC クラス I、がん細胞における表面発現を抑制する遺伝子の発現の制御が含まれる。

20

【0086】

「MYCL 阻害剤」という用語には、MYCL ポリペプチド（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／若しくはモチーフ）の能力を低減、阻害、遮断、予防、及び／又は阻害することができる、ヒトによって調製、合成、製造、及び／又は精製される任意の天然又は非天然の薬剤が含まれる。一実施形態では、かかる阻害剤は、MYCL と DNA 又は MYCL とその結合パートナーとの間の結合／相互作用を低減又は阻害し得る。別の実施形態では、かかる阻害剤は、転写因子として MYCL を低減又は阻害し得る。なお別の実施形態では、かかる阻害剤は、ターンオーバー率を増加又は促進し、発現及び／又は安定性（例えば、半減期）を低減又は阻害し、かつ／又は MYCL の細胞局在を変化させ、少なくとも MYCL レベル及び／若しくは活性の減少をもたらし得る。更に別の実施形態では、かかる阻害剤は、MCYL の触媒活性を損ない得る。なお別の実施形態では、阻害剤は、MYCL の転写活性を阻害する。かかる阻害剤は、小分子化合物、抗体又はイントラボディ、RNA 干渉 (RNAi) 剤（少なくとも siRNA、shRNA、マイクロ RNA (miRNA)、piwi、及び他の周知の薬剤を含む）を含むが、これらに限定されない任意の分子であってよい。かかる阻害剤は、MYCL に特異的であり得るか、又は結合パートナーのうちの少なくとも1つを阻害してもよい。MYCL ポリペプチドに対する RNA 干渉分子は、周知であり、市販されている（例えば、Origene からのヒト、ラット、又はマウスの shRNA / siRNA 製品（カタログ番号 TL311321V、SR303026、TL513612、SR412416、TR513612、TR311321、SR303026、TL311321、TL513612V、TL311321V、及び TL316626V）、Santa Cruz Biotechnology からの siRNA / shRNA 製品（カタログ番号 sc-38071））。

30

40

（例えば、抗 MYCL 抗体による）MYCL の検出、精製、及び／又は阻害のための方法もまた、周知であり、市販されている（例えば、Origene（カタログ番号 TA339110 及び TA590604）、Biorbyt (Cambridge, UK、カタログ番号 orb324619 orb540520)、Invitrogen（カタログ番号 PA1-30045、PA5-109998 等）、abcam (Cambridge, MA、カタログ番号 ab28739、ab167315 など) からの複数の MYCL 抗体

50

等)。MYCLノックアウトヒト細胞株もまた周知であり、Horizon（カタログ番号HZGHC4610）で入手可能である。

【0087】

「リジンデメチラーゼ2B」としても知られる「KDM2B」という用語は、ヒストンH3の「Lys-4」及び「Lys-36」を脱メチル化するヒストンデメチラーゼを指す。KDM2Bは、「F-box」を特徴とするF-boxタンパク質ファミリーのメンバーであり、およそ40個のアミノ酸モチーフF-boxタンパク質は、SCF（SKP1-キュリン-F-box）と呼ばれるユビキチンタンパク質リガーゼ複合体の構成要素である。F-boxタンパク質には、3つのクラスがある。Fbwsl F-boxタンパク質は、WD-40ドメインを含み、Fbls F-boxタンパク質は、ロイシンリッチリピートを含むことを含み、Fbxs F-boxタンパク質は、異なるタンパク質-タンパク質相互作用モジュールを含むか、又は認識可能なモチーフを含まない。KDM2Bは、Fblsクラスに属する。代替的スプライシングは、複数の転写バリエーションをもたらす。

【0088】

「KDM2B」という用語は、その断片、バリエーション（例えば、対立遺伝子バリエーション）、及び誘導体を含むよう意図されている。

【0089】

代表的なヒトKDM2Bの核酸及びアミノ酸配列は、GenBankデータベース（遺伝子ID 84678）で一般に公開されており、表1に示される。代替的スプライシングによって生成された少なくとも5つの異なるヒト転写バリエーションを含む、いくつかの異なるアイソフォームをコードする複数の転写バリエーションが、KDM2Bについて見出されている（uniprot.org/uniprot/Q8NHM5でWorld Wide Webを参照のこと）。ヒトKDM2Bバリエーションには、アイソフォームbをコードする転写バリエーション1（NM_001005366.2及びNP_001005366.1）、アイソフォームaをコードする転写バリエーション2（NM_032590.5及びNP_115979.3）、アイソフォームX1をコードする転写バリエーション3（XM_011538867.3及びXP_011537169.1）、アイソフォームX2をコードする転写バリエーション4（XM_011538868.3及びXP_011537170.1）、アイソフォームX4をコードする転写バリエーション5（XM_005253955.4及びXP_005254012.1）、アイソフォームX5をコードする転写バリエーション6（XM_005253956.4及びXP_005254013.1）、アイソフォームX7をコードする転写バリエーション7（XM_005253961.5及びXP_005254018.1）、アイソフォームX6をコードする転写バリエーション8（XM_011538875.3及びXP_011537177.1）、並びにアイソフォームX3をコードする転写バリエーション9（XM_011538869.2及びXP_011537171.1）が含まれる。ヒト以外の生物におけるKDM2Bオルソログの核酸及びポリペプチド配列が周知であり、例えば、チンパンジー（XM_024348087.1及びXP_024203855.1、XM_024348082.1及びXP_024203850.1、XM_024348080.1及びXP_024203848.1、XM_024348079.1及びXP_024203847.1、XM_009426426.3及びXP_009424701.1、XM_009426436.3及びXP_009424711.1、XM_024348085.1及びXP_024203853.1、XM_024348088.1及びXP_024203856.1、XM_024348090.1及びXP_024203858.1、XM_024348086.1及びXP_024203854.1、XM_024348083.1及びXP_024203851.1、XM_024348094.1及びXP_024203862.1、XM_024348089.1及びXP_024203857.1、XM_024348091.1及びXP_024203859.1、XM_024348092.1及びXP_024203860.1、XM_024348093.1及びXP_024203861.1、X

10

20

30

40

50

M__009426440.3及びXP__009424715.1、XM__0243480
84.1及びXP__024203852.1、XM__001164996.5及びXP__
001164996.1、XM__016924419.2及びXP__016779908
.、XM__024348081.1及びXP__024203849.1、XM__0094
26429.3及びXP__009424704.1、並びにXM__009426431.
3及びXP__009424706.1)、アカゲザル(XM__028830002.1及
びXP__028685835.、XM__015152992.2及びXP__015008
478.、XM__015152996.2及びXP__015008482.、XM__01
5152991.2及びXP__015008477.、XM__015153000.2及
びXP__015008486.、XM__015152998.2及びXP__015008
484.、XM__015152993.2及びXP__015008479.、XM__01
5152994.2及びXP__015008480.、XM__015152999.2及
びXP__015008485.、XM__015152997.2及びXP__015008
483.、XM__015152995.2及びXP__015008481.、XM__02
8830004.1及びXP__028685837.、XM__015153003.2及
びXP__015008489.、XM__015153002.2及びXP__015008
488.、XM__015153001.2及びXP__015008487.、並びにXM
__028830003.1及びXP__028685836.1)、イヌ(XM__0056
36193.3及びXP__005636250.、XM__022410683.1及びX
P__022266391.、XM__022410682.1及びXP__02226639
0.、XM__005636186.3及びXP__005636243.、XM__0056
36191.3及びXP__005636248.、XM__005636187.3及びX
P__005636244.、XM__022410687.1及びXP__02226639
5.、XM__005636188.3及びXP__005636245.、XM__0056
36189.3及びXP__005636246.、XM__022410688.1及びX
P__022266396.、XM__005636192.1及びXP__00563624
9.、XM__022410686.1及びXP__022266394.、XM__0224
10685.1及びXP__022266393.、XM__022410689.1及びX
P__022266397.、XM__005636194.3及びXP__00563625
1.、XM__005636195.1及びXP__005636252.、XM__0056
36197.3及びXP__005636254.1、並びにXM__005636196.
2及びXP__005636253.2)、ウシ(XM__010814030.3及びXP
__010812332.、XM__005217980.4及びXP__005218037
.、XM__005217983.4及びXP__005218040.、XM__02497
7708.1及びXP__024833476.、XM__024977709.1及びXP
__024833477.、XM__005217982.2及びXP__005218039
.、XM__005217985.2及びXP__005218042.、XM__02497
7704.1及びXP__024833472.、XM__024977705.1及びXP
__024833473.、XM__024977706.1及びXP__024833474
.、XM__024977707.1及びXP__024833475.、XM__02497
7711.1及びXP__024833479.、並びにXM__024977710.1及
びXP__024833478.1)、マウス(NM__001003953.2及びNP__
001003953.、NM__001378863.1及びNP__001365792.
1、NM__001378864.1及びNP__001365793.1、NM__0013
78865.1及びNP__001365794.1、NM__013910.2及びNP__
038938.、XM__006530376.4及びXP__006530439.、XM
__011248210.3及びXP__011246512.、XM__011248208
.3及びXP__011246510.、XM__011248212.3及びXP__011
246514.、XM__011248211.3及びXP__011246513.、XM
__030254558.1及びXP__030110418.、XM__011248215

10

20

30

40

50

． 2 及び X P _ 0 1 1 2 4 6 5 1 7 . 、 X M _ 0 1 1 2 4 8 2 1 4 . 3 及び X P _ 0 1 1 2 4 6 5 1 6 . 、 X M _ 0 1 1 2 4 8 2 1 3 . 3 及び X P _ 0 1 1 2 4 6 5 1 5 . 、 X M _ 0 1 1 2 4 8 2 1 6 . 2 及び X P _ 0 1 1 2 4 6 5 1 8 . 、 X M _ 0 1 1 2 4 8 2 1 7 . 3 及び X P _ 0 1 1 2 4 6 5 1 9 . 、 並びに X M _ 0 3 0 2 5 4 5 6 0 . 1 及び X P _ 0 3 0 1 1 0 4 2 0 . 1) 、 ラット (N M _ 0 0 1 1 0 0 6 7 9 . 1 及び N P _ 0 0 1 0 9 4 1 4 9 . 1 、 並びに X M _ 0 1 7 5 9 8 3 3 7 . 1 及び X P _ 0 1 7 4 5 3 8 2 6 . 1) 、 ニワトリ (X M _ 0 2 5 1 5 5 6 3 1 . 1 及び X P _ 0 2 5 0 1 1 3 9 9 . 、 X M _ 0 0 4 9 4 5 5 5 9 . 3 及び X P _ 0 0 4 9 4 5 6 1 6 . 、 X M _ 0 0 4 9 4 5 5 5 5 . 3 及び X P _ 0 0 4 9 4 5 6 1 2 . 、 X M _ 0 0 4 9 4 5 5 5 3 . 3 及び X P _ 0 0 4 9 4 5 6 1 0 . 、 X M _ 0 0 4 9 4 5 5 5 7 . 3 及び X P _ 0 0 4 9 4 5 6 1 4 . 、 X M _ 0 1 5 2 7 5 5 9 4 . 2 及び X P _ 0 1 5 1 3 1 0 8 0 . 、 X M _ 0 0 4 9 4 5 5 5 8 . 3 及び X P _ 0 0 4 9 4 5 6 1 5 . 、 X M _ 0 0 4 9 4 5 5 5 6 . 3 及び X P _ 0 0 4 9 4 5 6 1 3 . 、 X M _ 0 1 5 2 7 5 5 9 3 . 2 及び X P _ 0 1 5 1 3 1 0 7 9 . 、 X M _ 0 0 4 9 4 5 5 6 2 . 2 及び X P _ 0 0 4 9 4 5 6 1 9 . 、 X M _ 0 0 4 9 4 5 5 6 3 . 3 及び X P _ 0 0 4 9 4 5 6 2 0 . 、 並びに X M _ 0 0 4 9 4 5 5 6 1 . 1 及び X P _ 0 0 4 9 4 5 6 1 8 . 1) 、 並びにカエル (X M _ 0 3 1 8 9 2 6 3 0 . 1 及び X P _ 0 3 1 7 4 8 4 9 0 . 1 、 X M _ 0 3 1 8 9 2 6 3 1 . 1 及び X P _ 0 3 1 7 4 8 4 9 1 . 1 、 X M _ 0 3 1 8 9 2 6 3 8 . 1 及び X P _ 0 3 1 7 4 8 4 9 8 . 1 、 X M _ 0 3 1 8 9 2 6 4 6 . 1 及び X P _ 0 3 1 7 4 8 5 0 6 . 1 、 並びに X M _ 0 3 1 8 9 2 6 5 5 . 1 及び X P _ 0 3 1 7 4 8 5 1 5 . 1) が含まれる。

【 0 0 9 0 】

「 K D M 2 B 活性」という用語は、 K D M 2 B ポリペプチド（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／若しくはモチーフ）がその基質に結合し、かつ／又はそのデメチラーゼ活性を媒介する能力を含む。

【 0 0 9 1 】

「 K D M 2 B 基質」という用語は、 K D M 2 B ポリペプチド（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／又はモチーフ）、例えば、 S K P 1 及びキュリンタンパク質を含む、本明細書に列挙されるタンパク質の結合パートナーを指す。「 K D M 2 B 制御経路」という用語は、 K D M 2 B （並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／又はモチーフ）が、その基質のうちの少なくとも1つに結合する経路を含み、これを通じて、少なくとも1つの細胞機能及び／若しくは活性並びに／又は細胞タンパク質プロファイルが変化する。 K D M 2 B 制御経路には、ヒストン修飾の正又は負の制御など、少なくとも本明細書に記載されるものが含まれる。

【 0 0 9 2 】

「 K D M 2 B のコピー数、発現レベル、及び／若しくは活性を減少させる薬剤」、又は「 K D M 2 B の量及び／若しくは活性を減少させる薬剤」という用語は、 K D M 2 B ポリペプチド（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／若しくはモチーフ）の発現レベル及び／又は活性を減少させることができる、ヒトによって調製、合成、製造、及び／又は精製された任意の天然又は非天然の薬剤を包含する。いくつかの実施形態では、薬剤は、 K D M 2 B とその基質又は他の結合パートナーとの間の結合／相互作用を減少させてもよい。例えば、薬剤は、ヒストンに対する K D M 2 B の認識及び／又は結合を増加させ、それによってヒストンの脱メチル化を減少させ得る。他の実施形態では、薬剤は、 K D M 2 B ポリペプチドの発現を減少させ得る。更に他の実施形態では、かかる薬剤は、腫瘍に対する免疫応答を増強する際の K D M 2 B の活性を減少させ得る。なお他の実施形態では、かかる阻害剤は、ターンオーバー率を増加させ、発現及び／若しくは安定性（例えば、半減期）を減少させ、かつ／又は K D M 2 B の細胞局在を変化させ、少なくとも K D M 2 B レベル及び／若しくは活性の減少をもたらし得る。かかる薬剤は、小分子化合物、抗体又はイントラボディ、 R N A 干渉 (R N A i) 剤（少なくとも s i R N A 、 s h R N A 、 マイクロ R N A (m i R N A) 、 p i w i 、 及び他の周知の薬剤を含む）、並びにがん細胞内の K D M 2 B 又はその断片の内因性産生を阻害する遺伝子構築物を含むが

、これらに限定されない任意の分子であってよい。かかる薬剤は、SCF又はキュリンポリペプチドを含むが、これらに限定されない、KDM2B又は結合パートナーのうちの少なくとも1つに特異的であってもよい。KDM2Bの検出のための抗体は、市販されている（カタログ番号AP08592PU-N AP51620PU-N (OriGene) ; ab234082、ab5199 (Abcam) ; ab234082 (Santa Cruz)）。KDM2Bポリペプチドに対するRNA干渉は、周知であり、市販されている（例えば、OriGene (Rockville, MD) からのヒト、ラット、又はマウスのshRNA/siRNA製品（カタログ番号TL313046V、SR325364、SR420035、SR325364、TL313046、TG313046、TF514017、TL313046V、TR313046、TR514017、TL514017V、TL514017、及びCRISPRによるヒト又はマウス遺伝子ノックアウトキット（カタログ番号KN413999、KN508731）、並びにSanta Cruz Biotechnology (Dallas, Texas) からのsiRNA/shRNA製品（カタログ番号sc-75005及びsc-75006）。（例えば、抗KDM2B抗体による）KDM2Bの検出、精製、及び／又は阻害のための方法もまた、周知であり、市販されている（例えば、（カタログ番号AP08592PU-N AP51620PU-N (OriGene) ; ab234082、ab5199 (Abcam) ; ab234082 (Santa Cruz)）。加えて、ヒトKDM2Bノックアウト細胞株は、Horizon (Cambridge, UK、カタログ番号HZGHC014730c012) から市販されている。

10

20

【0093】

「BCORL1」という用語は、「BCL6コリプレッサー様1」としても知られており、DNA結合タンパク質によってプロモーター領域につながれていることが見出される転写コリプレッサーを指す。BCORL1は、いくつかのクラスIIヒストンデアセチラーゼと相互作用して、転写を抑制することができる。代替的スプライシングは、複数の転写バリエーションをもたらす。「BCORL1」という用語は、その断片、バリエーション（例えば、対立遺伝子バリエーション）、及び誘導体を含むよう意図されている。

【0094】

代表的なヒトBCORL1の核酸及びアミノ酸配列は、GenBankデータベース（遺伝子ID 63035）で一般に公開されており、表1に示される。代替的スプライシングによって生成された少なくとも3つの異なるヒト転写バリエーションを含む、いくつかの異なるアイソフォームをコードする複数の転写バリエーションが、BCORL1について見出されている（uniprot.org/uniprot/Q5H9F3でWorld Wide Webを参照のこと）。ヒトBCORL1バリエーションには、アイソフォーム1aをコードする転写バリエーション1（NM_001184772.3及びNP_001171701、NM_001379450.1及びNP_001366379、並びにNM_001379451.1及びNP_001366380.）、アイソフォーム1をコードする転写バリエーション2（NM_021946.5及びNP_068765.3）、アイソフォームX1をコードする転写バリエーション3（XM_005262453.4及びXP_005262510.1、XM_006724777.3及びXP_006724840.1、XM_017029721.1及びXP_016885210.1、XM_006724776.3及びXP_006724839.1、XM_005262455.4及びXP_005262512.2、並びにXM_017029722.1及びXP_016885211.1）、アイソフォームX3をコードする転写バリエーション4（XM_005262456.4及びXP_005262513.2）、並びにアイソフォームX2をコードする転写バリエーション4（XM_006724779.2及びXP_006724842.1）が含まれる。

30

40

【0095】

ヒト以外の生物におけるBCORL1オルソログの核酸及びポリペプチド配列が周知であり、例えば、チンパンジー（XM_016943863.2及びXP_0167993

50

52. 1、XM__016943867. 1及びXP__016799356. 1、XM__016943861. 1及びXP__016799350. 1、XM__016943870. 1及びXP__016799359. 1、XM__016943862. 1及びXP__016799351. 1、XM__024353327. 1及びXP__024209095. 1、XM__016943864. 2及びXP__016799353. 1、XM__016943868. 2及びXP__016799357. 1、XM__016943866. 2及びXP__016799355. 1、並びにXM__016943865. 1及びXP__016799354. 1)、アカゲザル(XM__028842487. 1及びXP__028698320. 1、XM__028842482. 1及びXP__028698315. 1、XM__028842486. 1及びXP__028698319. 1、XM__028842484. 1及びXP__028698317. 1、XM__028842483. 1及びXP__028698316. 1、XM__015128181. 2及びXP__014983667. 2、XM__015128183. 2及びXP__014983669. 2、並びにXM__028842485. 1及びXP__028698318. 1)、イヌ(XM__005641794. 3及びXP__005641851. 1、XM__022416325. 1及びXP__022272033. 1、XM__538169. 6及びXP__538169. 3、並びにXM__005641793. 3及びXP__005641850. 1)、ウシ(XM__005227504. 4及びXP__005227561. 1、XM__005227505. 4及びXP__005227562. 1、並びにXM__002699518. 5及びXP__002699564. 2)、マウス(NM__178782. 4及びNP__848897. 3)、ラット(NM__001191587. 1及びNP__001178516. 1)、ニワトリ(XM__015278363. 2及びXP__015133849. 1、XM__015278362. 2及びXP__015133848. 1、並びにXM__025150323. 1及びXP__025006091. 1)、並びにカエル(NM__001142070. 1及びNP__001135542. 1、XM__012968111. 3及びXP__012823565. 1、XM__018096174. 2及びXP__017951663. 1、XM__012968109. 3及びXP__012823563. 1、並びにXM__012968112. 3及びXP__012823566. 1)が含まれる。

10

20

【0096】

「BCORL1 活性」という用語は、BCORL1 ポリペプチド（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／若しくはモチーフ）がその基質に結合し、かつ／又はその転写抑制活性を媒介する能力を含む。

30

【0097】

「BCORL1 基質」という用語は、本明細書で論じられるBCORL1 ポリペプチド（並びに及びその断片、ドメイン、及び／又はモチーフ）の結合パートナーを指す。

【0098】

「BCORL1 制御経路」という用語は、BCORL1（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／又はモチーフ）が、その基質のうちの少なくとも1つに結合する経路を含み、それを通じて、少なくとも1つの細胞機能及び／若しくは活性並びに／又は細胞タンパク質プロファイルが変化する。BCORL1 制御経路には、転写制御などの少なくとも本明細書に記載されるものが含まれる。

40

【0099】

「BCORL1 のコピー数、発現レベル、及び／若しくは活性を減少させる薬剤」、又は「BCORL1 の量及び／若しくは活性を減少させる薬剤」という用語は、BCORL1 ポリペプチド（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／若しくはモチーフ）の発現レベル及び／又は活性を減少させることができる、ヒトによって調製、合成、製造、及び／又は精製された任意の天然又は非天然の薬剤を包含する。いくつかの実施形態では、薬剤は、BCORL1 とその基質又は他の結合パートナーとの間の結合／相互作用を減少させてもよい。他の実施形態では、薬剤は、BCORL1 ポリペプチドの発現を減少させ得る。更に他の実施形態では、かかる薬剤は、腫瘍に対する免疫応答を増強す

50

る際のBCORL1の活性を減少させ得る。なお他の実施形態では、かかる阻害剤は、ターンオーバー率を増加させ、発現及び／若しくは安定性（例えば、半減期）を減少させ、かつ／又はBCORL1の細胞局在を変化させ、少なくともBCORL1レベル及び／若しくは活性の減少をもたらし得る。かかる薬剤は、小分子化合物、抗体又はイントラボディ、RNA干渉（RNAi）剤（少なくともsiRNA、shRNA、マイクロRNA（miRNA）、piwi、及び他の周知の薬剤を含む）、並びにがん細胞内のBCORL1又はその断片の内因性産生を阻害する遺伝子構築物を含むが、これらに限定されない任意の分子であってよい。かかる薬剤は、BCORL1に特異的であり得るか、又はその結合パートナーの少なくとも1つにも特異的であり得る。BCORL1ポリペプチドに対するRNA干渉は、周知であり、市販されている（例えば、Origene（Rockville, MD）からのヒト、ラット、又はマウスのshRNA／siRNA製品（カタログ番号TL306414V、TF306414、TR519839、TR306414、SR311867、TL306414、SR423201）、及びCRISPRによるヒト又はマウス遺伝子ノックアウトキット（カタログ番号KN419297、KN502121）、並びにSanta Cruz Biotechnology（Dallas, Texas）からのsiRNA／shRNA製品（カタログ番号sc-141680）。（例えば、抗BCORL1抗体による）BCORL1の検出、精製、及び／又は阻害のための方法も周知であり、市販されている（カタログ番号ab251816）、ab251817）（Abcam）。（BCORL1ノックアウトヒト細胞株もまた周知であり、Horizon（Cambridge, UK、カタログ番号HZGHC630358）で入手可能である。

【0100】

「ringフィンガータンパク質1」としても知られる「RING1A」という用語は、RINGファミリーに属する遺伝子又はタンパク質を指す。Ringファミリーメンバーは、亜鉛フィンガードメインに関連する亜鉛結合モチーフであるRINGドメインを有することを特徴とする。RING1Aは、ポリコム基複合体タンパク質BMI、EDR1、及びCBX4と相互作用する。代替的スプライシングは、複数の転写バリエーションをもたらす。「RING1A」という用語は、その断片、バリエーション（例えば、対立遺伝子バリエーション）、及び誘導体を含むよう意図されている。

【0101】

代表的なヒトRING1Aの核酸及びアミノ酸配列は、GenBankデータベース（遺伝子ID 6015）で一般に公開されており、表1に示される。代替的スプライシングによって生成された少なくとも2つの異なるヒト転写バリエーションを含む、いくつかの異なるアイソフォームをコードする複数の転写バリエーションが、RING1Aについて見出されている（uniprot.org／uniprot／Q06587でWorld Wide Webを参照のこと）。ヒトRING1Aバリエーションは、アイソフォーム1をコードする転写バリエーション1（NM__002931.4及びNP__002922.2）を含む。

【0102】

ヒト以外の生物におけるRING1Aオルソログの核酸及びポリペプチド配列が周知であり、例えば、チンパンジー（NM__001081482.1及びNP__001074951.1、XM__009450849.3及びXP__009449124.1、並びにXM__016954658.2及びXP__016810147.1）、アカゲザル（NM__001114959.1及びNP__001108431.1、XM__028846856.1及びXP__028702689.1、並びにXM__015136067.2及びXP__014991553.1）、イヌ（NM__001048128.1及びNP__001041593.1）、ウシ（NM__001105051.1及びNP__001098521.1）、マウス（NM__009066.3及びNP__033092.3）、ラット（NM__212549.2及びNP__997714.2、XM__017601640.1及びXP__017457129.1）、並びにカエル（NM__001097325.1及びNP

— 001090794.1) が含まれる。

【0103】

「RING1A 活性」という用語は、RING1A ポリペプチド（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／若しくはモチーフ）がその基質に結合し、かつ／又はその転写抑制活性を媒介する能力を含む。

【0104】

「RING1A 基質」という用語は、RING1A ポリペプチド（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／又はモチーフ）、例えば、BMI1、EDR1、及びCBX4を含む、本明細書に列挙されるタンパク質の結合パートナーを指す。

【0105】

「RING1A 制御経路」という用語は、RING1A（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／又はモチーフ）が、その基質のうちの少なくとも1つに結合する経路を含み、これを通じて、少なくとも1つの細胞機能及び／若しくは活性並びに／又は細胞タンパク質プロファイルが変化する。RING1A 制御経路には、転写抑制などの少なくとも本明細書に記載されるものが含まれる。

【0106】

「RING1A のコピー数、発現レベル、及び／若しくは活性を減少させる薬剤」、又は「RING1A の量及び／若しくは活性を減少させる薬剤」という用語は、RING1A ポリペプチド（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／若しくはモチーフ）の発現レベル及び／又は活性を減少させることができる、ヒトによって調製、合成、製造、及び／又は精製された任意の天然又は非天然の薬剤を包含する。いくつかの実施形態では、薬剤は、RING1A とその基質又は他の結合パートナーとの間の結合／相互作用を減少させてもよい。他の実施形態では、薬剤は、RING1A ポリペプチドの発現を減少させ得る。更に他の実施形態では、かかる薬剤は、腫瘍に対する免疫応答を増強する際のRING1A の活性を減少させ得る。なお他の実施形態では、かかる阻害剤は、ターンオーバー率を増加させ、発現及び／若しくは安定性（例えば、半減期）を減少させ、かつ／又はRING1A の細胞局在を変化させ、少なくともRING1A レベル及び／若しくは活性の減少をもたらし得る。かかる薬剤は、小分子化合物、抗体又はイントラボディ、RNA 干渉 (RNAi) 剤（少なくとも siRNA、shRNA、マイクロRNA (miRNA)、piwi、及び他の周知の薬剤を含む）、並びにがん細胞内のRING1A 又はその断片の内因性産生を阻害する遺伝子構築物を含むが、これらに限定されない任意の分子であってよい。かかる薬剤は、RING1A に特異的であり得るか、又はBMI1、EDR1、及びCBX4を含むが、これらに限定されない結合パートナーのうちの少なくとも1つにも特異的であり得る。RING1A ポリペプチドに対するRNA干渉は周知であり、市販されている（例えば、Origene (Rockville, MD) からのヒト、ラット、又はマウス shRNA / siRNA 製品（とりわけ、カタログ番号 TL309810V、SR304071、SR304071、SR304082、TG309787、TG512489、TL309787、及びCRISPRによるヒト又はマウス遺伝子ノックアウトキット（カタログ番号 KN514834、KN402650）、並びに Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas) からの siRNA / shRNA 製品（カタログ番号 sc-38198、sc-77379、sc-106751、sc-38197、sc-62946、sc-62947）。（例えば、抗RING1A 抗体による）RING1A の検出、精製、及び／又は阻害のための方法もまた、周知であり、市販されている（例えば、（カタログ番号 C48439 (Signalway Antibody)、CF809239 CF809256 (Origene) ; とりわけ、ab175149、ab180170、ab32644 (Abcam) ; sc-517221 (Santa Cruz)。加えて、ヒトRING1A ノックアウト細胞株は、Horizon (Cambridge, UK、カタログ番号 HZGHC001111c003、HZGHC001111c012、及びHZGHC001111c001) から市販されている。

10

20

30

40

50

【0107】

「ringフィンガータンパク質2」としても知られる「RING1B」という用語は、RNF2遺伝子によってコードされるポリコーム基複合体（例えば、PRC1.1）のメンバーを指す。RING1Bは、転写因子であるCP2と相互作用し、それを阻害することが示されている。RING1Bはまた、ユビキチン結合酵素であるハンチンチン相互作用タンパク質2（HIP2）と相互作用し、ユビキチンリガーゼ活性を有する。このタンパク質は、クロマチン結合及びユビキチン-タンパク質トランスフェラーゼを有する。

「RING1B」という用語は、その断片、バリエント（例えば、対立遺伝子バリエント）、及び誘導体を含むよう意図されている。

【0108】

代表的なヒトRING1Bの核酸及びアミノ酸配列は、GenBankデータベース（遺伝子ID 6045）で一般に公開されており、表1に示される。代替的スプライシングによって生成された少なくとも2つの異なるヒト転写バリエントを含む、いくつかの異なるアイソフォームをコードする複数の転写バリエントが、RING1Bについて見出されている（uniprot.org/uniprot/Q99496でWorld Wide Webを参照のこと）。ヒトRING1Bは、正準配列（NM__007212.4及びNP__009143.1）をコードする。ヒトRING1Bバリエントにはまた、アイソフォームX1をコードする転写バリエント（XM__011509852.2及びXP__011508154.1、並びにXM__011509851.3及びXP__011508153.1）、並びにアイソフォームX2をコードする転写バリエント（XM__005245413.3及びXP__005245470.1）が含まれる。ヒト以外の生物におけるRING1Bオルソログの核酸及びポリペプチド配列は周知であり、例えば、チンパンジー（XM__514057.6及びXP__514057.3、XM__003308638.4及びXP__003308686.1、XM__009439605.3及びXP__009437880.1、並びにXM__009439610.3及びXP__009437885.1）、イヌ（XM__022420969.1及びXP__022276677.1）、ウシ（NM__001101203.1及びNP__001094673.1、XM__024976397.1及びXP__024832165.1、並びにXM__024976398.1及びXP__024832166.1）、マウス（NM__001360844.1及びNP__001347773.1、NM__001360845.1及びNP__001347774.1、NM__001360847.1及びNP__001347776.1、並びにNM__011277.3及びNP__035407.1）、ラット（NM__001025667.1及びNP__001020838.1、XM__006249991.3及びXP__006250053.1、並びにXM__006249990.3及びXP__006250052.1）、ニワトリ（XM__015290550.2及びXP__015146036.1、並びにXM__015290551.2及びXP__015146037.1）、カエル（NM__213707.2及びNP__998872.1）、ゼブラフィッシュ（NM__131213.2及びNP__571288.2）、ミバエ（NM__058161.4及びNP__477509.1）、及び蚊（XM__320974.5及びXP__320974.3）が含まれる。

【0109】

「RING1B活性」という用語は、RING1Bポリペプチド（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／若しくはモチーフ）がその基質に結合し、かつ／又はそのユビキチンリガーゼ活性を媒介する能力を含む。

【0110】

「RING1B基質」という用語は、RING1Bポリペプチド（及び本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／又はモチーフ）、例えば、C2及びHIP2を含む、本明細書に列挙されるタンパク質の結合パートナーを指す。

【0111】

「RING1B制御経路」という用語は、RING1B（並びに本明細書で論じられる

10

20

30

40

50

その断片、ドメイン、及び／又はモチーフ）が、その基質のうちの少なくとも1つに結合する経路を含み、これを通じて、少なくとも1つの細胞機能及び／若しくは活性並びに／又は細胞タンパク質プロファイルが変化する。RING1B制御経路には、発生及び細胞増殖などの少なくとも本明細書に記載されるものが含まれる。

【0112】

「RING1Bのコピー数、発現レベル、及び／若しくは活性を減少させる薬剤」、又は「RING1Bの量及び／若しくは活性を減少させる薬剤」という用語は、RING1Bポリペプチド（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／若しくはモチーフ）の発現レベル及び／又は活性を減少させることができる、ヒトによって調製、合成、製造、及び／又は精製された任意の天然又は非天然の薬剤を包含する。いくつかの実施形態では、薬剤は、RING1Bとその基質又は他の結合パートナーとの間の結合／相互作用を減少させてもよい。他の実施形態では、薬剤は、RING1Bポリペプチドの発現を減少させ得る。更に他の実施形態では、かかる薬剤は、腫瘍に対する免疫応答を増強する際のRING1Bの活性を減少させ得る。なお他の実施形態では、かかる阻害剤は、ターンオーバー率を増加させ、発現及び／若しくは安定性（例えば、半減期）を減少させ、かつ／又はRING1Bの細胞局在を変化させ、少なくともRING1Bレベル及び／若しくは活性の減少をもたらし得る。かかる薬剤は、小分子化合物、抗体又はイントロボディ、RNA干渉（RNAi）剤（少なくともsiRNA、shRNA、マイクロRNA（miRNA）、piwi、及び他の周知の薬剤を含む）、並びにがん細胞内のRING1B又はその断片の内因性産生を阻害する遺伝子構築物を含むが、これらに限定されない任意の分子であってよい。かかる薬剤は、RING1Bに特異的であり得るか、又はC2及びHIP2を含むが、これらに限定されない、結合パートナーのうちの少なくとも1つにも特異的であり得る。RING1Bの検出のための抗体は、市販されている（カタログ番号R1502P TA302592（Origene）；とりわけ、ab187509、ab181140、ab101273（Abcam）；sc-101109（Santa Cruz）。RING1Bポリペプチドに対するRNA干渉は、周知であり、市販されている（例えば、Origene（Rockville, MD）からのヒト、ラット、又はマウスのshRNA／siRNA製品（とりわけ、カタログ番号TL309787V、SR304082、SR304082、TG309787、TG512489、及びCRISPRによるヒト又はマウス遺伝子ノックアウトキット（カタログ番号KN514934、KN403089）、並びにSanta Cruz Biotechnology（Dallas, Texas）からのsiRNA／shRNA製品（カタログ番号sc-62946、sc-62947）。（例えば、抗RING1B抗体による）RING1Bの検出、精製、及び／又は阻害のための方法もまた、周知であり、市販されている（例えば、（カタログ番号C49790（Signalway Antibody；ABIN2781368、ABIN6207349（antibodies-online.com, Limerick, PA）。RING1Bノックアウトヒト細胞株もまた、周知であり、Horizon（Cambridge, UK、とりわけ、カタログ番号HZGHC001181c002、HZGHC001181c007、HZGHC001181c005、HZGHC001181c001、HZGHC001181c003）。

【0113】

「RING1及びYY1結合タンパク質」としても知られる「RYBP」という用語は、ポリコム抑制複合体1（及び1.1）のメンバーを指す。RYBPは、転写コリプレッサーである。代替的スプライシングは、複数の転写バリエーションをもたらす。「RYBP」という用語は、その断片、バリエーション（例えば、対立遺伝子バリエーション）、及び誘導体を含むよう意図されている。

【0114】

代表的なヒトRYBPの核酸及びアミノ酸配列は、GenBankデータベース（遺伝子ID 23429）で一般に公開されており、表1に示される。RYBPをコードする単一の転写バリエーションが同定されている（uniprot.org／uniprot／Q

8 N 4 8 8 での W o r l d W i d e W e b を参照のこと、N M _ 0 0 1 0 0 5 3 6 6 . 2 及び N P _ 0 0 1 0 0 5 3 6 6 . 1) 。

【0115】

ヒト以外の生物における R Y B P オルソログの核酸及びポリペプチド配列が周知であり、例えば、チンパンジー (X M _ 0 1 6 9 4 1 4 8 8 . 2 及び X P _ 0 1 6 7 9 6 9 7 7 . 1) 、イヌ (X M _ 0 2 2 4 0 7 3 3 9 . 1 及び X P _ 0 2 2 2 6 3 0 4 7 . 1) 、マウス (N M _ 0 1 9 7 4 3 . 3 及び N P _ 0 6 2 7 1 7 . 2) 、並びにニワトリ (X M _ 0 1 5 2 9 3 2 3 2 . 2 及び X P _ 0 1 5 1 4 8 7 1 8 . 1) が含まれる。

【0116】

R Y B P 「R Y B P 基質」という用語は、本明細書で論じられる R Y B P ポリペプチド (並びにその断片、ドメイン、及び／又はモチーフ) の結合パートナーを指す。

10

【0117】

「R Y B P 制御経路」という用語は、R Y B P (並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／又はモチーフ) が、その基質のうちの少なくとも1つに結合する経路を含み、これを通じて、少なくとも1つの細胞機能及び／又は活性及び／又は細胞タンパク質プロファイルが変化する。R Y B P 制御経路には、E 2 F 転写因子ネットワーク及びクロマチン制御並びにアセチル化などの少なくとも本明細書に記載されるものが含まれる。

【0118】

「R Y B P のコピー数、発現レベル、及び／若しくは活性を減少させる薬剤」、又は「R Y B P の量及び／若しくは活性を減少させる薬剤」という用語は、R Y B P ポリペプチド (並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／若しくはモチーフ) の発現レベル及び／又は活性を減少させることができる、ヒトによって調製、合成、製造、及び／又は精製された任意の天然又は非天然の薬剤を包含する。いくつかの実施形態では、薬剤は、R Y B P とその基質又は他の結合パートナーとの間の結合／相互作用を減少させてもよい。他の実施形態では、薬剤は、R Y B P ポリペプチドの発現を減少させ得る。更に他の実施形態では、かかる薬剤は、腫瘍に対する免疫応答を増強する際の R Y B P の活性を減少させ得る。なお他の実施形態では、かかる阻害剤は、ターンオーバー率を増加させ、発現及び／若しくは安定性 (例えば、半減期) を減少させ、かつ／又は R Y B P の細胞局在を変化させ、少なくとも R Y B P レベル及び／又は活性の減少をもたらし得る。かかる薬剤は、小分子化合物、抗体又はイントラボディ、RNA 干渉 (R N A i) 剤 (少なくとも s i R N A 、 s h R N A 、マイクロRNA (m i R N A) 、p i w i 、及び他の周知の薬剤を含む)、並びにがん細胞内の R Y B P 又はその断片の内因性産生を阻害する遺伝子構築物を含むが、これらに限定されない任意の分子であってよい。かかる薬剤は、R Y B P に特異的であり得るか、又はその結合パートナーのうちの少なくとも1つにも特異的であり得る。R Y B P ポリペプチドに対する RNA 干渉は、周知であり、市販されている (例えば、O r i g e n e (R o c k v i l l e , M D) からのヒト、ラット、又はマウスの s h R N A / s i R N A 製品 (とりわけ、カタログ番号 T L 3 0 9 6 7 5 V 、S R 3 0 8 2 7 0 、T L 5 0 3 1 5 6 、S R 3 0 8 2 7 0 、T R 3 0 9 6 7 5 、R 4 0 4 9 3 3 、及び C R I S P R によるヒト又はマウス遺伝子ノックアウトキット (カタログ番号 K N 4 0 6 1 8 6 、K N 5 1 5 2 2 8) 、並びに S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y (D a l l a s , T e x a s) からの s i R N A / s h R N A 製品 (カタログ番号 s c - 7 7 3 7 9 、s c - 1 0 6 7 5 1)) 。 (例えば、抗 R Y B P 抗体による) R Y B P の検出、精製、及び／又は阻害のための方法もまた、周知であり、市販されている (例えば、(カタログ番号 2 8 6 4 5 (S i g n a l w a y A n t i b o d i e s) ; A B I N 1 1 5 6 0 5 9 、A B I N 1 1 5 6 0 5 8 (a n t i b o d i e s - o n l i n e . c o m) ; R Y B P (A - 1) 、R Y B P (A - 1) X (S a n t a C r u z)) 。 R Y B P に特異的に結合する抗体は、市販されている (カタログ番号 A P 0 0 0 9 5 P U - N 、A P 0 7 7 2 9 P U - N (O r i G e n e) ; a b 1 8 5 9 7 1 、a b 2 5 0 8 7 1 、a b 5 9 7 6 、a b 1 0 7 8 9 6 、a b 8 9 6 0 3 (A b c a m) ; R Y B P (A - 1

20

30

40

50

)、RYBP (A-1) X (Santa Cruz)。RYBPノックアウトヒト細胞株もまた、周知であり、Horizon (Cambridge, UK、カタログ番号HZGHC23429) で入手可能である。

【0119】

「ポリコーン群Ringフィンガー1」としても知られている「PCGF1」という用語は、PRC1.1複合体のメンバーを指す。この遺伝子の重要なパラログは、COMM D3-BMI1である。代替的スプライシングは、複数の転写バリエーションをもたらす。「PCGF1」という用語は、その断片、バリエーション（例えば、対立遺伝子バリエーション）、及び誘導体を含むよう意図されている。

【0120】

代表的なヒトPCGF1の核酸及びアミノ酸配列は、GenBankデータベース（遺伝子ID 84759）で一般に公開されており、表1に示される。代替的スプライシングによって生成された少なくとも2つの異なるヒト転写バリエーションを含む、いくつかの異なるアイソフォームをコードする複数の転写バリエーションが、PCGF1について見出されている（uniprot.org/uniprot/Q9BSM1でWorld Wide Webを参照のこと）。ヒトPCGF1バリエーションとしては、アイソフォーム1をコードする転写バリエーション1（NM_032673.3及びNP_116062.2）、並びにアイソフォームX1をコードする転写バリエーション2（XM_024453181.1及びXP_024308949.1）が挙げられる。

【0121】

ヒト以外の生物におけるPCGF1オルソログの核酸及びポリペプチド配列が周知であり、例えば、チンパンジー（XM_515562.6及びXP_515562.2）、アカゲザル（XM_015112696.2及びXP_014968182.1）、イヌ（XM_022404797.1及びXP_022260505.1、XM_005630527.3及びXP_005630584.1、XM_005630524.3及びXP_005630581.1、XM_005630526.3及びXP_005630583.1、XM_005630529.3及びXP_005630586.1、XM_532995.6及びXP_532995.2、並びにXM_022404796.1及びXP_022260504.1）、ウシ（NM_001046447.2及びNP_001039912.2）、マウス（XM_030255588.1及びXP_030111448.1、ラット（NM_001007000.1及びNP_001007001.1）、ニワトリ（XM_015273146.2及びXP_015128632.1）、ゼブラフィッシュ（NM_001007158.2及びNP_001007159.1、並びにXM_009307695.3及びXP_009305970.1）が含まれる。「PCGF1活性」という用語は、PCGF1ポリペプチド（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／若しくはモチーフ）がその基質に結合し、かつ／又はその活性を媒介する能力を含む。

【0122】

「PCGF1基質」という用語は、本明細書で論じられるPCGF1ポリペプチド（並びに及びその断片、ドメイン、及び／又はモチーフ）の結合パートナーを指す。

【0123】

「PCGF1制御経路」という用語は、PCGF1（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／又はモチーフ）が、その基質のうちの少なくとも1つに結合する経路を含み、これを通じて、少なくとも1つの細胞機能及び／若しくは活性並びに／又は細胞タンパク質プロファイルが変化する。

【0124】

「PCGF1のコピー数、発現レベル、及び／若しくは活性を減少させる薬剤」、又は「PCGF1の量及び／若しくは活性を減少させる薬剤」という用語は、PCGF1ポリペプチド（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／若しくはモチーフ）の発現レベル及び／又は活性を減少させることができる、ヒトによって調製、合成、製造

10

20

30

40

50

、及び／又は精製された任意の天然又は非天然の薬剤を包含する。いくつかの実施形態では、薬剤は、PCGF1とその基質又は他の結合パートナーとの間の結合／相互作用を減少させてもよい。他の実施形態では、薬剤は、PCGF1ポリペプチドの発現を減少させ得る。更に他の実施形態では、かかる薬剤は、腫瘍に対する免疫応答を増強する際のPCGF1の活性を減少させ得る。なお他の実施形態では、かかる阻害剤は、ターンオーバー率を増加させ、発現及び／又は安定性（例えば、半減期）を減少させ、かつ／又はPCGF1の細胞局在を変化させ、少なくともPCGF1レベル及び／又は活性の減少をもたらし得る。かかる薬剤は、小分子化合物、抗体又はイントラボディ、RNA干渉（RNAi）剤（少なくともsiRNA、shRNA、マイクロRNA（miRNA）、piwi、及び他の周知の薬剤を含む）、並びにがん細胞内のPCGF1又はその断片の内因性産生を阻害する遺伝子構築物を含むが、これらに限定されない任意の分子であってよい。かかる薬剤は、PCGF1に特異的であり得るか、又は結合パートナーのうちの少なくとも一方にも特異的であり得る。PCGF1の検出のための抗体は、市販されている（カタログ番号TA330488（Origene）；ab84108、ab194556）（Abcam）；sc-515371（Santa Cruz）。PCGF1ポリペプチドに対するRNA干渉は、周知であり、市販されている（例えば、Origene（Rockville, MD）からのヒト、ラット、又はマウスのshRNA／siRNA製品（とりわけ、カタログ番号TL302590V、SR313658、TR302590、SR406929、SR313658、TL302590）及びCRISPRによるヒト又はマウス遺伝子ノックアウトキット（カタログ番号KN512948、KN416322）、並びにSanta Cruz Biotechnology（Dallas, Texas）からのsiRNA／shRNA製品（カタログ番号sc-152107、sc-94353）。（例えば、抗PCGF1抗体による）PCGF1の検出、精製、及び／又は阻害のための方法もまた、周知であり、市販されている（例えば、（カタログ番号BIN6208970、ABIN6208971（antibodies-online.com）；30713、C30713（Signalway Antibody. PCGF1ノックアウトヒト細胞株もまた、周知であり、Horizon（Cambridge, UK、カタログ番号HZGHC84759）で入手可能である。

10

20

30

40

50

【0125】

「S相キナーゼ関連タンパク質1」としても知られる「SKP1」という用語は、タンパク質基質のユビキチン化に参与する、SCF複合体の構成要素であるタンパク質を指す。これらの複合体については、上で記載されている。代替的スプライシングは、複数の転写バリエーションをもたらす。「SKP1」という用語は、その断片、バリエーション（例えば、対立遺伝子バリエーション）、及び誘導体を含むよう意図されている。

【0126】

代表的なヒトSKP1の核酸及びアミノ酸配列は、GenBankデータベース（遺伝子ID 6500）で一般に公開されており、表1に示される。代替的スプライシングによって生成された少なくとも2つの異なるヒト転写バリエーションを含む、いくつかの異なるアイソフォームをコードする複数の転写バリエーションが、SKP1について見出されている（uniprot.org／uniprot／P63208でWorld Wide Webを参照のこと）。ヒトSKP1バリエーションとしては、アイソフォームaをコードする転写バリエーション1（NM__006930.3及びNP__008861.2）及びアイソフォームbをコードする転写バリエーション2（NM__170679.3及びNP__733779.1）が挙げられる。

【0127】

ヒト以外の生物におけるSKP1オルソログの核酸及びポリペプチド配列が周知であり、例えば、チンパンジー（XM__001166401.6及びXP__001166401.1）、イヌ（NM__001252408.1及びNP__001239337.1）、ウシ（NM__001034781.2及びNP__001029953.1）、マウス（NM__011543.4及びNP__035673.3、並びにXM__006532786.2

及びXP__006532849.1)、ラット(NM__001007608.2及びNP__001007609.1)、ニワトリ(NM__001006153.1及びNP__001006153.1、XM__025154856.1及びXP__025010624.1、XM__025154857.1及びXP__025010625.1)、カエル(NM__001016519.3及びNP__001016519.1、XM__012959026.3及びXP__012814480.1)、ミバエ(NM__166858.3及びNP__726692.1、NM__058042.5及びNP__477390.1、NM__001038729.3及びNP__001033818.1、NM__166857.3及びNP__726691.1、NM__166856.3及びNP__726690.1、NM__166861.3及びNP__726695.1、NM__166860.3及びNP__726694.1、NM__166859.3及びNP__726693.1、NM__001297826.1及びNP__001284755.1)が含まれる。「SKP1活性」という用語は、SKP1ポリペプチド(並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び/又はモチーフ)がその基質に結合する能力を含み、これは、SCF複合体として、細胞周期の進行、シグナル伝達、及び転写に関与する。

10

【0128】

「SKP1基質」という用語は、SKP1ポリペプチド(並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び/又はモチーフ)、例えば、Cul1及びF-boxタンパク質を含む、本明細書に列挙されるタンパク質の結合パートナーを指す。

20

【0129】

「SKP1制御経路」という用語は、SKP1(並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び/又はモチーフ)が、その基質のうちの少なくとも1つに結合する経路を含み、これを通じて、少なくとも1つの細胞機能及び/若しくは活性並びに/又は細胞タンパク質プロファイルが変化する。SKP1制御経路には、少なくとも本明細書に記載されるものが含まれる。

【0130】

「SKP1のコピー数、発現レベル、及び/若しくは活性を減少させる薬剤」、又は「SKP1の量及び/若しくは活性を減少させる薬剤」という用語は、SKP1ポリペプチド(並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び/若しくはモチーフ)の発現レベル及び/又は活性を減少させることができる、ヒトによって調製、合成、製造、及び/又は精製された任意の天然又は非天然の薬剤を包含する。いくつかの実施形態では、薬剤は、SKP1とその基質又は他の結合パートナーとの間の結合/相互作用を減少させてもよい。他の実施形態では、薬剤は、SKP1ポリペプチドの発現を減少させ得る。更に他の実施形態では、かかる薬剤は、腫瘍に対する免疫応答を増強する際のSKP1の活性を減少させ得る。なお他の実施形態では、かかる阻害剤は、ターンオーバー率を増加させ、発現及び/若しくは安定性(例えば、半減期)を減少させ、かつ/又はSKP1の細胞局在を変化させ、少なくともSKP1レベル及び/若しくは活性の減少をもたらし得る。かかる薬剤は、小分子化合物、抗体又はイントラボディ、RNA干渉(RNAi)剤(少なくともsiRNA、shRNA、マイクロRNA(miRNA)、piwi、及び他の周知の薬剤を含む)、並びにがん細胞内のSKP1又はその断片の内因性産生を阻害する遺伝子構築物を含むが、これらに限定されない任意の分子であってよい。かかる薬剤は、SKP1に特異的であり得るか、又はF-boxタンパク質及びキュリン(例えば、CUL1)を含むが、これらに限定されない結合パートナーのうちの少なくとも1つにも特異的であり得る。SKP1の検出のための抗体は、市販されている(カタログ番号AM06704SU-N、AM06720SU-N(Origene); ab76502、ab233484、ab228637(Abcam); sc-136301、sc-5281(Santa Cruz))。SKP1ポリペプチドに対するRNA干渉は、周知であり、市販されている(例えば、Origene(Rockville, MD)からのヒト、ラット、又はマウスのshRNA/siRNA製品(カタログ番号TL301685V、SR304387、TR301685、SR304387、TF502226、TR5022

30

40

50

26及びCRISPRによるヒト又はマウス遺伝子ノックアウトキット（カタログ番号KN406509）、並びにSanta Cruz Biotechnology（Dallas, Texas）からのsiRNA/shRNA製品（カタログ番号sc-29482、sc-153916、sc-36498、sc-76605）。（例えば、抗SKP1抗体による）SKP1の検出、精製、及び／又は阻害のための方法もまた、周知であり、市販されている（例えば、（カタログ番号ABIN822770 ABIN421487（antibodies-online.com）；EK7324、EK16636（Signalway Antibody）。

【0131】

「BCL6コリプレッサー」としても知られる「BCOR」という用語は、BCL6のPOZドメインと相互作用するコリプレッサーを指す。BCORはまた、ヒストンデアセチラーゼのクラスと相互作用することが知られている。代替的スプライシングは、複数の転写バリエーションをもたらす。「BCOR」という用語は、その断片、バリエーション（例えば、対立遺伝子バリエーション）、及び誘導体を含むよう意図されている。

【0132】

代表的なヒトBCORの核酸及びアミノ酸配列は、GenBankデータベース（遺伝子ID 54880）で一般に公開されており、表1に示される。代替的スプライシングによって生成された少なくとも4つの異なるヒト転写バリエーションを含む、いくつかの異なるアイソフォームをコードする複数の転写バリエーションが、BCORについて見出されている（uniprot.org/uniprot/Q6W2J9でWorld Wide Webを参照のこと）。ヒトBCORバリエーションとしては、アイソフォームaをコードする転写バリエーション3（NM_001123383.1及びNP_001116855.1）、アイソフォームbをコードする転写バリエーション4（NM_001123384.2及びNP_001116856.1）、アイソフォームcをコードする転写バリエーション5（NM_001123385.2及びNP_001116857）、アイソフォームaをコードする転写バリエーション1（NM_017745.6及びNP_060215.4）、アイソフォームX1をコードする転写バリエーション（XM_005272616.1及びXP_005272673.1）、アイソフォームX1をコードする転写バリエーションX6（XM_011543931.2及びXP_011542233.1）、アイソフォームX1をコードする転写バリエーションX5（XM_011543930.1及びXP_011542232.1）、アイソフォームX1をコードする転写バリエーションX2（XM_011543929.2及びXP_011542231.1）、アイソフォームX1をコードする転写バリエーションX4（XM_005272618.3及びXP_005272675.1）、アイソフォームX3をコードする転写バリエーションX8（XM_017029615.1及びXP_016885104.1）、アイソフォームX1をコードする転写バリエーションX3（XM_006724536.3及びXP_006724599.1）、アイソフォームX4をコードする転写バリエーションX9（XM_005272620.4及びXP_005272677.1）、アイソフォームX2をコードする転写バリエーションX7（XM_005272619.4及びXP_005272676.1）、アイソフォームX5をコードする転写バリエーションX10（XM_017029616.2及びXP_016885105.1）が挙げられる。ヒト以外の生物におけるBCORオルソログの核酸及びポリペプチド配列は周知であり、例えば、チンパンジー（XM_016943431.2及びXP_016798920.1、XM_016947534.2及びXP_016803023.1、XM_016947536.2及びXP_016803025.1、XM_016943432.1及びXP_016798921.1、XM_016943433.1及びXP_016798922.1、XM_016943436.1及びXP_016798925.1、XM_016943430.1及びXP_016798919.1、XM_016943437.1及びXP_016798926.1、並びにXM_016943435.1及びXP_016798924.1、XM_016943434.2及びXP_016798923.1）、アカゲザル（XM_015127207.2

及びXP__014982693.2、XM__015127203.2及びXP__0149
82689.2、XM__028842387.1及びXP__028698220.1、X
M__028842388.1及びXP__028698221.1、XM__0288423
89.1及びXP__028698222.1、XM__015127204.2及びXP__
014982690.2、XM__015127202.2及びXP__014982688
.2、XM__015127208.2及びXP__014982694.2、XM__015
127206.2及びXP__014982692.2、XM__015127212.2及
びXP__014982698.2、XM__015127210.2及びXP__01498
2696.2、XM__015127205.2及びXP__014982691.2、XM
__015127211.2及びXP__014982697.2、XM__01512720
9.2及びXP__014982695.2)、イヌ(XM__537997.6及びXP__
537997.2、XM__022415576.1及びXP__022271284.1、
XM__022415575.1及びXP__022271283.1、XM__005641
249.3及びXP__005641306.1、XM__005641250.3及びXP
__005641307.1、XM__855998.5及びXP__861091.1、XM
__005641247.3及びXP__005641304.1、XM__855945.5
及びXP__861038.1、XM__005641248.3及びXP__0056413
05.1)、ウシ(NM__001191544.3及びNP__001178473.3、
XM__024988315.1及びXP__024844083.1、XM__005228
295.4及びXP__005228352.2、XM__005228296.4及びXP
__005228353.2、XM__024988316.1及びXP__02484408
4.1、XM__024988314.1及びXP__024844082.1、XM__02
4988322.1及びXP__024844090.1、XM__024988319.1
及びXP__024844087.1、XM__024988323.1及びXP__0248
44091.1、XM__024988320.1及びXP__024844088.1、X
M__024988324.1及びXP__024844092.1、XM__0249883
25.1及びXP__024844093.1、XM__024988317.1及びXP__
024844085.1、XM__024988318.1及びXP__024844086
.1)、マウス(NM__001168321.1及びNP__001161793.1、N
M__029510.3及びNP__083786.2、NM__175044.3及びNP__
778209.2、NM__175045.3及びNP__778210.2、NM__175
046.3及びNP__778211.2、XM__017318623.2及びXP__01
7174112.1、XM__017318621.2及びXP__017174110.1
、XM__030251502.1及びXP__030107362.1、XM__01731
8622.2及びXP__017174111.1、XM__030251503.1及びX
P__030107363.1、XM__030251500.1及びXP__0301073
60.1、XM__030251501.1及びXP__030107361.1、XM__0
30251499.1及びXP__030107359.1、XM__017318624.
2及びXP__017174113.1)、ラット(NM__001191586.1及びN
P__001178515.1、XM__006256660.3及びXP__0062567
22.1、XM__006256659.3及びXP__006256721.1、XM__0
06256664.3及びXP__006256726.1、XM__006256663.
3及びXP__006256725.1、XM__006256665.3及びXP__006
256727.1、XM__006256661.3及びXP__006256723.1)
、ニワトリ(XM__025146057.1及びXP__025001825.1、XM__
025146076.1及びXP__025001844.1、XM__025146086
.1及びXP__025001854.1、XM__025146070.1及びXP__02
5001838.1、XM__025146082.1及びXP__025001850.1
、XM__025146092.1及びXP__025001860.1、XM__02514
6062.1及びXP__025001830.1、XM__015302080.2及びX

P__015157566.2)、ゼブラフィッシュ(XM__005173943.4→XP__005174000.1)、並びにカエル(NM__001126679.1及びNP__001120151.1、XM__012956453.3及びXP__012811907.1、XM__012956456.3及びXP__012811910.1、XM__012956450.3及びXP__012811904.1、XM__012956452.3及びXP__012811906.1、XM__018091086.1及びXP__017946575.1、XM__031895681.1及びXP__031751541.1)が含まれる。

【0133】

「BCOR活性」という用語は、BCORポリペプチド（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／若しくはモチーフ）がその基質に結合し、かつ／又はそのコリプレッサー活性を媒介する能力を含む。

【0134】

「BCOR基質」という用語は、BCORポリペプチド（及び本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／又はモチーフ）、例えば、BCL6を含む本明細書に列挙されるタンパク質の結合パートナーを指す。

【0135】

「BCOR制御経路」という用語は、BCOR（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／又はモチーフ）が、その基質のうちの少なくとも1つに結合する経路を含み、これを通じて、少なくとも1つの細胞機能及び／若しくは活性並びに／又は細胞タンパク質プロファイルが変化する。BCOR制御経路には、ヒストン修飾の陽性又は陰性制御など、少なくとも本明細書に記載されるものが含まれる。

【0136】

「BCORのコピー数、発現レベル、及び／若しくは活性を減少させる薬剤」、又は「BCORの量及び／若しくは活性を減少させる薬剤」という用語は、BCORポリペプチド（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／又はモチーフ）の発現レベル及び／又は活性を減少させることができる、ヒトによって調製、合成、製造、及び／又は精製された任意の天然又は非天然の薬剤を包含する。いくつかの実施形態では、薬剤は、BCORとその基質又は他の結合パートナーとの間の結合／相互作用を減少させてもよい。他の実施形態では、薬剤は、BCORポリペプチドの発現を減少させ得る。更に他の実施形態では、かかる薬剤は、腫瘍に対する免疫応答を増強する際のBCORの活性を減少させ得る。なお他の実施形態では、かかる阻害剤は、ターンオーバー率を増加させ、発現及び／若しくは安定性を低下させ（例えば、半減期）、及び／又はBCORの細胞局在を変化させ、少なくともBCORレベル及び／又は活性の低下をもたらし得る。かかる薬剤は、小分子化合物、抗体又はイントラボディ、RNA干渉(RNAi)剤（少なくともsiRNA、shRNA、マイクロRNA(miRNA)、piwi、及び他の周知の薬剤を含む）、並びにがん細胞内のBCOR又はその断片の内因性産生を阻害する遺伝子構築物を含むが、これらに限定されない任意の分子であってよい。かかる薬剤は、BCORに特異的であり得るか、又はBCL6を含むが、これらに限定されない、結合パートナーのうちの少なくとも1つにも特異的であり得る。BCORの検出のための抗体は、市販されている（カタログ番号AP33297PU-N、CF807724(Origene)；とりわけ、ab135801、ab88112、ab129777、ab245423(Abcam)；sc-514576(SantaCruz)。BCORポリペプチドに対するRNA干渉は、周知であり、市販されている（例えば、Origene(Rockville, MD)からのヒト、ラット、又はマウスのshRNA/siRNA製品（とりわけ、カタログ番号TL306415V、SR310311、TL504552、TL306415、TL306415V、TF306414、TL519839V、及びCRI SPRによるヒト又はマウス遺伝子ノックアウトキット（カタログ番号KN413468, KN502120）、並びにSanta Cruz Biotechnology(Dallas, Texas)からのsiRNA/shRNA製品（カタログ番号sc

10

20

30

40

50

ー 7 2 6 3 5、s cー 7 2 6 3 6、s cー 9 0 8 6 1、s cー 1 4 1 6 8 0)。(例えば、抗 B C O R 抗体による) B C O R の検出、精製、及び／又は阻害のための方法もまた、周知であり、市販されている(例えば、(とりわけ、カタログ番号 R C 2 2 6 4 2 4、R C 2 1 3 4 6 8 L 1 V、R C 2 2 6 4 2 7 (O r i G e n e)。B C O R ノックアウトヒト細胞株もまた、周知であり、H o r i z o n (C a m b r i d g e, U K、カタログ番号 H Z G H C 0 0 4 8 9 5 c 0 0 5、H Z G H C 0 0 4 8 9 5 c 0 1 0)で入手可能である。

【0137】

「Y Y 1 関連因子 2」としても知られる「Y A F 2」という用語は、転写の制御に関するジンクフィンガーポリペプチド又は Y A F 2 をコードするポリヌクレオチドを指す。Y A F 2 は Y y 1 と相互作用し、そのタンパク質分解を促進することができる。Y A F 2 は、M Y C にも結合し、M Y C 媒介性トランス活性化を阻害する。複数の代替的にスプライシングされた転写バリエーションが知られている。「Y A F 2」という用語は、その断片、バリエーション(例えば、対立遺伝子バリエーション)、及び誘導体を含むよう意図されている。

10

【0138】

代表的なヒト Y A F 2 の核酸及びアミノ酸配列は、G e n B a n k データベース(遺伝子 I D 1 0 1 3 8)で一般に公開されており、表 1 に示される。代替的スプライシングによって生成された少なくとも 4 つの異なるヒト転写バリエーションを含む、いくつかの異なるアイソフォームをコードする複数の転写バリエーションが、Y A F 2 について見出されている(uniprot.org/uniprot/Q8IY57でWorld Wide Webを参照のこと)。ヒト Y A F 2 バリエーションとしては、アイソフォーム 3 をコードする転写バリエーション 3 (N M _ 0 0 1 1 9 0 9 7 7 . 2 及び N P _ 0 0 1 1 7 7 9 0 6 . 1)、アイソフォーム 1 をコードする転写バリエーション 1 (N M _ 0 0 1 1 9 0 9 7 9 . 2 及び N P _ 0 0 1 1 7 7 9 0 8 . 1)、アイソフォーム 4 をコードする転写バリエーション 4 (N M _ 0 0 1 1 9 0 9 8 0 . 2 及び N P _ 0 0 1 1 7 7 9 0 9 . 1)、アイソフォーム 5 をコードする転写バリエーション 5 (N M _ 0 0 5 7 4 8 . 6 及び N P _ 0 0 5 7 3 9 . 2)、アイソフォーム X 1 をコードする転写バリエーション X 1 (X M _ 0 1 1 5 3 7 7 2 8 . 3 及び X P _ 0 1 1 5 3 6 0 3 0 . 1)、アイソフォーム X 2 をコードする転写バリエーション X 2 (X M _ 0 2 4 4 4 8 7 9 2 . 1 及び X P _ 0 2 4 3 0 4 5 6 0 . 1)、アイソフォーム X 3 をコードする転写バリエーション X 3 (X M _ 0 0 6 7 1 9 1 8 5 . 3 及び X P _ 0 0 6 7 1 9 2 4 8 . 1)、アイソフォーム X 4 をコードする転写バリエーション X 4 (X M _ 0 1 1 5 3 7 7 2 9 . 2 及び X P _ 0 1 1 5 3 6 0 3 1 . 1)、並びに転写物 X 5 をコードする転写バリエーション X 5 (X M _ 0 1 7 0 1 8 6 7 0 . 2 及び X P _ 0 1 6 8 7 4 1 5 9 . 1)が挙げられる。

20

30

【0139】

ヒト以外の生物における Y A F 2 オルソログの核酸及びポリペプチド配列は周知であり、例えば、チンパンジー(X M _ 0 0 1 1 6 7 7 2 3 . 5 及び X P _ 0 0 1 1 6 7 7 2 3 . 1、X M _ 0 1 6 9 2 3 6 3 6 . 1 及び X P _ 0 1 6 7 7 9 1 2 5 . 1、X M _ 0 1 6 9 2 3 6 3 3 . 1 及び X P _ 0 1 6 7 7 9 1 2 2 . 1、X M _ 0 1 6 9 2 3 6 3 5 . 1 及び X P _ 0 1 6 7 7 9 1 2 4 . 1、並びに X M _ 0 1 6 9 2 3 6 3 4 . 2 及び X P _ 0 1 6 7 7 9 1 2 3 . 1)、アカゲザル(X M _ 0 1 5 1 5 1 4 5 7 . 2 及び X P _ 0 1 5 0 0 6 9 4 3 . 1)、並びにイヌ(X M _ 0 2 2 4 1 0 9 0 1 . 1 及び X P _ 0 2 2 2 6 6 6 0 9 . 1、X M _ 0 1 4 1 0 8 5 8 7 . 2 及び X P _ 0 1 3 9 6 4 0 6 2 . 1)が含まれる。

40

【0140】

「Y A F 2 活性」という用語は、Y A F 2 ポリペプチド(並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／若しくはモチーフ)がその基質に結合し、かつ／又はその転写抑制活性を媒介する能力を含む。

【0141】

「Y A F 2 基質」という用語は、Y A F 2 ポリペプチド(並びに本明細書で論じられる

50

その断片、ドメイン、及び／又はモチーフ)、例えば、MYC及びYy1を含む、本明細書に列挙されるタンパク質の結合パートナーを指す。

【0142】

「YAF2制御経路」という用語は、YAF2（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／又はモチーフ）が、その基質のうちの少なくとも1つに結合する経路を含み、これを通じて、少なくとも1つの細胞機能及び／若しくは活性並びに／又は細胞タンパク質プロファイルが変化する。YAF2制御経路には、ヒストン修飾の陽性又は陰性調節など、少なくとも本明細書に記載されるものが含まれる。

【0143】

「YAF2のコピー数、発現レベル、及び／若しくは活性を減少させる薬剤」、又は「YAF2の量及び／若しくは活性を減少させる薬剤」という用語は、YAF2ポリペプチド（並びに本明細書で論じられるその断片、ドメイン、及び／若しくはモチーフ）の発現レベル及び／又は活性を減少させることができる、ヒトによって調製、合成、製造、及び／又は精製された任意の天然又は非天然の薬剤を包含する。いくつかの実施形態では、薬剤は、YAF2とその基質又は他の結合パートナーとの間の結合／相互作用を減少させてもよい。他の実施形態では、薬剤は、YAF2ポリペプチドの発現を減少させ得る。更に他の実施形態では、かかる薬剤は、腫瘍に対する免疫応答を増強する際のYAF2の活性を減少させ得る。なお他の実施形態では、かかる阻害剤は、ターンオーバー率を増加させ、発現及び／若しくは安定性（例えば、半減期）を減少させ、かつ／又はYAF2の細胞局在を変化させ、少なくともYAF2レベル及び／若しくは活性の減少をもたらし得る。かかる薬剤は、小分子化合物、抗体又はイントラボディ、RNA干渉（RNAi）剤（少なくともsiRNA、shRNA、マイクロRNA（miRNA）、piwi、及び他の周知の薬剤を含む）、並びにがん細胞内のYAF2又はその断片の内因性産生を阻害する遺伝子構築物を含むが、これらに限定されない任意の分子であってよい。かかる薬剤は、YAF2に特異的であり得るか、又はMYC及びYy1を含むが、これらに限定されない結合パートナーのうちの少なくとも1つに特異的であり得る。YAF2の検出のための抗体は、市販されている（カタログ番号TA329295 TA329928（Origene）；ab239150、ab177945、及びab250017（Abcam）；ABIN203352、ABIN1501785、ABIN5621096、ABIN6742302、ABIN6736123、ABIN2568985、ABIN2895187（antibodies-online.com）。YAF2ポリペプチドに対するRNA干渉は、周知であり、市販されている（例えば、Origene（Rockville, MD）からのヒト、ラット、又はマウスのshRNA/siRNA製品（カタログ番号TL316898V、SR306838、TR316898、TL503808V、TL708870V、TR708870、SR404295、TL708870、SR306838、TR503808、TL316898、TL503808、TL316898V）及びCRISPRによるヒト又はマウス遺伝子ノックアウトキット（カタログ番号KN414071、KN519535）、並びにSanta Cruz Biotechnology（Dallas, Texas）からのsiRNA/shRNA製品（カタログ番号sc-95916、sc-155399）及びCRISPRによるヒト又はマウス遺伝子ノックアウトキット（とりわけ、カタログ番号sc-417274）。（例えば、抗YAF2抗体による）YAF2の検出、精製、及び／又は阻害のための方法もまた、周知であり、市販されている（例えば、（カタログ番号TA331108（Origene）；HG22835-ACGLN（Sino Biological US, Wayne, PA）；44489、C44489（Signalway Antibody）。

【0144】

「免疫応答」という用語は、T細胞媒介性及び／又はB細胞媒介性免疫応答を含む。例示の免疫応答には、T細胞応答、例えば、サイトカイン産生及び細胞毒性が含まれる。加えて、免疫応答という用語には、T細胞活性化、例えば、抗体産生（体液性応答）及びサイトカイン応答性細胞、例えば、マクロファージの活性化によって間接的にもたらされる

10

20

30

40

50

免疫応答が含まれる。

【0145】

「免疫治療薬」という用語は、対象における腫瘍又はがんに対する免疫応答をもたらすように宿主免疫系を刺激することができる任意の分子、ペプチド、抗体、又は他の薬剤を含み得る。様々な免疫治療薬が本明細書に記載の組成物及び方法で有用である。

【0146】

「阻害する」という用語は、例えば、特定の作用、機能、又は相互作用の低減、減少、制限、又は遮断を含む。いくつかの実施形態では、がんの少なくとも1つの症状が緩和、終了、減速、又は予防される場合、がんは「阻害される」。本明細書で使用される場合、がんの再発又は転移が低減、減速、遅延、又は予防される場合もまた、がんは「阻害される」。

10

【0147】

「相互作用」という用語は、2つの分子間の相互作用を指すとき、分子のお互いの物理的接触（例えば、結合）を指す。一般に、かかる相互作用は、当該分子の一方又は両方の活性をもたらす（それにより、生物学的効果がもたらされる）。

【0148】

「単離されたタンパク質」とは、他のタンパク質、細胞物質、分離培地、及び培養培地（細胞から単離される場合又は組換えDNA技法によって産生される場合）、又は化学的前駆体若しくは他の化学物質（化学的に合成される場合）を実質的に含まないタンパク質を指す。「単離された」又は「精製された」タンパク質又はその生物学的に活性な部分は、抗体、ポリペプチド、ペプチド、若しくは融合タンパク質が由来する細胞若しくは組織源由来の細胞物質若しくは他の夾雑タンパク質を実質的に含まず、又は化学的前駆体若しくは他の化学物質（化学的に合成される場合）を実質的に含まない。

20

【0149】

「細胞物質を実質的に含まない」という言語は、タンパク質が、それが単離されるか、又は組換え的に産生される細胞の細胞成分から分離されるバイオマーカーポリペプチド又はその断片の調製物を含む。一実施形態では、「細胞物質を実質的に含まない」という言語は、約30%未満（乾燥重量で）の非バイオマーカータンパク質（本明細書で「夾雑タンパク質」とも称される）、より好ましくは約20%未満の非バイオマーカータンパク質、なおより好ましくは約10%未満の非バイオマーカータンパク質、最も好ましくは約5%未満の非バイオマーカータンパク質を有するバイオマーカータンパク質又はその断片の調製物を含む。抗体、ポリペプチド、ペプチド、若しくは融合タンパク質、又はそれらの断片、例えば、それらの生物学的に活性な断片が組換え的に産生される場合、これは、好ましくは、培養培地、すなわち、タンパク質調製物の体積の約20%未満、より好ましくは約10%未満、最も好ましくは約5%未満に相当する培養培地を実質的に含まない。

30

【0150】

本明細書で使用される場合、「アイソタイプ」という用語は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス（例えば、IgM又はIgG1、IgG2C等）を指す。

【0151】

本明細書で使用される場合、「K_D」という用語は、特定の抗体－抗原相互作用の解離平衡定数を指すよう意図されている。開示される本発明の抗体の結合親和性は、標準の抗体－抗原アッセイ、例えば、競合的アッセイ、飽和アッセイ、又はELISA若しくはRIA等の標準の免疫アッセイによって測定又は決定され得る。

40

【0152】

「キット」とは、本発明のマーカーの発現を特異的に検出及び／又は行うための少なくとも1つの試薬、例えば、プローブ又は小分子を含む任意の製品（例えば、パッケージ又は容器）である。本キットは、本発明の方法を行うための装置として販売促進、流通、又は販売され得る。本キットは、本発明の方法で有用な組成物を発現するために必要な1つ以上の試薬を含み得る。特定の実施形態では、キットは、参照標準物、例えば、細胞成長、分裂、移行、生存又はアポトーシスを制御するシグナル伝達経路に影響を及ぼさないか

50

、又は調節しないタンパク質をコードする核酸を更に含んでもよい。当業者は、多くのこのような対照タンパク質を想定することができ、対照タンパク質としては、限定されないが、一般的な分子タグ（例えば、緑色蛍光タンパク質及びβ-ガラクトシダーゼ）、Gene Ontologyリファレンスによって細胞成長、分裂、遊走、生存若しくはアポトーシスを包含する経路のいずれにも分類されないタンパク質、又はユビキタスハウスキーピングタンパク質が挙げられる。キット内の試薬は、個々の容器内で、又は単一の容器内の2つ以上の試薬の混合物として提供されてもよい。加えて、キット内の組成物の使用を記載する教材を含むことができる。

【0153】

「ネオアジュバント療法」という用語は、一次治療の前に施される治療を指す。ネオアジュバント療法の例には、化学療法、放射線療法、及びホルモン療法が挙げられ得る。例えば、乳がんの治療において、ネオアジュバント療法は、大きな乳がんを有する患者が乳房保存手術を受けることを可能にすることができる。

【0154】

バイオマーカーの「過剰発現」又は「著しくより高い発現レベル」とは、発現を評価するために用いられるアッセイの標準誤差を超え、好ましくは、対照試料（例えば、バイオマーカー関連疾患を有しない健常対象由来の試料）におけるバイオマーカーの発現活性又はレベル、好ましくはいくつかの対照試料におけるバイオマーカーの平均発現レベルよりも好ましくは少なくとも10%、より好ましくは1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍、又はそれ以上に高い、試験試料における発現レベルを指す。バイオマーカーの「著しく低い発現レベル」とは、対照試料（例えば、バイオマーカー関連疾患を有しない健常対象由来の試料）におけるバイオマーカーの発現活性又はレベル、好ましくはいくつかの対照試料におけるバイオマーカーの平均発現レベルよりも少なくとも10%、より好ましくは1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍、又はそれ以上に低い、試験試料における発現レベルを指す。

【0155】

「所定の」バイオマーカー量及び／又は活性測定値という用語は、ほんの一例として、特定の治療のために選択され得る対象を評価するため、免疫療法と組み合わせでの、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの制御因子の阻害剤などの治療に対する応答を評価するため、かつ／又は病状を評価するために使用されるバイオマーカー量及び／又は活性測定値であり得る。所定のバイオマーカー量及び／又は活性測定値は、がんを有する患者集団又はがんを有しない患者集団において決定され得る。所定のバイオマーカー量及び／又は活性測定値は、あらゆる患者に平等に適用可能な単数であり得るか、又は所定のバイオマーカー量及び／又は活性測定値は、特定の患者亜集団により異なり得る。対象の年齢、体重、身長、及び他の因子は、その個体の所定のバイオマーカー量及び／又は活性測定値に影響を及ぼし得る。更に、所定のバイオマーカー量及び／又は活性は、対象毎に個別に決定され得る。一実施形態では、本明細書に記載の方法で決定及び／又は比較される量は、絶対測定値に基づいている。別の実施形態では、本明細書に記載の方法で決定及び／又は比較される量は、比率（例えば、ハウスキーピング又はさもなければ概ね一定のバイオマーカーの発現に正規化された血清バイオマーカー）などの相対測定値に基づいている。所定のバイオマーカー量及び／又は活性測定値は、任意の好適な基準であり得る。例えば、所定のバイオマーカー量及び／又は活性測定値は、患者選択が評価される同じ又は異なるヒトから得られ得る。一実施形態では、所定のバイオマーカー量及び／又は活性測定値は、同じ患者の以前の評価から得られ得る。かかる様式で、患者の選択の経過が

10

20

30

40

50

経時的に監視され得る。加えて、対照は、別のヒト又は複数のヒト、例えば、対象がヒトである場合、選択されたヒト群の評価から得られ得る。かかる様式で、選択が評価されるヒトの選択の程度が、好適な他のヒト、例えば、同様若しくは同じ状態に罹患しているヒト及び／又は同じ民族集団のヒト等の目的とするヒトと同様の状況下にある他のヒトと比較され得る。

【0156】

「予測的」という用語は、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの阻害剤に対するがんの応答の可能性を、免疫療法（例えば、かかる阻害剤と免疫療法、例えば、免疫チェックポイント阻害剤の組み合わせによる治療）と組み合わせて決定するための、療法前、療法中、又は療法後のバイオマーカー核酸及び／又はタンパク質状態、例えば、腫瘍の過剰若しくは過小活性、出現、発現、成長、寛解、再発、又は抵抗性の使用を含む。バイオマーカーのかかる予測的使用は、例えば、（1）増加若しくは減少したコピー数（例えば、FISH、FISH+SKY、単一分子配列決定、例えば、当該技術分野において少なくともJ. Biotechnol., 86:289-301に記載されるもの、若しくはqPCRによる）、バイオマーカー核酸の過剰発現若しくは過小発現（例えば、ISH、ノーザンブロット、若しくはqPCRによる）、増加若しくは減少したバイオマーカータンパク質（例えば、IHCによる）、又は増加若しくは減少した活性（例えば、アッセイされたヒトがんタイプ又はがん試料の約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%超、若しくはそれ以上における）、（2）生体試料、例えば、がん罹患している対象、例えば、ヒト由来の組織、全血、血清、血漿、頬搔爬物、唾液、脳脊髄液、尿、糞便、若しくは骨髓を含有する試料におけるその絶対又は比較的調節された存在又は不在、（3）がんを有する患者（例えば、特定の阻害剤／免疫療法の併用療法に応答する患者若しくはそれに対する抵抗性を発症する患者）の臨床サブセットにおけるその絶対又は比較的調節された存在又は不在によって確認され得る。

【0157】

「予防する」、「予防すること」、「予防」、「予防的治療」等の用語は、疾患、障害、又は状態を有しないが、それを発症する危険性があるか、又はそれに罹患し易い対象における疾患、障害、又は状態を発症する可能性を低下させることを指す。

【0158】

「プローブ」という用語は、特定の意図される標的分子、例えば、バイオマーカー核酸によってコードされるか、又はこれに対応するヌクレオチド転写物又はタンパク質に対して選択的に結合することができる任意の分子を指す。プローブは、当業者によって合成されるか、又は適切な生物学的調製物に由来するかのいずれかであり得る。標的分子の検出のために、プローブは、本明細書に記載されるように、標識されるように特異的に設計され得る。プローブとして利用され得る分子の例には、RNA、DNA、タンパク質、抗体、及び有機分子が挙げられるが、これらに限定されない。「予後」という用語は、がんの起こり得る経過及び転帰又は疾患からの回復の可能性の予測を含む。いくつかの実施形態では、統計的アルゴリズムの使用により、個体におけるがんの予後が提供される。例えば、予後は、手術、がんの臨床亜型（例えば、食道がん及び胃がんなどの固形腫瘍）の発症、1つ以上の臨床的因子の発症、又は疾患からの回復であり得る。

【0159】

「免疫療法に対する応答」又は「免疫療法と組み合わせての、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの阻害剤に対する応答」という用語は、抗がん剤、例えば、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの阻害剤、及び免疫療法、好ましくは、ネオアジュバント又はアジュバント療法の開始後の腫瘍質量及び／又は体積の変化に対する、過剰増殖性障害（例えば、がん）の任意の応答に関する。過剰増殖性障害応答が、例えば、有効性について又はネオアジュバント若しくはアジュバント状況で評価され得、全身介入後の腫瘍サイズが、CT、PET、マンモグラム、超音波、又は触診によって測定され

る初期サイズ及び寸法と比較され得る。応答は、生検又は外科的切除後の腫瘍のキャリパー測定又は病理学検査によっても評価され得る。応答は、腫瘍体積のパーセンテージ変化等の量的様式で、又は「病理学的完全寛解」(pCR)、「臨床的完全寛解」(cCR)、「臨床的部分寛解」(cPR)、「臨床的安定疾患」(cSD)、「臨床的進行性疾患」(cPD)、若しくは他の質的基準等の質的様式で記録され得る。過剰増殖性障害応答の評価は、ネオアジュバント又はアジュバント療法開始後早期に、例えば、数時間後、数日後、数週間後、又は好ましくは数ヶ月後に行われ得る。応答評価の典型的なエンドポイントは、ネオアジュバント化学療法の終了時又は残留腫瘍細胞及び／若しくは腫瘍床の外科的除去時である。これは、典型的には、ネオアジュバント療法開始の3ヶ月後である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療的治療の臨床的有效性は、臨床的有用率(CBR)を測定することによって決定され得る。臨床的有用率は、療法終了の少なくとも6ヶ月後の時点での完全寛解(CR)にある患者のパーセンテージ、部分寛解(PR)にある患者の数、及び安定疾患(SD)を有する患者の数の合計を決定することによって測定される。この公式の省略表現は、6ヶ月にわたる $CBR = CR + PR + SD$ である。いくつかの実施形態では、特定のがん治療レジメンのCBRは、少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、又はそれ以上である。がん療法に対する応答を評価するための追加の基準は、「生存期間」に関連し、これには、死亡までの生存期間、別名、全生存期間(当該死亡は、原因を問わないか、又は腫瘍関連のいずれかであり得る)、「無再発生存期間」(再発という用語は、局所再発及び遠隔再発の両方を含むものとする)、無転移生存期間、無病生存期間(疾患という用語は、がん及びそれに関連する疾患を含むものとする)の全てが含まれる。当該生存期間の長さは、定義された開始点(例えば、診断時又は治療開始時)及び終了点(例えば、死、再発、又は転移)を参照することによって計算され得る。加えて、治療有効性についての基準は、化学療法に対する応答、生存確率、所与の期間以内の転移確率、及び腫瘍再発確率を含むように拡大され得る。例えば、適切な閾値を決定するために、特定のがん治療レジメンが対象集団に投与され得、転帰が任意のがん療法の投与前に決定されたバイオマーカー測定値と相関付けられ得る。転帰測定値は、ネオアジュバント状況で施される療法に対する病理学的応答であり得る。あるいは、バイオマーカー測定値が既知であるがん療法後の対象について、全生存期間及び無病生存期間などの転帰測定値がある期間にわたって監視され得る。ある特定の実施形態では、投与される用量は、当該技術分野で既知のがん治療薬の標準用量である。対象が監視される期間は異なり得る。例えば、対象は、少なくとも2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、又は60ヶ月間監視され得る。がん療法の転帰と相関するバイオマーカー測定閾値は、実施例の節に記載の方法などの、当該技術分野において周知の方法を使用して決定され得る。

10

20

30

40

50

【0160】

「抵抗性」という用語は、がん療法に対するがん試料又は哺乳動物の獲得抵抗性又は自然抵抗性(すなわち、治療的治療に対して無応答性であるか、又は治療的治療に対する低減した又は限定された応答を有すること)を指し、例えば、治療的治療に対して25%以上、例えば、30%、40%、50%、60%、70%、80%、又はそれ以上、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、又はそれ以上低減した応答を有する。応答の低減は、抵抗性が獲得される前に同じがん試料若しくは哺乳動物と比較することによって、又は治療的治療に対する抵抗性を有しないことが知られている異なるがん試料若しくは哺乳動物と比較することによって測定され得る。化学療法に対する典型的な獲得抵抗性は、「多剤抵抗性」と呼ばれる。多剤抵抗性は、P糖タンパク質によって媒介され得るか、又は他の機構によって媒介され得るか、又は哺乳動物が多剤抵抗性微生物又は微生物の組み合わせに感染したときに生じ得る。治療的治療に対する抵抗性の決定は、当該技術分野で通例であり、当業者の技術の範囲内であり、例えば、「感作」として本明細書に記載の細胞増殖性アッセイ及び細胞死アッセイによって測定され得る。いくつかの実施形態では、「抵抗性を逆転させる」という用語は、一次がん療法(例えば、化学療法又は放射線

療法) 単独では治療されていない腫瘍の腫瘍体積と比較して腫瘍体積の統計的に有意な減少をもたらすことができない状況下で、一次がん療法(例えば、化学療法又は放射線療法)と組み合わせた第2の薬剤の使用が、治療されていない腫瘍の腫瘍体積と比較して統計的に有意なレベル(例えば、 $p < 0.05$)で腫瘍体積の有意な減少をもたらすことができることを意味する。これは、一般に、治療されていない腫瘍が対数律動的に成長しているときに行われる腫瘍体積測定に適用される。

【0161】

「応答」又は「応答性」という用語は、例えば、腫瘍サイズの低減又は腫瘍成長の阻害の意味での抗がん応答を指す。これらの用語は、例えば、再発までの時間(第1のイベントとしての第2の原発性がん若しくは再発の証拠のない死の時点で打ち切る第1の再発までの期間)の延長、又は全生存期間(治療から任意の原因による死までの期間)の延長によって反映される、改善された予後も指し得る。応答する又は応答を有するとは、刺激に曝露されたときに有益なエンドポイントが得られることを意味する。あるいは、陰性症状又は有害な症状は、刺激への曝露時に最小限に抑えられるか、緩和されるか、又は軽減される。腫瘍又は対象が好ましい応答を呈する可能性を評価することが、腫瘍又は対象が好ましい応答を呈しない(すなわち、応答の欠如を呈するか、又は非応答性である)可能性を評価することと同等であることが理解される。

【0162】

本明細書で使用される「RNA干渉剤」は、RNA干渉(RNAi)によって標的バイオマーカー遺伝子の発現に干渉するか、又はそれを阻害する任意の薬剤として定義される。かかるRNA干渉剤には、本発明の標的バイオマーカー遺伝子と相同のRNA分子を含む核酸分子又はその断片、短干渉RNA(sRNA)、及びRNA干渉(RNAi)によって標的バイオマーカー核酸の発現に干渉するか、又はそれを阻害する小分子が含まれるが、これらに限定されない。

【0163】

「RNA干渉(RNAi)」とは、標的バイオマーカー核酸と同一又は極めて同様の配列のRNAの発現又は導入により、標的とされた遺伝子から転写されたメッセンジャーRNA(mRNA)の配列特異的分解又は特異的転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)をもたらされ(Coburn and Cullen (2002) J. Virol 76: 9225を参照のこと)、それにより、標的バイオマーカー核酸の発現を阻害する、進化的に保存されたプロセスである。一実施形態では、RNAは、二本鎖RNA(dsRNA)である。このプロセスは、植物、脊椎動物、及び哺乳類細胞で説明されている。自然界では、RNAiは、dsRNA特異的エンドヌクレアーゼDicerによって開始され、それにより、長いdsRNAのsRNAと呼ばれる二本鎖断片への前進的な切断が促進される。sRNAは、標的mRNAを認識して切断するタンパク質複合体に組み込まれる。RNAiは、核酸分子、例えば、合成sRNA又はRNA干渉剤を導入することによって開始され、標的バイオマーカー核酸の発現を阻害又はサイレンシングすることもできる。本明細書で使用される場合、「標的バイオマーカー核酸発現の阻害」又は「マーカー遺伝子発現の阻害」は、標的バイオマーカー核酸又は標的バイオマーカー核酸によってコードされるタンパク質の発現又はタンパク質活性若しくはレベルの任意の減少を含む。この減少は、RNA干渉剤によって標的とされていない標的バイオマーカー核酸の発現又は標的バイオマーカー核酸によってコードされるタンパク質の活性若しくはレベルと比較して、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、若しくは99%、又はそれ以上の減少である。

【0164】

少なくとも1つのバイオマーカーの存在又はレベルを検出又は決定するために使用される「試料」という用語は、典型的には、脳組織、脳髄液、全血、血漿、血清、唾液、尿、糞便(例えば、糞)、涙、及び任意の他の体液(例えば、上の「体液」の定義下で記載されたもの)、又は組織試料(例えば、生検)、例えば、小腸、結腸試料、又は外科的切除組織である。ある特定の例では、本発明の方法は、試料中の少なくとも1つのマーカーの

存在又はレベルの検出又は決定前に個体から試料を得ることを更に含む。

【0165】

「感作させる」という用語は、がん療法（例えば、抗免疫チェックポイント、化学療法、及び／又は放射線療法）を用いて関連するがんをより有効に治療することを可能にする方法で、がん細胞又は腫瘍細胞を改変することを意味する。いくつかの実施形態では、正常細胞は、療法によって正常細胞を過度に損傷させる程度には影響されない。治療的治療に対する感受性の増加又は感受性の低減は、細胞増殖性アッセイ（Tanigawa N, Kern D H, Kikasa Y, Morton D L, Cancer Res. 1982; 42: 2159-2164）、細胞死アッセイ（Weisenthal L M, Shoemaker R H, Marsden J A, Dill P L, Baker J A, Moran E M, Cancer Res. 1984; 94: 161-173、Weisenthal L M, Lippman M E, Cancer Treat Rep 1985; 69: 615-632、Weisenthal L M, In: Kaspers G J L, Pieters R, Twentymann P R, Weisenthal L M, Veerman A J P, eds. Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma. Langhorne, P A: Harwood Academic Publishers, 1993: 415-432、Weisenthal L M, Contrib Gynecol Obstet 1994; 19: 82-90）を含むが、これらに限定されない、以下の本明細書に記載の特定の治療及び方法について当該技術分野で既知の方法に従って測定される。感受性又は抵抗性は、腫瘍サイズの低減をある期間、例えば、ヒトの場合6ヶ月及びマウスの場合4～6週間にわたって測定することによって動物においても測定され得る。組成物又は方法は、治療感受性の増加又は抵抗性の低減が、かかる組成物又は方法の不在下での治療感受性又は抵抗性と比較して、25%以上、例えば、30%、40%、50%、60%、70%、80%、又はそれ以上～2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、又はそれ以上である場合、治療的治療に対する応答を感作させる。治療的治療に対する感受性又は抵抗性の決定は、当該技術分野で通例であり、当業者の技術の範囲内である。がん療法の有効性を増強するための本明細書に記載のいずれの方法も、過剰増殖性又はさもないければがん性細胞（例えば、耐性細胞）をがん療法に対して感作させるための方法に同等に適用され得ることを理解されたい。

【0166】

本明細書で「低分子干渉RNA」とも称される「短干渉RNA」（siRNA）は、例えば、RNAiによって標的バイオマーカー核酸の発現を阻害する機能を果たす薬剤として定義される。siRNAは、化学的に合成され得るか、インビトロ転写によって産生され得るか、又は宿主細胞中に産生され得る。一実施形態では、siRNAは、約15～約40ヌクレオチド長、好ましくは約15～約28ヌクレオチド長、より好ましくは約19～約25ヌクレオチド長、より好ましくは約19、20、21、又は22ヌクレオチド長の二本鎖RNA（dsRNA）分子であり、約0、1、2、3、4、又は5ヌクレオチド長を有する3'及び／又は5'オーバーハングを各鎖に有し得る。オーバーハングの長さは、これらの2つの鎖間で独立しており、すなわち、一方の鎖上のオーバーハングの長さは、第2の鎖上のオーバーハングの長さに依存しない。好ましくは、siRNAは、標的メッセンジャーRNA（mRNA）の分解又は特異的転写後遺伝子サイレンシング（PTGS）によりRNA干渉を促進することができる。

【0167】

別の実施形態では、siRNAは、小ヘアピン（ステムループとも呼ばれる）RNA（shRNA）である。一実施形態では、これらのshRNAは、短い（例えば、19～25ヌクレオチドの）アンチセンス鎖、続いて、5～9ヌクレオチドのループ、及び類似センス鎖から成る。あるいは、センス鎖がヌクレオチドループ構造に先行する場合があります、アンチセンス鎖が続く。これらのshRNAは、プラスミド、レトロウイルス、及びレンチウイルス中に含まれ得、例えば、ポリメラーゼIII U6プロモーター、又は別

のプロモーターから発現され得る（例えば、参照により本明細書に組み込まれる Stewart, et al. (2003) RNA Apr; 9 (4): 493-501を参照のこと）。

【0168】

RNA干渉剤、例えば、siRNA分子は、がんにおいてHLAクラスI表面発現などのMHCクラスI表面発現を下方制御することに関与するバイオマーカー遺伝子の発現を阻害し、それにより、対象におけるがんを治療、予防、又は阻害するために、がんを有するか、又はがんを有する危険性のある患者に投与され得る。

【0169】

「小分子」という用語は、当該技術分野の用語であり、約1000分子量未満又は約500分子量未満の分子を含む。一実施形態では、小分子は、ペプチド結合を排他的に含まない。別の実施形態では、小分子は、オリゴマーではない。活性についてスクリーニングされ得る例示的な小分子化合物としては、限定されないが、ペプチド、ペプチド模倣薬、核酸、炭水化物、有機小分子（例えば、ポリケチド）（Cane et al. (1998) Science 282: 63）、及び天然産物抽出物ライブラリが挙げられる。別の実施形態では、これらの化合物は、非ペプチド性有機小分子化合物である。更なる実施形態では、小分子は、生合成のものではない。

【0170】

「特異的結合」という用語は、所定の抗原に対する抗体の結合を指す。典型的には、抗体は、分析物としての目的の抗原及びリガンドとしての抗体を使用して、BIACORE（登録商標）アッセイ装置において表面プラズモン共鳴（SPR）技術によって決定される場合、およそ 10^{-7} M未満、例えば、およそ 10^{-8} M、 10^{-9} M若しくは 10^{-10} M未満、又はそれよりも低い親和性（ K_D ）で結合し、所定の抗原若しくは密接に関連する抗原以外の非特異的抗原（例えば、BSA、カゼイン）への結合に対するその親和性よりも少なくとも1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍、4.0倍、4.5倍、5.0倍、6.0倍、7.0倍、8.0倍、9.0倍、若しくは10.0倍、又はそれ以上の親和性で、所定の抗原に結合する。「抗原を認識する抗体」及び「抗原に特異的な抗体」という語句は、本明細書で「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と同義に使用され得る。選択的結合は、別の抗原を上回る、ある抗原の結合を識別する抗体の能力を指す相対的な用語である。

【0171】

本明細書で使用される場合、「タンパク質複合体」という用語は、タンパク質間の相互作用によって形成される2つ以上のタンパク質の組み合わせである複合単位を意味する。典型的には、必ずしもそうではないが、「タンパク質複合体」は、2つ以上のタンパク質が、特定の非共有結合相互作用を通じて一緒に結合することによって形成される。しかしながら、共有結合は、相互作用するパートナー間にも存在し得る。例えば、2つの相互作用パートナーは、タンパク質複合体がより安定になるように共有結合的に架橋され得る。タンパク質複合体は、RNA若しくはDNAなどの核酸、又は金属イオン、ホルモン、第2のメッセンジャー、リン酸塩、糖から選択される脂質若しくは更なる補因子若しくは部分などの他の分子を含んでも含んでいなくてもよく、かつ／又はそれらと会合してもよい。本発明によって包含される「タンパク質複合体」は、より大きな生理学的タンパク質アセンブリの一部又は単位であってもよい。

【0172】

「単離されたタンパク質複合体」という用語は、その天然又は元の細胞環境又は身体環境において、自然界で見られるものとは異なる組成物又は環境中に存在するタンパク質複合体を意味する。好ましくは、「単離されたタンパク質複合体」は、他の天然に共存する細胞又は組織成分の少なくとも50%、より好ましくは少なくとも75%、最も好ましくは少なくとも90%から分離される。したがって、「単離されたタンパク質複合体」はまた、人工調製物中に天然に存在するタンパク質複合体又は非天然宿主細胞であり得る。「

単離されたタンパク質複合体」はまた、「精製されたタンパク質複合体」、すなわち、他の細胞成分、他のポリペプチド、ウイルス物質、若しくは培養培地を実質的に含まない実質的に均質な調製物中で、又はタンパク質複合体中のタンパク質成分が化学的に合成される場合、化学的前駆体又は化学的合成に関連する副生成物を含まない実質的に精製された形態であってもよい。「精製されたタンパク質複合体」とは、典型的には、特定のタンパク質複合体の少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、最も好ましくは少なくとも95%を含有する調製物を意味する。「精製されたタンパク質複合体」は、標準的な精製技法によって、又は化学合成によって、天然又は組換え宿主細胞又は他の身体試料から得ることができる。

【0173】

「修飾ポリペプチド」又は「修飾タンパク質複合体」という用語は、その天然又は元の細胞又は身体環境において、自然界で見られるものとは異なる組成物中に存在するポリペプチド又はタンパク質複合体を指す。本明細書で使用される「修飾」という用語は、基の切断及び付加又は除去を含む、本発明によって包含されるタンパク質又はタンパク質複合体の全ての修飾を指す。いくつかの実施形態では、「修飾ポリペプチド」又は「修飾タンパク質複合体」は、その天然又は元の細胞又は身体環境において修飾される、すなわち、自然界で見られるものとは異なる、少なくとも1つの修飾（例えば、断片、変異等）又はサブユニットを含む。「修飾サブユニット」は、例えば、それが由来する天然サブユニットの誘導体又は断片であってもよい。

【0174】

「活性」という用語は、タンパク質又はタンパク質複合体と関連して使用される場合、特定のタンパク質又はタンパク質複合体によって示されるか、又はそれと関連付けられる任意の生理学的又は生化学的活性を意味し、生物学的プロセス及び細胞機能示されるにおいて活性、別の分子又はその部分と相互作用又は結合する能力、特定の分子に対する結合親和性又は特異性、インビトロ又はインビボ安定性（例えば、タンパク質分解速度、若しくはタンパク質複合体の場合は、タンパク質複合体の形態を維持する能力）、抗原性及び免疫原性、酵素活性等を含むがこれらに限定されない。かかる活性は、当業者には明らかであろうように、様々な好適な方法のうちのいずれかによって検出又はアッセイされ得る。

【0175】

本明細書で使用される場合、「相互作用アンタゴニスト」という用語は、タンパク質-タンパク質相互作用を干渉する、遮断する、妨害する、若しくは不安定化する；タンパク質複合体の形成を遮断する、若しくは干渉する、又は既存のタンパク質複合体を不安定化する、妨害する、若しくは解離する化合物を意味する。

【0176】

本明細書で使用される「相互作用アゴニスト」という用語は、タンパク質相互作用の形成を引き起こす、開始させる、増殖させる、核生成させる、若しくは他の方法で増強させる；タンパク質複合体の形成を引き起こす、開始させる、増殖させる、核形成させる、若しくは他の方法で増強させる；又は既存のタンパク質複合体を安定化させる化合物を意味する。

【0177】

「PRC1.1複合体」又は「ポリコム抑制複合体1.1」という用語は、USP7、KDM2B、BCOR又はBCORL1、RING1A、RING1B、RYBP/YAF2、PCGF1、及びSKP1を含むタンパク質の複合体を指す。PRC1.1の喪失は、音波ヘッジホッグ駆動髄芽腫の発達を加速させることが示されている（Kutsher et al. (2020) bioRxiv 2020.02.06.938035）。この複合体は、造血幹細胞及び前駆細胞（HSPC）のコミットメントとの関連で研究されている。これらの細胞におけるPRC1.1不全是、骨髄系分化を誘導し、骨髄系悪性腫瘍をもたらした（Iwama (2018) Exp. Hematol. 64: S39）。

10

20

30

40

50

【0178】

「対象」という用語は、任意の健常な動物、哺乳動物若しくはヒト、又はがん、例えば、脳、肺、卵巣、脾臓、肝臓、乳房、前立腺、及び／若しくは結腸直腸がん、黒色腫、多発性骨髄腫等に罹患している任意の動物、哺乳動物、若しくはヒトを指す。「対象」という用語は、「患者」と同義である。

【0179】

「生存期間」という用語には、死亡までの生存期間、別名、全生存期間（当該死亡は、原因を問わないか、又は腫瘍関連のいずれかであり得る）、「無再発生存期間」（再発という用語は、局所再発及び遠隔再発の両方を含むものとする）、無転移生存期間、無病生存期間（病という用語は、がん及びそれに関連する疾患を含むものとする）の全てが含まれる。当該生存期間の長さは、定義された開始点（例えば、診断時又は治療開始時）及び終点（例えば、死、再発、又は転移）を参照することによって計算され得る。加えて、治療有効性についての基準は、化学療法に対する応答、生存確率、所与の期間以内の転移確率、及び腫瘍再発確率を含むように拡大され得る。

10

【0180】

「相乗効果」という用語は、2つ以上の抗がん剤（例えば、免疫療法と組み合わせての、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの阻害剤）の併用効果が、抗がん剤／療法単独の個別の効果の合計を上回り得ることを指す。

【0181】

「T細胞」という用語は、CD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞を含む。T細胞という用語は、Tヘルパー1型T細胞及びTヘルパー2型T細胞の両方を含む。「抗原提示細胞」という用語は、専門的な抗原提示細胞（例えば、Bリンパ球、単球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞）、並びに他の抗原提示細胞（例えば、ケラチノサイト、内皮細胞、アストロサイト、線維芽細胞、オリゴデンドロサイト）を含む。

20

【0182】

「治療効果」という用語は、薬理学的に活性な物質によって引き起こされる動物、具体的には哺乳動物、より具体的にはヒトにおける局所又は全身効果を指す。したがって、この用語は、動物若しくはヒトにおける疾患の診断、治療、緩和、治療、若しくは予防、又は望ましい身体若しくは精神発達及び状態の増強における使用を目的とした任意の物質を意味する。「治療有効量」という語句は、いずれの治療にも適用可能な合理的なベネフィット／リスク比でいくらかの所望の局所又は全身効果をもたらすかかる物質の量を意味する。ある特定の実施形態では、化合物の治療有効量は、その治療指数、溶解度等に依存するであろう。例えば、本発明の方法によって見出されたある特定の化合物が、かかる治療に適用可能な合理的なベネフィット／リスク比をもたらすのに十分な量で投与され得る。

30

【0183】

いくつかの実施形態では、「治療有効量」及び「有効量」という用語は、いずれの医学的治療にも適用可能な合理的なベネフィット／リスク比で動物における細胞の少なくとも亜集団にいくらかの所望の治療効果をもたらすのに有効である薬剤を含む、化合物、材料、又は組成物の量であり得る。対象化合物の毒性及び治療有効性は、例えば、LD₅₀及びED₅₀を決定するための、細胞培養物又は実験動物における標準の医薬品手順によって決定され得る。高い治療指数を呈する組成物が好ましい。いくつかの実施形態では、LD₅₀（致死投薬量）が測定され得、薬剤の投与なしと比較して、薬剤に対して、例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、又はそれ以上低減し得る。同様に、ED₅₀（すなわち、症状の半最大阻害を達成する濃度）が測定され得、薬剤の投与なしと比較して、薬剤に対して、例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、又はそれ以上増加し得る。また、同様に、IC₅₀（すなわち、がん細胞への半最大細胞毒性又は細胞増殖抑制効果を達成する濃度）が測

40

50

定され得、薬剤の投与なしと比較して、薬剤に対して、例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、又はそれ以上増加し得る。いくつかの実施形態では、アッセイにおけるがん細胞成長が、少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は更には100%阻害され得る。別の実施形態では、固体悪性腫瘍における少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は更には100%の減少が達成され得る。

10

【0184】

「転写されたポリヌクレオチド」又は「ヌクレオチド転写物」は、バイオマーカー核酸の転写、及びRNA転写物（存在する場合）の正常な翻訳後プロセッシング（例えば、スプライシング）、及びRNA転写物の逆転写によって作製される成熟mRNAの全て又は一部と相補的であるか、又はこれらと相同であるポリヌクレオチド（例えば、mRNA、hnRNA、cDNA、又はこのようなRNA若しくはcDNAの類似体）である。

【0185】

本明細書で使用されるとき、「無応答性」という用語は、療法に対するがん細胞の屈折性、又は刺激、例えば、活性化受容体若しくはサイトカインによる刺激に対する免疫細胞などの治療細胞の屈折性を含む。無応答性は、例えば、免疫抑制剤への曝露又は高用量の抗原への曝露により生じ得る。本明細書で使用される場合、「アネルギー」又は「耐性」という用語は、受容体媒介性刺激の活性化に対する屈折性を含む。かかる屈折性は、一般に、抗原特異的であり、耐性化抗原への曝露が終了した後に持続する。例えば、T細胞におけるアネルギー（非応答性とは反対）は、サイトカイン産生、例えば、IL-2の欠如を特徴とする。T細胞アネルギーは、T細胞が抗原に曝露され、第1のシグナル（T細胞受容体又はCD-3媒介性シグナル）を第2のシグナル（共刺激シグナル）の不在下で受けるときに生じる。これらの条件下で、細胞の同じ抗原への再曝露（再曝露が共刺激ポリペプチドの存在下で生じる場合でさえも）により、サイトカインの産生に失敗し、それ故に、増殖に失敗する。しかしながら、アネルギーT細胞は、サイトカイン（例えば、IL-2）で培養された場合、増殖することができる。例えば、T細胞アネルギーは、ELISA又は指標細胞株を使用した増殖アッセイによって測定されるTリンパ球によるIL-2産生の欠如によっても観察され得る。あるいは、レポーター遺伝子構築物を使用され得る。例えば、アネルギーT細胞は、5' IL-2 遺伝子エンハンサーの制御下で異種プロモーターによって又はエンハンサー中に見られ得るAP1配列の多量体によって誘導されるIL-2 遺伝子転写を開始することができない（Kang et al. (1992) Science 257:1134）。

20

30

【0186】

特定のタンパク質のアミノ酸配列と、遺伝子コード（以下に示される）によって定義されるタンパク質をコードし得るヌクレオチド配列との間に既知の明確な対応関係が存在する。同様に、特定の核酸のヌクレオチド配列と、遺伝子コードによって定義される核酸によってコードされるアミノ酸配列との間に既知の明確な対応関係が存在する。

40

【表 1】

遺伝子コード

アラニン(Ala、A)	GCA、GCC、GCG、GCT
アルギニン(Arg、R)	AGA、ACG、CGA、CGC、CGG、CGT
アスパラギン(Asn、N)	AAC、AAT
アスパラギン酸(Asp、D)	GAC、GAT
システイン(Cys、C)	TGC、TGT
グルタミン酸(Glu、E)	GAA、GAG
グルタミン(Gln、Q)	CAA、CAG
グリシン(Gly、G)	GGA、GGC、GGG、GGT
ヒスチジン(His、H)	CAC、CAT
イソロイシン(Ile、I)	ATA、ATC、ATT
ロイシン(Leu、L)	CTA、CTC、CTG、CTT、TTA、TTG
リジン(Lys、K)	AAA、AAG
メチオニン(Met、M)	ATG
フェニルアラニン(Phe、F)	TTC、TTT
プロリン(Pro、P)	CCA、CCC、CCG、CCT
セリン(Ser、S)	AGC、AGT、TCA、TCC、TCG、TCT
トレオニン(Thr、T)	ACA、ACC、ACG、ACT
トリプトファン(Trp、W)	TGG
チロシン(Tyr、Y)	TAC、TAT
バリン(Val、V)	GTA、GTC、GTG、GTT
終結シグナル(終了)	TAA、TAG、TGA

10

20

【0187】

30

遺伝子コードの重要な周知の特徴は、その冗長性であり、それにより、タンパク質を作製するために使用されるアミノ酸の大半には、1つより多くのコーディングヌクレオチドトリプレットが用いられ得る（上で例証される）。したがって、いくつかの異なるヌクレオチド配列が所与のアミノ酸配列をコードし得る。かかるヌクレオチド配列は、全ての生物における同じアミノ酸配列の産生をもたらすため（ある特定の生物はいくつかの配列を他の配列よりも効率的に翻訳し得るが）、機能的に同等であるとみなされる。更に、時折、プリン又はピリミジンのメチル化バリエーションが所与のヌクレオチド配列に見られ得る。かかるメチル化は、トリヌクレオチドコドンと対応するアミノ酸との間のコーディング関係に影響を及ぼさない。

【0188】

40

前述を考慮して、バイオマーカー核酸（又はその任意の部分）をコードするDNA又はRNAのヌクレオチド配列は、DNA又はRNAをアミノ酸配列に翻訳するための遺伝子コードを使用してポリペプチドアミノ酸配列を得るために使用され得る。同様に、ポリペプチドアミノ酸配列について、ポリペプチドをコードすることができる対応するヌクレオチド配列が遺伝子コードから推定され得る（その冗長性のため、任意の所与のアミノ酸配列に対して複数の核酸配列がもたらされる）。したがって、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の本明細書における説明及び／又は開示は、ヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列の説明及び／又は開示も含むとみなされるべきである。同様に、本明細書におけるポリペプチドアミノ酸配列の説明及び／又は開示は、アミノ酸配列をコードすることができる全ての可能なヌクレオチド配列の説明及び／又は開示も含むとみな

50

されるべきである。

【0189】

最後に、本発明の遺伝子座及びバイオマーカー（表1及び2に列挙されるバイオマーカー）についての核酸及びアミノ酸配列情報は、当該技術分野で周知であり、National Center for Information (NCBI) などの一般に公開されているデータベースで容易に入手可能である。例えば、一般に公開されている配列データベースに由来する例示の核酸及びアミノ酸配列が、以下に提供され、例えば、PCT公開第2014/022759号が含まれ、これは、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【表2-1】

10

表5

USP7

BCORL1

PCGF1

KDM2B

SKP1

RING1A

RING1B

20

RYBP

YAF2

BCOR

MYCL

配列番号1：ヒトUSP7転写バリエーション1 cDNA配列 (NM_003470.

3、622～3930位由来のCDS領域)

【表2-2】

```

1  gacatttcac gccgccgcca ttttgagagc gagccgagcc gagctgccgg gcgccgcgtc
61 cgctgccgga gccccgacga cgacgccgag gaggcggagg ccgcggctct cggaacgcgg
121 ccggcccgtc gcccgccgcg tcgcgcgctc ccgccggccc cagggcccgcc agggcccgccg
181 cggccggcca ggccctcccg ccgcgcgcgc ccgcccgagg cggggctgac tcgcgggccc
241 ccgaccggcc gccctccgcc cccggccggc ccgcggcccc gcagcccgcc ccccgcccc

```

30

40

50

【表 2 - 3】

301	ggcggcgggga	ggcgggcccc	gcggcgcgcg	cgcgcgcggc	cgagcgagc	gacgagggcg
361	cccggccccg	cccgcgggcc	gcccgcggcc	ctcggcgccg	agattggggg	aatcgcgagc
421	aagtacgtgc	gcgtctccct	gccgcggccg	ccgcccggcg	cgggcgcccc	cgggggcgcc
481	gtcgccgacg	acgcgcggga	ggaggaggag	gaggccggcc	cgccgcggcc	gccgcggccg
541	ccgccccggc	tcgcccgcgc	ccgcccggcg	ggctcgcgac	ccgggcccc	ggccgcaggc
601	gaggccccag	ccgcggccga	catgaaccac	cagcagcagc	agcagcagca	gaaagcgggc
661	gagcagcagt	tgagcgagcc	cgaggacatg	gagatggaag	cgggagatac	agatgaccca
721	ccaagaatta	ctcagaaccc	tgtgatcaat	gggaatgtgg	ccctgagtga	tggaacacaac
781	accgcggagg	aggacatgga	ggatgacacc	agttggcgct	ccgaggcaac	ctttcagttc
841	actgtggagc	gcttcagcag	actgagttag	tcggtcctta	gccctccgtg	ttttgtgcga
901	aatctgccat	ggaagattat	ggtgatgcca	cgcttttatt	cagacagacc	acacccaaaa
961	agcgtaggat	tctttctcca	gtgcaatgct	gaatctgatt	ccacgtcatg	gtcttgccat
1021	gcacaagcag	tgctgaagat	aataaattac	agagatgatg	aaaagtcggt	cagtcgtcgt
1081	attagtccatt	tggttctcca	taagaaaaat	gattggggat	tttccaattt	tatggcctgg
1141	agtgaagtga	ccgatcctga	gaaaggattt	atagatgatg	acaaagttaac	ctttgaagtc
1201	tttgtacagg	cggatgctcc	ccatggagtt	gcgtgggatt	caaagaagca	cacaggctac
1261	gtcggcctaa	agaatcaggg	agcgacttgt	tacatgaaca	gcctgctaca	gacgttattt
1321	ttcacggaac	gcttacgaaa	ggctgtgtac	atgatgccaa	ccgaggggga	tgattcgtct
1381	aaaagcgctc	cttttagcatt	acaaagagtg	ttctatgaat	tacagcatag	tgataaacct
1441	gtaggaaaca	aaaagttaac	aaagtcattt	gggtgggaaa	cttttagatag	cttcatgcaa
1501	catgatgttc	aggagctttg	tcgagtgttg	ctcgataatg	tggaaaaata	gatgaaaggc
1561	acctgtgtag	agggcacccat	acccaaatta	ttccgcggca	aatgtgtgtc	ctatatccag
1621	tgtaaagaag	tagactatcg	gtctgataga	agagaagatt	attatgatat	ccagctaagt
1681	atcaaaggaa	agaaaaatat	atgtgaatca	tttgtggatt	atgtggcagt	agaacagctc
1741	gatggggaca	ataaatacga	cgctggggaa	catggcttac	aggaagcaga	gaaaggtgtg
1801	aaattcctaa	cattgccacc	agtgttacat	ctacaactga	tgagatttat	gtatgaccct
1861	cagacggacc	aaaatatcaa	gatcaatgat	aggtttgaat	tcccagagca	gttaccactt
1921	gatgaatttt	tgcaaaaaac	agatcctaag	gaccctgcaa	attatattct	tcattgcagtc
1981	ctggttcata	gtggagataa	tcattgttga	cattatgttg	tttatctaaa	ccccaaagg
2041	gatggcaaat	ggtgtaaat	tgatgacgac	gtggtgtcaa	ggtgtactaa	agagggaagc
2101	attgagcaca	attatggggg	tcacgatgac	gacctgtctg	ttcgacactg	cactaatgct
2161	tacatgttag	tctacatcag	ggaatcaaaa	ctgagtgaag	ttttacaggc	ggtcaccgac
2221	catgatattc	ctcagcagtt	ggtggagcga	ttacaagaag	agaaaaggat	cgaggctcag
2281	aagcgggaag	agcggcagga	agcccatctc	tatatgcaag	tgagatagtg	cgagagggac
2341	cagtttttgt	gccaccaagg	gaatgacatg	tacgatgaag	aaaaagtgaa	atacactgtg
2401	ttcaaagtat	tgaagaactc	ctcgcttgct	gagtttgctc	agagcctctc	tcagaccatg
2461	ggatttccac	aagatcaaat	tcgattgttg	cccatgcaag	caaggagtaa	tggaacaaaa
2521	cgaccagcaa	tgtttagataa	tgaagccgac	ggcaataaaa	caatgattga	gctcagtgat
2581	aatgaaaaac	cttggacaat	attcctggaa	acagttgatc	ccgagctggc	tgctagtggg
2641	gcgaccttac	ccaagtttga	taaagatcat	gatgtaatgt	tatttttgaa	gatgtatgat
2701	cccaaaacgc	ggagcttgaa	ttactgtggg	catatctaca	caccaatata	ctgtaaaaata
2761	cgtgacttgc	tcccagttat	gtgtgacaga	gcaggattta	ttcaagatac	tagccttata
2821	ctctatgagg	aagttaaacc	gaatttaaca	gagagaattc	aggactatga	cgtgtctctt
2881	gataaaagccc	ttgatgaact	aatggatggg	gacatcatag	tatttcagaa	ggatgacctt
2941	gaaaaatgata	acagtgaatt	acccaccgca	aaggagtatt	tccgagatct	ctaccaccgc
3001	gttgatgtca	ttttctgtga	taaaacaatc	cctaattgatc	ctggatttgt	ggttacgtta
3061	tcaaatagaa	tgaattatct	tcagggttga	aagacagttg	cacagaggct	caacacagat
3121	ccaatgttgc	tcagtttttt	caagtctcaa	ggttataggg	atggccagg	taatcctctt
3181	agacataatt	atgaaggtag	tttaagagat	cttctacagt	tcttcaagcc	tagacaacct
3241	aagaaacttt	actatcagca	gcttaagatg	aaaatcacag	actttgagaa	caggcgaagt
3301	tttaaatgta	tatggttaaa	cagccaattt	agggaaagg	aaataacact	atatccagac
3361	aagcatgggt	gtgtccggga	cctgttagaa	gaatgtaaaa	aggccgtgga	gcttggggag
3421	aaagcatcag	ggaaacttag	gctgctagaa	attgtaagct	acaaaatcat	tggtgttcat
3481	caagaagatg	aactattaga	atgtttatct	cctgcaacga	gccggacggt	tcgaatagag
3541	gaaatccctt	tggaaccagg	ggacatagac	aaagagaatg	agatgcttgt	cacagtggcg
3601	catttccaca	aagaggtctt	cggaacgttc	ggaatcccg	ttttgctgag	gatacaccag
3661	ggcagacatt	ttcgagaagt	gatgaagcga	atccagagcc	tgctggacat	ccaggagaag
3721	gagtttgaga	agtttaaat	tgcaattgta	atgatggggc	gacaccagta	cataaatgaa
3781	gacgagtatg	aagtaaat	gaaagacttt	gagccacagc	ccggtaatat	gtctcatcct
3841	cggccttgcc	tagggctcga	ccacttcaac	aaagccccaa	agaggagtcg	ctacacttac
3901	cttgaanaag	ccattaaaa	ccataactga	tttccaagct	ggtgtgttca	aggcgaggac

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

```

3961 ggtgtgtgtgg tggcccctta acagcctaga actttgtgtgc acgtgccctc tagccgaagt
4021 cttcagcaag aggattcgct gctggtgtta attttatttt attgagctg ttcagtttgg
4081 cttctctgtga tctattgact gccctttttg agcaaaatga agatgttttt ataaagcttg
4141 gatgccaatg agagttattt tatggttaacc acagtgcgaag gcaactgtca gcgcaatggg
4201 ggagaagagg ttagtggatc gggggctcct ggctcaaggc ctctgggctg tccctagtgg
4261 gcacgagtgg ctgggctgcc ttcttggggg cccgtgcacc agccctgcag ctagcaagtc
4321 ttgtgtttag gctcgtctga cctatttctt tcagttatac tttcaatgac cttttgtgca
4381 tctgtttaag caaaacagag aaactcacia cctaataaat agcgtctctt ccttcattgt
4441 gtgcattgtc ggcccttctt cgggttcttc tctccagct gcctgggggc tttttaataa
4501 acttgtctca cctcgtcagc cactactgtc tgcagccctt ttgcaaagt gatgcactga
4561 atacagtccg gacagacatt gtgggggtct ttttattaaa tcaagaacat tgttaaatc
4621 aattaagggt tactctgctg ccttggcaga cttacgatct caacagtcca tacgagcagg
4681 tgaaaggatt ataaatagaa tttcgttaaa gtggaacaga cgacaagaaa gcccttttagc
4741 aagagggtat gctcactagt ggttagtaag ctgtcgactt tgtaaaaaag ttaaaaaatga
4801 aaaaaaaagg aaaaatgaat tgtatattta atgaatgaac atgtacaatt tgcactggg
4861 aggaggttcc tttttgttgg gtgagtctgc aagtgaattt cactgatgtt gatattcatt
4921 gtgtgtagtt ttatttcggt cccagccccc tttcctttta ttttggagct aatgccagct
4981 gcgtgtctag ttttgagtgc agtaaaatag aatcagcaaa tcactcttat ttttcatctt
5041 tttccggtat tttttgggtt gtttctgtgg gagcagtgtt caccaactct tcctgtatat
5101 tgcctttttg ctggaaaatg ttgtatgttg aataaaattt tctataaaaa ttataattca
5161 gtgagttacg tggaagtgga ggaagatttc tactctcctt ggaaacaggc ctgggaaacc
5221 ttggcatttg taacaagggt tcaactgagat gtacttttcc ttctaattcc gttttgcggg
5281 ggcagggtct cttgtttctt tttttttttt tttttttttt tagcctctaa ctagtcacat
5341 ttactcttaa gaaatgaag gttttccagg agagaactgt gtacaaaataa ggtgactgga
5401 gatgtgacct gatgtgcac gaggcccttc ggggcggcag gcgctatcgt ggcgctggtc
5461 cttgcaccgt cccatcggcc ttgccttcca gctccgtggc acgggttctt ggtctttggg
5521 ccagtgtgta ccttgagtg acttcccttc tcaacttcca ctgcagtgtg tgtgccttct
5581 gctctgagag ctgccttgtg acccgtgtga tagaaagcag ggagtgaagg tccccgcgga
5641 cctggccctt cctccttcc tccccagaa agaggagtta gagcaggggt gcgagagccg
5701 ttcgtgtggg ttttctctt gaacaaacat taaggtgtct tgtttttgtt ctgggctggg
5761 ggttggtgtg agtcttaggt aactgaaagt tcctactctc ccttaaggta ttaaatgact
5821 ctttttccaa a

```

10

20

30

40

50

配列番号 2 : ヒトユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼ 7 アイソフォーム 1 (転写
バリエーション 1 によってコードされる) アミノ酸配列 (NP_003461.2)

```

1 mnhqqqqqqq kageqqlsep edmemagdt ddppritqnp vingnvalsd ghntaeedme
61 ddtswrseat fqftverfsr lsesvlsppc fvrnlpwkim vmprfypdrp hqksvgfflq
121 cnaesdstsw schaqavlki inyrddksf srrishlffh kendwgsnf mawsevtde
181 kgfidddkvt fevfqadap hgvaawdskkh tgyvglnqg atcymnsllq tlfntnqlrk
241 avymmpetgd dssksvplal qrvfyelqhs dkpvgtkklt ksfgwetlds fmqhhdvqelc
301 rvllldnvenk mkgctvegti pklfrgkmvs yiqckevdyr sdrredyydi qlsikgkkn
361 fesfvdvav eqldgdnyk agehglqae kgvklftlpp vlhlqlmrfm ydpqtdqnik
421 indrfefpeq lpldeflqkt dpkdpnyil havlvhsgdn hgghyvvyln pkgdgkwckf
481 dddvvsrctk eeaiehygg hdddlsvrhc tnaymlvyir esklsevlqa vtdhdipqql
541 verlqeeekri eaqrkerqe ahlymqvqiv aedqfcghqg ndmydeekvk ytvfkvlkns
601 slaefvqsls qtmgfpqdqi rlwpmqarsn gtrkpamldn eadgnktmie lsdnenpwti
661 fletvdpela asgatlpkfd kdhdvmlflk mydpktrsln ycgihytpis ckirdllpvm
721 cdragfiqdt slilyeevcp nlteriodyd vsldkaldel mdgdiivfqk ddpndnsel
781 ptakeyfrdl yhrvdvifcd ktipndpgfv vtlsnrmnyf qvaktvaqrl ntdpmlqlff
841 ksqqyrdpgp nplrhyegf lrdllqffkp rqpkklyyq lkmkitdfen rrsfkciwln
901 sqfreeeitl ypdkhgcvr d lleeckkave lgekasgklr lleivsykii gvhqedelle
961 clspatsrtf rieeipldqv didkenemlv tvahfhkevf gtfqipfllr ihqgehfrev
1021 mkriqslldi qekekfkf aivmmgrhgy inedevevnl kdfepqpgnm shprpwlgl d
1081 hfnkapkrsr ytylekaiki hn

```

配列番号 3 : ヒト KDM2B 転写バリエーション 1 cDNA 配列 (NM_032590.
5、113~4123 位由来の CDS 領域)

【表 2 - 5】

```

1 gtacgtgtgt gtgtccacat ctttgagtgc cgggagttta aaagtttaggc agtccttata
61 ggtatggaag ccgagctaatt ttccttctga gcccccaaaa tgcctcctcc acatggcggg
121 tccgcaaatg gggggatctg cagaggatca cccccacga aaaagacatg cagcagaaaa

```

【表 2 - 6】

181	gcaaaaaaag	aaaacagtta	tatatacaaa	atgctttgaa	tttgagtcgg	ccacacagcg
241	cccgattgac	cgcagcgat	acgacgagaa	cgaggacttg	tcggacgtgg	aggagatcgt
301	cagcgtccgc	ggcttcagcc	tggaggagaa	gcttcgcagc	cagctgtacc	agggggactt
361	cgtgcacgcc	atggagggca	aagatttcaa	ctatgagtac	gtacagagag	aagctctcag
421	ggttccctcg	atatctcgag	aaaaggatgg	actgggaatt	aagatgcctg	accctgattt
481	cacagtcgga	gacgtcaaac	tcctagtggg	gagccggcgg	cttggtggacg	tgatggatgt
541	gaacacccag	aagggcacgg	agatgagcat	gtcccagttt	gtgcgttact	acgagacgcc
601	cgaggcccag	cgggacaagc	tgtacaacgt	catcagccta	gagttcagcc	acaccaagct
661	ggagcacttg	gtcaagcgtc	cgactgtggt	agacctggtg	gactgggtgg	acaacatgtg
721	gccccagcat	ctgaaggaga	agcagacaga	agccacgaac	gccattgcag	agatgaagta
781	cccgaaagtg	aaaaagtact	gtctgatgag	cgtgaaaggt	tgtttcaccg	acttccacat
841	cgacttttga	ggcacttccg	tttggtacca	tgttttcogg	ggtgggaaga	ttttttggct
901	gattcctcca	acgtctgcaca	atttggcgct	gtacgaggag	tgggtgctgt	caggcaaaaca
961	gagtgacatc	ttcttgggag	accgtgtgga	acgatgccaa	agaattgagc	tgaagcaggg
1021	ctacacattt	ttctccctt	ccggttggat	ccatgccgtc	tacaccctgt	tagactcttt
1081	ggtgttcggc	ggaaacatcc	tgcacagctt	taacgtgccc	atgcagctgc	ggatctacga
1141	gatcgaggac	aggacgcggg	tgcagcccaa	attccgttac	cccttctact	atgagatgtg
1201	ctggtatgtc	ctggagagat	acgtgtactg	tgtgaccacg	cgctcccacc	tactcagga
1261	ataccagagg	gatttcctca	ttattgatgc	cccgagggaag	cccagcatag	acggcttctc
1321	ttcggattcc	tggctggaga	tggaggagga	ggcctgtgat	cagcagcctc	aggaggagga
1381	ggagaaggac	gaggaggcgg	agggcaggga	cagggcaccc	aaaccgccca	ccgatggctc
1441	cacttcaccc	accagcacgc	cctctgagga	ccaggaggcc	ctcgggaaga	agcccaaaagc
1501	acctgccctg	gatttcctca	aaaggacttt	gtctaagtga	tcggaggaaa	gtgtgaagtc
1561	caccacattg	gccgtagact	accccaagac	ccccaccggc	tctcccgcca	cggaggtctc
1621	tgcctaatgg	acccatctca	ctgagtttga	actgaagggc	ctgaaagctc	tgttgagaaa
1681	actggaatcc	ctcccgagga	acaagaagtg	tgtcccccag	ggcatcgagg	acccccaggc
1741	actcctggag	ggtgtgaaga	acgtcctgaa	ggagcacgca	gatgatgacc	ctagtctggc
1801	catcactggg	gtccctgtgg	tgacttggcc	aaagaagact	ccaaagaacc	gggctgtggg
1861	tcggcccaag	gggaagctgg	gcccggcctc	cgcggtgaag	ttggccgcca	accggacaac
1921	ggcaggagct	cggcggcgcc	ggacgcgatg	ccgcaagtgc	gagggcctgc	tgcggaccga
1981	gtcggagag	tgccattctc	gcaaggacat	gaagaagttc	gggggccccg	ggcgcatgaa
2041	gcagagctgc	atcatgcggc	agtgcacgcg	gccagtgcgc	ccccacaccg	ccgtgtgcct
2101	tgtgtgtggc	gaggcgggga	aggaagacac	ggtggaagag	gaggaaggca	agtttaacct
2161	catgctcatg	gagtgtctca	tctgcaatga	aatcatccac	cctggatgcc	ttaagattaa
2221	ggagtcaag	ggtgtgttca	acgacgagct	tccaaactgc	tgggagtgtc	cgaagtgtaa
2281	ccagcccgcc	aagaccggga	aacaaaagcg	tggccctggc	tttaagtacg	cctccaacct
2341	gccccgctcc	ctgctcaagg	agcagaagat	gaaccgggac	aacaagggaag	ggcaggaacc
2401	tgcctaacgg	aggagtgaag	gtgaggaggc	gccccggcgc	aggtcggatg	agcactcgaa
2461	gaaggtgccc	ccggacggcc	ttctgcgcag	aaagtctgac	gacgtgcacc	tgagggaagaa
2521	cgcgaaatac	gagaagcccc	aggagctgag	tggacgcaag	cgggcctcat	cgcttcaaac
2581	gtcccccggt	tcctctctct	acctctcgcc	gaggccccct	ctaggcagca	gcctcagccc
2641	ctggttgaga	tccagtctca	cttacttcca	gcagcagctc	aaacctggca	aagaagataa
2701	gctttttcag	aaaaagcggc	ggtcctggaa	gaacgcggag	gaccgcattg	cgctggccaa
2761	caagccccct	cggcgcttca	agcaggaacc	cgaggacgaa	ctgcccaggg	cgccccccaa
2821	gaccaggagg	agcgaccact	cccgtctcag	ctccccacc	gcgggaccca	gcaccgaagg
2881	ggccgagggc	ccggaggaga	agaagaaggt	gaagatgcgc	cggaagcggc	ggcttcccaa
2941	caaggagctg	agcagggagc	tgagcaaggga	gctcaaccac	gagatccaga	ggacggagaa
3001	cagcctggcc	aacgagaacc	agcagcccat	caagtccgag	cctgagagcg	agggcgagga
3061	gccccagcgg	cccccgggca	tctgcgagcg	tccccaccgc	ttcagcaagg	ggctcaacgg
3121	caccccccgg	gagctgcggc	accagctggg	gcccagcctg	cgcagcccg	cccgtgtcat
3181	ctcccgcccc	ccaccctccg	tgtccccgcc	caagtgtatc	cagatggagc	gccatgtgat
3241	ccggccaccc	cccatcagcc	ccccgcctga	ctcgctaccc	ctggacgatg	gggcagccca
3301	cgctcatgac	agggaggtgt	ggatggccgt	cttcagctac	ctcagccacc	aagacctgtg
3361	tgtgtgcatg	cgggtcttca	ggacctggaa	ccgctggtgc	tgcgataaag	ggttgtggac
3421	ccgcattgac	ctgaaccact	gcaagtctat	cacacccctg	atgctgagtg	gcatcatccg
3481	gcgacagccc	gtctccctcg	acctcagctg	gaccaatata	tccaagaagc	agctgagctg
3541	gctcatcaac	cggctgcctg	ggctccggga	cttggtgctg	tcaggctgct	catggatccg
3601	ggtctcggcc	ctttgcagct	ccagttgtcc	gctgctccgg	accctggatg	tccagtgggt
3661	ggagggacta	aaggatgccc	agatgcggga	tctcctgtcc	ccgcccacag	acaacaggcc
3721	aggtcagatg	gacaatcgga	gcaagctccg	gaacatcgtg	gagctgcgcc	tggcaggcct
3781	ggacatcaca	gatgcctccc	tgcggctcat	catccgcacc	atgccctcgc	tctccaagct

10

20

30

40

50

【表 2 - 7】

```

3841 ccacctcagt tactgtaacc acgtcaccga ccagtctatc aacctgctca ctgctgttgg
3901 caccaccacc cgagactcct taaccgagat caacctgtct gactgcaata aggtcactga
3961 tcagtgcctg tccttcttca aacgctgttg aaacatctgt catattgacc tgaggtactg
4021 caagcaagtc accaaggaag gctgtgagca gttcatagcc gagatgtctg tgagtgtcca
4081 gtttgggcaa gtagaagaaa aactcctgca aaaactgagt tagtccaagg ataagtatgt
4141 aaatacgggg cgggctctgg gaggggagag actttacaaa aatgagggct tttattttcc
4201 atttggaaac tgggacaaca gaccacaacg caattccatt ttgcaagtct ttccaaggga
4261 gaagctgttc aaccaccgt ttgggggatg agtgagccga cactttcctt tggcttttct
4321 gaatcgtaac tgcactgctt tctggacat ttctaaggcg gcctttacaa gaagacattc
4381 ctgtcggaga ggaggggtga cttcggagaa attctcatal tgaagcatga gcttaggagt
4441 ttctgttagt ggtagtgggt ttttggacac ttcattcctt gcaacacoga ggttttgggt
4501 gttgacataa agtggaccac acaccacatc tgctgccgtc ttgacacttt tttttgtttg
4561 gttggttttg ttacatctta cattatgcag aactattttt gtacaaattg tttaaaagtt
4621 atttatgcaa ggtttgaatg cataccagtg tttttattgt tttgagattg ccaattttcc
4681 tgatttcctt aaggtaggag agaatttaac gtgtacttca tgcacacaac ccatctacaa
4741 atgtgcccag atctaacaaa gtaggctaag accttccact taaaagcatg tttaaactgga
4801 agttgagagt ctgctttgta cctcaagagt tacatgagca tgttgtggat aaatgtaaat
4861 tatagtcaaa gtaagatact ctgccaaagt tcctctgtag agaattcact tttctcaaat
4921 tttaaaattt cgacttcagc ctttgcactc aggaggttct gctccagcat gagctcttgt
4981 acttacatag atctaattta tacagttagt caagacgtag aataaatgct cccacatagc
5041 ctttcttttg cttttgcttc tctcctctga agtgtgagtt gagttctcat ttaggtttgt
5101 aacatggcta tttcctagtt gtaaagttct gcatttataa gtgccattgt tgtaagggtg
5161 tgtttcttag accttccctg atgcgatttt acctttgttg aatttgtata aacaattgta
5221 caaaaaaac cactcttgaa ctttgagggt ttctgttcta ggagtggact agaagtttaa
5281 gccagagtc agtaaact gttttgaagt ccaaa

```

10

配列番号 4 : ヒト KDM2B (転写アイソフォーム A によってコードされる) アミノ酸

20

配列 (NP_115979.3)

```

1 magpqqmgsa edhprkrha aekqkkktvi ytkcfefesa tqrpidrqr denedlsdve
61 eivsvrgfsl eeklrsqlyq gdfvhamegk dfnyeyvqre alrvplifre kdglgikmpd
121 pdftvrdvkl lvgsrrlvdv mdvntqkgte msmsqfvryy etpeaqrdkl ynvislefsh
181 tklehlvkrp tuvdlvdwvd nmwpqhlkek qteatnaiae mkypkvkkyc lmsvkgcftd
241 fhidfggtsv wyhvfrrgki fwlipptlhn lalyeewvls gkqsdiflgr rvercgriel
301 kqgytffips gwihavytpv dslvfgnnil hsfvnpmlr iyeiedrtv qpkfrypfyy
361 emcwyvlery vycvtqrshl tgeyqresml idaprksid gfssdswlem eeeacdqqpq
421 eeeekdeege grdrapkpt dgstsptstp sedgealgk pkapalrflk rtlsnesees
481 vksttlavdy pktptgspat evsakwthlt efelkgklal vekleslpen kkcvpiegied
541 pqallegvkn vlkehaddp slaitgvpv twpkktpknr avgrpkgklg pasavklaan
601 rttagarrrr trcrkceacl rtecgechfc kdmkkfggpg rmkqscimrq ciapvlphta
661 vclvcgeagk edtveeeegk fnlmlmecs cneihipgcl kikesegvvn delpncwecp
721 kcnhagktgk qkrgpgfkya snlpgsllke qkmnrndnkeg gepakrrsec eeaprrsde
781 hskkvppdgl lrrksddvhl rkkryekpq elsgkrass lqtspgsssh lsprpplgss
841 lspwwrssl yfqqqlkpgk edklfrkrr swknaedma lankplrrfk qepedelpea
901 ppktresdhs rssptagps tegaegpeek kkvkmrrkr lpnkelsrel skelnheiqr
961 tenslanenq qpiksepese geepkrppgi cerphfrskg lngtprelrh qlgplsrspp
1021 rvisrpppsv sppkciqmer hvirpppisp ppslplddg aahvmhrevw mavfsylshq
1081 dlcvcmrvcr twnrwccdkr lwtridlnc ksitplmlsg iirqpvsld lswtniskkq
1141 lswlinrlpg lrdlvsfgcs wiavsalcss scpllrtdlv qwveglkdaq mrdllsptd
1201 nrpgqmdnrs klrnivelrl aglditdasl rliirhmp11 sklhlslcynh vtdqsinllt
1261 avgtttrdsl teinlsdcnk vtdqclshfk rcgnichidl ryckqvtkeg ceqfiaemsv
1321 svqfgqveek llqkls

```

30

配列番号 5 : ヒト BCORL1 転写バリエント 1 (NM_021946.5、173~

40

5308 位由来の CDS 領域)

【表 2 - 8】

```

1 actcttttgc tcgccggggc tgctgccagt gtgtggctct gtctctctc cgctttgctg
61 agccctccct tcttctctc agttcctaga gtccgaccgc cgcggccgc gagagagagg
121 agaaggagg ggagtggcca cagcaggtcc tatctggtg tgagtggctg tcatgatctc
181 tacagcaccg ctctacagcg gcgtgcacaa ctggaccagt tctgaccgga ttgcgatgtg
241 tggcatcaac gaggagagaa gagcacctct ttctgatgag gagtcaacga caggcgactg
301 ccagcacttt ggatctcagg agttttgtgt cagcagcagt ttttccaagg tggagctcac

```

50

【表 2 - 9】

361	ggcagttgga	agtggcagca	atgcccgggg	ggcagaccca	gatggcagtg	ctacagaaaa
421	acttggggcac	aagtcagaag	acaagcctga	cgatccccag	ccaaaaatgg	actacgctgg
481	gaacgtggca	gaggctgagg	gcctcttggt	gccccctgagc	agccccaggag	acgggctcaa
541	gcttcccgcga	tctgacagcg	ccgaggccag	caacagcagg	gccgactgct	cctggactcc
601	actcaacacc	caaatgagca	aacaggttga	ctgctcacc	gccggagttaa	aggctttgga
661	ctctcggcaa	ggtgttgag	agaagaatac	tttcatTTTT	gcaactctgg	gaactggagt
721	ccctgtggag	gggacccctgc	ccctggttac	cactaacttc	agtctctctgc	cagccccctat
781	ctgtccccct	gctcccgggtt	cggcctctgt	gccccactct	gttccagatg	cattccagggt
841	tccccctctcc	gtccctgccc	cagtccccca	ttcagggtctt	gttccagtc	aagttgcccac
901	ttcgggttcca	gtctcttccc	ctcccttagc	acctgtcccg	gctctggctc	cagcgccacc
961	gtcagtgcgc	acgtctatct	ctgactcgaa	ccccctttct	gtttcggcct	cagtcttgggt
1021	gcctgtgcca	gcttctgctc	ccccctcagg	cccggttccc	ttgtcggctc	cagctcctgc
1081	cccgttttca	gtcccagttt	cagctcctcc	cttggctctc	atccaggctc	ctgtgcccc
1141	ttcagctccg	accttgggttc	tcgctcccg	ccccactccg	gttctggctc	ccatgccagc
1201	atccacgct	ccagcggccc	ctgccccctcc	gtctgtgccc	atgcccactc	caacccccatc
1261	ttccggccca	ccttctaccc	ccacccctcat	ccccgccttt	gctcctacac	cgggtgcctgc
1321	acccacccca	gcccccatct	ttactccagc	ccctacaccc	atgcctgctg	ccacgccagc
1381	tgccattccc	acctctgcac	ccatcccgcc	ctccttcagt	ttgagtagag	tgtgctttcc
1441	tgcagctcag	gcaccagcta	tgcaaaaagt	ccccctgtcc	tttcagccag	ggacagtgtct
1501	gaccccgagc	cagccgctgg	tatatatccc	gcctccaagc	tgtggggcagc	cactcagtgt
1561	ggccacactg	ccaaccactc	taggggtttc	ctccactctt	acgtccctcg	tcctgcccgc
1621	ctacctgcag	gacaggtgtc	tccaggcgt	gctagcctcc	cccgagctcc	gttcttaccc
1681	gtatgcatct	ttctgtgccc	ggcctctgac	ttcggattcc	aagctggtat	ctctggagggt
1741	gaacaggctc	ccctgcactt	ccccatccgg	tagcaccacc	acccagcctg	cacccgatgg
1801	ggtccctggg	cctttggcag	atacctccct	tgttactgct	tctgccaagg	tgcttccaac
1861	tccacagcct	ctgctgcccag	cccccagtg	gagctcagcc	ccaccgcacc	ccgccaagat
1921	gcccagtgct	accagcagc	aaacagaagg	gacttccgtt	accttctctc	ctcttaagtc
1981	accgccacag	ctggaacgag	agatggcctc	tccacctgag	tgcagcgaga	tgccccctga
2041	tctgtcctcc	aagtccaacc	gccagaagct	tccattgccc	aaccagcgca	agacaccccc
2101	catgcctgtg	ttgacccccg	tgacacaccag	cagcaaggcc	ctcctctcca	cagtctgtgc
2161	taggtctcag	cgcacaaccc	aggctgccgg	tggcaatgtc	acctcctgcc	tgggctccac
2221	ttcctcgcgc	tttgtcatct	ttcccagat	cgtgaggat	ggggacccga	gcacctgggt
2281	gaagaactca	actgcactga	tcagcaccat	tcctggcacc	tacgtgggag	tggccaaccc
2341	agtgcctgca	tcctgtctgc	tgaacaaaga	ccccaacctg	ggcctcaacc	gtgacccccg
2401	ccatctcccc	aagcaggagc	ccatctccat	cattgatcaa	ggagagccta	agggcactgg
2461	tgccacgtgt	ggcaaaaagg	gcagccaggc	tgggtgctgag	ggacagccaa	gcacagtga
2521	acgatatact	ccagcccgcga	ttgcccctgg	gctgccaggg	tgccaaaacca	aggaactctc
2581	tttgtggaaa	cccacggggc	cggcaaatat	ttatccccgg	tgttcagtc	atgggaaacc
2641	taccagcacc	caggctcctgc	ctgttggtctg	gtccccgtac	caccaggcgt	ctctgctttc
2701	cattgtcatt	tccagtgcgc	ggcagctgac	ccccagtcag	ggggcgccca	tcaggccac
2761	cagcgttgtt	tcggagtgtt	ctggtgtgcc	atctctcagc	tccagcgag	ccgtgcacgg
2821	acttctctgag	gggcaaccac	ggcctggggg	ctccttcgtt	ccagagcagg	accctgttac
2881	aaagaacaaa	acttgccgga	ttgctgccaa	gccttatgaa	gaacaagtca	atcctgtcct
2941	cttgaccctc	agccctcaga	ctgggaccct	ggcactgtct	gttcagccta	gcgggtggga
3001	cattcgaatg	aatcaggggc	ctgaggaatc	agagagccac	ctctgctctg	acagcactcc
3061	taagatggaa	ggcccccagg	gggcttgtgg	cctgaagctg	gcaggagaca	cgaagcctaa
3121	gaaccaagtg	ctggccacct	acatgtccca	tgagctggtc	ctggccaccc	cccagaacct
3181	gcctaagatg	cctgagctgc	ctttgctacc	tcacgacagc	caccccaagg	aacttatatt
3241	ggacgtgggt	ccgagcagca	ggaggggctc	cagcacagag	cgccacagc	ttggaagcca
3301	ggtggatctg	gggcgagtga	aaatggagaa	ggtggatggt	gatgtggtct	tcaatttagc
3361	cacctgcttc	cgggctgatg	gcctcccagt	ggctccccag	aggggccaag	ctgaagtctg
3421	ggctaaggcc	gggcaggctc	gagtgaaca	ggaaagcgta	ggggtctttg	cttgcaagaa
3481	caagtggcag	ccagatgatg	tgacggaatc	tctgccgcc	aagaagatga	agtgcggcaa
3541	agagaaggac	agtgaagagc	agcagctcca	gccacaagcc	aaggccgtgg	tcgggagttc
3601	ccacagaccc	aagtgcggga	agctgcccg	tgacccccag	gaatccacca	agaaaagccc
3661	caggggggct	tcagattcag	gaaaagagca	caatggagtc	aggggaaagc	acaagcaccg
3721	gaagccgaca	aagccggagt	cccagtctcc	aggaaaacga	gccgacagcc	acgaggaagg
3781	ttccttgga	aagaaagcaa	agagcagttt	ccgtgacttt	attcctgtgg	ttctgagcac
3841	ccgcacgcgc	agtacgtctg	gaagcatctg	tagctccttt	gctggcatgg	cagacagtga
3901	catgggaagc	caggaagtct	tccccacaga	agaagaagag	gaggtaaccc	ccaccccgagc
3961	taagcgtcga	aaggtgagaa	agacccaacg	ggacaccag	tatcgagcc	accatgccca

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 0】

```

4021 ggacaagtct ctgctgagcc agggccgaag gcacctgtgg cgagcccgag aaatgccctg
4081 gaggacagag gctgcccgcc aaatgtggga caccaatgag gagggaggag aagaagagga
4141 ggagggcctg ctgaagagga agaaacgaag acggcagaag agccgaaaat atcagactgg
4201 ggagtacctg acagagcaag aagacgagca gcggcggaag gggagagcag atttaaaggc
4261 ccgtaagcag aagacttcct cctcccaaag tttggagcac cgcctcagga acaggaacct
4321 tctcttgccc aacaaagtcc aggggatctc ggattcacca aacggtttcc tcccaaataa
4381 cctggaagag ccagcctgcc ttgaaaattc agaaaagcca tcaggaaaac gaaagtgcac
4441 gaccaagcac atggcaaccg tctcagaaga ggcaaaagat gttgttctct actgcctcca
4501 gaaagacagt gaagatgtga atcacctgta caatgctggc tacacagccc tgcagtaggc
4561 ttgttcccg ggctggaccg acatcctgaa catcctgctg gagcacgggg ccaactgaa
4621 ctgcagtgcg caggacggca cgaggccagt tcatgatgcg gtgggtcaatg acaacctgga
4681 gaccatctgg ctctgctgt cctatggggc cgatcccaca ctggctacct actcgggtca
4741 gacagccatg aagctggcca gcagcgacac catgaagcgc tttctcagtg atcacctctc
4801 ggatcttcag ggcggggcag aggggtatcc cgggtgatcc tgggattttt acagcagttc
4861 tgtgttgag gaaaaagacg ggtttgcctg tgacctccta cataatcctc ctgggagctc
4921 agatcaagaa ggagacgata cgatggagga ggatgatttc atgtttgaac tctcagacaa
4981 gcctcttctc ccttgctaca acctccaagt gtcagtgtcc cgcgggcccct gcaactgggt
5041 cctcttttcc gatgtcttga agaggctgaa gctttcctcg aggatcttc aggcccggtt
5101 ccgcgacttt gaaatcacca ccatgcccaa ggccgagttc tacaggcagg tggcctccag
5161 tcagctgctg acccctgccg agaggcctgg aggcttgga cagacatccc cccaggtc
5221 ctctgagact gtggagctgg tgcggtacga gccagacctc ctctggctcc tagggtccga
5281 ggtggaattc cagtcttgca acagttgacc gggaaaaacag cccctcctct tctttctcct
5341 tccgagttcg ccttccccc acctccttgt ctttcccoga ccgagacca gactgcagaa
5401 tgaggcaata atacggacca acaagaagcc gccttatcaa tgcagcatt agcagctgga
5461 ctgtttttgt ttttttggtt acaattagtt ctcatctccc tgtcgtcgtc attgttatcg
5521 tggttgctga tgggggtgga aagttgaact ccattgtctga ggacaagagg tcccgggggt
5581 ggtgggaggt ggcgccgggg tcccttgga cggcctcctt gttcatgacc aagaccaaac
5641 ctggggcctg gatggccttg gcctgtcccg aggagaaatg agaaaatccc agatctctga
5701 gcgcccccca actccattcc cctgtgttct tctgtcttct gtagtattta ttttattagt
5761 atttaatttg tattgtttca ttggtttctg ataagtctgt atcactgtga cgatttgaga
5821 caactgttg tattgagga cttctgttac ctcttttct ttttcttgt tgatgagctc
5881 tgacaaagct attcctgggt gtttttttcc cccactgggg aggggggtgag gtggaatggg
5941 gtgggggaac atggacttgt gactaacgaa gctggttgct gctggcccag ggctgggggc
6001 ttgggggtaa atcctgaggg tttggtgctc cccacccac ccattccgc cctttcagc
6061 agccccgcta tcttgagatt agtgttgaca gggaggggag gattgtgagg tgaggggtta
6121 ataagttact ctaataaagg agcgtggaga agggatctga ggggtgagg tggccccct
6181 cctcagcctc tcttactg cccctcaga gtgcacaata cgagtttgtt cctgcctcca
6241 ctctcccacc ccgttctggc ctccctgtct caagatactg agcctctcac ctcccagccc
6301 tcagccaccc ccactcctgc ccttctgag actcacagca ccccttctc tctctcctc
6361 ccacctcctc cctcagcccc tcattctcct tgggaatctg cagagggctc tgggactcac
6421 tgccggatgt gaaatccagg cgtcagctgt ttctaggca agggcaggaa agtggctctc
6481 agcccttgct ccactcatgc ctgggggcct ggggctgagt ggtatcccta cctggcctcc
6541 ccctggcctc tgggcctcca gcctggggt tgtcagtgga gagagagaga ggagcttggg
6601 ttgcttccct gtcccgcct cctctgtggc attgtccctc ccactcttat ttttctacca
6661 attgctattt ttccgaacaa tccttgtaga gtatgtacca tccaaaggca ggagggcctc
6721 gccgtggccg gctctggttg gagatggtac agttttattg tacaggtgct aaaaacaaca
6781 caacaaaaaa gaaaatggaa aaaaaaaga ttaaaaaaa aaggaaaaaa aaaaagccag
6841 tttgaggatg ggacaatctg ttctctagag gctcctgagc catgcgggag cattggtggt
6901 tattttcttt gttattgtgt ttgtctttgt tctgggggg gaagttctcg gcccttctc
6961 gtaggactgc tcccccccc caccatactg ccagttgggt tttgaacagt tgttttccct
7021 ttttaagaaa aaaaaatata tatatatata catatatata tataaagttg aggggttttg
7081 gactttaatt tgttggtttt gttgggggtt ctggtattgt gtagtttatt tcatgtctg
7141 tttgcctttc cttttttcgc atttgggtgt atattctggc tgccctttat gtttcatttt
7201 aagcaactgg ctgtggagtc aaaaacactt gcatactgaa aaa

```

10

20

30

配列番号6：ヒトBCORL1アイソフォーム1（転写バリエーション1によってコードされる）アミノ酸配列（NP_068765.3）

40

50

【表 2 - 1 1】

```

1 mistaplysg vhnwtssdri rmcgineerr aplsdeestt gdcqhfgsqe fcvsssfskv
61 eltavsgsgn argadpdgsa tekighksed kpddpqpkmnd yagnvaeaeg llvplsspgd
121 glklpasdsa easnsradcs wtplntqmsk qvdcspagvk aldrsggvge kntfilatlg
181 tgvpegtlpl lvttnfslpl apicppapgs asvphsvpda fqvplsvpap vphsglvvpq
241 vatsvpapsp plapvpapal appsvptlis dsnplsvsas vlvvpasap psgvpplsap
301 apaplsvpvs applaliqap vppsaptlpl apvptpvlap mpastppaap appsvpmptp
361 tpssgppstp tlipafaptp vpaptpapif tpaptmpaa tpaaitsap ipasfslsrv
421 cfpaagapam qkvplsfqpg tvltspqplv yipppscgqp lsvatlpttl gvsstltlplv
481 lpsylqdrcl pgvlaspeir sypayfsvar pltsdsklvs levnrlpcts psgstttqpa
541 pdgvpqplad tslvtasakv lptpqpllp psgssapphp akmpsgteqg tegtsvtfsp
601 lkspqqlere masppesem pldlssksnr qklplpnqrk tppmpvltplv htsskallst
661 vlrsqrqtq aaggnvtscl gstsspfvif peivrngdps twvknstali stipgtyvgv
721 anvpaslll nkdplnlglnr dprhlpkqep isiidqgepk gtgatcgkkg sqagaegqps
781 tvkrytpari apglpgcqtq elslwkptgp aniyprcsvn gkptstqvlp vgwsphygas
841 llsigissag qltspqgapi rptsvvsefs gvpslsssea vhlpeggqpr pggsvfpeqd
901 pvtknktcri aakpyeeqvn pvlltlspqt gtlalsvqps ggdirmmgqp eeseshlcsd
961 stpkmegppg acgklagdt kpknqvlaty mshelvlrat qnlpkmpelp llphdshpke
1021 lildvvpssr rgssterpql gsqvdlgvrk mekvdgdvfv nlatcfraqd lpvapqrgga
1081 evrakaggar vkqesvgvfa cknkwqpddv teslppkkmk cgkekdseeq qlqpqakavv
1141 rsshpkckrk lpsdpqestk ksprgasdsg kehngvrgh khkptkpes qspgkradsh
1201 eegslekkak ssfrdfipvv lstrtrsqsq sicssfagma dsdmgseqvf pteeeeevtp
1261 tvkrytpari apglpgcqtq elslwkptgp aniyprcsvn gkptstqvlp vgwsphygas
1321 eeeegllkrk krrrkksrky qtgeylteqe deqrrkgrad lkarkqktss sqslehlrn
1381 rnlilpnkvq gisdspngfl pnnlepacl ensekpsgr kcktkhmatv seeakdvly
1441 clqkdsedvn hrdaagytal heacsrgwt ilnilleha nvncsaqdg rpvhdavvnd
1501 nletiwlls ygadptlaty sggtamklas sdtmkrflsd hlsdlqgrae gdpvswdfy
1561 ssvleekdg facdlhnpp gssdqegddp meeddfmfel sdpkllpcyn lqsvsvrgpc
1621 nwlflsdvkl rklssrifq arfphfeitt mpkaefyrqv assqlltpae rpgglldrsp
1681 pgssetvelv ryepdlrlil gsevefqscl s

```

10

20

配列番号 7 : ヒト RING1A cDNA 配列 (BC051866. 2、188~14

08 位由来の CDS 領域)

```

1 cgggccatgg cgggcgccgt ggccggagct gctgtctgag cagcggttgc ggaccgagcg
61 aacttgcccc aggagcccg gcctagggag aggcgcggcg gcggcgagg cgcaacggc
121 tggagctggc cttcttcgcc ttctcctcgg ctgtggagcc ctggtggggg gtcctgcgcc
181 ggtcaccatg acgacgcccg cgaatgccca gaatgccagc aaaacgtggg aactgagctc
241 gtatgacgtg caccggaccc cgcaggaagc cataatggat ggcacagaga ttgctgttcc
301 cctcgggtca ctgcattcag aactcatgtg ccctatctgc ctggacatgc tgaagaatac
361 gatgaccacc aaggagtgcc tccacagatt ctgctctgac tgcattgtca cagccctacg
421 gagcggaac aaggagtgct ctacctgccg aaagaagctg gtgtccaagc gatccctacg
481 gccagacccc aactttgatg ccctgatctc taagatctat cctagccggg aggaatacga
541 ggcccatcaa gaccgagtgct ttatccgcct gagccgctg cacaaccagc aggcattgag
601 ctccagcatt gaggaggggc tacgcatgca ggccatgcac agggcccagc gtgtgaggcg
661 gccgatacca gggtcagatc agaccacaac gatgagtggt ggggaaggag agcccgggga
721 gggagaaggg gatggagaag atgtgagctc agactccgcc cctgactctg ccccgagccc
781 tgctcccaag cgaccccggt gagggggcgc aggggggagc agtgtaggga cagggggagg
841 cggcactggg ggggtgggtg ggggtgcccg ttcggaagac tctggtgacc ggggagggac
901 tctgggaggg ggaacgctgg gcccaccaag ccctcctggg gcccagagcc ccccgagccc
961 aggtggagaa attgagctcg tgttcgggcc ccaccccctg ctggtggaga agggagaata
1021 ctgccagacg aggtatgtga agacaactgg gaatgccaca gtggaccacc tctccaagta
1081 cttggccctg cgcatcgccc tcgagcggag gcaacagcag gaagcagggg agccaggagg
1141 gcctggaggg ggccgctctg acacgggagg acctgatggg tggggggggg aggggggggg
1201 tgcgggagga ggtgacggtc ctgaggagcc tgctttgccg agcctggagg gcgtcagtga
1261 aaagcagtac accatctaca tcgcacctgg aggcggggcg ttcacgacgt tgaatggctc
1321 gctgaccctg gagctggtga atgagaaatt ctggaaggtg tcccggccac tggagctgtg
1381 ctatgctccc accaaggatc caaagtgacc ccaccagggg acagccagag gaaggggacc
1441 atgggggtac cctgtgtcct ggtctatcac ccagccttct ttgtccccc gtacccccc
1501 cccagccagc caataagagg acacaaatga ggacacgtgg cttttatata aagtatttat
1561 atgagattct tctatattgt acagagtggt gcaaaacacg ccccatctg ctgccttttc
1621 tattgcccct caacgtccca tctatacag gtgttgagga aggtgaagaa cctccatt
1681 cagcccgccc taccaacaac aaacgtgctt ttttctctt tgaaaaaaa aaaaaaaa

```

30

40

50

【表 2 - 1 2】

配列番号 8 : ヒト R I N G 1 A アミノ酸配列 (C A I 9 5 6 2 0 . 1)

```

1 mttpanaqna sktwelslye lhrtppgeaim dgteiavspr slhselmcpi cldmlkntmt
61 tkeclhrfcs dcivtalrsg nkecptcrkk lvskrslrpd pnfdaliski ypsreeyeah
121 qdrvlirlsr lhnqqalsss ieeglrmqam hraqrvrp pi pgsdqtttms ggegepgege
181 gdgedvssds apdsapgpap krprgggagg ssvggtggggt ggvgggagse dsdrggtlg
241 ggtlgppspg gapsppepgg eielvfrphp llvekgeycq tryvkttgna tvdhlskyla
301 lrrialerrqg qeagepggpg ggasdtggpd gcggegaggag ggdgpeepal pslegvsekq
361 ytiyiapggg aftsllngslt lelvnekfwk vsrplelcya ptkdpk

```

配列番号 9 : ヒト R I N G 1 B cDNA配列 (NM_007212.4、95～1105位由来のCDS)

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 3】

1	atattgtgcg	gcggcgcgcg	cgccgcgcgc	agctgatacc	agagtcttgc	tccggccgcg
61	gccagcggag	ccctgggctg	gggcaggagc	cgcaatgtct	caggctgtgc	agacaaacgg
121	aactcaacca	ttaagcaaaa	catgggaact	cagtttatat	gagttacaac	gaacacctca
181	ggaggcaata	acagatggct	tagaaaattgt	ggtttcacct	cgaagtctac	acagtgaatt
241	aatgtgccca	atattgttgg	atatgttgaa	gaacaccatg	actacaaagg	agtgtttaca
301	tcgtttttgg	gcagactgca	tcacacagc	ccttagaagt	ggcaacaaag	aatgtcctac
361	ctgtcggaag	aaactagttt	ccaaaagatc	actaaggcca	gacccaaact	ttgatgcact
421	catcagcaaa	atattatccaa	gtcgtgatga	gtatgaagct	catcaagaga	gagtattagc
481	caggatcaac	aagcacaata	atcagcaagc	actcagtcac	agcattgagg	aaggactgaa
541	gatacaggcc	atgaacagac	tgcagcgagg	caagaaacaa	cagattgaaa	atggtagtgg
601	agcagaagat	aatgggtgaca	gttcacactg	cagtaatgca	tccacacata	gcaatcagga
661	agcaggccct	agtaacaaac	ggacccaaac	atctgatgat	tctgggctag	agcttgataa
721	taacaatgca	gcaatggcaa	ttgatccagt	aatggatggg	gctagtgaag	ttgaattagt
781	attcaggcct	catccacacac	ttatggaaaa	agatgacagt	gcacagacga	gatacataaa
841	gacttctggt	aacgccaact	ttgatcactt	atccaagtat	ctggctgtga	ggtagctttt
901	agaagaactt	cgaagcaaat	gtgaatcaaa	ccagatgaac	cttgatacag	ccagtggaga
961	gcagtatacc	atattatata	caacagccag	tggccagttc	actgtattaa	atggctcttt
1021	ttcttttgaa	ttggtcagtg	agaaatactg	gaaagtgaac	aaacccatgg	aactttatta
1081	cgcacctaca	aaggagcaca	aatgagcctt	taaaaaccaa	ttctgagact	gaactttttt
1141	atagcctatt	tctttaatat	taaagatgta	ctggcattac	ttttatggac	agatcttgga
1201	tatgtgttgc	aattttcttt	ctgagccaga	ctagtttaag	ctattcaaat	cttttccctt
1261	ttattttaaga	tttctttttt	ggaagggact	gcaattattc	agtatttttt	tcttctcttt
1321	aaaaaaatat	atctgaagtt	tcttgtgttt	ttttttttcc	ccacaaagtg	tgtttccact
1381	tgagcaccac	ttttgaccca	ggaatttttc	atagtttctg	tattcttata	agattcagtt
1441	ggctgtcctt	tctctgtctc	cctcaaaaga	tttttagtca	tacagaatgt	taaatattat
1501	gtattctgac	tttttttttc	ccccggagtc	ttgtatat	atagttttct	atataaactg
1561	tagtatcttc	atgaagaccc	aagggtcaaa	tttactgtcc	ttaaaaacaa	ttctcatagg
1621	attattcttt	tcattgtatt	ttcttccata	atatctcatt	ttaaaaagaa	gttctttatg
1681	aacttagtgt	ccattgtcat	gcaatgtttt	tttttttcca	ttcttttccc	ctgtaatttt
1741	ggaatttctg	gtcctgggaa	gaatcaaaac	aaatcttaag	ttctatgaga	acttggttca
1801	ttgacatatt	ctgctgaaga	aagaaaaatt	aaattggtag	taaaatatag	tcttcaagta
1861	tacgttttag	agtgtctttt	tttgtattag	ttctgtgtgc	acttcatttc	ctgtattata
1921	tgtgatgttt	ttccccatta	aaataccaga	gataatggag	atatttttga	ctttagcctt
1981	gatgaaaagt	acaagatatg	ttcaaaagct	ccctaatttt	ttctttattt	gtagccacat
2041	aagtttcaag	aataacatgg	cacacagaac	aatggaaaaa	agtttggttc	cattggaaaa
2101	ttatatcatt	ttgggttgcc	acatcagttt	ataaatttgg	cgctctttta	attacactct
2161	gtagaagggt	aatagagctt	gagccctgct	ttaatatgta	gtgaaagata	attctgtaga
2221	aaaacgtcag	ccagtagggg	aaagtcattc	tactgttctt	aatttttata	ttgaggaaac
2281	atattgggtg	tttgggagcc	agaaagcctt	gttgacagat	cagaaataag	attgacttgg
2341	gtgttatatt	tcatctctct	ccagactcta	ggtatatatt	caactttata	tatcacagta
2401	tttaaaaaga	catgtttgca	ttgagaaatt	aaccctaag	ggttttcaat	agggtgtaga
2461	cctccagtag	ctttgttaact	aaagtctgtc	tagtcattgt	aaatatttat	ctgtcagttt
2521	tgacagattg	gggccaagct	gatgttttaa	atcttcagcc	cggtagtaaa	acttaaagggt
2581	atatattcaa	ttttttacca	ttttatggaa	aatattttaa	atctgttttt	acagggtttt
2641	tttttttttt	ttttttttgt	aatctgtgct	atgaaatttg	aaaaccacca	aaaatcaagg
2701	gaacttttat	atattcaatt	ccttttctgt	tgtaattgta	aagttgtata	gattattaat
2761	gcatgcccac	tgaatataac	cctggttttg	tgataaaact	gcttagattt	tgttgatgac
2821	attagattag	tagttgcatt	aaataactaa	attccatttg	tgattaattg	aaattttgtc
2881	tttaagcaga	gagttatttg	tgactataag	ctttgtgtct	agagaatgta	tgtgttttta
2941	tctgtcagta	tgggaggata	taaaactgcat	catttagtaa	attattgggt	gtgtaacctt
3001	ttgtgaaata	taattctagg	tatttgatag	ggtattgagt	gtattttgtg	tgtgtgtgga
3061	tgtgtgtttt	ggggtacggg	gagaggcgat	gctattggcc	atcactacca	accagggttt
3121	caaaaagtat	tacctaagta	atcttcttta	tcactatctc	aactgaggaa	gaaaaggctc
3181	accacaagtg	gtgtgaaggc	tttgggtact	tagttctaaa	tttttttatg	gtaacatata
3241	catagccaca	tttacagttt	taaccatttt	aaggcatgta	attcagtggt	gttaggtaca
3301	ttcacaatgt	tgtgtaatga	tcaccgctgt	ctacttgtaa	aactttttca	tcaccccaaa
3361	cagaaaactct	gtgtgcaatt	aaagtaatgc	atcttctctc	ttcttaa	

10

20

30

配列番号 10 : ヒトRING1B アミノ酸配列 (NP_009143.1)

40

50

【表 2 - 1 4】

```

1 msqavqtngt qplsktwels lyelqrtpqe aitdgleivv sprslhselm cpicldmlkn
61 tmttkeclhr fcadciital rsgnkecptc rkklvskrsl rpdpnfdali skiypsrdey
121 eahqervlar inkhnngqal shsieeglki qamnlrlqrgk kqqiengsga edngdsshcs
181 nasthsnqea gpsnkrktks ddsgeleldnn naamaidpvm dgaseielvf rphptlmekd
241 dsaqtryikt sgnatvdhls kylavrlale elrskgesnq mnltdtasekq ytiyiatasg
301 qftvlnsfs lelvskeywk vnkpmelyya ptkehk

```

配列番号 1 1 : RYBP cDNA配列 (NM_012234.6、184~870位
由来のCDS領域)

```

1 agtctcgtcc ggagactggc agcggcgggcg gcggcgggcg ccggagctcg agccccagcg
61 gctgagggcg ggcgggcggg cgcgggggag ggaggggggc cggtcccgca cgactccccg
121 gacggcggtt ctccctccag cgcgcgccgt ttcggcttgg ggggggcggg gtacagccca
181 tccatgacca tgggcgacaa gaagagcccg accaggccaa aaagacaagc gaaacctgcc
241 gcagacgaag ggttttggga ttgtagcgtc tgcaccttca gaaacagtgc tgaagccttt
301 aaatgcagca tctgcgatgt gaggaaggc acctccacca gaaaacctcg gatcaattct
361 cagctggtgg cacaacaagt ggcacaacag tatgccacc caccaccccc taaaaaggag
421 aagaaggaga aagttgaaaa gcaggacaaa gagaaacctg agaaagacaa ggaaattagt
481 cctagtgtta ccaagaaaaa taccaacaag aaaaccaaac caaagtctga cattctgaaa
541 gatcctccta gtgaagcaaa cagcatcacg tctgcaaagt ctacaacaaa gaccagcgaa
601 acaaatcaca cctcaaggcc ccggttgaaa aacgtggaca ggagcactgc acagcagttg
661 gcagtaactg tgggcaacgt caccgtcatt atcacagact ttaaggaaaa gactcgctcc
721 tcatcgacat cctcatccac agtgaccttc agtgacgggt cagaacagca gaaccagagc
781 agctcggggg cagagagcac agacaagggc tctcccgtt cctccacgcc aaagggcgac
841 atgtcagcag tcaatgatga atctttctga aattgcacat ggaattgtga aaactatgaa
901 tcagggtatg aaattcaaaa cctccacctg cccatgctgc ttgcatccct ggagaatcct
961 ctgtggacat cgacctctta gtgatgctgc caggataatt tctgcttgcc atgggcatct
1021 ggccaccaag gaatttcgca ccctgacgat tactcttgac acttttatgt attccattgt
1081 tttatatgat tttcctaaca atcatttata attggatgtg ctccctgaatc tactttttat
1141 aaaaaaaaaa aaatctgctg tgcacaattt tccatgtaca ttacaactgg ttttttggtt
1201 ttgttttgtt gccggtgggg agggctggga gggggaggga acttttatgt attgtgttca
1261 caaactccat cctttcagca tatcctttta agtttagttc tttcttccag ttatactatg
1321 tactatcagt tttgatataa ctatatatat ataaatataa aattatatat aaagggttat
1381 ttgaaaccaa tccatggcaa cgctgggtgt tgatacactg tgaagtgaat acaacattga
1441 acagttacag atctgggaca gtcccttcta tgaaagtgtc gaaatttaat taaaatcagt
1501 cttatatgaa gtatgttcca atccatgtgg gaacttgact ctctcatctg tctaaagagt
1561 actggacgat ataaaaatat atatttttta aacaatgtga tctcaaattt aaagactgct
1621 ccagatagcc tgcatttgca atggaataac tgacaaatca caagtggttt agttgggcag
1681 ggctttgatc attcaaaagt aactaaagta gctccagaat gccaggtatt cgtgtaaatt
1741 acggttacat gttatcattt gctgttctta cataagcact catgaaaata tggattctctg
1801 taacttgaat tccatccatt ttccagacct ctactcatgt ctgaggtaaa tctagaaatt
1861 gtcttagttt taggattgaa acagtctata aactgtatgt ttggtccatc caggaaagcta
1921 gtcccttggt tctcctttct acatgacatt gcagtgggtg tttctgtaat taaaatttgt
1981 ttgcctcatg tccctttgtc tgataaacct tccctctacc gattcagttg tgagcattct
2041 ttttttccct ctcaaaacct actatgattt gttttactga acaaaggtta tcaaccacac
2101 atccagtcct gacatggagc ttttcagtgt ttggagacat ttctcaatcc cctgctgtgg
2161 taggaactcc agtgggtgaac ggcttgccgc cctgcagcca gagttgcagg gaaagctcgt
2221 acttactgcg agcagcatgt aatctttttt ctccctggac ataaagatag cttgagtaaa
2281 ctgttctatt tcattctctt cactcttttt actgtcttgc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
2341 taatcaaaga ccactaataa gattccacct ctcttatta aaataatttt ttaaaatttt
2401 gttttgcttt tgtttgatg tggggtctct ctctattttg acttttacat ttagatacacg
2461 agtttgtagt acttcagaga catttcaagc atgagaattt gaggttacct ctctttatgt
2521 gaccttagg gactcacggg agggcagcct gatttgtaat gaagcaccac attttggtgt

```

10

20

30

40

【表 2 - 1 5】

```

2581 taaaaacctg gtttgcttaa taatagcagt aatttctgtc tgtggaggca acaaaataaaa
2641 aaattaacag cttgaattga gtagccaaca ggaaagggtc ctttcacatt tacattaataa
2701 ctattctgta gtcactaatg taccataatt taaattcttt tctcaaaggt atagattata
2761 aagcagtgcc atttgttgct gtggtcctat tctcaaatgc atggacaatg tccccccctt
2821 tttaaaataa tgcttgtgtc tgggatgcaa gctttgctta tctttttaa tacattttta
2881 aagtatttat taatgaacca aaggaaatca gatgctttct ataagcatca gaatatataa
2941 tacatagtga tttgactatg aattttaaat ccacatttta atattggtgg gatattgcaa
3001 agacatttct tctaaagttt taatatctct tttattaagg gtctcaggga gggtaaaatta
3061 gtcagccata tttattttcc agaggtttaa gaaattgctg tttttaactt tttgaaaaaa
3121 cttaaagtc accaaactca tgtaggttgc actgcttatt gaaccaataa ctgttggtat
3181 gcactttgtt cagacacact gtgtactttt tcaaaaacta gtttcatgta aagtgattgg
3241 accccataga ttagtgga aaagctgatta accagctact cataggctgc taattcattc
3301 atgccaatgt tttggttttt cagttttgct tccgtgataa attaaagaat ggggaggggg
3361 gaaggaaggg gaagaagatt gctttagaac aagtggcatg aaattaccat cttttagaa
3421 accgcagcta acagtgggag ttatctaagc aatcagatgt tacagggcca gccctttagc
3481 tgctgtggtg tattctgttg ggtagtggag tagtaggtac tttatagact tttatttttg
3541 gaaattgatg acatccctca ggcatgtatt ctggaaatgg aattcctgta acttctgtg
3601 tctgcagtat gccctacaat tagtaggcag cgtgtaaaaa cactagtgtg gattataaag
3661 atatacatat aaagaggacc agaaatactt ggtattcagt ggcacagaaa gcaggttaaa
3721 caaacaacaa gcacagtgtt acgcttgcaa gtttccattt gttttaatac cagcaatct
3781 ttcacactcg tgcgtgtgcg cgcacacaga gcttacctga cttgctctgc ttgactcagt
3841 cagtttcaaa aaaaaagaca tcttgacacc cacacaatat tctaatacaa acctttcagt
3901 tccaatctgg atattttaaa acattggcag aagcttctgt gagtttagtt ccactaagat
3961 gtttcacctg cttatcaag accattctca gtctactttt ttaagctacc gtatcttaaa
4021 ttattgaaaa tttattaatt gctgaatata taataacctt tgcttgtagt taaccgaaa
4081 tggtttaaga gccaacattt agagtatgac aatggagctg aacagttttt aatgcgcaag
4141 cagttctgtt cttgtgtatg acttgaacc ttaatttact gtgtaaagat gggtacatta
4201 tttccttagc tttgtttgtt ggagacaaat agagaatgct tgtaagtagt gtcaaaacaa
4261 tcttatcttg tgaatttttg ttaatgtatt atacgagcta ttttttcat ttgccagaa
4321 agacagcttg tataacgctt ttggaagttt ctgctctgta atgtcttag agctgacagt
4381 ctgttaggtt tgtttttttt ttcattgctaa agtgtcagtt ggtggttttg tgaactggtc
4441 aaaaattcac aggtcttaaa tgttttggg gaaatttata ttggacactg ctctttgtct
4501 agcaataaaa agatgttaat atattcctgt tactggcatg tgcacgacta tggtattaga
4561 agccacttta tcatttttct gctttaaata gaaatgtcta tttatgaatt ctgctttag
4621 ttttttcaca aataaaatag taaaatttcc attggaatc ttaaaaaaaa aaaaaaaa

```

10

20

配列番号 1 2 : RYBP アミノ酸配列 (NP_036366.3)

```

1 mtmgdkkspt rpkraqkpaa degfwdcsvc tfrnsaeafk csicdvkgt strkprinsq
61 lvaqqvaqgy atppppkkekekvekdqke kpekdkisp svtkkntnkk tkpkdilkd
121 ppseansiqs anattktset nhtrprlkn vdrstaqla vtvgnvtvii tdfkektrss
181 stssstvtss agseqnqss sgsestdkgs srsstpkgdm savndesf

```

30

配列番号 1 3 : ヒト PCGF1 cDNA 配列 (NM_032673.3、28~80
7 位由来の CDS 領域)

40

50

【表 2 - 1 6】

```

1 agtggccggc tgggatcagc ctttaagatg gcgtctcctc agggggggcca gattgcgac
61 gcgatgaggc ttcggaacca gctccagtoa gtgtacaaga tggacccgct acggaacgag
121 gaggaggttc gaggtaagat caaagacttg aatgaacaca ttgtttgctg cctatgcgcc
181 ggctacttcg tggatgccac caccatcaca gagtgtcttc atactttctg caagagttgt
241 attgtgaagt acctccaaac tagcaagtac tgcccatgt gcaacattaa gatccacgag
301 acacagccac tgcacaacct caaactggac cgggtcatgc aggacatcgt gtataagctg
361 gtgcctggct tgcaagacag tgaagagaaa cggattcggg aattctacca gtcccgaggt
421 ttggaccggg tcaccagacc cactggggaa gagccagcac tgagcaacct cggcctccc
481 ttcagcagct ttgaccactc taaagccacc tactatcgct atgatgagca gttgaacctg
541 tgcctggagc ggctgagttc tggcaaagac aagaataaaa gcgtcctgca gaacaagtat
601 gtccgatgtt ctgttagagc tgaggtacgc catctccgga gggtcctgtg tcaccgcttg
661 atgctaaacc ctcagcatgt gcagctcctt tttgacaatg aagttctccc tgatcacatg
721 acaatgaagc agatatggct ctcccgtggg ttccgcaagc catccccttt gcttttataa
781 tacagtgtga aagagaagag gaggtagggg ccaagcccc accccatccc actccccttc
841 cctcccaga tatttatgtg aaatgaactg cagctttatt ttttgaaata aaaactttta
901 aaaagca

```

10

配列番号 14 : ヒト PCGF1 アミノ酸配列 (NP_116062.2)

```

1 maspggggia iamrlrnqlq svykmplrn eeervkikd lnehivccle agyfvdati
61 teclhtfcks civkylqtsk ycpmcnikih etqpllnlkl drvmqdivyk lvpqlqsee
121 krirefyqsr gldrvtpgtg eepalsnlgl pfssfdhska hyrydeqln lcclerlssgk
181 dknksvlqnk yvrsvraev rhrrvlchr lmlnpqhvql lfdnevlpdh mtmkqiwlsl
241 wfgkpsplll qysvkekrr

```

配列番号 15 : ヒト SKP1 転写バリエーション 2 cDNA配列 (NM_170679.

20

3、97～588位由来のCDS領域)

30

40

50

【表 2 - 1 7】

1	gctgtagtgg	cttcgtcttc	ggttttttctc	ttccttctgct	aacgcctccc	ggctctctgc
61	agcctcccg	cgccgctctc	cttaacaccg	aacaccatgc	cttcaattaa	gttgagaggt
121	tctgatggag	agatatttga	agttgatgtg	gaaattgcc	aacaatctgt	gactattaag
181	accatgttgg	aagatttggg	aatggatgat	gaaggagatg	atgacccagt	tcctctacca
241	aatgtgaatg	cagcaatatt	aaaaaaggct	attcagtggt	gcacccacca	caaggatgac
301	cctcctcctc	ctgaagatga	tgagaacaaa	gaaaagcgaa	cagatgatat	ccttgtttgg
361	gaccaagaat	tcctgaaagt	tgaccaaggga	acactttttg	aactcattct	ggctgcaaac
421	tacttagaca	tcaaagggtt	gcttgatggt	acatgcaaga	ctgttgccaa	tatgatcaag
481	gggaaaactc	ctgaggagat	tcgcaagacc	ttcaatatca	aaaatgactt	tactgaagag
541	gaggaagccc	aggtacgcaa	agagaaccag	tggtgtgaag	agaagtgaag	tggtgtgcct
601	gacactgtaa	cactgtgaag	attgttccaa	atactagtgt	cactgctctg	tttataaattg
661	ttaatatattg	acaaacagta	gacaaatgca	gcagcaagtc	aattgtatta	gcagaatatt
721	gtcctcattg	catgtgtagt	ttgagcacag	atcccaaac	ttacggccaa	gtttcttcta
781	gtatgatgga	aagtttcttt	tttcttttgc	ctgaataaaa	ctgaactgtg	agcttctctat
841	aagtggcatt	ttgggctttc	cctctttttt	gtaaagcaat	gtctgcctag	tttattgtcc
901	agttaaacttt	agtgcacttt	taaaagttgg	cattgtaaat	aaaacaactt	gcaaaaaagt
961	tttctggaat	agaattaaca	aaatattatc	tttattcatg	agttggaaac	tgaaaaaagg
1021	cttcttgaag	taaatgttct	gagtggagct	actaggatgt	cttcagcct	cctgcagtc
1081	aggagtacca	ctgtattgat	tagcctgtat	gtagcagggc	tccttctatt	gcactctgag
1141	acttgttttc	tttttcttta	tttttaatcc	tcttagtttt	aaatatattg	cctagagact
1201	cagttactac	ccagtttgtg	gttttttggg	agaaatgtaa	ctggacagtt	agcttttcaa
1261	ttaaaaagac	acttaaccac	tgtagggatgt	catcttttta	taattagtgt	tcccatgtgg
1321	agaaaattat	tcacactact	tgcatgtaaa	gaataattta	acttttaaca	ttaaaaatag
1381	tggtaaaacc	cagaaagcat	ccatcatgaa	tgcaagatac	tttcaataaa	aagtaagtta
1441	tatagtaggt	agtttaagttt	gcttttgtgg	acttaaatgt	gtctcttcac	ttaaatgggt
1501	tgaatgtgta	tatatattgtt	cagcttgaaa	agacttagtt	tatatcctag	ctcactggag
1561	gctgctgaca	taaccataac	ttctgtccct	tctaattgtc	atttatatgc	ctaactggag
1621	ctagtacttt	aattcttaac	acaaaattac	tctgccattg	ttccagctt	cctctctaca
1681	atagaatgaa	gtttttttga	tggtcttgaga	tggtctcaca	attttgattt	ttttttcttc
1741	cttgtgctcc	ctttttttct	ccttgctttt	ccagttaaca	tctatatcca	catgtaatct
1801	tgttttctct	tcacattcac	tgagttgttc	aggctcagat	catcccttga	cagtagtttg
1861	ccttcatctc	accttttcatt	tgtcccaaat	tcaccttatt	taataaagtc	ccatatgttg
1921	tctcaactta	ttccaatttg	ttgtctgtac	cagagatagg	aaactataat	gtgtgggtca
1981	aatcaggccc	atagcctggt	tttgtagtct	ttgagctaaa	aatgggtttt	acgttgtaaa
2041	gagttattta	aaattctctc	tctctctctc	tctctctctc	aggagataag	cttgttttct
2101	gtttgtcctg	gttttagtgg	ggaaggtagc	ggtgtatagt	cctagctgaa	ttgtctcatc
2161	taccaatttc	tgctattata	agatcaactt	ctgcaaaaac	cttatccacc	tcaagtatcc
2221	ttagcagctg	ggcatgggtg	cttatgcctg	taatctcaac	attttgggag	gacaagacag
2281	gaggatcggt	tgagcccagg	agttcaagac	cagcctgggc	aacacagaaa	gtccctgtct
2341	ctccaaaaaa	aaaaaaaaaa	attagcagtc	atatgggtgca	tgccataaat	cccaactact
2401	tgagaggctg	aggtgggaag	atggcttgag	cctgagaggt	cgaggtgca	gtgagctggc
2461	attgcaccac	tgcactccag	tctaggcaat	agagcgagac	cttgtctcaa	aaacaaacca
2521	gaagtatcct	tagcagttat	atgacaaaac	aatcttcaat	gaaggtccag	gattactgcc
2581	atatgccatg	tttaacttgt	aaaggaagta	tcaccttcta	agaaactgga	gcttgttatt
2641	accacttgat	ctgtataata	ctcagcagta	gttagaatta	tatgagtaaa	taacgtcact
2701	atccgtattt	aaaggataat	gagatctttc	agaaagattg	gatggacaga	caatatagta
2761	gtaatttaaa	tttttgtttc	ctgactttct	gtagtcccta	aacaaacaac	aaaaaatcct
2821	agtaacttta	aactttttaca	ttaatagaga	tccaagagaa	aataagccat	ttttcaccat
2881	tgtggaccca	aataaatcat	agacatggta	ttaagaagcc	cttttcagtc	tggttgagtc
2941	attatttttc	tacctttctt	tttctgttct	cctgtgtgat	gcccactatt	cctttaatat

10

20

30

40

50

【表 2 - 18】

3001	atctactaga	acttttctag	gctttcacct	ggagtggagt	gtcctttctc	attatcacag
3061	tagccaaacc	tcagttctca	aaactccact	cattttctggc	tactctctta	cttcccaact
3121	attcttctaa	actaatattg	tggcattaag	tcataccttg	aggctggagt	tttagtgtct
3181	tcattggcctt	gggcaagttg	gaaataggta	ctacggtttt	atagatctag	tgcagttctgc
3241	tttatattag	ttccagaact	tcatttgaag	tcacttgaca	gcaggattta	acttgtattt
3301	agcagcacta	ctccatgaat	ttcagtataa	gtaacagaag	tgaaaagtcc	ttgtgaaatg
3361	cagggtacagg	gcataatgaa	aacaagaaga	gtagttttaa	tgcattgagag	gggagagctt
3421	gataaatagct	gataaatagcc	ttgggtttgga	gagtgggttac	tgatgaatta	tgaagacttt
3481	ctctaattac	tgttatagta	gtaaaggaaa	gaaaaccctt	gttgataaag	taaacttagg
3541	gatttaattag	gaaatgcctt	ttatttcacc	aggaaagaga	atgagaggaa	gaaggtattt
3601	ggcagatttg	ggtgattgaa	ggatgtttgt	cgggttctct	tgtaaacac	atgctgcttt
3661	ctgcagtggt	ctgcttttaa	tgatgaagtc	ctttcaagga	ctccatggca	gtcctttggc
3721	ttctcacctt	ttcattgatt	atgtcacctg	tgatctaaaa	gtaaaccaaa	accttctctga
3781	atgttagctt	attattttct	ccttaacatt	gtcataggct	aaagatgtgc	ccctcacaat
3841	tctaataatt	tttttttttt	tttttttttt	tttgagacag	agtctcactc	tgctgcccag
3901	actggaatgc	agtgggtgca	tctcagctca	ctgcaacctc	cgcctcctgg	gttcaagtga
3961	ttctcctgcc	tcagcctccc	gagtagctgg	gattacaggc	acatgccacc	atgctgtggc
4021	aatttttttt	tggttttttt	agagatggag	ttttaccata	ttggccaggc	tggtcttgaa
4081	ctcctgacct	ctgtatccgc	cgccttagc	ctccgaaagt	gctgaggtta	cacgtgtgac
4141	ccaccgcaca	cggccctaatt	aattcttaag	ttgtagaagc	aagttactct	tttgaagtgc
4201	catgtgttag	cttgccctaa	tctattcttg	gtatacaaaa	tagatactgc	tttacagttc
4261	ttatatatttc	tcagagattc	acaaaatcat	cctgtagctc	cctgtgtggg	attatagctg
4321	tgacttttta	ctctacaact	gtcagaatac	accagctcct	ggaattaagc	aagaactata
4381	ttgtgacttg	gttggacagg	taactgcagc	cttgtaacat	gacatcatag	taatgtgag
4441	cttatcttaa	aactagctgg	ggaggaggga	tagtaacagt	gagtcactgt	gggcatctca
4501	cttagggcag	gcagatattc	caaatcacat	tgatttttca	gtttacgtaa	aaattgacca
4561	atcctatggg	tggtgttctg	atcccaacat	aaattttggt	taagttaatt	tgccatggct
4621	ctcaataaag	cagtttggga	atataagggt	attttccacc	agaaaagaga	aaattgagag
4681	agcagcagac	ctcttgctct	cagcaccctt	tacaagctta	acttttgctt	gccaccatta
4741	gcttttgaag	atttttttta	actgtcctct	gcagagcagg	actaccccat	aggcagtggt
4801	cccagagtga	cccgaagagc	tttttgattc	ttcttttaag	agacaaggtc	tcacctctgc
4861	ccccaggct	ggagtgcag	gatgtgatca	cagctcattg	cagcctcgaa	ctcttgggct
4921	ccaacagtc	tctgcctca	gcctcctgaa	tagctaggac	tacatgtgtg	tgctaccatg
4981	ccttgctagt	ttttgttttt	ttaaattgat	ttttatagag	atgaggtctc	ctcatgttgc
5041	ccaggctggt	ttcgaattcc	tgggctcaag	atcctcctgc	ctcaacctcc	caaagtgtct
5101	gtattacaga	gttgagccac	agcaccaccc	aatttttctt	tttctaaagc	tcagtgtaca
5161	ttctggtagg	aaggaatcaa	ccaagtaaat	gttctcccta	caaagttggt	tgaggatttg
5221	aaaagttaat	cttcaattat	ctggatttga	aaccagctta	taacttttta	agctagggaag
5281	aagtcaagaa	taagaagatt	gcaagcaaag	ggaaagctta	caaaatggct	gaatccttaa
5341	agtgtagctc	ctggcttctc	cttggtagga	agcattagac	atgggttccc	tctagggagc
5401	tgggagcttt	tggtgtagtt	caggagagaa	ggcataaata	ctgctgggag	ggagtggata
5461	actctaataa	aaatgttctt	gggctgggca	cgggtggctca	cgcctgtaat	cccaacattt
5521	tcagaggctg	agggtgtcag	atcacgaggt	caagagatcg	agaccatcct	ggccaacatg
5581	gtgaaacctc	atctctacta	aaaatacaaa	aattagctgg	gcgtggtggc	acatgcctgt
5641	agtcccagca	actcgggagg	ctgaggcagg	agaaccgctt	gaaccgggga	ggcggaagtt
5701	gcagtggacc	gacatcacgc	cactgactgc	agtccagcct	ggcgacagag	cgagactccg
5761	tttcaaaaaa	aaaaagtttc	tggacagaac	agattaatga	gccaatgggg	ggctacagag
5821	ctgaaaagggt	ctacgaaagg	ttttgtaaag	tgaaactaat	ttgggttcaa	gaatcaagtt
5881	ggatttgggt	gggggtggac	agatgccaaa	gtgaggaaaa	agcagtgcac	agtcaggaac
5941	taacagcaga	agggttgggt	ttggtacatt	tccctgagaa	tatagactaa	agagaaatta
6001	gggcaggatt	agtcacagta	ctttgtctgac	actcagtagt	attttatcag	catttattca
6061	tcagacccac	attaggcagg	gcaatttttg	agtgaagctaa	attctaatat	ttttaatttt
6121	aattttttatt	tatttttttt	ttggctgttc	aactaaacca	gtcttttgaa	tggtgggggt
6181	tttacagtta	gagtctctgat	gactttttct	tgtttactgt	tgtaaaaaat	cactacctcc
6241	agtggtcaca	gagaatgagt	aagagaactg	gctgtgcata	tcaagatgaa	gtatggtgta
6301	agaaatattt	cagagcatgt	cctttggccc	aagattgagc	catttggaca	cctaagcagg
6361	attggctgaa	tgttatcctt	tctgctgagg	catcagtgga	gatgatcatt	agtgtgtggc
6421	gaaaagtgtt	gtcgaagggt	ctcttctgtt	acacacttcc	aatgcgggac	atagtttgag
6481	tgatagatgg	ctaattcatt	gataatgtac	ttgttgctct	gcagtcctgt	gtactgctgg
6541	ctacctctgg	tctgtgtgcc	agtattgagc	agcattctat	gggagggaat	tagttgctca
6601	taacagtgct	tgcttccaca	tctgtagtct	ttgcgacctt	ctgatatctg	tcaactttaa

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 9】

```

6661 attttctgga agtattttaag tatattcaga ccttctgata tctcttaact tcaaattttc
6721 aacctgctat atagcagcct cttattgcac actgaggatc agcttatttc cttaaagtgc
6781 tctcactttg aatacctccc acctatctgg tgaattttct tatttgcctt tcttttctg
6841 aatgtaccat ttcacaacct ctaactgcct tcttcagttg ctttgcagat ttttctgttc
6901 caggaagctt acggaaggg gtgggaaaa agagaagctg tactctatcc tcaagtactc
6961 aagcagggtt tccagagtgg ctttgtaaaa attttttatt atttatttat ttatttttgg
7021 tgagtggaac ctggcttttc ctcttccctc cccaagcccc accccgcttc ctgacattgc
7081 acatgcctga aagaactagg cttcagataa aagaatgaga acacttgaat gaaaaaggaa
7141 gacttggtcc agagccctcg gtgaatatga aagaagtatt ggcctggact atctcccgc
7201 taattcacag ctgctatctt gtcttcagaa gtgaaacatc ccttaccaat agtgacctaa
7261 cttgtgagga ctgcttgtga tagtatagtt cccaccccca ggacataagt tttccctttc
7321 cagtttaacat gcctaataccc atgctatctt taagagcttg aaaatccttc ctgacctgag
7381 ctaggcctttt attctaaggg actgtgtatg tgaacatccc caccatctat gtttctgtt
7441 ttcaaactcg gtgcccgtttt gagtattttc agatgctcac tgccagtaat ggtttgttag
7501 tagctccaaa ctattagaga agagctcagg agtcagaatt tgaaagatgc ccataggggtg
7561 atttgagatt tggaacaagg ttatcacaat aagttgggat tgggggagtt gacacaacca
7621 gggctctgctt ggggtggcag ctgtttcaga aaccttgggt gaactcttaa agccctgaag
7681 agcttaaaaa atgctctgaa gagatctgag agtcgcagtt aaggactctc aaagaacctc
7741 aaagaaaaagc caacttagcc tttttataca attaactaga tttgggtctt aaattctact
7801 ttgacatata ggcctaagag gtatgtttaac atggccttgt tacccttacc ccttctgttc
7861 tgtgctgttt tctgagaaac ggatgcagga actgattccc tttcttccc tctggaacag
7921 gatataaaga accttccgc ttccctttac ttgtggcctt cctggccagg cttatgtata
7981 ctgaacaaag ctagggtgca gtgcttctga gctagctgtt aggggtccac agccagaagg
8041 aatgggagac cacaggagcc attcaaaaga taattacatg tcagaagaga gtccatccat
8101 ggggttctgt taaagtagac accttcacgt tgggagacat aggtcttgtc tgcctgtctg
8161 gctgaacctc caccatctcc acagagaaca aaatggggag cagctgtacc aggggaggga
8221 tgaacgtctt tcaccaagt tgccagctct ctagttgtct ggaaatgttc aagggaggct
8281 aaggtatctt gtcttatgat gtctcaggaa acagggttg tctcagctg gcagtgaagg
8341 gggactgggt tggtatttag agttgaactt gaggttgcaa tctcaagtc cctctggcc
8401 tcgcagggaat gcaccagggt gatttgggag gatctgagtt tcctttatga agtcagatta
8461 aaaaaaaaaa aagctgatct gatttaaaca gagttgccaa agacttcccc gccaatcac
8521 aaagactgca ttgttcaggt acctgtgtga ctctaagtga gacacaaat cagatgcagc
8581 aacctggtct tgcataagcc ctgggttaga tgtaggtttt ttaaacaaat agggcagtag
8641 ccagaacaga attctttaaa atgggacaga tgtccagaga atggctagt tctcttagca
8701 ctctctcaga agcaaaagca agtctggggt tacaacttcc agtggcctac tttaaataga
8761 cgctgttctg gaaaatgact ttatacttta aacacaaaat ccaaaaaata gaactcagtg
8821 gagtgaacat gacaatgcat gatgggtggc cagtggctgt cccatgtgaa atacttcttg
8881 cctgacatgt atcatctact tgttgactga cctattgagg tgccttcatg acacctttta
8941 cattcatgat aggtctcagg aagacagcag tgtacttggt ggaaactcat gtaaaaagt
9001 ggttgtaggg agctaaacag tgagtacaca tggatatagg atacggaatg gaataataga
9061 cattggagac ttcaaaaggt gggagatgaa agggggatga ggtatgaaat cctacctgtt
9121 gagtacaatg tacactactt acgtgcacag tacactgttt ggggtgagagg cacactaaaa
9181 gcccgacct caccgctacc cagtatgttc atgtaacaca gctgcacttg taccctctaa
9241 atgtatacaa ataactctaa aatagcccg acctcaccgc tacacaatat attcatgtaa
9301 cacagctgca tttgtacccc ctaaattgtat acaaataatc taaaaataaa gtggatatgg
9361 tggctgtcgt gtccaccaac agcgta

```

10

20

30

配列番号 16 : ヒト SKP1 アイソフォーム B (転写バリエーション 2 によってコードされる) アミノ酸配列 (NP_733779.1)

```

1 mpsiklqssd geifevdvei akqsvtiktm ledlgmddeg dddpvplpnv naailkkviq
61 wcthhkddpp ppeddenkek rtdipvwddq eflkvdqgtl felilaanyl dikgllldvtc
121 ktvanmikgk tpeeirkftn ikndfteeek aqvrkengwc eek

```

配列番号 17 : ヒト MYCL 転写バリエーション 1 cDNA 配列 (NM_001033081.3、484~1578 位由来の CDS 領域)

40

【表 2 - 20】

```

1  gagtgcgggc  cgcgctctcg  gggcgcgcca  tgtgcgtgtg  tgctggctgc  cgggctgccc
61  cgagccggcg  gggagccggg  ccgctccagg  tggcgggcgg  ctggagcgag  gtgaggctgc
121  ggggtggccag  ggcacggggc  cgggtcccg  ggtgcgggct  ggctgcaggc  tgccttctgg
181  gcaaggcgcg  ccccgccggc  gcccgcggc  gcctggggag  ctgcgctccg  ggcggcgctg
241  gcaaggtttg  ctttgaactc  gctgcccaca  gtcgggtccg  cgcgctgcga  ttgcttccc
301  ctaccactct  gaccgggggc  ccggcttccc  gggacgcgag  gactgggccc  aggctgcaag
361  ctggtggggg  tggggaggaa  cgagagcccg  gcagccgact  gtgcgaggag  acccggggac
421  acctccttcg  cccggccggc  acccggtcag  cagtccccc  cttccctccc  gcagggagcg
481  gacatggact  acgactcgta  ccagcactat  ttctacgact  atgactgcgg  ggaggatttc
541  taccgctcca  cggcgcccg  cgaggacatc  tggaaagaa  tcgagctggg  gccatcgccc
601  ccacgctcgc  cgccttgggg  cttgggtccc  ggcgcagggg  acccgcccc  cgggattggg
661  ccccgggagc  cgtggccggc  aggggtgcac  ggagacgaag  cggaaatccc  gggccactcg
721  aaaggctggg  cagggaacta  gcctccatc  atacgcgctg  actgcatgtg  ggcggcttc
781  tcggcccggg  aacggctgga  gagagctgtg  agcgaccggc  tcgctcctgg  cgcgccccgg
841  gggaaaccgc  ccaaggcgct  cgcgcgcccg  gactgcactc  ccagcctcga  agccggcaac
901  ccggcgcccg  ccgccccctg  tccgctgggc  gaaccaaga  cccaggcctg  ctccgggtcc
961  gacatggact  cagactcgta  gaatgaagaa  attgatgttg  tgacagtaga  gaagaggcag
1021  tctctgggta  ttcggaagcc  ggtcaccatc  acggtgcgag  cagacccccc  ggatccctgc
1081  atgaagcatt  tccacatctc  catccatcag  caacagcaca  actatgctgc  ccgttttctc
1141  ccagaaagct  gctcccaaga  agaggcttca  gagaagggtc  cccaagaaga  ggttctggag
1201  aaaggctggg  cagggaacta  ggaagatgag  gaggatgaag  agattgtgag  tccccacatc
1261  gtgaaagtgc  aggtgcccc  gtctgccac  cccaaacctg  tcagtctctga  tactgaggat
1321  gtgaccaaga  ggaagaatca  caacttccct  gagcgcaaga  ggcggaatga  cctgcgttcg
1381  cgattcttgg  cgtgaggga  ccagggtccc  accctggcca  gctgctccaa  gggcccaaaa
1441  gtatggatcc  taagcaaat  cttggaatac  ttgcaagccc  tgggtggggc  tgagaagagg
1501  atggctacag  agaaaagaca  gctccgatgc  cggcagcagc  agttgcagaa  aagaattgca
1561  taactcactg  gctactaact  gacccaaaag  cctgacagtt  ctgtcttacg  aagacacaag
1621  tttatttttt  aacctccctc  tcccctttag  taatttgac  attttggtta  tggtgggaca
1681  gtctggacag  tagatcccag  aatgcattgc  agccggtgca  cacacaataa  agccttgcat
1741  tcttggaac  cttgaaaccc  agctctccct  cttccctgac  tcatgggagt  gctgtatgtt
1801  ctctggcgcc  tttggttccc  cagcaggcag  ctgactgagg  agccttgggg  tctgcctagc
1861  tcactagctc  tgaagaaaag  gctgacagat  gctatgcaac  aggtggtgga  tgttgtcagg
1921  gctccagcc  tgcattgaa  ctcacactct  gcattgagct  taggttagga  aagatgctc
1981  ccaactggtg  tctctgggg  gatgcaagga  cagctgggccc  tggatgctct  cctgaggct
2041  cttttttcca  gaagacacac  gagctgtctt  ggggtgaagac  aagcttgca  acttgatcaa
2101  cattgacat  tacctcactg  tcagacactt  tacagtagcc  aaggagtgg  aaacctttat
2161  atattatgat  ttagctgac  ccccttccct  ccactcccaa  tgctgcgacc  ctgggaacac
2221  ttaaaaagct  tggcctctag  attctttgtc  tcagagccct  ctgggctctc  tccctgagg
2281  gagggacctt  tctttctcca  caagggactt  tttgttccca  ttatgccttg  ttatgcaatg
2341  ggtctacag  caccctttcc  cacaggtcag  aaatatttcc  ccaagacaca  gggaaatcgg
2401  tcttccagcc  gggcctggg  atagcttgg  gtcctggccc  atgaacttga  tccctgccc
2461  ggtgttttcc  gaggggcact  tgaggcccg  tcttttctca  aggcagggtg  aagacacctc
2521  agaggagaa  ctgtactgct  gcctctttcc  caccctgcctc  atctcaatcc  ttgagcgcca
2581  agtttgaagt  tcttctgaa  ccatgcaaat  ctgtcctcct  catgcaatc  caaggagctt
2641  gctggctctg  cagccacct  tgggcccctt  ccagcctgcc  atgaatcaga  tatcttccc
2701  agaactctgg  cgtttctgaa  gttttgggga  gagctgttgg  gactcatcca  gtgctccaga
2761  aggtggactt  gcttctggtg  ggtttttaaag  gagcctccag  gagatatgct  tagccaacca
2821  tgatggattt  taccacagct  ggactcggca  gctccaagt  gaatccacgt  gcagcttcta
2881  gtctgggaaa  gtcacccaac  ctacagttg  tcatgtgggt  aacctcaggc  acctctaagc
2941  ctgtcctgga  agaaggacca  gcagccctc  cagaactctg  cccaggacag  cagggtgctg
3001  ctggctctgg  gtttggaagt  tgggggtggg  aggggtgggt  aagtactata  tatggctctg
3061  gaaaaccagc  tgetacttcc  aaatctattg  tccataatgg  tttcttctg  aggttgcttc
3121  ttggcctcag  aggaccccag  gggatgtttg  gaaatagcct  ctctaccctt  ctggagcatg
3181  gtttacaaaa  gccagctgac  ttctggaatt  gtctatggag  gacagtttgg  gtgtaggtta
3241  ctgatgtctc  aactgaatag  cttgtgtttt  ataagctgct  gttggctatt  atgctggggg
3301  agtctttttt  ttttatattg  ttttttggta  tgccttttgc  aaagtgggtg  taactgtttt
3361  tgtacaagga  aaaaaactct  tggggcaatt  tcctgttgca  aggtctgat  ttattttgaa
3421  aggcaagtcc  acctgaaatt  ttgtatttag  ttgtgattac  tgattgcctg  attttaaaat
3481  gttgcctctc  gggacatctt  ctaataaaaag  atttctcaaa  ca

```

10

20

30

配列番号 18 : ヒトMYCL (転写バリエント 1 によってコードされる) アミノ酸配列
(NP_001028253.1)

40

50

【表 2 - 2 1】

```

1 mdydsyqhyf ydydcgedfy rstapsediw kkfelvpspp tsppwglpgg agdpapgigp
61 pepwpggctg deaesrghsk gwgrnyasii rrdcmwsgfs arerleravs drlapgaprg
121 nppkasaapd ctpsleagnp apaapcplge pktqacsgse spsdseneei dvvtvekrqs
181 lgirkpvtit vradpldpcm khfhisihiqq qhnyaarfpf escsqeease rgpqeevler
241 daagekedee deeiivspvpv eseeaaqschp kpvsdsdtedv tkrknhnfle rkrndlrslr
301 flalrdqvpt lascskapkv vilskaleyl qalvgaekrm atekrqlrcr qqqlqkriay
361 ltgy

```

配列番号 19 : B C O R 1 転写バリエーション 5 cDNA配列 (NM_00112338)

5. 2、785～6052位由来のCDS領域)

```

1 agacggagcc tgggctccca gcggcaaggt gaggcagagc tgcgctcctc gctgaacgcg
61 ggccgagctc ggccgctgcg ggggagacgc gcaggagccc agaccgagc cgagagcggg
121 agctaggcgg gcggcgcgcg cggaggggga gcccgcgagc cgccggggcg agagcccaag
181 ccgcgctgtc gccgcgcagg gacgacttgg ccaacactca cacacactca cacacacca
241 gcccgagcgg gcgctcgcg cgaaccgtca acatggcgct ggggctcctg ccgcagcggc
301 ggccggcgcg gcagcgcgcg agctgctgag ctgcgccaa cccagtcag ctgcgggagc
361 ccggaggatc gcacggggct gtgcgccact gcccgaggcg cccgagcccg ccccgcccg
421 cccccaccg gccagagcc caccctcgcg cggggccgac cccgagggca gccggctgcc
481 acgagcggc gagggagtc agtgagcgcg gcgcccgcag cgggctcgcg gcagccgggg
541 accgcaaaact ttgctgctcg ccgcgcttct ccggcccggc tccttctcgg ctggttaaag
601 tcgccaaacc cccccaccg tcatatctct ctccaccac ccaaccgccc ccgctcctt
661 ctgcgcgctc cgagtcgctg tgggggaaaa cttcaaagag ccgagtcgca ggctccctgc
721 ctactccccc accggggatt tcagactaga cgcttgaagc aaagctgcca tcccagaaga
781 cgacatgtct tcagcaaccc cctgtatgg gaacgttcac agctggatga acagcgagag
841 ggtccgcatg tgtggggcga gcgaagacag gaaaaacctt gtaaatgatg gtgacgcttc
901 aaaagccaga ttggaactga gggaagagaa tccctgaac cacaacgtgg tggatgcgag
961 cagggcccat aggatcgatg gcctggcagc actgagcatg gaccgcaact gcctgatccg
1021 ggaagggctg cgggtcccg gaaacatcgt ctattctagc ttgtgtggac tgggctcaga
1081 gaaaggtcgg gaggctgcca caagcactct aggtggcctt ggggtttctt cggaaagaaa
1141 tccagagatc cagttcaaac cgaatacacc cgagacagtg gaggttctg ccgtctctgg
1201 aaaaaccccc aatggcttca gtgctatata caaaacacgg cctggaatac aaaaaagtg
1261 ttagaccaca gcagaagcgc tgggcttgga caggcctgcc agcgacaaac agagccctct
1321 caacatcaat ggtgctagtt atctgcggct gccctgggtc aatccttaca tggaggggtg
1381 acgcgcagcc atctaccctt tctcgactc gccaaataag tattcaactg acatgtacaa
1441 ggcccttgct cctcagcag cctacagctt ggcccagcgg ctgtattctc cagtctgcac
1501 caatggggag cgctttctct acctgcggcc acctcactac gtccgtcccc acatcccatc
1561 gtcccttgga tcacccatga ggctctcgac acctcgggc tcccagcca tcccgcctct
1621 tagccatgca gcagacaaaa gcctcccggt gaagatgggc gtcagccctg ggaatcctgt
1681 tgattccca ccttatccct acatccagaa cagtaagcag cccaggggtc cctctgcaa
1741 ggccgtcacc agtggcctgc cgggggacac agctctcctg ttgccccctt cgctcgggc
1801 gtacccccga gtccaccttc ccaccagcc tgcctcagac acctactcgg agttccacaa
1861 gcaactagcc aggatctcca cctctccttc agttgcctg tcaaagccat acatgacagt
1921 tagcagcgag ttcccccgcg ccaggtcttc caatggcaag tatcccaagg ctccggaagg
1981 gggcgaaagt gccagccag tgcccgggca tgcccggaa acagcgggtt aagacagaaa
2041 agatggcagc tcacctcctc tgttgagaa gcagaccgtt accaaagacg tcacagataa
2101 gccactagac ttgtcttcta aagtgttgga ttagatgct tcaaagctg accacatgaa
2161 aaagatggct cccacggctc tgggtcacag cagggttgga agtggcttag tgcctccgg
2221 aagttagatt ccgaaagaaa cactatctcc tccaggaaat ggttgtgcta tctatagatc
2281 tgaatcatc agcactgctc cctcatcctg ggtgtgtccc gggccaagt ctaacgaaga
2341 gaacaatggc aaaagcatgt cgctgaaaaa caaggcattg gactgggcga taccacagca
2401 gcggagttca tcatgcccgc gcctggcgcg caccgatgct gtcatacta acgtttcagg
2461 gtcagtgtcg agtgagggc gccagcctc cgcacacccc gccccaatg ccaatgcaga
2521 tggcaccaaa accagcagga gctctgtaga aaccacacca tccgttattc agcagtgagg
2581 ccagcccccg gccactcctg ccaagcacag tagcagcacc agcagcaagg gcgcaaaagc
2641 cagcaaccca gaaccaggtt tcaaagcaaa cgagaacggc cttccaccaa gctctatatt
2701 tctgtctcca aatgaggcat tcaggctccc accaattccc taccacagga gttacctccc
2761 ttaccacgac cctgagggca ttgctgtaag tccctctctc ttacatggca aaggacctgt
2821 ctaccctcag ccagttttgt taccacatgg cagtctgttt cctggggacc ttgccccaaa
2881 ccctggggctg ccctatgggc ttcccacggg ccgtccagag tttgtgacct accaagatgc
2941 cctgggggttg ggcatgtgtc atcccaggtt gataccacac acgcccatag agattactaa
3001 agaggagaaa ccagagagga gatcccggtc ccatgagaga gcccggttac aggacccaac
3061 cctccggaat cggttttccg agattttgga aactagcagc accaagttac atccagatgt

```

10

20

30

40

【表 2 - 2 2】

3121	ccccaccgac	aagaacctaa	agccgaaccc	caactggaat	caaggggaaga	ctgttgtcaa
3181	aagcgacaag	cttgtctacg	tagaccttct	ccgagaagaa	ccagatgcta	aaactgacac
3241	aaacgtgtcc	aaacccagct	ttgcagcaga	gagtgttggc	cagagcgctg	agcccccaa
3301	gcctcagtt	gagccggccc	tgcagcagca	ccgtgatttc	atcgccctga	gagaggagtt
3361	ggggcgcatc	agtgaacttc	acgaaactta	tactttcaaa	cagccagtct	tcaccgtaag
3421	caaggacagt	gttctggcag	gtaccaacaa	agagaaccta	gggttgccag	tctcgactcc
3481	attcctggag	ccacctctgg	ggagcgatgg	ccctgctgta	acttttggtg	aaacccaaga
3541	ggatcccaaa	ccattttgtg	tgggcagtgc	cccaccaagt	gtggatgtga	ccccacccta
3601	taccaaagat	ggagctgatg	aggctgaatc	aaatgatggc	aaagtcttga	aaccgaagcc
3661	atctaagctg	gcaaagagaa	tcgccaactc	agcgggttac	gtgggtgacc	gattcaaatg
3721	tgtcactacc	gaactgtatg	cagattccag	tcagctcagc	cgggagcaac	gggcatttga
3781	gatggaagga	ttacaagagg	acagtatttt	atgtctaccc	gctgcttact	gtgagcgtgc
3841	aatgatgcgc	ttctcagagt	tggagatgaa	agaaagagaa	ggtggccacc	cagcaaccaa
3901	agactccgag	atgtgcaaat	tcagcccagc	cgactgggaa	aggttgaaag	gaaatcagga
3961	caaaaagcca	aagtcggtca	ccctggagga	ggccatttga	gaacagaacg	aaagtggagag
4021	atgcgagtat	agtgttgga	acaagcaccg	tgatcccttt	gaagccccag	aggacaaaga
4081	tcttcctgtg	gagaagtact	ttgtggagag	gcagcctgtg	agcgagcctc	ccgcagacca
4141	ggtggcctcg	gacatgcctc	acagcccac	cctccgggtg	gacaggaaac	gcaaagtctc
4201	aggtgacagc	agccacactg	agccactgc	ggaggaggtg	ccagaggacc	ctctgctgaa
4261	agccaaacgc	cgacgagtct	ctaaagatga	ctggcctgag	agggaaatga	caaacagttc
4321	ctctaaccac	ttagaagacc	cacattatag	tgagctgacc	aacctgaagg	tgtgcattga
4381	attaacaggg	ctccatccta	aaaaacaacg	ccacttgctg	caccttagag	aacgatggga
4441	gcagcaggtg	tcggcagcag	atggcaaac	tggccggcaa	agcagggaag	aagtgaacca
4501	ggccactcag	cctgaggcca	ttcctcaggg	gactaacatc	actgaagaga	aacctggcag
4561	gaaaaggcca	gaggccaaag	gcaacagaag	ctggtcggaa	gagtctctta	aacctcagtg
4621	caatgaacaa	ggcttgctcg	tgttctccgg	ctctccgccc	atgaagagtc	tttcatccac
4681	cagtgcaggc	ggcaaaaagc	aggctcagcc	aagctgcgca	ccagcctcca	ggccgcctgc
4741	caaacagcag	aaaattaaag	aaaaccagaa	gacagatgtg	ctgtgtgcag	acgaagaaga
4801	ggattgccag	gctgcctccc	tgctgcagaa	atacaccgac	aacagcgaga	agccatccgg
4861	gaagagactg	tgcaaaacca	aacacttgat	ccctcaggag	tccaggcggg	gattgccact
4921	gacaggggaa	tactacgtgg	agaatgccga	tggcaagggtg	actgtccgga	gattcagaaa
4981	cgggccggag	ccagtttcgg	actatgatct	gtcaccagcc	aagcaggagc	caaagccctt
5041	cgaccgcttg	cagcaactgc	taccagcctc	ccagtccaca	cagctgccat	gctcaagttc
5101	ccctcaggag	accacccagt	ctcgccctat	gccgcgggaa	gcacggagac	ttattgtcaa
5161	taagaacgct	ggcgagaccc	ttctgcagcg	ggcagccagg	cttggctatg	aggaagtggg
5221	cctgtactgc	ttagagaaca	agattttgtg	tgtaaatcat	cgggacaacg	caggttactg
5281	cgccctgcat	gaagcttgtg	ctaggggctg	gctcaacatt	gtgcgacacc	tccttgaata
5341	tggcgctgat	gtcaactgta	gtgcccagga	tggaaaccagg	cctctgcacg	atgctgttga
5401	gaacgatcac	ttggaaattg	tccgactact	tctctcttat	ggtgtgaccc	ccaccttggc
5461	tacgtactca	ggtagaacca	tcattgaaat	gacccacagt	gaacttatgg	aaaagttctt
5521	aacagattat	ttaaatgacc	tccagggtcg	caatgatgat	gacgccagtg	gcacttggga
5581	cttctatggc	agctctgttt	gtgaaccaga	tgatgaaagt	ggctatgatg	tttagccaa
5641	ccccccagga	ccagaagacc	aggatgatga	tgacgatgcc	tatagcgatg	tgtttgaatt
5701	taacttttca	gagaccccc	tcttaccgtg	ttataacatc	caagtatctg	tggtccaggg
5761	gccacgaaac	tggtactctg	tttcggatgt	ccttaagaaa	ttgaaaatgt	cctcccgcac
5821	atttcgctgc	aattttccaa	acgtggaaat	tgtcaccatt	gcagaggcag	aattttatcg
5881	gcagggttct	gcaagtctct	tgttctcttg	ctccaaagac	ctggaagcct	tcaaccttga
5941	aagtaaggag	ctgttagatc	tgggtggaatt	cacgaacgaa	attcagactc	tgctgggctc
6001	ctctgtagag	tggctccacc	ccagtgatct	ggcctcagac	aactactggg	gagcaagctg
6061	gacccaccat	gtacagtgtg	ttatagtgtt	aatccttgtg	catatgtgtc	ataatacaac
6121	tatttctgtg	aagaaaggac	actattacat	atgaaaatat	ctcttcttta	tataagagaa
6181	attactccag	tcagaaggac	ttagaaacat	gtttttttcc	ttttaaacct	ttaggtcagt
6241	ttttatgaag	ttgttataat	gtttctttac	ttttcaatgc	acacatgctt	tgggatacgt
6301	ttgtttttac	ttggaacatt	tgtttctttt	cttttttaag	gagaaaaaaa	aatgagtaaa
6361	aggagctcca	cactttgact	taatttcata	caaagctctg	atgacaggcc	atgactgtag
6421	agtgttcaga	actgtgtggt	tggtttgagg	gagcgaattc	ggggaaggca	cttgggtgat
6481	taacttttgt	ttgtttacag	agtacctgct	cgggccaggt	aaatgctatt	ggatgtaac
6541	cagtagtgtg	taatataaat	tcaaaccata	tccacacaca	acaactaatt	gtatgaaact
6601	tttatatcct	aattttaaag	ctgtgaaatt	agttttcacg	catcaaaccg	gattgtttat
6661	atgttttaac	attttatgct	cttattttaa	gaagactttg	agctattttt	ttctgtaccc
6721	tgtaaaatat	tgaaaactaa	cataatatgt	tgagggttgc	tggaaatgta	cataaaacta

10

20

30

40

50

【表 2-23】

6781 aaatttttctg aatcgtgtgt ttagtgttga aatctgtgtt ttaactttgt aagtaaattc
 6841 tctgcctttg tatttatatt ttacaaaaat tttcttaaaa ggcaataaaa ctgttgagga
 6901 aaggagaaaa

配列番号 20 : ヒト BCOR アイソフォーム c (転写バリエント 5 によってコードされ
 る) アミノ酸配列 (NP_001116857.1)

1 mlsatplygn vhswnserv rmcgasedrk ilvndgdask arlelreenp lnhnvvdast
 61 ahridglaal smdrtglire glrvpgnivy sslcglgsek greaatstlg glgfssernp
 121 emqfknptpe tveasavsgk ppngfsaiyk tppgiqksav ataealgidr pasdkqspn
 181 ingasyrlrp wvnpy megat paiypfldsp nkyslnmyka llpqgsysla qplyspvctn
 241 gerflylppp hyvgphipss laspmrlstp saspaipplv hcadkslpwk mgvsgpnvd
 301 shayphiqns kqprvpsaka vtsglpgdta lllppsprps prvhlptqpa adtysefhkh
 361 yaristspsv alskpymtvs sefpaarlsl gkypkapegg egaqvpvgha rktavqdrkd
 421 gssppllekq tvtkdvt dkp ldlsskvvdv daskadhmkk maptvlvhsr agsglvls
 481 eipketlspg gngcaiyre iistapsswv vpgpspneen ngksmslknk aldwaipqqr
 541 ssscprrmgt davitnvs gs vssagrpasa spapnanadg tktsrsvet tpsviahvgg
 601 ppatpakhs stsskgakas npepsfkane nglppssifl spneafsrpp ipyprsyly
 661 papegiavsp lslhgkpvpy phpvllpngs lfpghlapkp glpyglptgr pefvtyqdal
 721 glgmvhpmli phtpieitke ekperrsrsh eraryedptl rnrfseliet sstklhpdvp
 781 tdknlkpnpn wnqgktvvs dklvyvdllr eepdakt dtn vskpsfaaes vgqsaepkp
 841 svepalqghr dfialreelg risdfhetyt fkqpvtvsk dsvlagtnke nlglpvstpf
 901 lepllgdgp avtfgktqed pkpfcvgsap psdvdtptyt kdgadeaesn dgkvlkpks
 961 klakriansa gyvgdrfkcv ttelyadssq lsregralqm eglqedsilc lpaayceram
 1021 mrfselemke regghpatkd semckfspd werlkgnqdk kpksvtlea iaeqneserc
 1081 eysvgnkhrd pfeapedkdl pvekyfverq pvseppadqv asdmphsptl rvdrrkrvsg
 1141 dsshtettae evpedplla krrrvskddw peremtnsss nhledphyse ltnlkvcie
 1201 tglhpkkqhr llhlrerweq qvsaaadgkpg rqsrkevtqa tqpeaipqgt niteekpgrk
 1261 raeakgnrsw seeslkpsdn eqglpvfsgs ppmkslssts aggkkaqps capasrpak
 1321 qqkikenqkt dvlcadeeed cqaasllqky tdnsekspgk rlcktkhlip qesrrglpt
 1381 geyyvenadg kvtrrrfrkr pepssdydls pakqepkpf d rlqllpasq stqlpcsssp
 1441 qettqsrpmp pearrlivnk nagetllqra arlgyeevvl yclenkiadv nhrdnagyc
 1501 lheacargwl nivrhll eyg advncsaqdg trplhdaven dhleivrlll sygadptlat
 1561 ysgrtimkmt hselmekflt dylnldqgrn dddasgtwdf ygssvcepd esgydvlanp
 1621 pggpedqddd daysdvfefe fsetpllpcy niqvsvaqgp rnwlillsdv kklkmssrif
 1681 rcnfpnveiv tiaaeafyrq vsasllfscs kdleafnpes kelldlveft neiqtllgss
 1741 vewlhpsdla sdnyw

10

20

配列番号 21 : ヒト YY1 関連因子 2 (YAF2) 転写バリエント 2 cDNA 配列 (N
 M_005748.6、69~611 位由来の CDS 領域)

30

【表 2-24】

1 attatcctcc ttattgacaa acagagcggg cgcggcggcg actctcggcg tgcggtgata
 61 gccaaagccat gggagacaag aagagcccca ccaggccgaa gggcagccg aagccgtcct
 121 cggatgaggg ttactgggac ttagcgtct gcaccttccg gaacagcgcc gaggccttca
 181 agtgcgatgat gtgcgatgtg cggaagggca cctccaccg gaaacctga cctgtctccc
 241 agttggttg acagcaggtt actcagcagt ttgtgcctcc tacacagtca aagaaagaga
 301 aaaaagataa agtagaaaaa gaaaaaagt gaaaagaaac aactagcaaa aagaatagcc
 361 ataagaaaac caggccaaga ttgaaaaatg tggatcggag tagtgctcag ctttggaag
 421 ttactgttg agatctgaca gtcattatta cagactttaa ggagaaaaca aagtcaccgc
 481 ctgcatctag tgctgcttct gcagatcaac acagtcaaag cggctctagc tctgataaca
 541 cagagagagg aatgtccagg tcatcttcac ccagaggaga agcctcatca ttgaatggag
 601 aatctcatta aagtttattt tctccaattt cttagtcact tctgtcctac catgcaaata
 661 cacagattat gccaaagagg accacatttt catgacagat acattcatgc acaatccata
 721 atttgagttt tacataaaat agaaatttgt tagaatttgt tagattttat tgcaatgatg
 781 cctaccaaac atttcagac ttaacatttt ggtctctgca gtttaagtgc atgaaatgt
 841 ggttgaatta ttcattatgc agtggtattg gtaagtgtat tttcactttt agtttagtga
 901 attctaacac ataattcttg aattctctac tattggcatg taacgaattt aaatttttta
 961 taacatagtg caagctgcct aaatatgtat tatttgagaa ttgtgaaaca gatagttata
 1021 tgtatacaag tcaaagaaca acttaactat tgctgcaaca ggtttttctt aatggttatc
 1081 ctcttaataa cacctgctgg tacttggtgt ggttaaatag gaaaattgtt attaaataaa
 1141 gaatttgtat gaacctttgc caatgttttt gacacgtttt actaattatt gttcctgaat
 1201 tatgtttctg gttttatcta ttttttgagg tttttttgtt tgcttatttt tcaaaacatt

40

50

【表 2 - 2 5】

```

1261 cattttattgt aatgtttact agcggactag taaacaataa aacattgatt atttagcttt
1321 ataattcagg ttttagtgcta ttgtcattga acactgggat tttctgtatc atataaaaca
1381 ttaaaattca aataattata agcatttggc aaaaacaaga gaaaagaaac ttgccatatt
1441 ttacaagctg caatttttaga aaagctttaa cttaatgata gttttatcat tgttttcttg
1501 tcccaaacct atccagggcc atagaagtat gaatctaatt aaaacagaaa tgggaattat
1561 tgcacagaaa tgggaaataa ctaattttta atcagtcaaa ttggcttctt attaaatata
1621 ataattctta tgaaaatcat agtaccctat tttcagacac agctgccagt ttacacattt
1681 ctacagtatc tgaaaggaaa aaagtatagc cccacttata ctatgtaaaa ttaccaataa
1741 aatattttta tgactacaga ttttgcattt ttgtttacaa ctatttaaag agttttatgt
1801 tgtattttaga atttcaacct agaaaccaca cagtacttaa attctcctgg ggtctcctgc
1861 tttctcttaa ccattttgctt aatatatatc tacctaagg agacttctga attgtaaaatg
1921 aacttaaaaa tagaatgtgg atgcaaaata tcacataaga catcatgata acatttgaag
1981 aaaaaataaa actgtagacc ctaacagttg tgatatttgg tggtttcatg tggtaagtga
2041 attttctggt taattacagt actttttaca ggcacagtgg tactgtcttt tttgtaagat
2101 gctagtgttg aaatacaatt aattgcatac agtaaaagtc tgtgattaaa acatttatat
2161 acctcattct ttagtggtgt taaatgaaaa attaaaattt gtgtttatta taagatactt
2221 tcaattgga accagctaac cagatattgt cctttaaaac atgaattttt ttgtcttatt
2281 ctgtttttta catgtttcaa atgttttata cttttttgga gatagtaaaa atttataaat
2341 gtaataggga aaatatttta tttttaagtc aaaaactatg ctttaaagga attacatctt
2401 atgatcaaat aactttcagg atgtatttta aatgagctgc aagagagaaa aatctgacag
2461 gagatgggat tttacctgaa tggagcatac tcatatttct acataggtgg gaagatactc
2521 atctttctac atagacggga acacggtgta gcatggagat taagcgtgct aactgacacc
2581 tcatgtttga atcctgttgt agaattgaaa tgagcttaaa ttaccaagc ttactttcca
2641 tctataaaac agggctaata atggtaatca catctaattt atagggtttt tgggaggatt
2701 aagtcfaatc gtgtaaaatt cttaattatc tgacacatac tgggtactca gtaaatgtga
2761 gctttttacca ttgttatagg taaaatccca ttacaaaaat acaaaaaatat tttttgtaac
2821 agttattttc ctgccctctt ggatgacctt aagtaatagt gttttataga tttcactaaa
2881 ttttcagtgt aatatcagat gttttctctg gatgcagaaa gacctcttt ccataattaa
2941 agaacctggg ggggtgtgcac tatgagattg gagaaatgaa ttaagttgac ttgaaattat
3001 tttactttta ttaatcacag gtatctcaac ctgctttgtt ttcacctac ttcaagtaca
3061 cttccacacc tgaataaacag acccaaatct cataaacaga actgacgtta aaatatgcga
3121 aagattcaga acctagggtt aggggtacatg tttttctctg tttcatgaac ttacagtgtg
3181 gtttgagcac tgggttcttt tagccaaatt ccatacaaaa agaatttgga tgttttccag
3241 cattttattc cttactttgc tataagtaag agtgaagata ggccgggtgt gatggctcat
3301 gccagtaatc ccagcacttt gggctgaagc aggcagatat tttgagccca ggaccagcct
3361 gggcaacatg gtgaaagctc atctctatga aaaaatttga atatacatat atatatatat
3421 gtatatttta aaagtgaata taatttgagg cacagaagaa tattcttaaa accttttgta
3481 ttatacaata gaaataaagg ttttattttt attaaatgct ttctaaaaat gatagtggat
3541 aatagacaaa gtgaaaacat ttaaaaagga agagaaactt cagcctttct aagttgatag
3601 catgtttatt aacttttaga taaagatcct tatagactga aagaatgtag cctctgcatt
3661 aatggtaaat ggtctagaag ttttcgtttc cactgaggct tccgccactc gcttttttaa
3721 acttctctgt atgggttgga tatgggttgt cctcaccaaa actcatgctg aggcctgagt
3781 cccagtttg attgtgttg taggtgggtg ctttaagagg tgattaggtc attgagatgg
3841 attaaaggtt ttctcatgag gctcagttag ttctggaatg gattcgtctc tgcaggaatg
3901 gatgaattct cacaagagt gggtgttatg aagtgaggat gcttcttggt tctgttctc
3961 tttgccctcc tcagttcacc atctgctttc caccatgagt tgaagcagca tgaggccctc
4021 atcagatggg ctccctgatc ttggactcct cagcctttg actcataagc caaaataaat
4081 ctgttttctt tataaa

```

10

20

30

40

50

配列番号 22 : ヒト Y Y 1 関連因子 2 アイソフォーム 2 (転写バリエーション 2 によってコードされる) アミノ酸配列 (NP_005739.2)

```

1 mgdkkspttrp krqpkpssde gywcdsvctf rnsaeafkcm mcdvrkgtst rkprpvsqvlv
61 aqqvtqqfvp ptqskkekdd kvekekseke tsksknshkk trprlknvdr ssaghlvltv
121 gdlitviitdf kektskspas saasadqhsq sgsssdnter gmsrsssprg easslngesh

```

* RNA 核酸分子 (例えば、チミンがウリジンで置き換えられたもの)、コードされたタンパク質のオルソログをコードする核酸分子、並びに本明細書に記載の表 5、及び表 1 ~ 4 に列挙されるいずれかの配列番号の核酸配列又はその一部と全長にわたって少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、又はそれ以上の同一性を有する核酸配列を含む DNA 又は RNA 核酸配列が、本明細書に記載の表 5、及び表 1 ~ 4 に含まれる。かかる核酸分子は、本明細書に更に記載される全長核酸の機能を有し得る。

* 例えば、ヒト、マウス、サル等におけるタンパク質のオルソログ、並びに本明細書に記

載の表 5、及び表 1～4 に列挙されるいずれかの配列番号のアミノ酸配列又はその一部と全長にわたって少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、又はそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド分子が、本明細書に記載の表 5、及び表 1～4 に含まれる。かかるポリペプチドは、本明細書に更に記載される全長ポリペプチドの機能を有し得る。

【0190】

II. 対象

一実施形態では、表 1～5 に列挙される 1 つ以上のバイオマーカーの阻害剤及び免疫療法併用治療の有効性の予測可能性が決定される対象は、哺乳動物（例えば、マウス、ラット、霊長類、非ヒト哺乳動物、家畜、例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ等）であり、好ましくはヒトである。別の実施形態では、対象は、がんの動物モデルである。例えば、動物モデルは、ヒト由来のがんの同所性異種移植片動物モデルであり得る。

10

【0191】

本発明の方法の別の実施形態では、対象は、化学療法、放射線療法、標的療法、及び／又は免疫療法などの治療を受けていない。なお別の実施形態では、対象は、化学療法、放射線療法、標的療法、及び／又は免疫療法などの治療を受けている。

【0192】

ある特定の実施形態では、対象は、がん性又は前がん性組織を取り除くための手術を受けている。他の実施形態では、がん性組織は取り除かれておらず、例えば、がん性組織は、生命に不可欠な組織又は外科的手技が患者に危害を及ぼすかなりの危険性を引き起こすであろう領域等の身体の手術不能な領域に位置し得る。本発明の方法を使用して、表 1～5 に列挙される 1 つ以上のバイオマーカーの阻害剤に対する応答性を決定することができ、本明細書に記載のものなどの対象における多くの異なるがんの免疫療法併用治療を決定することができる。

20

【0193】

III. 試料の収集、調製、及び分離

いくつかの実施形態では、対象由来の試料中のバイオマーカー量及び／又は活性測定値が、所定の対照（基準）試料と比較される。対象由来の試料は、典型的には、がん細胞又は組織等の罹患組織由来である。対照試料は、同じ対象又は異なる対象由来であり得る。対照試料は、典型的には、罹患していない正常試料である。しかしながら、いくつかの実施形態では、疾患の病期分類又は治療の有効性の評価等のために、対照試料は罹患組織由来であり得る。対照試料は、いくつかの異なる対象由来の試料の組み合わせであり得る。

30

【0194】

いくつかの実施形態では、対象由来のバイオマーカー量及び／又は活性測定値が所定のレベルと比較される。この所定のレベルは、典型的には、正常試料から得られる。本明細書に記載される場合、「所定の」バイオマーカー量及び／又は活性測定値は、ほんの一例として、治療に選択され得る対象を評価する（例えば、ゲノム変異の数及び／又は DNA 修復遺伝子の非機能性タンパク質を引き起こすゲノム変異の数に基づいて）、表 1～5 に列挙される 1 つ以上のバイオマーカーの阻害剤に対する応答を評価し、かつ／又は表 1～5 に列挙される 1 つ以上のバイオマーカーの阻害剤及び 1 つ以上の追加の抗がん療法を伴う免疫療法併用治療に対する応答を評価するために使用されるバイオマーカー量及び／又は活性測定値であり得る。所定のバイオマーカー量及び／又は活性測定値は、がんを有する患者集団又はがんを有しない患者集団において決定され得る。所定のバイオマーカー量及び／又は活性測定値は、あらゆる患者に平等に適用可能な単数であり得るか、又は所定のバイオマーカー量及び／又は活性測定値は、特定の患者亜集団により異なり得る。対象の年齢、体重、身長、及び他の因子は、その個体の所定のバイオマーカー量及び／又は活性測定値に影響を及ぼし得る。更に、所定のバイオマーカー量及び／又は活性は、対象毎に個別に決定され得る。

40

【0195】

50

一実施形態では、本明細書に記載の方法で決定及び／又は比較される量は、絶対測定値に基づいている。別の実施形態では、本明細書に記載の方法で決定及び／又は比較される量は、比率等の相対的測定（例えば、治療前対治療後のバイオマーカーコピー数、レベル、及び／又は活性、スパイク又は人工対照に対するかかるバイオマーカー測定値、ハウスキーピング遺伝子の発現に対するかかるバイオマーカー測定値等）に基づいている。例えば、相対的分析は、治療後バイオマーカー測定と比較した治療前バイオマーカー測定の比率に基づき得る。治療前バイオマーカー測定は、抗がん療法開始前の任意の時点で行われ得る。治療後バイオマーカー測定は、抗がん療法開始後の任意の時点で行われ得る。いくつかの実施形態では、治療後バイオマーカー測定は、抗がん療法開始の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20週間、又はそれ以上後に、継続的監視のために無期限に近い更に長い期間後に行われる。治療は、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの1つ以上の阻害剤、及び免疫療法併用治療を単独で、又は免疫チェックポイント阻害剤などの他の抗がん剤と組み合わせる含む、治療レジメンなどの抗がん療法を含み得る。

10

【0196】

所定のバイオマーカー量及び／又は活性測定値は、任意の好適な基準であり得る。例えば、所定のバイオマーカー量及び／又は活性測定値は、患者選択が評価される同じ又は異なるヒトから得られ得る。一実施形態では、所定のバイオマーカー量及び／又は活性測定値は、同じ患者の以前の評価から得られ得る。かかる様式で、患者の選択の経過が経時的に監視され得る。加えて、対照は、別のヒト又は複数のヒト、例えば、対象がヒトである場合、選択されたヒト群の評価から得られ得る。かかる様式で、選択が評価されるヒトの選択の程度が、好適な他のヒト、例えば、同様若しくは同じ状態に罹患しているヒト及び／又は同じ民族集団のヒト等の目的とするヒトと同様の状況下にある他のヒトと比較され得る。

20

【0197】

本発明のいくつかの実施形態では、所定のレベルからのバイオマーカー量及び／又は活性測定値の変化は、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、若しくは5.0倍、又はそれ以上、又はそれらの間の任意の範囲（境界値も含む）である。測定値が相対的变化に基づいている、例えば、治療前バイオマーカー測定を治療後バイオマーカー測定と比較した比率に基づいている場合に、かかるカットオフ値が平等に適用される。生物学的試料は、核酸及び／又はタンパク質を含む体液試料、細胞試料、又は組織試料を含む患者由来の様々な源から収集され得る。「体液」とは、身体から排泄又は分泌される流体、並びに通常は身体から排泄又は分泌されない流体（例えば、羊水、房水、胆汁、血液及び血漿、脳脊髄液、耳垢（cerumen）及び耳垢（earwax）、カウパー液又は前射精液、乳糜、糜粥、糞便、雌性射出液、間質液、細胞内液、リンパ液、月経、母乳、粘液、胸膜液、膿汁、唾液、皮脂、精液、血清、汗、滑液、涙、尿、腔粘滑液、硝子体液、嘔吐物）を指す。好ましい実施形態では、対象試料及び／又は対照試料は、細胞、細胞株、組織学的スライド、パラフィン包埋組織、生検、全血、乳頭吸引液、血清、血漿、頬搔爬物、唾液、脳脊髄液、尿、糞便、及び骨髓からなる群から選択される。一実施形態では、試料は、血清、血漿、又は尿である。別の実施形態では、試料は、血清である。

30

40

【0198】

試料は、長期間にわたって個体から繰り返し収集され得る（例えば、約数日間、数週間、数ヶ月に1回以上、年1回、年2回等）。ある期間にわたって個体から多数の試料を得ることは、早期検出からの結果を検証し、かつ／又は生物学的パターンの変化を、例えば、疾患進行、薬物治療等の結果として特定するために使用され得る。例えば、対象試料は、1ヶ月に1回、2ヶ月に1回、又は本発明による1、2、若しくは3ヶ月間隔の組み合わせで採取及び監視され得る。加えて、経時的に得られた対象のバイオマーカー量及び／又は活性測定値は、監視期間中に、互いに、かつ正常対照のものと好都合に比較され、そ

50

れにより、対象自身の値を長期監視のための内部対照又は個人的対照として提供することができる。

【0199】

試料調製及び分離は、収集された試料のタイプ及び／又はバイオマーカー測定値の分析に応じて、手順のうちのいずれかを含み得る。かかる手順には、ほんの一例として、濃縮、希釈、pHの調整、高濃度ポリペプチド（例えば、アルブミン、ガンマグロブリン、及びトランスフェリン等）の除去、保存料及び検量体の添加、プロテアーゼ阻害剤の添加、変性剤の添加、試料の脱塩、試料タンパク質の濃縮、脂質の抽出及び精製が含まれる。

【0200】

試料調製は、非共有結合複合体中で他のタンパク質（例えば、担体タンパク質）に結合した分子を単離することもできる。このプロセスは、特定の担体タンパク質（例えば、アルブミン）に結合したこれらの分子を単離することができるか、又はタンパク質変性による、例えば、酸を使用した、全ての担体タンパク質からの結合した分子の放出、その後の担体タンパク質の除去等のより一般的なプロセスを使用することができる。

【0201】

望ましくないタンパク質（例えば、高濃度の、無益な、又は検出不能なタンパク質）の試料からの除去は、高親和性試薬、高分子量フィルター、超遠心分離及び／又は電気透析を使用して達成され得る。高親和性試薬には、高濃度タンパク質に選択的に結合する抗体又は他の試薬（例えば、アプタマー）が含まれる。試料調製には、イオン交換クロマトグラフィー、金属イオン親和性クロマトグラフィー、ゲル濾過、疎水性クロマトグラフィー、クロマト分画、吸着クロマトグラフィー、等電点分画、及び関連技法も含まれ得る。分子量フィルターには、サイズ及び分子量に基づいて分子を分離する膜が含まれる。かかるフィルターは、逆浸透、ナノ濾過、限外濾過、及び精密濾過を更に用い得る。

【0202】

超遠心分離とは、望ましくないポリペプチドを試料から除去するための方法である。超遠心分離とは、光学系で粒子の沈降（又はその欠如）を監視しながら、約15,000～60,000rpmで試料を遠心分離することである。

【0203】

電気透析とは、イオンが電位勾配の影響下で半透性膜を通して1つの溶液から別の溶液に輸送されるプロセスにおいて電気膜又は半透性膜を使用する手技である。電気透析に使用される膜は、正電荷又は負電荷を有するイオンを選択的に輸送するか、反対電荷のイオンを拒絶するか、又は種がサイズ及び電荷に基づいて半透性膜を通して移動することを可能にする能力を有し得るため、電気透析を電解質の濃縮、除去、又は分離に有用なものにする。

【0204】

本発明における分離及び精製は、当該技術分野で既知の任意の手技、例えば、キャピラリー電気泳動（例えば、キャピラリー内若しくはチップ上）又はクロマトグラフィー（例えば、キャピラリー内、カラム、若しくはチップ上）を含み得る。電気泳動とは、電場の影響下でイオン性分子を分離するために使用され得る方法である。電気泳動は、ゲル中、キャピラリー内、又はチップ上のマイクロチャンネル内で行われ得る。電気泳動に使用されるゲルの例には、デンプン、アクリルアミド、ポリエチレンオキシド、アガロース、又はそれらの組み合わせが挙げられる。ゲルは、その架橋結合、洗剤又は変性剤の添加、酵素又は抗体（アフィニティー電気泳動）又は基質（ザイモグラフィー）の固定化、及びpH勾配の組み込みによって修飾され得る。電気泳動に使用されるキャピラリーの例には、エレクトロスプレーと連動するキャピラリーが挙げられる。キャピラリー電気泳動（CE）は、複合親水性分子と高度に荷電された溶質の分離に好ましい。CE技術は、マイクロ流体チップ上に実装される場合もある。使用されるキャピラリー及び緩衝液のタイプに応じて、CEは、キャピラリーゾーン電気泳動（CZE）、キャピラリー等電点電気泳動（CIEF）、キャピラリー等速電気泳動（cITP）、及びキャピラリー電気クロマトグラフィー（CEC）等の分離技法に更に分けられ得る。CE技法をエレクトロスプレーイオ

10

20

30

40

50

ン化に連結するための実施形態は、揮発性溶液、例えば、揮発性酸及び／又は塩基を含有する水性混合物並びにアルコール又はアセトニトリル等の有機物の使用を含む。

【0205】

キャピラリー等速電気泳動（cITP）とは、分析物がキャピラリーを通して一定速度で移動するが、それにもかかわらずそれらのそれぞれの移動度によって分離される技法である。キャピラリーゾーン電気泳動（CZE）、別名、自由溶液CE（FSCCE）とは、分子上の電荷によって決定される種の電気泳動移動度の差及び分子が移動中に遭遇する摩擦抵抗（多くの場合、分子のサイズに正比例する）に基づいている。キャピラリー等電点電気泳動（CIEF）は、弱イオン性両性分子がpH勾配で電気泳動によって分離されることを可能にする。CECは、伝統的な高速液体クロマトグラフィー（HPLC）とCEとの間のハイブリッド技法である。

10

【0206】

本発明で使用される分離及び精製技法は、当該技術分野で既知の任意のクロマトグラフィー手順を含む。クロマトグラフィーは、ある特定の分析物の示差的吸着及び溶出又は移動相と固定相との間での分析物の分配に基づき得る。クロマトグラフィーの異なる例としては、液体クロマトグラフィー（LC）、ガスクロマトグラフィー（GC）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0207】

IV. バイオマーカー核酸及びポリペプチド

本発明の一態様は、バイオマーカーポリペプチド又はかかるポリペプチドの一部をコードするバイオマーカー核酸に対応する単離された核酸分子の使用に関する。本明細書で使用される場合、「核酸分子」という用語は、DNA分子（例えば、cDNA又はゲノムDNA）及びRNA分子（例えば、mRNA）、並びにヌクレオチド類似体を使用して生成されるDNA又はRNAの類似体を含むことが意図されている。核酸分子は、一本鎖又は二本鎖であり得るが、好ましくは二本鎖DNAである。「単離された」核酸分子は、核酸分子の天然源に存在する他の核酸分子から分離されたものである。好ましくは、「単離された」核酸分子は、核酸の由来となる生物のゲノムDNA中の核酸に天然で隣接する配列（すなわち、核酸の5'末端及び3'末端に位置する配列）を含まない配列（好ましくは、タンパク質をコードする配列）である。例えば、様々な実施形態では、単離された核酸分子は、核酸の由来となる細胞のゲノムDNA中の核酸分子に天然で隣接する約5kB、4kB、3kB、2kB、1kB、0.5kB、又は0.1kB未満のヌクレオチド配列を含有し得る。更に、「単離された」核酸分子、例えば、cDNA分子は、組換え技法によって産生される場合には他の細胞物質若しくは培養培地を実質的に含み得ないか、又は化学的に合成される場合には化学的前駆体若しくは他の化学物質を実質的に含み得ない。

20

30

【0208】

本発明のバイオマーカー核酸分子は、標準の分子生物学技法及び本明細書に記載のデータベース記録の配列情報を使用して単離され得る。かかる核酸配列の全て又は一部を使用して、本発明の核酸分子は、標準のハイブリダイゼーション及びクローニング技法を使用して単離することができる（例えば、Sambrook et al., ed., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に記載されるように）。

40

【0209】

本発明の核酸分子は、標準のPCR増幅技法に従って、テンプレートとしてcDNA、mRNA、又はゲノムDNA、及び適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅され得る。このように増幅された核酸分子は、適切なベクターにクローニングされ、DNA配列分析によって特性決定され得る。更に、本発明の核酸分子の全て又は一部に対応するオリゴヌクレオチドは、例えば、自動DNA合成機を使用して、標準の合成技法によって調製され得る。

【0210】

50

更に、本発明の核酸分子は、核酸配列の一部のみを含むことができ、全長核酸配列は、本発明のマーカを含むか、又は本発明のマーカに対応するポリペプチドをコードする。かかる核酸分子は、例えば、プローブ又はプライマーとして使用することができる。プローブ／プライマーは、典型的には、1つ以上の実質的に精製されたオリゴヌクレオチドとして使用される。オリゴヌクレオチドは、典型的には、バイオマーカ核酸配列の少なくとも約7、好ましくは約15、より好ましくは約25、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、又は400以上の連続したヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、ヌクレオチド配列の領域を含む。バイオマーカ核酸分子の配列に基づくプローブを使用して、本発明の1つ以上のマーカに対応する転写物又はゲノム配列を検出することができる。プローブは、それに付着した標識基、例えば、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、又は酵素補因子を含む。

10

【0211】

遺伝子コードの縮重に起因して、バイオマーカに対応するタンパク質をコードする核酸分子のヌクレオチド配列とは異なり、したがって、同じタンパク質をコードするバイオマーカ核酸分子もまた企図される。

【0212】

加えて、アミノ酸配列において変化を生じさせるDNA配列多型が、ある集団（例えば、ヒト集団）内に存在し得ることは、当業者には理解されるであろう。かかる遺伝子多型は、天然対立遺伝子多様性に起因して、ある集団内の個体間に存在し得る。対立遺伝子は、あるいは所与の遺伝子座で生じる遺伝子群のうちの1つである。加えて、RNA発現レベルに影響を与えるDNA多型もまた存在し得、これが（例えば、制御又は分解に影響を与えることによって）その遺伝子の全体的な発現レベルに影響を与え得ることが理解されるであろう。

20

【0213】

本明細書で「対立遺伝子バリエント」と同義に使用される「対立遺伝子」という用語は、遺伝子又はその部分の代替形態を指す。対立遺伝子は、相同染色体上で同じ遺伝子座又は位置を占める。対象が遺伝子の2つの同一の対立遺伝子を有する場合、対象は、遺伝子又は対立遺伝子に対してホモ接合であると言われる。対象が遺伝子の2つの異なる対立遺伝子を有する場合、対象は、遺伝子又は対立遺伝子に対してヘテロ接合であると言われる。例えば、バイオマーカ対立遺伝子は、単一のヌクレオチド又はいくつかのヌクレオチドにおいて互いに異なり得、ヌクレオチドの置換、欠失、及び挿入を含み得る。遺伝子の対立遺伝子はまた、1つ以上の変異を含有する遺伝子の形態であり得る。

30

【0214】

本明細書で互換的に使用される、「遺伝子の多型領域の対立遺伝子バリエント」又は「対立遺伝子バリエント」という用語は、集団中の遺伝子のその領域に見出されるいくつかの可能なヌクレオチド配列のうちの1つを有する遺伝子の代替形態を指す。本明細書で使用される場合、対立遺伝子バリエントは、機能的対立遺伝子バリエント、非機能的対立遺伝子バリエント、SNP、変異及び多型を包含することを意味する。

【0215】

「単一ヌクレオチド多型」（SNP）という用語は、対立遺伝子配列間の変化の部位である単一ヌクレオチドによって占められる多型部位を指す。この部位は、通常、対立遺伝子の高度に保存された配列（例えば、集団の1/100又は1/1000未満のメンバーで変化する配列）が前にあり、後に続く。SNPは、通常、多型部位におけるあるヌクレオチドの別のヌクレオチドへの置換に起因して生じる。SNPは、参照対立遺伝子に対するヌクレオチドの欠失又はヌクレオチドの挿入からも生じ得る。典型的には、多型部位は、参照塩基以外の塩基によって占有される。例えば、参照対立遺伝子が多型部位に塩基「T」（チミジン）を含有する場合、改変した対立遺伝子は、多型部位に「C」（シチジン）、「G」（グアニン）、又は「A」（アデニン）を含有することができる。SNPは、タンパク質コード核酸配列において生じ得るが、その場合、それらは、欠陥若しくは他のバリエントタンパク質、又は遺伝疾患を引き起こし得る。かかるSNPは、遺伝子のコー

40

50

ディング配列を改変させることができ、したがって、別のアミノ酸（「ミスセンス」SNP）を特定し得るか、又はSNPは、停止コドン（「ナンセンス」SNP）を導入し得る。SNPがタンパク質のアミノ酸配列を改変しない場合、SNPは「サイレント」と呼ばれる。SNPはまた、ヌクレオチド配列の非コーディング領域においても生じ得る。これは、例えば、代替的なスパイシングの結果として、欠陥タンパク質発現をもたらし得るか、又はタンパク質の機能に影響を与えない場合がある。

【0216】

本明細書で使用される場合、「遺伝子」及び「組換え遺伝子」という用語は、本発明のマーカーに対応するポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含む核酸分子を指す。かかる天然対立遺伝子多様性は、典型的には、所与の遺伝子のヌクレオチド配列中に1～5%の変異をもたらし得る。いくつかの異なる個体における目的の遺伝子を配列決定することによって、代替対立遺伝子を同定することができる。これは、様々な個体における同じ遺伝子座を同定するためにハイブリダイゼーションプローブを使用することによって容易に実行することができる。天然の対立遺伝子多様性の結果であり、機能活性を改変しない、任意及び全てのかかるヌクレオチド多様性、並びに得られるアミノ酸多型は、本発明の範囲内であることが意図される。

【0217】

別の実施形態では、バイオマーカーク酸分子は、少なくとも7、15、20、25、30、40、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、550、650、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3500、4000、4500、又はそれ以上のヌクレオチド長であり、本発明のマーカーに対応する核酸分子、又は本発明のマーカーに対応するタンパク質をコードする核酸分子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする。本明細書で使用される場合、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」という用語は、互いに少なくとも60%（65%、70%、75%、80%、好ましくは85%）同一のヌクレオチド配列が、典型的に互いにハイブリダイズされたままである、ハイブリダイゼーション及び洗浄のための条件を説明することが意図されている。かかるストリンジェントな条件は、当業者に知られており、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989)の節6.3.1～6.3.6に見出すことができる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の好ましい非限定的な例は、約45℃での6X塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）中のハイブリダイゼーション、続いて、50～65℃での0.2X SSC、0.1% SDS中の1つ以上の洗浄である。

【0218】

集団に存在し得る本発明の核酸分子の天然に存在する対立遺伝子バリエーションに加え、当業者は、それによってコードされるタンパク質の生物学的活性を改変することなく、変異によって配列変化を導入することができ、それによって、コードされるタンパク質のアミノ酸配列における変化につながることを更に理解するであろう。例えば、「非必須」アミノ酸残基でのアミノ酸置換につながるヌクレオチド置換を行うことができる。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を改変することなく、野生型配列から改変され得る残基であり、一方で、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性に必要とされる。例えば、様々な種の相同体の間で保存されていないか、又は半保存されているだけのアミノ酸残基は、活性に必須ではなくてもよく、したがって、改変の標的である可能性が高い。あるいは、様々な種（例えば、マウス及びヒト）の相同体間で保存されるアミノ酸残基は、活性に必須であり得、したがって、改変のための標的ではあり得ない。

【0219】

したがって、本発明の別の態様は、活性に必須ではないアミノ酸残基の変化を含有する本発明のポリペプチドをコードする核酸分子に関する。かかるポリペプチドは、アミノ酸配列が、本発明のマーカーに対応するが、生物学的活性を保持する天然に存在するタンパ

ク質とは異なる。一実施形態では、バイオマーカータンパク質は、本明細書に記載のバイオマーカータンパク質のアミノ酸配列と少なくとも約40%同一、50%、60%、70%、75%、80%、83%、85%、87.5%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は同一であるアミノ酸配列を有する。

【0220】

バリエーションタンパク質をコードする単離された核酸分子は、1つ以上のヌクレオチド置換、付加、又は欠失を、1つ以上のアミノ酸残基置換、付加、又は欠失が、コードされたタンパク質に導入されるように、本発明の核酸のヌクレオチド配列に導入することによって作成され得る。変異は、部位特異的変異誘発及びPCR媒介性変異誘発などの標準の技法によって導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換は、1つ以上の予測される非必須アミノ酸残基で行われる。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられたものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野で定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非帯電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β -分岐状側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。あるいは、変異は、例えば、飽和変異誘発によって、コーディング配列の全て又は一部に沿ってランダムに導入することができ、得られた変異体を、生物学的活性についてスクリーニングして、活性を保持する変異体を同定することができる。変異誘発後、コードされたタンパク質は、組換え的に発現することができ、タンパク質の活性を決定することができる。

【0221】

いくつかの実施形態では、本発明は、抗バイオマーカーアンチセンス核酸分子、すなわち、本発明のセンス核酸に相補的である分子、例えば、本発明のマーカースに対する二本鎖cDNA分子のコード鎖に相補的である分子、又は本発明のマーカースに対するmRNA配列に相補的である分子の使用を更に企図する。したがって、本発明のアンチセンス核酸分子は、本発明のセンス核酸に水素結合する（すなわち、アニールする）ことができる。アンチセンス核酸は、コード鎖全体若しくはその一部のみ、例えば、タンパク質コーディング領域の全て若しくは一部（又はオープンリーディングフレーム）に相補的であり得る。アンチセンス核酸分子はまた、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の非コーディング領域の全て又は一部に対してアンチセンスであり得る。非コーディング領域（「5'及び3'非翻訳領域」）は、コーディング領域に隣接し、アミノ酸に翻訳されない5'及び3'配列である。

【0222】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、又は50以上のヌクレオチド長であり得る。アンチセンス核酸は、化学合成及び酵素ライゲーション反応を使用して、当該技術分野で既知の手順を使用して構築され得る。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチド若しくは分子の生物学的安定性を増加させるか、又はアンチセンス核酸とセンス核酸との間に形成される二本鎖の物理的安定性を増加させるように設計された様々に修飾されたヌクレオチドを使用して化学的に合成することができ、例えば、ホスホロチオエート誘導体及びアクリジン置換ヌクレオチドを使用することができる。アンチセンス核酸を生成するために使用され得る修飾ヌクレオチドの例としては、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシルメチ

ル) ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 β -D-ガラクトシルケオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルケオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイブトキシソシン(wybutoxosine)、プソイドウラシル、ケオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、及び2,6-ジアミノプリンが挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス配向でサブクロニングされた発現ベクターを使用して生物学的に産生することができる(すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、次のサブセクションで更に説明される、目的とする標的核酸に対するアンチセンス配向である)。

10

20

30

40

50

【0223】

本発明のアンチセンス核酸分子は、典型的には、例えば、転写及び／又は翻訳を阻害することによって、マーカーの発現を阻害するように、本発明の選択されたマーカーに対応するポリペプチドをコードする細胞mRNA及び／又はゲノムDNAとハイブリダイズ又は結合するように、対象に投与されるか、又は原位置で生成される。ハイブリダイゼーションは、安定な二本鎖を形成するための従来のヌクレオチド相補性によるものであり得るか、又は例えば、DNA二本鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合、二重らせんの主要な溝における特異的な相互作用を介するものであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位での直接注射、又はアンチセンス核酸の血液若しくは骨髓関連体液への注入が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的とするように修飾され、次いで全身的に投与され得る。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子は、例えば、アンチセンス核酸分子を細胞表面受容体又は抗原に結合するペプチド又は抗体に結合することによって、選択された細胞表面上で発現される受容体又は抗原に特異的に結合するように修飾することができる。アンチセンス核酸分子はまた、本明細書に記載のベクターを使用して細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が強力なpol II又はpol IIIプロモーターの制御下に置かれるベクター構築物が好ましい。

【0224】

本発明のアンチセンス核酸分子は、 α -アノマー核酸分子であり得る。 α -アノマー核酸分子は、通常の α 単位とは対照的に、鎖が互いに平行に走る相補的RNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成する(Gaultier et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 6625-6641)。アンチセンス核酸分子はまた、2'-O-メチルリボヌクレオチド(Inoue et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 6131-6148)又はキメラRNA-DNA類似体(Inoue et al., 1987, FEBS Lett. 215: 327-330)を含むことができる。

【0225】

本発明は、リボザイムも包含する。リボザイムは、それらが相補性領域を有するmRNAなどの一本鎖核酸を切断することができる、リボヌクレアーゼ活性を有する触媒RNA分子である。したがって、リボザイム(例えば、Haselhoff and Gerlach, 1988, Nature 334: 585-591に記載されているようなハンマーヘッドリボザイム)を使用して、mRNA転写産物を触媒的に切断し、それにより、mRNAによってコードされるタンパク質の翻訳を阻害することができる。本発明のマ-

カーに対応するポリペプチドをコードする核酸分子に対する特異性を有するリボザイムは、マーカーに対応するcDNAのヌクレオチド配列に基づいて設計され得る。例えば、Tetrahymena-19 IVS RNAの誘導体は、活性部位のヌクレオチド配列が、切断されるヌクレオチド配列に相補的であるように構築することができる（Cech et al. 米国特許第4,987,071号、及びCech et al. 米国特許第5,116,742号を参照のこと）。あるいは、本発明のポリペプチドをコードするmRNAを使用して、RNA分子のプールから特定のリボヌクレアーゼ活性を有する触媒RNAを選択することができる（例えば、Bartel and Szostak, 1993, Science 261:1411-1418を参照のこと）。

【0226】

10

本発明は、三重らせん構造を形成する核酸分子も包含する。例えば、バイオマーカータンパク質の発現は、ポリペプチド（例えば、プロモーター及び／又はエンハンサー）をコードする遺伝子の制御領域に相補的なヌクレオチド配列を標的化して、標的細胞における遺伝子の転写を防止する三重らせん構造を形成することによって阻害され得る。概して、Helene (1991) Anticancer Drug Des. 6(6):569-84、Helene (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660:27-36、及びMaher (1992) Bioassays 14(12):807-15を参照のこと。

【0227】

20

様々な実施形態では、本発明の核酸分子は、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、又は溶解性を向上させるために、塩基部分、糖部分、又はリン酸骨格で修飾され得る。例えば、核酸分子のデオキシリボースリン酸骨格は、ペプチド核酸分子を生成するように修飾され得る（Hyrup et al., 1996, Bioorganic & Medicinal Chemistry 4(1):5-23を参照のこと）。本明細書で使用される場合、「ペプチド核酸」又は「PNA」という用語は、デオキシリボースリン酸骨格がブソイドペプチド骨格によって置き換えられ、4つの天然核酸塩基のみが保持される、核酸模倣物、例えば、DNA模倣物を指す。PNAの中性骨格は、低イオン強度の条件下でDNA及びRNAへの特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。PNAオリゴマーの合成は、Hyrup et al. (1996)（上記参照）、Perry-O'Keefe et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:14670-675に記載される標準的な固相ペプチド合成プロトコルを使用して行うことができる。

30

【0228】

PNAは、治療及び診断用途に使用することができる。例えば、PNAは、例えば、転写又は翻訳停止を誘導するか、又は複製を阻害することによって、遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンス又はアンチゲン剤として使用され得る。PNAはまた、例えば、PNA指向性PCRクランピングによる遺伝子の単一塩基対変異の分析において、他の酵素、例えば、S1ヌクレアーゼ（Hyrup (1996)、上記と組み合わせて使用される場合の人工制限酵素として、又はDNA配列及びハイブリダイゼーションのためのプローブ若しくはプライマーとしても使用され得る（Hyrup, 1996（上記参照）、Perry-O'Keefe et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:14670-675）。

40

【0229】

別の実施形態では、PNAは、例えば、それらの安定性若しくは細胞取り込みを向上させるために、親油性若しくは他のヘルパー基をPNAに付着させることによって、PNA-DNAキメラの形成によって、又はリボソーム若しくは当該技術分野で知られている薬物送達他の技法の使用によって修飾され得る。例えば、PNA及びDNAの有利な特性を組み合わせることができる、PNA-DNAキメラを生成することができる。かかるキメラは、DNA認識酵素、例えば、RNase H及びDNAポリメラーゼが、DNA部分と相互作用することを可能にする一方で、PNA部分は、高い結合親和性及び特異性を

50

提供するであろう。PNA-DNAキメラは、塩基スタッキング、核酸塩基間の結合数、及び配向の観点から選択される適切な長さのリンカーを使用して連結することができる (Hyrup, 1996 (上記参照))。PNA-DNAキメラの合成は、Hyrup (1996) (上記参照)、及び Finn et al. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24 (17): 3357-63 に記載されるように行うことができる。例えば、DNA鎖は、標準的なホスホロアミダイトカップリング化学反応及び修飾ヌクレオシド類似体を使用して固体支持体上で合成され得る。5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシチミジンホスホロアミダイトなどの化合物は、PNAとDNAの5'末端との間の連結として使用することができる (Mag et al., 1989, *Nucleic Acids Res.* 17: 5973-88)。次いで、PNAモノマーを段階的にカップリングさせて、5' PNAセグメント及び3' DNAセグメントを有するキメラ分子を産生する (Finn et al., 1996, *Nucleic Acids Res.* 24 (17): 3357-63)。あるいは、キメラ分子を5' DNAセグメント及び3' PNAセグメントで合成することができる (Peterser et al., 1975, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 5: 1119-1124)。

10

【0230】

他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ペプチド (例えば、宿主細胞受容体をインビボで標的化するための)、又は細胞膜を横切る輸送を促進する薬剤 (例えば、Lettinger et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 6553-6556、Lemaitre et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84: 648-652、PCT公開第88/09810号を参照のこと)、又は血液脳関門 (例えば、PCT公開第89/10134号を参照のこと) などの他の付加基を含み得る。加えて、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション誘発切断剤 (例えば、Krol et al., 1988, *Bio/Techniques* 6: 958-976を参照のこと) 又は挿入剤 (例えば、Zon, 1988, *Pharm. Res.* 5: 539-549を参照のこと) で修飾され得る。この目的のために、オリゴヌクレオチドは、別の分子、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発切断剤等にコンジュゲートされ得る。

20

30

【0231】

本発明の別の態様は、バイオマーカータンパク質及びその生物学的に活性な部分の使用に関する。一実施形態では、マーカーに対応する天然ポリペプチドは、標準のタンパク質精製技法を使用して適切な精製スキームによって細胞源又は組織源から単離され得る。別の実施形態では、本発明のマーカーに対応するポリペプチドは、組換えDNA技法によって産生される。組換え発現の代替案として、本発明のマーカーに対応するポリペプチドは、標準のペプチド合成技法を使用して化学的に合成され得る。

【0232】

「単離された」又は「精製された」タンパク質又はその生物学的に活性な部分は、タンパク質が由来する細胞若しくは組織源由来の細胞物質若しくは他の夾雑タンパク質を実質的に含まないか、又は化学的前駆体若しくは他の化学物質 (化学的に合成される場合) を実質的に含まない。「細胞物質を実質的に含まない」という言語は、タンパク質が、それが単離されるか、又は組換え的に産生される細胞の細胞成分から分離される、タンパク質の調製物を含む。したがって、細胞物質を実質的に含まないタンパク質は、約30%、20%、10%、又は5%未満 (乾燥重量で) の異種タンパク質 (本明細書では「夾雑タンパク質」とも称される) を有するタンパク質の調製物を含む。タンパク質又はその生物学的に活性な部分が組換え的に産生される場合、好ましくは、培養培地、すなわち、タンパク質調製物の体積の約20%、10%、又は5%未満に相当する培養培地を実質的に含まない。タンパク質が化学合成によって産生される場合、タンパク質は、好ましくは、化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に含まない、すなわち、タンパク質の合成に関与する

40

50

化学的前駆体又は他の化学物質から分離される。したがって、タンパク質のかかる調製物は、目的とするポリペプチド以外の化学的前駆体又は化合物の（乾燥重量で）約30%、20%、10%、5%未満を有する。

【0233】

バイオマーカーポリペプチドの生物学的に活性な部分は、本明細書に記載のバイオマーカータンパク質アミノ酸配列と十分に同一であるか、又はそれに由来するアミノ酸配列を含むが、全長タンパク質よりも少ないアミノ酸を含み、対応する全長タンパク質の少なくとも1つの活性を呈するポリペプチドを含む。典型的には、生物学的に活性な部分は、対応するタンパク質の少なくとも1つの活性を有するドメイン又はモチーフを含む。本発明のタンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、10、25、50、100、又はそれ以上のアミノ酸長のポリペプチドであり得る。更に、タンパク質の他の領域が欠失している他の生物学的に活性な部分は、組換え技法によって調製され、本発明のポリペプチドの天然形態の機能的活性のうちの1つ以上について評価され得る。

10

【0234】

好ましいポリペプチドは、本明細書に記載の核酸分子によってコードされるバイオマーカータンパク質のアミノ酸配列を有する。他の有用なタンパク質は、これらの配列のうちの1つと実質的に同一であり（例えば、少なくとも約40%、好ましくは50%、60%、70%、75%、80%、83%、85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%）、対応する天然に存在するタンパク質のタンパク質の機能的活性を保持するが、天然対立遺伝子変異又は変異誘発によりアミノ酸配列が異なる。

20

【0235】

2つのアミノ酸配列又は2つの核酸の同一性パーセントを決定するために、配列が最適比較目的のためにアラインされる（例えば、第2のアミノ酸又は核酸配列との最適アライメントのために第1のアミノ酸又は核酸配列の配列にギャップが導入され得る）。その後、対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置のアミノ酸残基又はヌクレオチドが比較される。第1の配列における位置が第2の配列における対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドによって占有されている場合、それらの分子はその位置で同一である。2つの配列間の同一性パーセントは、それらの配列によって共有される同一の位置の数の関数（すなわち、同一性% = 同一の位置の数 / 総位置数（例えば、重複している位置）× 100）である。一実施形態では、2つの配列は、同じ長さである。

30

【0236】

2つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。2つの配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例は、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 5873-5877と同様に修飾された、Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87: 2264-2268のアルゴリズムである。かかるアルゴリズムは、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410のNBLAST及びXBLASTプログラムに組み込まれる。本発明の核酸分子と相同のヌクレオチド配列を得るために、BLASTヌクレオチド検索が、NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12で行われ得る。本発明のタンパク質分子と相同のアミノ酸配列を得るために、BLASTタンパク質検索が、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3で行われ得る。比較目的のためにギャップドアライメントを得るために、ギャップドBLASTがAltschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402に記載されるように利用され得る。あるいは、PSI-Blastを使用して、分子間の距離関係を検出する反復検索を行うことができる。BLAST、ギャップドBLAST、及びPSI-Blastプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLAST及びNBLAST）のデフォルトパラメータが使用され得る。ncbi.nlm.nih.govでWorld Wi

40

50

de Webを参照のこと。配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例は、Myers and Miller, (1988) Comput Appl Biosci, 4:11-7のアルゴリズムである。かかるアルゴリズムは、GCG配列アライメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれる。アミノ酸配列を比較するためにALIGNプログラムを利用する場合、PAM120重み残基表、ギャップ長ペナルティ12、及びギャップペナルティ4が使用され得る。局所配列類似性及びアライメントの領域の特定に有用な更に別のアルゴリズムは、Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:2444-2448に記載のFASTAアルゴリズムである。ヌクレオチド又はアミノ酸配列を比較するためにFASTAアルゴリズムを使用する場合、例えば、PAM120重み残基表がk-タプル値2で使用され得る。

10

【0237】

2つの配列間の同一性パーセントは、ギャップを許容して又はギャップを許容することなく、上述の技法と同様の技法を使用して決定され得る。同一性パーセントを計算する際、正確な一致のみが計数される。本発明は、バイオマーカータンパク質に対応するキメラ又は融合タンパク質も提供する。本明細書で使用される場合、「キメラタンパク質」又は「融合タンパク質」は、異種ポリペプチド（すなわち、マーカーに対応するポリペプチド以外のポリペプチド）に作動可能に連結された本発明のマーカーに対応するポリペプチドの全て又は一部（好ましくは、生物学的に活性な部分）を含む。融合タンパク質において、「作動可能に連結される」という用語は、本発明のポリペプチドと異種ポリペプチドが互いにインフレームで融合していることを示すよう意図されている。異種ポリペプチドは、本発明のポリペプチドのアミノ末端又はカルボキシル末端に融合し得る。

20

【0238】

1つの有用な融合タンパク質は、本発明のマーカーに対応するポリペプチドがGST配列のカルボキシル末端に融合しているGST融合タンパク質である。かかる融合タンパク質は、本発明の組換えポリペプチドの精製を容易にし得る。

【0239】

別の実施形態では、融合タンパク質は、異種シグナル配列、免疫グロブリン融合タンパク質、毒素、又は他の有用なタンパク質配列を含む。本発明のキメラ及び融合タンパク質は、標準の組換えDNA技法によって産生され得る。別の実施形態では、融合遺伝子は、自動DNA合成機を含む従来の技法によって合成され得る。あるいは、遺伝子断片のPCR増幅は、2つの連続した遺伝子断片間の相補的オーバーハングをもたらすアンカプライマーを使用して行われ得、その後、これがアニール及び再増幅されて、キメラ遺伝子配列を生成することができる（例えば、Ausubel et al.（上記参照）を参照のこと）。更に、融合部分（例えば、GSTポリペプチド）をすでにコードする多くの発現ベクターが市販されている。本発明のポリペプチドをコードする核酸は、融合部分が本発明によって包含されるポリペプチドにインフレームで連結されるように、かかる発現ベクターにクローニングされ得る。

30

【0240】

シグナル配列を使用して、分泌タンパク質又は目的とする他のタンパク質の分泌及び単離を容易にすることができる。シグナル配列は、典型的には、一般に1つ以上の切断事象において分泌中に成熟タンパク質から切断される疎水性アミノ酸のコアを特徴とする。かかるシグナルペプチドは、分泌経路を通過する際に成熟タンパク質からのシグナル配列の切断を可能にする処理部位を含む。したがって、本発明は、シグナル配列を有する記載のポリペプチド、並びにシグナル配列がタンパク質分解的に切断されたポリペプチド（すなわち、切断産物）に関する。一実施形態では、シグナル配列をコードする核酸配列は、通常は分泌されないか、又はさもなければ単離が困難なタンパク質等の目的とするタンパク質に発現ベクター内で作動可能に連結され得る。シグナル配列は、発現ベクターが形質転換される真核宿主等からのタンパク質の分泌を指示し、シグナル配列がその後又は同時に切断される。その後、タンパク質は、当該技術分野によって認識された方法によって細

40

50

胞外培地から容易に精製され得る。あるいは、シグナル配列は、G S Tドメイン等の精製を容易にする配列を使用して目的とするタンパク質に連結され得る。

【0241】

本発明は、本明細書に記載のバイオマーカーポリペプチドのバリエーションにも関する。かかるバリエーションは、アゴニスト（模倣物）又はアンタゴニストのいずれかとして機能し得る改変されたアミノ酸配列を有し得る。バリエーションは、変異誘発、例えば、離散点変異又は切断によって生成され得る。アゴニストは、タンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性と実質的に同じもの又はそのサブセットを保持し得る。タンパク質のアンタゴニストは、例えば、目的とするタンパク質を含む細胞シグナル伝達カスケードの下流又は上流メンバーに競合的に結合することによって、タンパク質の天然に存在する形態の活性のうちの1つ以上を阻害し得る。したがって、特定の生物学的効果が限定された機能を有するバリエーションでの処理によって誘発され得る。タンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性のサブセットを有するバリエーションでの対象の治療は、タンパク質の天然に存在する形態での治療と比較して対象におけるより少ない副作用を有し得る。

10

【0242】

アゴニスト（模倣物）又はアンタゴニストのいずれかとして機能するバイオマーカータンパク質のバリエーションは、本発明のタンパク質の変異体、例えば、切断変異体のコンビナトリアルライブラリをアゴニスト又はアンタゴニスト活性についてスクリーニングすることによって同定され得る。一実施形態では、バリエーションの多様化ライブラリが核酸レベルでのコンビナトリアル変異誘発によって生成され、多様化遺伝子ライブラリによってコードされる。バリエーションの多様化ライブラリは、潜在的なタンパク質配列の縮重セットが個々のポリペプチドとして又はあるいはより大きい融合タンパク質のセットとして（例えば、ファージディスプレイ用に）発現可能であるように、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に酵素的にライゲートすることによって産生され得る。縮重オリゴヌクレオチド配列から本発明のポリペプチドの潜在的なバリエーションのライブラリを産生するために使用され得る様々な方法が存在する。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法は当該技術分野で既知である（例えば、Narang, 1983, Tetrahedron 39:3, Itakura et al., 1984, Annu. Rev. Biochem. 53:323, Itakura et al., 1984, Science 198:1056, Ike et al., 1983 Nucleic Acid Res. 11:477を参照のこと）。

20

30

【0243】

加えて、本発明のマーカーに対応するポリペプチドのコーディング配列の断片のライブラリを使用して、バリエーションのスクリーニング及びその後の選択のためのポリペプチドの多様化集団を生成することができる。例えば、コーディング配列断片のライブラリは、ニックングが1分子当たり約1回のみ生じる条件下で目的とするコーディング配列の二本鎖PCR断片をヌクレアーゼで処理し、二本鎖DNAを変性させ、DNAを復元して異なるニックング産物由来のセンス／アンチセンス対を含み得る二本鎖DNAを形成し、S1ヌクレアーゼでの処理により再形成された二本鎖から一本鎖部分を除去し、結果として生じた断片ライブラリを発現ベクターにライゲートすることによって生成され得る。この方法により、目的とするタンパク質の様々なサイズのアミノ末端及び内部断片をコードする発現ライブラリが得られ得る。

40

【0244】

点変異又は切断によって作製されたコンビナトリアルライブラリの遺伝子産物をスクリーニングするための、かつ選択された特性を有する遺伝子産物についてcDNAライブラリをスクリーニングするためのいくつかの技法が当該技術分野で既知である。大きい遺伝子ライブラリをスクリーニングするためのハイスループット分析に従う最も広く使用されている技法は、典型的には、遺伝子ライブラリを複製可能な発現ベクターにクローニングすることと、適切な細胞をベクターの結果として生じたライブラリで形質転換することと、所望の活性の検出が、産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にす

50

る条件下で、コンビナトリアル遺伝子を発現させることを含む。ライブラリにおける機能的変異体の頻度を高める技法である再帰的アンサンブル変異誘発（REM）が、本発明のタンパク質のバリエーションを同定するためのスクリーニングアッセイと組み合わせて使用され得る（Arkin and Yourvan, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89: 7811-7815、Delgrave et al., 1993, Protein Engineering 6 (3): 327-331）。表1～5に列挙されるバイオマーカー又はそれらの断片を含む、本発明によって包含される1つ以上のバイオマーカーに対応する単離されたポリペプチド若しくはその断片（又はかかるポリペプチドをコードする核酸）は、当該技術分野で周知の方法に従ってポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を調製するための標準の技法を使用して、当該免疫原に結合する抗体を生成するために、免疫原として使用され得る。抗原ペプチドは、少なくとも8個のアミノ酸残基を含み、ペプチドに対して産生された抗体がそれぞれの全長分子と特異的免疫複合体を形成するように、それぞれの全長分子中に存在するエピトープを包含する。好ましくは、抗原ペプチドは、少なくとも10個のアミノ酸残基を含む。一実施形態では、かかるエピトープは、マウス又はヒト等の1つの種由来の所与のポリペプチド分子に対して特異的であり得る（すなわち、種にわたって保存されていないポリペプチド分子の領域にわたる抗原ペプチドが免疫原として使用され、かかる保存されていない残基が本明細書に提供されるアライメント等のアライメントを使用して決定され得る）。

10

20

30

40

50

【0245】

いくつかの実施形態では、免疫療法は、PD-1などの免疫チェックポイントに実質的に特異的に結合する抗体などの少なくとも1つの免疫チェックポイントの阻害剤を利用し、例えば、PD-1のPD-L1及び／又はPD-L2結合パートナーなどの免疫チェックポイントの結合パートナーとの相互作用を妨害することによって、その免疫阻害機能を阻害又は遮断する。一実施形態では、抗体、特にイントラボディは、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーに実質的に特異的に結合し、その生物学的機能を阻害又は遮断する。別の実施形態では、抗体、特にイントラボディは、本明細書に記載されるかかる1つ以上のバイオマーカーの基質などの表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの結合パートナーに実質的に特異的に結合し、例えば、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーとの相互作用を妨害することによって、その生物学的機能を阻害又は遮断する。

【0246】

例えば、ポリペプチド免疫原は、典型的には、好適な対象（例えば、ウサギ、ヤギ、マウス、又は他の哺乳動物）を免疫原で免疫化することによって抗体を調製するために使用される。好ましい動物は、所望の標的抗原が欠損したマウスである。例えば、所望の抗体が抗PD-1抗体である場合、PD-1ノックアウトマウスが使用され得る。これにより、一般的なマウス及びヒトのエピトープに反応する抗体が許容機構によって除去されないため、より広い範囲の抗体認識可能性がもたらされる。適切な免疫原性調製物は、例えば、免疫応答が生成される組換え的に発現された又は化学的に合成された分子又はその断片を含み得る。この調製物は、フロインド完全若しくは不完全アジュバント等のアジュバント、又は同様の免疫刺激剤を更に含む。好適な対象の免疫原性調製物での免疫化により、内部に含まれる抗原ペプチドに対するポリクローナル抗体の応答が誘導される。

【0247】

ポリクローナル抗体は、好適な対象をポリペプチド免疫原で免疫化することによって上述のように調製され得る。免疫化された対象におけるポリペプチド抗体力価が、固定化ポリペプチドを使用した酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）等の標準の技法によって経時的に監視され得る。所望の場合、抗原に対して産生された抗体が哺乳動物から（例えば、血液から）単離され、タンパク質Aクロマトグラフィー等の周知の技法によって更に精製されて、IgG画分を得ることができる。免疫化後の適切な時点で、例えば、抗体力価が最も高い時点で、抗体を産生する細胞が対象から得られ、それを使用して、ハイブリドーマ技法（Kohler and Milstein (1975) Nature 25

6:495-497によって最初に説明された) (Brown et al. (1981) J. Immunol. 127:539-46、Brown et al. (1980) J. Biol. Chem. 255:4980-83、Yeh et al. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. 76:2927-31、Yeh et al. (1982) Int. J. Cancer 29:269-75も参照のこと)、より最近のヒトB細胞ハイブリドーマ技法 (Kozbor et al. (1983) Immunol. Today 4:72)、EBV-ハイブリドーマ技法 (Cole et al. (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)、又はトリオーマ技法等の標準の技法によってモノクローナル抗体を調製する。モノクローナル抗体ハイブリドーマを産生するための技術が周知である (概して、Kenneth, R. H. in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980)、Lerner, E. A. (1981) Yale J. Biol. Med. 54:387-402、Gefter, M. L. et al. (1977) Somatic Cell Genet. 3:231-36を参照のこと)。簡潔には、不死細胞株 (典型的には、骨髄腫) が上述のように免疫原で免疫化された哺乳動物由来のリンパ球 (典型的には、脾細胞) に融合し、結果として生じたハイブリドーマ細胞の培養上清がスクリーニングされて、ポリペプチド抗原に好ましくは特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが特定される。いくつかの実施形態では、免疫化は、目的とする標的抗原のノックアウトを有する (例えば、免疫化前に抗原を産生しない) 細胞又は動物宿主で行われる。

10

20

30

40

50

【0248】

リンパ球を不死化細胞株に融合させるために使用される多くの周知のプロトコルのうちのいずれか、表1~5に列挙されるバイオマーカーを含む、本発明によって包含される1つ以上のバイオマーカー又はその断片に対するモノクローナル抗体を生成する目的のために適用され得る (例えば、Galfre, G. et al. (1977) Nature 266:55052、Gefter et al. (1977) (上記参照)、Lerner (1981) (上記参照)、Kenneth (1980) (上記参照) を参照のこと)。更に、当業者であれば、同様に有用であろうかかる方法の多くの変形が存在することを理解する。

【0249】

典型的には、不死細胞株 (例えば、骨髄腫細胞株) は、リンパ球と同じ哺乳類種に由来する。例えば、マウスハイブリドーマは、本発明の免疫原性調製物で免疫化されたマウス由来のリンパ球を不死化マウス細胞株に融合させることによって作製され得る。好ましい不死細胞株は、ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含む培養培地 (「HAT培地」) に感受性のマウス骨髄腫細胞株である。P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653、又はSp2/O-Ag14骨髄腫株等のいくつかの骨髄腫細胞株のうちのいずれかが、標準の技法に従って融合パートナーとして使用され得る。これらの骨髄腫株は、American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD) から入手可能である。典型的には、HAT感受性マウス骨髄腫細胞は、ポリエチレングリコール (「PEG」) を使用してマウス脾細胞に融合する。その後、この融合から生じたハイブリドーマ細胞が、融合していない骨髄腫細胞及び非生産的に融合した骨髄腫細胞を死滅させるHAT培地を使用して選択される (融合していない脾細胞は形質転換されていないため、数日後に死ぬ)。本発明によって包含されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、例えば、標準のELISAアッセイを使用して、ハイブリドーマ培養上清を所与のポリペプチドに結合する抗体についてスクリーニングすることによって検出される。

【0250】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを調製する代替案として、上述のポリペ

プチドのうちの1つに特異的なモノクローナルは、組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリ（例えば、抗体ファージディスプレイライブラリ）を適切なポリペプチドでスクリーニングし、それにより、ポリペプチドに結合する免疫グロブリンライブラリメンバーを単離することによって特定及び単離される。ファージディスプレイライブラリを生成及びスクリーニングするためのキットが市販されている（例えば、Pharmacia Recombinant Phage Antibody System（カタログ番号27-9400-01）、及びStratagene SurfZAP（商標）ファージディスプレイキット（カタログ番号240612）。加えて、抗体ディスプレイライブラリの生成及びスクリーニングにおける使用に特に従う方法及び試薬の例は、例えば、Ladner et al.（米国特許第5,223,409号、Kang et al.（国際公開第92/18619号）、Dower et al.（国際公開第91/17271号）、Winter et al.（国際公開第92/20791号）、Markland et al.（国際公開第92/15679号）、Breitling et al.（国際公開第93/01288号）、McCafferty et al.（国際公開第92/01047号）、Garrard et al.（国際公開第92/09690号）、Ladner et al.（国際公開第90/02809号）、Fuchs et al.（1991）（NY）9:1369-1372号、Hay et al.（1992）Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85、Huse et al.（1989）Science 246:1275-1281、Griffiths et al.（1993）EMBO J. 12:725-734、Hawkins et al.（1992）J. Mol. Biol. 226:889-896、Clarkson et al.（1991）Nature 352:624-628、Gram et al.（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:3576-3580、Garrard et al.（1991）（NY）9:1373-1377、Hoogenboom et al.（1991）Nucleic Acids Res. 19:4133-4137、Barbas et al.（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88:7978-7982、及びMcCafferty et al.（1990）Nature 348:552-554において見出すことができる。

10

20

30

【0251】

抗体の重鎖及び軽鎖CDR3ドメインが、抗原に対する抗体の結合特異性／親和性において特に重要な役割を果たすことが当該技術分野で周知であるため、上述のように調製された本発明の組換えモノクローナル抗体は、好ましくは、本明細書に記載され、かつ当該技術分野で周知の抗体の可変領域の重鎖及び軽鎖CDR3を含む。同様に、本抗体は、当該抗体の可変領域のCDR2を更に含み得る。本抗体は、当該抗体の可変領域のCDR1を更に含み得る。他の実施形態では、本抗体は、これらのCDRの任意の組み合わせを含み得る。

40

【0252】

上述の操作された抗体のCDR1、2、及び／又は3領域は、本明細書に記載される本発明の可変領域と全く同じアミノ酸配列を含み得る。しかしながら、当業者であれば、抗体、特にイントラボディが、所望の標的、例えば、表1～5に列挙されている1つ以上のバイオマーカー、及び／又はその結合パートナーに、単独で、又は免疫療法、例えば、1つ以上のバイオマーカー、かかるバイオマーカーの結合パートナー／基質、又は免疫療法と組み合わせて有効に結合する能力を依然として保持しつつ（例えば、保存的配列修飾）、正確なCDR配列からのいくつかの逸脱が可能であり得ることを理解するであろう。したがって、別の実施形態では、操作された抗体は、例えば、本明細書に記載される、又はさもなければ一般に公開されている本発明の1つ以上のCDRと50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は99.5%同一である、1つ以上のCDRで構成され得る。

50

【0253】

例えば、非ヒト抗体又はヒト抗体（例えば、ラット抗マウス／抗ヒト抗体）の構造的特徴を使用して、本発明の抗体の少なくとも1つの機能的特性、例えば、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカー、かかる1つ以上のバイオマーカーの結合パートナー／基質、及び／又は免疫チェックポイントへの結合を保持する構造的に関連するヒト抗体、特にイントラボディを生成することができる。別の機能的特性には、競合E L I S A アッセイにおける本来の既知の非ヒト又はヒト抗体の結合の阻害が含まれる。

【0254】

本発明によって包含される抗体、免疫グロブリン、及びポリペプチドは、単離された（例えば、精製された）形態で使用され得るか、又は膜若しくは脂質小胞（例えば、リポソーム）などのベクター中に含まれ得る。更に、本明細書に記載の抗体のアミノ酸配列修飾が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び／又は他の生物学的特性を改善することが望ましくあり得る。ヒト化抗体が非ヒト動物に由来する抗体のVH及びVL内のCDRのみをヒト抗体のVH及びVLのFRに単にグラフトすることによって産生された場合、抗原結合活性は、非ヒト動物に由来する元の抗体と比較して減少することが知られている。CDR内のみならずFR内の非ヒト抗体のVH及びVLのいくつかのアミノ酸残基が抗原結合活性に直接又は間接的に関連するとみなされる。したがって、これらのアミノ酸残基の、ヒト抗体のVH及びVLのFRに由来する異なるアミノ酸残基での置換により、結合活性が減少し、アミノ酸を、非ヒト動物に由来する元の抗体のアミノ酸残基で置き換えることによって補正され得る。

【0255】

同様に、修飾及び変化が本明細書に記載の抗体の構造及びそれらをコードするDNA配列においてなされ得、望ましい特徴を有する抗体及びポリペプチドをコードする機能的分子を依然として得ることができる。例えば、抗体グリコシル化パターンを調節して、例えば、安定性を増加させることができる。「改変させる」とは、抗体に見られる1つ以上の炭水化物部分を欠失させること、及び／又は抗体に存在しない1つ以上のグリコシル化部位を付加することを意味する。抗体のグリコシル化は、典型的には、N結合であり得る。

「N結合」とは、炭水化物部分のアスパラギン残基の側鎖への結合を指す。トリペプチド配列アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-トレオニン（ここで、Xは、プロリンを除く任意のアミノ酸である）は、炭水化物部分のアスパラギン側鎖への酵素結合の認識配列である。したがって、ポリペプチドにおけるこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在により、潜在的なグリコシル化部位が作製される。抗体へのグリコシル化部位の付加は、（N結合グリコシル化部位について）上に記載されるトリペプチド配列のうちの1つ以上を含むようにアミノ酸配列を改変することによって好都合に達成される。共有結合的修飾の別のタイプは、グリコシドを抗体に化学的又は酵素的にカップリングすることを含む。これらの手順は、N結合又はO結合グリコシル化のためのグリコシル化能力を有する宿主細胞における抗体の産生を必要としないという点で有利である。使用されるカップリング様式に応じて、糖が、（a）アルギニン及びヒスチジン、（b）遊離カルボキシル基、（c）遊離スルフヒドリル基、例えば、システインの遊離スルフヒドリル基、（d）遊離ヒドロキシル基、例えば、セリン、トレオニン、若しくはヒドロキシプロリンの遊離ヒドロキシル基、（e）芳香族残基、例えば、フェニルアラニン、チロシン、若しくはトリプトファンの芳香族残基、又は（f）グルタミンのアミド基に結合していてもよい。例えば、かかる方法は、WO 87 / 05330に記載されている。

【0256】

同様に、抗体上に存在するいずれの炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に達成され得る。化学的脱グリコシル化は、化合物トリフルオロメタンスルホン酸又は同等の化合物への抗体の曝露を必要とする。この処理により、抗体をインタクトに保った状態で、結合糖（N-アセチルグルコサミン又はN-アセチルガラクトサミン）を除く大半又は全ての糖の切断がもたらされる。化学的脱グリコシル化は、Sojajhret al.（1987）によって、またEdge et al.（1981）によって記載される。抗体上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura et al.（1987）によ

って記載される様々なエンドグリコシダーゼ及びエキソグリコシダーゼの使用によって達成され得る。

【0257】

他の修飾は、イムノコンジュゲートの形成を含み得る。例えば、1つのタイプの共有結合的修飾では、抗体又はタンパク質が、米国特許第4,640,835号、同第4,496,689号、同第4,301,144号、同第4,670,417号、同第4,791,192号、又は同第4,179,337号に記載の様式で、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレン等の様々な非タンパク質性ポリマーのうちの1つに共有結合的に連結される。

【0258】

本発明の抗体又は他のタンパク質の異種薬剤とのコンジュゲーションは、N-スクシンイミジル(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPD P)、スクシンイミジル(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(アジプイミド酸ジメチルHCLなど)、活性エステル(スベリン酸ジスクシンイミジルなど)、アルデヒド(グルタルアルデヒドなど)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなど)、ジイソシアネート(トルエン2,6ジイソシアネートなど)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど)を含むが、これらに限定されない、様々な二官能性タンパク質カップリング剤を使用して行われ得る。例えば、炭素標識1-イソチオシアナトベンジルメチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドの抗体へのコンジュゲーションのための例示のキレート剤である(WO 94/11026)。

【0259】

別の態様では、本発明は、細胞毒素、薬物、及び/又は放射性同位体などの治療的部分にコンジュゲートされた抗体を特色とする。細胞毒素にコンジュゲートされると、これらの抗体コンジュゲートは、「免疫毒素」と称される。細胞毒素又は細胞毒性薬剤には、細胞に有害な(例えば、細胞を死滅させる)任意の薬剤が含まれる。例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、及びピューロマイシン、並びにそれらの類似体又は相同体が挙げられる。治療薬には、代謝拮抗剤(例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)及びロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、並びにシス-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン(例えば、ダウノルビシン(以前のダウノマイシン)及びドキソルビシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(以前のアクチノマイシン)、プレオマイシン、ミトラマイシン、及びアントラマイシン(AMC))、及び抗分裂剤(例えば、ビンクリスチン及びビンブラスチン)が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体は、放射性同位体、例えば、放射性ヨウ素にコンジュゲートされて、がん等の関連障害を治療するための細胞毒性放射性医薬品を生成することができる。

【0260】

治療的有用性に加えて、コンジュゲートされた抗体は、臨床検査手順の一部として組織におけるポリペプチドレベルを監視して、例えば、所与の治療レジメンの有効性を決定するために、診断的又は予後的に有用であり得る。検出は、抗体を検出可能物質に結合(すなわち、物理的に連結)することによって促進することができる。検出可能な物質の例に

10

20

30

40

50

は、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、及び放射性物質が挙げられる。好適な酵素の例には、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼが挙げられ、好適な補欠分子族複合体の例には、フラッグタグ、mycタグ、ヘマグルチニン（HA）タグ、ストレプトアビジン／ビオチン及びアビジン／ビオチンが挙げられ、好適な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、又はフィコエリトリン（PE）が挙げられ、発光物質の例には、ルミノールが挙げられ、生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンが挙げられ、好適な放射性物質の例には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、又は ^3H が挙げられる。本明細書で使用される場合、抗体に関して「標識される」という用語は、検出可能な物質、例えば、放射性薬剤又はフルオロフォア（例えば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）又はフィコエリトリン（PE）又はインドシアニン（Cy5））を抗体にカップリングする（すなわち、物理的に連結する）ことによる抗体の直接標識、並びに検出可能な物質との反応による抗体の間接的標識を包含するよう意図されている。

10

20

30

40

50

【0261】

本発明の抗体コンジュゲートを使用して、所与の生物学的応答を修飾することができる。治療的部分が古典的な化学的治療薬に限定されると解釈されるべきではない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質又はポリペプチドであり得る。かかるタンパク質には、例えば、酵素的に活性な毒素、又はその活性断片（例えば、アブリン、リシンA、Pseudomonas外毒素、又はジフテリア毒素）、タンパク質（例えば、腫瘍壊死因子又はインターフェロン- γ ）、又は生物学的応答調整因子（例えば、リンホカイン、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、又は他のサイトカイン若しくは成長因子）が含まれ得る。

【0262】

一実施形態では、本発明で使用するための抗体は、二重特異性又は多重特異性抗体である。二重特異性抗体は、単一の抗体ポリペプチド内に2つの異なる抗原に対する結合部位を有する。抗原結合は、同時又は順次であり得る。トリオーマ及びハイブリッドハイブリッドオーマは、二重特異性抗体を分泌することができる細胞株の2つの例である。ハイブリッドハイブリッドオーマ又はトリオーマによって産生された二重特異性抗体の例は、米国特許第4,474,893号に開示されている。二重特異性抗体は、化学的手段（Staerz et al. (1985) Nature 314:628、及びPerez et al. (1985) Nature 316:354）並びにハイブリッドオーマ技術（Staerz and Bevan (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 83:1453、及びStaerz and Bevan (1986) Immunol. Today 7:241）によって構築されている。二重特異性抗体は、米国特許第5,959,084号にも記載されている。二重特異性抗体の断片は、米国特許第5,798,229号に記載されている。

【0263】

二重特異性薬剤は、異なる抗体を作製するハイブリッドオーマ又は他の細胞を融合させることによりヘテロハイブリッドオーマを作製し、その後、これらの両方の抗体を産生して共集合させるクローンを特定することによっても生成され得る。それらは、完全免疫グロブリン鎖又はFab及びFv配列等のその一部の化学的又は遺伝的コンジュゲーションによっても生成され得る。抗体成分は、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカー又はその断片を含む、本発明によって包含される1つ以上のバイオマーカーのポリペプチド又はその断片に結合することができる。一実施形態では、二重特異性抗体は、ポリペプチド又はその断片及びその天然結合パートナー又はその断片の両方に特異的に結合し得る。例えば、ヒト化、コンジュゲーション、組換え技法等の抗体を調節するための技法は、当該技術

分野で周知である。

【0264】

本発明の別の態様では、ペプチド又はペプチド模倣物を使用して、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーを含む、本発明によって包含される1つ以上のバイオマーカー、又はその断片の発現を調節し（例えば、発現を増加させるか、若しくは発現を減少させる）、かつ／又は活性を調節する（アゴナイズするか、若しくはアンタゴナイズする）ことができる。一実施形態では、それぞれの全長タンパク質の調節剤として機能する表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーのバリエーションは、変異体、例えば、切断変異体のコンビナトリアルライブラリをアンタゴニスト活性についてスクリーニングすることによって同定され得る。一実施形態では、バリエーションの多様化ライブラリが核酸レベルでのコンビナトリアル変異誘発によって生成され、多様化遺伝子ライブラリによってコードされる。バリエーションの多様化ライブラリは、潜在的なポリペプチド配列の縮重セットがポリペプチド配列のセットを内部に含む個々のポリペプチドとして発現可能であるように、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に酵素的にライゲートすることによって産生され得る。縮重オリゴヌクレオチド配列からポリペプチドバリエーションのライブラリを産生するために使用され得る様々な方法が存在する。縮重遺伝子配列の化学的合成が自動DNA合成機で行われ、その後、合成遺伝子が適切な発現ベクターにライゲートされ得る。遺伝子の縮重セットの使用により、1つの混合物における、潜在的なポリペプチド配列の所望のセットをコードする配列の全ての提供が可能になる。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法は当該技術分野で既知である（例えば、Narang, S. A. (1983) Tetrahedron 39:3、Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323、Itakura et al. (1984) Science 198:1056、Ike et al. (1983) Nucleic Acid Res. 11:477を参照のこと。

【0265】

加えて、ポリペプチドコーディング配列の断片のライブラリを使用して、所与のポリペプチドのバリエーションのスクリーニング及びその後の選択のためのポリペプチド断片の多様化集団を生成することができる。一実施形態では、コーディング配列断片のライブラリは、ニックングが1ポリペプチド当たり約1回のみ生じる条件下でポリペプチドコーディング配列の二本鎖PCR断片をヌクレアーゼで処理し、二本鎖DNAを変性させ、DNAを還元して異なるニックング産物由来のセンス／アンチセンス対を含み得る二本鎖DNAを形成し、S1ヌクレアーゼでの処理により再形成された二本鎖から一本鎖部分を除去し、結果として生じた断片ライブラリを発現ベクターにライゲートすることによって生成され得る。この方法により、ポリペプチドの様々なサイズのN末端、C末端、及び内部断片をコードする発現ライブラリが得られ得る。

【0266】

点変異又は切断によって作製されたコンビナトリアルライブラリの遺伝子産物をスクリーニングするための、かつ選択された特性を有する遺伝子産物についてcDNAライブラリをスクリーニングするためのいくつかの技法が当該技術分野で既知である。かかる技法は、ポリペプチドのコンビナトリアル変異誘発によって生成された遺伝子ライブラリの迅速なスクリーニングに適応可能である。大きい遺伝子ライブラリをスクリーニングするためのハイスループット分析に従う最も広く使用されている技法は、典型的には、遺伝子ライブラリを複製可能な発現ベクターにクローニングすることと、適切な細胞をベクターの結果として生じたライブラリで形質転換することと、所望の活性の検出が、産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下で、コンビナトリアル遺伝子を発現させることとを含む。ライブラリにおける機能的変異体の頻度を高める技法である再帰的アンサンブル変異誘発（REM）が、目的とするバリエーションを同定するためのスクリーニングアッセイと組み合わせて使用され得る（Arkin and Youvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:7811-7815、Delagrave et al. (1993) Protein Eng. 6(3

）：327-331）。一実施形態では、細胞ベースのアッセイが、多様化ポリペプチドライブラリを分析するために利用され得る。例えば、発現ベクターのライブラリは、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーを含む、本発明によって包含される1つ以上のバイオマーカー、又はその断片を通常で合成する細胞株にトランスフェクトされてもよい。その後、トランスフェクト細胞は、全長ポリペプチド及び特定の変異体ポリペプチドが産生されるように培養され、細胞上清における全長ポリペプチド活性への変異体の発現の影響が、例えば、いくつかの機能的アッセイのうちのいずれかによって検出され得る。その後、プラスミドDNAが、全長ポリペプチド活性の阻害、又はあるいは増強をスコア化する細胞から回収され、個々のクローンが更に特徴付けられ得る。

【0267】

ポリペプチドアミノ酸配列の1つ以上のアミノ酸の同じタイプのD-アミノ酸での系統的置換（例えば、L-リジンの代わりにD-リジン）を使用して、より安定したペプチドを生成することができる。加えて、目的とするポリペプチドアミノ酸配列又は実質的に同一の配列変形を含む制限ペプチドが、当該技術分野で既知の方法（参照により本明細書に組み込まれる、Rizo and Gierasch (1992) Annu. Rev. Biochem. 61:387）によって、例えば、ペプチドを環化する分子内ジスルフィド架橋を形成することができる内部システイン残基を付加することによって生成され得る。本明細書に記載されるアミノ酸配列は、当業者がペプチド配列及びその配列バリエーションに対応するポリペプチドを産生することを可能にするであろう。かかるポリペプチドは、多くの場合、より大きいポリペプチドの一部として、ペプチド配列をコードするポリヌクレオチドの発現によって原核又は真核宿主細胞中に産生され得る。あるいは、かかるペプチドは、化学的方法によって合成され得る。組換え宿主で異種タンパク質を発現させるための方法、ポリペプチドの化学的合成、及びインビトロ翻訳は、当該技術分野で周知であり、参照により本明細書に組み込まれる、Maniatis et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), 2nd Ed., Cold Spring Harbor, N. Y., Berger and Kimmel, Methods in Enzymology, Volume 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (1987), Academic Press, Inc., San Diego, Calif., Merrifield, J. (1969) J. Am. Chem. Soc. 91:501, Chaiken I. M. (1981) CRC Crit. Rev. Biochem. 11:255, Kaiser et al. (1989) Science 243:187, Merrifield, B. (1986) Science 232:342, Kent, S. B. H. (1988) Annu. Rev. Biochem. 57:957, 及び Offord, R. E. (1980) Semisynthetic Proteins, Wiley Publishing) に更に記載されている。

【0268】

ペプチドは、典型的には、直接化学合成によって産生され得る。ペプチドは、非ペプチド部分がN末端及び／又はC末端への共有結合的結合によって結合している修飾ペプチドとして産生され得る。ある特定の好ましい実施形態では、カルボキシ末端若しくはアミノ末端のいずれか、又は両方が、化学的に修飾されている。末端アミノ基及び末端カルボキシル基の最も一般的な修飾は、それぞれ、アセチル化及びアミド化である。アシル化（例えば、アセチル化）又はアルキル化（例えば、メチル化）などのアミノ末端修飾及びアミド化などのカルボキシ末端修飾、並びに環化を含む他の末端修飾が、本発明によって包含される種々の実施形態に組み込まれ得る。コア配列に対するある特定のアミノ末端修飾及び／若しくはカルボキシ末端修飾並びに／又はペプチド伸長により、増強された安定性、増加した効力及び／又は有効性、血清プロテアーゼに対する抵抗性、望ましい薬物動態学的特性等の有利な物理的、化学的、生化学的、及び薬理学的特性が提供され得る。本明細書に記載のペプチドは、例えば、患者における共刺激を改変することによって、疾患を治療するために治療的に使用され得る。

10

20

30

40

50

【0269】

ペプチド模倣薬（参照により本明細書に組み込まれる、Fauchere (1986) Adv. Drug Res. 15:29、Veber and Freidinger (1985) TINS p. 392、及びEvans et al. (1987) J. Med. Chem. 30:1229）は、通常、コンピュータ化された分子モデリングを用いて開発される。治療的に有用なペプチドと構造的に同様のペプチド模倣物を使用して、同等の治療又は予防効果をもたらすことができる。一般に、ペプチド模倣薬は、パラダイムポリペプチド（すなわち、生物学的又は薬理学的活性を有するポリペプチド）と構造的に同様であるが、当該技術分野で既知であり、かつ以下の参考文献：Spatola, A. F. “Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins” Weinstein, B., ed., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983)、Spatola, A. F., Vega Data (March 1983), Vol. 1, Issue 3, “Peptide Backbone Modifications”（一般概説）、Morley, J. S. (1980) Trends Pharm. Sci. p. 463-468（一般概説）、Hudson, D. et al. (1979) Int. J. Pept. Prot. Res. 14:177-185（-CH₂NH-、CH₂CH₂-）、Spatola, A. F. et al. (1986) Life Sci. 38:1243-1249（-CH₂-S）、Hann, M. M. (1982) J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 307-314（-CH-CH-、シス及びトランス）、Almquist, R. G. et al. (1990) J. Med. Chem. 23:1392-1398（-COCH₂-）、Jennings-White, C. et al. (1982) Tetrahedron Lett. 23:2533（-COCH₂-）、Szelke, M. et al. European Appln. EP 45665 (1982) CA:97:39405 (1982)（-CH(OH)CH₂-）、Holladay, M. W. et al. (1983) Tetrahedron Lett. (1983) 24:4401-4404（-C(OH)CH₂-）、及びHruby, V. J. (1982) Life Sci. (1982) 31:189-199（-CH₂-S-）に更に記載される方法により、-CH₂NH-、-CH₂S-、-CH₂-CH₂-、-CH=CH-（シス及びトランス）、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-、及び-CH₂SO-からなる群から選択される結合によって任意に置き換えられる1つ以上のペプチド結合を有する。特に好ましい非ペプチド結合は、-CH₂NH-である。かかるペプチド模倣物は、例えば、より経済的な産生、より高い化学的安定性、増強された薬理学的特性（半減期、吸収、効力、有効性等）、改変された特異性（例えば、生物学的活性の広域スペクトル）、低下した抗原性等を含む、ポリペプチド実施形態に優る重大な利点を有し得る。ペプチド模倣薬の標識は、通常、定量的構造活性データ及び／又は分子モデリングによって予測されるペプチド模倣薬上の非干渉位置への1つ以上の標識の直接又はスパーサー（例えば、アミド基）を介した共有結合的結合を伴う。かかる非干渉位置は、概して、ペプチド模倣薬が結合して治療効果をもたらすマクロポリペプチドとの直接接触を形成しない位置である。ペプチド模倣薬の誘導体化（例えば、標識）は、ペプチド模倣薬の所望の生物学的又は薬理学的活性に実質的に干渉してはならない。

【0270】

例えば、本明細書に記載の又は表1～5に列挙されるバイオマーカーとそれらの天然結合パートナーとの間の相互作用を調節する（増強又は阻害のいずれか）ことができる小分子も本発明によって包含される。本発明の小分子は、空間的にアドレス可能な並列固相又は溶液相ライブラリ、デコンボリューションを必要とする合成ライブラリ法、「1ビーズ1化合物」ライブラリ法、及び親和性クロマトグラフィー選択を使用した合成ライブラリ法を含む当該技術分野で既知のコンビナトリアルライブラリ法における多数のアプローチのうちのいずれかを使用して得られ得る。（Lam, K. S. (1997) Anticancer Drug Des. 12:145）。

【0271】

分子ライブラリを合成するための方法の例は、当該技術分野で、例えば、Dewitt et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 6909、Erb et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91: 11422、Zuckermann et al. (1994) J. Med. Chem. 37: 2678、Cho et al. (1993) Science 261: 1303、Carrell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059、Carell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061、及び Gallop et al. (1994) J. Med. Chem. 37: 1233で見つけることができる。

10

【0272】

化合物のライブラリは、溶液中に（例えば、Houghten (1992) Biotechniques 13: 412-421）、又はビーズ上に（Lam (1991) Nature 354: 82-84）、チップ上に（Fodor (1993) Nature 364: 555-556）、細菌上に（Ladner USP 5, 223, 409）、胞子上に（Ladner USP 409）、プラスミド上に（Cull et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89: 1865-1869）、又はファージ上に（Scott and Smith (1990) Science 249: 386-390）、（Devlin (1990) Science 249: 404-406）、（Cwirlla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87: 6378-6382）、（Felicci (1991) J. Mol. Biol. 222: 301-310）（Ladner（上記参照））提示され得る。化合物は、細胞ベースのアッセイ又は非細胞ベースのアッセイでスクリーニングされ得る。化合物は、プール中で（例えば、各試験試料中の複数の化合物）又は個別の化合物としてスクリーニングされ得る。

20

【0273】

キメラ又は融合タンパク質は、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの阻害剤、及び／又は表1～5に列挙されるバイオマーカーを含む、本発明によって包含されるバイオマーカー、若しくはその断片への阻害剤などの本明細書に記載される免疫療法のための薬剤のために調製することができる。本明細書で使用される場合、「キメラタンパク質」又は「融合タンパク質」は、それぞれのバイオマーカーと実質的に相同ではないタンパク質に対応するアミノ酸配列を有する別のポリペプチドに作動可能に連結された、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーを含む、本発明によって包含される1つ以上のバイオマーカー、又はその断片を含む。好ましい実施形態では、融合タンパク質は、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーを含む、本発明によって包含される1つ以上のバイオマーカー、又はその断片の少なくとも1つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質において、「作動可能に連結される」という用語は、融合から独立して発現されたときに呈される機能を保存する方法で、バイオマーカー配列及び非バイオマーカー配列が互いにインフレームで融合していることを指すよう意図されている。「別の」配列が、それぞれ、バイオマーカー配列のN末端又はC末端に融合し得る。

30

40

【0274】

かかる融合タンパク質は、第1のペプチドをコードするヌクレオチド配列及び第2のペプチドをコードするヌクレオチド配列の組換え発現によって産生され得る。第2のペプチドは、任意に、第1のペプチドの溶解度、親和性、安定性、又は原子価を改変する部分、例えば、免疫グロブリン定常領域に対応し得る。別の好ましい実施形態では、第1のペプチドは、生物学的に活性な分子の一部（例えば、ポリペプチドの細胞外部分又はリガンド結合部分）からなる。第2のペプチドは、免疫グロブリン定常領域、例えば、ヒトC γ 1ドメイン又はC γ 4ドメイン（例えば、ヒトIgC γ 1又はヒトIgC γ 4のヒンジ、CH2、及びCH3領域、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Capon et al. 米国特許第5, 116, 964号、同第5, 580, 756号、同第5, 844,

50

095号等を参照のこと）を含み得る。かかる定常領域は、エフェクター機能（例えばFc受容体結合）を媒介する領域を保持し得るか、又はエフェクター機能を低下させるように改変され得る。結果として生じた融合タンパク質は、独立して発現された第1のペプチドと比較して改変された溶解度、結合親和性、安定性、及び／又は原子価（すなわち、1ポリペプチド当たりの利用可能な結合部位の数）を有し得、タンパク質精製の効率を高め得る。組換え技法によって産生された融合タンパク質及びペプチドが分泌され、細胞とそのタンパク質又はペプチドを含有する培地との混合物から単離され得る。あるいは、タンパク質又はペプチドは、細胞質的に保持され、細胞が採取され、溶解し、タンパク質が単離され得る。細胞培養物は、典型的には、宿主細胞、培地、及び他の副産物を含む。細胞培養に好適な培地は、当該技術分野で周知である。タンパク質及びペプチドは、タンパク質及びペプチドを精製するための当該技術分野で公知の技法を使用して、細胞培養培地、宿主細胞、又は両方から単離され得る。宿主細胞をトランスフェクトするための技法及びタンパク質及びペプチドを精製するための技法は、当該技術分野で既知である。

10

20

30

40

50

【0275】

好ましくは、本発明によって包含される融合タンパク質は、標準の組換えDNA技法によって産生される。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNA断片が、従来の技法に従って、例えば、ライゲーションのための平滑末端化又はスタグガー末端化末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、適切な場合、付着末端の充填、望ましくない連結を回避するためのアルカリ性ホスファターゼ処理、及び酵素的ライゲーションを用いて、一緒にインフレームでライゲートされる。別の実施形態では、融合遺伝子は、自動DNA合成機を含む従来の技法によって合成され得る。あるいは、遺伝子断片のPCR増幅は、2つの連続した遺伝子断片間の相補的オーバーハングをもたらすアンカープライマーを使用して行われ得、その後、これがアニール及び再増幅されて、キメラ遺伝子配列を生成することができる（例えば、Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992を参照のこと）。

【0276】

本発明によって包含される融合タンパク質を免疫原として使用して、対象において抗体を産生することができる。かかる抗体は、融合タンパク質が生成されたそれぞれの天然ポリペプチドを精製するために使用され得るか、又はスクリーニングアッセイにおいて1つ以上のバイオマーカーポリペプチド又はその断片とその天然結合パートナー又はその断片との間の相互作用を阻害するポリペプチドを特定するために使用され得る。

【0277】

少なくとも1、2、3、4、5、10、20個、又はもっと多くの小核酸又はアンチセンスオリゴヌクレオチド、又はそれらの誘導体を含むか、又は発現することができる1つ以上の核酸を含み、細胞における上述の小核酸又はアンチセンスオリゴヌクレオチド、又はそれらの誘導体が、細胞条件下で細胞核酸（例えば、miRNA、pre-miRNA、pri-miRNA、miRNA*、抗miRNA、miRNA結合部位、そのバリエーション及び／又は機能的バリエーション、細胞mRNA又はそれらの断片などの小さな非コードRNAs）と特異的にハイブリダイズする（例えば、結合する）組成物も本明細書に提供される。一実施形態では、細胞における小核酸若しくはアンチセンスオリゴヌクレオチド、又はそれらの誘導体の発現は、例えば、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーを含む、例えば、本発明によって包含される1つ以上のバイオマーカー、又はその断片の転写、翻訳、及び／又は小核酸処理を阻害することによって、細胞核酸及び／又はタンパク質の発現又は生物学的活性を阻害することができる。一実施形態では、小核酸又はアンチセンスオリゴヌクレオチド、又はそれらの誘導体は、小RNA（例えば、マイクロRNA）又は小RNAの相補体である。別の実施形態では、小核酸又はアンチセンスオリゴヌクレオチド、又はそれらの誘導体は、一本鎖又は二本鎖であってもよく、少なくとも6ヌクレオチド長であり、約1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、50、40、30、25、24、23、22、21、20、19、1

8、17、16、15、又は10ヌクレオチド長未満である。別の実施形態では、組成物は、小核酸又はアンチセンスオリゴヌクレオチド、又はそれらの誘導体を含むか、又は発現することができる核酸のライブラリ、あるいは上述の小核酸又はアンチセンスオリゴヌクレオチド、又はそれらの誘導体のプールを含み得る。核酸プールは、小核酸又はアンチセンスオリゴヌクレオチド、又はそれらの誘導体を含むか、又は発現することができる約2～5、5～10、10～20、10～30、又はもっと多くの核酸を含み得る。一実施形態では、結合は、従来の塩基対相補性によるものであってもよく、又は例えば、DNA二本鎖への結合の場合、二重らせんの主要な溝における特異的な相互作用を介するものであってもよい。一般に、「アンチセンス」は、当該技術分野で一般的に用いられる範囲の技術を指し、オリゴヌクレオチド配列への特異的結合に依存する任意のプロセスを含む。

10

【0278】

miRNA活性を妨げることなくmiRNA又はプレmiRNAの配列に修飾が行われ得ることが当該技術分野で周知である。本明細書で使用される場合、miRNA配列の「機能的バリエーション」という用語は、天然miRNA配列とは異なるが、miRNAの1つ以上の機能的特徴（例えば、がん細胞増殖阻害、がん細胞アポトーシスの誘導、化学療法剤に対するがん細胞感受性の増強、特異的なmiRNA標的阻害）を保持するオリゴヌクレオチド配列を指す。いくつかの実施形態では、miRNA配列の機能的バリエーションは、miRNAの機能的特徴の全てを保持する。特定の実施形態では、miRNA配列の機能的バリエーションは、約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、又はもっと多くの核酸塩基の領域にわたって、miRNA又はその前駆体に対して少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%同一であるか、又は機能的バリエーションが、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でmiRNA又はその前駆体の相補体にハイブリダイズする、核酸塩基配列を有する。したがって、特定の実施形態では、機能的バリエーションの核酸塩基配列は、miRNAの1つ以上の標的配列にハイブリダイズすることができる。

20

【0279】

本明細書に記載されるmiRNA及びそれらの対応するステムループ配列は、microna.sanger.ac.uk.でのワールドワイドウェブ上に見出される、miRNA配列及びアノテーションのオンライン検索可能なデータベースであるmiRBase中に見出されてもよい。miRBase Sequenceデータベース中のエントリは、miRNA転写物の予測ヘアピン部分（ステムループ）を表し、成熟miRNA配列の位置及び配列に関する情報を有する。このデータベース中のmiRNAステムループ配列は、厳密には前駆体miRNA（プレmiRNA）ではなく、いくつかの例では、推定一次転写物由来のプレmiRNA及びいくつかの隣接配列を含み得る。本明細書に記載のmiRNA核酸塩基配列は、miRBase配列データベースのリリース10.0に記載される配列、及び任意のそれより前のリリースのmiRBase配列データベースに記載される配列を含む、任意のバージョンのmiRNAを包含する。配列データベースのリリースは、特定のmiRNAの再命名が生じる場合がある。配列データベースのリリースは、成熟miRNA配列の多様性を生じる場合がある。

30

40

【0280】

いくつかの実施形態では、本発明によって包含されるmiRNA配列は、miRNA配列と同じRNA分子上又は別個のRNA分子上に位置し得る第2のRNA配列と関連付けられ得る。このような場合、miRNA配列は、活性鎖と呼ばれてもよく、一方、miRNA配列に少なくとも部分的に相補的である第2のRNA配列は、相補鎖と呼ばれてもよい。活性鎖及び相補鎖をハイブリダイゼーションして、天然に存在するmiRNA前駆体に類似する二本鎖RNAを作製する。miRNAの活性は、活性鎖の取り込みを最大化し、遺伝子翻訳を制御するmiRNAタンパク質複合体による相補鎖の取り込みを最小化す

50

ることによって最適化され得る。これは、相補鎖の修飾及び／又は設計を通じて行うことができる。

【0281】

いくつかの実施形態では、相補鎖は、その5'末端にリン酸又はヒドロキシル以外の化学基が存在するように修飾される。5'修飾の存在は、相補鎖の取り込みを明らかに除外し、その後、miRNAタンパク質複合体による活性鎖の取り込みに有利になる。5'修飾は、NH₂、NHCOCH₃、及びビオチンを含む、当該技術分野で知られている様々な分子のうちのいずれかであり得る。

【0282】

別の実施形態では、miRNA経路による相補鎖の取り込みは、相補鎖の最初の2～6ヌクレオチドに糖修飾を有するヌクレオチドを組み込むことによって低減される。かかる糖修飾は、miRNA活性を更に増強するために、上述の5'末端修飾と組み合わせることができることに留意されたい。

【0283】

いくつかの実施形態では、相補鎖は、相補鎖の3'末端のヌクレオチドが活性鎖に相補的ではないように設計される。これにより、活性鎖の3'末端において安定であるが、活性鎖の5'末端において比較的不安定な二本鎖ハイブリッドRNAが生じる。この安定性の差は、miRNA経路による活性鎖の取り込みを増強する一方で、相補鎖の取り込みを減少させ、それによってmiRNA活性を増強する。

【0284】

本明細書に提示される方法及び組成物の小核酸及び／又はアンチセンス構築物は、例えば、細胞内で転写されると、細胞核酸（例えば、小RNA、mRNA、及び／又はゲノムDNA）の少なくとも固有の部分に相補的なRNAを産生する発現プラスミドとして送達され得る。あるいは、小核酸分子は、mRNA、miRNA、プレmiRNA、プリmiRNA、miRNA*、抗miRNA、又はmiRNA結合部位、又はそれらのバリエーションをコードするRNAを産生することができる。例えば、miRNAを発現するのに好適なプラスミドの選択、核酸配列をプラスミドに挿入する方法、及び目的の細胞に組換えプラスミドを送達する方法は、当該技術分野の技術範囲内である。例えば、開示全体が参照により本明細書に組み込まれる、Zeng et al. (2002) Mol. Cell 9:1327-1333、Tuschl (2002), Nat. Biotechnol. 20:446-448、Brummelkamp et al. (2002) Science 296:550-553、Miyagishi et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:497-500、Paddison et al. (2002) Genes Dev. 16:948-958、Lee et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:500-505、及びPaul et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:505-508を参照のこと。

【0285】

あるいは、小核酸及び／又はアンチセンス構築物は、エキスピボで生成され、細胞に導入されると、細胞核酸とのハイブリダイゼーションを生じる、オリゴヌクレオチドプローブである。かかるオリゴヌクレオチドプローブは、好ましくは、内因性ヌクレアーゼ、例えば、エキソヌクレアーゼ及び／又はエンドヌクレアーゼに耐性があり、したがってインピボで安定である、修飾オリゴヌクレオチドである。小核酸及び／又はアンチセンスオリゴヌクレオチドとして使用するための例示的な核酸分子は、DNAのホスホラミデート、ホスホチオエート及びメチルホスホネート類似体である（米国特許第5,176,996号、同第5,264,564号、及び同第5,256,775号も参照されたい）。更に、アンチセンス療法に有用なオリゴマーを構築する一般的なアプローチは、例えば、Van der Krol et al. (1988) BioTechniques 6:958-976、及びStein et al. (1988) Cancer Res 48:2659-2668によって概説されている。

【0286】

アンチセンスアプローチは、細胞核酸に相補的である（例えば、表 1～5 に列挙されるバイオマーカーに相補的である）オリゴヌクレオチド（DNA 又は RNA のいずれか）の設計を伴っていてもよい。絶対的な相補性は必要とされない。したがって、二本鎖アンチセンス核酸の場合、二本鎖 DNA の一本鎖を試験してもよく、又は三本鎖形成をアッセイしてもよい。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度及びアンチセンス核酸の長さの両方に依存するであろう。一般に、ハイブリダイズする核酸が長ければ長いほど、核酸（例えば、RNA）との塩基ミスマッチが多くなり、安定な二本鎖（又は場合によっては、三本鎖）を含有し、依然として形成し得る。当業者であれば、ハイブリダイゼーション複合体の融点を決定するための標準手順を使用することによって、許容可能な程度のミスマッチを確認することができる。

10

【0287】

mRNA の 5' 末端に相補的なオリゴヌクレオチド、例えば、AUG 開始コドンまで、及びそれを含む 5' 非翻訳配列は、翻訳の阻害において最も効率的に作用するべきである。しかしながら、mRNA の 3' 非翻訳配列に相補的な配列は、近年、mRNA の翻訳を阻害するのにも有効であることが示されている（Wagner (1994) Nature 372:333）。したがって、遺伝子の 5' 又は 3' 非翻訳非コーディング領域のいずれかに相補的なオリゴヌクレオチドが、アンチセンスアプローチで使用され、内因性 mRNA の翻訳を阻害することができる。mRNA の 5' 非翻訳領域に相補的なオリゴヌクレオチドとしては、AUG 開始コドンの相補体が挙げられ得る。mRNA コーディング領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、翻訳の効率的な阻害剤ではないが、本明細書に提示される方法及び組成物に従って使用することもできる。細胞 mRNA の 5'、3'、又はコーディング領域にハイブリダイズするように設計されているかどうかにかかわらず、小核酸及び／又はアンチセンス核酸は、少なくとも 6 ヌクレオチド長であるべきであり、約 1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、50、40、30、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、又は 10 ヌクレオチド長未満であり得る。

20

【0288】

標的配列の選択にかかわらず、遺伝子発現を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドの能力を定量化するために、インビトロ研究が最初に行われることが好ましい。一実施形態では、これらの研究は、アンチセンス遺伝子阻害とオリゴヌクレオチドの非特異的生物学的効果とを区別する対照を利用する。別の実施形態では、これらの研究は、標的核酸又はタンパク質のレベルを、内部対照核酸又はタンパク質のレベルと比較する。更に、アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して得られた結果を、対照オリゴヌクレオチドを使用して得られた結果と比較することが想定される。対照オリゴヌクレオチドは、試験オリゴヌクレオチドとほぼ同じ長さであり、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列は、標的配列への特異的ハイブリダイゼーションを防止するために必要なものを越えないようにアンチセンス配列と異なることが好ましい。

30

【0289】

小核酸及び／又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA 若しくは RNA、若しくはキメラ混合物若しくは誘導体、又はその修飾態様、一本鎖又は二本鎖であり得る。小核酸及び／又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション等を改善するために、塩基部分、糖部分、又はリン酸骨格で修飾されていてもよく、他の付加基、例えば、ペプチド（例えば、宿主細胞受容体を標的とするための）、又は細胞膜を横切る輸送を促進する薬剤（例えば、Letsinger et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86:6553-6556、Lemaitre et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84:648-652、PCT 公開第 88/09810 号を参照のこと）、又は血液脳関門（例えば、PCT 公開第 89/10134 号を参照のこと）、ハイブリダイゼーション誘発切断剤。（例えば、Krol et al. (1988) BioTech. 6:958-976 を参照のこと）又は挿入剤。（例えば、Zon (1988

40

50

Pharm. Res. 5: 539-549) を含み得る。この目的のために、小核酸及び／又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、別の分子、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発切断剤などにコンジュゲートされ得る。

【0290】

小核酸及び／又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、限定されないが、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシチエチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルラシル、ジヒドロウラシル、 β -D-ガラクトシルケオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルイノシン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルケオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイブトキソシン(wybutoxosine)、プソイドウラシル、ケオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、及び2,6-ジアミノプリンを含む群から選択される少なくとも1つの修飾塩基部分を含んでいてもよい。小核酸及び／又はアンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、アラビノース、2-フルオロアラビノース、キシルロース、及びヘキソースを含むが、これらに限定されない群から選択される少なくとも1つの修飾糖部分を含んでいてもよい。

【0291】

特定の実施形態では、化合物は、得られるオリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、又は細胞取り込みを増強する1つ以上の部分にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチド(例えば、miRNA又はオリゴヌクレオチドをコードするmiRNA)を含む。特定のそのような実施形態では、その部分は、コレステロール部分(例えばアンタゴミル)又は脂質部分又はリボソームコンジュゲートである。コンジュゲーションのための更なる部分としては、炭水化物、リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸塩、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、及び色素が挙げられる。特定の実施形態では、共役基は、オリゴヌクレオチドに直接結合する。特定の実施形態では、共役基は、アミノ、ヒドロキシル、カルボン酸、チオール、不飽和(例えば、二重又は三重結合)、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸(ADO)、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、6-アミノヘキサン酸(AHEx又はAHA)、置換C1-C10アルキル、置換又は非置換C2-C10アルケニル、及び置換又は非置換C2-C10アルキニルから選択される連結部分によってオリゴヌクレオチドに結合する。特定のそのような実施形態では、置換基は、ヒドロキシル、アミノ、アルコキシ、カルボキシ、ベンジル、フェニル、ニトロ、チオール、チオアルコキシ、ハロゲン、アルキル、アリール、アルケニル、及びアルキニルから選択される。特定の実施形態では、化合物は、オリゴヌクレオチドの一方又は両方の末端に接続して、例えばヌクレアーゼ安定性などの特性を増強する1つ以上の安定化基を有するオリゴヌクレオチドを含む。安定化基には、キャップ構造が含まれる。これらの末端修飾は、オリゴヌクレオチドをエキソヌクレアーゼ分解から保護し、細胞内の送達及び／又は局在化を補助することができる。キャップは、5'末端(5'キャップ)、又は3'末端(3'キャップ)に存在し得るか、又は両方の末端に存在し得る。キャップ構造には、例えば、逆デオキシ脱塩基性キャップが含まれる。

【0292】

好適なキャップ構造としては、4',5'-メチレンヌクレオチド、1-(β -D-エリ 50

スロフラノシル)ヌクレオチド、4'-チオヌクレオチド、炭素環式ヌクレオチド、1,5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド、L-ヌクレオチド、アルファ-ヌクレオチド、修飾塩基ヌクレオチド、ホスホロジチオエート結合、トレオペンツフラノシルヌクレオチド、非環状3',4'-セコヌクレオチド、非環状3,4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド、非環状3,5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、3'-3'-反転ヌクレオチド部分、3'-3'-反転脱塩基部分、3'-2'-反転ヌクレオチド部分、3'-2'-反転脱塩基部分、1,4-ブタンジオールホスフェート、3'-ホスホラミデート、ヘキシルホスフェート、アミノヘキシルホスフェート、3'-ホスフェート、3'-ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、架橋メチルホスホネート部分、及び非架橋メチルホスホネート部分、5'-アミノ-アルキルホスフェート、1,3-ジアミノ-2-プロピルホスフェート、3-アミノプロピルホスフェート、6-アミノヘキシルホスフェート、1,2-アミノドデシルホスフェート、ヒドロキシプロピルホスフェート、5'-5'-反転ヌクレオチド部分、5'-5'-反転脱塩基部分、5'-ホスホラミデート、5'-ホスホロチオエート、5'-アミノ、架橋及び／又は非架橋5'-ホスホラミデート、ホスホロチオエート、及び5'-メルカプト部分が挙げられる。

【0293】

小核酸及び／又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、中性ペプチド様骨格も含有し得る。かかる分子は、ペプチド核酸(PNA)-オリゴマーと称され、例えば、Perry-O'Keefe et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:14670及びEgloff et al. (1993) Nature 365:566に記載される。PNAオリゴマーの1つの利点は、DNAの中性骨格に起因する培地のイオン強度から本質的に独立して相補的DNAに結合するそれらの能力である。更に別の実施形態では、小核酸及び／又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホラミドチオエート、ホスホラミデート、ホスホルジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、及びホルムアセタール又はそれらの類似体からなる群から選択される少なくとも1つの修飾されたリン酸骨格を含む。更なる実施形態では、小核酸及び／又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、 α -アノマーオリゴヌクレオチドである。 α -アノマーオリゴヌクレオチドは、通常のb単位とは対照的に鎖が互いに平行に走る相補的RNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成する(Gautier et al. (1987) Nucl. Acids Res. 15:6625-6641)。オリゴヌクレオチドは、2'-O-メチルリボヌクレオチド(Inoue et al. (1987) Nucl. Acids Res. 15:6131-6148)、又はキメラRNA-DNA類似体(Inoue et al. (1987) FEBS Lett. 215:327-330)である。

【0294】

本明細書に提示される方法及び組成物の小核酸及び／又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、当該技術分野で既知の標準的な方法によって、例えば、自動DNA合成機(例えば、Biosearch, Applied Biosystemsなどから市販されている)の使用によって合成され得る。例として、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、Stein et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16:3209の方法によって合成されてもよく、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは、孔径が制御されたガラスポリマー支持体(Sarin et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:7448-7451)などの使用によって調製することができる。例えば、単離されたmiRNAは、当該技術分野で既知の方法を使用して化学合成又は組換え産生され得る。いくつかの例では、miRNAは、適切に保護されたリボヌクレオシドホスホラミダイト及び従来のDNA/RNA合成機を使用して、化学合成される。合成RNA分子又は合成試薬の商業的供給業者としては、例えば、Proligo (Hamburg, Germany)、Dharmacon Research (Lafayette, Colo., U. S. A.)、Pierce Chemical (Perbio Scienceの一部、Rockford, Ill., U. S.

A.)、Glen Research (Sterling, Va., U. S. A.)、ChemGenes (Ashland, Mass., U. S. A.)、Cruachem (Glasgow, UK)、及びExiqon (Vedbaek, Denmark)が挙げられる。

【0295】

小核酸及び／又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、インビボで細胞に送達され得る。小核酸及び／又はアンチセンスオリゴヌクレオチドのDNA又はRNAを細胞に送達するためのいくつかの方法が開発されており、例えば、アンチセンス分子を組織部位に直接注入することができ、又は所望の細胞を標的にするように設計された修飾アンチセンス分子（例えば、標的細胞表面上で発現される受容体又は抗原に特異的に結合するペプチド又は抗体に接続するアンチセンス）を系統的に投与することができる。

10

【0296】

一実施形態では、小核酸及び／又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞内で発現されると、細胞核酸（例えば、mRNA）配列に完全に相補的な配列が分解を媒介するか、又は細胞核酸（例えば、mRNA）に不完全に相補的な配列が翻訳抑制を媒介する、二本鎖低分子干渉RNA (siRNA)、又はpiwiRNAを含み得るか、又はそれから生成され得る。別の実施形態では、二本鎖siRNAは、一本鎖細胞RNA（例えば、マイクロRNA）に結合し、それらの発現を阻害する一本鎖アンチセンスRNAに処理され得る。RNA干渉 (RNAi) は、サイレンシングされた遺伝子に対して配列が相同の二本鎖RNA (dsRNA) によって開始される、動物及び植物における配列特異的な転写後遺伝子サイレンシングのプロセスである。インビボでは、長いdsRNAが、リボヌクレアーゼIIIによって切断され、21及び22ヌクレオチドのsiRNAを生成する。21ヌクレオチドのsiRNA二本鎖が、ヒト胚腎臓 (293) 及びHeLa細胞を含む異なる哺乳動物細胞株において、内因性及び異種遺伝子の発現を特異的に抑制することが示されている (Elbashir et al. (2001) Nature 411: 494-498)。したがって、細胞内の遺伝子の翻訳は、細胞を、約15～30ヌクレオチド又は約18～21ヌクレオチド又は約19～21ヌクレオチドの長さを有する短い二本鎖RNAと接触させることによって阻害することができる。あるいは、siRNAに代謝されるかかかるsiRNA又は短ヘアピンRNA (shRNA) をコードするベクターを標的細胞に導入することができる（例えば、McManus et al. (2002) RNA 8: 842、Xia et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20: 1006、及びBrummelkamp et al. (2002) Science 296: 550を参照のこと）。使用することができるベクターは、例えば、pSuper RNAi System (商標) という名称でOligoEngineから市販されている。

20

30

【0297】

細胞mRNA転写物を触媒的に切断するように設計されたリボザイム分子は、細胞mRNAの翻訳及び細胞ポリペプチドの発現、又はその両方を防止するためにも使用され得る（例えば、1990年10月4日に公開されたPCT国際公開第90/11364号、Sarver et al. (1990) Science 247: 1222-1225及び米国特許第5,093,246号を参照されたい）。部位特異的認識配列でmRNAを切断するリボザイムを使用して細胞mRNAを破壊することができるが、ハンマーヘッド型リボザイムの使用が好ましい。ハンマーヘッド型リボザイムは、標的mRNAと相補的塩基対を形成する隣接領域により指示された位置でmRNAを切断する。唯一の必要性は、2つの塩基の配列：5'-UG-3'を標的mRNAが有することである。ハンマーヘッド型リボザイムの構築及び産生は、当該技術分野で周知であり、Haseloff and Gerlach (1988) Nature 334: 585-591に更に完全に記載されている。リボザイムは、切断認識部位が細胞mRNAの5'末端近くに位置するように、すなわち、効率を高め、非機能性mRNA転写物の細胞内蓄積を最小限に抑えるように操作され得る。

40

50

【0298】

本明細書に提示される方法のリボザイムにはまた、RNAエンドリボヌクレアーゼ（以下「Cech型リボザイム」）、例えば、*Tetrahymena thermophila*において天然に存在し（IVS、又はL-19 IVS RNAとしても知られる）、Thomas Cech及び共同研究者（Zaug et al. (1984) Science 224: 574-578、Zaug et al. (1986) Science 231: 470-475、Zaug et al. (1986) Nature 324: 429-433、WO88/04300、Been et al. (1986) Cell 47: 207-216）によって広範に記載されているものも含まれる。Cech型リボザイムは、標的RNA配列にハイブリダイズし、その後、標的RNAの切断が行われる8塩基対活性部位を有する。本明細書に提示される方法及び組成物は、細胞遺伝子中に存在する8塩基対活性部位配列を標的とするCech型リボザイムを包含する。

10

【0299】

アンチセンスアプローチと同様に、リボザイムは、修飾オリゴヌクレオチドから構成され得る（例えば、改善された安定性、標的化などのために）。好ましい送達方法は、形質転換細胞が内因性細胞メッセージを破壊し、翻訳を阻害するのに十分な量のリボザイムを産生するように、強力な構成的pol III又はpol IIIプロモーターの制御下でリボザイムを「コードする」DNA構築物を使用することを伴う。リボザイムは、アンチセンス分子とは異なり、触媒的であるため、効率のために必要なのは、より低い細胞内濃度である。

20

【0300】

細胞遺伝子の転写の阻害のために三重らせん形成に使用される核酸分子は、好ましくは一本鎖であり、デオキシリボヌクレオチドから構成される。これらのオリゴヌクレオチドの塩基組成は、Hoogsteen塩基対合規則によって三重らせん形成を促進すべきであり、これは一般に、プリン又はピリミジンのいずれかのかなり大きな伸長部が二本鎖の1つの鎖上に存在することを必要とする。ヌクレオチド配列は、ピリミジン系であってもよく、これは得られた三重らせんの3つの会合する鎖にわたるTAT及びCGC三重鎖を生じる。ピリミジンを豊富に含む分子は、その鎖と平行な配向で二本鎖のうちの一本鎖のプリンを豊富に含む領域に対する塩基相補性を提供する。加えて、核酸分子は、例えば、G残基の伸長部を含有する、プリンを豊富に含むものを選択することができる。これらの分子は、プリン残基の大部分が標的二本鎖のうちの一本鎖上に位置する、GC対が豊富なDNA二本鎖を有する三重らせんを形成し、三本鎖中の3つの鎖にわたってCGC三本鎖を生じる。

30

【0301】

あるいは、三重らせん形成のために標的化され得る潜在的配列は、いわゆる「スイッチバック」核酸分子を作製することによって増加し得る。スイッチバック分子は、交互に5'-3'、3'-5'様式で合成され、その結果、それらが二本鎖の第1の鎖と塩基対になり、次いで他方と対になり、プリン又はピリミジンのいずれかのかなり大きな伸長部が二本鎖の1つの鎖上に存在する必要性を除外する。本明細書に提示される方法及び組成物の小核酸（例えば、miRNA、pre-miRNA、primiRNA、miRNA*、anti-miRNA、又はmiRNA結合部位、又はそれらのバリエーション）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、及び三重らせん分子は、DNA及びRNA分子の合成のための当該技術分野で知られている任意の方法によって調製され得る。これらには、例えば固相ホスホラミダイト化学合成などの当該技術分野で周知のオリゴデオキシリボヌクレオチド及びオリゴリボヌクレオチドを化学合成するための技法が含まれる。あるいは、RNA分子は、アンチセンスRNA分子をコードするDNA配列のインビトロ及びインビボ転写によって生成され得る。かかるDNA配列は、T7又はSP6ポリメラーゼプロモーターなどの好適なRNAポリメラーゼプロモーターを組み込む多種多様なベクターに組み込まれ得る。あるいは、使用されるプロモーターに応じて、アンチセンスRNAを構成的又は誘導的に合成するアンチセンスcDNA構築物を、細胞株に安定的に導入することができる。

40

50

【0302】

更に、核酸分子への様々な周知の修飾が、細胞内安定性及び半減期を増加させる手段として導入され得る。考えられる修飾としては、限定されないが、分子の5'末端及び／又は3'末端に対するリボヌクレオチド若しくはデオキシリボヌクレオチドの隣接配列の付加、又はオリゴデオキシリボヌクレオチド骨格内のホスホジエステラーゼ結合以外のホスホロチオエート若しくは2' O-メチルの使用が挙げられる。当業者は、ポリペプチド、小核酸、及びアンチセンスオリゴヌクレオチドが、例えば、タンパク質検出手段として機能する別のペプチド又はポリペプチド（例えば、異種ペプチド）に更に連結され得ることを容易に理解するであろう。本発明における検出に有用な標識ペプチド又はポリペプチド部分の非限定的な例としては、限定されないが、好適な酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼ；エピトープタグ、例えば、FLAG、MYC、HA、又はHISタグ；フルオロフォア、例えば、緑色蛍光タンパク質；染料；放射性同位体；ジゴキシゲニン；ビオチン；抗体；ポリマー、並びに当該技術分野で既知の他のもの、例えば、Principles of Fluorescence Spectroscopy, Joseph R. Lakowicz (Editor), Plenum Pub Corp, 2nd edition (July 1999)におけるものが挙げられる。

10

【0303】

本明細書に記載の調節剤（例えば、抗体、小分子、ペプチド、融合タンパク質、又は小核酸）が薬学的組成物に組み込まれ、インビボで対象に投与され得る。本組成物は、単一のかかる分子若しくは薬剤又は本明細書に記載の薬剤の任意の組み合わせを含み得る。本明細書に記載の「単一の活性薬剤」は、本明細書に提供される方法及び組成物による当該技術分野で既知の他の薬理学的に活性な化合物（「第2の活性薬剤」）と組み合わせられ得る。

20

【0304】

本明細書に記載のバイオマーカー核酸及び／又はバイオマーカーポリペプチド分子の産生及び使用は、標準の組換え技法を使用することによって容易になり得る。いくつかの実施形態では、かかる技法は、バイオマーカーポリペプチド又はかかるポリペプチドの一部をコードする核酸を含むベクター、好ましくは発現ベクターを使用する。本明細書で 사용되는場合、「ベクター」という用語は、連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。1つの種類のベクターは、追加のDNAセグメントがライゲートされ得る環状二本鎖DNAループを指す「プラスミド」である。別の種類のベクターは、追加のDNAセグメントがウイルスゲノムにライゲートされ得るウイルスベクターである。ある特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自己複製することができる（例えば、細菌性複製起源を有する細菌ベクター及びエピソード哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソード哺乳類ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより、宿主ゲノムとともに複製される。更に、ある特定のベクター、すなわち、発現ベクターは、それらが作動可能に連結される遺伝子の発現を指示することができる。一般に、組換えDNA技法で有用な発現ベクターは、多くの場合、プラスミド（ベクター）の形態にある。しかしながら、本発明は、ウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス）等の同等の機能を果たす発現ベクターの他の形態を含むよう意図されている。

30

40

【0305】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞での核酸の発現に好適な形態で本発明の核酸を含む。これは、組換え発現ベクターが、発現される核酸配列に作動可能に連結される、発現に使用される宿主細胞に基づいて選択される1つ以上の制御配列を含むことを意味する。組換え発現ベクターにおいて、「作動可能に連結される」とは、目的とするヌクレオチド配列が、（例えば、インビトロ転写／翻訳系での、又はベクターが宿主細胞に導入される場合は宿主細胞での）ヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で制御配列に連結されることを意味するよう意図されている。「制御配列」という用語は、プロモーター、エ

50

ンハンサー、及び他の発現対照要素（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むよう意図されている。かかる制御配列は、例えば、Goeddel, Methods in Enzymology: Gene Expression Technology vol. 185, Academic Press, San Diego, CA (1991)に記載されている。制御配列には、多くの種類の宿主細胞でのヌクレオチド配列の構成的発現を指示するもの及びある特定の宿主細胞のみでのヌクレオチド配列の発現を指示するもの（例えば、組織特異的制御配列）が含まれる。当業者であれば、発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベル等の因子に依存し得ることを理解するであろう。本発明の発現ベクターが宿主細胞に導入され、それにより、本明細書に記載の核酸によってコードされる融合タンパク質又はペプチドを含むタンパク質又はペプチドを産生することができる。

10

【0306】

本発明における使用のための組換え発現ベクターは、原核（例えば、E. coli）又は真核細胞（例えば、昆虫細胞 {バキュロウイルス発現ベクターを使用}、酵母細胞、又は哺乳類細胞）での本発明のマーカに対応するポリペプチドの発現のために設計され得る。好適な宿主細胞は、Goeddel（上記参照）に詳述されている。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター制御配列及びT7ポリメラーゼを使用して、インビトロで転写及び翻訳され得る。

【0307】

原核生物でのタンパク質の発現は、多くの場合、融合タンパク質又は非融合タンパク質のいずれかの発現を指示する構成的又は誘導性プロモーターを含むベクターを用いてE. coliで行われる。融合ベクターは、いくつかのアミノ酸をそれにコードされるタンパク質に、通常、組換えタンパク質のアミノ末端に付加する。1) 組換えタンパク質の発現を増加させる、2) 組換えタンパク質の溶解度を増加させる、及び3) 親和性精製においてリガンドとして作用することによって組換えタンパク質の精製を助けるという3つの目的を果たす。多くの場合、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解的切断部位が融合部分と組換えタンパク質との接合部に導入されて、融合タンパク質の精製後に融合部分からの組換えタンパク質の分離を可能にする。かかる酵素、及びそれらの同族認識配列には、第Xa因子、トロンピン、及びエンテロキナーゼが含まれる。典型的な融合発現ベクターには、それぞれ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトースE結合タンパク質、又はタンパク質Aを標的組換えタンパク質に融合させる、pGEX（Pharmacia Biotech Inc, Smith and Johnson, 1988, Gene 67:31-40）、pMAL（New England Biolabs, Beverly, MA）、及びpRIT5（Pharmacia, Piscataway, NJ）が含まれる。

20

30

【0308】

好適な誘導性非融合E. coli発現ベクターの例には、pTrc（Amann et al., 1988, Gene 69:301-315）及びpET 11d（Studier et al., p. 60-89, In Gene Expression Technology: Methods in Enzymology vol. 185, Academic Press, San Diego, CA, 1991）が挙げられる。pTrcベクターからの標的バイオマーカー核酸発現は、ハイブリッドtrp-lac融合プロモーターからの宿主RNAポリメラーゼ転写に依存する。pET 11dベクターからの標的バイオマーカー核酸発現は、共発現されたウイルスRNAポリメラーゼ（T7 g n1）によって媒介されたT7 g n10-lac融合プロモーターからの転写に依存する。このウイルスポリメラーゼは、lacUV 5プロモーターの転写制御下でT7 g n1遺伝子を保有する常在性プロファージ由来の宿主株BL21（DE3）又はHMS174（DE3）によって供給される。

40

【0309】

E. coliでの組換えタンパク質発現を最大化するための1つの戦略は、組換えタン

50

パク質をタンパク質分解的に切断する能力が損なわれた宿主細菌でタンパク質を発現することである (Gottesman, p. 119-128, In Gene Expression Technology: Methods in Enzymology vol. 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990)。別の戦略は、各アミノ酸の個々のコドンが *E. coli* で優先的に利用されるものになるように発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を改変することである (Wada et al., 1992, Nucleic Acids Res. 20:2111-2118)。本発明の核酸配列のかかる改変は、標準のDNA合成技法によって行われ得る。

【0310】

別の実施形態では、発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母 *S. cerevisiae* での発現のためのベクターの例には、pYepSec1 (Baldari et al., 1987, EMBO J. 6:229-234)、pMFa (Kurjan and Herskowitz, 1982, Cell 30:933-943)、pJRY88 (Schultz et al., 1987, Gene 54:113-123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA)、及び pPicZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA) が挙げられる。

【0311】

あるいは、発現ベクターは、バキュロウイルス発現ベクターである。昆虫培養細胞（例えば、Sf 9細胞）でのタンパク質の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターには、pAc系列 (Smith et al., 1983, Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) 及び pVL系列 (Lucklow and Summers, 1989, Virology 170:31-39) が含まれる。

【0312】

更に別の実施形態では、本発明の核酸は、哺乳類発現ベクターを使用して哺乳類細胞で発現される。哺乳類発現ベクターの例には、pCDM8 (Seed, 1987, Nature 329:840) 及び pMT2PC (Kaufman et al., 1987, EMBO J. 6:187-195) が挙げられる。哺乳類細胞で使用される場合、発現ベクターの制御機能は、多くの場合、ウイルス制御要素によって提供される。例えば、一般に使用されているプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、及びシミアンウイルス40に由来する。原核細胞及び真核細胞の両方に好適な他の発現系については、Sambrook et al. (上記参照) の第16章及び第17章を参照されたい。別の実施形態では、組換え哺乳類発現ベクターは、特定の細胞型で優先的に核酸の発現を指示することができる（例えば、組織特異的制御要素を使用して核酸を発現させる）。組織特異的制御要素は、当該技術分野で既知である。好適な組織特異的プロモーターの非限定的な例には、アルブミンプロモーター（肝臓特異的、Pinker et al., 1987, Genes Dev. 1:268-277）、リンパ系特異的プロモーター (Calame and Eaton, 1988, Adv. Immunol. 43:235-275)、具体的にはT細胞受容体プロモーター (Winoto and Baltimore, 1989, EMBO J. 8:729-733) 及び免疫グロブリンプロモーター (Banerji et al., 1983, Cell 33:729-740、Queen and Baltimore, 1983, Cell 33:741-748)、ニューロン特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントプロモーター、Byrne and Ruddie, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86:5473-5477）、膵臓特異的プロモーター (Edlund et al., 1985, Science 230:912-916)、並びに乳腺特異的プロモーター（例えば、乳清プロモーター、米国特許第4,873,316号及び欧州出願公開第264,166号）が挙げられる。発生的に制御されたプロモーター、例えば、マウス *hox* プロモーター (Kessel and Gruss, 1990, Science 249:374-379) 及び α -フェトプロテインプロモーター

10

20

30

40

50

(Camper and Tilghman, 1989, Genes Dev. 3: 537-546) も包含される。

【0313】

本発明は、アンチセンス配向で発現ベクターにクローニングされたDNA分子を含む組換え発現ベクターを更に提供する。すなわち、DNA分子は、本発明のポリペプチドをコードするmRNAに対してアンチセンスであるRNA分子の（DNA分子の転写による）発現を可能にする様式で制御配列に作動可能に連結される。様々な細胞型でのアンチセンスRNA分子の連続発現を指示する、アンチセンス配向でクローニングされた核酸に作動可能に連結された制御配列、例えば、ウイルスプロモーター及び／又はエンハンサーが選択され得るか、又はアンチセンスRNAの構成的、組織特異的、若しくは細胞型特異的発現を指示する制御配列が選択され得る。アンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファージミド、又は弱毒化ウイルスの形態にあり得、そこで、アンチセンス核酸が高効率制御領域の制御下で産生され、その活性が、ベクターが導入される細胞型によって決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用した遺伝子発現の制御の考察については、(Weintraub et al., 1986, Trends in Genetics, Vol. 1 (1) を参照されたい)。

10

【0314】

本発明の別の態様は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関する。「宿主細胞」及び「組換え宿主細胞」という用語は、本明細書で同義に使用される。かかる用語が特定の対象細胞のみならず、かかる細胞の子孫又は潜在的な子孫も指すことが理解される。変異又は環境影響のいずれかによりある特定の修飾が後世で生じ得るため、かかる子孫は実際には親細胞と同一ではない場合があるが、依然として本明細書で使用される本用語の範囲内に含まれる。

20

【0315】

宿主細胞は、任意の原核（例えば、E. coli）細胞又は真核細胞（例えば、昆虫細胞、酵母、若しくは哺乳類細胞）であり得る。

【0316】

ベクターDNAは、従来の形質転換又はトランスフェクション技法によって原核又は真核細胞に導入され得る。本明細書で使用される場合、「形質転換」及び「トランスフェクション」という用語は、リン酸カルシウム若しくは塩化カルシウム共沈、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、リポフェクション、又は電気穿孔を含む、外来核酸を宿主細胞に導入するための様々な当該技術分野で認識されている技法を指すよう意図されている。宿主細胞の形質転換又はトランスフェクションに好適な方法は、Sambrook, et al. (（上記参照）) 及び他の研究室マニュアルで見つけることができる。

30

【0317】

哺乳類細胞の安定したトランスフェクションのために、使用される発現ベクター及びトランスフェクション技法に応じて、わずかな細胞のみが外来DNAをそれらのゲノムに組み込むことができることが既知である。これらの組み込み体を特定及び選択するために、一般に、（例えば、抗生物質に対する抵抗性のための）選択可能なマーカーをコードする遺伝子が目的とする遺伝子とともに宿主細胞に導入される。好ましい選択可能なマーカーには、G418、ハイグロマイシン、及びメトトレキサート等の薬物に対する抵抗性を付与するものが含まれる。導入された核酸で安定してトランスフェクトされた細胞は、薬物選択によって特定され得る（例えば、選択可能なマーカー遺伝子を組み込んだ細胞が生存する一方で、他の細胞は死ぬ）。

40

【0318】

V. バイオマーカー核酸及びポリペプチドの分析

バイオマーカー核酸及び／又はバイオマーカーポリペプチドを、本明細書に記載の方法及び当業者に既知の技法に従って分析して、1) バイオマーカー転写物又はポリペプチドのレベルの改変、2) バイオマーカー遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの欠失又は付加、

50

4) バイオマーカー遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換、5) 発現制御領域等のバイオマーカー遺伝子の異常な修飾を含むが、これらに限定されない、本発明に有用な遺伝子改変又は発現改変を特定することができる。

【0319】

a. コピー数の検出のための方法

バイオマーカー核酸のコピー数を評価する方法は、当業者に周知である。染色体獲得又は喪失の存在又は不在は、単に本明細書で特定された領域又はマーカーのコピー数を決定することによって評価される。

【0320】

一実施形態では、生体試料は、ゲノムマーカーを含むゲノム遺伝子座のコピー数変化の存在について試験される。少なくとも3、4、5、6、7、8、9、又は10のコピー数が、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの阻害剤、及び免疫療法併用療法のより不良な転帰を予測する。

【0321】

バイオマーカー遺伝子座のコピー数を評価する方法には、ハイブリダイゼーションベースのアッセイが含まれるが、これに限定されない。ハイブリダイゼーションベースのアッセイには、伝統的な「直接プローブ」法、例えば、サザンブロット、インサイツハイブリダイゼーション（例えば、FISH及びFISHプラスSKY）法、及び「比較プローブ」法、例えば、比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH）、例えば、cDNAベース又はオリゴヌクレオチドベースのCGHが含まれるが、これらに限定されない。これらの方法は、基質（例えば、膜若しくはガラス）結合方法又はアレイベースのアプローチを含むが、これらに限定されない多種多様の形式で使用され得る。

【0322】

一実施形態では、試料中のバイオマーカー遺伝子のコピー数の評価は、サザンブロットを伴う。サザンブロットでは、ゲノムDNA（典型的には、電気泳動ゲル上で断片及び分離されたもの）が標的領域に特異的なプローブにハイブリダイズされる。標的領域に対するプローブからのハイブリダイゼーションシグナルと、正常ゲノムDNA（例えば、同じ又は関連細胞、組織、臓器等の非増幅部分）の分析からの対照プローブシグナルとの強度の比較により、標的核酸の相対コピー数の推定値が提供される。あるいは、試料中のコード核酸のコピー数を評価するためにノーザンブロットが利用され得る。ノーザンブロットでは、mRNAが標的領域に特異的なプローブにハイブリダイズされる。標的領域に対するプローブからのハイブリダイゼーションシグナルと、正常RNA（例えば、同じ又は関連細胞、組織、臓器等の非増幅部分）の分析からの対照プローブシグナルとの強度の比較により、標的核酸の相対コピー数の推定値が提供される。あるいは、適切な対照（例えば、同じ又は関連細胞組織、臓器等の非増幅部分）と比較してより高い又はより低い発現により、標的核酸の相対コピー数の推定値が提供されるように、RNAを検出するための当該技術分野で周知の他の方法が使用され得る。ゲノムコピー数を決定するための代替手段は、インサイチュハイブリダイゼーション（例えば、Angerer (1987) Meth. Enzymol. 152: 649) である。一般に、インサイチュハイブリダイゼーションは、以下のステップ：（1）分析される組織又は生物学的構造の固定、（2）標的DNAのアクセス可能性を高め、かつ非特異的結合を減少させるための生物学的構造のプレハイブリダイゼーション処理、（3）生物学的構造又は組織における核酸混合物の核酸へのハイブリダイゼーション、（4）ハイブリダイゼーションで結合しなかった核酸断片を除去するためのポストハイブリダイゼーション洗浄、及び（5）ハイブリダイズされた核酸断片の検出を含む。これらのステップの各々で使用される試薬及び使用条件は、特定の用途に応じて異なる。典型的なインサイチュハイブリダイゼーションアッセイでは、細胞が、固体支持体、典型的には、スライドガラスに固定される。核酸がプローブされる場合、細胞は、典型的には、熱又はアルカリで変性される。その後、これらの細胞は適度な温度でハイブリダイゼーション溶液と接触して、タンパク質をコードする核酸配列に特異的な標識プローブのアニールリングを可能にする。その後、標的（例えば、細胞）は、典型

10

20

30

40

50

的には、適切なシグナル対ノイズ比が得られるまで所定のストリンジェンシーで又は増加するストリンジェンシーで洗浄される。プローブは、典型的には、例えば、放射性同位体又は蛍光レポーターで標識される。一実施形態では、プローブは、ストリンジェントな条件下で標的核酸と特異的にハイブリダイズするのに十分に長い。プローブは、一般に、約200塩基長～約1000塩基長の範囲である。いくつかの用途では、反復配列のハイブリダイゼーション能力を阻止することが必要である。したがって、いくつかの実施形態では、非特異的ハイブリダイゼーションを阻止するために、tRNA、ヒトゲノムDNA、又はCot-1 DNAが使用される。

【0323】

ゲノムコピー数を決定するための代替手段は、比較ゲノムハイブリダイゼーションである。一般に、ゲノムDNAは、正常参照細胞及び試験細胞（例えば、腫瘍細胞）から単離され、必要に応じて増幅される。これらの2つの核酸は、差次的に標識され、その後、参照細胞の分裂中期の染色体にインサイチュでハイブリダイズされる。参照DNA及び試験DNAの両方の反復配列は、ある手段によって、例えば、適切な遮断核酸とのプレハイブリダイゼーションによって、かつ／又は当該ハイブリダイゼーション中に当該反復配列に対するかかる遮断核酸配列を含むことによって除去されるか、又はそれらのハイブリダイゼーション能力が低下するかのいずれかである。その後、結合した標識DNA配列は、必要に応じて、視覚可能な形態にされる。コピー数が増加又は減少した試験細胞における染色体領域は、2つのDNAからのシグナル比が変化する領域を検出することによって特定され得る。例えば、試験細胞におけるコピー数が減少した領域は、ゲノムの他の領域と比較して参照よりも試験DNAから比較的より低いシグナルを示すであろう。

【0324】

試験細胞におけるコピー数が増加した領域は、試験DNAから比較的より高いシグナルを示すであろう。染色体の欠失又は増倍が存在する場合、2つの標識からのシグナルの比率の差が検出され、この比率により、コピー数の尺度が提供される。CGHの別の実施形態であるアレイCGH (aCGH) では、固定化された染色体要素がアレイ上の一群の固体支持体に結合した標的核酸で置き換えられ、ゲノムの大部分又は全てが一群の固体支持体に結合した標的に表されることを可能にする。標的核酸は、cDNA、ゲノムDNA、オリゴヌクレオチド（例えば、単一ヌクレオチド多型を検出するため）等を含み得る。アレイベースのCGHは、（対照及び可能な腫瘍試料を2つの異なる色素で標識し、ハイブリダイゼーション前にそれらを混合し、それにより、アレイ上のプローブの競合的ハイブリダイゼーションに起因する比率がもたらされることとは対照的に）単色標識で行われる場合もある。単色CGHでは、対照が標識され、1つのアレイにハイブリダイズされ、絶対シグナルが読み取られ、可能な腫瘍試料が標識され、第2のアレイ（同一の含有量）にハイブリダイズされ、絶対シグナルが読み取られる。コピー数の差が2つのアレイからの絶対シグナルに基づいて計算される。固定化された染色体又はアレイを調製する方法及び比較ゲノムハイブリダイゼーションを行う方法は、当該技術分野で周知である（例えば、米国特許第6,335,167号、同第6,197,501号、同第5,830,645号、及び同第5,665,549号、並びにAlbertson (1984) EMBO J. 3:1227-1234、Pinkel (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:9138-9142、EPO公開第430,402号、Methods in Molecular Biology, Vol. 33: In situ Hybridization Protocols, Choo, ed., Humana Press, Totowa, N. J. (1994) 等を参照のこと）。別の実施形態では、Pinkel, et al. (1998) Nature Genetics 20:207-211、又はKallioniemi (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:5321-5325 (1992) のハイブリダイゼーションプロトコルが使用される。

【0325】

なお別の実施形態では、増幅ベースのアッセイを使用して、コピー数を測定することが

できる。かかる増幅ベースのアッセイでは、核酸配列は、増幅反応（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）において鋳型としての機能を果たす。定量的増幅では、増幅産物の量は、元の試料中の鋳型の量に比例するであろう。適切な対照、例えば、健常組織との比較により、コピー数の尺度が提供される。

【0326】

「定量的」増幅法は、当業者に周知である。例えば、定量的PCRは、同じプライマーを使用して既知の量の対照配列を同時に共増幅することを含む。これにより、PCR反応を校正するために使用され得る内部標準が提供される。定量的PCRの詳細なプロトコルは、Innis, et al. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N. Y.) に提供されている。定量的PCR分析を使用したマイクロサテライト遺伝子座でのDNAコピー数の測定は、Ginzinger, et al. (2000) Cancer Research 60:5405-5409に記載されている。遺伝子の既知の核酸配列は、当業者が遺伝子の任意の部分を増幅するためにプライマーを通例的に選択することを可能にするのに十分である。蛍光発生的定量的PCRも本発明の方法で使用され得る。蛍光発生的定量的PCRでは、定量は、蛍光シグナル、例えば、TaqMan及びSYBRグリーンの量に基づいている。

【0327】

他の好適な増幅法には、限定されないが、リガーゼ連鎖反応（LCR）（Wu and Wallace (1989) Genomics 4:560、Landegren, et al. (1988) Science 241:1077、及びBarringer et al. (1990) Gene 89:117を参照のこと）、転写増幅（Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86:1173）、自立配列複製（Guatelli et al. (1990) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 87:1874）、ドットPCR、及びリンカーアダプターPCR等が含まれる。

【0328】

ヘテロ接合性の喪失（LOH）及び主要コピー比率（MCP）マッピング（Wang, Z. C., et al. (2004) Cancer Res 64(1):64-71、Seymour, A. B., et al. (1994) Cancer Res 54, 2761-4、Hahn, S. A., et al. (1995) Cancer Res 55, 4670-5、Kimura, M., et al. (1996) Genes Chromosomes Cancer 17, 88-93、Li et al., (2008) MBC Bioinform. 9, 204-219）も、増幅又は欠失の領域を特定するために使用され得る。

【0329】

b. バイオマーカー核酸発現を検出するための方法

バイオマーカー発現は、転写分子又はタンパク質の発現を検出するための多種多様の周知の方法のうちのいずれかによって評価され得る。かかる方法の非限定的な例には、分泌タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞質タンパク質、又は核タンパク質を検出するための免疫学的方法、タンパク質精製法、タンパク質機能又は活性アッセイ、核酸ハイブリダイゼーション法、核酸逆転写法、及び核酸増幅法が挙げられる。

【0330】

好ましい実施形態では、特定の遺伝子の活性は、遺伝子転写物（例えば、mRNA）の尺度、翻訳されたタンパク質の量の尺度、又は遺伝子産物活性の尺度によって特徴付けられる。マーカー発現は、mRNAレベル、タンパク質レベル、又はタンパク質活性（これらはいずれも標準の技法を使用して測定され得る）を検出することを含む様々な方法で監視され得る。検出は、遺伝子発現（例えば、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、タンパク質、又は酵素活性）レベルの定量化を含むか、又はあるいは、具体的には対照レベルと比較した遺伝子発現レベルの質的評価であり得る。検出されるレベルのタイプは、文脈か

ら明らかであろう。

【0331】

別の実施形態では、バイオマーカー及びその機能的に同様の相同体（その断片又は遺伝子改変を含む）の（例えば、その制御領域又はプロモーター領域における）発現レベルの検出又は決定は、目的とするマーカーのRNAレベルを検出又は決定することを含む。一実施形態では、1つ以上の細胞が試験される対象から得られ、その細胞からRNAが単離される。好ましい実施形態では、乳房組織細胞の試料が対象から得られる。

【0332】

一実施形態では、RNAは、単一細胞から得られる。例えば、細胞は、レーザーキャプチャマイクロダイセクション（LCM）によって組織試料から単離され得る。この技法を使用して、細胞が、染色された組織切片を含む組織切片から単離され、それにより、所望の細胞が単離されることを確実にすることができる（例えば、Bonner et al. (1997) Science 278:1481、Emmert-Buck et al. (1996) Science 274:998、Fend et al. (1999) Am. J. Path. 154:61、及びMurakami et al. (2000) Kidney Int. 58:1346を参照のこと）。例えば、Murakami et al.（上記参照）は、事前に免疫染色された組織切片からの細胞の単離について説明している。

10

【0333】

対象から細胞を得て、その細胞をインビトロで培養すること、例えば、RNAが抽出され得るより大きい細胞集団を得ることも可能である。非形質転換細胞の培養物、すなわち、初代細胞培養物を確立するための方法が当該技術分野で既知である。

20

【0334】

個体由来の組織試料又は細胞からRNAを単離する際に、組織又は細胞が対象から採取された後に遺伝子発現のいかなる更なる変化も阻止することが重要であり得る。発現レベルの変化は、攪乱後に、例えば、熱ショック又はリポ多糖（LPS）若しくは他の試薬での活性化後に急速に変化することが知られている。加えて、組織及び細胞中のRNAは、急速に分解し得る。したがって、好ましい実施形態では、対象から得られた組織又は細胞は、可能な限り迅速に瞬間凍結される。

【0335】

RNAは、様々な方法、例えば、チオシアン酸グアニジウム溶解に続くCsCl遠心分離によって組織試料から抽出され得る。（Chirgwin et al., 1979, Biochemistry 18:5294-5299）。単一細胞由来のRNAは、例えば、Dulac, C. (1998) Curr. Top. Dev. Biol. 36, 245及びJena et al. (1996) J. Immunol. Methods 190:199に記載の単一細胞からcDNAライブラリを調製するための方法に記載されるように得られ得る。例えば、RNAsinの包含により、RNA分解を回避するために注意を払われなければならない。その後、RNA試料は、特定の種で濃縮され得る。一実施形態では、ポリ（A）+RNAがRNA試料から単離される。一般に、かかる精製は、mRNA上のポリ-A尾部を利用する。具体的には、上述のように、ポリ-Tオリゴヌクレオチドは、固体支持体内に固定化されて、mRNAに対する親和性リガンドとしての機能を果たし得る。この目的のためのキット、例えば、MessageMakerキット（Life Technologies, Grand Island, NY）が市販されている。

30

【0336】

好ましい実施形態では、RNA集団は、マーカー配列で濃縮される。濃縮は、例えば、プライマー特異的cDNA合成によって、又はcDNA合成及び鋳型特異的インビトロ転写に基づく複数回の線形増幅によって行われ得る（例えば、Wang et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86:9717、Dulac et al.（上記参照）、及びJena et al.（上記参照）を参照）。

40

50

【0337】

特定の種又は配列で濃縮されたRNA集団又は濃縮されていないRNA集団が更に増幅され得る。本明細書で定義される場合、「増幅プロセス」は、RNA中の分子を強化するか、増加させるか、又は増大させるように設計されている。例えば、RNAがmRNAである場合、シグナルが検出可能であるか、又は検出が増強されるように、RT-PCR等の増幅プロセスが利用されて、mRNAを増幅することができる。かかる増幅プロセスは、特に生体試料、組織試料、又は腫瘍試料のサイズ又は体積が小さい場合に有益である。

【0338】

様々な増幅法及び検出法が使用され得る。例えば、mRNAのcDNAへの逆転写に続くポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、又は米国特許第5,322,770号に記載される両ステップでの単一の酵素の使用、又はR. L. Marshall, et al., PCR Methods and Applications 4:80-84 (1994)に記載されるmRNAのcDNAへの逆転写に続く対称ギャップリガーゼ連鎖反応(RT-AGLCR)は本発明の範囲内である。リアルタイムPCRも使用され得る。

【0339】

本明細書で利用され得る他の既知の増幅法には、限定されないが、PNAS U. S. A. 87:1874-1878 (1990)に記載され、Nature 350 (No. 6313):91-92 (1991)にも記載されている、いわゆる「NASBA」又は「3SR」技法；公開されている欧州特許出願(EPA)第4544610号に記載されているQ-ベータ増幅；鎖置換増幅(G. T. Walker et al., Clin. Chem. 42:9-13 (1996)及び欧州特許出願第684315号に記載されている)；PCT公開第9322461号に記載されている標的媒介増幅；PCR；リガーゼ連鎖反応(LCR)(例えば、Wu and Wallace, Genomics 4, 560 (1989), Landegren et al., Science 241, 1077 (1988)を参照のこと)；自立配列複製(SSR)(例えば、Guatelli et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 87, 1874 (1990)を参照のこと)；及び転写増幅(例えば、Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86, 1173 (1989)を参照のこと)が挙げられる。

【0340】

遺伝子発現の絶対レベル及び相対レベルを決定するための多くの技法が当該技術分野で既知であり、本発明での使用に好適な一般に使用されている技法には、ノーザン分析、RNase保護アッセイ(RPA)、マイクロアレイ、及びPCRベースの技法、例えば、定量的PCR及び差次的発現PCRが含まれる。例えば、ノーザンブロッティングは、RNA調製物を変性アガロースゲル上に泳動させ、それを、活性化セルロース、ニトロセルロース、又はガラス若しくはナイロン膜等の好適な支持体に移送することを含む。その後、放射性標識cDNA又はRNAが調製物にハイブリダイズされ、洗浄され、オートラジオグラフィーによって分析される。

【0341】

放射活性的に標識されたアンチセンスRNAプローブが生検試料の薄切片とハイブリダイズされ、洗浄され、RNaseで切断され、オートラジオグラフィーのために感受性乳剤に曝露されるインサイチュハイブリダイゼーション視覚化も用いられ得る。試料がヘマトキシリンで染色されて、試料の組織学的組成が示され、好適な光フィルターを用いた暗視野撮像により、現像された乳剤が示される。ジゴキシゲニン等の非放射性標識も使用され得る。

【0342】

あるいは、mRNA発現は、DNAアレイ、チップ、又はマイクロアレイ上で検出され得る。対象から得られた試験試料の標識核酸が、バイオマーカーDNAを含む固体表面にハイブリダイズされ得る。正のハイブリダイゼーションシグナルがバイオマーカー転写物を含む試料で得られる。DNAアレイを調製する方法及びそれらを使用する方法は、

当該技術分野で周知である（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第 6,618,679 号、同第 6,379,897 号、同第 6,664,377 号、同第 6,451,536 号、同第 548,257 号、米国 2003/0157485 号、並びに Schena et al. (1995) Science 20,467-470、Gerhold et al. (1999) Trends In Biochem. Sci. 24,168-173、及び Lennon et al. (2000) Drug Discovery Today 5,59-65 を参照のこと）。遺伝子発現の連続分析 (SAGE) も行われ得る（例えば、米国特許出願第 2003/0215858 号を参照のこと）。

【0343】

mRNA レベルを監視するために、例えば、mRNA が試験される生体試料から抽出され、逆転写され、蛍光標識 cDNA プローブが生成される。その後、マーカー cDNA にハイブリダイズすることができるマイクロアレイが標識 cDNA プローブでプローブされ、スライドがスキャンされ、蛍光強度が測定される。この強度は、ハイブリダイゼーション強度及び発現レベルと相関する。

【0344】

本明細書に記載の方法で使用され得るプローブのタイプには、cDNA、リボプローブ、合成オリゴヌクレオチド、及びゲノムプローブが含まれる。使用されるプローブのタイプは、一般に、例えば、インサイチュハイブリダイゼーションの場合にはリボプローブ及びノーザンブロッティングの場合には cDNA 等の特定の状況によって決定される。一実施形態では、プローブは、RNA に特有のヌクレオチド領域に向けられる。プローブは、マーカー mRNA 転写物を差次的に認識するのに必要な程度に短くてもよく、例えば、15 塩基程度に短くてもよいが、少なくとも 17、18、19、若しくは 20 塩基、又はそれ以上の塩基のプローブが使用されてもよい。一実施形態では、プライマー及びプローブは、ストリンジェントな条件下で、マーカーに対応するヌクレオチド配列を有する DNA 断片に特異的にハイブリダイズする。本明細書で使用される場合、「ストリンジェントな条件」という用語は、ヌクレオチド配列に少なくとも 95% の同一性が存在する場合にのみハイブリダイゼーションが生じることを意味する。別の実施形態では、「ストリンジェントな条件」下でのハイブリダイゼーションは、配列間に少なくとも 97% の同一性が存在する場合に生じる。

【0345】

プローブの標識の形態は、放射性同位体、例えば、 ^{32}P 及び ^{35}S の使用等の任意の適切なものであり得る。好適に標識された塩基の使用により、プローブが化学的に合成されるか生物学的に合成されるかにかかわらず、放射性同位体での標識が達成され得る。

【0346】

一実施形態では、生体試料は、試験対象由来のポリペプチド分子を含有する。あるいは、生体試料は、試験対象由来の mRNA 分子又は試験対象由来のゲノム DNA 分子を含有し得る。

【0347】

別の実施形態では、本方法は、対照対象から対照生体試料を得ることと、マーカーポリペプチド、mRNA、ゲノム DNA、又はそれらの断片の存在が生体試料中で検出されるように、対照試料を、マーカーポリペプチド、mRNA、ゲノム DNA、又はそれらの断片を検出することができる化合物又は薬剤と接触させることと、対照試料中のマーカーポリペプチド、mRNA、ゲノム DNA、又はそれらの断片の存在を、試験試料中のマーカーポリペプチド、mRNA、ゲノム DNA、又はそれらの断片の存在と比較することとを更に含む。

【0348】

c. バイオマーカータンパク質発現を検出するための方法

バイオマーカータンパク質の活性又はレベルは、発現されたポリペプチドを検出又は定量化することによって検出及び／又は定量化され得る。ポリペプチドは、当業者に周知の

10

20

30

40

50

いくつかの手段のうちのいずれかによって検出及び定量化され得る。バイオマーカー核酸及びその機能的に同様の相同体（その断片又は遺伝子改変を含む）によってコードされるポリペプチドの（例えば、その制御領域又はプロモーター領域における）異常なポリペプチド発現レベルは、表 1～5 に列挙される 1 つ以上のバイオマーカーの阻害剤及び免疫療法併用治療に対するがんの応答の可能性と関連付けられる。ポリペプチドを検出するための当該技術分野で既知の任意の方法が使用され得る。かかる方法には、免疫拡散、免疫電気泳動、放射性免疫アッセイ（RIA）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、免疫蛍光アッセイ、ウエスタンブロッティング、結合剤リガンドアッセイ、免疫組織化学的技法、凝集、補体アッセイ、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、薄層クロマトグラフィー（TLC）、超拡散クロマトグラフィー等が含まれるが、これらに限定されない（例えば、参照により組み込まれる、Basic and Clinical Immunology, Sites and Terr, eds., Appleton and Lange, Norwalk, Conn. pp 217-262, 1991）。抗体をエピトープ（複数可）と反応させることと、標識ポリペプチド又はその誘導体を競合的に置き換えることとを含む、結合剤リガンド免疫アッセイ法が好ましい。

10

【0349】

例えば、ELISA 及び RIA 手順は、所望のバイオマーカータンパク質標準が（¹²⁵I 若しくは ³⁵S 等の放射性同位体、又はセイヨウワサビペルオキシダーゼ若しくはアルカリ性ホスファターゼ等のアッセイ可能な酵素で）標識され、非標識試料と一緒に、対応する抗体と接触させられるように行われ得、そこで、第 2 の抗体が第 1 の抗体に結合するために使用され、放射活性又は固定化酵素がアッセイされる（競合的アッセイ）。あるいは、試料中のバイオマーカータンパク質が対応する固定化抗体と反応させられ、放射性同位体標識又は酵素標識抗バイオマーカータンパク質抗体がこの系と反応させられ、放射活性又は酵素がアッセイされる（ELISA-サンドイッチアッセイ）。好適な場合、他の従来の方法も用いられ得る。

20

【0350】

上述の技法は、「一段階」アッセイ又は「二段階」アッセイとして本質的に行われ得る。「一段階」アッセイは、抗原を固定化抗体と接触させ、洗浄することなく、混合物を標識抗体と接触させることを含む。「二段階」アッセイは、混合物を標識抗体と接触させる前に洗浄することを含む。好適な場合、他の従来の方法も用いられ得る。

30

【0351】

一実施形態では、バイオマーカータンパク質レベルを測定するための方法は、生物学的検体を、バイオマーカータンパク質に選択的に結合する抗体又はそのバリエーション（例えば、断片）と接触させるステップと、当該抗体又はそのバリエーションが当該試料に結合しているかを検出するステップと、それにより、バイオマーカータンパク質レベルを測定するステップとを含む。

【0352】

バイオマーカータンパク質及び／又は抗体の酵素標識及び放射標識は、従来手段によって達成され得る。かかる手段は、一般に、特に酵素の活性に悪影響を及ぼさないように、例えば、グルタルアルデヒドによる、問題となっている抗原又は抗体への酵素の共有結合的連結を含み、これは、酵素がその基質と依然として相互作用することができなければならないことを意味するが、酵素の全てが活性である必要はないが、但し、アッセイの達成を可能するのに十分な活性のままであることを条件とする。実際には、酵素に結合するためのいくつかの技法は非特異的であり（例えば、ホルムアルデヒドを使用して）、ある割合の活性酵素しかもたらさない。

40

【0353】

アッセイ系の 1 つの成分を支持体上に固定化し、それにより、系の他の成分がその 1 つの成分と接触し、多大な労力と時間を必要とすることなく容易に除去されることを可能にすることが通常望ましい。第 2 の相が第 1 の相から離れて固定化されることが可能であるが、通常、1 つの相で十分である。

50

【0354】

酵素自体を支持体上に固定化することが可能であるが、固相酵素が必要とされる場合、これは、通常、抗体に結合し、その抗体を当該技術分野で周知の支持体、モデル、及び系に付着することによって最も良好に達成される。単純なポリエチレンが好適な支持体を提供し得る。

【0355】

標識に用いられ得る酵素は特に限定されていないが、例えばオキシダーゼ群のメンバーから選択され得る。これらは、それらの基質との反応により過酸化水素の産生を触媒し、グルコースオキシダーゼは、その良好な安定性、入手の容易さ及び安価、並びにその基質（グルコース）の入手し易さのため、使用されることが多い。オキシダーゼの活性は、当該技術分野で周知の制御された条件下で酵素標識抗体と基質との反応後に形成された過酸化水素の濃度を測定することによってアッセイされ得る。

10

【0356】

他の技法を使用して、本開示に基づいて専門家の選好に従ってバイオマーカータンパク質を検出することができる。かかる技法の1つは、好適に処理された試料をSDS-PAGEゲル上で泳動させた後にニトロセルロースフィルター等の固体支持体に移すウエスタンブロッティング (Towbin et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 76:4350 (1979)) である。その後、抗バイオマーカータンパク質抗体（非標識）を支持体と接触させ、標識タンパク質A又は抗免疫グロブリン (^{125}I 、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、及びアルカリ性ホスファターゼを含む好適な標識) 等の二次免疫学的試薬によってアッセイする。クロマトグラフ検出も使用され得る。

20

【0357】

免疫組織化学を使用して、例えば、生検試料中のバイオマーカータンパク質の発現を検出することができる。好適な抗体が、例えば、細胞の薄層と接触させられ、洗浄され、その後、第2の標識抗体と接触させられる。標識は、蛍光マーカー、酵素、例えば、ペルオキシダーゼ、アビジン、又は放射標識により得る。このアッセイは、顕微鏡を使用して視覚的にスコア化される。

【0358】

抗バイオマーカータンパク質抗体、例えば、イントラボディも、撮像目的のために、例えば、対象の細胞及び組織中のバイオマーカータンパク質の存在を検出するために使用することができる。好適な標識には、放射性同位体、ヨウ素 (^{125}I 、 ^{121}I)、炭素 (^{14}C)、硫黄 (^{35}S)、トリチウム (^3H)、インジウム (^{112}In)、及びテクネチウム ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、フルオレセイン及びローダミン等の蛍光標識、並びにビオチンが含まれる。

30

【0359】

インビボ撮像の目的のために、抗体は、それ自体が体外から検出不能であるため、検出を可能にするために標識されるか、又は別様に修飾されなければならない。この目的のためのマーカーは、抗体結合を実質的に妨害しないが、外部検出を可能にする任意のマーカーであり得る。好適なマーカーには、X線ラジオグラフィー、NMR、又はMRIによって検出され得るものが含まれ得る。X線ラジオグラフィー技法の場合、好適なマーカーには、検出可能な放射線を放出するが、対象に明らかに有害ではない任意の放射性同位体（例えば、バリウム又はセシウム等）が含まれる。NMR及びMRIに好適なマーカーには、一般に、例えば、関連ハイブリドーマの栄養素の好適な標識によって抗体に組み込まれ得る重水素等の検出可能な特徴的スピンを有するものが含まれる。

40

【0360】

対象のサイズ及び使用される撮像システムにより、診断的画像を生成するのに必要な撮像部分の量が決定される。放射性同位体部分の場合、ヒト対象について、注射される放射活性の量は、通常、テクネチウム-99約5～20ミリキュリーの範囲である。その後、標識された抗体又は抗体断片は、バイオマーカータンパク質を含有する細胞の場所に優先的に蓄積する。その後、標識された抗体又は抗体断片が既知の技法を使用して検出され得

50

る。

【0361】

バイオマーカータンパク質を検出するために使用され得る抗体には、天然であるか、又は合成であるか、全長であるか、又はその断片であるか、モノクローナルであるか、又はポリクローナルであるかにかかわらず、検出されるバイオマーカータンパク質に十分に強くかつ特異的に結合する任意の抗体が含まれる。抗体は、最大約 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M の K_d を有し得る。「特異的に結合する」という語句は、例えば、結合が、同一又は同様のエピトープ、抗原、又は抗原決定基の第2の調製物で置き換えられ得るか、又はそれと競合され得るような様式での、抗体のエピトープ又は抗原又は抗原決定基への結合を指す。抗体は、関連タンパク質等の他のタンパク質と比較してバイオマーカータンパク質に優先的に結合し得る。抗体は、市販されているか、又は当該技術分野で既知の方法に従って調製され得る。

10

【0362】

使用され得る抗体及びその誘導体は、ポリクローナル又はモノクローナル抗体、キメラ、ヒト、ヒト化、霊長類化（CDR-グラフト化）、ベニヤ化、又は一本鎖抗体、並びに抗体の機能的断片、すなわち、バイオマーカータンパク質結合断片を包含する。例えば、バイオマーカータンパク質又はその一部（F_v、F_{ab}、F_{ab}'、及び F（a b'）2断片を含むが、これらに限定されない）に結合することができる抗体断片が使用され得る。かかる断片は、酵素的切断又は組換え技法によって産生され得る。例えば、パパイン又はペプシン切断により、それぞれ、F_{ab}断片又は F（a b'）2断片が生成され得る。必要な基質特異性を有する他のプロテアーゼも F_{ab}断片又は F（a b'）2断片を生成するために使用され得る。抗体は、1つ以上の終止コドンが天然終止部位の上流に導入された抗体遺伝子を使用して様々な切断形態で産生される場合もある。例えば、F（a b'）2重鎖部分をコードするキメラ遺伝子は、重鎖の CH、ドメイン、及びヒンジ領域をコードする DNA 配列を含むように設計され得る。

20

【0363】

合成抗体及び操作された抗体は、例えば、Cabilly et al.（米国特許第4,816,567号）、Cabilly et al.（欧州特許第0,125,023 B1号）、Boss et al.（米国特許第4,816,397号）、Boss et al.（欧州特許第0,120,694 B1号）、Neuberger, M. S. et al.（WO86/01533）、Neuberger, M. S. et al.（欧州特許第0,194,276 B1号）、Winter（米国特許第5,225,539号）、Winter（欧州特許第0,239,400 B1号）、Queen et al.（欧州特許第0451216 B1号）、及び Padlan, E. A. et al.（欧州特許第0519596 A1号）に記載されている。また、霊長類化抗体については、Newman, R. et al., 10:1455-1460（1992）、一本鎖抗体については、Ladner et al.（米国特許第4,946,778号）及び Bird, R. E. et al., Science, 242:423-426（1988）も参照のこと。ライブラリ、例えば、ファージディスプレイライブラリから産生された抗体も使用され得る。

30

40

【0364】

いくつかの実施形態では、抗体以外のバイオマーカータンパク質に特異的に結合する薬剤、例えば、ペプチドが使用される。バイオマーカータンパク質に特異的に結合するペプチドは、当該技術分野で既知の任意の手段によって特定され得る。例えば、バイオマーカータンパク質の特異的ペプチド結合剤は、ペプチドファージディスプレイライブラリの使用についてスクリーニングされ得る。

【0365】

d. バイオマーカーの構造的改変を検出するための方法

以下の例証的な方法を使用して、例えば、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカー、又は過剰発現、過機能性などである本明細書に記載の免疫療法で使用される他のバ

50

バイオマーカーを特定するために、バイオマーカー核酸及び／又はバイオマーカーポリペプチド分子中の構造的改変の存在を特定することができる。

【0366】

特定の実施形態では、改変の検出は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（例えば、米国特許第4,683,195号及び同第4,683,202号を参照のこと）、例えば、アンカーPCR若しくはRACE PCR、又はあるいはライゲーション連鎖反応（LCR）（例えば、Landegran et al. (1988) Science 241: 1077-1080、及びNakazawa et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91: 360-364を参照のこと）におけるプローブ／プライマーの使用を含み、後者は、バイオマーカー遺伝子などのバイオマーカー核酸の点変異の検出に特に有用であり得る（Abravaya et al. (1995) Nucleic Acids Res. 23: 675-682を参照のこと）。この方法は、対象から細胞試料を収集するステップ、試料の細胞から核酸（例えば、ゲノム、mRNA、又は両方）を単離するステップ、バイオマーカー遺伝子（存在する場合）のハイブリダイゼーション及び増幅が生じるような条件下で、核酸試料を、バイオマーカー遺伝子に特異的にハイブリダイズする1つ以上のプライマーと接触させるステップ、増幅産物の存在若しくは不在を検出するステップ、又は増幅産物のサイズを検出して、対照試料と長さを比較するステップを含み得る。PCR及び／又はLCRを予備的増幅ステップとして本明細書に記載の変異を検出するために使用される技法のうちのいずれかと併せて使用することが望ましくあり得ることが理解される。

10

20

【0367】

代替の増幅法には、自立配列複製（Guatelli, J. C. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87: 1874-1878）、転写増幅系（Kwoh, D. Y. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 1173-1177）、Q-ベータレプリカーゼ（Lizardi, P. M. et al. (1988) Bio-Technology 6: 1197）、又は任意の他の核酸増幅法が含まれ、その後、当業者に周知の技法を使用した増幅された分子の検出が続く。これらの検出スキームは、核酸分子が非常に少ない数で存在する場合の核酸分子の検出に特に有用である。

【0368】

代替の実施形態では、試料細胞由来のバイオマーカー核酸の変異は、制限酵素切断パターンの改変によって特定され得る。例えば、試料DNA及び対照DNAが単離され、増幅され（任意に）、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼと消化され、断片長サイズがゲル電気泳動によって決定され、比較される。試料DNAと対照DNAとの間の断片長サイズの差が、試料DNAの変異を示す。更に、配列特異的リボザイムの使用（例えば、米国特許第5,498,531号を参照のこと）を使用して、リボザイム切断部位の発生又は喪失による特異的変異の存在についてスコア化することができる。

30

【0369】

他の実施形態では、バイオマーカー核酸の遺伝子変異は、試料核酸及び対照核酸、例えば、DNA又はRNAを、何百又は何千ものオリゴヌクレオチドプローブを含有する高密度アレイにハイブリダイズすることによって特定され得る（Cronin, M. T. et al. (1996) Hum. Mutat. 7: 244-255、Kozal, M. J. et al. (1996) Nat. Med. 2: 753-759）。例えば、バイオマーカーの遺伝子変異は、Cronin et al. (1996)（上記参照）に記載されるように、光生成DNAプローブを含む二次元アレイで特定され得る。簡潔には、プローブの第1のハイブリダイゼーションアレイを使用して、試料及び対照中のDNAの長いストレッチを走査して、連続的な重複プローブの線形アレイを作製することによって配列間の塩基の変化を特定することができる。このステップにより、点変異の特定が可能になる。このステップの後に、検出される全てのバリエーション又は変異に相補的なより小さい特殊化されたプローブアレイを使用することによって特異的変異の特徴付けを可能にする第2の

40

50

ハイブリダイゼーションアレイが続く。変異アレイは各々、並列プローブセットから成り、一方は野生型遺伝子に相補的であり、他方は変異体遺伝子に相補的である。かかるバイオマーカーの遺伝子変異は、例えば、生殖系列及び体細胞変異を含む様々な状況で特定され得る。

【0370】

更に別の実施形態では、当該技術分野で既知の様々な配列決定反応のうちのいずれかを使用して、バイオマーカー遺伝子を直接配列決定し、試料バイオマーカーの配列を対応する野生型（対照）配列と比較することによって変異を検出することができる。配列決定反応の例としては、Maxam and Gilbert (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74:560又はSanger (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74:5463によって開発された技法に基づくものが挙げられる。質量分析による配列決定（例えば、PCT国際公開第94/16101号、Cohen et al. (1996) Adv. Chromatogr. 36:127-162、及びGriffin et al. (1993) Appl. Biochem. Biotechnol. 38:147-159を参照のこと）を含み、診断アッセイが行われるとき、任意の様々な自動化された配列決定手順が利用され得ることもまた企図される（Naevé (1995) Biotechniques 19:448-53）。

10

【0371】

バイオマーカー遺伝子の変異を検出するための他の方法には、切断薬剤からの保護を使用してRNA/RNA又はRNA/DNAヘテロ二重鎖中のミスマッチ塩基を検出する方法が含まれる（Myers et al. (1985) Science 230:1242）。一般に、当該技術分野の技法である「ミスマッチ切断」は、野生型バイオマーカー配列を含有する（標識された）RNA又はDNAを組織試料から得られた潜在的に変異のRNA又はDNAとハイブリダイズすることによって形成されたヘテロ二重鎖を提供することから開始する。二本鎖二重鎖は、対照鎖と試料鎖との間の塩基対ミスマッチにより存在するもの等の二重鎖の一本鎖領域を切断する薬剤で処理される。例えば、RNA/DNA二重鎖がRNaseで処理され、DNA/DNAハイブリッドがSIヌクレアーゼで処理されて、ミスマッチ領域を酵素的に消化することができる。他の実施形態では、DNA/DNA二重鎖又はRNA/DNA二重鎖のいずれかがヒドロキシルアミン又は四酸化オスミウム及びピペリジンで処理されて、ミスマッチ領域を消化することができる。ミスマッチ領域を消化した後、結果として生じた物質が変性ポリアクリルアミドゲル上でサイズにより分離されて、変異の部位を決定する。例えば、Cotton et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:4397及びSaleeba et al. (1992) Methods Enzymol. 217:286-295を参照のこと。好ましい実施形態では、対照DNA又はRNAが検出のために標識され得る。

20

30

【0372】

なお別の実施形態では、ミスマッチ切断反応は、細胞試料から得られたバイオマーカーcDNAの点変異を検出及びマッピングするための定義された系において二本鎖DNA中のミスマッチ塩基対を認識する1つ以上のタンパク質（いわゆる「DNAミスマッチ修復」酵素）を用いる。例えば、E. coliのmutY酵素は、G/AミスマッチでAを切断し、HeLa細胞由来のチミジンDNAグリコシラーゼは、G/TミスマッチでTを切断する（Hsu et al. (1994) Carcinogenesis 15:1657-1662）。例示の実施形態に従って、バイオマーカー配列、例えば、DNAミスマッチ修復酵素で処理された野生型バイオマーカー及び切断産物（存在する場合）に基づくプローブが、電気泳動プロトコル等から検出され得る（例えば、米国特許第5,459,039号）。

40

【0373】

他の実施形態では、電気泳動移動度の改変を使用して、バイオマーカー遺伝子の変異を

50

特定することができる。例えば、一本鎖立体配座多型 (SSCP) を使用して、変異体核酸と野生型核酸との間の電気泳動移動度の差を検出することができる (Orita et al. (1989) Proc Natl. Acad. Sci U. S. A. 86: 2766、Cotton (1993) Mutat. Res. 285: 125-144 及び Hayashi (1992) Genet. Anal. Tech. Appl. 9: 73-79 も参照のこと)。試料及び対照バイオマーカー核酸の一本鎖 DNA 断片は変性され、復元され得る。一本鎖核酸の二次構造は配列によって異なり、電気泳動移動度の結果として生じた改変は、単一塩基の変化の検出さえも可能にする。DNA 断片は、標識プローブで標識又は検出され得る。アッセイの感度は、二次構造が配列の変化により敏感である (DNA ではなく) RNA を使用することによって増強され得る。好ましい実施形態では、主題の方法は、電気泳動移動度の変化に基づいて二本鎖ヘテロ二重鎖分子を分離するためのヘテロ二重鎖分析を利用する (Keen et al. (1991) Trends Genet. 7: 5)。

10

【0374】

更に別の実施形態では、変性剤勾配を有するポリアクリルアミドゲル中での変異断片又は野生型断片の移動が変性勾配ゲル電気泳動 (DGGE) を使用してアッセイされる (Myers et al. (1985) Nature 313: 495)。DGGE が分析法として使用される場合、DNA は、例えば、PCR によっておよそ 40 bp の高融点 GC リッチ DNA の GC クランプを付加することによって、完全に変性しないことを確実にするように修飾される。更なる実施形態では、温度勾配が変性勾配の代わりに使用されて、対照 DNA と試料 DNA との移動度の差を特定する (Rosenbaum and Reissner (1987) Biophys. Chem. 265: 12753 を参照のこと)。

20

【0375】

点変異を検出するための他の技法の例には、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、又は選択的プライマー伸長が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーは、既知の変異が中心に配置されるように調製され得、その後、完全マッチが見出された場合にのみハイブリダイゼーションを許容する条件下で標的 DNA にハイブリダイズされ得る (Saiki et al. (1986) Nature 324: 163、Saiki et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 6230)。かかる対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドがハイブリダイズ膜に付着され、標識された標的 DNA とハイブリダイズされる場合に、PCR 増幅された標的 DNA 又はいくつかの異なる変異にハイブリダイズされる。

30

【0376】

あるいは、選択的 PCR 増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術が、本発明と併せて使用され得る。特異的増幅のためのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、目的とする変異を、分子の中心に (これにより、増幅が差次的ハイブリダイゼーションに依存するようになる) (Gibbs et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 2437-2448)、又は適切な条件下でミスマッチがポリメラーゼ伸長を阻止又は低減する 1 つのプライマーの最も 3' 側に (Prossner (1993) Tibtech 11: 238) 有し得る。加えて、切断ベースの検出を行うために変異の領域内に新規制限部位を導入することが望ましくあり得る (Gasparini et al. (1992) Mol. Cell Probes 6: 1)。特定の実施形態では、増幅が増幅用の Taq リガーゼを使用して行われる場合もあることが理解される (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A. 88: 189)。そのような場合、5' 配列の 3' 末端に完全マッチが存在する場合にのみライゲーションが生じ、増幅の存在又は不在を探すことによって特定の部位での既知の変異の存在を検出することを可能にする。

40

【0377】

50

V I . 抗がん療法

表 1 ～ 5 に列挙される 1 つ以上のバイオマーカーの阻害剤及び免疫療法併用治療の有効性は、本明細書に記載の方法による対象におけるがんに関連するバイオマーカー量及び／又は活性に従って予測される。一実施形態では、かかる阻害剤及び免疫療法併用治療（例えば、別の免疫チェックポイント阻害剤などの 1 つ以上の追加の抗がん療法と組み合わせた 1 つ以上の阻害剤及び免疫療法併用治療）は、特に対象が最初に阻害剤及び免疫療法併用治療に応答する可能性の高い者として示された場合に投与され得る。別の実施形態では、かかる阻害剤及び免疫療法併用治療は、対象が阻害剤及び免疫療法併用治療に応答する可能性の低い者として示されたときに避けられ得、標的及び／又は非標的抗がん療法などの代替の治療レジメンが投与され得る。

【 0 3 7 8 】

併用療法も企図され、これは、例えば、1 つ以上の化学療法剤及び放射線、1 つ以上の化学療法剤及び免疫療法、又は 1 つ以上の化学療法剤、放射線、及び化学療法を含み得、これらの組み合わせは各々、抗免疫チェックポイント療法との併用であり得る。加えて、特定の標的を調節するための薬剤の任意の代表的な実施形態は、当業者によって本明細書に記載の任意の他の標的に適応され得る。

【 0 3 7 9 】

「標的療法」という用語は、選択された生体分子と選択的に相互作用し、それにより、がんを治療する薬剤の投与を指す。一例としては、当該技術分野で周知である、免疫チェックポイント阻害剤などの免疫療法が挙げられる。例えば、当該技術分野で周知であり、かつ上に記載されている治療用モノクローナル遮断抗体などの抗 P D - 1 経路剤を使用して、P D - 1、P D - L 1、及び／又は P D - L 2 などの P D - 1 経路の望ましくない成分を発現する腫瘍微小環境及び細胞を標的とすることができる。

【 0 3 8 0 】

例えば、「P D - 1 経路」という用語は、P D - 1 受容体及びそのリガンド、例えば、P D - L 1 及び P D - L 2 を指す。「P D - 1 経路阻害剤」は、相互作用によって別様に生成された免疫阻害性シグナル伝達が遮断されるか、又はさもなければ低下するように、P D - 1 とそのリガンドの一方又は両方との間の相互作用を遮断するか、又はさもなければ低下させる。抗免疫チェックポイント阻害剤は、直接又は間接的であり得る。直接抗免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイントとそのリガンドの少なくとも一方との間の相互作用を遮断するか、又はさもなければ低下させる。例えば、P D - 1 阻害剤は、P D - 1 のそのリガンドの一方又は両方との結合を遮断することができる。直接 P D - 1 組み合わせ阻害剤は、特に P D - 1（例えば、P D - L 1 及び P D - L 2）、P D - L 1（例えば、P D - 1 及び B 7 - 1）、及び P D - L 2（例えば、P D - 1 及び R G M b）の天然結合パートナーが既知であるため、当該技術分野で周知である。

【 0 3 8 1 】

例えば、二重特異性抗体などの P D - 1 と P D - L 1、P D - 1 と P D - L 2、P D - 1 と P D - L 1 及び P D - L 2 の両方との間の相互作用を直接遮断する薬剤は、阻害性シグナル伝達を阻止し、免疫応答を上方制御することができる（すなわち、P D - 1 経路阻害剤として）。あるいは、P D - 1 とそのリガンドの一方又は両方との間の相互作用を間接的に遮断する薬剤は、阻害性シグナル伝達を阻止し、免疫応答を上方制御することができる。例えば、B 7 - 1 又はその可溶性形態は、P D - L 1 ポリペプチドへの結合により、P D - 1 への結合に利用可能な P D - L 1 ポリペプチドの有効濃度を間接的に低減させる。例示の薬剤には、受容体とリガンドとの間の相互作用を遮断する P D - 1、P D - L 1、及び／又は P D - L 2 に対する単一特異性又は二重特異性遮断抗体；P D - 1、P D - L 1、及び／又は P D - L 2 の非活性化形態（例えば、優性阻害性若しくは可溶性ポリペプチド）；P D - 1、P D - L 1、及び／又は P D - L 2 の間の相互作用を遮断する小分子又はペプチド；P D - 1、P D - L 1、及び／又は P D - L 2 に結合し、その受容体とリガンドとの間の相互作用を阻害する融合タンパク質（例えば、抗体又は免疫グロブリンの F c 部分に融合した P D - 1、P D - L 1、及び／又は P D - L 2 の細胞外部分）；

10

20

30

40

50

天然PD-1、PD-L2、及び／又はPD-L2リガンドの非活性化形態、並びに天然PD-1、PD-L2、及び／又はPD-L2リガンドの可溶性形態が挙げられる。

【0382】

間接的抗免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイントとそのリガンドの少なくとも一方との間の相互作用によって生成された免疫阻害性シグナル伝達を遮断するか、又はさもなければ低下させる。例えば、阻害剤は、PD-1とそのリガンドの一方又は両方との間の相互作用を必ずしも直接遮断することなく、PD-1とそのリガンドの一方又は両方との間の相互作用を遮断することができる。例えば、間接的阻害剤には、免疫阻害性シグナル伝達を遮断するか、又はさもなければ低下させるために、シグナル伝達することを必要とされるPD-1及び／又はPD-L1の細胞内部分に結合するイントラボディが含まれる。同様に、PD-1、PD-L1、及び／又はPD-L2の発現を低下させる核酸は、相互作用のための成分の利用可能性を除去することによって、PD-1とそのリガンドの一方又は両方との間の相互作用を間接的に阻害することができる。かかる核酸分子は、PD-L1、PD-L2、及び／又はPD-L2転写又は翻訳を遮断することができる。

10

【0383】

同様に、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーと、かかる1つ以上のバイオマーカーの結合パートナー及び／又は基質との間の相互作用を直接遮断する薬剤は、インターフェロンシグナル伝達に対する感受性を増加させるなどの、かかる1つ以上のバイオマーカーによって制御されるシグナル伝達及びその下流免疫応答に対する阻害を除去することができる。

20

【0384】

あるいは、かかる1つ以上のバイオマーカーとその結合パートナー／基質との間の相互作用を間接的に遮断する薬剤は、かかる1つ以上のバイオマーカーによって制御されるシグナル伝達及びその下流免疫応答に対する阻害を除去することができる。例えば、かかる1つ以上のバイオマーカーの基質に結合し、かつ細胞内の1つ以上のバイオマーカーへの結合に利用可能なかかる基質の有効濃度を間接的に低下させることにより、機能活性を有しないバイオマーカー断片などのかかる1つ以上のバイオマーカーの切断された又は優性阻害性形態。例示の薬剤には、1つ以上のバイオマーカーとその基質との間の相互作用を遮断する1つ以上のバイオマーカー及び／又はその基質に対する単一特異性又は二重特異性遮断抗体、特にイントラボディ；かかる1つ以上のバイオマーカー及び／又はその基質の非活性化形態（例えば、優性阻害性ポリペプチド）、かかる1つ以上のバイオマーカーとその基質との間の相互作用又はかかる1つ以上のバイオマーカーの活性を遮断する小分子又はペプチド；並びに天然バイオマーカー及び／又はその基質の非活性化形態が挙げられる。

30

【0385】

免疫応答を誘発又は増幅するように設計された免疫療法は、「活性化免疫療法」と称される。免疫応答を低下又は抑制するように設計された免疫療法は、「抑制免疫療法」と称される。遺伝学的に修飾された移植がん細胞に免疫系効果をもたらすと考えられる任意の薬剤をアッセイして、薬剤が免疫療法であるかを決定し、所与の遺伝子修飾が免疫応答の調節にもたらす効果を決定することができる。いくつかの実施形態では、免疫療法は、がん細胞特異的である。いくつかの実施形態では、免疫療法は、「非標的」であり得、これは、免疫系細胞と選択的に相互作用しないが、免疫系機能を調節する薬剤の投与を指す。非標的療法の代表的な例には、化学療法、遺伝子療法、及び放射線療法が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0386】

免疫療法は、がん抗原又は疾患抗原に対して産生された予め形成された抗体の投与（例えば、任意に化学療法剤又は毒素に結合しているモノクローナル抗体の腫瘍抗原への投与）によって達成される宿主の短期間保護のための受動免疫を伴い得る。この免疫療法は、がん細胞株の細胞毒性リンパ球によって認識されるエピトープの使用にも焦点を合わせる

50

ことができる。あるいは、アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、RNA干渉分子、三重らせんポリヌクレオチド等を使用して、腫瘍又はがんの発症、進行、及び／又は病理に関連した生体分子を選択的に調節することができる。

【0387】

一実施形態では、免疫療法は、養子細胞ベースの免疫療法を含む。照射自己又は同種腫瘍細胞、腫瘍溶解物又はアポトーシス腫瘍細胞、抗原提示細胞ベースの免疫療法、樹状細胞ベースの免疫療法、養子T細胞移入、養子CAR T細胞療法、自己免疫増強療法（AIE T）、がんワクチン、及び／又は抗原提示細胞を含むが、これらに限定されない、周知の養子細胞ベースの免疫療法様式。かかる細胞ベースの免疫療法は、1つ以上の遺伝子産物を発現して免疫応答を更に調節する、例えば、GM-CSF等のサイトカインを発現するように、かつ／又はMAGE-1、gp-100、患者特異的ネオ抗原ワクチン等の腫瘍関連抗原（TAA）抗原を発現するように更に修正され得る。

10

【0388】

別の実施形態では、免疫療法は、非細胞ベースの免疫療法を含む。一実施形態では、ワクチン増強アジュバントを有する又は有しない抗原を含む組成物が使用される。かかる組成物は、ペプチド組成物、腫瘍溶解性ウイルス、融合タンパク質を含む組換え抗原等の多くの周知の形態で存在する。なお別の実施形態では、免疫調節インターロイキン、例えば、IL-2、IL-6、IL-7、IL-12、IL-17、IL-23等、並びにそのモジュレーター（例えば、遮断抗体又はより強力な形態若しくはより長い時間持続する形態）が使用される。更に別の実施形態では、免疫調節サイトカイン、例えば、インターフェロン、GM-CSF、イミキモド、TNFアルファ等、並びにそのモジュレーター（例えば、遮断抗体又はより強力な形態若しくはより長い時間持続する形態）が使用される。別の実施形態では、免疫調節ケモカイン、例えば、CCL3、CCL26、及びCXCL7等、並びにそのモジュレーター（例えば、遮断抗体又はより強力な形態若しくはより長い時間持続する形態）が使用される。別の実施形態では、免疫抑制を標的とする免疫調節分子、例えば、STAT3シグナル伝達モジュレーター、NFカッパBシグナル伝達モジュレーター、及び免疫チェックポイントモジュレーターが使用される。「免疫チェックポイント」及び「抗免疫チェックポイント療法」という用語は、上で説明されている。

20

【0389】

なお別の実施形態では、免疫調節薬、例えば、免疫細胞増殖抑制薬、グルココルチコイド、細胞増殖抑制剤、イムノフィリン、及びそのモジュレーター（例えば、ラパマイシン、カルシニューリン阻害剤、タクロリムス、シクロスポリン（cyclosporin）（シクロスポリン（cyclosporin））、ピメクロリムス、アベチムス、グスペリムス、リダフォロリムス、エベロリムス、テムシロリムス、ゾタロリムス等）、ヒドロコルチゾン（コルチゾール）、酢酸コルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、デキサメタゾン、ベータメタゾン、トリアムシノロン、ベクロメタゾン、酢酸フルドコルチゾン、酢酸デオキシコルチコステロン（doca）アルドステロン、非グルココルチコイドステロイド、ピリミジン合成阻害剤、レフルノミド、テリフルノミド、葉酸類似体、メトトレキサート、抗胸腺細胞グロブリン、抗リンパ球グロブリン、サリドマイド、レナリドミド、ペントキシフィリン、ブプロピオン、クルクミン、カテキン、オピオイド、IMP DH阻害剤、ミコフェノール酸、ミリオシン、フィンゴリモド、NF-κB阻害剤、ラロキシフェン、ドロトレコギンアルファ、デノスマブ、NF-κBシグナル伝達カスケード阻害剤、ジスルフィラム、オルメサルタン、ジチオカルバメート、プロテアソーム阻害剤、ボルテゾミブ、MG132、Pro1、NPI-0052、クルクミン、ゲニステイン、レスベラトロール、パルテノリド、サリドマイド、レナリドミド、フラボピリドール、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）、三酸化ヒ素、デヒドロキシメチルエポキシキノマイシン（DHMEQ）、I3C（インドール-3-カルビノール）／DIM（ジインドールメタン）（I3C／DIM）、Bay 11-7082、ルテオリン、細胞透過性ペプチドSN-50、IKBa、スーパーリプレッサー過剰発現、NFKBデコイオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）、又はそれらのいずれかの誘導体

30

40

50

若しくは類似体が使用される。更に別の実施形態では、免疫調節抗体又はタンパク質が使用される。例えば、CD40、Toll様受容体（TLR）、OX40、GITR、CD27、又は4-1BB、T細胞二重特異性抗体、抗IL-2受容体抗体、抗CD3抗体、OKT3（ムロモナブ）、オテリキシマブ、テプリズマブ、ビジリズマブ、抗CD4抗体、クレノリキシマブ、ケリキシマブ、ザノリムマブ、抗CD11抗体、エファリズマブ、抗CD18抗体、エルリズマブ、ロベリズマブ、抗CD20抗体、アフツズマブ、オクレリズマブ、オフアツムマブ、パスコリズマブ、リツキシマブ、抗CD23抗体、ルミリキシマブ、抗CD40抗体、テネリキシマブ、トラリズマブ、抗CD40L抗体、ルプリズマブ、抗CD62L抗体、アセリズマブ、抗CD80抗体、ガリキシマブ、抗CD147抗体、ガビリモマブ、Bリンパ球刺激因子（BLyS）阻害抗体、ベリムマブ、CTLA4-Ig融合タンパク質、アバタセプト、ベラタセプト、抗CTLA4抗体、イピリムマブ、トレメリムマブ、抗エオタキシン1抗体、ベルチリムマブ、抗a4-インテグリン抗体、ナタリズマブ、抗IL-6R抗体、トシリズマブ、抗LFA-1抗体、オデュリモマブ、抗CD25抗体、バシリキシマブ、ダクリズマブ、イノリモマブ、抗CD5抗体、ゾリモマブ、抗CD2抗体、シプリズマブ、ネレリモマブ、ファラリモマブ、アトリズマブ、アトロリムマブ、セデリズマブ、ドルリモマブアリトクス、ドルリキシズマブ、フォントリズマブ、ガンテネルマブ、ゴミリキシマブ、レブリリズマブ、マスリモマブ、モロリムマブ、パキセリズマブ、レスリズマブ、ロベリズマブ、タリズマブ、テリモマブアリトクス、バパリキシマブ、ベパリモマブ、アフリベルセプト、アレファセプト、リロナセプト、IL-1受容体アンタゴニスト、アナキンラ、抗IL-5抗体、メポリズマブ、IgE阻害剤、オマリズマブ、タリズマブ、IL12阻害剤、IL23阻害剤、ウステキヌマブ等に結合する抗体。ビタミンA、ビタミンE、ビタミンC等の免疫応答を増強する栄養補助剤が当該技術分野で周知であり（例えば、米国特許第4,981,844号及び同第5,230,902号並びにPCT公開第2004/004483号を参照のこと）、本明細書に記載の方法で使用され得る。

10

20

30

40

50

【0390】

同様に、免疫療法以外の薬剤及び療法、又はそれらの組み合わせを、免疫療法の有無にかかわらず、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの阻害剤と組み合わせて使用して免疫応答を刺激し、それによって、それらから利益を受け得る状態を治療することができる。例えば、化学療法、放射線、後成的修飾因子（例えば、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）修飾因子、メチル化修飾因子、リン酸化修飾因子等）、標的療法等が当該技術分野で周知である。

【0391】

「非標的療法」という用語は、選択された生体分子と選択的に相互作用しないが、がんを治療する薬剤の投与を指す。非標的療法の代表的な例には、化学療法、遺伝子療法、及び放射線療法が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、化学療法が使用される。化学療法は、化学療法剤の投与を含む。かかる化学療法剤は、以下の化合物の群：白金化合物、細胞毒性抗生物質、代謝拮抗剤、抗分裂剤、アルキル化剤、ヒ素化合物、DNAトポイソメラーゼ阻害剤、タキサン、ヌクレオシド類似体、植物アルカロイド、及び毒素、並びにそれらの合成誘導体から選択されるものであり得るが、これらに限定されない。例示の化合物としては、限定されないが、アルキル化剤：シスプラチン、トレオスルファン、及びトロホスファミド；植物アルカロイド：ビンブラスチン、パクリタキセル、ドセタキセル；DNAトポイソメラーゼ阻害剤：テニポシド、クリスナトール、及びマイトマイシン；抗葉酸剤：メトトレキサート、ミコフェノール酸、及びヒドロキシウレア；ピリミジン類似体：5-フルオロウラシル、ドキシフルリジン、及びシトシンアラビノシド；プリン類似体：メルカプトプリン及びチオグアニン；DNA代謝拮抗剤：2'-デオキシ-5-フルオロウリジン、アフジコリングリシネート、及びピラゾロイミダゾール；並びに有糸分裂阻害剤：ハリコンドリン、コルヒチン、及びリゾキシンが挙げられる。1つ以上の化学療法剤（例えば、FLAG、CHOP）を含む組成物も使用され得る。FLAGには、フルダラビン、シトシンアラビノシド（Ara-C）、及びG-CSFが

含まれる。CHOPには、シクロホスファミド、ビンクリスチン、ドキソルビシン、及びプレドニゾンが含まれる。別の実施形態では、PARP（例えば、PARP-1及び／又はPARP-2）阻害剤が使用され、かかる阻害剤は当該技術分野で周知である（例えば、Olaparib、ABT-888、BSI-201、BGP-15（N-Gen Research Laboratories, Inc.）、INO-1001（Inotek Pharmaceuticals Inc.）、PJ34（Soriano et al., 2001、Pacher et al., 2002b）、3-アミノベンズアミド（Trevigen）、4-アミノ-1, 8-ナフタルイミド（Trevigen）、6（5H）-フェナントリジノン（Trevigen）、ベンズアミド（米国特許R 第36, 397号）、及びNU1025（Bowman et al.）。作用機構は、一般に、PARPに結合し、その活性を低下させるPARP阻害剤の能力に関連する。PARPは、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD⁺）のニコチンアミド及びポリ-ADP-リボース（PAR）への変換を触媒する。ポリ（ADP-リボース）及びPARPはいずれも、転写制御、細胞増殖、ゲノム安定性、及び発がんに関連付けられている（Bouchard V. J. et al. *Experimental Hematology*, Volume 31, Number 6, June 2003, pp. 446-454 (9)、Herceg Z.; Wang Z.-Q. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Volume 477, Number 1, 2 Jun. 2001, pp. 97-110 (14)）。ポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼ1（PARP1）は、DNA一本鎖破壊（SSB）の修復における重要な分子である（de Murcia J. et al. 1997. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 94: 7303-7307、Schreiber V, Dantzer F, Ame J C, de Murcia G (2006) *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 517-528、Wang Z Q, et al. (1997) *Genes Dev* 11: 2347-2358）。PARP1機能の阻害によるSSB修復のノックアウトにより、相同性指向DSB修復に欠陥のあるがん細胞における合成致死を誘発し得るDNA二本鎖破壊（DSB）が誘導される（Bryant H E, et al. (2005) *Nature* 434: 913-917、Farmer H, et al. (2005) *Nature* 434: 917-921）。化学療法剤の前述の例は例示的なものであり、限定するようには意図されていない。

10

20

30

40

50

【0392】

別の実施形態では、放射線療法が使用される。放射線療法で使用される放射線は、電離放射線であり得る。放射線療法は、ガンマ線、X線、又は陽子ビームでもあり得る。放射線療法の例には、外部ビーム放射線療法、放射性同位体（I-125、パラジウム、イリジウム）、ストロンチウム-89等の放射性同位体の間質埋め込み、胸部放射線療法、腹腔内P-32放射線療法、並びに／又は全腹部及び骨盤放射線療法が挙げられるが、これらに限定されない。放射線療法の一般概要については、Hellman, Chapter 16: Principles of Cancer Management: Radiation Therapy, 6th edition, 2001, DeVita et al., eds., J. B. Lippencott Company, Philadelphiaを参照されたい。放射線療法は、放射線が遠隔源から向けられる外部ビーム放射線又は遠隔療法として施され得る。放射線治療は、放射性源ががん細胞又は腫瘍塊に近接して体内に設置される内部療法又は小線源療法として施される場合もある。ヘマトポルフィリン及びその誘導体、ベルトポルフィン（BPD-MA）、フタロシアニン、感光剤Pc4、デメトキシヒポクレリンA、並びに2BA-2-DMHA等の感光剤の投与を含む光線力学的療法の使用も包含される。

【0393】

別の実施形態では、がん性細胞及び／又は組織を物理的に取り除くために外科的介入が行われ得る。なお別の実施形態では、ホルモン療法が使用される。ホルモン治療的治療は

、例えば、ホルモンアゴニスト、ホルモンアンタゴニスト（例えば、フルタミド、ピカルタミド、タモキシフェン、ラロキシフェン、酢酸ロイプロリド（LUPRON）、LH-RHアンタゴニスト）、ホルモン生合成及び処理阻害剤、並びにステロイド（例えば、デキサメタゾン、レチノイド、デルトイド、ベータメタゾン、コルチゾール、コルチゾン、プレドニゾン、デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、エストロゲン、テストステロン、プロゲステロン）、ビタミンA誘導体（例えば、オールトランス型レチノイン酸（ATRA））、ビタミンD3類似体、抗ゲスターゲン（例えば、ミフェプリストン、オナプリストン）、又は抗アンドロゲン（例えば、酢酸シプロテロン）を含み得る。

【0394】

更に別の実施形態では、身体組織が高温（最大106°F）に曝露される手技である温熱療法が使用される。熱は、細胞を損傷するか、又はそれらが生きるのに必要な物質をそれらから取り除くことによって腫瘍を縮小させる助けとなり得る。温熱療法は、外部及び内部加熱デバイスを使用した局部、局所、及び全身温熱療法であり得る。温熱療法は、ほとんどの場合、他の療法形態（例えば、放射線療法、化学療法、及び生物学的療法）とともに使用されて、それらの有効性を向上させるよう試みる。局部温熱とは、腫瘍等の非常に小さい領域に適用される熱を指す。その領域は、体外のデバイスから腫瘍に向けられた高周波で外部から加熱され得る。内部加熱を達成するために、細い加熱ワイヤ又は温水が充填された中空管、埋め込み型マイクロ波アンテナ、及び高周波電極を含む滅菌プローブのいくつかのタイプのうちの1つが使用され得る。局所温熱療法では、臓器又は肢が加熱される。高エネルギーを生み出す磁石及びデバイスが加熱される領域上に配置される。灌流と呼ばれる別のアプローチでは、患者の血液のいくらかが取り除かれ、加熱され、その後、内部加熱される領域にポンプ注入（灌流）される。全身加熱は、全身に広がった転移がんを治療するために使用される。これは、温水毛布、温ワックス、誘導コイル（電気毛布中のもの等）、又は熱チャンバ（大型インキュベーターと同様のもの）を使用して達成され得る。温熱療法は、放射線副作用又は合併症の著しい増加を引き起こさない。しかしながら、皮膚に直接適用される熱は、治療される患者の約半数に不快感又は更には著しい局所疼痛をもたらし得る。これは、通常は急速に治癒する水疱も引き起こし得る。

【0395】

なお別の実施形態では、光線力学的療法（別名、PDT、光線照射療法、光線療法、又は光化学療法）が、いくつかのがんタイプの治療に使用される。これは、単細胞生物が特定のタイプの光に曝露されたときに感光剤として既知のある特定の化学物質がその生物を死滅させることができるという発見に基づいている。PDTは、感光剤と組み合わせて固定周波数レーザー光を使用することによってがん細胞を破壊する。PDTでは、感光剤は、血流に注射され、全身の細胞によって吸収される。この薬剤は、正常細胞で残存するよりも長い時間にわたってがん細胞で残存する。処理されたがん細胞がレーザー光に曝露されると、感光剤は光を吸収し、処理されたがん細胞を破壊する酸素の活性形態を産生する。露光は、感光剤の大半が健常細胞を去っているが、依然としてがん細胞中に存在しているときに生じるように、慎重に時間調節されなければならない。PDTで使用されるレーザー光は、光ファイバー（極細ガラスストランド）を通して方向付けられ得る。光ファイバーは、適切な量の光を送達するためにがんに近接して設置される。光ファイバーは、肺がんの治療の場合には気管支鏡を通して肺内に方向付けられ得、食道がんの治療の場合には内視鏡を通して食道内に方向付けられ得る。PDTの利点は、健常組織に最小限の損傷しか引き起こさないことである。しかしながら、現在使用されているレーザー光が約3センチメートル（1と1/8インチをわずかに超える）を超える組織を通過することができないため、PDTは、皮膚上若しくは皮膚真下又は内臓器官の内膜上の腫瘍の治療に主に使用されている。光線力学的療法により、治療後6週間以上にわたって皮膚及び目が光に敏感になる。患者は、直射日光及び明るい室内照明を少なくとも6週間避けるよう忠告される。患者が屋外に出なければならない場合、サングラスを含む防護衣類を着用しなければならない。PDTの他の一時的な副作用は、特定の領域の治療に関連しており、咳嗽、

10

20

30

40

50

嚥下困難、腹痛、及び痛みを伴う呼吸又は息切れが含まれ得る。1995年12月、米国食品医薬品局（FDA）は、閉塞を引き起こしている食道がん及びレーザーのみでは満足に治療することができない食道がんの症状を緩和するためのポルフィマーナトリウムと呼ばれる感光剤又はPhotofrin（登録商標）を承認した。1998年1月、FDAは、通常の肺がん治療が適切ではない患者における早期非小細胞肺がんの治療のためにポルフィマーナトリウムを承認した。国立がん研究所及び他の機関は、膀胱がん、脳がん、喉頭がん、及び口腔がんを含むいくつかのがんタイプに対する光線力学的療法の使用を評価するための臨床試験（調査研究）を支援している。

【0396】

更に別の実施形態では、レーザー療法は、高強度光を利用してがん細胞を破壊するために使用される。この技法は、多くの場合、特にがんが他の治療によって治癒されない場合に、出血又は閉塞等のがんの症状を緩和するために使用される。この技法は、腫瘍を縮小又は破壊することによってがんを治療するためにも使用される。「レーザー」という用語は、励起誘導放射による光増幅を表す。電球からの光等の常光は、多くの波長を有し、全ての方向に広がる。その一方で、レーザー光は、特定波長を有し、狭ビームに集中する。このタイプの高強度光は、多くのエネルギーを含んでいる。レーザーは、非常に強力であり、鋼鉄の切断又はダイヤモンドの成形に使用され得る。レーザーは、眼内の損傷網膜の修復又は組織の切断（外科用メスの代わりに）等の非常に精密な外科的作業にも使用され得る。いくつかの異なる種類のレーザーが存在するが、医学分野で3種類のみが広く使用されている。二酸化炭素（CO₂）レーザー：このタイプのレーザーは、深層を貫通することなく皮膚表面から薄層を取り除くことができる。この技法は、皮膚の深部に広がっていない腫瘍及びある特定の前がん性状態を治療する際に特に有用である。伝統的な外科用メス手術の代替案として、CO₂レーザーも皮膚を切断することができる。レーザーをこの方法で使用して、皮膚がんを取り除く。ネオジウム：イットリウム－アルミニウム－ガーネット（Nd：YAG）レーザー：このレーザーからの光は、他のタイプのレーザーよりも深く組織に透過することができ、血液を素早く凝固させることができる。これは、光ファイバーを通じて身体の到達しにくい部分に運ばれる。このタイプのレーザーは、咽喉がんの治療に使用されることもある。アルゴンレーザー：このレーザーは、組織の表層のみを通過することができ、したがって、皮膚科学及び眼の手術に有用である。これは、光線力学的療法（PDT）として既知の手技において腫瘍を治療するために感光性色素とともに使用される。レーザーは、以下を含む標準の手術道具に優るいくつかの利点を有する。レーザーは、外科用メスよりも精密である。周辺皮膚又は他の組織とほとんど接触しないため、切開付近の組織が保護される。レーザーによって生成された熱が手術部位を滅菌するため、感染の危険性を低下させる。レーザーの精度がより小さい切開を可能にするため、より短い手術時間しか要しない場合がある。多くの場合、治療時間が短縮され、レーザー熱が血管を閉鎖するため、出血、腫脹、又は瘢痕が軽減される。レーザー手術はあまり複雑ではない場合がある。例えば、光ファイバーを用いて、レーザー光は、大きく切開することなく、身体部分に方向付けられ得る。より多くの手技が外来で行われ得る。レーザーを2つの方法で使用して、すなわち、熱で腫瘍を縮小若しくは破壊することによって、又はがん細胞を破壊する感光剤として既知の化学物質を活性化することによって、がんを治療することができる。PDTでは、感光剤はがん細胞で保持され、がん細胞を死滅させる反応を引き起こす光によって刺激され得る。CO₂及びNd：YAGレーザーは、腫瘍を縮小又は破壊するために使用される。これらは、医師が膀胱等の身体のある特定の領域を覗き込むことを可能にする管である内視鏡とともに使用され得る。いくつかのレーザーからの光は、光ファイバーを装着したフレキシブル内視鏡を通して伝達される。これにより、医師が手術を除いては別様に到達することのできない身体部分を見て作業することが可能になり、それ故に、レーザービームの非常に精密な照準が可能になる。レーザーは、低出力顕微鏡とともに使用される場合もあり、医師は治療をされている部位をはっきりと見ることができる。他の器具とともに使用して、レーザーシステムは、極細糸の幅未満である直径最小200ミクロンの切断領域を生成することができる。レーザーは、多くのが

10

20

30

40

50

んタイプを治療するために使用される。レーザー手術は、声門（声帯）がん、子宮頸がん、皮膚がん、肺がん、膣がん、外陰がん、及び陰茎がんのある特定の病期に対する標準の治療である。がんを破壊するための使用に加えて、レーザー手術は、がんによって引き起こされる症状の緩和（緩和ケア）を助けるためにも使用される。例えば、レーザーを使用して、患者の気管（trachea）（気管（wind pipe））を封鎖している腫瘍を縮小又は破壊し、呼吸を容易にすることができる。これは、結腸直腸がん及び肛門がんの緩和に使用されることもある。レーザー誘起間質温熱療法（LITT）は、レーザー療法における最新の開発のうちの1つである。LITTは、熱が、細胞を損傷するか、又はそれらが生きるのに必要な物質をそれらから取り除くことによって腫瘍を縮小させる助けとなり得る、温熱療法と呼ばれるがん治療と同じ発想を使用する。この治療では、レーザーは、体内の間質領域（臓器間の領域）に方向付けられる。その後、レーザー光が腫瘍の温度を上昇させ、これにより、がん細胞が損傷又は破壊される。

10

【0397】

療法を用いた治療の持続期間及び／又は用量は、特定の治療薬又はそれらの組み合わせによって異なり得る。当業者であれば、特定のがん治療薬の適切な治療時間を理解するであろう。本発明は、各がん治療薬の最適治療スケジュールの継続的な評価を企図し、ここで、本発明の方法によって決定される対象のがんの表現型が、最適治療用量及びスケジュールを決定する要因である。

【0398】

ポリヌクレオチドを哺乳動物、ヒト、若しくは非ヒト、又はそれらの細胞に導入するための任意の手段は、本発明の様々な構築物を対象とするレシピエントに送達するための本発明の実施に適応され得る。本発明の一実施形態では、DNA構築物は、トランスフェクションによって、すなわち、「ネイキッド」DNAの送達によって、又はでコロイド分散系との複合体で細胞に送達される。コロイド系には、巨大分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、及び脂質ベースの系、例えば、水中油乳剤、ミセル、混合ミセル、及びリポソームが含まれる。本発明の好ましいコロイド系は、脂質複合体化DNA又はリポソーム製剤化DNAである。前者のアプローチでは、例えば、脂質でのDNAの製剤化の前に、所望のDNA構築物を有するトランス遺伝子を含むプラスミドが発現（例えば、イントロンの5'非翻訳領域への包含及び不要な配列の排除（Felgner, et al., Ann NY Acad Sci 126-139, 1995）について最初に

20

30

【0399】

リポソームの標的は、解剖学的要因及び機構的要因に基づいて分類され得る。解剖学的分類は、選択性レベル、例えば、臓器特異的、細胞特異的、及び細胞小器官特異的に基づいている。機構的標的は、それが受動的であるか能動的であるかに基づいて区別され得る。受動的標的は、洞様毛細血管を含む臓器内の細網内皮系（RES）の細胞に分布するリポソームの生来の傾向を利用する。その一方で、能動的標的は、天然に存在する局在化部位以外の臓器及び細胞型への標的を達成するために、リポソームをモノクローナル抗体、糖、糖脂質、若しくはタンパク質等の特異的リガンドに結合することによる、又はリポソームの組成又はサイズを変化させることによるリポソームの改変を伴う。

40

【0400】

標的とされた送達系の表面は、様々な方法で修飾され得る。リポソーム標的送達系の場合、脂質基は、標的リガンドをリポソーム二重層と安定した会合で維持するために、リポソームの脂質二重層に組み込まれ得る。脂質鎖を標的リガンドに連結するために様々な連

50

結基が使用され得る。送達ビヒクル、例えば、リボソームと会合したネイキッドDNA又はDNAは、対象におけるいくつかの部位に投与され得る（以下を参照のこと）。

【0401】

核酸は、任意の所望のベクターで送達され得る。これらには、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、及びプラスミドベクターを含むウイルス又は非ウイルスベクターが含まれる。例示のウイルスタイプには、HSV（単純ヘルペスウイルス）、AAV（アデノ随伴ウイルス）、HIV（ヒト免疫不全ウイルス）、BIV（ウシ免疫不全ウイルス）、及びMLV（マウス白血球ウイルス）が挙げられる。核酸は、十分に効率的な送達レベルを提供する任意の所望の形式で、例えば、ウイルス粒子、リボソーム、ナノ粒子で投与され、ポリマーに複合体化され得る。

10

【0402】

目的とするタンパク質又は核酸をコードする核酸は、プラスミド若しくはウイルスベクター、又は当該技術分野で既知の他のベクターに存在し得る。かかるベクターは周知であり、任意のベクターが特定の用途のために選択され得る。本発明の一実施形態では、遺伝子送達ビヒクルは、プロモーター及びデメチラーゼコーディング配列を含む。好ましいプロモーターは、組織特異的プロモーター及び細胞増殖によって活性化されるプロモーター、例えば、チミジンキナーゼ及びチミジル酸シンターゼプロモーターである。他の好ましいプロモーターには、ウイルス感染によって活性化可能なプロモーター、例えば、 α -及び β -インターフェロンプロモーター、並びにエストロゲン等のホルモンによって活性化可能なプロモーターが含まれる。使用され得る他のプロモーターには、モロニーウイルスLTR、CMVプロモーター、及びマウスアルブミンプロモーターが含まれる。プロモーターは、構成的又は誘導性であり得る。

20

【0403】

別の実施形態では、ネイキッドポリヌクレオチド分子が、WO90/11092及び米国特許第5,580,859号に記載されるように遺伝子送達ビヒクルとして使用される。かかる遺伝子送達ビヒクルは、成長因子DNA又はRNAのいずれかであり得、ある特定の実施形態では、死滅アデノウイルスに連結される。Curriel et al., Hum. Gene Ther. 3:147-154, 1992。任意に使用され得る他のビヒクルには、DNA-リガンド (Wu et al., J. Biol. Chem. 264:16985-16987, 1989)、脂質-DNAの組み合わせ (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84:7413-7417, 1989)、リボソーム (Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84:7851-7855, 1987)、及びマイクロプロジェクトイル (Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88:2726-2730, 1991) が含まれる。

30

【0404】

遺伝子送達ビヒクルは、ウイルス複製起源又はパッケージングシグナル等のウイルス配列を任意に含み得る。これらのウイルス配列は、アストロウイルス、コロナウイルス、オルトミクソウイルス、パポバウイルス、パラミクソウイルス、パルボウイルス、ピコルナウイルス、ポックスウイルス、レトロウイルス、トガウイルス、又はアデノウイルス等のウイルスから選択され得る。好ましい実施形態では、成長因子遺伝子送達ビヒクルは、組換えレトロウイルスベクターである。組換えレトロウイルス及びその様々な使用は、例えば、Mann et al., Cell 33:153, 1983、Cane and Mulligan, Proc. Nat'l. Acad. Sci. U. S. A. 81:6349, 1984、Miller et al., Human Gene Therapy 1:5-14, 1990、米国特許第4,405,712号、同第4,861,719号、及び同第4,980,289号、並びにPCT出願第89/02,468号、同第89/05,349号、及び同第90/02,806号を含む、多数の参考文献に記載されている。例えば、EP0,415,731、WO90/07936、WO94/03622

40

50

、WO93/25698、WO93/25234、米国特許第5,219,740号、WO9311230、WO9310218、Vile and Hart, Cancer Res. 53:3860-3864, 1993、Vile and Hart, Cancer Res. 53:962-967, 1993、Ram et al., Cancer Res. 53:83-88, 1993、Takamiya et al., J. Neurosci. Res. 33:493-503, 1992、Baba et al., J. Neurosurg. 79:729-735, 1993 (米国特許第4,777,127号、GB2,200,651、EP0,345,242、及びWO91/02805)に記載のものを含む、多数のレトロウイルス遺伝子送達ベヒクルが、本発明で利用され得る。本発明のポリヌクレオチドを送達するために使用され得る他のウイルスベクター系は、ヘルペスウイルス、例えば、単純ヘルペスウイルス(1997年5月20日に発行されたWoo et al.による米国特許第5,631,236号、及びNeurovexによるWO00/08191)、ワクシニアウイルス(Ridgeway (1988) Ridgeway, "Mammalian expression vectors," In: Rodriguez R L, Denhardt D T, ed. Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses. Stoneham: Butterworth, Baichwal and Sugden (1986) "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes," In: Kucherlapati R, ed. Gene transfer. New York: Plenum Press, Coupar et al. (1988) Gene, 68:1-10)、及びいくつかのRNAウイルスに由来している。好ましいウイルスには、アルファウイルス、ポキシウイルス、アレナウイルス、ワクチニアウイルス、ポリオウイルス等が含まれる。それらは、様々な哺乳類細胞にいくつかの魅力的な特徴を提供する(Friedmann (1989) Science, 244:1275-1281、Ridgeway, 1988 (上記参照)、Baichwal and Sugden, 1986 (上記参照)、Coupar et al. 1988、Horwich et al. (1990) J. Virol., 64:642-650)。

【0405】

他の実施形態では、ゲノム中の標的DNAは、当該技術分野で周知の方法を使用して操作され得る。例えば、ゲノム中の標的DNAは、欠失、挿入、及び／又は変異によって操作され得、これらは、レトロウイルス挿入、人工染色体技法、遺伝子挿入、組織特異的プロモーターによるランダム挿入、遺伝子標的、転移性因子、及び／又は外来DNAを導入するための若しくは修飾DNA／修飾核DNAを産生するための任意の他の方法である。他の修飾技法は、DNA配列をゲノムから欠失させること及び／又は核DNA配列を改変することを含む。例えば、核DNA配列は、部位特異的変異誘発によって改変され得る。

【0406】

他の実施形態では、組換えバイオマーカーポリペプチド及びそれらの断片が対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、増強された生物学的特性を有する融合タンパク質が構築及び投与され得る。加えて、バイオマーカーポリペプチド及びその断片は、増加したバイオアベイラビリティ及び減少したタンパク質分解等の望ましい生物学的活性を更に増強するために、当該技術分野で周知の薬理学的方法(例えば、ペグ化、グリコシル化、オリゴマー化等)に従って修飾され得る。

【0407】

VII. 臨床的有效性

臨床的有效性は、当該技術分野で既知の任意の方法によって測定され得る。例えば、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの阻害剤、及び免疫療法併用治療などの療法に対する応答は、がん、例えば、腫瘍のその療法に対する任意の応答、好ましくは、ネオアジュバント又はアジュバント化学療法の開始後の腫瘍質量及び／又は体積の変化に関

連する。腫瘍応答は、CT、PET、マンモグラム、超音波、又は触診によって測定される全身介入後の腫瘍サイズが初期サイズ及び寸法と比較され得るネオアジュバント又はアジュバント状況下で評価され得、腫瘍の細胞充実度が組織学的に推定され得、治療開始前に採取された腫瘍生検の細胞充実度と比較され得る。応答は、生検又は外科的切除後の腫瘍のキャリパー測定又は病理学的試験によっても評価され得る。応答は、腫瘍体積若しくは細胞充実度のパーセンテージ変化等の定量様式で記録され得るか、又は残留がん組織量等の半定量スコア化システム (Symmans et al., J. Clin. Oncol. (2007) 25: 4414-4422) 若しくはミラー・ペインスコア (Ogston et al., (2003) Breast (Edinburgh, Scotland) 12: 320-327) を使用して、「病理学的完全応答」(pCR)、「臨床的完全寛解」(cCR)、「臨床的部分寛解」(cPR)、「臨床的安定疾患」(cSD)、「臨床的進行性疾患」(cPD)、又は他の質的基準等の質的様式で記録され得る。腫瘍応答の評価は、ネオアジュバント又はアジュバント療法の開始後早期に、例えば、数時間後、数日後、数週間後、又は好ましくは数ヶ月後に行われ得る。応答評価の典型的なエンドポイントは、ネオアジュバント化学療法の終了時又は残留腫瘍細胞及び／若しくは腫瘍床の外科的除去時である。

10

【0408】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療的治療の臨床的有効性は、臨床的有用率(CBR)を測定することによって決定され得る。臨床的有用率は、療法終了の少なくとも6ヶ月後の時点での完全寛解(CR)にある患者のパーセンテージ、部分寛解(PR)にある患者の数、及び安定疾患(SD)を有する患者の数の合計を決定することによって測定される。この公式の省略表現は、6ヶ月にわたる $CBR = CR + PR + SD$ である。いくつかの実施形態では、特定の抗免疫チェックポイント治療レジメンのCBRは、少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、又はそれ以上である。

20

【0409】

抗免疫チェックポイント療法などの免疫療法に対する応答を評価するための追加の基準は、「生存期間」に関連し、これには、死亡までの生存期間、別名、全生存期間(当該死亡は、原因を問わないか、又は腫瘍関連のいずれかであり得る)、「無再発生存期間」(再発という用語は、局所再発及び遠隔再発の両方を含むものとする)、無転移生存期間、無病生存期間(病という用語は、がん及びそれに関連する疾患を含むものとする)の全てが含まれる。当該生存期間の長さは、定義された開始点(例えば、診断時又は治療開始時)及び終了点(例えば、死、再発、又は転移)を参照することによって計算され得る。加えて、治療有効性についての基準は、化学療法に対する応答、生存確率、所与の期間以内の転移確率、及び腫瘍再発確率を含むように拡大され得る。

30

【0410】

例えば、適切な閾値を決定するために、特定の抗がん治療レジメンが対象集団に投与され得、転帰が、抗免疫チェックポイント療法などの任意の免疫療法の投与前に決定されたバイオマーカー測定値と相関され得る。転帰測定値は、ネオアジュバント状況で施される療法に対する病理学的応答であり得る。あるいは、バイオマーカー測定値が既知である免疫療法後の対象について、全生存期間及び無病生存期間などの転帰測定値がある期間にわたって監視され得る。特定の実施形態では、同じ用量の免疫療法剤が、もしあれば、各対象に投与される。関連実施形態では、投与される用量は、免疫療法で使用される薬剤の当該技術分野で既知の標準用量である。対象が監視される期間は異なり得る。例えば、対象は、少なくとも2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、又は60ヶ月間監視され得る。免疫療法の転帰と相関するバイオマーカー測定閾値は、実施例の節に記載の方法などの方法を使用して決定され得る。

40

【0411】

VIII. 本発明の更なる使用及び方法

50

本明細書に記載の組成物は、様々な診断用途、予後用途、及び治療用途で 사용할ことができる。診断方法、予後予測方法、治療方法、又はそれらの組み合わせなどの本明細書に記載の任意の方法では、方法の全てのステップは、単一の作用素によって、又は代替的に、複数の作用素によって行われ得る。例えば、診断は、治療的治療を提供する作用素によって直接行われ得る。あるいは、治療剤を提供する人は、診断アッセイが行われることを要求することができる。診断士及び／又は治療介入者は、診断アッセイ結果を解釈して治療戦略を決定することができる。同様に、かかる代替プロセスは、予後アッセイなどの他のアッセイに適用することができる。

【0412】

a. スクリーニング方法 本発明の一態様は、非細胞ベースのアッセイ及び異種移植片動物モデルアッセイを含む、スクリーニングアッセイに関する。一実施形態では、これらのアッセイは、異種移植片動物モデルアッセイを使用することによってヒトなどにおける表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの阻害剤、及び免疫療法併用治療にがんが応答する可能性があるかを特定し、かつ／又は薬剤が表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの阻害剤、及び免疫療法併用治療に応答する可能性の低いがん細胞の成長を阻害するか、又はそれを死滅させることができるかを特定するための方法を提供する。

【0413】

一実施形態では、本発明は、本明細書（例えば、表、図、実施例、又は本明細書の他の箇所）に記載の少なくとも1つのバイオマーカーに結合するか、又はその生物学的活性を調節する試験薬剤をスクリーニングするためのアッセイに関する。一実施形態では、かかる薬剤を特定するための方法は、本明細書に記載の少なくとも1つのバイオマーカーを調節する、例えば、阻害する薬剤の能力の決定を伴う。

【0414】

一実施形態では、アッセイは、本明細書に記載の少なくとも1つのバイオマーカーを試験薬剤と接触させることと、以下に記載されるように基質の直接結合を測定すること又は間接的パラメータを測定すること等によって、バイオマーカーの酵素活性を調節する（例えば、阻害する）試験薬剤の能力を決定することを含む、無細胞アッセイ又は細胞ベースのアッセイである。

【0415】

例えば、直接結合アッセイでは、結合が複合体中の標識タンパク質又は分子を検出することによって決定され得るように、バイオマーカータンパク質（又はそれらのそれぞれの標的ポリペプチド又は分子）が放射性同位体又は酵素標識にカップリングされ得る。例えば、標的は、直接的又は間接的のいずれかで、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、又は ^3H で標識され得、放射性同位体が放射線放出の直接計数又はシンチレーション計数によって検出され得る。あるいは、標的は、例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、又はルシフェラーゼで酵素的に標識され得、酵素標識が適切な基質の産物への変換の決定によって検出され得る。バイオマーカーと基質との間の相互作用の決定が標準の結合又は酵素分析アッセイを使用して達成される場合もある。上述のアッセイ方法の1つ以上の実施形態では、ポリペプチド又は分子を固定化して、タンパク質又は分子の一方又は両方の複合体形成されていない形態からの複合体形成された形態の分離を促進し、かつアッセイの自動化を適応させることが望ましくあり得る。

【0416】

試験薬剤の標的への結合は、反応物を収容するのに好適な任意の容器内で達成され得る。かかる容器の非限定的な例には、マイクロタイタープレート、試験管、及び微小遠心管が挙げられる。本明細書に記載の抗体の固定化された形態は、多孔性、微孔性（約1ミクロン未満の平均細孔径を有する）又はマクロ多孔性（約10ミクロン超の平均細孔径を有する）材料、例えば、膜、セルロース、ニトロセルロース、又はガラス繊維；ビーズ、例えば、アガロース若しくはポリアクリルアミド若しくはラテックス製のもの；又は皿、プレート、若しくはウェルの表面、例えば、ポリスチレン製のもの等の固相に結合した抗体も含み得る。

10

20

30

40

50

【0417】

代替の実施形態では、バイオマーカーと基質又はバイオマーカーとその天然結合パートナーとの間の相互作用を調節する薬剤の能力決定は、シグナル伝達経路（例えば、フィードバックループ）内のその位置の下流又は上流で機能するポリペプチド又は他の産物の活性を調節する試験薬剤の能力を決定することによって達成され得る。かかるフィードバックループは当該技術分野で周知である（例えば、Chen and Guillemin (2009) Int. J. Tryptophan Res. 2: 1-19を参照のこと）。

【0418】

本発明は更に、上述のスクリーニングアッセイによって特定された新規の薬剤に関する。したがって、本明細書に記載されるように特定された薬剤を適切な動物モデル等に更に使用することは本発明の範囲内である。例えば、本明細書に記載されるように特定された薬剤が動物モデルに使用されて、かかる薬剤での治療の有効性、毒性、又は副作用を決定することができる。あるいは、本明細書に記載されるように特定された抗体が動物モデルに使用されて、かかる薬剤の作用機構を決定することができる。

【0419】

b. 予測医学

本発明は、診断アッセイ、予後アッセイ、及び臨床試験の監視が予後（予測）目的で使用され、それによって個体を予防的に治療する、予測医学の分野にも関する。したがって、本発明の一態様は、生体試料（例えば、血液、血清、細胞、又は組織）の観点で本明細書に記載のバイオマーカーの量及び／又は活性を決定し、それによって、がん罹患した個体が、がんなどにおいて、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの阻害剤、及び免疫療法併用治療に応答する可能性が高いかどうかを決定するための診断アッセイに関する。かかるアッセイは、予後目的若しくは予測目的のみに使用されてもよく、又は治療介入と組み合わせ、それによって、バイオマーカーポリペプチド、核酸発現若しくは活性によって特徴付けられるか、又はこれらに関連する障害の発症前又は再発後の個体を予防的に治療してもよい。当業者であれば、任意の方法が、表、図、実施例、及び本明細書に記載されるその他のものなどの本明細書に記載されるバイオマーカーのうちの1つ以上（例えば、組み合わせ）を使用することができることを理解するであろう。

【0420】

本発明の別の態様は、本明細書に記載のバイオマーカーの発現又は活性に対する薬剤（例えば、薬物、化合物、及び小核酸系分子）の影響を監視することに関する。これら及び他の薬剤については、以下の章に更に詳細に記載されている。

【0421】

当業者は、特定の実施形態では、本発明の方法が、コンピュータプログラム及びコンピュータシステムを実装することも理解するであろう。例えば、コンピュータプログラムを使用して、本明細書に記載のアルゴリズムを実行することができる。コンピュータシステムはまた、本発明の方法を実装する際にコンピュータシステムによって使用することができる複数のバイオマーカーシグナルの変化／プロファイルを含む、本発明の方法によって生成されるデータを記憶し、操作することができる。特定の実施形態では、コンピュータシステムは、バイオマーカー発現データを受信し、(ii) データを記憶し、(iii) 本明細書に記載の任意の数の様式でデータを比較し（例えば、適切な対照と比較した分析）、がん性又は前がん性組織からの有益なバイオマーカーの状態を決定する。他の実施形態では、コンピュータシステムは、(i) 決定された発現バイオマーカーレベルを閾値と比較し、(ii) 上述のバイオマーカーレベルが閾値を有意に調節されるか（例えば、閾値を上回るか、又は下回るか）、又は上述の適応症に基づく表現型の指標を出力する。

【0422】

特定の実施形態では、かかるコンピュータシステムもまた、本発明の部分とみなされる。多数の種類のコピュータシステムを使用して、バイオインフォマティクス及び／又はコンピュータ技術分野の当業者によって所持される知識に従って、本発明の分析方法を実装することができる。そのようなコンピュータシステムの動作中に、いくつかのソフトウ

10

20

30

40

50

エアコンポーネントをメモリにロードすることができる。ソフトウェアコンポーネントは、当該技術分野で標準であるソフトウェアコンポーネントと、本発明に特有のコンポーネント（例えば、Lin et al. (2004) Bioinformatics 20, 1233-1240に記載されるdCHIPソフトウェア、当該技術分野で既知の放射基底関数に基づく機械学習アルゴリズム（RBM））の両方を含んでいてもよい。

【0423】

本発明の方法はまた、使用される特定のアルゴリズムを含め、方程式の記号入力及び処理の高レベル仕様を可能にする数学的ソフトウェアパッケージでプログラム化又はモデル化されてもよく、それによって、個々の方程式及びアルゴリズムを手順的にプログラミングする必要性からユーザを解放する。かかるパッケージには、例えば、Mathworks（ネイティック、マサチューセッツ）製のMatlab、Wolfram Research（シャンペン、イリノイ）製のMathematica、又はMathSoft（シアトル、ワシントン）製のS-Plusが挙げられる。

【0424】

特定の実施形態では、コンピュータは、バイオマーカーデータを保存するためのデータベースを含む。そのような記憶されたプロファイルにアクセスし、後の時間点で目的の比較を実行するために使用することができる。例えば、対象の非がん性組織に由来する試料のバイオマーカー発現プロファイル、及び／又は同じ種の関連する集団における目的の情報遺伝子座の集団に基づく分布から生成されるプロファイルが保存され、その後、その対象のがん性組織又はその対象のがん性であると疑われる組織に由来する試料のプロファイルと比較することができる。

【0425】

本明細書に記載される例示的なプログラム構造及びコンピュータシステムに加えて、当業者には、他の代替的なプログラム構造及びコンピュータシステムが容易に明らかになるであろう。したがって、上述のコンピュータシステム及びプログラム構造から精神的又は範囲的のいずれかに逸脱しないそのような代替システムは、添付の特許請求の範囲内であると理解されることが意図されている。

【0426】

c. 診断アッセイ

本発明は、生体試料が、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの阻害剤、及び免疫療法併用治療に応答する可能性が高いがんに関連しているかを正確に分類するための方法、システム、及びコードを部分的に提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、統計的アルゴリズム及び／又は経験的データ（例えば、表、図、実施例、及び他の方法で本明細書に記載されるものなどの本明細書に記載されるバイオマーカーの量又は活性）を使用して、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの阻害剤、及び免疫療法併用治療に関連するか、又は応答するか、若しくは応答しない危険性があるものとして試料（例えば、対象由来）を分類するのに有用である。

【0427】

本明細書に記載されるバイオマーカーの量又は活性を検出し、したがって、ある試料が、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの阻害剤、及び免疫療法併用治療に
応答する可能性が高いか、又は応答する可能性が低いかを分類するのに有用な例示的方法は、試験対象から生体試料を得ることと、生体試料と薬剤、例えば、生体試料中のバイオマーカーの量又は活性を検出することができる、抗体若しくはその抗原結合断片のようなタンパク質結合剤、又はオリゴヌクレオチドのような核酸結合剤とを接触させることと、を伴う。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの抗体又はその抗原結合断片が使用され、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又はそれ以上のかかる抗体又は抗体断片が組み合わせで（例えば、サンドイッチELISAで）又は順次に使用され得る。ある特定の例では、統計的アルゴリズムは、単一の学習統計的分類システムである。例えば、単一の学習統計的分類システムを使用して、予測値又は確率値、及びバイオマーカーの存在又はレベルに基づくものとして試料を分類することができる。単一の学習統計的分類システ

ムの使用により、典型的には、試料を、例えば、少なくとも約75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の感受性、特異性、陽性予測値、陰性予測値、及び／又は全体的な精度を有する免疫療法レスポnder又はプログレッサー試料である可能性が高いと分類する。

【0428】

他の好適な統計的アルゴリズムが当業者に周知である。例えば、学習統計的分類子システムは、複雑なデータセット（例えば、目的とするマーカーのパネル）に適合し、かかるデータセットに基づいて決定することができる機械学習アルゴリズム技法を含む。いくつかの実施形態では、分類ツリー（例えば、ランダムフォレスト）等の単一の学習統計的分類子システムが使用される。他の実施形態では、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、又はそれ以上の学習統計的分類子システムの組み合わせが、好ましくは直列で使用される。学習統計的分類子システムの例には、帰納的学習（例えば、ランダムフォレスト、分類及び回帰ツリー（C & RT）、ブーストツリー等の決定／分類ツリー）、確率的に近似的に正しい（PAC）学習、コネクショニスト学習（例えば、ニューラルネットワーク（NN）、人工ニューラルネットワーク（ANN）、ニューロファジーネットワーク（NFN）、ネットワーク構造、多層パーセプトロン等のパーセプトロン、多層フィードフォワードネットワーク、ニューラルネットワークの適用、信念ネットワークにおけるベイズ学習等）、強化学習（例えば、ナীব学習、適応動的学習、及び時間差学習等の既知の環境における受動的学習、未知の環境における受動的学習、未知の環境における能動的学習、学習行動値関数、強化学習の適用等）、並びに遺伝的アルゴリズム及び進化的プログラミングを使用したものが挙げられるが、これらに限定されない。他の学習統計的分類子システムは、サポートベクトルマシン（例えば、カーネル法）、多変量適応型回帰スプライン（MARS）、レーベンバーグ・マーカーアルゴリズム、ガウス・ニュートンアルゴリズム、ガウスの混合（mixtures of Gaussians）、勾配降下アルゴリズム、及び学習ベクトル量子化（LVQ）を含む。特定の実施形態では、本発明の方法は、試料分類結果を臨床医、例えば、腫瘍学者に送信することを更に含む。

【0429】

別の実施形態では、対象の診断に続いて、個体に、診断に基づいて、治療有効量の定義された治療の投与が行われる。

【0430】

一実施形態では、本方法は、対照生体試料（例えば、がんを有しないか、若しくはがんが、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの阻害剤、及び免疫療法併用治療に感受性である対象由来の生体試料）、寛解中の対象由来の生体試料、又は表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの阻害剤、及び免疫療法併用治療にもかかわらず進行するがんを発達させるための治療中の対象由来の生体試料を得ることを更に伴う。

【0431】

d. 予後アッセイ

更に、本明細書に記載される診断法は、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの阻害剤及び免疫療法併用治療に応答する可能性が高いか、若しくは応答する可能性が低いがんを有するか、又はそれを発症する危険性がある対象を特定するために利用される。前述の診断アッセイ又は以下のアッセイ等の本明細書に記載のアッセイを利用して、本明細書に記載される少なくとも1つのバイオマーカーの量又は活性の誤制御に関連する障害を（例えば、がんにおいて）有するか、又はその状態が発生する危険性がある対象を特定することができる。あるいは、予後アッセイを利用して、本明細書に記載される少なくとも1つのバイオマーカーの誤制御に関連する障害を（例えば、がんにおいて）有するか、又はその状態が発生する危険性がある対象を特定することができる。更に、本明細書に記載の予後アッセイを使用して、対象に薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣薬、ポリペプチド、ペプチド、核酸、小分子、又は他の薬物候補）を投与し

て、異常なバイオマーカー発現又は活性に関連する疾患又は障害を治療することができるかどうかを決定することができる。

【0432】

e. 治療方法

表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの阻害剤、及び免疫療法の組み合わせなどの、本明細書に記載の治療組成物を、本明細書に記載の製剤及び／又は組み合わせを使用して、種々のインビトロ及びインビボでの治療用途で使うことができる。一実施形態では、治療薬を使用して、それに応答すると決定されたがんを治療することができる。例えば、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの阻害剤、及び免疫療法の両方を阻害又は遮断する単一又は複数の薬剤を使用して、それに応答する可能性が高いと特定された対象におけるがんを治療することができる。

10

【0433】

本発明の調節方法は、免疫細胞などの細胞と、かかる1つ以上のバイオマーカー及び／又は免疫療法、例えば、免疫チェックポイント阻害剤（例えば、PD-1）の発現及び／又は活性を阻害又は遮断する薬剤とを接触させることを伴う。かかる方法に有用な例示的な薬剤は、上で説明されている。かかる薬剤は、インビトロ若しくはエクスピボで（例えば、細胞を薬剤と接触させることによって）、又はあるいはインビボで（例えば、薬剤を対象に投与することによって）で投与され得る。したがって、本発明は、免疫応答の増加から利益を受け得る状態、例えば、感染症又は結腸直腸がんのようながんに罹患している個体を治療するために有用な方法を提供する。

20

【0434】

免疫応答を上方制御する薬剤は、既存の免疫応答を増強する形態又は初期免疫応答を誘発する形態であり得る。したがって、本主題の組成物及び方法を使用して免疫応答を増強させることは、がんを治療するのに有用であるだけでなく、感染症（例えば、細菌、ウイルス、又は寄生虫）、寄生虫感染症、及び免疫抑制性疾患を治療するのに有用であり得る。

【0435】

例示的な感染性障害としては、ヘルペス又は帯状疱疹などのウイルス性皮膚疾患が挙げられ、その場合、かかる薬剤は皮膚に局所的に送達され得る。加えて、全身性ウイルス疾患、例えば、インフルエンザ、一般的な風邪、及び脳炎は、かかる薬剤の全身投与によって軽減され得る。好ましい一実施形態では、本明細書に記載の免疫応答を上方制御する薬剤は、寄生虫に対する保護性免疫応答を促進するために、Trypanosoma cruzi 感染症の間のアルギナーゼ／iNOSバランスを調節するのに有用である。

30

【0436】

免疫応答はまた、エクスピボでのアプローチによって、例えば、患者から免疫細胞を除去し、免疫細胞を本明細書に記載の薬剤とインビトロで接触させ、インビトロで刺激された免疫細胞を患者に再導入することによって、感染した患者において増強され得る。

【0437】

ある特定の例では、免疫応答を更に増強するために、免疫応答を上方制御する他の薬剤、例えば、共刺激受容体を介してシグナルを伝達する他のB7ファミリーメンバーの形態を更に投与することが望ましくあり得る。かかる追加の薬剤及び療法については、以下に更に記載される。また、免疫応答を上方制御する薬剤が様々なポリペプチド（例えば、病原体に由来するポリペプチド）に対するワクチンにおいて予防的に使用され得る。病原体（例えば、ウイルス）に対する免疫は、適切なアジュバントにおいて免疫応答を上方制御する薬剤とともにウイルスタンパク質をワクチン接種することによって誘導され得る。

40

【0438】

別の実施形態では、本明細書に記載の免疫応答機能の上方制御又は増強は、腫瘍免疫の誘導に有用である。

【0439】

別の実施形態では、免疫応答は、既存の耐性、クローン欠失、及び／又は疲弊（例えば

50

、T細胞疲弊）が克服されるように、本明細書に記載の方法によって刺激され得る。例えば、対象が有意な免疫応答を開始することができない抗原、例えば、腫瘍特異的抗原等の自己抗原に対する免疫応答は、免疫応答を上方制御する本明細書に記載の適切な薬剤を投与することによって誘導され得る。一実施形態では、腫瘍特異的抗原等の自己抗原が同時投与され得る。別の実施形態では、主題の薬剤は、能動免疫化の過程で外来抗原に対する応答を高めるためのアジュバントとして使用され得る。

【0440】

一実施形態では、免疫細胞は、対象から得られ、本明細書に記載の薬剤の存在下、エクスピボで培養され、免疫細胞の集団を肥大させ、かつ／又は免疫細胞活性化を増強する。更なる実施形態では、免疫細胞は、次いで、対象に投与される。免疫細胞は、当該技術分野で知られているように、例えば、免疫細胞に一次活性化シグナル及び共刺激シグナルを提供することによって、インビトロで刺激され得る。様々な薬剤を使用して、免疫細胞の増殖を共刺激することもできる。一実施形態では、免疫細胞は、PCT出願第94／29436号に記載の方法に従って、エクスピボで培養される。共刺激ポリペプチドは、可溶性であってもよく、細胞膜に付着していてもよく、又はビーズ等の固体表面に付着していてもよい。

10

【0441】

IX. 薬剤の投与

本発明によって包含される免疫調節剤は、免疫細胞媒介性免疫応答を増強するために、インビボでの医薬品投与に好適な生物学的に適合性の形態で対象に投与される。「インビボでの投与に好適な生物学的に適合性の形態」とは、いずれの毒性作用もタンパク質の治療効果を上回る、投与されるタンパク質の形態を意味する。「対象」という用語は、免疫応答が誘発され得る生きている生物、例えば、哺乳動物を含むよう意図されている。対象の例には、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、及びそれらのトランスジェニック種が含まれる。本明細書に記載の薬剤の投与は、薬剤の治療的に活性な量を単独で又は薬学的に許容される担体と組み合わせて含む任意の薬理学的形態であり得る。

20

【0442】

本発明の治療的組成物の治療的に活性な量の投与は、必要な投薬量で必要な期間にわたって所望の結果を達成するのに有効な量として定義される。例えば、薬剤の治療的に活性な量は、個体の病状、年齢、性別、及び体重等の因子、並びに個体に所望の応答を誘発するペプチドの能力により異なり得る。投薬量レジメンは、最適治療応答を提供するように調整され得る。例えば、いくつかの分割用量が1日1回投与され得るか、又は用量は、治療状況の緊急事態によって示されるように比例的に減少し得る。

30

【0443】

単独で、又は免疫療法と組み合わせて、表1～5に列挙される1つ以上のバイオマーカーの発現及び／又は活性を阻害又は遮断することは、本明細書に記載の調節剤との併用療法によって達成することができる。併用療法は、1つ以上のバイオマーカーが免疫療法と同時に阻害又は遮断される療法を記載する。これは、本明細書に記載の調節剤を免疫療法と同時に（例えば、併用剤形で、又は単一の薬剤を同時に投与することによって）投与することによって、又は患者に同時に存在する各調節剤の有効量をもたらすスケジュールに従って、かかる1つ以上のバイオマーカー及び免疫療法のための単一の阻害剤を投与することによって達成され得る。

40

【0444】

本明細書に記載の治療剤は、注射（皮下、静脈内等）、経口投与、吸入、経皮適用、又は直腸投与などの簡便な様式で投与され得る。投与経路に応じて、活性化合物は、化合物を不活性化し得る酵素、酸、及び他の自然条件の作用から化合物を保護するための材料でコーティングされ得る。例えば、薬剤の投与について、非経口投与以外の方法により、薬剤をその不活性化を阻止するための材料でコーティングするか、又は薬剤をその材料と同時に投与することが望ましくあり得る。

【0445】

50

薬剤は、個体に、適切な担体、希釈剤、若しくはアジュバント中で投与されるか、酵素阻害剤と同時投与されるか、又はリポソーム等の適切な担体中で投与される。薬学的に許容される希釈剤には、生理食塩水及び水性緩衝溶液が含まれる。アジュバントは、その最も広い意味で使用され、インターフェロン等の任意の免疫刺激化合物を含む。本明細書で企図されるアジュバントには、レゾルシノール、非イオン性界面活性剤、例えば、ポリオキシエチレンオレイルエーテル及びn-ヘキサデシルポリエチレンエーテルが含まれる。酵素阻害剤には、膵臓トリプシン阻害剤、ジイソプロピルフルオロリン酸（DEEP）、及びトラジロールが含まれる。リポソームには、水中油中水乳剤、並びに従来のリポソーム（Stern et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27）が含まれる。

10

【0446】

以下で詳細に説明されるように、本発明の薬学的組成物は、以下のために適合されたものを含め、固体又は液体形態での投与のために特別に製剤化されてもよい。（１）経口投与、例えば、ドレンチ（水性若しくは非水性の溶液若しくは懸濁液）、錠剤、ボラス、粉末、顆粒、ペースト、（２）非経口投与、例えば、滅菌溶液若しくは懸濁液としての皮下、筋肉内、又は静脈内注射によるもの、（３）局所投与、例えば、皮膚に適用されるクリーム、軟膏、若しくはスプレーとしてのもの、（４）腔内若しくは直腸内、例えば、ペッサリー、クリーム、又はフォームとしてのもの、あるいは（５）エアロゾル、例えば、化合物を含有する水性エアロゾル、リポソーム調製物、又は固体粒子。

【0447】

本明細書において、「薬学的に許容される」という語句は、理にかなった医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、又は他の問題若しくは合併症がなく、合理的なベネフィット／リスク比に見合った、ヒト及び動物の組織と接触させて使用するのに適したそれらの薬剤、材料、組成物、及び／又は投薬形態を指すために用いられる。

20

【0448】

本明細書で使用される「薬学的に許容される担体」という語句は、ある臓器又は身体の一部から別の臓器又は身体の一部へと、対象の化学物質を運ぶか、又は輸送することに関与する、薬学的に許容される材料、組成物、又はビヒクル、例えば、液体又は固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、又はカプセル化材料を意味する。各担体は、製剤の他の成分と適合性があり、対象に有害ではないという意味で「許容される」ものでなければならない。薬学的に許容される担体として機能できる材料の例には、（１）糖類、例えばラクトース、グルコース及びスクロース、（２）デンプン類、例えばコーンスターチ及びジャガイモデンプン、（３）セルロース、及びその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース及び酢酸セルロース、（４）トラガカント末（５）麦芽、（６）ゼラチン、（７）タルク、（８）賦形剤、例えばカカオバター及び坐剤ワックス、（９）油類、例えば落花生油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、大豆油、（１０）グリコール類、例えばプロピレングリコール、（１１）ポリオール類、例えばグリセリン、ソルビトール、マンニトール及びポリエチレングリコール、（１２）エステル類、例えばオレイン酸エチル及びラウリン酸エチル、（１３）寒天、（１４）緩衝剤、例えば水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウム（１５）アルギン酸、（１６）発熱物質を含まない水、（１７）等張食塩水、（１８）リンゲル液、（１９）エチルアルコール、（２０）リン酸緩衝液、及び（２１）薬学的製剤に使用される他の非毒性適合物質、が含まれる。

30

40

【0449】

「薬学的に許容される塩」という用語は、本発明によって包含されるバイオマーカーの発現及び／又は活性、又は複合体の発現及び／又は活性を調節する（例えば、阻害する）薬剤の比較的非毒性の無機及び有機の酸付加塩を指す。これらの塩は、治療薬の最終的な単離及び精製中に、又はその遊離塩基形態での精製された治療薬と好適な有機若しくは無機の酸とを別個に反応させ、そのようにして生成した塩を単離することによって、系中で調製することができる。代表的な塩としては、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、重硫酸塩

50

、リン酸塩、硝酸塩、酢酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、トシル酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチル酸塩、メシル酸塩、グルコヘプトン酸塩、ラクトビオン酸塩、及びラウリルスルホン酸塩等が挙げられる（例えば、B e r g e e t a l . (1 9 7 7) “ P h a r m a c e u t i c a l S a l t s ” , J . P h a r m . S c i . 6 6 : 1 - 1 9 も参照のこと）。

【0450】

他の場合では、本発明の方法で有用な薬剤は、1つ以上の酸性官能基を含んでいてもよい。ため、薬学的に許容される塩基と薬学的に許容される塩を形成することができる。これらの場合における「薬学的に許容される塩」という用語は、バイオマーカーの発現及び／又は活性、又は複合体の発現及び／又は活性を調節する（例えば、阻害する）薬剤の比較的非毒性の無機及び有機の塩基付加塩を指す。これらの塩は、同様に、治療薬の最終的な単離及び精製中に、又はその遊離酸形態での精製された治療薬と好適な塩基、例えば、薬学的に許容される金属カチオンの水酸化物、炭酸塩若しくは重炭酸塩と、アンモニアと、又は薬学的に許容される有機の一級、二級若しくは三級アミンとを別個に反応させることによって、系中で調製することができる。代表的なアルカリ又はアルカリ土類塩としては、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、及びアルミ塩等が挙げられる。塩基付加塩の形成に有用な代表的な有機アミンとしては、エチルアミン、ジエチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジン等が挙げられる（例えば、B e r g e e t a l . (上 記) を参照）。湿潤剤、乳化剤及びラウリル硫酸ナトリウム及びステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、並びに着色剤、放出剤（release agent）、コーティング剤、甘味料、香味料及び芳香剤、保存剤及び抗酸化剤もまた、組成物中に存在し得る。

【0451】

薬学的に許容される抗酸化剤の例には、（1）水溶性抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸、塩酸システイン、硫酸水素ナトリウム、メタ亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム等、（2）油溶性抗酸化剤、例えば、パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、レシチン、没食子酸プロピル、 α -トコフェロール等、及び（3）金属キレート剤、例えば、クエン酸、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ソルビトール、酒石酸、リン酸等が含まれる。

【0452】

本発明の方法に有用な製剤には、経口、鼻、局所（頬及び舌下を含む）、直腸、膣、エアロゾル及び／又は非経口投与に好適な製剤が含まれる。製剤は、単位投与形態で簡便に提供されてもよく、薬学の分野で周知の任意の方法によって調製されてもよい。単回投与形態を製造するために担体材料と組み合わせることができる有効成分の量は、治療される宿主、特定の投与方法に応じて変化する。単回投与形態を生成するために担体材料と組み合わせることができる有効成分の量は、一般に、治療効果をもたらす化合物の量である。一般に、100パーセントのうち、この量は、有効成分の約1パーセント～約99パーセント、好ましくは約5パーセント～約70パーセント、最も好ましくは約10パーセント～約30パーセントの範囲である。

【0453】

これらの製剤又は組成物を調製する方法は、バイオマーカーの発現及び／又は活性を調節する（例えば、阻害する）薬剤と、担体及び任意に1つ以上の付随成分とを会合させるステップを含む。一般に、製剤は、治療薬と、液体担体、又は精密に分割した固体担体、又はその両方とを均一かつ密接に会合させ、次いで、必要に応じて製品を成形することによって調製される。

【0454】

経口投与に適した製剤は、カプセル、カシェ剤、丸剤、錠剤、ロゼンジ（フレーバーベース、通常、スクロース及びアカシア若しくはトラガカントを使用する）、粉末、顆粒の形態で、又は水性若しくは非水性液体の溶液若しくは懸濁液として、又は水中油型若しく

10

20

30

40

50

は油中水型液体乳剤として、又はエリキシル剤若しくはシロップ剤として、又はトローチ剤（*pastille*）（不活性基剤、例えば、ゼラチン及びグリセリン、若しくはスクロース及びアカシアを使用する）として、及び／又は口腔洗浄剤等としてのものであってもよく、各々が有効成分として所定量の治療薬を含有する。化合物は、ボーラス、舐剤又はペーストとして投与することもできる。

【0455】

経口投与用の固体投与形態（カプセル、錠剤、丸剤、糖衣錠、粉末、顆粒等）において、有効成分を、1つ以上の薬学的に許容される担体、例えば、クエン酸ナトリウム又はリン酸ニカルシウム、及び／又は以下のいずれか、（1）充填剤又は増量剤、例えば、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、及び／又はケイ酸、（2）結合剤、例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース及び／又はアカシア、（3）保湿剤、例えばグリセロール、（4）崩壊剤、例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモ又はタピオカデンプン、アルギン酸、特定のケイ酸塩、及び炭酸ナトリウム、（5）溶解遅延剤、例えば、パラフィン、（6）吸収促進剤、例えば、四級アンモニウム化合物、（7）湿潤剤、例えば、アセチルアルコール及びモノステアリン酸グリセロール、（8）吸着剤、例えば、カオリン及びベントナイトクレイ、（9）滑沢剤、例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、及びそれらの混合物、並びに（10）着色剤と混合する。カプセル、錠剤、及び丸剤の場合、薬学的組成物は、緩衝剤も含み得る。類似のタイプの固体組成物はまた、ラクトース又は乳糖のような賦形剤、並びに高分子量ポリエチレングリコールなどを使用して、軟及び硬充填ゼラチンカプセルの充填剤としても使用できる。

【0456】

錠剤は、任意に1つ以上の副成分とともに、圧縮又は成形することにより作成できる。圧縮錠剤は、結合剤（例えば、ゼラチン又はヒドロキシプロピルメチルセルロース）、滑沢剤、不活性希釈剤、保存剤、崩壊剤（例えば、デンプングリコール酸ナトリウム又は架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム）、表面活性剤又は分散剤を使用して調製できる。成形錠剤は、不活性液体希釈剤で湿らせた粉末状ペプチド又はペプチド模倣薬の混合物を適切な機械で成形することにより作製することができる。

【0457】

錠剤、及び他の固体投与形態、例えば、糖衣錠、カプセル、丸剤及び顆粒は、任意に、刻み目が付けられているか、又は腸溶性コーティング及び薬学的製剤の分野で知られている他のコーティング等のコーティング及びシェルを伴って調製することができる。それらはまた、例えば、所望の放出プロファイルを提供するための様々な割合のヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、リポソーム及び／又はミクロスフェアを使用して、その中の有効成分の徐放又は制御放出を提供するように製剤化することもできる。それらは、例えば、細菌保持フィルターを通す濾過によって、又は使用直前に滅菌水若しくはいくつかの他の滅菌注射媒体に溶解することができる滅菌固体組成物の形態で滅菌剤を組み込むことによって、滅菌されてもよい。これらの組成物はまた、任意に不透明剤（*opacifying agent*）を含有していてもよく、任意選択的に遅延様式で、胃腸管の特定の部分でのみ、又は優先的に有効成分を放出する組成物であってもよい。使用可能な包埋組成物の例には、ポリマー物質及びワックスが含まれる。有効成分は、適切な場合、上記の賦形剤の1つ以上を含むマイクロカプセル化形態であってもよい。

【0458】

経口投与のための液体投薬形態は、薬学的に許容される乳剤、微乳剤、溶液、懸濁液、シロップ、及びエリキシルを含む。有効成分に加えて、液体投薬形態は、当該技術分野で一般的に使用される不活性希釈剤、例えば、水又は他の溶媒、可溶化剤及び乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油

類（特に、綿実油、落花生油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、及びゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコール、及びソルビタンの脂肪酸エステル、並びにそれらの混合物を含有し得る。

【0459】

不活性希釈剤に加えて、経口組成物は、湿潤剤、乳化剤及び懸濁化剤、甘味料、香味料、着色料、芳香剤及び保存剤などのアジュバントも含むことができる。

【0460】

懸濁液は、活性薬剤に加えて、例えば、エトキシシル化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトール及びソルビタンエステル、微結晶セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天及びトラガカント、及びそれらの混合物等の懸濁化剤を含有し得る。

10

【0461】

直腸又は膣投与のための製剤は、坐剤として提示されてもよく、坐剤は、1つ以上の治療薬と、例えば、ココアバター、ポリエチレングリコール、坐剤ワックス若しくはサリチル酸塩を含む1つ以上の好適な非刺激性賦形剤若しくは担体とを混合することによって調製されてもよく、室温では固体であるが、体温では液体であり、したがって、直腸又は膣腔で融解して活性薬剤を放出する。

【0462】

膣投与に適した製剤には、適切であることが当該技術分野で知られているような担体を含有するペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム又はスプレー製剤も含まれる。バイオマーカーの発現及び／又は活性を調節する（例えば、阻害する）薬剤の局所又は経皮投与のための投与形態としては、粉末、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチ及び吸入剤が含まれる。活性要素は、無菌条件下で、薬学的に許容される担体、及び必要とされる可能性のある保存料、緩衝剤、又は噴射剤と混合することができる。

20

【0463】

軟膏、ペースト、クリーム及びゲルは、治療薬に加えて、賦形剤、例えば、動物性及び植物性脂肪、油類、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン、ベントナイト、ケイ酸、タルク及び酸化亜鉛、又はそれらの混合物を含有し得る。

30

【0464】

粉末及びスプレーは、バイオマーカーの発現及び／又は活性を調節する（例えば、阻害する）薬剤に加えて、賦形剤、例えば、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム及びポリアミド粉末、又はこれらの物質の混合物を含有し得る。スプレーは、クロロフルオロ炭化水素などの通常の噴射剤、及びブタン及びプロパンなどの揮発性非置換炭化水素を追加で含有することができる。

【0465】

あるいは、バイオマーカーの発現及び／又は活性を調節する（例えば、阻害する）薬剤は、エアロゾルによって投与することができる。これは、化合物を含有する水性エアロゾル、リポソーム調製物、又は固体粒子を調製することによって達成される。非水性（例えば、フルオロカーボン噴射剤）懸濁液を使用することができる。超音波式ネブライザは、薬剤が、化合物の分解を引き起こし得る剪断にさらされることを最小限に抑えるため、好ましい。

40

【0466】

通常、水性エアロゾルは、薬剤の水溶液又は懸濁液を、従来の薬学的に許容される担体及び安定剤とともに製剤化することによって作製される。担体及び安定剤は、特定の化合物の要求によって異なるが、典型的には、非イオン性界面活性剤（Tween（登録商標）、Pluronic（登録商標）、又はポリエチレングリコール）、血清アルブミン、ソルビタンエステル、オレイン酸、レシチン等の無害なタンパク質、グリシン等のアミノ酸、緩衝液、塩、糖又は糖アルコールを含む。エアロゾルは、一般に、等張性溶液から調

50

製される。

【0467】

経皮パッチは、身体への治療薬の制御された送達を提供するという追加の利点を有する。そのような投与形態は、治療薬を適切な媒体に溶解又は分配することによって作製することができる。吸収促進剤を使用して、皮膚を通るペプチド模倣薬の流れを増大させることもできる。そのような流れの速度は、速度を制御する膜を提供するか、又はペプチド模倣薬をポリマーマトリックス若しくはゲルに分散させることのいずれかによって制御することができる。眼科製剤、眼軟膏、粉末、溶液なども、本発明の範囲内にあると考えられる。

【0468】

非経口投与に適した本発明の薬学的組成物は、1つ以上の治療薬を、1つ以上の薬学的に許容される滅菌等張性水性若しくは非水性溶液、分散液、懸濁液若しくは乳剤、又は使用直前に滅菌注射用溶液又は分散液に再構成可能な滅菌粉末と組み合わせて含み、これらは、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、製剤を対象レシピエントの血液と等張性にする溶質、又は懸濁化剤又は増ちょう剤を含有していてもよい。

【0469】

本発明の薬学的組成物において用いることができる好適な水性及び非水性担体の例には、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、及びそれらの適切な混合物、オリーブ油などの植物油、並びにオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルなどが含まれる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用、分散液の場合は必要な粒子径の維持、及び界面活性剤の使用により維持できる。

【0470】

これらの組成物は、保存剤、湿潤剤、乳化剤、及び分散剤などのアジュバントを含んでもよい。微生物の活動の予防は、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などの様々な抗菌剤及び抗真菌剤を含めることによって確実にできる。糖類、塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物に含めることも望ましいと言える。加えて、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチン等の吸収を遅らせる薬剤を含めることにより、注射可能な薬剤形態の長期吸収がもたらされ得る。

【0471】

場合によっては、薬物の効果を延長するために、皮下注射又は筋肉内注射からの薬物の吸収を遅らせることが望ましい。これは、難水溶性である結晶性又は非晶質の液体懸濁液を使用することにより達成できる。その場合、薬物の吸収速度は溶解速度に依存し、次に溶解速度は結晶サイズと結晶形に依存する可能性がある。あるいは、非経口投与された薬物形態の遅延吸収は、薬物を油性ビヒクルに溶解又は懸濁することにより達成される。

【0472】

注射可能なデポー形態は、ポリラクチド-ポリグリコリドなどの生分解性ポリマー中でバイオマーカーの発現及び／又は活性を調節する（例えば、阻害する）薬剤のマイクロカプセルマトリックスを形成することにより作製される。薬物とポリマーの比率、及び使用する特定のポリマーの性質に応じて、薬物放出の速度を制御できる。他の生分解性ポリマーの例には、ポリ（オルトエステル）及びポリ（無水物）が含まれる。デポー注射用製剤は、生体組織に適合するリポソーム又はマイクロ乳剤中に薬物を取り込むことによっても調製される。

【0473】

本発明の治療剤を医薬としてヒト及び動物に投与する場合、治療剤は、そのまま、又は例えば0.1～99.5%（より好ましくは0.5～90%）の有効成分を薬学的に許容される担体と組み合わせて含有する薬学的組成物として与えられ得る。

【0474】

本発明の薬学的組成物中の有効成分の実際の投薬量レベルは、対象に対して毒性であることなく、特定の対象、組成物、及び投与態様にとって所望の治療応答を達成するのに有

10

20

30

40

50

効である有効成分の量を得るように、本発明の方法によって決定され得る。

【0475】

本発明の核酸分子は、ベクターに挿入され、遺伝子療法ベクターとして使用され得る。遺伝子療法ベクターは、例えば、静脈内注射、局所投与（米国特許第5,328,470号を参照）、又は定位注射（例えば、Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91:3054-3057を参照）によって対象に送達され得る。遺伝子療法ベクターの薬学的調製物は、許容される希釈剤中の遺伝子療法ベクターを含み得るか、又は遺伝子送達ビヒクルが埋め込まれる徐放性マトリックスを含み得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターが組換え細胞からインタクトで産生され得る場合、例えば、レトロウイルスベクターの場合、薬学的調製物は、遺伝子送達系を産生する1つ以上の細胞を含み得る。

10

【0476】

一実施形態では、本発明によって包含される薬剤は、抗体である。本明細書で定義されるように、抗体の治療有効量（すなわち、有効投薬量）は、約0.001~30mg/kg体重、好ましくは約0.01~25mg/kg体重、より好ましくは約0.1~20mg/kg体重、更により好ましくは約1~10mg/kg、2~9mg/kg、3~8mg/kg、4~7mg/kg、又は5~6mg/kg体重の範囲である。当業者であれば、疾患又は障害の重症度、以前の治療、対象の一般的な健康状態及び／又は年齢、並びに存在する他の疾患を含むが、これらに限定されないある特定の因子が、対象を有効に治療するのに必要な投薬量に影響を及ぼし得ることを理解する。更に、抗体の治療有効量での対象の治療は、単回治療を含み得るか、又は好ましくは一連の治療を含み得る。好ましい例では、対象は、約0.1~20mg/kg体重の範囲の抗体で、約1~10週間、好ましくは2~8週間、より好ましくは約3~7週間、更により好ましくは約4、5、又は6週間にわたって週1回治療される。治療に使用される抗体の有効投薬量が特定の治療の過程にわたって増加又は減少し得ることも理解されるであろう。投薬量の変化により、診断アッセイの結果がもたらされ得る。

20

【0477】

X. 単離された修飾ポリペプチド及び複合体

本発明は、部分的に、単離されたポリペプチド及び／又はそれを含む複合体、例えば、表1~5に列挙されるポリペプチドからなる群から選択されるものに関する。いくつかの実施形態では、複合体は、ポリコームリプレッサー複合体（例えば、PRC1.1複合体）である。

30

【0478】

本発明による使用のための複合体は、別の部分と会合する単一のポリペプチド（例えば、USP7ポリペプチド若しくはその断片）、又は互いに会合し、かつ／若しくは別の部分と会合するポリペプチドの組み合わせ（例えば、USP7サブユニットを含むタンパク質複合体）であり得る。

【0479】

本発明の一態様では、少なくとも1つのバリエーションポリペプチドを含むポリペプチドの複合体を含む、組成物が提供される。いくつかの実施形態では、バリエーションポリペプチドは、野生型アミノ酸配列に対して少なくとも1つのバリエーションアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有する変異体ペプチドである。いくつかの実施形態では、バリエーションポリペプチドは、複合体中の他のポリペプチドが由来する種とは異なる種における野生型ポリペプチドである。特定の実施形態では、単離されたポリペプチドは、野生型又は野生型配列に対して修飾されるドメインを含む断片のものである。いくつかの実施形態では、単離された修飾ポリペプチド断片は、野生型断片と比較して、活性が低減している。いくつかの実施形態では、単離された修飾断片は、野生型断片と比較して、以下のうちの1つ以上を有する：a. 任意に、塩基性アミノ酸がアルファらせんの外向き残基である場合、少なくとも1つの塩基性アミノ酸の中性又は酸性アミノ酸への置き換え；b. 塩基性アミノ酸がアルファらせんの外向き残基である場合、少なくとも1つの塩基性アミノ酸の欠失；又はc.

40

50

等電点の低減、電荷電位の低減、及び／若しくは正味正電荷の低減。いくつかの実施形態では、単離された断片は、親和性タグ又は標識などの異種アミノ酸配列を更に含む。タグには、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、カルモジュリン結合タンパク質 (CBP)、タンパク質Cタグ、Mycタグ、Halotag、HAタグ、Flagタグ、Hisタグ、ビオチンタグ、及びV5タグが含まれ得る。標識は、蛍光タンパク質を含むことができる。

【0480】

いくつかの実施形態では、上述の断片であり得る修飾サブユニット、又はかかる断片の機能的特性を有するように修飾された全長ポリペプチドを含む、タンパク質複合体が提供される。特定の実施形態では、本発明によって包含される複合体の少なくとも1つのサブユニットは、本発明によって包含される複合体のタンパク質サブユニットの相同体、誘導体 (例えば、機能的に活性な誘導体)、断片 (例えば、機能的に活性な断片) である。本発明によって包含される特定の実施形態では、本発明によって包含される複合体のタンパク質サブユニットの相同体／オルソログ、誘導体、又は断片は、他のサブユニットと複合体を形成することが依然として可能である。複合体形成は、当業者に知られている任意の方法によって試験することができる。かかる方法には、非変性PAGE、FRET、及び蛍光偏光アッセイが含まれるが、これらに限定されない。

【0481】

天然細胞タンパク質複合体のメンバーである相同体 (例えば、他の種由来のサブユニットタンパク質をコードする核酸) 又は他の関連配列 (例えば、パラログ) は、核酸ハイブリダイゼーション及びクローニングのための当該技術分野で周知の方法を使用して、プローブとしての特定の核酸配列の全て又は一部との低、中、又は高ストリンジェンシーハイブリダイゼーションによって同定及び取得することができる。

【0482】

例示的な中程度のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は以下のとおりである: 6X SSC、50mMのTris-HCl (pH 7.5)、1mMのEDTA、0.02%のPVP、0.02%のFicoll、0.02%のBSA、及び500 µg/mlの変性サーモン精子DNAで構成される緩衝液中で、DNAを含有するフィルターの予備ハイブリダイゼーションを65℃で8時間〜一晩実行する。100 µg/mlの変性サーモン精子DNA及び5〜20 × 10⁶ cpmの³²P標識プローブを含有する予備ハイブリダイゼーション混合物中で、フィルターを65℃で48時間ハイブリダイズする。2X SSC、0.01%のPVP、0.01%のFicoll、及び0.01%のBSAを含有する溶液中で、フィルターの洗浄を37℃で1時間行う。続いて、オートラジオグラフィーの前に、0.1X SSC中、50℃で45分間洗浄する。あるいは、高ストリンジェンシーの例示的な条件は、以下のとおりである: 例えば、0.5MのNaHPO₄、7%のドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、1mMのEDTA中、65℃でのフィルター結合DNAへのハイブリダイゼーション、及び0.1X SSC/0.1%のSDS中、68℃での洗浄 (Ausubel et al., eds., (1989) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., 及び John Wiley & sons, Inc., New York, at p. 2.10.3)。使用され得る高ストリンジェンシーの他の条件は、当該技術分野で周知である。例示的な低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、35%ホルムアミド、5X SSC、50mMのTris-HCl (pH 7.5)、5mMのEDTA、0.02%のPVP、0.02%のFicoll、0.2%のBSA、100 µg/mlの変性サーモン精子DNA、及び10% (重量/体積) デキストラン硫酸塩を含む緩衝液中、40℃で18〜20時間のハイブリダイゼーション、2X SSC、25mMのTris-HCl (pH 7.4)、5mMのEDTA、及び0.1%のSDSからなる緩衝液中、55℃で1.5時間の洗浄、並びに2X SSC、25mMのTris-HCl (pH 7.4)、5mMのEDTA、及び0.1%のSDSからなる緩衝液中、60℃で1.5時間の洗浄を含む。

【0483】

特定の実施形態では、サブユニットの相同体は、サブユニットが結合する同じタンパク質に結合する。特定のより具体的な実施形態では、サブユニットの相同体は、サブユニットが結合する同じタンパク質に結合し、相同体とサブユニットの結合パートナーとの間の結合親和性は、サブユニットと結合パートナーとの間の結合親和性の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%である。タンパク質間の結合親和性は、当業者に知られている任意の方法によって決定することができる。

【0484】

特定の実施形態では、複合体のタンパク質サブユニットの断片は、天然に存在するタンパク質複合体のタンパク質サブユニットの少なくとも6個の（連続的な）アミノ酸、少なくとも10個のアミノ酸、少なくとも20個のアミノ酸、少なくとも30個のアミノ酸、少なくとも40個のアミノ酸、少なくとも50個のアミノ酸、少なくとも75個のアミノ酸、少なくとも100個のアミノ酸、少なくとも150個のアミノ酸、少なくとも200個のアミノ酸、少なくとも250個のアミノ酸、少なくとも300個のアミノ酸、少なくとも400個のアミノ酸、又は少なくとも500個のアミノ酸からなる。特定の実施形態では、かかる断片は、40個以下のアミノ酸、50個以下のアミノ酸、75個以下のアミノ酸、100個以下のアミノ酸、150個以下のアミノ酸、200個以下のアミノ酸、250個以下のアミノ酸、300個以下のアミノ酸、400個以下のアミノ酸、又は500個以下のアミノ酸である。より具体的な実施形態では、機能的断片は、本発明によって包含される複合体を形成することができ、すなわち、断片は、依然として少なくとも1つの他のタンパク質サブユニットに結合して、本発明によって包含される複合体を形成することができる。いくつかの実施形態では、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、若しくは44以上、又はそれらの間の任意の範囲の同一の領域を共有する断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、このドメインは、野生型ドメインと比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、若しくはそれ以上、又はその間の任意の範囲のアミノ酸残基欠失及び／又は変異を含むことができる。

【0485】

サブユニットタンパク質の誘導体又は類似体としては、様々な実施形態において、同一のサイズのアミノ酸配列にわたって、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、若しくは95%の同一性でサブユニットタンパク質に実質的に相同である領域を含む分子、あるいはアラインメントが当該技術分野で知られているコンピュータホモロジープログラムによって行われるか、又はそのコード核酸が、ストリンジェント、中程度にストリンジェント、若しくは非ストリンジェントな条件下でサブユニットタンパク質をコードする配列にハイブリダイズすることが可能である整列配列と比較した場合の分子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0486】

タンパク質サブユニットの誘導体としては、本発明によって包含される複合体のタンパク質サブユニットの、異種アミノ酸配列への融合タンパク質、本発明によって包含される複合体のタンパク質サブユニットの変異形、及び本発明によって包含される複合体のタンパク質サブユニットの化学修飾形が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、本発明によって包含される複合体のタンパク質サブユニットの機能的誘導体は、本発明によって包含される複合体を形成することができ、すなわち、誘導体は、依然として少なくとも1つの他のタンパク質サブユニットに結合して、本発明によって包含される複合体を形成することができる。

【0487】

本発明によって包含される特定の実施形態では、本発明によって包含される複合体の少なくとも2つのサブユニットは、少なくとも1つの共有結合を介して互いに連結される。

本発明によって包含される複合体のサブユニット間の共有結合は、サブユニットの解離を防止するため、本発明によって包含される複合体の安定性を増加させる。当業者に既知の任意の方法を使用して、本発明によって包含される少なくとも2つのサブユニット間の共有結合を達成することができる。

【0488】

特定の実施形態では、共有結合架橋は、隣接したサブユニット間に導入される。かかる架橋は、二量体界面の反対側のアミノ酸の側鎖間であり得る。好適な架橋剤と組み合わせた二量体界面におけるアミノ酸残基の任意の官能基を使用して、二量体界面におけるタンパク質サブユニット間の共有結合を作製することができる。二量体界面における既存のアミノ酸を使用することができるか、あるいは、部位特異的変異誘発によって好適なアミノ酸を導入することができる。

10

【0489】

例示的な実施形態では、二量体界面の対向する側のシステイン残基が酸化されて、ジスルフィド結合を形成する。例えば、Reznik et al., (1996) Nat Bio Technol 14:1007-1011の1008頁を参照のこと。1, 3-ジブromoアセトンを使用して、二量体界面における2つのスルヒドリル基間の不可逆的共有結合を作製することもできる。特定の他の実施形態では、二量体界面でのリジン残基を使用して、複合体のタンパク質サブユニット間の共有結合を作成する。リジン残基のイプシロンアミノ基間の共有結合を作成するために使用され得る架橋剤は、例えば、限定されないが、ビス(スルホスクシンイミジル)スベレート、ジメチルアジピミデート-2 HD 1、グルタル酸ジスクシンイミジル、N-ヒドロキシスクシンイミジル2, 3-ジブromoプロピオンネートである。

20

【0490】

他の特定の実施形態では、2つ以上の相互作用サブユニット、又はその相同体、誘導体、若しくは断片は、ペプチドリンカーを介して直接融合されるか、又は共有結合され、単一の非分岐ポリペプチド鎖を有するハイブリッドタンパク質を形成する。したがって、タンパク質複合体は、ハイブリッドタンパク質の2つの部分間の「分子内相互作用」によって形成され得る。なお別の実施形態では、このタンパク質複合体における融合又は連結した相互作用サブユニットのうちの少なくとも1つは、天然タンパク質の相同体、誘導体、又は断片である。

30

【0491】

特定の実施形態では、少なくとも1つのサブユニット、又はその相同体、誘導体、若しくは断片は、異種アミノ酸配列にペプチド結合を介して接合されたサブユニット、相同体、誘導体、又は断片を含む融合又はキメラタンパク質として発現され得る。

【0492】

本明細書で使用される場合、「キメラタンパク質」又は「融合タンパク質」は、異種ポリペプチド(すなわち、サブユニット、又はその断片、相同体、若しくは誘導体に対応するポリペプチド以外のポリペプチド)に作動可能に連結されたサブユニット、又はその断片、相同体、若しくは誘導体に対応するポリペプチドの全て又は一部(好ましくは、生物学的に活性な部分)を含む。融合タンパク質において、「作動可能に連結される」という用語は、本発明によって包含されるポリペプチドと異種ポリペプチドが互いにインフレームで融合していることを示すよう意図されている。異種ポリペプチドは、本発明によって包含されるポリペプチドのアミノ末端又はカルボキシル末端に融合し得る。

40

【0493】

一実施形態では、異種アミノ酸配列は、親和性精製に使用することができる親和性タグを含む。別の実施形態では、異種アミノ酸配列は、蛍光標識を含む。なお別の実施形態では、融合タンパク質は、異種シグナル配列、免疫グロブリン融合タンパク質、毒素、又は他の有用なタンパク質配列を含む。

【0494】

当該技術分野で既知の様々なペプチドタグを使用して、例えば限定されないが、免疫グ

50

ロブリン定常領域、ポリヒスチジン配列 (Petty, (1996) Metal-chelate affinity chromatography, in Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ed. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience)、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST: Smith, (1993) Methods Mol. Cell Bio. 4: 220-229)、E. coli マルトース結合タンパク質 (Guan et al., (1987) Gene 67: 21-30)、及び様々なセルロース結合ドメイン (米国特許第5,496,934号、同第5,202,247号、同第5,137,819号; Tomme et al., (1994) Protein Eng. 7: 117-123) 等の本発明によって包含される複合体のタンパク質サブユニットの融合タンパク質を生成することができる。

10

【0495】

本明細書で企図されるペプチドタグは、限定されないが、以下の周知の例、FLAGエピトープ、アミノ酸408~439のmycエピトープ、インフルエンザウイルスヘマグルチニン (HA) エピトープなどの、モノクローナル抗体が利用可能である短いアミノ酸配列を含む。他のペプチドタグは、特定の結合パートナーによって認識され、したがって、結合パートナーへの親和性結合による単離を容易にし、結合パートナーは、好ましくは、固定化され、かつ／又は固体支持体上にある。当業者であれば理解するであろうが、DNAクローニング、DNA増幅、及び合成方法を含むが、これらに限定されない、上述のペプチドタグのコーディング領域を得るために、多くの方法を使用することができる。それらの検出及び単離のためのペプチドタグ及び試薬のうちのいくつかは、市販されている。

20

【0496】

特定の実施形態では、本発明によって包含される複合体のタンパク質サブユニットの精製のために、又は複合体の精製のために、異なるペプチドタグの組み合わせが使用される。特定の実施形態では、少なくとも1つのサブユニットは、少なくとも2つのペプチドタグ、例えば、FLAGタグ及びHisタグを有する。異なるタグは、一緒に融合され得るか、又はタンパク質サブユニットに対して異なる位置で融合され得る。精製手順において、異なるペプチドタグは、その後、又は同時に、精製のために使用される。特定の実施形態では、少なくとも2つの異なるサブユニットは、ペプチドタグに融合され、2つのサブユニットのペプチドタグは、同一であっても異なってもよい。複合体の精製のために異なるタグ付きサブユニットを使用することで、複合体のみが精製されることを確実にし、モノマー又はホモ二量体などの非複合体化タンパク質サブユニットの量を最小限に抑える。

30

【0497】

当該技術分野で知られている様々なリーダー配列は、本発明によって包含される複合体のタンパク質サブユニットを細菌及び哺乳類細胞から効率的に分泌するために使用することができる (von Heijne, (1985) J. Mol. Biol. 184: 99-105)。リーダーペプチドは、意図される宿主細胞に基づいて選択され、細菌、酵母、ウイルス、動物、及び哺乳動物配列を含み得る。例えば、ヘルペスウイルス糖タンパク質Dリーダーペプチドは、多様な哺乳類細胞での使用に好適である。哺乳類細胞で使用するための好ましいリーダーペプチドは、マウス免疫グロブリンカップ鎖のV-J2-C領域から得ることができる (Bernard et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 5812-5816)。

40

【0498】

既知であるか、又はライブラリ若しくは商業的サプライヤーから容易に入手可能である、所望のペプチドタグ又はリーダーペプチドをコードするDNA配列は、本発明の実施において好適である。

【0499】

50

特定の実施形態では、本発明によって包含される複合体のタンパク質サブユニットは、同じ種に由来する。より具体的な実施形態では、タンパク質サブユニットは全て、ヒトに由来する。別の特定の実施形態では、タンパク質サブユニットは全て、哺乳動物に由来する。

【0500】

特定の他の実施形態では、本発明によって包含される複合体のタンパク質サブユニットは、非ヒト種、例えば、限定されないが、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラット、マウス、霊長類（例えば、チンパンジー、カニクイザルなどのサル）に由来する。特定の実施形態では、1つ以上のサブユニットはヒトに由来し、他のサブユニットはヒト以外の哺乳動物に由来してキメラ複合体を生じさせる。

10

【0501】

本発明に包含される範囲には、サブユニット、又はその相同体、誘導体、若しくは断片が、翻訳中又は翻訳後に、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護／遮断基による誘導体化、タンパク質分解切断、抗体分子又は他の細胞リガンドへの結合等によって、差別的に修飾される、単離された修飾タンパク質複合体が含まれる。多数の化学修飾のうちのいずれかは、チュニカマイシンの存在下での、シアノゲンブロミド、トリブシン、キモトリブシン、パパイン、V8プロテアーゼ、NaBH₄、アセチル化、ホルミル化、酸化、還元、代謝合成などによる特定の化学切断を含むが、これらに限定されない、既知の技法によって実行され得る。なお別の実施形態では、タンパク質配列は、ヘテロ官能性試薬を有するように修飾され、かかるヘテロ官能性試薬は、複合体のメンバーを架橋するために使用され得る。

20

【0502】

本発明によって包含されるタンパク質複合体も、修飾形態であり得る。例えば、タンパク質複合体と選択的に免疫反応する抗体は、タンパク質複合体に結合することができる。別の例では、タンパク質複合体における相互作用パートナー間の相互作用を増強することができる非抗体調節因子を含んでもよい。

【0503】

上述のタンパク質複合体は、任意の追加の構成要素、例えば、他のタンパク質、核酸、脂質分子、単糖類又は多糖類、イオン等を更に含み得る。

【0504】

30

XI. ポリペプチド及びタンパク質複合体を調製する方法

本発明によって包含されるポリペプチド及びタンパク質複合体は、タンパク質精製及び組換えタンパク質発現のための当該技術分野で周知の方法、並びに実施例で詳細に記載される方法によって得ることができる。例えば、本発明によって包含されるポリペプチド及びタンパク質複合体は、第5節（下記参照）、及び参照によりそれぞれその全体が組み込まれる、WO00/09716及びRigaut et al. (1999) Nature Biotechnol., 17:1030-1032に記載されるTAP方法を使用して単離され得る。加えて、ポリペプチド及びタンパク質複合体は、サブユニットタンパク質の免疫沈降及び免疫沈降タンパク質の組み合わせによって単離され得る。タンパク質複合体はまた、サブユニットタンパク質を組み換えて発現させ、発現させたタンパク質を組み合わせることによって産生することができる。

40

【0505】

特定の実施形態では、複合体は、複合体のサブユニットを細胞内で共発現させ、続いて複合体を精製することによって生成され得る。特定のより具体的な実施形態では、細胞は、組換えDNA技術によって複合体の少なくとも1つのサブユニットを発現する。他の実施形態では、細胞は、通常、複合体のサブユニットを発現する。特定の他の実施形態では、複合体のサブユニットは別々に発現され、サブユニットは、組換えDNA技術を使用して発現され得るか、又は少なくとも1つのサブユニットは、通常、サブユニットを発現する細胞から精製される。複合体の個々のサブユニットを、本発明によって包含される複合体のサブユニットの互いへの結合に有利な条件下でインビトロでインキュベートし、本発

50

明によって包含される複合体を生成する。

【0506】

サブユニットのうちの1つ以上が組換えDNA技術によって発現される場合、当業者に知られている任意の方法を使用して、組換えタンパク質を産生することができる。本発明によって包含されるタンパク質複合体のサブユニットタンパク質の核酸及びアミノ酸配列は、表1などで本明細書に提供され、当該技術分野で既知の任意の方法によって、例えば、各配列の3'及び5'末端にハイブリダイゼーション可能な合成プライマーを使用したPCR増幅によって、及び／又は各ヌクレオチド配列に特異的なオリゴヌクレオチドを使用したcDNA若しくはゲノムライブラリからのクローニングによって得ることができる。

【0507】

1つ以上のタンパク質の組換え発現のために、タンパク質をコードするヌクレオチド配列の全て又は一部を含有する核酸は、適切な発現ベクター、すなわち、挿入されたタンパク質コーディング配列の転写及び翻訳に必要な要素を含有するベクターに挿入され得る。必要な転写及び翻訳シグナルはまた、サブユニットタンパク質遺伝子の天然プロモーター及び／又は隣接領域によって供給され得る。

【0508】

タンパク質コーディング配列を発現するために、様々な宿主ベクター系を利用してもよい。これらには、ウイルス（例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルス等）に感染した哺乳類細胞系、ウイルス（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系、酵母ベクターを含む酵母などの微生物、又はバクテリオファージ、DNA、プラスミドDNA、又はコスミドDNAで形質転換された細菌が含まれるが、これらに限定されない。ベクターの発現要素は、それらの強度及び特異性が変化する。利用される宿主ベクター系に応じて、いくつかの好適な転写及び翻訳要素のうちの任意の1つが使用され得る。

【0509】

好ましい実施形態では、本発明によって包含される複合体は、同じプロモーター又は別のプロモーターのいずれかの制御下で、同じ細胞内でサブユニットタンパク質のコーディング配列全体を発現させることによって得られる。更に別の実施形態では、サブユニットタンパク質の誘導体、断片、又は相同体は、組換えで発現される。好ましくは、タンパク質の誘導体、断片、又は相同体は、複合体の他のサブユニットと複合体を形成し、より好ましくは、抗複合体抗体に結合する複合体を形成する。

【0510】

当該技術分野で利用可能な任意の方法は、適切な転写／翻訳制御シグナル及びタンパク質コーディング配列からなるキメラ遺伝子を含有する発現ベクターを構築するために、DNA断片をベクターに挿入するために使用することができる。これらの方法は、インビトロ組換えDNA及び合成技法、並びにインビボ組換え技法（遺伝子組換え）を含み得る。サブユニットタンパク質、又はそれらの誘導体、断片、若しくは相同体をコードする核酸配列の発現は、遺伝子又はその断片が、組換えDNA分子で形質転換された宿主において発現されるように、第2の核酸配列によって制御され得る。例えば、タンパク質の発現は、当該技術分野で知られている任意のプロモーター／エンハンサーによって制御され得る。特定の実施形態では、プロモーターは、サブユニットタンパク質の遺伝子に対して天然ではない。使用され得るプロモーターは、当該技術分野で知られている多くのプロモーターの中から選択することができ、選択された宿主細胞で機能するように選択される。

【0511】

特定の実施形態では、サブユニットタンパク質、又はその断片、誘導体、若しくは相同体をコードする核酸配列に作動可能に連結されたプロモーター、1つ以上の複製起点、及び任意に1つ以上の選択可能なマーカー（例えば、抗生物質耐性遺伝子）を含むベクターを使用する。

【0512】

別の実施形態では、サブユニットタンパク質のコーディング配列又はその一部と一緒に又は別々に含有する発現ベクターは、遺伝子配列を3つのpGEXベクター（グル

10

20

30

40

50

タチオン S-トランスフェラーゼ発現ベクター、Smith and Johnson (1988) Gene 7:31-40) の各々の EcoRI 制限部位にサブクロニングすることによって作製される。これにより、正しいリーディングフレームにおける生成物の発現が可能になる。

【0513】

目的とする配列を含有する発現ベクターは、以下の3つの一般的アプローチによって同定され得る：(a) 核酸ハイブリダイゼーション、(b) 「マーカー」遺伝子機能の存在若しくは不在、及び(c) 挿入された配列の発現。第1のアプローチでは、コーディング配列は、挿入された配列に相同かつ相補的な配列を含むプローブへの核酸ハイブリダイゼーションによって検出され得る。第2のアプローチでは、組換えベクター／宿主系は、ベクター内の目的とする配列の挿入によって引き起こされる特定の「マーカー」機能（例えば、抗生物質への耐性、バキュロウイルスにおける閉塞体の形成等）の存在又は不在に基づいて同定及び選択され得る。例えば、サブユニットタンパク質遺伝子又はその一部が、ベクターのマーカー遺伝子配列内に挿入される場合、コードされたタンパク質又は一部を含む組換え体は、マーカー遺伝子機能の不在（例えば、 β -ガラクトシダーゼ活性の喪失）によって特定される。第3のアプローチでは、組換え発現ベクターは、組換えベクターによって発現されるサブユニットタンパク質についてアッセイすることによって特定され得る。かかるアッセイは、例えば、インビトロアッセイシステムにおける相互作用種の物理的又は機能的特性、例えば、タンパク質を含む複合体の形成又は抗複合体抗体への結合に基づくことができる。

【0514】

組換えサブユニットタンパク質分子が同定され、複合体又は個々のタンパク質が単離されると、当該技術分野で既知のいくつかの方法を使用してそれらを増殖させることができる。好適な宿主系及び増殖条件を使用して、組換え発現ベクターを増殖させ、量で増幅させることができる。前述のように、使用され得る発現ベクター又は誘導体には、ワクシニアウイルス又はアデノウイルスなどのヒト又は動物ウイルス；バキュロウイルス、酵母ベクターなどの昆虫ウイルス；ラムダファージなどのバクテリオファージベクター；並びにプラスミド及びコスミドベクターが含まれるが、これらに限定されない。

【0515】

加えて、挿入された配列の発現を調節するか、又は発現したタンパク質を所望の特定の様式で修飾若しくは処理する宿主細胞株を選択してもよい。特定のプロモーターからの発現は、特定の誘導体の存在下で上昇させることができ、したがって、遺伝子操作されたサブユニットタンパク質の発現を制御することができる。更に、異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳及び翻訳後プロセッシング及び修飾（例えば、グリコシル化、リン酸化等）のための特徴的かつ特異的な機構を有する。外来タンパク質の所望の修飾及び処理が確実に達成されるように、適切な細胞株又は宿主系を選択することができる。例えば、細菌系における発現を使用して、グリコシル化されていないコアタンパク質を産生することができ、一方、哺乳類細胞における発現は、異種タンパク質の「天然」グリコシル化を確実にする。更に、異なるベクター／ホスト発現系は、異なる範囲への処理反応に影響を及ぼし得る。

【0516】

他の特定の実施形態では、サブユニットタンパク質、又はその断片、相同体、若しくは誘導体は、異なるタンパク質の異種タンパク質配列にペプチド結合を介して接合されたタンパク質、断片、相同体、若しくは誘導体を含む融合タンパク質又はキメラタンパク質生成物として発現してもよい。かかるキメラ生成物は、当該技術分野で知られている方法によって、適切なコードフレーム内で所望のアミノ酸をコードする適切な核酸配列を互いにライゲートし、当該技術分野で一般的に知られている方法によって、好適な宿主においてキメラ生成物を発現することによって作製することができる。あるいは、かかるキメラ生成物は、タンパク質合成技法によって、例えば、ペプチド合成装置の使用によって作製することができる。任意の異種タンパク質コード配列に融合されたサブユニットタンパク質

の一部を含むキメラ遺伝子を構築してもよい。

【0517】

特に、タンパク質サブユニット誘導体は、機能的に等価な分子を提供する置換、付加、又は欠失によってそれらの配列を改変させることによって作製することができる。ヌクレオチドコーディング配列の変性により、サブユニット遺伝子又はcDNAと実質的に同じアミノ酸配列をコードする他のDNA配列を、本発明によって包含される実施において使用することができる。これらには、サブユニットタンパク質遺伝子の全て又は一部を含むヌクレオチド配列が含まれるが、これらに限定されず、これらは、配列内の機能的に等価なアミノ酸残基をコードする異なるコドンの置換によって改変され、したがって、サイレント変化をもたらす。同様に、本発明によって包含される誘導体には、サブユニットタンパク質のアミノ酸配列の全て又は一部を一次アミノ酸配列として含有するものが含まれるが、これらに限定されず、機能的に等価なアミノ酸残基が配列内の残基に置換され、サイレント変化をもたらす改変配列が含まれる。例えば、配列内の1つ以上のアミノ酸残基は、機能的等価物として作用する同様の極性の別のアミノ酸によって置換され、サイレント改変をもたらすことができる。配列内のアミノ酸の置換基は、アミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択され得る。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン及びメチオニンが挙げられる。極性中性アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、及びグルタミンが挙げられる。正に荷電した（塩基性）アミノ酸としては、アルギニン、リジン、及びヒスチジンが挙げられる。負に荷電した（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸及びグルタミン酸が挙げられる。

10

20

【0518】

特定の実施形態では、野生型タンパク質中のアミノ酸の総数の最大1%、2%、5%、10%、15%、若しくは20%が置換若しくは欠失されるか、あるいは野生型タンパク質に対して1、2、3、4、5、若しくは6、又は最大10、又は最大20個のアミノ酸が挿入、置換、又は欠失される。

【0519】

本発明によって包含されるタンパク質サブユニット誘導体及び類似体は、当該技術分野で既知の様々な方法によって産生され得る。それらの産生をもたらす操作は、遺伝子又はタンパク質レベルで生じ得る。例えば、クローニングされた遺伝子配列は、当該技術分野で既知の多数の戦略のうちのいずれかによって修飾され得る（Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York）。配列は、制限エンドヌクレアーゼを用いて適切な部位で切断し、その後、必要に応じて更なる酵素修飾を行い、単離し、インビトロでライゲートすることができる。サブユニットタンパク質の誘導体、相同体、又は類似体をコードする遺伝子の産生において、修飾遺伝子が、所望の活性がコードされる遺伝子領域において、翻訳停止シグナルによって中断されない元の翻訳リーディングフレームを確実に保持するように注意を払わなければならない。

30

40

【0520】

加えて、コード核酸配列をインビトロ又はインビボで変異させて、翻訳配列、開始配列、及び／若しくは終結配列を作成及び／若しくは破壊するか、又はコーディング領域の変異を作成して、新しい制限エンドヌクレアーゼ部位を形成するか、又は既存の部位を破壊して、更なるインビトロ修飾を促進することができる。化学的変異誘発及びインビトロ部位特異的変異誘発（Hutchinson et al. (1978) J. Bioi. Chem. 253: 6551-6558）、変異を含有するPCRプライマーによる増幅等を含むがこれらに限定されない、当該技術分野で既知の変異誘発のための任意の技法を使用することができる。

【0521】

50

サブユニットタンパク質、又はその断片若しくは誘導体を発現する組換え細胞が同定されると、個々の遺伝子産物又は複合体を単離して分析することができる。これは、製品の放射性標識、続いてゲル電気泳動、イムノアッセイ、マーカー標識生成物への架橋等による分析を含むがこれらに限定されない、タンパク質又は複合体の物理的及び／又は機能的特性に基づくアッセイによって達成される。

【0522】

サブユニットタンパク質及び複合体は、当該技術分野で既知の標準的な方法（天然源、又は複合体若しくはタンパク質を発現する組換え宿主細胞のいずれかから）、あるいは本明細書の実施例に記載される方法（カラムクロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、ゲル排除、逆相高圧、高速タンパク質液体等）、分画遠心分離、示差溶解度、又はタンパク質の精製に使用される任意の他の標準的な技法を含むが、これらに制限されない）によって単離及び精製され得る。いくつかの実施形態では、単離方法は、密度沈降に基づくアプローチを含む。機能的特性は、当該技術分野で知られている任意の好適なアッセイを使用して評価され得る。

【0523】

あるいは、サブユニットタンパク質又はその誘導体が同定されると、タンパク質のアミノ酸配列は、それをコードしたキメラ遺伝子の核酸配列から推定することができる。結果として、タンパク質又はその誘導体は、当該技術分野で既知の標準的な化学的方法（例えば、Hunkapiller et al. (1984) Nature 310:105-111)によって合成することができる。

【0524】

加えて、類似体の複合体及びサブユニットタンパク質の誘導体を化学的に合成することができる。例えば、所望のドメインを含むか、又はインビトロで所望の活性（例えば、複合体形成）を媒介する、サブユニットタンパク質の一部に対応するペプチドは、ペプチド合成装置の使用によって合成することができる。

【0525】

更に、必要に応じて、非古典的アミノ酸又は化学アミノ酸類似体を、タンパク質配列に置換又は付加として導入することができる。非古典的なアミノ酸には、一般的なアミノ酸のD-異性体、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸（4-Abu）、2-アミノ酪酸（2-Abu）、6-アミノヘキサン酸（Ahk）、2-アミノイソ酪酸（2-Aib）、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、システイン酸、 ϵ -ブチルグリシン、 ϵ -ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、フルオロ-アミノ酸、デザイン-アミノ酸（例えば、 β -メチルアミノ酸）、 α -メチルアミノ酸が含まれるが、これらに限定されない。N-メチルアミノ酸、及びアミノ酸類似体全般。更に、アミノ酸は、D（右旋性）又はL（左旋性）であり得る。

【0526】

天然物が変異体であることが疑われる場合、又は新たな種から精製される場合、天然源から精製されるサブユニットタンパク質のアミノ酸配列、及びインビトロで発現されるもの、又はインビボ若しくはインビトロで合成される発現ベクターから発現されるものは、DNA配列の分析から、又は代替的に、精製されたタンパク質の直接配列決定によって決定され得る。かかる分析は、手動配列決定によって、又は自動アミノ酸配列決定装置の使用によって行うことができる。

【0527】

複合体は、親水性分析によって分析することもできる（Hopp and Woods (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3824-3828）。親水性プロファイルを使用して、タンパク質の疎水性及び親水性領域を特定し、結合実験、抗体合成等の実験操作のための基質の設計におけるそれらの配向を予測するのに役立てることができる。二次構造解析を行って、特定の構造を想定したサブユニットタンパク質、又はそれらの誘導体の領域を特定することもできる（Chou and Fas

man (1974) Biochemistry 13:222-23)。操作、翻訳、二次構造予測、親水性及び疎水性プロファイル予測、オープンリーディングフレーム予測及びプロットティング、並びに配列相同性の決定等は、当該技術分野で利用可能なコンピュータソフトウェアプログラムを使用して達成され得る。

【0528】

X線結晶学を含むが、これらに限定されない他の構造解析方法 (Engstrom (1974) Biochem. Exp. Biol. 11:7-13)、質量分析及びガスクロマトグラフィー (Methods in Protein Science, J. Wiley and Sons, New York, 1997)、並びにコンピュータモデリング (Fietterick and Zoller eds. (1986) Computer Graphics and Molecular Modeling, In Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, New York) を用いることもできる。

【0529】

特定の実施形態では、複合体の少なくとも1つのサブユニットは、組換えDNA技術によって生成され、天然に存在するタンパク質の誘導体である。特定の実施形態では、誘導体は、融合タンパク質であり、天然に存在するタンパク質のアミノ酸配列は、第2のアミノ酸配列に融合される。第2のアミノ酸配列は、タンパク質の精製、免疫学的検出、及び同定、並びに可視化を促進するペプチドタグであり得る。異なる機能及び親和性を有する多様なペプチドタグを本発明において使用して、親和性クロマトグラフィーによるサブユニット又はサブユニットを含む複合体の精製を容易にすることができる。特異的ペプチドタグは、免疫グロブリンの定常領域を含む。他の実施形態では、サブユニットは、リーダー配列に融合され、タンパク質サブユニットを発現する細胞からのタンパク質サブユニットの分泌を促進する。本発明とともに使用することができる他のペプチドタグには、FLAGエピトープ又はHAタグが含まれるが、これらに限定されない。

【0530】

複合体のサブユニットが共発現される場合、複合体は、免疫沈降、硫酸アンモニウム沈降、酸抽出、アニオン又はカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、免疫親和性クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、及びレクチンクロマトグラフィーを含む、当業者に既知の任意の方法によって精製することができる。

【0531】

本明細書に記載の方法を使用して、本発明によって包含される複合体の個々のサブユニットを精製することができる。複合体全体を精製するために、本方法を使用することもできる。一般に、複合体の精製条件及び解離定数は、精製手順中に複合体が無傷のままであるかどうかを決定する。かかる条件には、塩濃度、洗剤濃度、pH、及び酸化還元電位が含まれるが、これらに限定されない。

【0532】

複合体の少なくとも1つのポリペプチド又はサブユニットがペプチドタグを含む場合、本発明は、ペプチドタグの特性に基づく本発明によって包含される複合体の精製のための方法も企図する。1つのアプローチは、タグとその結合パートナーとの間の特定の分子相互作用に基づいている。他のアプローチは、タグ上に存在するエピトープへの抗体の免疫特異的結合に依存する。当該技術分野で周知の親和性クロマトグラフィーの原理は、概して、これらのアプローチの両方に適用可能である。別の実施形態では、複合体は、免疫沈降を使用して精製される。

【0533】

特定の実施形態では、本発明によって包含される複合体の個々のサブユニットは、別々に発現される。その後、複合体のサブユニットの互いへの結合に有利な条件下でサブユニットをインキュベートして、複合体を生成する。特定のより具体的な実施形態では、サブ

ユニットは、複合体形成の前に精製される。他の実施形態では、サブユニットを発現する細胞の上清（サブユニットが分泌される場合）又はサブユニットを発現する細胞の細胞溶解物（サブユニットが分泌されない場合）を最初に組み合わせて複合体を生じさせ、その後、複合体を精製する。本発明によって包含されるサブユニットが互いに結合する能力に影響を与えるパラメータには、塩濃度、洗剤濃度、pH、及び酸化還元電位が含まれるが、これらに限定されない。複合体が形成されると、当業者に知られている任意の方法によって複合体を精製又は濃縮することができる。特定の実施形態では、複合体は、濾過によって残りの個々のサブユニットから分離される。フィルターの細孔径は、個々のサブユニットが依然としてフィルターを通過することができるが、複合体がフィルターを通過しないようにしなければならない。複合体を濃縮するための他の方法には、スクロース勾配遠心分離及びクロマトグラフィーが含まれる。

10

【0534】

XII. スクリーニング方法

a. 複合体形成の調節因子

本発明によって包含される複合体、複合体の成分タンパク質及び成分タンパク質をコードする核酸、並びにアミノ酸及び核酸の誘導体及び断片を使用して、当該複合体に結合するか、又は当該複合体の活性の量、形成、若しくは安定性を調節する化合物についてスクリーニングすることができ、したがって、複合体の活性、複合体の安定性、及び／又は複合体の形成（すなわち、形成される複合体の量）、及び／又は複合体のタンパク質成分組成物の調節因子（すなわち、アゴニスト又はアンタゴニスト）としての潜在的な使用を有する。

20

【0535】

上述のように、本発明による使用のための複合体は、別の部分と会合した単一のポリペプチド、又は互いに会合し、かつ／又は別の部分と会合したポリペプチドの組み合わせ（例えば、タンパク質複合体）であり得る。

【0536】

したがって、本発明は、本発明によって包含される複合体のタンパク質成分組成物に結合するか、又はその活性の量を調節する分子についてスクリーニングするための方法も対象とする。本発明によって包含される一実施形態では、本発明によって包含される複合体の機能、活性又は形成を直接的又は間接的に調節する分子についてスクリーニングするための方法は、調節に有利な条件下で、当該複合体、又は複合体の機構を含む細胞若しくは生物を1つ以上の試験薬剤に曝露することと、当該複合体のタンパク質成分の活性の量又は同一性を決定することとを含み、試験薬剤の不在下での当該量、活性、又は同一性に対する当該量、活性、又は同一性の変化は、試験薬剤が当該複合体の機能、活性、又は形成を調節することを示す。かかるスクリーニングアッセイは、当該技術分野で一般に知られている無細胞及び細胞ベースの方法を使用して実行され得る。

30

【0537】

一実施形態では、本発明によって包含される複合体に結合するか、又は複合体の量、活性、形成、若しくは安定性を調節する分子についてスクリーニングするための方法は、上述の接触のステップの前に、修飾タンパク質複合体を形成するために有利な条件下、試験薬剤の存在下で単離された修飾タンパク質複合体のサブユニットをインキュベートすることを更に含む。別の実施形態では、方法は、単離された修飾タンパク質複合体における個々のサブユニットの存在及び／又は量を決定するステップを更に含む。

40

【0538】

本発明は、本発明によって包含される複合体のサブユニットの発現を調節する分子についてスクリーニングするための方法を更に対象とする。本発明によって包含される一実施形態では、本発明によって包含される複合体のサブユニットの発現を調節する分子についてスクリーニングするための方法は、調節に有利な条件下で、成分をコードする核酸を含む細胞又は生物を1つ以上の化合物に曝露することと、当該複合体のタンパク質成分の活性の量又は同一性を決定することとを含み、当該化合物の不在下での当該量、活性、又は

50

同一性に対する当該量、活性、又は同一性の変化は、化合物が当該複合体の発現を調節することを示す。かかるスクリーニングアッセイは、当該技術分野で一般に知られている無細胞及び細胞ベースの方法を使用して実行され得る。複合体又は構成要素の活性がアッセイの読み出しとして使用される場合、ウエスタンブロット分析又はノーザンブロット分析などの後続のアッセイを行って、構成要素の調節された発現レベルが調節された活性の原因であることを検証することができる。

【0539】

更なる特定の実施形態では、複合体の形成又は安定性の調節を決定することができる。いくつかの実施形態では、薬剤は、単離された修飾タンパク質複合体の形成又は安定性を調節する（阻害又は促進する）。特定の実施形態では、薬剤は、単離された修飾タンパク質複合体の形成又は安定性を、複合体中のポリペプチドと表1～5に列挙される別のサブユニットとの間の少なくとも1つの相互作用の間の相互作用を阻害又は促進することによって阻害する。薬剤は、例えば、小分子阻害剤、小分子分解剤、CRISPRガイドRNA（gRNA）、RNA干渉剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ペプチド若しくはペプチド模倣薬阻害剤、アプタマー、抗体、又はイントラボディであってもよい。特定の実施形態では、薬剤は、単離された修飾タンパク質複合体の少なくとも1つのサブユニットに特異的に結合する、抗体及び／若しくはイントラボディ、又はその抗原結合断片を含む。いくつかの他の実施形態では、薬剤は、単離された修飾タンパク質複合体の形成又は安定性を増強する。特定の実施形態では、薬剤は、複合体のポリペプチドと、表1～5に列挙される別のサブユニットとの間の少なくとも1つの相互作用の間の相互作用を安定化することによって、タンパク質複合体の形成又は安定性を強化する。薬剤は、小分子化合物、例えば、小分子安定剤であり得る。

【0540】

かかる調節は、その形成の典型的な時間経過の変化又は完全な複合体の形成につながる典型的なステップの変化のいずれかであり得る。かかる変化は、例えば、特定の状況において特定の条件及び／若しくは特定の薬剤で処理された特定の疾患表現型及び／若しくは細胞を示すか、又はそれを発生させる素因を有する特定のタイプ及び／若しくは細胞の未処理の野生型細胞における複合体形成のプロセスを分析及び比較することによって検出することができる。時間経過におけるかかる変化を研究する方法は、当該技術分野で周知であり、例えば、その形成の異なるステップで単離された複合体中のタンパク質のウエスタンブロット分析が挙げられる。

【0541】

特定の実施形態では、複合体のタンパク質成分、特にペプチド模倣物の断片及び／又は類似体は、複合体形成の競合的又は非競合的阻害剤としての活性についてスクリーニングされ、それによって複合体の活性又は形成を阻害する。

【0542】

別の実施形態では、本発明は、本発明によって包含されるタンパク質複合体に結合する分子についてスクリーニングするための方法であって、当該複合体、又は複合体機構を含む有する細胞若しくは生物を1つ以上の候補分子に曝露することと、当該複合体が当該候補分子のうちのいずれかによって結合されるかどうかを決定することと、を含む、方法を対象とする。

【0543】

ライブラリのスクリーニングは、多様な一般的に知られている方法のうちのいずれかによって達成され得る。例えば、ペプチドライブラリのスクリーニングを開示する以下の参考文献を参照のこと：Parmley and Smith (1989) Adv. Exp. Med. Biol. 251:215-218; Scott and Smith (1990) Science 249:386-390、Fowlkes et al. (1992) BioTechniques 13:422-427、Oldenburg et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5393-5397; Yu et al. (1994) Cell 76:933-945、Stau

dt et al. (1988) Science 241:577-580、Bock et al. (1992) Nature 355:564-566: Tuerk et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6988-6992: Ellington et al. (1992) Nature 355:850-852、米国特許第5,096,815号、米国特許第5,223,409号、及び米国特許第5,198,346号、全てLadner et al. Rebar and Pabo, (1993) Science 263:671-673)、並びに国際特許公開第94/18318号。

【0544】

特定の実施形態では、スクリーニングは、ライブラリメンバーを、固相上で固定化された複合体と接触させ、タンパク質に結合する（又は核酸若しくは誘導体をコードする）ライブラリメンバーを回収することによって実行することができる。「パニング」技法と呼ばれるかかるスクリーニング方法の例は、例えば、Parmley and Smith (1988), Gene 73:305-318、Fowlkes et al. (1992), BioTechniques 13:422-427、国際特許公開第94/18318号、及び上記の本明細書で引用される参考文献に記載されている。

【0545】

特定の実施形態では、複合体、特にペプチド模倣物のタンパク質成分の断片及び／又は類似体は、細胞内の複合体形成（複合体の量若しくは複合体の組成）又は活性の競合的又は非競合的阻害剤としての活性についてスクリーニングされ、それによって、細胞内の複合体活性又は形成を阻害する。

【0546】

一実施形態では、複合体活性又は形成を調節する（すなわち、アンタゴナイズ又はアゴナイズする）薬剤は、結合阻害アッセイを使用してスクリーニングすることができ、ここで、薬剤は、複合体形成が試験される薬剤の不在下で生じる、水性又は生理学的結合条件下で複合体の形成を調節するそれらの能力についてスクリーニングされ得る。本発明によって包含される複合体の形成を妨げる薬剤は、複合体形成のアンタゴニストとして特定される。複合体の形成を促進する薬剤は、複合体形成のアゴニストとして特定される。複合体の形成を完全に遮断する薬剤は、複合体形成の阻害剤として特定される。

【0547】

スクリーニングのための方法は、複合体の成分タンパク質を、放射性リガンド（例えば、 ^{125}I 若しくは ^3H ）、磁性リガンド（例えば、酢酸フォトビオチンに共有結合された常磁性ビーズ）、蛍光リガンド（例えば、フルオレセイン若しくはローダミン）、又は酵素リガンド（例えば、ルシフェラーゼ若しくは β -ガラクトシダーゼ）で標識することを伴い得る。次いで、溶液中で結合する反応物は、非標識結合パートナーに対する抗血清を使用した標識複合体部分の共免疫沈降（又は第2の標識複合体部分で使用されるものと区別可能なマーカーを有する標識結合パートナー）、免疫親和性クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、及び勾配密度遠心分離を含むが、これらに限定されない、当該技術分野で知られている多くの技法のうちの1つによって単離され得る。好ましい実施形態では、標識された結合パートナーは、市販のフィルターによって保持されない小さな断片又はペプチド模倣物である。結合すると、標識された種は次いで、フィルターを通過することができず、複合体形成の単純なアッセイを提供する。

【0548】

特定の実施形態では、本発明によって包含される複合体のタンパク質成分は、成分の互いへの結合がFRET（蛍光共鳴エネルギー伝達）をもたらすように、異なるフルオロフォアで標識される。化合物の添加が、化合物の不在下でのFRETと比較してFRETの差異をもたらす場合、化合物は、複合体形成の調節因子として特定される。化合物の存在下におけるFRETが、化合物の不在下におけるFRETと比較して減少する場合、化合物は、複合体形成の阻害剤として特定される。化合物の存在下でのFRETが、化合物の不在下でのFRETと比較して増加する場合、化合物は、複合体形成の活性化剤として特

定される。

【0549】

特定の他の実施形態では、本発明によって包含される複合体のタンパク質成分は、成分が別のタンパク質成分に結合して、本発明によって包含される複合体を形成することによって、FP（蛍光偏光）がもたらされるように、フルオロフォアで標識される。化合物の添加が、化合物の不在下でのFPと比較してFPの差異をもたらす場合、化合物は、複合体形成の調節因子として特定される。

【0550】

当該技術分野で一般的に知られている方法は、複合体の構成要素のうちの少なくとも1つを標識するために使用される。好適な標識方法には、放射性標識アミノ酸、例えば、³H-ロイシン若しくは³⁵S-メチオニンの組み込みによる放射標識、クロラミンT法を使用した¹²⁵I若しくは¹³¹Iによる翻訳後ヨウ素化による放射標識、ボルトン-ハンター試薬等、又はホスホリラーゼ及び無機放射標識リンを使用した³²Pによる標識、フォトビオチン-酢酸塩及び太陽灯曝露によるビオチン標識等が含まれるが、これらに限定されない。複合体のメンバーのうちの1つが固定化される場合、例えば、以下に記載されるように、遊離種が標識される。相互作用種のいずれも固定化されていない場合、各々が区別可能なマーカーで標識され得、その結果、両方の部分の単離を追跡して、より正確な定量化を提供し、ヘテロマー複合体からのホモマー複合体の形成を区別することができる。修飾された相互作用物質のうちの1つに結合するアクセサリタンパク質を利用して、検出の感度を改善し、複合体の安定性を高める方法等が提供される。

【0551】

複合体形成の物理的パラメータは、使用される標識に特異的なアッセイ方法、例えば、放射活性検出のための液体シンチレーション計数、酵素標識部分のための酵素活性等を使用する複合体形成の定量化によって分析することができる。次いで、反応結果を、Scatchard分析、Hill分析、及び当該技術分野で一般的に知られている他の方法を利用して分析する（例えば、Proteins, Structures, and Molecular Principles, 2nd Edition (1993) Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New Yorkを参照のこと）。

【0552】

スクリーニングされる薬剤／分子（候補分子）は、限られた数の特定の化合物の混合物として、又は化合物ライブラリ、ペプチドライブラリ等として提供され得る。スクリーニングされる薬剤／分子には、複合体活性又は形成を調節することができる、あらゆる形態の抗血清、アンチセンス核酸等も含まれ得る。スクリーニングのための例示的な候補分子及びライブラリを以下に記載する。

【0553】

特定の実施形態では、化合物は、プールでスクリーニングされる。ポジティブプールが特定されると、そのプールの個々の分子を別々に試験する。特定の実施形態では、プールサイズは、少なくとも2、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも25、少なくとも50、少なくとも75、少なくとも100、少なくとも150、少なくとも200、少なくとも250、又は少なくとも500個の化合物である。

【0554】

本発明によって包含される特定の実施形態では、スクリーニング方法は、候補分子の構造を決定することを更に含む。候補分子の構造は、当業者に知られている任意の技法によって決定することができる。

【0555】

i. 試験薬剤

当該技術分野で知られている任意の分子は、当該複合体の量、活性、又はタンパク質成分組成物の変化によって検出されるように、本発明によって包含される複合体の量、活性、又はタンパク質成分組成物を調節する（増加又は減少させる）その能力について試験す

ることができる。一例として、複合体の量の変化は、複合体機構を発現する細胞から単離することができる複合体の量の変化を検出することによって検出することができる。他の実施形態では、化合物の不在と比較した化合物の存在下でのシグナル強度の変化（例えば、FRET又はFPを使用する場合）は、化合物が複合体形成の調節因子であることを示す。複合体活性を調節する分子を特定するために、複合体を発現する細胞に候補分子を直接提供することができるか、又は候補タンパク質の場合、複合体機構を発現する細胞内で候補タンパク質を産生するために核酸が組換え的に発現される条件下で、それらのコード核酸を提供することによって提供することができ、次いで、複合体を細胞から精製し、精製された複合体を、上述のものに限定されないが、当該技術分野で周知の方法を使用して活性についてアッセイする。

10

【0556】

特定の実施形態では、本発明は、複合体の量、活性、又はタンパク質成分組成物を調節する、例えば、阻害する、アンタゴナイズする、又はアゴナイズする分子についての化学ライブラリを使用したスクリーニングアッセイを提供する。化学ライブラリは、ペプチドライブラリ、ペプチド模倣ライブラリ、化学合成ライブラリ、組換え、例えば、ファージディスプレイライブラリ、及びインビトロ翻訳ベースライブラリ、他の非ペプチド合成有機ライブラリ等であり得る。

【0557】

例示的なライブラリは、いくつかの供給源（ArOule、Tripos/Pan Labs、ChemDesign、及びPharmacopoeia）から市販されている。場合によっては、これらの化学ライブラリは、メンバー化合物が付着している基板上のライブラリの各メンバーの同一性をコードする組み合わせ戦略を使用して生成され、したがって、効果的な調節因子である分子の直接的かつ即時的な特定を可能にする。したがって、多くの組み合わせアプローチでは、化合物のプレート上の位置は、その化合物の組成を指定する。また、一実施例では、単一のプレート位置は、目的とする相互作用を含むウェルへの投与によってスクリーニングされ得る1〜20個の化学物質を有し得る。したがって、調節が検出される場合、相互作用する対のより小さなプールを調節活性についてアッセイすることができる。かかる方法によって、多くの候補分子をスクリーニングすることができる。

20

【0558】

使用に好適な多くの多様なライブラリが当該技術分野で既知であり、本発明に従って試験される化合物を提供するために使用され得る。あるいは、ライブラリは、標準的な方法を使用して構築することができる。化学的（合成）ライブラリ、組換え発現ライブラリ、又はポリソームベースのライブラリは、使用され得るライブラリの例示的なタイプである。

30

【0559】

ライブラリは、拘束性又は半剛性（ある程度の構造的剛性を有する）、又は直鎖状若しくは非拘束性であり得る。ライブラリは、cDNA若しくはゲノム発現ライブラリ、ランダムペプチド発現ライブラリ、又は化学的に合成されたランダムペプチドライブラリ、又は非ペプチドライブラリであり得る。発現ライブラリを、アッセイが行われる細胞に導入し、ライブラリの核酸を発現させて、それらのコードされたタンパク質を産生する。

40

【0560】

一実施形態では、本発明で 사용할ことができるペプチドライブラリは、インビトロで化学的に合成されるライブラリであり得る。かかるライブラリの例は、Houghten et al. (1991) Nature 354: 84-86（各ペプチドの第1の残基及び第2の残基が個々にかつ具体的に定義された遊離ヘキサペプチドの混合物を記載する）、Lam et al. (1991) Nature 354: 82-84（固相分割合成スキームが、コレクション中の各ビーズがアミノ酸残基の単一のランダム配列をその上に固定化したペプチドのライブラリを作製した「1つのビーズ、1つのペプチド」アプローチを記載する）、Medynski (1994) Bio/Technology 12

50

：709-710（分割合成及びT-bag合成方法を記載する）、並びにGallop et al. (1994) J. Medicinal Chemistry 37(9)：1233-1251に示される。単なる他の例として、コンビナトリアルライブラリは、Ohlmeyer et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10922-10926、Erb et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422-11426、Houghten et al., (1992) Biotechniques 13:412、Jaya wickreme et al. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1614-1618、又はSalmon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11708-11712の方法に従い、使用のために調製され得る。PCT公開第93/20242号及びBrenner and Lerner (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5381-5383は、各化学ポリマーライブラリメンバーについてのオリゴヌクレオチド識別子を含む「コードされたコンビナトリアル化学ライブラリ」を記載している。

10

【0561】

好ましい実施形態では、スクリーニングされるライブラリは、ランダムペプチドファージディスプレイライブラリである生物学的発現ライブラリであり、ランダムペプチドは（例えば、ジスルフィド結合を有することによって）拘束される。

20

【0562】

更に、より一般的な、構造的に拘束された有機多様性（例えば、非ペプチド）ライブラリも使用され得る。

【0563】

使用され得る立体構造的に制限されたライブラリとしては、限定されないが、酸化環境において、ジスルフィド結合によって架橋されてシスチン、修飾ペプチド（例えば、フッ素、金属、同位体標識を組み込む、リン酸化される等）、1つ以上の非天然に存在するアミノ酸を含むペプチド、非ペプチド構造、及びγ-カルボキシグルタミン酸の相当部分を含むペプチドを形成する、不変のシステイン残基を含むライブラリが挙げられる。

30

【0564】

非ペプチド、例えば、ペプチド誘導体（例えば、1つ以上の非天然に存在するアミノ酸を含む）のライブラリも使用され得る。これらの一例は、ペプチドライブラリである（Simon et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367-9371）。ペプチドは、天然に存在する側鎖がアルファ炭素に結合していないが、骨格アミノ窒素に結合している非天然アミノ酸のポリマーである。

【0565】

ペプチドは、ヒト消化酵素によって容易に分解されないため、ペプチドは、有利には薬物使用により容易に適応する。ペプチド中のアミド官能基がパルメチル化されて、化学的に形質転換されたコンビナトリアルライブラリを生成する、使用可能なライブラリの別の例は、Ostresh et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11138-11142によって記載されている。

40

【0566】

本発明によるスクリーニングが可能なペプチドライブラリのメンバーは、20個の天然に存在するアミノ酸を含むことに限定されない。特に、化学的に合成されたライブラリ及びポリソームベースのライブラリは、20個の天然に存在するアミノ酸に加えてアミノ酸の使用を可能にする（ライブラリ産生で使用されるアミノ酸の前駆体プールにそれらを含めることによって）。特定の実施形態では、ライブラリメンバーは、1つ以上の非天然又は非古典的アミノ酸又は環状ペプチドを含む。非古典的アミノ酸としては、一般的なアミノ酸のD-異性体、α-アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸；γ-Abu、ε-Ahk、6-アミノヘキサン酸；Aib、2-アミノイソ酪酸：

50

3-アミノプロピオン酸：オルニチン；ノルロイシン：ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、システイン酸、 ϵ -ブチルグリシン、 ϵ -ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、デザイナーアミノ酸、例えば、 β -メチルアミノ酸、 γ -メチルアミノ酸、 N -メチルアミノ酸、フルオロアミノ酸、及びアミノ酸類似体全般が挙げられるが、これらに限定されない。更に、アミノ酸は、D（右旋性）又はL（左旋性）であり得る。

【0567】

特定の実施形態では、本発明によって包含される複合体のタンパク質成分の断片及び／又は類似体、特にペプチド模倣体は、複合体活性又は形成の競合的又は非競合的阻害剤としての活性についてスクリーニングされる。

【0568】

本発明によって包含される別の実施形態では、コンビナトリアル化学を使用して、複合体の調節因子を特定することができる。コンビナトリアル化学は、数十万個の化合物を含有するライブラリを作成することができ、その多くは、構造的に類似し得る。高スループットスクリーニングプログラムは、既知の標的に対する親和性のためにこれらの広大なライブラリをスクリーニングすることができるが、より低次元のライブラリを達成するが、最大の化学的多様性を提供する新たなアプローチが開発されている。（例えば、Matter (1997) Journal of Medicinal Chemistry 40:1219-1229を参照のこと）。

【0569】

コンビナトリアル化学の1つの方法、親和性フィンガープリンティングは、以前に、定義されたタンパク質パネルに対する結合親和性についての小分子の離散ライブラリを試験するために使用されてきた。スクリーニングによって得られたフィンガープリントは、個々のライブラリメンバーの目的とする他のタンパク質又は受容体に対する親和性を予測するために使用される（本発明では、本発明によって包含されるタンパク質複合体及びそのタンパク質成分）。フィンガープリントは、ライブラリ化合物が同様に反応し得るかどうかを予測するために、目的とするタンパク質と反応することが知られている他の化合物から得られたフィンガープリントと比較される。例えば、複合体又はタンパク質成分との相互作用について大規模なライブラリ内の全てのリガンドを試験するのではなく、その活性を有することが知られている他の化合物と同様のフィンガープリントを有するリガンドのみを試験することができる。（例えば、Kauvar et al. (1995) Chemistry and Biology 2:107-118、Kauvar (1995) Affinity finger printing, Pharmaceutical Manufacturing International. 8:25-28、及びKauvar, Toxic-Chemical Detection by Pattern Recognition in New Frontiers in Agrochemical Immunoassay, D. Kurtz, L. Stanker and J. H. Skerritt. Editors, 1995, AOAC:Washington, D. C., 305-312を参照のこと）。

【0570】

Kay et al. (1993) Gene 128:59-65 (Kay) は、従来の任意のライブラリよりも長い、全くランダムな配列のペプチドをコードするペプチドライブラリを構築する方法を開示している。Kayに開示されるライブラリは、約20アミノ酸長を超える全合成ランダムペプチドをコードする。かかるライブラリは、複雑な調節因子を特定するために有利にスクリーニングされ得る。（1996年3月12日付の米国特許第5,498,538号、及び1994年8月18日付のPCT国際公開第94/18318号も参照されたい）。

【0571】

様々なタイプのペプチドライブラリの包括的なレビューは、Gallop et al. (1994) J. Med. Chem. 37:1233-1251に見出すことができる

10

20

30

40

50

。

【0572】

本発明によって包含される方法を使用してスクリーニングされるライブラリは、様々なタイプの化合物を含み得る。本発明に包含される方法に従ってスクリーニングされ得るライブラリの例としては、ペプトイド；ランダムバイオオリゴマー；ヒダントイン、ベンゾジアゼピン、及びジペプチドなどの多様体；ビニロガスポリペプチド；非ペプチド性ペプチド模倣薬；オリゴカルバメート；ペプチジルホスホネート；ペプチド核酸ライブラリ；抗体ライブラリ；炭水化物ライブラリ；及び小分子ライブラリ（好ましくは、小有機分子ライブラリ）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、スクリーニングされたライブラリ内の化合物は、核酸又はペプチド分子である。非限定的な例では、ペプチド分子は、ファージディスプレイライブラリに存在し得る。他の実施形態では、化合物のタイプには、非天然に存在するアミノ酸、例えば、D-アミノ酸、アミノ酸のリン類似体（ α -アミノリン酸及び α -アミノリン酸など）、又は非ペプチド結合を有するアミノ酸、核酸類似体（ホスホロチオエート及びPNAなど）、ホルモン、抗原、合成又は天然に存在する薬物、オピエート、ドーパミン、セロトニン、カテコールアミン、トロピン、アセチルコリン、プロスタグランジン、有機分子、フェロモン、アデノシン、スクロース、グルコース、ラクトース、及びガラクトースを含むペプチド類似体が含まれるが、これらに限定されない。ポリペプチド又はタンパク質のライブラリもまた、本発明によって包含されるアッセイで使用され得る。

10

20

【0573】

好ましい実施形態では、コンビナトリアルライブラリは、ベンゾジアゼピン、イソプレノイド、チアゾリジノン、メタチアザノン、ピロリジン、モルホリノ化合物、及びベンゾジアゼピンを含むが、これらに限定されない小有機分子ライブラリである。別の実施形態では、コンビナトリアルライブラリは、ペプチド；ランダムなバイオオリゴマー；ベンゾジアゼピン；ヒダントイン、ベンゾジアゼピン、及びジペプチドなどの多量体；ビニロガスポリペプチド；非ペプチド性ペプチド模倣物；オリゴカルバメート；ペプチジルホスホネート；ペプチド核酸ライブラリ；抗体ライブラリ；又は炭水化物ライブラリを含む。コンビナトリアルライブラリ自体は、市販されている（例えば、ComGenex, Princeton, N. J.、Asinex, Moscow, Ru、Tripos, Inc., St. Louis, Mo.、ChemStar, Ltd, Moscow, Russia、3D Pharmaceuticals, Exton, Pa.、Martek Biosciences, Columbia, Md.等を参照のこと）。

30

【0574】

好ましい実施形態では、ライブラリの化合物が細胞取り込みにより適しているように、ライブラリが事前に選択される。例えば、化合物は、限定されないが、サイズ、親油性、親水性、及び水素結合などの特定のパラメータに基づいて選択され、これらは、化合物が細胞内に入る可能性を増加させる。別の実施形態では、化合物は、三次元又は四次元コンピュータ計算プログラムによって分析される。

【0575】

本発明によって包含される方法に従って使用するためのコンビナトリアル化合物ライブラリを合成してもよい。薬理的、生物学的、又は他の活性についてスクリーニングされ得る、小有機化合物、又はライブラリの大規模なコレクションの作成に向けられた合成方法に大きな関心がある。広大なコンビナトリアルライブラリを作成するために適用される合成方法は、溶液中又は固相中、すなわち、固体支持体上で行われる。固相合成は、過剰な試薬を容易に添加し、各反応ステップ後に洗い流すことができるため、多段階反応を実施し、高収率で反応を完了させることを容易にする。固相コンビナトリアル合成はまた、単離、精製、及びスクリーニングを改善する傾向がある。しかしながら、より伝統的な溶液相化学は、固相化学よりも幅広い種類の有機反応を支持する。

40

【0576】

本発明によって包含されるコンビナトリアル化合物ライブラリは、参照によりその全体

50

が本明細書に組み込まれる、K i l c o i n e t a l . に対する米国特許第 6 , 1 9 0 , 6 1 9 号に記載される装置を使用して合成され得る。米国特許第 6 , 1 9 0 , 6 1 9 号は、複数の別個の化合物の並列合成のため、又は化合物のコンビナトリアルライブラリのために、複数の反応容器を保持することができる合成装置を開示している。

【0577】

一実施形態では、コンビナトリアル化合物ライブラリは、溶液中で合成することができる。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、B o g e r e t a l . に対する米国特許第 6 , 1 9 4 , 6 1 2 号に開示される方法は、コンビナトリアルライブラリの溶液相合成のためのテンプレートとして有用な化合物を特徴とする。

【0578】

テンプレートは、液体／液体又は固体／液体抽出を使用して、反応生成物を未反応の反応物から容易に精製できるように設計されている。テンプレートを使用したコンビナトリアル合成によってされる化合物は、好ましくは小有機分子である。ライブラリ内のいくつかの化合物は、非ペプチド又はペプチドの効果を模倣し得る。

【0579】

コンビナトリアル化合物ライブラリの固相合成とは対照的に、液相合成は、多段階固相合成の個々のステップを監視するための専門的なプロトコルの使用を必要としない (E g n e r e t a l . (1995) J . O r g . C h e m . 6 0 : 2 6 5 2 、 A n d e r s o n e t a l . (1995) J . O r g . C h e m . 6 0 : 2 6 5 0 、 F i t c h e t a l . (1994) J . O r g . C h e m . 5 9 : 7 9 5 5 、 L o o k e t a l . (1994) J . O r g . C h e m . 4 9 : 7 5 8 8 、 M e t z g e r e t a l . (1993) A n g e w . C h e m . , I n t . E d . E n g l . 3 2 : 8 9 4 、 Y o u n g q u i s t e t a l . (1994) R a p i d C o m m u n . M a s s S p e c t . 8 : 7 7 、 C h u e t a l . (1995) J . A m . C h e m . S o c . 1 1 7 : 5 4 1 9 、 B r u m m e l e t a l . (1994) S c i e n c e 2 6 4 : 3 9 9 、及び S t e v a n o v i c e t a l . (1993) B i o o r g . M e d . C h e m . L e t t . 3 : 4 3 1) 。

【0580】

本発明によって包含される方法に有用なコンビナトリアル化合物ライブラリは、固体支持体上で合成され得る。一実施形態では、固体支持体上の化合物のライブラリを合成するために、合成中に固体支持体を分離及び混合するプロトコルである分割合成方法を使用する (例えば、L a m e t a l . (1997) C h e m . R e v . 9 7 : 4 1 - 4 4 8 、 O h l m e y e r e t a l . (1993) P r o c . N a t . A c a d . S c i . U S A 9 0 : 1 0 9 2 2 - 1 0 9 2 6 、及びそれらで引用される参考文献を参照のこと)。最終ライブラリの各固体支持体は、その表面に実質的に1つのタイプの化合物が付着している。1つの生成物が各支持体に付着される、固体支持体上でコンビナトリアルライブラリを合成するための他の方法は、当業者に知られているであろう (例えば、N e f z i e t a l . (1997) C h e m . R e v . 9 7 : 4 4 9 - 4 7 2 を参照のこと)。

【0581】

本明細書で使用される場合、「固体支持体」という用語は、特定のタイプの固体支持体に限定されない。むしろ、多数の支持体が利用可能であり、当業者に知られている。固体支持体としては、シリカゲル、樹脂、誘導体化プラスチックフィルム、ガラスビーズ、綿、プラスチックビーズ、ポリスチレンビーズ、アルミナゲル、及び多糖類が挙げられる。好適な固体支持体は、所望の末端使用及び様々な合成プロトコルに対する好適性に基づいて選択され得る。例えば、ペプチド合成の場合、固体支持体は、p-メチルベンズヒドリルアミン (pMBHA) 樹脂 (P e p t i d e s I n t e r n a t i o n a l , L o u i s v i l l e , K y .) 、ポリスチレン (例えば、B a c h e m I n c . , P e n i n s u l a L a b o r a t o r i e s から得られるPAM-樹脂等) (クロロメチルポリスチレン、ヒドロキシメチルポリスチレン、及びアミノメチルポリスチレンを含む)、ポリ (ジメチルアクリルアミド) を移植したスチレンコジビニルベンゼン (例えば、A m

10

20

30

40

50

i n o t e c h , C a n a d a から得られる P O L Y H I P E 樹脂)、ポリアミド樹脂 (P e n i n s u l a L a b o r a t o r i e s から得られる)、ポリエチレングリコールを移植されたポリスチレン樹脂 (例えば、T E N T A G E L 若しくは A R G O G E L , B a y e r , T u b i n g e n , G e r m a n y)、ポリジメチルアクリルアミド樹脂 (M i l l i g e n / B i o s e a r c h , C a l i f o r n i a から得られる)、又は S e p h a r o s e (P h a r m a c i a , S w e d e n) などの樹脂であり得る。

【0582】

本発明によって包含されるいくつかの実施形態では、化合物は、リンカーを介して固体支持体に付着され得る。リンカーは、固体支持体と一体であり、その一部であり得るか、又は一体でなくてもよく、固体支持体上で合成されるか、若しくは合成後にそれに付着されるかのいずれかである。リンカーは、固体支持体への化合物結合点を提供するだけでなく、リンカーの性質に応じて、異なる条件下で固体支持体から異なる分子基を切断することを可能にするためにも有用である。例えば、リンカーは、とりわけ、求電子的に切断され得るか、求核的に切断され得るか、光切断可能であり得るか、酵素的に切断され得るか、金属によって切断され得るか、還元的条件下で切断され得るか、又は酸化的条件下で切断され得る。好ましい実施形態では、化合物は、化合物の高スループットスクリーニングの前に固体支持体から切断される。

【0583】

本発明によって包含される特定の実施形態では、薬剤は、小分子である。

【0584】

i i . 無細胞アッセイ

特定の実施形態では、本発明によって包含される複合体の形成又は安定性の調節因子を特定するための方法は、インビトロで、特に無細胞系において実行され得る。特定のより具体的な実施形態では、複合体は、精製される。特定の実施形態では、候補分子は、精製される。

【0585】

特定の実施形態では、スクリーニングは、ライブラリメンバーを、固相上で固定化された複合体と接触させ、タンパク質に結合する (又は核酸若しくは誘導体をコードする) ライブラリメンバーを回収することによって実行することができる。「パニング技法」と呼ばれるかかるスクリーニング方法の例は、例として、P a r m l e y a n d S m i t h (1 9 8 8) G e n e 7 3 : 3 0 5 - 3 1 8 : F o w l k e s e t a l . (1 9 9 2) B i o T e c h n i q u e s 1 3 : 4 2 2 - 4 2 7 : 国際特許公開第 9 4 / 1 8 3 1 8 号、及び上で本明細書において引用される参考文献に記載されている。

【0586】

一実施形態では、複合体活性又は形成を調節する (すなわち、アンタゴナイズ若しくはアゴナイズする) 薬剤は、結合阻害アッセイを使用してスクリーニングすることができ、ここで、薬剤は、複合体形成が試験される薬剤の不在下で生じる、水性又は生理学的結合条件下で複合体の形成を調節するそれらの能力についてスクリーニングされる。本発明によって包含される複合体の形成を妨げる薬剤は、複合体形成のアンタゴニストとして特定される。複合体の形成を促進する薬剤は、複合体形成のアゴニストとして特定される。複合体の形成を完全に遮断する薬剤は、複合体形成の阻害剤として特定される。例示的な実施形態では、結合条件は、例えば、限定ではないが、相互作用の特異性を向上させる 1 0 ~ 2 5 0 m M の N a C l 、 5 ~ 5 0 m M の T r i s - H C l 、 p H 5 ~ 8 、及び 0 . 5 % の T r i t o n (登録商標) X - 1 0 0 、又は他の洗剤の塩水溶液中にある。結合を改善し、かつ／又はタンパク質分解を低減するために、金属キレート剤及び／又は二価カチオンを添加することができる。反応温度は、4、10、15、22、25、35、又は 4 2 ° C を含み得、インキュベーション時間は、典型的に少なくとも 1 5 秒であるが、結合平衡を生じさせるために、より長い時間が好ましい。特定の複合体を、日常的なタンパク質結合アッセイを使用してアッセイして、再現可能な結合のための最適な結合条件を決定することができる。

10

20

30

40

50

【0587】

2つの分子間の相互作用の決定が、標準の結合又は酵素分析アッセイを使用して達成される場合がある。これらのアッセイは、熱シフトアッセイ（タンパク質単独かつ分子の存在下での融解温度の変化の測定値）（R. Zhang, F. Monsma, (2010) Curr. Opin. Drug Discov. Devel., 13:389-402）、SPR（表面プラズモン共鳴）（T. Neumann et al. (2007), Curr. Top Med. Chem., 7:1630-1642）、FRET/BRET（蛍光又は生物発光共鳴励起移動）（A. L. Mattheyses, A. I. Marcus, (2015), Methods Mol. Biol., 1278:329-339）、J. Bacart, et al. (2008), Biotechnol. J., 3:311-324）、Elisa（（酵素結合免疫吸着アッセイ）（Z. Weng, Q. Zhao, (2015), Methods Mol. Biol., 1278:341-352）、蛍光偏光（Y. Du, (2015), Methods Mol. Biol., 1278:529-544）、及びファウエスタン（U. Mahlknecht, O. G. Ottmann, D. Hoelzer J. (2001), Biotechnol., 88:89-94）、又は他の技法を含み得る。（等温熱量測定（ITC）、核磁気共鳴（NMR）、及びX線結晶学を使用して）分子結合モードの構造又は熱力学的詳細を提供する、より高度な（かつより低いスループットの）生物物理学的方法もまた、潜在的なヒットの更なる検証及び特性評価のために必要とされ得る。

【0588】

例えば、直接結合アッセイでは、結合が複合体中の標識サブユニットを検出することによって決定され得るように、1つのサブユニット（又はそれらのそれぞれの結合パートナー）が放射性同位体又は酵素標識にカップリングされ得る。例えば、サブユニットは、直接的又は間接的のいずれかで、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、又は ^3H で標識され得、放射性同位体が放射線放出の直接計数又はシンチレーション計数によって検出され得る。あるいは、サブユニットは、例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、又はルシフェラーゼで酵素的に標識され得、酵素標識が適切な基質の生成物への変換の決定によって検出され得る。

【0589】

特定の実施形態では、インビトロ結合アッセイに対する別の一般的なアプローチが使用される。このアッセイでは、結合種のうちの1つは、フィルター上、マイクロタイタープレートウェル内、試験管内で、共有結合又は非共有結合のいずれかで、クロマトグラフィーマトリックス等に固定化される。タンパク質は、当該技術分野で周知の任意の方法、例えば、限定されないが、Kadonaga and Tjian (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5889-5893の方法、すなわち、CNBr-セファロース48（Pharmacia）などのシアノゲン-臭化誘導体化基質への連結を使用して共有結合的に固定化することができる。必要な場合、スパーサーの使用は、基質による立体障害を低減することができる。タンパク質の基質への非共有結合には、タンパク質の荷電表面への付着、特定の抗体との結合、第3の無関係な相互作用タンパク質への結合等が含まれるが、これらに限定されない。

【0590】

複合体の1つのメンバー（又はその誘導体）と、任意の手段（例えば、上記の手段）によって標識された複合体の別のメンバーとの結合についての競合のための薬剤（細胞抽出物又はライブラリプールを含む）のアッセイは、複合体形成の競合体又はエンハンサーについてスクリーニングするために提供される。特定の実施形態では、他のタンパク質成分への試薬の非特異的結合を阻害するための遮断剤、又はプラスチック、固定化マトリックス等への試薬の吸収損失が、アッセイ混合物に含まれる。遮断剤には、ウシ血清アルブミン、13-カゼイン、非脂肪乾燥乳、デンハート試薬、フィコール、ポリビニルピロリジン、非イオン性洗剤（NP40、Triton X-100、Tween 20、Tween 80等）、イオン性洗剤（例えば、SDS、LOS等）、ポリエチレングリコール

等が含まれるが、これらに限定されない。適切な遮断剤濃度は、複合体形成を可能にする。

【0591】

結合が行われた後、結合されていない標識タンパク質を上清中で除去し、任意の結合された標識タンパク質を保持する固定化タンパク質を広範囲に洗浄する。次いで、結合標識の量を、当該技術分野における標準的な方法を使用して定量化して、標識を検出する。

【0592】

好ましい実施形態では、優れた安定性を有するが、複合体を形成する能力を保持するポリペプチド誘導体（例えば、結合アッセイ緩衝液中のタンパク質分解に耐性であるように、又は酸化的分解に耐性であるように修飾された1つ以上の構成タンパク質）を使用して、複合体の活性又は形成の調節因子についてスクリーニングする。そのような耐性分子は、例えば、タンパク質分解切断部位におけるアミノ酸の置換、タンパク質分解感受性部位における化学的に誘導体化されたアミノ酸の使用、並びに酸化を受けるアミノ酸残基、すなわち、メチオニン及びシステインの置換によって生成することができる。

【0593】

i i i . 細胞ベースのアッセイ

特定の実施形態では、アッセイを実行して、複合体のタンパク質成分を発現する組換え細胞を使用して、複合体に結合するか、又は複合体の活性若しくは形成を干渉するか、又は複合体の活性若しくは形成を促進する分子についてスクリーニングすることができる。特定の実施形態では、融合タンパク質としての組換え細胞で発現されるタンパク質成分のうちの少なくとも1つ、タンパク質成分は、精製及びその後の定量化及び／又は免疫学的視覚化及び定量化を容易にするためにペプチドタグに融合される。

【0594】

本発明によって包含される特定の態様は、例えば、複合体を単離するために記載された方法を使用して、本発明によって包含される複合体の形成又は分解を阻害又は促進する分子を特定することと、第4節（下記参照）、並びにW O O O / 0 9 7 1 6 及びR i g a u t e t a l . (1 9 9 9) N a t u r e B i o t e c h n o l . 1 7 : 1 0 3 0 - 1 0 3 2（各々、参照によりそれら全体が組み込まれる）に記載されているT A Pアッセイを使用して、複合体のメンバーを特定することに関する。

【0595】

本発明によって包含される別の実施形態では、調節因子は、本発明によって包含される複合体の組換え構成タンパク質を発現するトランスジェニック非ヒト動物に試験薬剤を投与することによって特定される。特定の実施形態では、複合体成分は、相同性内因性タンパク質成分から区別可能である。特定の実施形態では、組換え構成タンパク質は、融合タンパク質であり、タンパク質成分は、ペプチドタグに融合される。特定の実施形態では、組換えタンパク質成分のアミノ酸配列は、組換えタンパク質成分に特異的な抗体を使用して、タンパク質成分又は当該成分とともに形成される複合体のレベルを決定することができるように、内因性タンパク質成分のアミノ酸配列とは異なる。特定の実施形態では、組換えタンパク質成分は、それぞれのタンパク質の天然プロモーターではないプロモーターから発現される。特定の実施形態では、組換えタンパク質成分は、通常、それが発現されない組織で発現される。特定の実施形態では、化合物は、トランスジェニック非ヒト動物においても組換え的に発現される。

【0596】

特定の実施形態では、本発明によって包含される複合体のタンパク質成分の変異体形態は、細胞において発現され、タンパク質成分の変異体形態は、本発明によって包含される複合体の他のタンパク質成分に対する天然に存在するタンパク質の結合親和性よりも低い結合親和性を有する。特定の実施形態では、タンパク質成分の優性阻害性変異体形態は、細胞において発現される。優性阻害性形態は、他のタンパク質成分、すなわち結合ドメインに結合するタンパク質成分のドメインであり得る。理論に縛られることなく、結合ドメインは、複合体の他のタンパク質成分に結合するために天然に存在するタンパク質成分と

10

20

30

40

50

競合し、それによって、完全長タンパク質成分を含有する複合体の形成を防止する。代わりに、細胞内の優性阻害性形態のレベルが増加するにつれて、漸増量の複合体は、通常、優性阻害性として表されるタンパク質成分によって複合体に提供されるドメインを欠く。

【0597】

タンパク質成分の結合ドメインは、当業者に知られている任意の標準技法によって特定され得る。非限定的な例では、アラニン走査変異誘発 (Cunningham and Wells (1989) Science 244:1081-1085) を実施して、別のタンパク質成分との二量体化に必要なタンパク質の領域を特定する。他の実施形態では、タンパク質成分の異なる欠失変異体が生成され、それにより、組み合わされた欠失領域がタンパク質全体に及ぶことになる。特定の実施形態では、異なる欠失は互いに重複する。タンパク質成分の変異体形態が生成されると、それらは、別のタンパク質成分と二量体を形成するそれらの能力について試験される。特定の変異体が別のタンパク質成分と二量体を形成することに失敗した場合、又は天然に存在する形態と比較して低減した親和性で他のタンパク質成分に結合した場合、この変異体形態の変異は、二量体形成に参与するタンパク質の領域内にあるものとして識別される。変異が単にタンパク質の適切なフォールディングを干渉したことを除外するために、当業者に既知の任意の構造解析を行って、タンパク質の三次元立体構造を決定することができる。かかる技法には、環状二色性 (CD)、NMR、及びX線結晶学が含まれるが、これらに限定されない。

【0598】

特定の実施形態では、本発明によって包含される複合体の成分の変異形態は、誘導性プロモーター下で細胞において発現され得る。当業者に知られている任意の方法を使用して、成分をコードするヌクレオチド配列を変異させることができる。当業者に知られている任意の誘導性プロモーターを使用することができる。特に、本発明によって包含される複合体の成分の変異形態は、活性の低減、例えば、複合体の他の成分に対するRNA核酸分解活性の低減及び／又は親和性の低減を有する。

【0599】

特定の実施形態では、本発明によって包含されるアッセイは、高スループット形式で行われる。例えば、逆ツーハイブリッド又はBRETを使用して相互作用の喪失を測定する高スループット細胞スクリーニングを使用してもよく、細胞透過性分子のみを選択する利点を提供する (A. R. Horswill, S. N. Savinov, S. J. Benkovic (2004), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101:15591-15596, A. Hamdi, P. Colas (2012), Trends Pharmacol. Sci., 33:109-118)。後者のアプローチは、「標的上の」効果を評価するために更なる検証が必要である。上述のアッセイ方法の1つ以上の実施形態では、ポリペプチド又は分子を固定化して、タンパク質又は分子の一方又は両方の複合体形成されていない形態からの複合体形成された形態の分離を促進し、かつアッセイの自動化を適応させることが望ましくあり得る。

【0600】

b. 新たな結合パートナーを特定するための複合体の使用

本発明によって包含される特定の実施形態では、本発明によって包含される複合体を使用して、複合体の新たな成分を特定する。特定の実施形態では、本発明によって包含される複合体の新たな結合パートナーが特定され、それによってクロマチンリモデリングプロセスに参与する。当業者に知られている任意の技法を使用して、かかる新たな結合パートナーを特定することができる。特定の実施形態では、本発明によって包含される複合体の結合パートナーは、本発明によって包含される複合体に結合するが、本発明によって包含される複合体の個々のタンパク質成分には結合しない。特定の実施形態では、免疫沈降を使用して、本発明によって包含される複合体の結合パートナーを特定する。

【0601】

特定の実施形態では、本発明によって包含されるアッセイは、高スループット形式で行われる。

【0602】

本発明によって包含されるスクリーニング方法はまた、当該技術分野で知られている他の無細胞又は細胞ベースのアッセイ、例えば、WO2004/009622、US2002/0177692A1、US2010/0136710A1（これらの全ては、参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるものを使用することもできる。

【0603】

本発明は更に、上述のスクリーニングアッセイによって特定された新規の薬剤に関する。したがって、本明細書に記載されるように特定された薬剤を適切な動物モデルにおいて更に使用することは、本発明の範囲内である。例えば、本明細書に記載されるように特定された薬剤が動物モデルに使用されて、かかる薬剤での治療の有効性、毒性、又は副作用を決定することができる。あるいは、本明細書に記載されるように特定された抗体が動物モデルに使用されて、かかる薬剤の作用機構を決定することができる。

10

【0604】

XIII. キット

本発明は、本明細書に記載のバイオマーカーを検出及び／又は調節するためのキットも包含する。本発明のキットは、本明細書に提供される開示される本発明の方法における、開示される本発明のキット又は抗体の使用を開示又は記載する教材も含み得る。キットは、キットが設計される特定の用途を容易にするための追加の成分を含み得る。例えば、キットは、標識を検出する手段（例えば、酵素標識のための酵素基質、蛍光標識を検出するためのフィルターセット、ヒツジ抗マウス-HRPなどの適切な二次標識など）及び対照に必要な試薬（例えば、対照生体試料又は標準）を更に含んでもよい。キットは、開示される本発明の方法での使用が認められている緩衝液及び他の試薬を更に含む得る。非限定的な例には、担体タンパク質又は洗剤等の非特異的結合を減少させる薬剤が挙げられる。

20

【0605】

XIII.1. 表1～4スクリーニングヒット

以下の表1～4は、本明細書とともに提出されたASCIIテキストファイルにも見出される遺伝子記号を列挙する（PCT出願の1頁の「L a r g e s F i l e s」段落を参照のこと）。スクリーニングヒットに関する配列及び追加情報は、本明細書とともに提出された大きなASCIIファイルにおいて見出すことができる。以下に列挙される遺伝子記号は、周知かつ広く使用されている遺伝子記号を表す。当業者は、かかる記号を認識することができ、遺伝子カード（Gene Cards）又はアンサンブル（Ensemble）を含むがこれらに限定されない任意の周知の遺伝子データベース内でその対応する配列を見つけることができるであろう。

30

40

50

【表 3 - 1】

表 1 : C R I S P R ポジティブヒット (遺伝子記号)

遺伝子記号	遺伝子記号	遺伝子記号	遺伝子記号	遺伝子記号	遺伝子記号	遺伝子記号	遺伝子記号
USP7	RPS27P29	NPIP8	TOPBP1	MGAT5	RPL22	CRABP2	LGALS7
BCORL1	RPS27P13	CCDC138	RFC3	MAN1A1	C20orf27	ECT2	GOLGA6L17P
SS18L2	RPS27P9	B4GAT1	DDX10	TRIM36	ENTPD1	KMT2C	GOLGA6L5P
NEDD8	ATP5MFP5	AKAP5	TUSC2	ZNF273	ZCCHC2	CD96	LOC392196
RBM4	ATP5MFP2	ZNF737	TP53AIP1	SULT1A3	SPART	CDK2	SEPT5-GP1BB
RBM14- RBM4	TIA1	ERH	HS2ST1	SULT1A4	ECHS1	NAIF1	GAGE2A
MEPCE	SEC61B	TOR3A	DDX23	SMAD6	EIF2B3	TMM17B	SPDYE5
ASXL1	CDK1	ARRB1	EPS8L1	RRM2	PRPF8	BARX1	CT45A3
DDX6	MTBP	PNPLA8	ZNF41	VGLL1	ZNF559- ZNF177	SPDYE2	GOLGA8Q
INTS1	NDUFAF5	MYOC	KLHL24	MYL9	PEX3	SPDYE2B	HSFY1
CHAF1B	CT55	DBNL	FMO5	ABCG5	FITM1	SPDYE6	HSFY2
DTYMK	ZRSR2	FAM71A	SLC35G1	GRIK3	H2AB3	HCFC1	GOLGA6L4
ISL1	SERINC3	SUZ12	CANX	STK10	H2AB2	TNPO3	CT45A7
KEAP1	UBE2Q1	SLC25A29	TMEM171	GABRD	VWF	PRR12	CT45A6
UBE2I	AGBL1	PPAN	LENG1	HSD17B12	COPB1	GNGT2	CT45A5
SUPT20H	TP73	COX7C	SLIT1	C14orf178	CTXN3	BLZF1	MIA2
CCNE2	PEBP4	NKIRAS2	PYHIN1	TMC7	HNRNPDL	FGF18	ATP5MF-PTCD1

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

CARS1	ZNF99	RSRC1	TDRD10	GSKIP	DNAJC24	NPIPB4	CT45A1
NEDD8-							
MDP1	USP17L7	CDK12	FLII	RPUSD2	ZNF680	TP53INP1	RBMY1F
RD3	DHX9	APOBEC3D	PEMT	TBX10	RRS1	MTF2	RBMY1J
MCM7	MYH9	ATP5MC1	NPB	ID4	KNCN	POTEB2	TBC1D3I
IPO5	AKTIP	PTPRK	CASS4	NCKIPSD	NPIPB12	POTEB	RPL17-C1orf32
H3C2	HCN2	HYAL2	NPNT	IFT81	NPIPB13	CDK13	GOLGA8O
HMGB1	CLEC6A	THAP9	KAT5	APOBEC4	TRIL	GID8	TBC1D3L
LDB1	COX7B	COX10	MAP1LC3A	RTN4	VCX3A	APBB1	TBC1D3D
UBC	ATP5F1C	GDNF-AS1	TMEM236	BIRC5	GCLC	GNPDA2	NBPF11
USP17L10	BIRC6	RPS20	PCDHGA3	SLC7A8	OPN4	JOSD1	TMED7-TICAM2
PCID2	CHD7	PSG1	MRPS14	MAGEB1	TMEM251	SLC4A9	MBD3L3
GIGYF2	CDC5L	TOR1AIP1	JMJD7- PLA2G4B	SH3BP5L	UBAP2	HOXA6	TBC1D3G
FLCN	RNF8	MVK	TTC14	ACOX1	MRGBP	GABRA4	TBC1D3H
LAMTOR1	ESRP2	CBX8	ANP32A	B3GALT2	ATXN7L2	GABRR2	ERCC6
ATP5F1A	LOC441155	GOLGA6A	ZNF319	IGFN1	ITGA9	WRNIP1	TBC1D3E
TAF5L	ZC3H11B	GOLGA6B	ATP5ME	MPHOSPH6	STAC	HOXA4	TBC1D3F
MED12	TMEM259	ZNF208	SCNN1B	HTR4	ANAPC2	TSG101	TBC1D3
PRMT1	KMT5B	INTS2	STOML2	MAML2	MFSD1	C1orf122	TBC1D3C
POLD2	ACADM	TMEM69	IL4I1	HDDC2	RBX1	JAKMIP3	GOLGA8N
SEC63	SMARCA5	CDC42EP2	LARS1	CLEC2L	OR2T33	IFT46	GAGE12J
RACK1	HTT	TFDP1	HRH4	PRPF19	SOX4	WBP2NL	AMY1A
SAE1	POLA2	AGAP1	BOD1L1	MRPL12	TAGAP	GJB1	AMY1C
CKS1B	C3orf67	ADI1	HMBS	ATP5F1E	ZNF584	SPATA5L1	AMY1B
PHC1	LOC730110	SP100	FCGR1B	MAP3K2	SLC38A11	CIB1	ANKRD20A3
EDF1	TLCD3B	NLE1	TIMP1	VPS4B	SMC3	GCG	ANKRD20A1
TADA2B	CDAN1	NPIPA5	HMGA1	CAMK1G	CNGA4	OR4F6	ANKRD20A2
RPL28	SLC39A9	RAB28	PPIAL4A	IPMK	CLIP4	SEC14L1	ANKRD20A4- ANKRD20A20P
USP17L14 P	VPS37A	OR10G7	WAPL	PPP2R2A	PGK2	SOCs4	ANKRD20A4
SLC33A1	GCNT2	LRRC43	MED6	MASP1	ZNF236	CNOT9	GAGE12H
DOCK3	SFR1	DHX36	LRRC37A2	CNTLN	ZNF83	OR2G2	GAGE12C
PPP1R7	LMLN	QTRT2	ABCD1	LYAR	PRRT2	CASP2	GAGE12E

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

USP17L22	COPS2	RPS27P8	USP17L3	INO80B	NEURL4	HPSE	GAGE12D
PCGF1	GARS1	RPS27	KRT12	GSE1	IFT57	MAF1	GAGE12G
BRD8	FRMD4A	CNOT6	CKAP5	TMEM232	TMEM159	FOXL1	GAGE12B
YPEL5	INTS12	PPP6R3	GOLGA6C	AHDC1	CASC4	KRT18	GAGE12F
CDC73	HMMR	PMAIP1	EPHB6	NPIP1B11	PRKX	ZHX1	
USP17L6P	RNF185	ATP6V1D	ZFAND6	MDM4	ARID3C	CKLF	
USP17L13	SLC35A1	ORC6	NOP14	RBM48	EFCAB2	WIZ	
RBM8A	ARNTL2	EXO1	STK32B	EP300	INPP5F	CAMSAP1	
COPS5	PA2G4	CERS3	C8orf89	RFC1	GSTZ1	TMEM63A	
BAHD1	POLE2	DPEP2NB	OTUD7B	LEFTY1	KYNU	CAMKV	
SUPT16H	PIKFYVE	MORF4L1	PRSS48	COL21A1	KIAA0930	SYNPO	
TRIM55	ATP6V1B2	ASB9	TPR	ATP1B3	INO80E	PSMA1	
HMGB1P5	CNOT3	SLX1B-SULT1A4	LRRC56	PODN	LAMTOR4	OR5K3	
NPIPA7	MAFA	SLX1A-SULT1A3	CABP7	SLC8B1	BICC1	GNAL	
NPIPA8	TSHR	RPA3	RIOK2	LRP2BP	MPC1	ZNF625-ZNF20	
PAFAH1B1	ZNF510	PAIP1	OSBPL8	APOA5	FASTKD2	ZNF20	
H6PD	PPP1R3C	OR6F1	RPL15P3	KCNJ14	TMEM147	PPIAL4G	
HEXIM1	SSRP1	MEN1	TNFRSF1A	C15orf48	KIF23	PPIAL4C	
TMED2	TNFRSF4	RPA1	CD3E	TRIM6	ZNF93	LIN28A	
CYP3A7-CYP3A51P	PSMD14	RPL36A	BMPER	FBXO9	ZNF37A	KLHDC4	
CYP3A7	DEFB106A	RPL36A-HNRNP2	PKD1P6-NPIPP1	COG3	CLPX	MAP4K4	
SEM1	DEFB106B	LRRC1	KCNN3	ACAP1	CHMP1B	GRTP1	
USP17L30	DNAJB12	SLC2A12	MAP1B	SATB2	SMG1	ADGB	
USP17L29	C9orf57	CLGN	ZNF557	CSGALNAC T1	RFPL3	TUBB2BP1	
USP17L26	OGFR	AURKC	CCL8	ZNF638	UMPS	STC1	
USP17L24	EIF4ENIF1	STMN1	SLC25A5	UNC50	NOL6	C17orf98	
USP17L25	ATP5PF	OXA1L	SULT1C2	H2AC13	ZNF341	WDR36	
USP17L5	DSC2	TINF2	PDCD10	H2AC14	EID3	ACAD10	

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

USP17L28	PRIM2	UHRF2	GLI3	SH3YL1	PPIAL4H	CD58
USP17L27	SNAP29	WTAP	FAM50A	BTLA	PHF10	COLEC10
THAP11	NPIPB1P	RBBP8	USP17L2	HLA-DRA	HTATIP2	PRKAG1
ATP5MF	HMGB1P6	TTBK2	ADH7	NCAPG2	FAM160A1	WDR45B
NTM	HMGB1P1	TSC2	DCP1A	ACKR3	ARL10	SEMA3A
USP17L15	HMGB1P10	PIK3R3	PTDSS2	PYM1	PPM1D	GALNT8
PTEN	TSR2	LOC1101174 98-PIK3R3	NUDT7	OR4D11	MAP7D2	FAIM2
PTENP1	WDR25	SNRNP25	RPF2	ANKHD1- EIF4EBP3	CCDC142	CD46
LOC64935 2	LIX1	OR10G4	HSPA9	ANKHD1	DNAH11	PDCD11
ZBTB10	NOP56	LAPTM4A	DTL	MED19	CD300LG	NDUFA2
NFS1	PUF60	SKIL	NBPF9	UTF1	TMBIM1	GPR85
TMM23	UFM1	CUL4B	BTBD8	ACOX2	B4GALT6	CDRT15L2
RPA2	RPS27AP16	UGT2B28	MBD5	LAMTOR2	FUBP3	CPN1
KIF18A	MICALL1	PSMD12	SFSWAP	SLCO1B3	MUC13	TMEM126A
MRFAP1	ZBTB38	ZC3H13	NBPF12	SLCO1B3- SLCO1B7	MPI	NACA2
DMAPI	PGA3	RAP2A	SCNN1A	H2AB1	OR5L1	UPK3A
MSMO1	PCNT	ZDHHC17	ITGB6	EP400	KCNN2	RPS10-NUDT3
TADA1	PIP5K1B	MAP1LC3C	NLRP6	SRSF3	ZNF629	ORC1
NPIPB7	RAD54L2	PPIP5K2	FMNL2	CYP4Z1	GIGYF1	ATP5PD
COPE	UBE2L3	PQBP1	BTBD9	FAM49B	SEMA3C	CCNI2
COMMD1	LYZ	TANGO6	CD300LD	TMEM198	GRM5	DCP1B
OR10J1	TTC3	L3MBTL2	TMEM68	TAF5	TFAP2A	RCSD1
NPIPB2	ATP6V1E2	NDUFA1	SRPK2	BFSP1	C1orf21	NCLN
USP17L18	GRID1	PEAK3	VAV3	TRPC5OS	TBCK	ERCC5
USP17L11	TERF1	C4orf47	ITSN2	LYN	OR51A4	HMGB2
USP17L20	ATP5F1B	POTEC	INTS10	PRKG2	ADAM17	ARGLU1
RBPJL	TATDN1	POTEB3	GPR89B	HIVEP3	GBGT1	CDCA8
SOX11	THUMPD3	MED30	GPR89A	RBM10	UFD1	PLOD2
CANT1	PODXL	GPALPP1	SEMA4G	TSR3	VPS13C	DEFB108B
USP17L17	LUC7L3	ING5	PUS10	MIB2	PHOX2B	SCD
USP17L9P	MRPL42	RPS10	CFAP57	ERBIN	KIF11	BASP1

10

20

30

40

50

【表 3 - 5】

CUL1	USO1	ACTRT3	HECTD1	TMEM101	PSME3IP1	OR10G8
CCN5	PRPF40A	AR	ENOSF1	SOX5	ACOT13	KDM5C
TAF6L	GLIPR1	FBXL5	HNRNPCL1	NBPF26	SEH1L	EFCAB9
TFAP2B	SNRNP40	ASGR2	OR10G2	NBPF1	OR8G5	NAA16
GINS1	HMGAI1P8	SFRP5	BTG3	LOC102724250	ITCH	COMMD3-BMI1
SLCO5A1	MPC2	HSD17B4	MIS18BP1	GGT7	MCTP1	OR10G9
ZBTB2	SMARCA2	ZNF143	SHISA7	DUT	ADA	ZNF138
COPS3	COL4A5	ABCA5	BTA1F1	SRGAP2	NAA25	GAGE10
PKDIP4-NPIPA8	IDO2	AQP9	ORMDL3	HELT	RAB7A	OR51A2
VPS16	ZNF224	OR14J1	TNFAIP1	PLA2G4B	SUGP1	TUBAP2
PHC1P1	LCAT	NCF1	PAQR6	TC1EX1D2	MED15	SPANXD
KNL1	COPS6	PLEKHH3	F11	CD22	MORC4	POTEJ
UBE2H	QRICH1	SERP1NB13	ROMO1	SRCAP	DDX49	OCM2
PLEKHG6	SLC25A28	CD44	CCNI	MXD1	DCP2	INTS7
SFMBT1	TOB2	XYLT1	PPP4C	PTGES	C19orf33	OR1L6
ELOB	LSS	NAMPT	PROM1	HNF1B	ESRP1	OR1L4
SPAG1	GPRIN3	KL	POLR1E	CATIP	PTPN14	LOC102723502
AP2S1	COX7A2	H3C15	RPS3	SERP1	RCOR2	GJA9-MYCBP
TERF2	ZC3H12A	H3C14	PLEKHA8	RHNO1	DDX53	TBC1D3B
ASXL2	OR10J5	TOP2A	PKDCC	AMPD1	STK3	PCYT2
HMGCS1	OR2M5	ATP8B2	RWDD4	ARRB2	IL18RAP	GAGE13
SUPT4H1	PRPF4	TLCD5	SLC35E1	PPIL1	ZNF726	TMED7
DNMT1	TRIM43	PDHX	ADGRL1	LZTS1	RPP30	NBPF14
VIRMA	TBCA	SYAP1	ZNF563	NSRP1	ZMIZ1	NPIPB3
HIPK3	SQLE	PDZK1	BIVM-ERCC5	STXBP3	TACR1	NPIPB5
ING1	ENY2	SOD1	DAP3	DCDC2B	WNT10B	OR2T29
ST3GAL3	C17orf100	TAOK2	P2RY2	AGK	AASDHPPT	JMJD7
PSG8	HDLBP	PORCN	CYB561D1	HTR3E	GIMAP8	POTED
BCR	UBA1	KRTAP10-6	TBCB	LILRB1	POTEI	ZNF492
SKP2	OR7E24	SCARF1	LOC102724957	UTP4	IFNA8	LOC102724334
MOV10L1	NPIPA2	SSTR5	ZNF644	MGAT4C	SERPINI2	H2BS1

10

20

30

40

50

【表 3 - 6】

LOC10042						
1094	NPIPA3	PLAC8L1	TMEM167A	ATP1A1	CLDN22	PMF1
USP17L19	ATP6V1C1	OCEL1	TMED4	IQCB1	ZNF865	TUBB2A
ASPSCR1	SMCO3	XBP1	OR9Q1	KLHL34	SERPINB4	MBD3L2B
HIC2	ATP6V1E1	FTH1	CBFA2T2	CMPK1	DNAI2	MBD3L2
THAP10	AARD	MUC12	DNAJC9	PTGES3L-	DNAJC19	ISY1
ZNF572	PLA2G4F	C20orf85	PSG3	LRRC34	C6orf52	ISY1-RAB43
SFPQ	GABARAP	METTL6	FASLG	PLBD2	PSMD4	LYZL2
MGA	TOM1L1	ZNF98	TNRC6A	TRAPPC11	LANCL3	TRIM6- TRIM34
RNF115	PINLYP	FO XK2	AVP	RBM18	FOXP1	SPDYE18
TRIP12	C6orf141	MYCBPAP	WDHD1	DDX19B	TIPRL	TUBA1B
SLC35A2	SIGLEC5	USP17L4	TDRD6	LSR	SCN4B	IFNA7
AFAP1	FBXW8	TNNI2	CCDC71L	CDC7	CROT	STX16- NPEPL1
UBA2	RPS27P3	PLA2G5	LINC01620	RAB25	DSCAM	LOC100288966
NPIPB15	RPS27P19	CUL2	UQCRFS1	MED14	CTCF	SPANXC
TSC1	VCX3B	MTRNR2L10	NEFL	SNAPC4	DPYSL2	INO80B-WBP1
CTSB	NPIPP1	BMP4	MRPL13	SART1	RNF148	TBC1D3K
L3MBTL3	CDR2	PHB2	SLC35B3	CACNB1	CTSD	OR2T5
WRB- SH3BGR	MAP3K20	CHADL	LDLRAD3	MYH7	TRA2A	CHMP3
C6orf47	MLEC	UBE2E3	VPS41	CD3D	MCTP2	KRTAP10-4
CACNA1G	TTC32	SNX11	GABRA3	ATP9A	LMTK2	GAGE1
RORA	POLD3	VPS33A	PLA2G7	SRSF10	FERMT1	ZHX1-C8orf76
ASB11	IFNA4	TACR3	CCDC88B	H2BC15	FAM209B	VCY
SLC15A1	USP17L21	PDCD7	COPG1	FAM169B	ZNF235	VCY1B
EED	USP17L12	NPIPB10P	H2AX	RCHY1	NDUFB7	SPRR2D
RFX5	USP17L1	ODR4	ARMCX5	RPL22L1	FAM83A	PPLAL4D
RAB33B	SGF29	NDUFA11	LARP7	PPAN- P2RY11	EWSR1	PPLAL4E
CENPW	LIN54	RPTN	FAM174C	WDR26	LRRC3B	PPLAL4F
GOLGA6D	HMG2	GET1	ACOT8	ACTR5	HIVEP1	TSNAX-DISC1
PIGQ	ATP5F1EP2	AMZ1	TSHB	WDTC1	IGSF11	SPATA31A3

10

20

30

40

50

【表 3 - 7】

CT47A2	PPA1	MED28	USP17L8	C8orf33	PELP1	SPDYE21P
CT47A1	MFAP3	MAPK8IP1	GPS1	GAST	WDR11	H4C14
CT47A3	ZNF100	COX6B1	MGST1	GRB14	MCM3AP	H4C15
CT47A8	TUBGCP4	SUFU	SLC12A2	CCDC39	BBX	FAM174B
CT47A7	SLC6A8	TMEM39A	KBTBD8	VPS18	CEP295	H2BC12
CT47A4	ZNF501	FOXD4L4	FSD1L	RASGRP3	IKZF2	CTAG1B
			PKD1P5- LOC10537675			
CT47A6	STS	UHRF1	2	LTF	SPACA9	CTAG1A
CT47A5	H3C11	NDUFS2	SNCA	LRRC27	TMEM127	KRT6B
CT47A12	SFT2D2	UBA3	MTRNR2L3	RNF13	UGT3A2	LRCH4
CT47A9	LRRC52	DRAP1	ALAS1	MOCOS	PCDH7	ANKRD20A8P
						TTMM23B- AGAP6
CT47A10	PSMB1	PRR20C	MGAT2	NDUFA6	SGPL1	
CT47A11	ELOVL7	PRR20E	SPDYE1	SCUBE3	NDOR1	PMF1-BGLAP
RTF1	RPSAP58	PRR20B	GABRP	RPL15	STATH	SPANXA2
L3MBTL4	NFX1	PRR20A	PSMC1	FOXD4L5	SMO	SPANXA1
					PDXDC2P- NPIPB14P	NBPF8
ATXN7L3	NPIPA9	PRR20D	OSBPL11	ZSWIM1		
	PKD1P3- NPIPA1	BCLAF3	CIAPIN1	TNFSF9	LINGO1	C8orf76
IER5						
POU2F2	ARAP1	GTSE1	PKNOX1	ANTKMT	DHX30	CKLF-CMTM1
BANF2	ELP1	F8A1	OR4K15	SIGLEC14	NEUROG1	GOLGA6L3
ARMCX2	CLEC4C	F8A3	CAPS	PCGF5	RAB5B	GOLGA6L10
INTS5	IMMP1L	F8A2	IRF2BP1	FGF1	TMPRSS2	SLX1A
CALR3	TRMT12	LIN52	RFC4	SPINK5	H2BC4	SLX1B
ZNF592	DEFB104B	RCCD1	MOB2	TMEM106C	OXER1	FOXD4L1
PARP14	DEFB104A	CTPS2	IL4R	TMEM222	C1GALT1C1	PABPC1L2A
FOLR1	DCUN1D4	ATP5F1D	H2BC7	GUCY2C	HECA	PABPC1L2B
						ARMCX5- GPRASP2
NPIPA1	COX7BP1	PKD1P1	DDX27	PGR	USP19	
RAD51C	BMS1	RPS27A	TECTA	VPS28	SHANK2	TMEFF1
DDAH1	KRT33B	PSMB2	PWP2	TMPRSS9	LGALS14	NBPF10
LIG1	TXNRD1	NOC4L	ARMCX1	ACTR1B	ZNF607	COMMD3
BCL11B	GLG1	LRP3	GPR62	FUT11	CEP41	ZNF177

10

20

30

40

【表 3 - 8】

LOC10192						TBC1D7-
7979	NPIPB6	EDA	ITIH2	SEC24B	ZNF773	LOC100130357
INCA1	NPIPB9	DDB1	GON4L	INTS8	NCOA5	LRRC37A

50

【表 4 - 1】

表 2 : C R I S P R ネガティブ ヒット (遺伝子記号)

遺伝子記号	遺伝子記号	遺伝子記号	遺伝子記号	遺伝子記号	遺伝子記号
TAPBP	RANBP2	TRAPPC9	PTCD1	AP1S2	SPANXB1
MBTD1	MUC5B	CYLC2	ERGIC2	MON1A	MAGED4
SYS1	TRAK1	ZNF404	TEX46	ATP6V1G1	MAGED4B
EEF2	PACC1	DAZ4	OR4F15	ANKDD1B	LOC392196
EIF4E	TOP1	DAZ1	RCL1	GGCX	LY75
SRP19	CRTC1	DAZ2	OR8J3	ZNF132	STON1
SYS1- DBNDD2	BIN2	DAZ3	RPA4	SNX10	GALNT4
DDX39A	CSMD2	PSMD7	SEC13	ATP9B	POC1B-GALNT4
EIF3E	CYP4F22	VPS25	TCOF1	SMARCA4	C8orf76
YY1	TBC1D3H	UFSP2	RALA	METTL15	TRIM59-IFT80
SRP72	TBC1D3G	DDX21	EHBP1L1	EPS8	TNFAIP8L2- SCNM1
SRPRA	MARCHF11	SDCCAG8	RGS4	TMEM215	SCNM1
KANSL1	NUFIP2	GTF2B	EXOSC6	SPECC1L- ADORA2A	ISY1-RAB43
ZNF407	HIGD1C	PPP1R3G	ETF1	MEPE	ISY1
MROH7- TTC4	DYRK1A	NTSR2	OPHN1	CCIN	PGA3
PPP6C	FGFR3	ELF4	DNAAF5	GPR37	PGA5
CEBPE	IFI44	CHAMP1	RPL31	GNAZ	SPANXA1
TXNDC12	CDHR3	RRAGD	SOST	SCRG1	SPANXA2
RAB10	BRF1	PIP4K2C	ZNF479	TESMIN	CGB7
SRP68	MYH4	INVS	SDR16C5	EMX2	NT5C1B-RDH14
IRF1	ZNF705E	SSBP4	SLC30A9	SIAE	USP17L2
SERINC5	CHURC1-FNTB	E2F3	DMAC1	ARHGDIG	PGA4
PDILT	GPR37L1	TRMT10A	DHX57	CYP1B1	OPN1MW2
BAP1	NLRP8	KRTAP10-12	ZBTB7A	HSPB2	OPN1MW3

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

SMIM12	OXCT1	AP4M1	PPIAL4E	CEP55	OPN1MW
KRT75	KCNE2	CLEC4F	PPIAL4F	PTK2B	USP17L1
ZC3H11A	LOC105372791	PRKAR2A	SAPCD1	BAG4	USP17L21
INHBE	PRPF38B	TAF2	GPR137	SCGN	USP17L12
KCNK1	SNRPC	FBXO47	CXorf56	RAB37	ARMCX5- GPRASP2
ICK	BAAT	H4C2	PHF3	GUK1	USP17L4
KTI12	CD36	NOS1AP	ELF2	SNAP23	LY75-CD302
ALMS1	KCTD4	PAXX	TPMT	NMNAT1	USP17L18
EIF3I	SUCNR1	TSNARE1	ATG5	IRAK1	USP17L11
FAM76B	MCOLN3	ECD	TSHZ3	B9D2	USP17L17
ARMH3	PRSS23	FAM187B	RNF113B	ANGPTL7	CBWD2
IFI30	TMEM202	SMARCB1	PCDHGB5	CDC42SE1	JMJD7- PLA2G4B
RPTOR	SLC41A3	CNOT6	ZBED5	PTPRU	USP17L19
SCAP	GOSR1	ZNF160	CCDC42	RALB	USP17L13
PITPNB	VRK2	NOP58	TBC1D3K	SIKE1	VCX3B
FAM89A	CLRN1	SEMA5A	EIF4H	ZNF345	FOXD4L5
ZUP1	ABRAXAS1	FRAT1	GRK6	TUBB6	STON1- GTF2A1L
EBNA1BP2	UBE2J2	ELOVL2	GPR34	GPS2	USP17L8
CCDC144A	TVP23C	ENTPD3	OR4X2	FIP1L1	USP17L3
RGPD6	C15orf65	WNK1	OR51A2	IQGAP1	VCX2
RGPD5	EIF3D	LRRC25	FAM207A	ADO	VCX3A
HLA-DOA	CD46	H1-1	POGZ	SHROOM1	USP17L14P
ABALON	ADGRG1	CFAP97D1	SAXO2	SLC17A5	VCX
BCL2L1	CCDC167	PDGFRB	TMEM67	WSB1	USP17L10
UBE2N	DBP	KIAA1328	NLRP14	SDHC	
CFAP69	RBM25	ZCRB1	RBMX	GLRX2	
ZNF251	C9orf24	KIF1B	COQ5	SPNS2	
NUP155	CT45A10	NCAPD3	SMIM10	PIWIL3	
ADSL	KDM4A	ST3GAL1	CFAP161	SCAPER	
OTUD6A	CCNY	PALM	CYBA	RAB11A	
RPL37	SSX7	TTN	HOXB5	NUTF2	
ITGB7	GPR152	TOMM20	IFNW1	CSNK2B	

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

NUDC	ISG15	SMIM10L1	ZCWPW1	KCNJ5
MBTPS2	KIR2DL1	OTUD4	DLGAP1	TMEM233
BUD31	MAP1S	CMPK2	TEKT3	ADAM9
ITPRIPL2	NCKAP1L	ZNF770	VPS4B	CARHSP1
SPAG7	FANCC	MMP3	CD300LB	RNF146
CDK9	TSPAN19	OR2S2	TNFSF4	HMGCLL1
CT45A7	NUP160	WDR59	GABRB3	DDX47
CT45A5	HNRNPH1	DDX3X	SP1	EBAG9
CT45A6	TMEM273	CCR5	ARPC4	AQP1
TTC4	CCT2	NRM	PNLDC1	VMP1
EIF4G2	GMPPB	PDPK2P	FNDCA	TSNAX
FZR1	OTOP3	SHTN1	RYS2	GGPS1
NDUFA7	CALCA	MLF1	RASA4B	ZNF516
NUP54	MKRN3	ADGRG4	RASA4	PSMB9
CYB5R2	SEC23A	RWDD1	RGL3	DNAJC11
RPL13	SYNCRIP	SATB1	PRRC2C	CATSPERD
PIK3R5	SOWAHD	GLP1R	CREBZF	ZNF79
SAP30BP	EGLN3	SPATA31E1	CHGB	SMG5
KBTBD2	ANKLE2	TM7SF2	C1orf195	OCIAD2
SAYS1	ZNF221	BMT2	SYT15	ZNF195
NUDT9	KNSTRN	OR9G4	SLC4A8	TSPAN6
RTKN2	UBLCPI	PEX11G	KDM3A	ERC1
POLR3B	COX19	LRRC63	METTL23	SLC35G2
LRRC14	HAUS3	C8orf37	PSMD1	GNAL
KDM1A	NPIPBI	TECRL	ANKDD1A	OR2K2
WFDC6	PDRGI	PTH2	GEMIN8	NCL
TGFBRAP1	MSL3	ULK4	SPINK13	ABCA4
CALR	SLAIN1	FOXHI	MXRA7	CCDC27
ADAT1	GAL	TSACC	LOC100506055	GIP
GNRH2	TEDDM1	TVP23C-CDRT4	GRM3	KCTD1
HARS1	ADAMTS18	NLGN3	CASP4	FRS3
ICE2	CCDC88B	SELENOW	ATP2A3	ELAC1
SMPX	COL6A6	CDC37L1	ODF3L1	GPER1

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

C5orf24	EIF3C	VAR5	IRF2	NUP37
NKX1-2	EIF3CL	KBTBD12	SULT6B1	LBX1
PFN1	EZR	PGLYRP2	LIG3	CYB561A3
BCL2	DOHH	LGR5	PANK1	GFPT1
PCDHB13	NRG1	OR8B4	LRRC47	NEUROD1
MTOR	FKBP3	ZNF813	TBCB	SMCO2
CRYL1	PTH1R	ZC3H12C	FANCG	THBD
TNRC6B	TMEM59L	ADH1C	ADAM12	LAMA1
MBTPS1	RPE65	RHOT1	PI4KB	SELENOM
CWF19L1	CYP4F11	PTPRH	AMPD3	PRND
ALG1L	ZDHHC5	NME1	EXOSC8	IQCJ
MOBP	MBNL3	AP1M1	KCTD13	ASTE1
WSB2	MXRA5	ZDHHC9	SERPINB4	DSN1
EIF5A	DST	PRICKLE1	RSF1	TVP23B
RNGTT	MTRNR2L6	CISD1	APOBEC2	CRYZL1
PSMG2	TRIM34	RNF145	OR52N5	CEP128
IL7R	ASAP2	NISCH	PMM1	ZNF728
CIC	ASMTL	ENKUR	FABP2	FBXO25
OGT	MEIS2	KIAA1656	SLC9C2	XXYL1
EXOSC10	TMEM8B	DYNC1LI2	IL10RB	MT3
BACH2	PPFIA1	COG4	CYP4Z1	NFIX
BDP1	CLSTN2	AP2A2	HLX	TMEM211
DNMT1	H4C3	BTBD7	ZFYVE26	LPA
MICALL2	ZNF814	NYAP1	NQO2	RFXAP
PF4V1	TRIM48	EXOSC4	PTCH2	SLC34A1
LMAN2L	ERI2	ANKRD28	SLFN12L	USP10
SYN2	ATOH1	NAXD	SPZ1	GJA5
DIDO1	ZNF567	KRT15	PLCD3	C11orf58
PYCARD- AS1	MSL2	CRLF2	NEK6	CTSF
BHLHE22	NUDCD3	CARNS1	INA	CNNM2
ZSWIM3	ELOVL1	OR4K5	FAM222B	ICMT
RP1L1	HOOK3	EHD1	CLDN19	U2AF1
UBXN4	ARFRP1	ZNF517	ADRA2C	U2AF1L5
CYP2U1	NUS1	CLDN24	CDC26	LRRC8B

10

20

30

40

50

【表 4 - 5】

OLFML2B	GRXCR1	NACA	CBWD6	FCER2
TBC1D3P2	VPS8	PROM1	TMEM53	H2BC3
LSM2	TEK	ANKLE1	BLOC1S3	RDX
NUP42	CGB2	POLR3H	ZNF213	TDGF1
TLE2	CGB3	C1orf43	PATL1	PRPF3
MSMB	CGB8	NUP205	SLC2A13	DNHD1
SEZ6L	CGB1	TIMM44	ZNF493	ALB
CDC16	CGB5	TMEM31	M6PR	ACTL6A
RHEB	LINC02210-CRHR1	POLG2	ETV3	IKZF3
EIF4G1	S100A1	SMG9	DAPK2	SYT13
PDPK1	OR51A7	EAF2	SLC22A13	PLEKHA6
TMEM186	STK19	RELA	CSNK1A1	ANKRD10
DCAF7	TPT1	FRA10AC1	VPS13D	IL1F10
NPW	PDE6D	CXorf49	MAPKAPK5	TTF2
HAAO	SLC7A3	CXorf49B	PIK3AP1	ADCY4
TNFSF11	EIF3M	LRIF1	C9orf129	C7orf57
HLA-DPA1	KCTD12	ABRACL	MTMR2	VSTM5
B2M	TAF15	MPRIIP	EHBP1	OR2A12
APOL6	CAPN3	ETHE1	CD109	SLC35C1
MAGEE1	SLC5A8	CAPN2	SH3D21	TTC38
HABP2	ANAPC15	ARNT	PRMT7	DOCK2
DMAC2	YBX1	HAS2	OAS3	HARBI1
AACS	SLC9A8	HSD3B2	S100B	EIF3G
CRIP3	KRT26	SLCO2A1	SMC4	PTPRD
TCF24	ASAH2	EFNA1	SBK1	DCAF13
LRAT	ALS2CL	CSE1L	KLRC1	DIPK1A
TBC1D3J	ASCL1	HTR3C	MMEL1	PCDHB2
ZNF619	GPR107	ZNF806	P3H2	COL4A1
NTHL1	NSFL1C	TOMM34	BRD2	GPR85
TMEM207	CBR1	ANKMY1	EPB41L1	CHGA
ACSM1	NRG2	MANEA	ACTRT1	ADAM11
DBR1	SLC35B2	KDSR	EMC8	TRIM33
SPANXD	MARCKSL1	DARS1	L1CAM	UBALD2
PPP1CB	KDM3B	RPS21	AADACL3	PCED1A

10

20

30

40

50

【表 4 - 6】

RAB11FIP2	LRP5L	TBC1D3	SCAI	CHORDC1
SCRN1	ZNF792	TBC1D3C	GPN1	NANP
ZNF736	STAMBPL1	TBC1D3E	TTC5	METTTL16
CWC22	SEMA3E	GSG1L	GLRB	YEATS2
CNTROB	EIF2S2	FLJ44635	BRF2	ZNF623
ABCB4	NXPH3	ADGRE1	COL8A1	RNF222
TCF3	KLRD1	RCN1	BRDT	DOCK1
IAPP	PLD5	KIAA0100	PHACTR1	FBXW5
ERG28	MRPS15	YIPF6	NKPD1	FCN3
ABCC6	TBC1D3F	XPA	WBP11	KLHDC7B
SRP54	ZKSCAN7	ABCC8	ADAM32	NUP85
EIF3F	RGS18	TMSB10	ZPR1	ARPC2
EPHX1	CRISP2	MPPED2	USP48	KCTD20
AFP	WIPI2	FFAR4	HOXC5	OR2T34
EIF3H	H3C7	RAPGEFL1	DUSP8	TLCD4-RWDD3
GPC5	GZF1	BARHL2	GPRC5A	MOB4
CLEC4A	BRD4	MTRNR2L7	ZNF540	ATP5MF-PTCD1
CCDC36	WDR63	MTMR6	MYH7	CT47A5
KCNIP2	ADRB1	CRHR1	CXorf58	CT47A9
EXOC3	NAB1	MMP27	AMZ2	CT47A6
REN	REEP2	TRIM29	GOLM1	CT47A1
SLC25A51P3	CLU	PCDHA9	COL10A1	CT47A2
SLC25A51P2	VAMP4	PPIAL4A	S100A16	CT47A12
SLC25A51P4	SLC35E4	C1orf56	SERTM1	CT47A3
COPG2	VWA8	LMNA	SGCD	CT47A11
CCDC157	MRM2	CCDC74A	TLE3	CT47A4
EXOC5	MRGPRD	FBRSL1	PDP2	CT47A10
ATXN2L	RPN1	DGKB	RAB27B	CT47A7
PSORS1C2	SGTB	CDKL5	CYFIP1	CT47A8
PYCARD	TBC1D3I	MYLK	S1PR2	RAB4B-EGLN2
CT45A3	EFNA4	RBAK	SH3BP5	MIA-RAB4B
PRPF4B	ABAT	RPL38	MPZL2	H2AC21
ABCF1	TTYH3	ZBTB14	GNG11	RFPL4A
PLSCR2	UBFD1	TMEM43	ALDH18A1	RFPL4AL1
ALYREF	NMB	ADAMTSL3	RAE1	TCEAL6

10

20

30

40

50

【表 4 - 7】

STRN4	FBXL13	CDKN1B	PLPBP	NME1-NME2
CT47B1	H3C12	ALDH8A1	ENDOD1	CMC2
IDH3G	CPNE2	DALRD3	APEX2	TLCD4
TMEM164	PRRC1	DNTTIP2	EBF2	OR10H2
ACTR3	ATOX1	GCC1	C11orf45	RPL17-C18orf32
PHOSPHO2	ELOVL6	MIA2	PTMA	ZNF417
XPR1	TFEB	RABIF	FOXA1	OR2T3
REPS1	PRKRA	CARD17	SNAPC2	PPIA
SPANXC	SLC25A51	PRKAG2	RPS10-NUDT3	PLGLB2
ACVR2A	C11orf96	KRTAP4-11	NFKB2	PLGLB1
BRK1	SHCBP1	RIPOR1	ASB16	C3orf52
GCHFR	DISP1	OR5B17	ANKRD53	SSX3
TMEM41B	SLC52A1	CCDC122	ZHX3	BOLA2-SMG1P6
TEX35	FICD	KIAA1671	MARCKS	BOLA2
SLC39A7	HLF	ZNF812P	HIKESHI	CEP68
CT45A9	CDK10	ZNF614	ZNF117	ZNF726
CT45A8	ASPM	CSNK2A3	ERV3-1-ZNF117	ALG11
CT45A2	CARD6	FBLN2	DEPDC1B	ESS2
MYO5C	MTG2	SLC1A6	C6orf15	NUDT3
CAP1	TP53BP1	IL31	MKI67	FNTB
RGPD8	SYVN1	MYO1E	ATP2B2	OR11H1
CLCC1	RAB11FIP1	TMEM125	TMEM120A	OR11H12
TBC1D3B	MROH7	MBP	SEPTIN3	TRIM6-TRIM34
CRYGA	INTS3	MCOLN1	DHX15	ITFG2
PSMB4	RAB4B	LAG3	TBX6	PPIAL4H
TNFRSF10D	SLC6A9	IL23A	HOXA2	RABL2B
MMACHC	C1QBP	NKAP	TMEM71	SPACA5B
UCP3	MMADHC	GRAMD1A	DLX6	SPACA5
SSR3	HAND1	WDR33	CHST7	SERF2-C15ORF63
KCNA2	CYGB	ADAM33	KRTAP20-2	CBWD5
C19orf48	PPIAL4C	FAM151B	CARD10	CBWD3
FXR1	PPIAL4G	UFM1	WDR72	MZT2A
FEM1C	NOD2	HSFY2	DOCK11	GOLGA6L6

10

20

30

40

50

【表 4 - 8】

IQCF3	LIMS2	HSFY1	SYNPR	HBA1
PBK	TMCO4	S100A9	TTC37	HBA2
GH2	PIK3CA	HPS4	PJVK	ZNF664-RFLNA
OR8D2	QARS1	AKNAD1	TOMM40	RFLNA
CT45A1	ZNF776	RAB11B	RASSF5	FAM120A
IFNA1	NOP53	RPL7	SNX27	OBP2A
IFNA13	ARPIN-AP3S2	CPNE9	GPR17	VCY1B
COQ10B	OR7D2	CLSTN3	TMEM245	VCY
TKFC	CDK11B	SMPD2	GALR2	MSH5-SAPCD1
ARPIN	CD14	SRM	CNOT10	RABL2A
SAP25	IRF2BPL	CCDC160	ICAM5	PLA2G4B
NUP214	GPR4	CCDC88C	DHFR	SAA2-SAA4
POLR1C	FCRL3	SENP2	ARF6	NT5C1B
KLHL1	IRGM	SLC17A8	NRXN2	SEM1
THEMIS	AIRE	B3GALNT1	CYB5R4	TSNAX-DISC1
GTF3C1	AQP2	KAT8	CLIC5	GPRASP2
OR2AG1	ZNF266	CDH19	DCBLD1	MAP1LC3B
C17orf107	A4GALT	STXBP5	USP28	RPL17
TBC1D3L	NUP88	CNR1	ABHD3	OBP2B
TBC1D3D	OTOF	ZFP82	MECOM	ARPC4-TTL3
NUB1	KIAA1614	RCN3	TEX13B	TRIM49D2
SELENOH	ENPP1	NATD1	RNF40	TRIM49D1
NUP133	ADAMTS3	RBPMS	DHX8	PPIAL4D

10

20

30

【表 5 - 1】

表 3 : O R F ポジティブスクリーニングヒット

遺伝子記号	遺伝子記号	遺伝子記号	遺伝子記号	遺伝子記号	遺伝子記号
IFNG	KCNJ10	TBPL1	GPRIN3	GYG2	NO_MATCH_146
IFNA21	TMEM98	CRYBB1	NO_MATCH_127	GNGT2	FAM74A1
FCGR2A	CBR3	ARL13B	BET1	CCNC	HIST1H3B
ATP6V0A1	ZDHHC13	TIMMDC1	POLR2B	VPS36	TFDP3
SPATA25	MYL3	MASTL	RTP2	PCDHAC2	FBXO42
CDX2	CDKL2	LINC00588	LRR1	XLOC_l2_004840	ZBBX
HOXB13	Trim72	MRPS17	PQLC1	MTMR12	C1orf87
IFNGR1	SLC39A6	NUDT21	EIF4A2	OR6B1	RUFY4

40

50

【表 5 - 2】

FCGR2B	GGN	ZNF155	ADCK2	HPS5	IST1
HLA-B	VPS33A	MRFAP1L1	RBP4	RLF	RFFL
SOX15	XIAP	EBNA1BP2	BPGM	ATP6V0C	ARF1
IRF2	TIMM21	ENDOD1	PRL	LXN	CCL26
LHX4	PCDHGA6	JUN	USB1	WASF2	ZBTB14
TLR7	BCKDHA	ING5	MRGPRX3	HIST2H4A	CSK
POU5F1	C10orf82	UBOX5	SCPEP1	XLOC_L2_005151	IQSEC1
OVOL2	ACP5	FMOD	DIABLO	NO_MATCH_139	ATP5G3
FOS	KLHL26	NAB2	DKKL1	IMMP1L	PTPRCAP
IFNA8	EFEMP1	NMI	RETN	MRPL46	ABCC11
IFNA6	TNPO2	GAD1	ASS1	FAM120A	NDUFV2
TIRAP	CREB3	PPIL4	EDF1	SPANXN3	TOR1A
USO1	TCEAL9	TSPEAR-AS2	NUP62	SIRT1	HBG2
FOSL1	LOC101060386	ZNF501	FIBIN	RNF183	STRADB
BMS1	VSIR	SPO11	TTC29	EMB	BTNL8
IFNA5	ATRNL1	AGO2	CT83	AURKC	FAR2
ANO4	PDIA4	LC TL	SGPP2	FLJ33534	PTPN9
DLX2	URGCP	PLEKHA8	ADA	RARB	CAMK4
HOXA6	SLC12A7	DTD1	MC1R	CAPZB	PIP5K1A
RUNX1	DOK3	CACNB1	RAB41	PIN1	RPL31
IFNB1	KRTAP5-6	KIAA0141	HIST1H2AJ	HIST1H2BD	CD302
EDA2R	SNX16	LRRC3B	PAPOLB	GCNT3	C11orf57
SOX2	CSF1	RPS6KC1	YIPF4	CCL19	TPK1
IFNA10	SLC17A8	NO_MATCH_118	PPP4R3A	MPZL1	ECHS1
GATA3	PNO1	SLC28A1	SLC35A1	RAB9B	RNF25
DMRT1	PCDHB16	KHDRBS2	UPF3A	ABTB1	NFKBID
IFNA2	USP6NL	SFT2D2	GJB3	MRPL35	ASB2
MKX	PITRM1	TREML1	RNF19A	MAP4K5	RASSF1
NDN	ACOT11	KCTD7	FBXL16	SULF1	NO_MATCH_97
HLA-C	HCLS1	ZBTB9	SPAG7	C19orf44	ENSA
NR5A2	FAM124A	ART4	HMBX1	CFAP97	HIST1H3H
DNAJC5	CCDC112	HLA-DQB2	OR5L1	RPS6KA1	PCDHGC3
FOXA3	CNPPD1	IGFLR1	GOSR1	RIOK1	RHOQ
ZC3H10	OR51E2	ZKSCAN3	PIGF	Rnf150	CNIH2
TFEB	DRAM2	TMEM14C	TSPYL5	HDAC6	NDUFS5

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

ECD	PSRC1	EIF4E2	HLA-DQA1	PLPP3	SEC22B
ZFP36L1	MSL1	ERLIN2	PRKCD	CSTA	GAN
OOSP2	USH1C	TANGO2	RNF2	PHF13	ABHD17B
ZNF317	NUP43	ATP6V0A4	CAVIN4	FMO1	GPR151
CXorf67	IL17RE	UQCC3	APOBEC4	SMPDL3A	HLA-DMB
TSPY10	HOOK1	TSPAN18	BHLHA15	TRAPPC12	PDZD9
DLX1	JPH4	ABRAXAS1	PHKG1	PLK2	HAVCR2
KLF4	KIAA0930	TSEN54	OR2F2	AGBL5	DHRS1
IFNA17	CRYGS	PGRMC1	ACTR3	RABL6	PAGE3
MTR	EVL	FBLN7	6-Sep	NGB	EGFLAM
DLX5	FAM172A	ESAM	CCDC90B	TRIM28	GLE1
PIM1	FAM228A	EMC2	CTRB1	MBIP	NO_MATCH_100
YY1	RXFP2	LPGAT1	PPAN	EIF4E	ELMO3
HOXC8	RHBDF1	ACTR8	GEMIN8	MRPS18B	C7orf13
HOXB6	ALDH1A2	CKB	AMMECR1	SOST	MPST
LRPPRC	SYNGR1	SEMA6C	DUOXA1	GATC	LILRA3
SOX14	HILPDA	PML	GNG10	C2orf15	CELA2A
EGR2	DNM1	ACBD4	NECAB3	NPC2	GLMP
MAGEA10	LUC7L	ABCE1	HBEGF	LIPE	BGN
DLX4	AQP2	TBK1	LOC642249	BDH2	AXIN2
MCM6	PPP1R13B	GTSF1	FUT10	TNFAIP2	DCK
CEBPE	VIM	TRAF1	FNIP1	ILF2	PIP4K2C
DLX6	PIK3CB	ADGRF2	OR5H6	BTBD9	GNPTG
MAGEA9	NUDT3	ESRRA	VMO1	HLA-DRB1	FAM3A
IFNW1	FZD2	CSH2	LEFTY1	UBXN4	MEIOB
H2AFB3	SYT16	DEFB4A	NXPH3	CDSN	PPP6C
DLX3	HLA-DRB3	NTNG1	NYX	C1QBP	LETMD1
UGCG	LMLN	ATF3	SCARB2	GOLGA8G	SCGB1A1
BSND	ZNF705D	ZBTB12	GINM1	KIAA0040	RRM2
IFNL2	SLC39A12	NARS2	POMK	MSRB2	NCOA7
KATNAL1	ADH1C	NSG1	SSMEM1	KLRC2	ACTR3B
RUNX3	STX1B	PITHD1	TIMM29	HIST1H4F	LGALS4
IPO5	MON1B	IL36RN	SC5D	SNRPA1	MGAT4C
FCGR1A	SUCLG1	PPP2R3B	SAT2	OR6T1	CLDND1
NKX2-5	EPHB3	TRMT44	C10orf107	SNX27	STAMBP

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

GATA2	LRRC37B	KCNIP3	TMEM67	PSPC1	SERHL2
SLFN12	ZMYM3	POMP	SYTL5	MYEOV	MMGT1
FGFR3	KSR2	H3F3B	ADCY4	NO_MATCH_202	TCOF1
KAT2A	DENND5A	GOLM1	SLC25A35	FAM213A	RNF152
PRDM14	HERC6	PEX7	A4GNT	DNAI2	MPP1
H2BFWT	GDPD5	STN1	GATD1	GTF2H5	Nrbp2
FOSL2	FCHO2	PEX16	CDCA7L	FGL2	PSME1
NTRK2	GPRC6A	G6PC3	TECR	GLB1L3	WNT1
SRSF8	ZNF532	TSNARE1	PRPF4B	TMED9	PDXK
HLA-A	YES1	COG2	AIDA	CLDN18	MSH4
VPS26A	DPP3	LSM2	HAX1	RBM11	CACNB4
CD40	GAA	TNFSF14	MFSD13A	GPR155	CAPN8
MAP3K14	DUS2	JAK3	LINC00346	PLIN3	ARPC1B
NR5A1	CNPY2	1-Mar	ARL4C	GDF10	RCE1
ROS1	SFPQ	SIGLEC7	LINC00173	G3BP1	TDRD9
HPN	CSIF2T	NCAPH2	FIBCD1	OPTC	SEMA4B
EMILIN2	FBXL19	PRR7	NOXRED1	SCYL2	CRIP2
PHF23	ZDHHC17	SNRNP48	CASP5	IL17RC	ANXA9
RBM47	GRAMD1C	RAB40C	CCDC172	PARP6	CRBN
ZFYVE1	ELP2	SAAL1	C4orf33	NDUFB6	TADA3
PITX1	IL1RL2	AGPAT3	TBCK	LYPD6	PHF21B
WDR91	PPM1E	TH	BCL2L10	GRM8	EPB41L4A-AS2
FAM43A	GPBP1	RHOBTB2	THSD4	TXNRD3NB	HDGFL2
CPEB2	TEKT2	C8orf37	TUBG1	EP400	OR2H1
TBC1D10B	CCDC33	PIPOX	AKR1C4	TPP2	TXNDC9
POLD1	SETDB2	ESR1	RBM15B	OBP2A	NOP53
PITX2	FOXN3	MUSK	TCTEX1D1	TP53	ZNF277
PRR15	CLIC4	CT45A3	SEC61A1	NBPF19	ZNF839
MARCKSL1	SMAD5	DNM1L	RPP25	HTR3E	PLD3
AAK1	DNAJA4	TPPP2	U2AF1L4	CSNK2A2	FUCA1
NR2F6	EHD4	ETNK2	TCTN2	GPC3	TMD4
RBAK	LIPH	PPY	SP4	GNA14	EEF1AKMT2
TBX22	ZFP2	GFAP	ABHD12B	FAHD2B	KLB
HNH4A	INTS6	QPCTL	SLC25A2	HIST2H2AA3	NAGK
SATB2	MRPL19	NO_MATCH_84	CUEDC2	DPH3	ALDOC

10

20

30

40

50

【表 5 - 5】

PPP4C	ADORA2A	CALML3	GPX2	FBP1	DDX19B
TMCC1	TNFRSF10D	CST4	TGFB2	PNPLA1	XPNPEP1
CDX4	NUDT4	ANXA4	TNNI2	BRI3	SPATA2
OR2S2	NPIP9	ERO1B	BTRC	HSD3B2	LOC641367
SPATA31E1	RFXANK	COL21A1	NO_MATCH_152	KRTCAP3	MATN4
IDE	SLC25A16	DBNDD1	PRKRA	PCP2	IRAK4
SNAI1	ABCA9	ANKDD1A	PKK2	C10orf35	ITPKA
BCL6	ASPN	SMTN	ZNF529	GPSM3	ZSCAN21
SEC23B	ANXA7	GH1	FHOD1	NO_MATCH_74	FKBP8
IFNA4	EBAG9	PTP4A1	DNPEP	AVPI1	CLK1
SYTL4	SLC22A4	GJA3	TGFBAP1	BAD	SYNE3
RCBTB2	SCLY	FAM167B	SLC43A3	PNOC	RELA
FNDC7	GPR107	CALM1	SERPINB10	M1AP	TMEM204
IFNA13	IGF2BP2	C16orf70	NO_MATCH_251	PRMT6	TEX101
CACFD1	SENP2	DCAF4	ZNF486	RPL32	ZNF8
IRS1	C6orf222	CLIC5	C14orf180	CCDC117	PSMB3
KLF2	MYNN	MGAT2	CLDN17	ANKRD33	AVPR2
AFG1L	WIF1	NDUFB2	RNF5	COLQ	FGD4
OSBPL8	BBOX1	CT47A11	RPL36	RNF212	MUCL1
PIM2	ARHGEF26	REN	MPPE1	PARVG	NEIL1
SOX5	WT1	DYNC1H1	EFCAB2	HMGB4	LCMT2
ONECUT1	TP73	ZNF232	LAX1	YIPF6	NBPF9
MSX2	MKRN3	IRF9	PKD1L2	ADAP1	MMS19
SETBP1	EID1	TNIP1	ACAA1	MOC3	CD79A
CALHM1	KIT	SLC5A10	CLDN19	SEMA4G	BLVRB
TOX	TMEM120A	SUV39H1	MSL3	GRTP1	PLEKHF2
ASAP2	PALM2	KIAA1147	KLK3	RRP8	CDRT4
GDF9	FBXO2	EIF4H	BZW2	PHC2	FHIT
ARHGEF2	PTPN20	SOWAHB	DPP10	SMIM14	CHRNA3
RBFOX1	SEMA4C	DCT	TRIB2	HRH1	PCK2
SRRT	EML3	PPP1R7	IGSF11	FAM76A	ARL6IP5
MITD1	FAM104A	FYTDD1	ZNF784	C2orf83	GALNT9
MCM3	CPEB4	OAZ3	PRC1	RCCD1	ATF7IP
EGR1	PDZK1	KMT5B	PIN4	CBSL	NR1I2
ZCCHC24	NDUFA5	GGA1	WNK1	GRPEL2	ARL10

10

20

30

40

50

【表 5 - 6】

PRKACA	PYCR1	ATP10D	PCMTD1	C1orf198	TMEM55A
BHLHB9	NME5	MAST2	YIF1A	C1orf146	CALML5
TSC2	TMTC4	CERS4	PBX3	CFHR4	PDK3
PRR15L	SHARPIN	CD48	HSD17B3	LILRB4	GTF2A1
ESRRG	ZNF300	MUC15	COL9A3	C1QL2	HNRNPA2B1
TOB1	DDAH1	CAMK1G	MOB1B	SQSTM1	DYNC1IL2
PIM3	HIST1H2BF	IFT46	GRAP2	UCN3	NXPH2
KLHL2	ENTPD2	Grid1	SSH3	CTNS	LOC653513
RNF40	PTGIS	BRSK1	ZDHH4	RGL3	SLC35E2
ZNF140	GOLGA2P11	PLSCR5	CFL1	FXYD2	NO_MATCH_61
FBXO3	MRPS5	STK32B	GALR2	TAS2R13	NEK7
RBM45	HSD17B1	C10orf71	NEMP1	VAPB	SCGB2A1
ZNF345	PDE10A	EIF3G	CAMK1	MRPS18C	HIST3H3
ZBTB21	DNHD1	RLN2	PTMA	RAMP3	PCP4L1
TSPY1	Sf3b3	SPIN2A	XLOC_I2_007111	CHIC1	SNAPC5
SLC2A4	UGT1A6	UCHL1	LOC102724813	LACTB	LHFPL3
MCTP1	TMSB4Y	PRDX5	TMEM189	PRSS45	TK1
BCCIP	NO_MATCH_1	ZNF566	SCAMP1	PDP1	ZBTB22
LMX1B	NO_MATCH_36	VCX2	PYM1	TPM3	URI1
ZBTB20	CX3CR1	THAP11	EFHD1	RDH13	C10orf88
XLOC_I2_015578	VPS39	MS4A4A	UPB1	DNASE2	APP
FOXM1	EXOC3L4	PDILT	PDPN	ZCCHC10	ANGPTL4
SEC23IP	RORA	CXorf21	SMARCD2	DEPDC5	PIK3R2
GCM2	PAK5	ACTA2	PARM1	ENOPH1	PAQR5
ZNF224	GNB4	EPB42	FLCN	NO_MATCH_238	MAGOH
CD38	SPRY4	HSD17B10	CD99	ELF4	VSTM4
EMILIN3	HIST1H2AG	CNIH1	FABP6	EPHX3	ATP5J
USP29	TRH	PARP16	ITGA4	MAGEC3	SNF8
PWWP2B	CCND1	RAPGEF5	RAB11FIP2	ADAD1	NO_MATCH_112
HEY2	CABP4	KPNA5	EFCC1	KRT18P55	NXNL1
FAM46A	PIAS3	TMEM26	SAMSN1	TRNAU1AP	UTP4
ZFAND3	TRPC4	LDLRAP1	TRIT1	KDELC2	ATP5I
HNF4G	DNAJC1	PSME4	MMP13	PIGO	PDGFD
GATA4	ISY1	RNPS1	C2orf54	RNF130	CNOT7
NFE2L2	GIMAP4	ACTG2	SSC4D	DIRC1	TMEM207

10

20

30

40

50

【表 5 - 7】

SPDYE17	WWTR1	GTF2IRD2B	VAMP5	OR1A2	SELENOP
FOXA1	DDIT3	ABHD4	NHP2	TRIM27	ATF6
BFSP1	VPS45	TMEM229B	DAGLB	RBL1	MIS18A
DES	PRRG3	NOP56	GLRX2	TSPY26P	STK38
UBA7	NSG2	SCNN1B	FAM8A1	GSTM1	ZCCHC17
C9orf3	GPR50	DDX31	AMACR	PLPPR5	APTX
GLIS3	BICRAL	PAX8	SPPL2C	SUN3	LITAF
ADD2	C8orf34	KLK13	ST3GAL4	ACSF2	SLURP1
TEX261	SLC30A6	CBS	TRIB1	SLC30A2	FDX1
OCRL	CYP4F2	CLEC4F	DENND1A	CFAP77	AAR2
BHLHE23	XLOC_010217	SP6	GRIN1	HOXB-AS3	MAZ
TFDP1	DCUN1D2	TNFRSF11B	BPHL	REP15	ZSCAN32
GPBP1L1	PUS10	TSC22D4	CSF2	MMP28	NUDT14
MBNL1	MFSD5	C1QB	TMEM82	OR2D3	LRRC40
PHF21A	ACER3	INTS4	CPA2	PPWD1	
KCTD1	TMEM110	SPSB2	DNMT3A	TFF2	
KRT23	CALD1	MYOD1	KIF2C	C6	
MORF4L2	NO_MATCH_98	DNAJA2	MTAP	PCDH20	
DTL	GLO1	WDFY2	NO_MATCH_58	C1QL4	
RHAG	VTI1B	ASRGL1	CD4	EEF1B2	
PLG	PRDX4	KCNA7	BBS5	CCDC114	
SMG5	UNC45B	DAZ2	APEX1	NUDCD3	
PHKA1	PSEN2	FAM217A	DYNC1H1	GPD1	
NR1D1	TMEM192	MNAT1	LRRC27	ALG8	
DARS2	FOXP3	KIR2DS1	AGMAT	TC1N1	
NOVA1	HSP90B1	NCKIPSD	NBPF15	IQCH	
CCDC13	SPAG9	ZNF85	LMBR1L	PIEZO1	
ERF	NSUN2	SPEM1	PDZD4	INTS4P1	
IFNA1	GYS1	SLC13A5	TMEM45A	PIK3R5	
ZNF569	CST6	HEY1	CD72	COX18	
MBNL2	ASCL2	RASSF8	NEUROD6	PTPN5	
SGF29	GSE1	C7orf26	YAP1	PPIL6	
KNG1	POTEB3	CARD11	IFNAR2	TSNAXIP1	
SORT1	MFSD4A	TRHDE	MYBPH	SULT1A3	
TCF7L2	SLC17A1	EFNA5	KCNK15	ZFP41	

10

20

30

40

50

【表 5 - 8】

MAGEB6	KYNU	KPNA6	C1orf127	D2HGDH	
GZMA	KLC1	NAPB	EDN3	SFXN2	
TGIF2	CYP39A1	UCHL5	HSPD1	KRTAP1-1	
PNRC2	FAM199X	ZNF512	XG	SMARCD3	
EXOC2	GLIPR1L2	SCNN1G	COX6A1	OGFOD3	
DCAF12L2	KIF7	KCNK5	GNG7	C1orf162	
HOXC9	CNTN4	C1orf21	RASGRP3	ARMCX2	
FBXL13	ZNF684	ZC3H7A	NTF3	PSKH1	
EBF3	NO_MATCH_182	WDR53	MAD2L1	PRDM5	
RIBC1	ZNF98	OR11A1	EPHX1	SPEF1	
FOXO3	SETD5	ERMN	PRPS2	ZNF783	
KDR	SLC4A1	CPA1	PPP1R16A	ATP5E	
APOBEC3B	MS4A10	SCAMP4	IMPA1	TGFBR3	
ZNF12	LNPK	HVCN1	CAMK2B	NPAS1	
SMARCAD1	ADD1	CTGF	DYNLL1	FBXO28	
ASB16	TIGD7	GPR63	CXorf58	EML4	
UBE3B	SHOX2	FANCD2	TMEM155	C12orf50	
NRP1	NPR3	VIT	UBE2S	DCLRE1A	
PCDHGA2	VGLL4	TTYH3	ZNF3	BPIFA1	
PCDHGA5	HSCB	WNT9B	YIPF1	SLC9A8	
HNRNPF	SLC25A43	CFAP57	METTL7A	B3GNT9	
JSRP1	RPE65	TSPAN8	CFAP36	SCG5	
MTA1	PCDHAC1	LRRC39	SOX10	CAPN3	
MPPED1	PIGA	VDR	AGER	CCL7	
AMPD3	AUP1	KRT6A	RAB8B	FUK	
RNF11	RBPJ	GNL1	PARPBP	TBC1D28	
DRG2	EEF1A1	TNFRSF10A	TGFB3	CMA1	
LEF1	GPR146	LIG4	ADRA2B	TRMT6	
FAM3C	C3orf62	GMFB	EOGT	LYN	
PIGR	JAGN1	DAP3	ADSSL1	CAMKMT	
MRRF	CORO1C	MRPL30	DPM1	NEK2	
FAR1	UXS1	TYRO3P	SPOCK3	VEGFB	
OXR1	ANKZF1	PDE4D	DYDC2	EEF1G	
FOXJ2	TMEM134	RNF214	TAPBPL	SETD3	
ASIC1	ZNF207	GPR180	TMEM255A	PLD4	

10

20

30

40

50

【表 5 - 9】

PDE4B	CCND3	SLC39A9	CWC22	KLHDC4	
SCAP	NOP16	RAB3A	ACMSD	TEX45	
SP1	C11orf24	ZNF625	P3H3	ANKAR	
CDON	AP2A2	NTN5	A4GALT	ICAM4	
SLC41A1	TTLL2	BRINP3	HIKESHI	CYB561	
MRGPRX1	PPP5K1	ZBTB49	RIPPLY1	MND1	
ERCC5	PHLDB3	CXCL14	TOR1AIP1	LELP1	
TNFRSF19	H2AFY	MPG	ASB6	KRT8	
MRPL37	NDEL1	TSPAN31	MARVELD3	IL3	
FAM151A	METTL25	LSM10	HEBP2	VRK2	
SSRP1	EYS	GPR15	CAPNS2	OR13J1	
DRD4	TF	OR4K2	PDE6D	CA11	
USP26	MS4A7	SERPINA4	PBX4	MNS1	
ARR3	ELOVL5	ZNF816-ZNF321P	FASLG	TRIM48	
MITF	ZNF816	CHRD	ASPRV1	TRIP6	
JOSD2	METTL13	ACTL6A	REG3G	CORO2A	
HS3ST3B1	CFDP1	RGS8	STXBP3	PTPN12	
FAM160B1	KRBA1	FES	AMY2A	COX8C	
SLC25A42	PTGDR2	RFPL4B	TMPRSS3	OR8D1	
ZIM2	JUP	CEP162	HAND2	SCLT1	
PCDHA6	SLC35A3	CDC42EP3	DYNC1LI1	STK3	
FAM20B	SLC35B1	ZNF474	ADGRG2	DUSP26	
PDE9A	CUTA	FBXO25	CXXC1	NO_MATCH_155	
JKAMP	PCID2	AGBL2	AAAS	WDR62	
CTDSP1	SF3B4	HAO1	ZNF202	IL1A	
NRSN2	CLCC1	PHAX	EIF3J	CABP5	
BAZ2B	COQ7	RASSF3	DLK2	FBL	
PSG9	RPS6KL1	GIPC2	FRMPD2	ZP1	
SS18L1	RAB23	POLR2L	C14orf39	RBM46	
HRAS	FAM161B	CDHR4	ARHGAP45	HDAC3	
Prkd2	ALOX15B	ASH2L	PPCDC	APEH	
PSMD4	LLGL2	CDK17	CETP	NO_MATCH_133	
AKT1	OXA1L	BNIP3L	B9D2	TNFAIP3	
IRX6	PLCL1	TMTC1	EVA1C	TBC1D20	
MEPE	IL17B	CREB3L1	ATP1A4	ITM2C	

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 0】

ARAP1	LONP2	MYH7	SLC35D1	TMEFF1	
MAPK8IP3	ECHDC2	EFNB2	TXNL4B	UBE2Z	
KSR1	SUPT4H1	LRRIQ1	KIF3A	ADGRD1	
DRICH1	HAUS7	FAM219A	ERP27	KIAA1644	
SPOPL	FURIN	HID1	NO_MATCH_239	CRAT	
ZNF503	WDR48	MIR7-3HG	ARMC8	GALNT16	
RARA	CDC42EP4	PTBP1	KRT80	FIGN	
SPON1	FAM103A1	CIPC	PCBD1	AGA	
TRIM37	SLCO1B1	FLT3	SEMA4F	C11orf70	
TNFRSF13B	KBTBD7	SLC23A3	NO_MATCH_124	STAC3	
MUC20	SURF4	RPS3A	GALE	G2E3	
TMPRSS13	GCC1	FBXO39	IL5RA	TUBA1A	
C1orf228	AHCYL1	DPYS	HIST1H3A	CAB39	
DTX3L	RFX5	IDS	PRB3	PRR4	
MMP19	MAJIN	HOXA5	LOC102724428	DNASE2B	
MSH2	GGA2	POLM	NO_MATCH_89	RAB40A	
TPST1	RABGGTA	CRIPT	ZWILCH	CREG2	
TEC	CCDC137	KCTD14	NO_MATCH_194	NOSIP	
BORCS8-MEF2B	HOXA3	LIN9	BAX	FCRL1	
SYBU	TCERG1L	TPPP	RNF13	F2RL2	
BTBD18	ADPRHL1	RNMT	CLEC14A	GREM2	
PPP2R5D	SLC20A2	PMM1	KCNRG	DLEU7	
TLK1	BRD4	HSD17B11	TMEM45B	NO_MATCH_187	
ZNF219	TMEM205	CASC10	OLR1	PITPNM3	
ZNF311	SHC4	SDCBP2	GLP2R	EIF4A3	
CTBP1	DEK	SH3BP4	RAB3B	TXN	
IKZF5	Med1	SNRPD2P2	KDELR3	SLC5A8	
POLA2	GABBR1	NR2C1	BCL2L11	TBC1D13	
ARIH1	FOXJ1	ZNF134	HCK	PRDM7	
CEP135	TP53BP2	TSPAN12	ERH	MGME1	
DGKK	SH3BP5	RPS6KA3	PBK	LRRC74A	
FGFR2	FBXO5	AQP11	RAB2B	TVP23A	
PACSIN2	BRMS1L	FNDC3B	NO_MATCH_144	NO_MATCH_7	
TRMT5	DPPA3	LAMP3	BMT2	GPN3	
STMN2	OSBPL3	GDF15	DMP1	TVP23C	

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 1】

CYP4B1	TLDC1	TMEM43	TNS4	SHOC2	
ZNF669	ITGB8	ODF3	PANK1	NO_MATCH_120	
RELB	LINC01105	MCUR1	SYCE1	WARS2	
ZNF572	PIP4K2A	EGFR	FECH	QRFPR	
PDGFRB	CPT1B	ZPBP	PAK4	IMP3	
C9orf170	GNAS	XLOC_l2_015600	CLEC1A	SNAPC2	
LCA5L	CRY1	NO_MATCH_67	LILRA4	NO_MATCH_138	
GSC	ZNF107	SLC12A8	FUNDC1	UBE2DNL	
EZH1	NQO2	FAM189A1	ABHD18	PI15	
OR13C3	SERPINA12	XCR1	MCAT	BAAT	
CLCN6	TAMM41	DUSP6	AP3M1	ZNRF2P2	
ANGEL2	LIN7A	ZDHHC11	IDH3B	EXOC3-AS1	
ATF4	GNB1	NR2F1	HSPBAP1	MVK	
VKORC1	B4GALT5	WDR83	EPHA3	C10orf25	
SYTL3	IL20	PKD2	SLA2	IFI30	
PDIA5	TAT	EMC6	KIAA1324	TM4SF18	
MAGEE1	HHAT	GDPD3	GATAD1	B4GAT1	
SYT4	DYRK3	PDZD11	ATG3	PIIB	
BATF	ATF5	SLC2A13	SLC51B	PCCB	
TCF7	REM2	GCAT	EYA1	EGFEM1P	
TONSL	ITGB7	IRX2	BLZF1	SPOCK1	
COPB1	RNASE4	RFWD2	SURF1	XPA	
PPP2R2D	TEKT5	TMCO3	CRYM	RPL27A	
NLRX1	FBXL14	MYO10	MRPL28	ZNF483	
RAI1	GALNT8	EHMT2	KCNE3	ECSIT	
MSN	AKAP14	MCL1	C21orf2	DIO3	
LUC7L2	ZC3HAV1	NAA40	BATF3	HLA-DMA	
TBC1D2B	MRE11	IL17RD	MLLT6	RAB6A	
RFX4	ANKRD1	CCR2	KCNJ11	MS4A6A	
SLA	FSCN3	CEP19	HIST1H2AC	UQCR10	
ENTPD5	C1orf50	PILRB	RNF175	NATD1	
FAM19A4	RNF133	C3orf38	Mok	MRGPRE	
DIP2C	FZD1	ZCRB1	CACNG3	CSNK1A1L	
TFDP2	ARID5A	WDR1	DACH1	MTCH2	
FAM126A	DMBT1	GRIN3A	TMED5	ADTRP	

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 2】

MAFB	ACSM3	HIST1H2BC	FABP5	CD7	
LRWD1	ISLR2	MYLK4	CCDC70	SYT17	
ACSL3	ADGRG5	SUGP1	MYOZ2	PRELID2	
CFB	ARL6	PNKP	PNLIP	GOT1L1	
IRF5	RPS6	SLC6A20	CCNI	TSSK2	
Myt1	DAZAP1	MRPS22	RDH12	KRT36	
EPB41L1	ROCK2	USP47	SH3BP5L	PA2G4	
TPD52L1	MIXL1	TCEAL8	CHMP1B	CDC42BPG	
PAX7	ANXA6	SCD	PCDHB10	ALG13	
CCDC32	TGOLN2	PTDSS1	AIF1	FER1L6-AS1	
UCKL1	AP3D1	SRMS	TTC4	EID2B	
FUT1	HIST2H2BE	ACVR1	LCE3C	DGCR8	
LEPROTL1	DDI1	LDB3	SMIM11A	TMEM97	
GLYR1	DR1	PPIL2	NR2C2AP	ASB8	
ELAVL4	DPM3	IL23R	AGO3	CARD6	
PDE3B	ELF2	FOXB1	OR4F15	SNX31	
XPR1	HIST1H1C	KPNA2	GPR45	OCM	
UBALD1	C1orf115	LGALS12	C9orf85	TTC9C	
PTGES3L- AARSD1	CDC25C	CPPED1	MKRN2	CCM2	
LRCH2	GIMAP5	TSPAN7	MLYCD	AIM2	
ST5	EAPP	RTFDC1	SMCO1	NAA16	
YAF2	LOXL4	SH2D1B	TATDN1	CEP170B	
OTX2	MYLIP	OGDHL	PPARD	CTPS2	
SERPINH1	RFTN1	MRPL27	VSIG2	ACOT13	
SIK2	ZMAT1	ETNK1	ACOT7	PLA2G4C	
ZBTB26	AP3S1	ZNF341	CNDP2	BSCL2	
VENTX	HNRNPH1	DAPK2	GBGT1	ZNF266	
CLIP3	DPP8	RAB20	TRIM41	CMTM8	
SIRPA	NFKBIA	ITPK1	APOL1	RAC3	
OLIG3	RASGRP1	KRTAP13-1	ACTBL2	FSD1L	
PKD2L1	CCDC42	MRPL45	NEK10	PCNX4	
TNFRSF1A	NOX1	B3GNT6	Tmprss7	AP4E1	
HOXB7	GTF2H1	XYLB	ZNF34	FNDC1	
POU2AF1	ERP44	FNDC11	INTS12	KIF14	

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 3】

TCF7L1	MLH1	C11orf54	AP2M1	ADCY9	
CTDSP2	UST	LRRC31	ZNF189	ELF3	
ROGDI	ADCK1	KCNK2	SSR2	ROPN1B	
MADD	TMEM63A	NO_MATCH_134	KCNE2	DHX57	
ANKRD20A3	SMARCE1	MEOX2	LHB	ATP6V0E2	
FAM19A1	GPR143	NUBP2	CAPSL	TPPP3	
XBP1	KIAA1586	FANCM	ZNF770	GALNT4	
SGSH	TSR3	SPIN2B	TGFBR1	TMEM234	
TM9SF1	PSMA1	CNST	RCN1	ZNRF1	
AXL	RAD23A	NECAB2	GALNT14	PFDN2	
BRD2	ZNF571	PRR14L	ST8SLA2	NO_MATCH_240	
MFAP4	HSPB7	TXNDC12	NO_MATCH_151	CASP7	
C10orf67	PGAP2	C1orf220	PARP11	PGD	
POGK	RHBDL1	PCYT2	N6AMT1	RAB32	
JAG1	NUDT16L1	FOXN3-AS2	TMEM257	RBFOX2	
DOLK	SLC44A3	SLC47A1	NO_MATCH_85	TPD52L3	
NR2E1	TOX2	C8orf74	DEFB134	LHFPL5	
GCM1	MRPL12	C1QTNF1	LINC01657	ZBED8	
WDR41	TSPAN14	IL7	PCMT1	SLC41A3	
PKN1	HNRNPK	DUSP15	KRT71	TICAM1	
HOXA9	ADGRA2	LIMCH1	YWHAB	SNX9	
UBE4A	TMEM123	ZDHHC1	ZNF253	G6PD	
C6orf118	CYSRT1	CPZ	METTL21A	LMO3	
CCNB1IP1	COPG1	C17orf97	LRTM2	DUT	
CT45A10	ZNF559	ABO	RPS12	APLF	
HS3ST5	CKAP5	KIF25	RPS27L	LOC100289561	
IKZF3	TPRA1	NO_MATCH_87	TAOK3	GSDMB	
CYP3A4	GPM6B	THAP6	TSR2	CEP170P1	
FMR1NB	TYSND1	ZBTB38	DNAJC6	CFHR5	
ACADS	CWF19L1	ASCL4	DDX19A	OTUD6A	
GALNT2	FAM71E1	SEMA6D	SENP8	SNRPE	
CKAP4	CCDC138	ZNF263	NOL6	FARSB	
WNK4	FAM46B	ADORA2B	XLOC_12_006955	DPY19L2	
PPP1R12A	3-Sep	SAR1A	KRTAP22-1	TTC8	
CAP1	SGK3	SLC50A1	DDX21	LRFN4	

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 4】

C1orf210	L3MBTL1	NO_MATCH_60	TEX28	MMAB	
DLK1	LSAMP	CASP14	UROD	MS4A1	
NCS1	VPS4A	C21orf62-AS1	SPIN3	LRRC46	
IGF1R	LRRTM4	SPACA4	C15orf40	DUSP7	
UBLCP1	TET2	SSX5	FSHR	UFSP1	
FAM212A	HADHB	B4GALT2	LMAN2L	RIOK3	
DPYSL5	RHBDD3	HNRNPA0	ARG2	PCYT1B	
NKX2-3	CYP1A1	NO_MATCH_167	STAR	OR5M8	
ZNF680	TIMM22	NUDT8	ARF6	NR3C1	
MMRN1	PDE1B	CAPZA2	ERBB3	NO_MATCH_49	
JADE3	ZNF169	NSUN4	ARL13A	ZNF526	
RAD17	UBE2I	PAGE5	FGFR1OP2	REEP3	
CAPN9	MOGS	TEX264	MAATS1	AHDC1	
PRRT3	ATG16L2	PIPSL	NAALADL2	TKTL1	
GPC1	BRPF1	LOC403312	TPM1	SLC39A7	
PHF8	GALNT1	PLA2G2D	TMEM8B	NXPE1	
BANK1	AKT2	C11orf98	SRD5A2	ACCS	
SMARCAL1	PSMG1	PPP3R2	IZUMO1	CMTM2	
SPSB4	ZBED1	ROPN1L	TMEM231	PRAME	
COX7C	TMC02	PJA2	WSCD1	RNF216	
E2F8	NO_MATCH_14	JUNB	FGF12	TTBK2	
TRIM16	ERICH5	ACSS3	ECHDC1	XLOC_011297	
PELO	OR52N5	CYLC2	DEFB106A	WDR20	
RABGGTB	DCAF4L2	BCL2L1	MPDU1	TMEM255B	
DSG4	VGLL2	ABCF3	TMEM236	PDCD10	
ZNF791	SLC35C2	OR3A4P	ITLN2	SPATA5L1	
HOXD4	STMN3	RAB39A	TIMM8A	STK38L	
TMED4	PPP3CC	FANCE	XLOC_013491	MYADM	
SARDH	OR56B1	LRRC45	PLOD1	SLC1A7	
RPGRIP1	TMBIM4	ANKRD12	OR51B4	MLKL	
HPS1	HOXD3	MYRIP	BRWD1	RAB31	
TRAPPC8	TSPAN10	CCDC181	TMEM30B	DDHD1	
TMEM179B	GSPT2	RPL4	GTDC1	GDI2	
LRRC49	FAM222B	PCYOX1	RHNO1	SLITRK4	
ACSBG1	C19orf38	RGS18	RNASEH2B	ORMDL1	

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 5】

GBP1	LCORL	UGT1A1	C16orf78	KRTAP9-2	
ZBTB48	YY1AP1	NO_MATCH_268	REPS1	RAB1B	
CCER1	MRPS6	WDR89	MLX	FBXO44	
ZDHHC23	PSTPIP2	ARPC5	TTC26	MAPK8	
PGAM2	AFP	OSBPL5	STK35	SYP	
CD83	DZIP1	LSM12	SAV1	HLA-L	
FAM46C	FAM219B	PDK4	AAMDC	SOD2	
ZZZ3	TMOD1	RPP38	RP2	TMEM164	
DENND6B	FGF11	LOC399886	SUMO1	TNFRSF21	
KCNH7	ZNF628	MGST2	FNTB	UPK2	
CPEB1	RHOH	CATSPERD	CHMP2A	ALG12	
KIAA1524	MAP3K2	TMEM260	OSBPL2	BFAR	
HJURP	CHMP7	SPHK1	HAUS1	SLC23A2	
MRPL15	AP3M2	PAIP2	FAHD1	VEGFC	
FEZF1	FANK1	LGALS3BP	PPIL1	MPP5	
TAS2R4	ESYT1	PPP1CC	VCAM1	CCDC121	
ZNF366	RAB3IP	GPR89A	CFI	DPAGT1	
PHACTR3	ZNF561	BFSP2	RARS	TSG101	
APOE	EGFL6	CCT4	APBB1	NT5C1B	
OR6K6	PKIG	MPZ	SLC18A2	RTN2	
HIST1H2BG	MYCBP	CCL22	EFS	PDGFRL	
RNF8	RASGRP4	SLC25A33	PPM1K	CAMTA2	
ZNF618	NELFCD	TPP1	GRP	APCS	
IFNL1	RPS8	RPAIN	RORB	TBC1D7	
BABAM1	PHLDB1	NR2E3	PRICKLE3	CAMP	
SPATA6	XLOC_I2_006624	NO_MATCH_169	ARL11	PLIN2	
TMED2	PTK2	GALK2	CYP27C1	CALCOCO2	
MEP1A	ZYX	POLR2M	PTP4A3	GTPBP8	
XLOC_005244	TCEANC2	CKAP2	CNTN2	TRIM17	
FEZ1	BANF1	CDKN3	PRPF18	UBTD2	
CRYL1	VIRMA	CCDC97	AQP7	CLINT1	
GPR183	GRHL1	UBE2M	HIST1H2BA	SHPK	
TMPRSS2	OR52W1	OGT	SYNJ2BP	MRPS35	
EPYC	AK9	CCDC74B	BORCS8	ZNF394	
DNTTIP2	CDCP1	ADAM22	SRPK2	PLSCR3	

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 6】

PPP3R1	CTRC	ADCK5	OSTM1	PRPS1L1	
MECP2	ST6GAL1	TPD52L2	MYOC	CAMK2D	
PGAP3	C15orf48	RBBP5	C6orf201	CYB5R1	
MPC2	ATP1B2	EIF2AK1	BRK1	PNMA1	
ZNF250	PEX11B	LAMP2	CYB5R2	CBFA2T2	
TXNDC5	SCHIP1	SSUH2	PCSK9	GLB1	
PIK3CA	ERCC2	ORM1	PPIA	PLP2	
LOC100287896	SRSF10	PINX1	OPRM1	TSHB	
NBN	NO_MATCH_31	DCAF11	BCAS2	CTLA4	
NANOS3	SLC46A3	FGL1	EIF2S1	GPR173	
NO_MATCH_52	R3HCC1L	SMN2	SPACA3	CHRNA1	
MSANTD3	PRKX	RILPL2	NO_MATCH_101	UPP1	
MADCAM1	POLR3GL	FH	CHIT1	LRRC6	
DUSP22	TGM1	MAPK12	MSC	CHI3L1	
ZC3H11A	KCTD12	KIF5C	BCAS1	SBNO1	
KIF24	TLE3	GK5	EIF2S2	CEACAM3	
SNCAIP	STT3A	RAP1GDS1	TNFRSF17	AFTPH	
FGFR1	RND1	DCLK3	NEFL	BAIAP2-AS1	
KIRREL1	UBASH3B	SYT6	MS4A12	RASEF	
GTF3C5	EDEM3	ACKR4	DIAPH1	ASPA	
DGCR2	GABRP	POT1	MST1R	CHRNA4	
PPFLA1	VEPH1	PLSCR4	SLAIN1	DNAJC27	
BRPF3	LAMTOR3	LSM14B	NXF5	RPS26	
CRAMP1	CWC27	GPD2	SLU7	USP48	
PAIP1	KRAS	SLC9A3R1	TOM1	DNASE1L1	
NACC1	POP7	CBARP	BCL7C	DAPK3	
KLHL40	CDK9	SLC26A11	PUDP	ST6GALNAC6	
TMEM246	ACAD11	TUSC3	PIGH	CDHR2	
KCNA6	TBPL2	ALDH3A1	CHRD1	MICAL2	
XKR3	DNAJC11	ATG13	SUPT5H	PRAG1	
ARHGAP8	CCDC68	MZT1	ASB9	ZNF273	
GPR62	BPESC1	UBE2A	CEP55	HERC3	
MAST3	GBP4	LIMK1	UMPS	SLC38A11	
JAKMIP2	GDAP1	TERF1	ZNF75D	RNASEL	
SLC38A7	IFT81	F3	OR6A2	CREB5	

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 7】

ZFP14	IFI27	AXDND1	ZNF785	MLN	
RGSL1	CHMP4A	SIL1	SLC12A1	RNF141	
CRX	PAPSS2	KDELC1	BPIFC	RPS27A	
TCF25	TFAP4	RPS19BP1	RAB39B	LPAR3	
OTX1	PMEL	NHLRC1	PCDHGB3	OLAH	
NRP2	ARSG	Spes2	PHTF1	ZCCHC14	
FEM1C	TACSTD2	GPNMB	GFOD2	SNX11	
APLP1	ZCCHC9	SHBG	HSPA9	TMEM30A	
RSRC2	PLCG2	TMEM243	ATP23	DUSP21	
CBLB	PPP1R32	IL10	ARMCX6	CARS	
ZNF778	DCLRE1C	DEFB105A	PRKAR2B	ZNF300P1	
DIRAS3	APOBEC3C	TRIM52	ORAI1	NDUFS7	
ABI3	ZBTB45	PDE6G	DMRTC2	GCK	
PSMA4	TP63	DRAM1	NHLRC3	DLL4	
RRM1	LINC01555	NMNAT1	MCFD2	FAM114A2	
NO_MATCH_256	PRPF6	LINC01465	GABRG2	GNG11	
DDOST	TRAIP	FSTL4	KLHL18	PDLIM2	
TGIF2LX	VANGL2	ZFP3	WDR63	SOC56	
TMEM132A	PRPH	PYHIN1	THOC1	TMEM54	
ZIC3	LRRTM3	RIMKLA	WDR47	NO_MATCH_69	
HOXD10	PPM1N	SPINK6	ARHGEF28	IL26	
MEIS2	ADAMTSL1	NO_MATCH_237	ASB17	EDA	
UGT1A9	C2	PDCL	HSD17B12	LCN1	
KCNJ1	STOML3	MRPS7	ASMTL	CPLX4	
IFI16	NUMBL	CASS4	RAET1E	KRTAP12-1	
GTF3C3	PIH1D3	GPRC5A	SCIMP	CDO1	
VN1R2	PCBP1	HOXA1	C9orf43	KCNJ12	
GORAB	TMPRSS5	ZNF638	RTCA	VIP	
NTS	IGF2BP3	EIF4B	SLC47A2	NO_MATCH_160	
MRPL39	LRIT3	KIF2B	HIST1H2AI	SCCPDH	
CDC23	MAPT	BOD1	NEDD8	NO_MATCH_6	
HSP90AA1	RNF7	Mbd5	CLDN20	ADSS	
CANT1	NO_MATCH_220	INSL4	IRAK3	FAM92B	
DRAXIN	TICAM2	C2orf66	FCHSD2	SLAMF9	
DENND2D	NDUFA7	ANKRD29	MBOAT2	GRB14	

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 8】

NO_MATCH_11	LOC102724984	FLOT1	DSTN	CCR9	
CASD1	GPATCH2L	LRRN1	ANAPC13	APOBR	
SUGP2	SLC4A5	ERO1A	SH2D1A	NO_MATCH_223	
SPECC1L	PSMD5	GAS2L3	PRKCI	TRIM31	
CHAT	RINT1	IFITM2	GNPNAT1	IL4	
TMEM185B	CDC42SE1	KIZ	PMEPA1	COG5	
WARS2-IT1	RSPO1	NSA2	C3orf30	TCTN3	
HNRNPH2	PRR14	COPS2	EYA2	OSGIN1	
FSTL1	FOXN4	PEX19	NCOA1	FER	
BDNF	ARHGAP32	IL37	ACTRT3	C3orf49	
UBE3A	HOMER3	GABRA4	ZBTB8A	SH3GLB1	
TLE6	DPH6	ATP6V0D1	ITLN1	LCP2	
GLDC	ZBTB42	MC3R	CDIPT	PIGM	
TCF4	NCALD	CD3E	GOSR2	ATP6V1D	
CENPQ	L1TD1	TTC23L	C16orf54	PRKCA	
SLC9A6	OLFM3	AFF4	CBLN2	LOC90768	
EMP1	ZNF428	ABHD14B	SECTM1	STAT1	
GPR108	CCR3	Hoxa10	DFFB	HSDL2	
LINC00852	LNPEP	App	TRAPPC5	RNF168	
GMDS	ATP13A1	PRKAR1A	ATG14	IRAK2	
RPA4	RHOA	TUBGCP3	PDE4DIP	USP46	
ALKBH7	SLC14A1	ZP2	MYL12B	BANP	
STX4	GUCY1B3	GRM1	CSRP1	EREG	
OR7C1	UBR2	NO_MATCH_179	ULK3	RSL24D1	
SLC52A3	DCBLD2	PPP1R12C	BBS10	CIDEC	
IFNAR1	SNAP29	DCTN4	LARP1B	MAPK15	
DBF4	OCLM	KCTD19	TLDC2	FAM110D	
BBS1	TRAPPC10	NKIRAS2	POF1B	ATG10	
ARL8A	XLOC_12_000791	NO_MATCH_77	ARHGAP36	CYCS	
POLR3E	CYB5B	NUDT9P1	ARHGEF38	MTPAP	
TTPAL	MARCO	PTGER4	PIK3C3	SLC39A4	
WAPL	CD9	CRKL	TLR2	BCAT2	
RER1	RHOT1	B9D1	RPL13	PEA15	
NIPAL1	STUB1	FKBP7	CCDC126	SYN3	
DHTKD1	PDP2	ZMIZ2	BTBD1	SLC25A32	

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 9】

ALDH18A1	MLST8	DEFB1	NO_MATCH_197	LCA5	
GRIN2A	TFE3	Rbp1	CHCHD5	FBXL8	
STX17	OSER1	TUBA1B	FGF5	PRR13	
NTRK3	FOXRED2	COMMD1	PVRIG	INTU	
NENF	P3H4	LGR5	HIST1H3G	FCRL5	
MFF	Lztr1	DCTN2	GET4	PMP22	
ZNF613	CCDC130	NADK	ZNF556	DLGAP1-AS1	
ZNF678	NEUROD2	CALR3	RETREG3	FERMT1	
LTV1	BMX	NMRK1	SPDL1	FCRL2	
PLLP	MAP3K3	SENPI	PRIM1	IDO2	
SH3D19	MYCBPAP	DHX38	NAA50	IWS1	
NO_MATCH_196	RTL8A	EHD2	C20orf173	BCL6B	
ZSCAN9	XLOC_12_005978	SRSF7	DAZ1	NAALAD2	
XXYL1	ZFP82	DNAJB2	SDR9C7	NCCRP1	
RAP1A	NPEPPS	CACNB3	TFAM	PFKM	
RSPH4A	BLOC1S2	ZIK1	UGGT2	PGLS	
IRAK1	EPHA2	ZMYM1	F11R	FKBP14	
ADH6	TMEM170A	ASZ1	MMP23B	SYTL2	
RIT2	TMEM79	WASF1	PIH1D2	ALOX5	
SERTAD4	CALCRL	LOC107983965	NUMB	LAMP5	
ZNF577	BID	HIST1H2AM	ENKUR	DEFB118	
PCDHGA9	DOCK5	SLC6A2	SLCO1C1	ZMYM5	
ARPC4-TTL3	KCMF1	YPEL3	RUNDC1	IL1RAPL2	
MAP2	TAS2R19	GFPT2	OGFOD2	SRPK1	
POU5F2	C3orf56	PARVA	STX7	RPL23AP7	
NUFIP2	PPP2CA	ACAP3	RHOC	CCNJL	
CLEC18A	AGTRAP	PCDHA11	SPRR1B	MAT2B	
SLC4A1AP	DFNB59	PROCA1	POLR2C	B3GALT4	
NF2	NLRC4	ZNF764	EPHB4	PLEKHN1	
ELL3	GPR119	TCTEX1D4	DACH2	RGS22	
B3GAT3	ZKSCAN1	ELOF1	FBXO16	SEPHS1	
RBM17	EFHC1	RAP2B	DENND1B	HPD	
PKM	NAT8L	LYNX1	GNB5	TP53I11	
RCAN3	CHMP4C	SLC7A2	CLEC10A	ZC4H2	
DEFB125	MEMO1	CLEC4E	SFR1	LSP1P3	

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 0】

SENP5	LINGO2	NO_MATCH_62	CAPG	PSG11	
TUBB1	SUN1	GABRQ	RUNDC3B	XLOC_l2_010511	
ARFGAP3	FAF2	FBXO32	CFAP47	NOA1	
ATL2	CPXM2	CHST13	ADIG	HHIPL1	
NONO	LRRC41	ANKRD26P1	CHRNA2	PLA2G2A	
SYNGR4	ZFAND5	RAB26	KCNG1	TMEM239	
SF1	SRC	B3GALNT1	FBF1	POPDC3	
NUP62CL	CSPPI	MTHFS	SSR3	HIST1H3F	
KRT15	DGKZ	OR13G1	FAM81A	HYAL3	
PINK1	CEP83	PON2	C3orf58	GNL3L	
HNRNPR	C17orf78	DNAJC22	S100B	GRK7	
CCDC36	PTPN3	REEP5	ZNF581	TAP2	
ANKRD23	ZNF460	CD74	GYS2	RHBDD2	
THUMPDI	CHSY3	PIK3R4	EEPD1	COPS7B	
PGM3	HARS	FAM161A	LSM3	MREG	
WWP1	NECTIN1	GH2	CATSPERE	DNAJC28	
CHRNA2	ERVFRD-1	PHACTR1	ST3GAL1	ST20-AS1	
MPLKIP	KCNC1	LANCL3	CRISP3	TMM10	
JAKMIP1	TVP23B	SSX1	SPPL2B	SEC13	
Ddx17	POGZ	ILF3	SLC12A9	SERPINB3	
WDR93	PTX3	PIWIL4	SLC25A52	ZC3H8	
BTN3A1	RAD51D	HOMER1	SNRPN	GALNT17	
SLC8B1	C14orf80	FUT9	LRG1	CBR4	
MINK1	SEC31B	TEX35	ARNTL2	SMCP	
DDX1	VRK3	2-Mar	C15orf59	ELMOD3	
Pi4ka	SLC13A4	C15orf54	MC4R	TOMM20L	
SUPV3L1	C1orf106	CRABP1	BVES	C20orf27	
TIGAR	AKAP9	LRRC55	MINPP1	SF3B3	
PGR	FANCG	ZBTB39	HSD17B8	NO_MATCH_198	
REC8	ENDOV	OXGR1	CTBP1-AS2	RBM24	
GSTM5	CD226	TOR1B	YKT6	HBG1	
ETV6	MBL2	SLC5A12	PRSS1	COX7B2	
CNNM4	IL18RAP	ASPH	RAC2	KRTAP26-1	
PPP1R3B	PYCR3	ARL6IP6	CSN3	NO_MATCH_42	
DCST1	KRT6C	MEOX1	TNK2	PABPN1	

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 1】

7-Mar	GABARAP	KCNIP1	TLR8	ZBTB44	
ZNF624	CHPF	B3GALT5	KRT31	TSGA10IP	
KLHL1	GNE	TTC1	LRP1	FUT2	
GID8	GABRR1	APRT	ATP6AP1	PRUNE2	
MLLT10	RPA1	SLC11A1	NPY	WDR90	
SPTY2D1	RASSF5	SLC35D3	LACTB2	CLN8	
PPP2R2B	SNX15	ARPC1A	INTS10	CCL4L1	
RMDN2	CPOX	LIN7B	C1orf186	PRKG1	
ZNF426	MAFF	HAO2	GRB7	HMGCS2	
TMEM185A	NAP1L1	ATP6V1B2	KCNE4	CSNK1A1	
NO_MATCH_106	CSMD2	ZNF71	FAM90A1	OR51F2	
QSOX1	HEMGN	RPL34	NRBF2	OR4C12	
MTDH	RRP1	SERBP1	ZNF184	CHI3L2	
SEC61A2	SSH1	EPHB6	RIC8A	USP22	
JAK1	NTRK1	OXSRI	AK5	XLOC_l2_000048	
MTMR10	LPXN	SKA2	INHA	LOX	
GATAD2A	CD247	HCFC1	ACBD7	RNF166	
TMEM270	YIPF7	HIST1H4C	ALDH6A1	TREML2	
TGFBR2	HOXC4	LGALS9B	C3orf33	ERLEC1	
TMEM115	Myo5c	CST2	LIX1L	CES1	
DND1	TSTA3	EME1	GIN52	FXYP7	
DNAJB5	AKR1D1	DXO	GMPT	KLRK1	
POU2F1	SPCS2	ACBD6	ZNF772	PI4K2B	
PCYT1A	BRCA1	CD5L	TM2D1	ZNF558	
BCAP31	SLC22A15	PQLC2L	DGKA	MVP	
ARSF	RANGAP1	MRPL10	CLU	CINP	
CHMP6	FAIM	PIWIL2	RING1	NEK4	
CARNS1	TLK2	C19orf53	ALDH3B2	USP2	
FSD2	SDF2L1	PLK4	BZW1	ADAT2	
L2HGDH	ZG16B	SLC25A30	RAD9A	XLOC_l2_006166	
ADSL	PPM1F	ADAT3	GSTM3	DNM3	
ZNF257	ZNF423	MIOX	ULK4	LFNG	
GPS2	COG3	ACSL6	HTR2B	PTCD2	
PPP1CA	PIAS1	DPYSL2	SIM2	DOK4	
FGFR4	MARVELD2	COQ4	SALL2	NO_MATCH_94	

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 2】

C12orf4	TMEM106B	B3GNT5	C10orf111	AADAC	
PRICKLE1	RPL6	RRAGD	FSBP	XLOC_013840	
NOP58	DNAJC30	PSENN	ETV7	UBE2V2	
TCEA2	C17orf51	MAPK7	ERC2-IT1	NRSN1	
VMA21	KMT2E	CCDC134	ZNF133	TMEM14B	
BCL7A	RALY	STBD1	BEND6	1-Sep	
ZC2HC1A	DDRKG1	PRCC	HMOX2	LINC00242	
MCOLN1	LBHD1	DYNLRB1	SPRYD7	SUOX	
ATG4C	RHOBTB1	RBMX2	TEX36	ZNF439	
PPP1R36	CTBS	ENTPD7	SBDS	MRPS11	
CD63	EYA4	ATG5	STX18	ANGEL1	
BBS4	FAM46D	HIP1R	OR2AE1	HDX	
BCL2L2	NIPSNAP3A	HCAR3	TMEM143	TUBGCP4	
CPSF6	BPIFB2	SULT1C4	KRT20	GLYATL1	
SLC35D2	GPR162	MAPRE3	NCSTN	DGKG	
PRSS23	JAM2	TBR1	SAA1	CD3G	
NO_MATCH_39	CACNB2	FAM30A	WASL	SDHC	
TCAF2	KIF9	UBQLNL	CFH	MOBP	
UNC93B1	PCDH9	ZNF404	SNRPD2	XLOC_12_007488	
C2orf49	PTCH1	DTX4	ACOXL-AS1	LOC554206	
HAND1	ADIPOR1	CLSTN2	GEMIN6	CRTAP	
SLAMF7	SRFBP1	GPR21	TFB2M	CYTH4	
NO_MATCH_46	AKR7A2	DEFB127	LOC107984086	TOMM40	
MID2	TCP11L1	GPR149	RTN1	NECAB1	
OR10K1	E2F3	THOC3	KRT38	ATG4D	
UBE2J1	CD200R1	CSN2	PAQR7	EIF3F	
F10	DDX59	NDUFS3	MTPN	PPP2R1A	
CRISP2	CPNE2	CLIC2	TADA2B	NO_MATCH_80	
MFSD2A	ZDHHC22	SLC25A22	PSTK	ZNF331	
C1orf112	PIGT	EIF3H	NMUR2	RBKS	
HCFC2	EXD1	QRSL1	PIP	GXYLT2	
LPP	NET1	LIMS1	KCTD9	BTF3	
MXD3	CNPY4	IFIH1	BEST1	NO_MATCH_96	
PRDM1	C9orf153	FAM151B	ISOC1	PLCD3	
TMEM101	GCNT1	GPR135	CSF1R	COX20	

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 3】

BEND3	GPR6	NKPD1	NR1H4	PRIMPOL	
TP53TG5	PRUNE1	DAOA	CYP3A5	MYL6B	
IFNL3	CAPN13	STAP2	LNP1	STAC	
TMEM35B	KIFC3	NFYA	OR2K2	LOC107987205	
SCG3	TSSK1B	TNNT1	JMJD1C-AS1	AHNAK	
DDX54	ZNF2	WDFY3	MRAP	HMGCR	
HAVCR1	LHX9	DLG3	MTHFD2L	KMT5A	
IKZF2	ZNF449	ENO3	CD300A	RNF139	
ZMYND10	TMEM174	ITIH3	PSMB4	NXNL2	
KCNJ5	CES3	TMEM208	TMEM35A	TYW3	
PCSK5	RLN1	KRT73	TMX2	SIRT2	
TFB1M	ZNF821	HES6	PXDNL	LYZL1	
CDH7	TMEM44	EGLN1	ZDHHC20	ABAT	
CLGN	ACTR1A	TUBB2A	OR2L2	TMEM27	
OR10S1	MIIP	CXorf57	HIGD2B	RPL35	
GNA15	GPR88	ZBTB47	PRSS57	ZC3H12D	
Zfp317	CYP4V2	TIGD5	VDAC1	CACUL1	
SERINC1	TNIP3	XLOC_012148	YWHAE	DCP1A	
PPP1R16B	SHISA5	SQOR	C15orf39	PBRM1	
NO_MATCH_265	SLC22A5	RYBP	LIPG	CROT	
ATG16L1	PLEKHG3	NO_MATCH_259	SUCNR1	TSPAN1	
FKTN	CLDN8	PREPL	OR10W1	NCOA4	
ELOVL6	TMEM186	HEMK1	TTK	OAS2	
XRN2	RWDD2A	NDRG2	RNF182	MRAP2	
STX1A	TNFSF18	ZNF329	LOC442132	PNKD	
LYSMD4	FMN1	ZNF846	CEP72	MICU1	
PARD6B	TRPT1	SPATC1L	STXBP6	C2orf68	
VEZT	HIP1	DHRS4	TGFB1	NDUFB10	
ETV4	PPP4R1L	METAP1D	TTC6	PTRHD1	
CAV3	BSPRY	AKNAD1	CLEC3A	NR1H3	
TRAF3	KIAA1257	MMP8	COMMD8	CTAGE1	
SMC1B	CDCA7	MMP3	GRPEL1	TMIE	
SHISA3	OTOR	NME7	PSMC4	STAM2	
TRAK1	AIMP1	C22orf46	SLC44A5	TESMIN	
Zfp777	ATAD2	LRGUK	OR5K2	CXCL6	

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 4】

STK31	TOM1L1	GUSB	CCDC7	KLHDC10	
USH1G	VCX3A	TMEM33	CCT8L2	RNASE1	
TUBG2	DOC2A	TYRO3	ASPSCR1	TES	
DEDD	MAGEF1	PMM2	URB1-AS1	FPGT-TNNI3K	
S100PBP	Bnip3	IL12RB2	XLOC_l2_001669	H2AFX	
AKR1B1	DENND6A	MAP2K3	YPEL1	SOD1	
FAM135A	C7orf31	EXOC8	PSG1	SECISBP2	
UCP3	RPIA	HMGB3	C11orf1	TADA1	
FAM217B	FDFT1	DAZ3	COASY	POLR1C	
NUDT10	YWHAQ	EXO1	KLHL11	TTLL9	
FBXO17	DIRC2	ANXA8L1	AKR1C3	ODAM	
DSE	XLOC_l2_007271	ANXA10	FAM171A2	TRIM62	
NAA15	ZFYVE21	HIBCH	TNNT3	RASGEF1C	
CACHD1	SEC14L1	DHRS4L2	PSMB1	CENPA	
TMEM209	C16orf72	CDR2	Atr	C16orf59	
CHN2	AGRP	SRP68	MANF	MBLAC1	
SLC5A7	SLC20A1	MCOLN2	BCOR	DDX60	
OSR2	ZFP28	VPS50	CPNE5	ZNF397	
LRRCC1	RPS7	SCAMP2	PDIK1L	TINAGL1	
ZNF177	RNF43	MZB1	NPL	LYSMD2	
ANGPTL3	LOC440461	LILRB1	GOLGA4	NO_MATCH_145	
C12orf65	DMTF1	TRIML2	LOC107986810	ERGIC2	
PRMT1	SERPINI2	SIAE	ARL16	SMOC1	
GNAI3	CALHM3	ALDH1L1	PSG2	EEF1AKMT1	
SUCLA2	TMEM200A	LGI2	CHST4	TWIST2	
TSPEAR	HEXB	SERPINB11	ENY2	CXADR	
RNF128	KCNN4	FAM84B	LYPD5	FABP3	
MRGBP	CLSPN	XLOC_l2_011954	IL18	PRKAG3	
FAM83A	FERMT2	PTPDC1	REEP2	TRIM10	
CPA4	GNRH1	GIMAP7	EMD	Thap12	
PHOSPHO2	OXTR	ANXA1	FKBP1A	MTG2	
STRN	PXN	BCL2L14	TMEM106A	PSG8	
APOBEC3F	CCDC26	ARHGAP6	FAM117B	NUDT11	
MB21D1	SDHA	BMP2K	STK32C	GIF	
TRIM4	MFGE8	TSEN2	ERGIC1	NUP88	

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 5】

ATXN1	YAE1D1	MEDAG	MESP1	DIO1	
ADAMTS12	CLASP1	RANBP3	TRAK2	LGALS8-AS1	
SATB1	TMSB10	DKK1	SLC25A11	TAF1D	
TMIGD3	WDR33	LDLRAD4	RIT1	AMOTL2	
RPAP3	TGIF1	C6orf106	DCPS	RHOXF2	
PNMA5	ANK1	POLE2	ADAM7	NHLRC2	
TBX18	RARG	ZHX1-C8orf76	ACP1	NUP58	
SPG7	TAF9	ZDHHC16	RND2	UBA6	
RIPK2	CD14	LOC284009	C8orf33	SLC25A15	
SLC9A3R2	RWDD1	XLOC_001973	LCN12	HSD17B2	
GPT2	LINC00636	CHMP3	ELAC2	MELK	
ANXA2R	ANKLE2	PRLHR	HMG20B	NDNF	
CYP4A11	IQCB1	MERTK	MB	NUTF2	
ALG5	TSGA13	XPNPEP3	AKT3	NUBP1	
ZNF33A	SLPI	C2orf50	MGLL	CFAP100	
SLC7A3	MAP2K5	ASB16-AS1	PRPF19	ANKS3	
TTYH2	PRR23B	SMIM5	UBQLN4	C21orf59- TCP10L	
SFT2D1	MZF1	NOX5	ATRIP	KDSR	
TMEM156	RPL37A	CHST11	TUBA1C	Zyg11b	
MSX1	HCST	RHBDD1	GLT8D2	DCN	
BIRC2	LAIR2	DNAL1	TMEM159	KCNAB3	
TRUB2	KAT7	RPS4X	MAGEE2	PTPRR	
Kat14	CCDC140	LOC107987559	ACAD10	FERMT3	
PM20D2	KIR2DS4	ATAD3B	BMP7	ZBTB6	
EPS8L1	CASP1	CAPS2	ATP9B	C1QC	
PPM1G	PAX3	DYRK2	HOGA1	LRRC8D	
TULP1	OPN4	NECAP1	IL20RA	Srgap3	
ALG11	FGF7	NELL1	SLC25A51	SEMA4D	
GPR12	CDK5RAP1	NOL9	CCDC120	DPH7	
DUSP16	COPS6	QPCT	KRBOX4	ACAT2	
NO_MATCH_203	CTBP2	NDUFAF4	C21orf58	LINC01588	
PARP12	BCAP29	PRKG2	HEATR1	HIF1A	
CHGA	LOC107984058	DBN1	OR6F1	TADA2A	
FGF14	FAM118A	RASSF7	PHKG2	ITPRIP	

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 6】

PCDHA12	ZNF80	TMEM70	ZNF302	GDAP1L1	
STX8	NPR2	ZNF267	RPL17	GPRC5B	
MME	CYP11A1	GPR26	SLC22A12	SYK	
LALBA	RBBP8	RTP5	CHST6	GPR157	
STX2	FBXW11	MVD	VSTM1	SPINK7	
IPPK	SPIN1	PON1	TMEM47	NO_MATCH_86	
STYX	NUP50	UEVLD	TXLNA	DEFA3	
OR10H1	RDH11	HSPA1L	WNT9A	C12orf40	
MAGEB3	PRKACB	TIMM23	PALM	PPP1R2	
RAB14	ZNF747	KCTD17	TFF3	ECT2	
FMO4	SMARCC2	LOC102724151	H2AFV	NACA2	
PTPN14	MAGEB4	DGAT2	PDK1	STS	
LIAS	TOX4	ATP6AP2	TMEM41B	CNRIP1	
FGG	DPP6	CD164L2	OR1S2	C11orf42	
AP1AR	MIPEP	MRPS30	ZNF112	LONRF1	
POMT2	KRTAP12-2	LRPAP1	RSL1D1	PKDCC	
NO_MATCH_227	SCO2	UQCRC2	TM6SF1	KLHL31	
SLC18A3	UBE2R2	NSMF	SWAP70	HUS1	
GPR160	SNRPG	ABHD5	KIAA2013	RABL2A	
SLC30A1	RSPH1	NECTIN4	SLC23A1	EPHA6	
SPDYE4	MAK16	GRID1	BST2	MGC16025	
NCEH1	UNC5CL	DNALI1	FMTT	NO_MATCH_261	
FAM118B	CCNE2	NDUFAF5	EXOSC10	SGO1	
SEC22A	ASIC4	METAP1	FCRLA	SCN1B	
MEX3B	SPINK1	SCOC	NR1H2	SPHK2	
TBC1D2	KRT40	TMEM5	PACSIN3	TMPRSS12	
GRK2	NT5C3B	C3orf36	ACTR6	ODF1	
HPRT1	STPG2	GJA5	MAPRE2	ADIRF	
GTF2H3	ZNF454	TEKT3	LIMS2	TRABD	
PDCD4	TMED10	DAXX	L3MBTL3	FGFBP2	
ENAH	TIPIN	LOC105376844	CAMKK1	LGALS7B	
MAGEC2	THRB	PPARG	FBXO4	C11orf71	
SPDYE1	LARP4	GALNT5	ABHD17A	RPL30	
TRAFD1	FOXG1	PAK1	CLECL1	PIGG	
ITGA9	SNRPD1	CXorf66	TDP1	ARHGAP28	

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 7】

TIMP4	GTF2A2	ZNF276	TNFSF9	Usp48	
GCHFR	PRKRIP1	CCDC17	CCDC65	C19orf57	
RBPMS	ID12	NDST3	PRPS1	APCDD1	
TMEM263	ALKBH1	NO_MATCH_45	NOV	PHC3	
KHNYN	MORC2-AS1	SMCHD1	REPIN1	KCNQ2	
FGGY	HSD11B1	CNNM1	SOCS4	CPED1	
KRTAP8-1	RD3	SDC3	FAM189A2	NPHP1	
CLDN14	CDKN2AIP	EVA1A	TAS2R31	GATAD2B	
WDR36	CBR1	LGMN	TUBB4A	ALG3	
RARRES2	NSUN7	CLIP1	ISCU	PTPA	
GRINA	RALYL	ZNF32	GOLGA7	ANKS1B	
RNF20	MAP3K9	PENK	BTN2A2	HINT2	
NO_MATCH_274	NCF1	GALNT12	KLC3	ARRB2	
TRMO	CCDC141	MSS51	OR14I1	C8orf46	
KIFAP3	WSB2	JPT2	DCAKD	IGFL2	
MTMR7	APCDD1L	TAGAP	APBB2	LATS1	
NANOG	NO_MATCH_222	GNPDA1	NO_MATCH_108	C2orf82	
USF1	SLC35E2B	UFC1	XLOC_011808	NO_MATCH_83	
CDC25A	HIST1H2AA	VSIG8	APOC3	RNF217	
ZNF18	ACP7	IGFBP5	SRGN	INSR	
CDH6	TAS2R43	TDP2	LIPA	SMPD3	
MRPS31	GTF2F1	WDTC1	LIMD2	SUSD3	
PDCD6IP	ZNF562	ERN1	LINC00895	CST9L	
PAPD7	FGB	PYCARD	UFD1	PAX4	
PPP1CB	EPHA8	UBXN2B	COCH	DHFR	
NXF1	CYP2W1	TUBA3E	POLR2F	KCTD21	
COX7A2L	MED21	CD248	HYAL1	PTPN22	
MMP14	QKI	PLEKHA1	RAB34	RDH5	
GPR3	SLC17A3	PLEKHS1	OR2L13	MTRF1L	
PHF20	ARRB1	PTPRO	ZNF287	MT2A	
SMG8	ATP5F1	HLA-G	Naa10	ANKRD13D	
ALAS2	RARRES3	GBP5	USP6	LCE3D	
POLH	ZKSCAN8	FN3KRP	PACRG	ARAF	
CDR1	NFU1	SUSD4	MAGED2	ZNF641	
SNX18	CDC42EP1	SPCS3	PSMC1	PIAS4	

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 8】

HMX2	TLCD1	KMO	MED22	ARHGAP5-AS1	
SCGN	KCNA10	NIT1	S100A11	FZD10	
OVOL1	KRTAP13-2	HSPA6	SFXN4	ASXL2	
GDA	TEX2	OTULIN	KCTD16	CAPN5	
SVOP	NKAIN1	COL23A1	CYGB	Sgsm1	
ZMYM4	MPP2	EPS8L2	HSPB6	NO_MATCH_228	
ANKRD46	TBC1D19	NR2C2	FASTKD2	ZC3HC1	
RCBTB1	LARP4B	SSX2IP	P2RX4	ZFHX2	
CCDC6	XLOC_l2_000915	PIMREG	FAM3B	XLOC_l2_009492	
DOCK4	Aak1	PPIE	CSAD	DMRTA1	
CSTL1	CIB2	MAP3K7	CNMD	LHX8	
NR0B1	FCF1	CEP104	TBC1D3J	SERPINB13	
WWP2	MDM4	A1BG	NBPF6	MTUS2	
CCDC122	TMEM184B	PRKAG2	KRT81	PIGZ	
ESM1	MCPH1	METTL2A	JTB	NO_MATCH_143	
PRKAR1B	DONSON	LINC01561	ZNF563	TUBE1	
PIF1	RGL4	VPS4B	RNF185	CPNE8	
KCTD8	FAN1	HIST1H2AL	ULK2	FRG1	
DNASE1L2	TPR	NO_MATCH_126	C9orf64	IGIP	
GCDH	SBSPON	SDHB	SMIM7	Akt1s1	
SNAI3	DPH2	SNPH	TRAM1L1	ATXN7L1	
GDF11	SLC7A9	OR12D3	NO_MATCH_119	TRIM11	
HORMAD2	RNF26	CYP2J2	STH	FHL3	
ACAA2	IFNA7	AIFM2	NO_MATCH_75	FEN1	
SEMA4A	PRKAB2	TCTE3	MISP	ENO2	
ZNF548	CSNK2A1	LSM1	LPCAT4	CDC20	
ACER1	FAM163A	LTF	E4F1	SMPDL3B	
TMEM259	CLCNKB	USP16	SNRPC	SRP14	
GNS	FLRT1	MAS1L	KCNS2	WFDC10A	
PLEKHB2	PNPO	ZFC3H1	UQCC2	TFPT	
CHEK1	PLB1	BUD13	PCDHB4	SYTL1	
NAF1	TRMT61A	NDUFA10	SESN3	PLPPR1	
RLIM	HYPM	TPGS2	NO_MATCH_55	UBXN1	
TSSK3	SULT1E1	POM121	APOA5	SCARB1	
BHMT2	UBAP1	SLC35A4	SH3BGRL2	B3GNT3	

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 9】

RBMY1J	PODNL1	TNK1	GADD45B	FARP2	
EXOSC4	ATP5H	G6PC	PCOTH	CRYGA	
FRMD6	ZNF597	INHBC	FAM13C	ZNRF4	
TBC1D22B	RUNDC3A	CDC42SE2	LOC102724652	CCDC155	
IKBKE	SFTPC	FBXW4	DNAH17	IFT43	
LOC153684	NLK	MSANTD2	TBP	RGS3	
OXNAD1	NFIB	RSRC1	RCAN1	PCBP3	
LHX6	GRIK2	ANTXR1	TMEM266	FBXO10	
LSM14A	RPA2	SLC2A12	CASQ1	CENPN	
NDUFAF7	POLDIP3	CCDC88C	SARS	CORO6	
SORCS3	Rictor	AQP12B	RTL8C	HECTD2	
PRRG1	C9orf106	TYW1B	PRELID1	UQCRB	
FZD9	NFIA	GSTZ1	DYM	SCEL	
TEPP	RARS2	NIFK	CPA6	RPL22L1	
RGP1	MED18	CNTN5	OR2A25	CA8	
CNOT9	FPGT	TM2D3	FTO	ZNF677	
NO_MATCH_3	RIDA	SMAD7	PF4V1	ETS2	
AIFM1	EIF1B	ZNF595	ATAD3A	TFPI2	
HRASLS	PLCB2	PIGY	XLOC_005142	INIP	
TKFC	OR4N4	NARF	HPSE	FADS2	
HDAC5	DLC1	BLCAP	LYZL6	SFTPA2	
Fam122a	ATCAY	SF3B2	UTP15	TM2D2	
NASP	KRT2	ATRAID	ITM2A	MTHFD2	
ABLM1	XLOC_12_006014	SLC16A10	PDLIM5	TPRX1	
RCC1	PLRG1	SRI	DNAJB9	LOC440700	
LUZP2	UIMC1	ESR2	KIAA0825	CATIP	
LDHC	KRTAP4-1	PAAF1	C22orf39	HFM1	
FOXN2	GAPDH	KANK4	ZNF550	ZBTB25	
HAUS4	MED10	ENO1	GDF5	NUDT5	
ZNF101	OR5M11	Olf981	RPL28	OR10H2	
LOC102724159	FMC1	DNAJB11	IQCA1	RASD1	
NO_MATCH_205	BTB	C10orf91	SNUPN	HGF	
TWINK	ALX3	TESPA1	C1orf35	CDKN2AIPNL	
NIF3L1	ABHD8	CABYR	CRYZL1	TNF	
PRPF38A	LCN10	PRSS38	DUS3L	SPTSSA	

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 0】

HIRIP3	CLUAP1	HOXB1	WDR86	OTOP1	
MFSD7	CASC4	PCGF1	CCDC78	OSBP	
BOLL	PHF6	PART1	RFTN2	PTPRN	
FZD6	COQ3	DEPDC1	TAS2R9	STOM	
MAP3K8	ALKBH4	FAM109A	ARHGAP17	SPTLC1	
ACRV1	POLE4	PRPF3	NO_MATCH_178	CCDC183	
SLC36A4	TTC23	RPL7	COPS4	DUSP4	
CTCF	PAN3	CDH8	UTP23	MED9	
P3H2	ACSL5	C16orf52	GPR148	GK2	
TMOD2	PDZRN4	TPCN2	ZC3H12B	CCDC148	
TTLL4	STRN3	GPR52	RBP7	DHPS	
DNAJC17	LINC00526	SPP1	C18orf54	ADCY2	

10

【表 6 - 1】

表 4 : O R F ネガティブスクリーニングヒット (遺伝子記号)

20

遺伝子記号	遺伝子記号	遺伝子記号	遺伝子記号	遺伝子記号
IDI1	TKT	AGTR1	SPACA1	C1orf27
MTHFR	RABL3	TAC1	TMEM59	APH1A
SLC24A5	ATG9B	ARG1	STOML2	HLA-DOB
ATP4B	OR51Q1	ZNF575	RNF144A	AP2B1
SLC8A3	GBP6	NO_MATCH_107	NEGR1	TXNRD1
ACVR1C	PRSS48	GSK3A	NO_MATCH_190	C17orf53
FANCD2OS	RHBG	GJA1	KRTAP10-7	TAS2R20
OR10X1	C2orf48	GALNS	EXOSC9	FZD4
CDS1	EXOSC8	PIK3CD	REG3A	TMC4
CCNJ	GAR1	RALGAPA2	ZNF322	JAK2
TUSC2	MS4A2	METTL6	NKD2	SIAH1
CIB3	SERF2	IGFBP1	HERPUD1	LAMP1
CCNG2	NUDT1	CYP1A2	MMP7	CHD9
AURKA	YIF1B	CDC25B	C16orf92	IP6K1
TMED3	TXNDC11	Rasl10a	S100A7	AFMID
XLOC_005466	SERPINE2	TMEM230	LURAP1L	ANKRD42
BDKRB1	AQP7P5	HSFY2	CNFN	CD70
TEFM	DUSP9	PANX1	SLC22A23	TMEM220
RPS19	TANK	C11orf74	KCNN2	PUSL1

30

40

50

【表 6 - 2】

AMN1	SMAD9	NPHP4	ANKS6	RIOK2
SYPL2	KLK6	RNASET2	ZFPL1	FAM196A
EID3	MS4A13	OSTN	LINC01580	NUDT9
BLOC1S5	TMEM242	LSM7	ECEL1	CD28
AGT	PI4K2A	VWC2L	SLC2A3	SP100
ANAPC7	MPP6	TRIM43	RDM1	MXI1
NO_MATCH_20	C19orf48	OR6C4	CD36	FRMD5
PDLIM3	BPNT1	DERL1	RCN2	GPATCH2
EEF2	NUDT18	LRRN2	NO_MATCH_28	NO_MATCH_175
DNAJC8	DRD2	UBE2J2	HDDC2	SYT2
HEXIM2	ADRB2	DCAF4L1	SIGLEC6	HARS2
ITGB3BP	KCNMB4	GHRH	C8A	ARMCX1
SUMF2	COMTD1	ABCG2	ATXN7L3	GCFC2
CHCHD10	UGT2B4	GZMM	WNT16	SUDS3
KIF16B	KIAA0895	LINC00486	CSNK1G3	TMEM9
RTN4IP1	OTUB1	CARNMT1	RIKN	NAT14
OR10G8	M6PR	TMEM241	ATP6V1G1	FAS
CYR61	NDUFB3	PADI1	CD79B	ZNF354A
TTC25	NFE2	XLOC_I2_009136	PDGFB	FOXRED1
NPM1	NO_MATCH_260	KRCC1	DENND2A	EQTN
NOD1	ZNF181	GAGE2E	KCNMB1	MARK2
KITLG	TFG	KL	XLOC_013923	ISYNA1
ANAPC15	KCNMB2	PNPLA6	MRTO4	NO_MATCH_148
HBE1	LAMC1	PAPLN	XLOC_I2_010863	CEP76
CCDC25	ACTR10	SLC9A9	IDH3A	STAT3
MAP3K20	EAF1	SPCS1	BABAM2	PLD6
SIPA1L2	MOB3B	KRTAP3-1	RABEPK	SNIP1
CHKB	HYOU1	SUPT20H	PRB4	IMPDH2
ARHGEF35	FAM149B1	TMEM216	RUSC1-AS1	NO_MATCH_158
CHN1	ZNF285	NO_MATCH_44	RCAN2	TACR3
TROVE2	MRPL20	DRD5	TMEM196	SLC31A1
OR5P2	GRAMD1B	FMR1	LATS2	WWOX
SDS	C6orf48	TRPC1	C9orf16	MSL2
RNF38	TMEM116	KCNK17	TRIR	GTPBP10
CASP6	ASL	CFAP20	NO_MATCH_114	C19orf70

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

THAP1	LCLAT1	TRPC7	DSCR4	AMY2B
LOC151760	PAICS	CDC26	CYP7B1	MAOB
EPM2A	RPF1	CERS3	EPN3	LAG3
LINC00305	RNF126	RXRG	ZFYVE19	ZNF658
EPDR1	GJD2	NGDN	GRIP1	ADRA2A
STX19	LINC02449	SLC6A5	SKA3	CPNE4
BCL2L12	MSI2	VHLL	ZNF212	ETFDH
RAB33A	WISP2	POP5	LRRC61	RBM26
TMC7	MRPS33	KRTAP9-3	TSLP	MAMDC2
OR2B6	MLF1	MRPL11	ZSCAN26	RELT
SFTA2	RAB17	WDR77	NMBR	PSMA8
SLAMF6	DMAC1	R3HDM2	MVB12A	GMCL1
NYAP2	NPM3	STK32A	BTC	NO_MATCH_95
OSMR	TRAPPC6B	ACOT8	PYGB	ETV1
DHDH	XAGE3	RPP40	ASCC1	PTPN18
Dmc1	ODF2L	EPHA4	SLC2A14	LARP6
ZNF148	CYC1	APOPT1	SND1-IT1	CCNL2
TMEM206	SLC25A48	B2M	VDAC3	ST3GAL3
CTH	TGM4	TLNRD1	CASTOR1	C11orf16
AIF1L	DCANP1	SLC38A6	CHUK	NPB
KLK7	FIHL17	NO_MATCH_13	UTS2	SLC26A5
RASAL3	SH3GLB2	OR51G2	NAIF1	CPSF7
PIGX	NFYC	OR2T27	NO_MATCH_157	DKFZP434K028
COA5	HPX	SDHAF1	RPS2	NAT9
FAM166A	TMEM100	SPATA8	DHX37	INSIG2
STKLD1	FCER1G	FBXW12	IMP4	PRKCQ
TAX1BP3	MEAF6	GAL3ST1	CLCN4	ST7L
ILDR1	TWISTNB	Trim41	TRIM13	BCKDK
MLIP	HYI	TP53INP1	SPACA9	EIF6
UPK3B	PHF7	SNX17	TMEM53	NOLC1
FABP7	BIVM	RRAGC	CRK	GPAM
CYP4F12	USMG5	KNSTRN	HTR1B	OSGEPL1
OR2F1	SDF4	BAMBI	PNP	RPUSD2
PLXDC2	VSX2	NME4	GCLC	RNASE7
DEGS1	SERF1A	KCTD3	RPL13A	ANP32A-IT1

10

20

30

40

50

【表 6 - 4】

CHIC2	ZNF468	LOC107984056	CEP290	COX4I2
TMX1	POLD2	NO_MATCH_164	ISG20	RDX
CHCHD1	THEM6	RNF32	FAM153B	KIR2DL2
EPHA7	EPO	Clpb	LINC00479	SLC25A25
PIP4K2B	MLC1	PPIAL4C	SLC25A39	NHLRC4
TBCCD1	CLRN2	GTPBP3	SNHG11	PMCH
DCUN1D1	RPP14	BALAP2	CPXCR1	CBX7
PRRG4	CTSS	NUMA1	PIK3CG	LYAR
TNKS2	PGPEP1	USP28	CCR7	CTSV
PVALB	PGM2	IDNK	PDLIM4	TSC1
SAE1	PDHX	BCO1	UBE2V1	JPT1
NAXE	SPG11	GEMIN7	MTFR1	QARS
ATP11B	CENPL	HSD17B7	ZMAT5	DDX49
SORD	PNPLA2	UQCC1	MAN1C1	GPR27
MSRB3	KCTD21-AS1	TUBGCP2	SKA1	C6orf141
ATF6B	ERG	RPLP0	LRRC20	TIMP3
CHGB	NO_MATCH_79	COX17	AGXT	DIS3
SNRPB	SGMS2	ATAD1	HIST1H2BJ	TRMT11
MECR	MTERF1	MELTF	IP6K2	PKN3
MMD2	NPPA	PIGK	FAM71F1	CMSS1
CATSPER2	RSPO3	CRYBA4	CRMP1	HMGCL
SLCO4A1-AS1	MAFG	SYAP1	TRMT112	DAND5
GYPB	SLBP	ACOT6	RPL37	ICK
RWDD4	ATP5S	SOCS2	ALG14	SRSF12
ELMOD1	RPS10	SCYL3	P2RX7	RNF114
PSMA5	CATSPER2P1	KCTD5	CAPNS1	MKS1
NCF2	CENPO	PSMA2	ENPP5	SYNE4
GPX7	IFNLR1	CDKN2A	PLIN5	ANAPC5
SLC30A8	OR2G3	NO_MATCH_242	XLOC_006950	NEFM
ZNHIT2	MOCS1	TMUB1	BBS9	GPR132
TYR	SMPD1	LGALS3	ZBTB24	ZNF324B
ANKRD34B	TK2	HSPA4	LOC105371303	ALDH1B1
EBP	GDI1	TMEM267	LZIC	TMEM248
SH3BGRL3	TRPM1	CAMK2G	GSAP	TMEM81
ERAL1	SELENOV	CCDC167	NO_MATCH_125	COLEC12

10

20

30

40

50

【表 6 - 5】

IL32	IFIT2	SPATS1	DNAJA1	CNR2
MOAP1	C19orf12	VWC2	NO_MATCH_234	NO_MATCH_30
WLS	C12orf66	UBE2W	CCDC96	CXorf38
ADAT1	NO_MATCH_276	BMPR2	CYP2C18	NO_MATCH_156
BIN3-IT1	RTL3	ZNF542P	TEAD2	ORAOV1
ACADL	TUBB2B	TRAF4	SGTB	CRTC1
ATF2	METTL1	NOTCH2	KLK2	CYP1B1-AS1
COQ5	PARP15	PSTPIP1	KCNJ3	XLOC_12_009493
HPGD	CTSG	C7orf34	HASPIN	AGTR2
NT5DC3	TEAD4	S100A10	AMBN	NDUFS1
BMF	OR5AK2	MT4	SELENOF	HLA-DRA
PLCXD2	TMEM165	ZNF398	SMAP1	DSC2
PFKFB1	C14orf177	INS-IGF2	FSCN2	IQUB
CDK5R1	KCTD6	ALDH1A3	KRT19	CCKAR
LRCH1	ITC33	ZSCAN16	RAPGEF4	SUFU
PLEKHJ1	RAB3IL1	FADD	ZNF254	TOMM70
SULT6B1	SPESP1	COX16	MSMO1	PCGF5
SEC61B	KIF12	TCF23	BANF2	MRPL51
RCN3	FTCD	ATMIN	DCUN1D4	CCDC150
ADIPOQ	NO_MATCH_64	RADIL	REG1A	RBM43
CDC45	VAT1L	H2AFY2	ITFG2	PELI3
UTP11	DISC1	TAS2R38	TNFSF13	EFNA4
PITPNB	NO_MATCH_250	NO_MATCH_105	C12orf74	ZNF582
AGPAT1	SMG6	C18orf21	WDR19	CCDC178
LINC00574	KIAA0408	TAAR5	RAG2	PPAT
XLOC_12_009889	ABLIM3	LGALS8	FTL	MBTPS1
RXFP4	RAMP1	DHRS2	AICDA	PRPH2
TEK	FRZB	SRPK3	HIST1H2BO	SLC51A
GPANK1	MYL6	F11	TMEM9B	BMP5
ZNF517	Hdac7	SH2D2A	ZNF830	ZNF655
CYB5A	NKAIN4	MAN1B1	CASC2	FAM171B
GMFG	CLEC12A	TNNC2	FKBP2	GSTA1
CDK7	TAF6L	SLC26A1	NO_MATCH_23	KLK12
BTN2A1	TNFRSF1B	TSR1	MRPS14	DVL2
FAM136A	RPLP2	ITM2B	PF4	DCAF8L2

10

20

30

40

50

【表 6 - 6】

MAP2K4	ETHE1	MMP2	SLC25A47	CNOT10
EPB41L4A-AS1	ACSM5	OR2T33	LRRC19	KLHDC7B
C7orf49	P4HA3	XLOC_I2_004853	FN3K	EVI2A
XLOC_001164	TRIM65	CRYBG2	SLC25A29	KANSL3
OGN	DDX47	KIF1BP	YIPF2	XLOC_I2_000394
MFAP3L	KIF26B	PRR11	NCAPD3	ERVK3-1
BICDL2	BIN2	LRAT	FTH1P3	RPS6KA6
IL16	SNX21	FHL1	AZU1	UQCRC1
TTI1	CCDC9	KCNA5	NEK5	ARFIP2
LAP3	CD69	ISOC2	RNF31	LZTS2
RAB3D	ADAM33	Bloc1s1	C16orf87	RIC8B
LRRC8B	CHRNA1	KRTAP19-5	RNF146	CCNI2
TRIM39	KRT18	ANKRD39	RPS15A	P4HB
XLOC_005923	FAM105A	PIP5K1B	SERINC4	SRSF6
S100A14	FSD1	GPR31	TACC3	HACD2
PSMB9	SCAMP3	SAMD4A	LYSMD3	EPN2
RNF170	CISD1	PKD2L2	LMAN2	DEPDC7
PLBD1	DERL2	GCSAML	CD244	RHBDF2
TPRN	DMC1	GABRD	ATP5D	PRPF40A
NXPE3	HBZ	GDE1	PSMG2	OR2A2
TRIM6-TRIM34	NO_MATCH_183	ZACN	OSCP1	PCDHGA7
SLC25A21	GOLPH3L	XLOC_I2_004594	ATP6V1F	HTATSF1
HAS3	CCR1	COL10A1	C20orf24	SPATA17
HBM	COQ8A	TUFT1	DYNLT3	MYLK2
KAZN	C5orf51	ATAD3C	TOR1AIP2	FOXR1
MPP7	HTR3D	ABCA3	ZNF695	MMADHC
MYZAP	XLOC_013281	RPEL1	CCDC27	DBNDD2
LBX2-AS1	BAG5	PCMTD2	SLC39A1	LRRN3
FTSJ1	GPATCH11	LINC01341	FZD5	SPAM1
ENOSF1	LRRC29	SLC12A4	MANSC1	PSCA
SNRNP35	RNF138	MUM1L1	TEX26	CERKL
AGPAT2	SEPHS2	GEN1	POLL	TRPC3
KCNJ13	MRPL13	UBAP2L	XLOC_I2_003293	CDKN1B
PDXDC1	CXCR3	DDX50	DEUP1	DTNBP1
PANK3	DUSP10	CCDC81	OARD1	MRPS34

10

20

30

40

50

【表 6 - 7】

TMEM39A	KCNJ14	CCDC62	CDRT15	CCT6B
DIXDC1	SLC6A1	BCS1L	NO_MATCH_232	ZBED5
AHSP	SEC16B	C4orf47	CH25H	ZC3H12A
ODF3L2	ADK	BRAF	JADE2	LRCH3
FBXO15	HDAC1	AQP3	ZNF343	NO_MATCH_140
DPP7	HNRNPLL	DIAPH3	OR2J2	H2AFJ
CDH17	SLC5A11	COTL1	AHNAK2	FRS3
DUS4L	NUDC	Sec31a	HIST1H3C	NARFL
PIGV	TMEM11	NME6	SIX1	ELK1
UCN2	WNT7A	4-Sep	SUB1	SYF2
EGFL7	B4GALT4	OR1D2	NO_MATCH_41	PRRC1
NO_MATCH_266	ASB11	ZNF662	CLIC1	ZRANB2
NME2	RRM2B	TTL7	TAS2R8	PPIL3
RGS5	KLRC1	PSMF1	NO_MATCH_103	CIART
DCAF7	TMBIM1	DMWD	C5orf64	CCT3
OCIAD1	DUSP13	ALKBH2	BCAM	PRNT
Ints11	ACTL6B	NAT8	USP18	DVL1
NXT2	GCNT2	CDV3	PPP1R1A	WDR76
POLR2E	CFAP53	FUCA2	SAP30BP	SYVN1
STEAP1B	NAP1L3	BAG1	CLYBL	IP6K3
NUDT16	RNASE6	CYP2A7	PFDN1	VPS41
ZSCAN1	SIGLECL1	GLIPR1	TMEM40	CCDC144A
XLOC_l2_009790	MCUB	LIX1	RPL11	MYH7B
NO_MATCH_264	ARHGAP26	RND3	FCER1A	PPFIBP2
CKMT2	OR52L1	TAS2R14	C11orf68	TEX10
ARMCX5	GPR153	FAM27E4	HCRT2	NLRP10
TAS2R45	ZNF280A	OSM	BAGE	RBM42
L3MBTL4	CARD9	MBLAC2	SPANXD	SERPINA7
NSFL1C	SLC9A2	MAF1	CDK1	CPM
XRCC6	ARHGAP12	PARP3	HIPK3	NO_MATCH_230
ACOT12	RRH	CPB2	IGLL5	SBF2
SSBP1	TRMT13	MRPL52	PGLYRP3	EPM2AIP1
RAB30	ARMC3	RAD23B	XAF1	GALR3
INGX	TCIRG1	NO_MATCH_199	NO_MATCH_188	ZCCHC8
WSCD2	ANO6	EIPR1	TKTL2	PURG

10

20

30

40

50

【表 6 - 8】

HACL1	EXOC3	CNKSRI	PATL1	WBP4
CDK8	FKBP4	SBNO2	WNT2	RAB1A
SLC5A9	MEGF10	TEX19	COG8	KCND3
CLN6	TMEM256	TCAP	TFRC	SETD9
MMAA	TMEM222	REXO5	TMEM2	FOXD4
TGM3	HMBS	FAM220A	MRPL49	DEXI
RHPN1-AS1	THBS3	ASTE1	C11orf72	NLRP4
GALNT6	FIS1	ANGPTL7	TMEM89	SLC9B1
ZNF114	PAEP	NSUN6	HMGN1	KISS1R
CNBD1	LMX1A	FAM20A	OLFM1	TIMM17B
COMMD10	CCDC102B	CHMP2B	CD6	MAP10
FIGNL1	YWHAEP7	PRRT2	N4BP2L2	Rassf3
Arnt	FAM234A	CYP24A1	HIPK1	CASP2
S100A8	MYL10	GAS8-AS1	GPR171	TAF1C
LRRC28	NEDD9	CTSL	RAN	LINC01600
LMO2	TOMM7	HBB	MTMR11	NO_MATCH_15
PROSER2	LOXL2	DNAJB3	OR2C3	OR52B4
PRAF2	OR13C5	ARCN1	REL	PEX13
GNG3	ZFAND6	SSFA2	CYTL1	ABL2
B3GALT2	OR6N1	ECH1	ETV5	ERLIN1
NIPA1	KCNG4	SEC63	ZNF438	MAPK11
HEATR9	RFC1	TMOD4	NAGS	C8orf31
PSMD10	ADAMTS4	XPO7	GRM5	XLOC_012222
ABCB6	CCL20	MYCT1	REM1	FBXL20
CDYL2	PPDPF	GPAA1	LY86	KRIT1
S100A12	EFCAB1	CPNE7	NO_MATCH_136	ZBTB10
ZSCAN20	PBLD	TRIM3	CLEC1B	ALOX15
TTC41P	CLEC11A	RMDN3	SYT5	CHRNA3
OR2T10	NDUFA4L2	ANXA5	Ube2o	SYT1
TBL1Y	C6orf226	DIMT1	SLC27A1	PEX5
XRCC3	EMC3-AS1	C1QTNF9B	FSIP1	SULF2
MAB21L2	IL23A	FXVD6	SEC14L3	RABEP2
BOD1L2	CNNM2	HIST1H1A	UBTD1	RNF111
FGFRL1	RPL23A	CD52	OR56A1	ACPP
SLC26A9	PEF1	JAML	ALMS1P1	NELFE

10

20

30

40

50

【表 6 - 9】

RAD1	TSSK6	RBM4B	DAPP1	PLEKHO2
CMIP	NO_MATCH_184	NR4A2	LY6G6D	CLK3
CNP	LEMD1	UBE2D3	NO_MATCH_102	OR6C1
SDR39U1	IFT57	SCRN3	DSTYK	GAREM1
HMGA1	HSD3B1	ZIC1	AASDHPPT	NCLN
CYYR1	OXT	QRICH1	HORMAD1	SLC52A2
RNF167	NDUFV1	VPS52	LRMP	ZBP1
DTX3	MRPS12	ARSJ	TMEM87A	ADGRE1
MT1B	TM4SF4	FAM168A	DRD1	SCTR
CD3D	SLC6A7	NCR3	DKK2	TTC19
CXorf40A	FUOM	HMMR	NO_MATCH_245	MKL2
BEX5	FBXO48	HDAC11	FAM71A	PURB
TMEM151A	CSNK1G1	ID2	CDC34	DOHH
LOC439933	XLOC_008618	ANKRD13A	XLOC_I2_000581	NO_MATCH_244
KIR3DX1	RASSF6	PIKFYVE	CTSE	SMURF1
SUPT3H	SNX12	MYBPHL	IYD	SGSM3
A2M	NRN1L	DUSP18	TOE1	HTN3
MRGPRG-AS1	FBXO7	MDFI	SERPINC1	MOC52
DQX1	WFDC5	MRPL38	UPP2	LAIR1
XLOC_013207	OR52I2	IPMK	KXD1	TEX30
ATP6V0D2	TNNI3	HAUS2	FAM221A	REEP1
ZNF726	PRR22	CMBL	OLFM4	PROK2
ZNF490	RASL11B	HSPA2	NAT10	COPRS
CDKL3	PCED1A	WNT3A	KIAA0513	SULT1B1
GABRA3	NECTIN3	TTC28	LMCD1	DHRS7B
MAP4K1	PPP1R15B	EDDM3A	GRN	DNAJB14
LIN7C	CCDC107	ASB4	FAM19A3	TRMT1L
FXN	GPAT2	GALK1	CCDC54	ZNF346
SERINC2	CEACAM1	SGK494	ANKRD50	UNC50
APOF	NO_MATCH_273	DNAJC4	LRRC71	ARMCX3
HS6ST2	CRACR2B	SPATA1	SPSB1	XLOC_009028
TMEM126B	AVPR1B	SRPRA	MPP3	MYLK3
BUD23	MUM1	TMEM211	CSGALNACT2	NFIX
TTL10	TGIF2LY	ELOVL1	NO_MATCH_258	GRM6
LARP7	C8orf49	ATP6V0B	URM1	C19orf66

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 0】

VPS33B	SLC31A2	NFAM1	FAM98C	MORF4L1
CYP27B1	AIMP2	TM4SF19	LOC440570	PANK4
HTR1D	PPP4R4	MAPK8IP2	ARSA	PRAM1
RAD9B	PTGDS	OXCT2	IGFBP7	PELI2
NAA30	RPN2	GLUD1	HLX	CAPN2
DHX30	SH3GL2	ISL1	CCL21	CLASP2
LINC01620	ASTN2	TMEM107	CYP8B1	TRIAP1
DNAJC14	SLC25A38	TPRG1	GABARAPL2	PPP1R18
MYL5	CGA	MTHFSD	IFIT1	NO_MATCH_8
NO_MATCH_206	HRH4	SHMT1	C2CD2	EPB41L3
EDIL3	MCRS1	IFT20	SCGB1D1	OAS1
FNDC5	IGFBP4	GPX1	VPS29	KBTBD4
BDH1	CLASRP	KIF25-AS1	EPB41L4A	ACAT1
GPR37L1	ZNF653	ORC6	TRIM74	ERVW-1
GNG12	AMBP	C3orf14	MEPCE	C1QTNF9
RNASEH2C	LINC01547	A1CF	ESS2	TXLNGY
HIST1H1E	PRKAG1	MPIG6B	COX5B	ADRB3
SCMH1	SEC11A	TXNRD2	CD276	DAB2
RNH1	RBP2	SPC24	SLC48A1	PHOSPHO1
HAT1	IHH	CDIP1	BPIFB1	DSCR3
TMEM14A	Churc1	PRR30	HIST2H3C	NOTUM
ZADH2	NO_MATCH_51	METTL15	HADHA	ESRRB
Rpl3	STAT5B	DNAJC5B	DLD	AMPH
HIST1H4L	DAO	BRAT1	Ptpf39	GGTLC2
MXD4	LIG3	OGFOD1	STX12	SH3GL3
PDCL2	CALM3	JADE1	ADGRF5	INPP5E
SMDT1	RAE1	FRYL	NO_MATCH_149	MAP4K3
CLK2	ATP5B	SDHAF3	SMPX	ADAMTS15
NUP210P1	RLN3	HLA-DRB5	MPI	RAB9A
PDE6H	C5orf49	SPIC	FAM209A	FZD3
HGFAC	FANCC	DPP4	SUCLG2	P2RY8
LINC00671	CHCHD7	HIST1H2BH	FOXP1	SRPRB
LOC105369201	MDH1	HSD3B7	MPV17	SERPINA10
YIPF3	XLOC_013189	SYCN	ORMDL3	UHRF1BP1L
MFSD14C	BAIAP2L2	MGC34796	RASL12	BMP4

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 1】

SIGMAR1	MMACHC	SLC25A18	CX3CL1	SFN
CCL8	DCAF8	C1orf174	PTK2B	CCL18
GNMT	CYP4A22	OR6B2	TAS2R1	ANKRD10
IL2RG	KCNK4	AOAH	LPIN3	ZNF610
STX11	MGC70870	PAF1	KIAA0391	ALOX5AP
MTERF2	ADH5	CKMT1A	BBX	MX1
LPAR6	ABRACL	ZNF524	EXOSC1	HK2
OVGP1	PHYHIPL	HTR3C	HSPH1	AATF
SYCE3	KCNJ15	LINC02370	NAE1	FUBP3
CNOT3	INSL6	C1QTNF3	FGF22	IPCEF1
NO_MATCH_25	SLC19A2	OPTN	SAT1	SYNCRIP
GNB2	KPNA3	LPCAT2	CXCL11	NPY6R
EMG1	FGF10	VASH2	CCDC43	TINF2
TSNAX	RPS6KB1	AP1S2	UCP2	EFCAB14
NIT2	CSF3	DNAJA3	PPEF1	TMEM214
STX10	RNASE2	TBC1D22A	ADPGK	NDUFA4
ACKR3	SPATA3	WIPI2	PROC	CABP1
NO_MATCH_185	EIF3D	NSMCE3	LOC107984064	ZMYND8
FDX1L	RETREG1	PXK	CCNDBP1	CSGALNACT1
CALCB	STK24	TBX20	MCEE	PSMD6
LAPTM5	HTR4	LACRT	7-Sep	RBMS3
SS18	YRDC	FAM57A	ZBPB2	CELF5
ATP5L	PHYHD1	FAM207A	LSP1	ATP1B3
KLRG2	IFT22	ZNF738	CCDC103	PEAK1
PDIA6	PMVK	RFC4	RPS4Y1	TMEM38B
DECR2	KIR3DL2	CETN3	NO_MATCH_104	LINC00597
MS4A15	DTWD2	TBCC	ETFBKMT	GFM2
C9orf24	LRFN3	TWF2	STPG1	ATP1A3
GBP3	XLOC_l2_014804	C1orf94	PEMT	CDCA8
PRKAB1	LOC107986912	SNX32	ZNF83	NO_MATCH_170
CDH23	KIAA1683	FAM102A	PIK3IP1	CLDND2
ICAM2	ARPC3	ERMP1	UGT3A1	USP14
Tardbp	DOK1	GUK1	POLR2J	ATP2B2
BLVRA	XLOC_l2_013503	TBC1D25	TMCO6	LRRC4C
ST8SIA4	FAM227B	POC1A	RPL5	THEM4

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 2】

LOC100101148	PHF10	NINJ2	PPM1M	POLR3K
SERPINA5	COL4A3BP	XLOC_005602	IL1R2	RPS13
STAT6	LRSAM1	PANK2	PTK7	ZNF23
NANS	DNAJC12	RNF213	AOC2	NHSL2
EIF2B1	RABGAP1L	MAPK9	TREX1	IGFN1
BTBD16	CXCL2	NO_MATCH_63	RTL4	COMMD5
COX5A	SCP2	XLOC_000477	KLHL28	EEF1E1
WDR46	DEGS2	INO80C	ORC4	OR8D4
AARD	FYCO1	RPL18A	ST8SLA3	SSC5D
SCGB1C2	CRH	STEAP4	RSG1	GAS7
ANKRD49	LDHAL6B	ID1	MRII	NO_MATCH_4
PSEN1	SYT9	CAPN1	NMUR1	SIN3A
RACK1	SLC35A2	DDR2	VPS37B	NFE2L1
PGK1	KHK	AKTIP	ADRM1	SLC36A3
CTNNA1	CD46	PMPCA	HSPA8	WDR34
S100A6	SIVA1	INPP5J	RIMS3	POC1B
RUFY1	GOLGA7B	TXNDC8	XLOC_I2_015213	AKR7A3
SPEG	CDKN2C	GJB5	TAF8	EXOC5
MMP10	TBC1D3H	MAP2K2	PSMD13	KRTAP9-8
MYDGF	HTATIP2	HOPX	SERPINB4	MAP7D2
OPALIN	RNF148	DEFA	LOC541473	C1orf131
CD96	FKBP6	AMIGO1	SPRED1	TRIM49
ACTG1P17	ADAL	POLR3C	AVPR1A	MAN2B2
XLOC_005712	MED4	ANGPT2	PICALM	RPL19
WDR45	SIX4	TPT1	RASD2	RANBP10
ACTL7B	PSMD9	DUSP23	SAYS1D1	ZNF800
ZBTB1	KNOP1	COLEC10	YPEL4	ZNF77
RAD54L2	SELENOH	RECK	SLC4A8	MBD3L1
NO_MATCH_43	FRA10AC1	AMMECR1L	RBAKDN	C7orf25
FAM96A	PFN4	VBP1	SLC22A24	ECSCR
KCNE1	FLT1	IFI27L1	FBXL2	IFT74
TMEM86A	MIR650	CEBPG	GABARAPL1	C17orf80
ETFB	RPL3	TACO1	SYT3	DPF1
DNAJC10	COG4	TMED6	SSX3	PALLD
PLPP2	NDP	NSL1	ASPHD2	PRTFDC1

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 3】

RALB	HSPA12B	C6orf89	ZCCHC12	ICOS
IFT80	ABRAXAS2	EML1	ADAMTS5	DIS3L
ADGRB2	MEN1	FKBPL	DHX40	MIA2
NO_MATCH_246	FMO9P	TMEM51	LOC644936	SLC37A2
ADH4	SAMD11	NO_MATCH_66	EDEM2	DNASE1L3
HYAL2	ANKRD55	LOC254896	KRTAP10-9	GPR18
CCDC50	NDUFB11	MSMB	RAB11FIP4	CRY2
NIPSNAP2	LYRM1	COA7	EPB41L2	CYP51A1
ACOT1	SLC7A8	GNLY	TNFAIP6	CHCHD4
WDPCP	C4orf26	WDR83OS	CDKL4	SLC6A13
NEK3	C7orf69	RFX2	GFRA1	LOC441242
PPP1R27	RPS6KA5	COPZ1	AP3B2	TFIP11
LRRC8E	ZNF230	LAT	RPP21	DDIT4
GAB2	AGGF1	CDH26	CXorf40B	MDM1
HOXD9	OR5F1	TMPRSS4	HHLA3	SAMD3
CHST15	GP9	S100A1	SV2B	GNGT1
SCGB2A2	SNX1	NO_MATCH_241	PTTG2	MIR17HG
HSF1	NO_MATCH_208	RAB24	ADGRF1	MRPL18
PSMB8	SDSL	L3MBTL2	SLC46A1	ERCC6L2
THRA	THUMP2	EDNRB	CCDC115	CDK18
CCDC142	TMEM88	LOC100506127	CST9	CSNK1D
DNPH1	ASMTL-AS1	XPC	SLC25A17	C22orf34
ANKRD22	PRSS2	ACTRT2	PCDHGB4	CCDC91
ST3GAL2	CGB8	LNK1	FBXO21	CHRM4
NETO2	IL33	PGLYRP4	FXYD3	EIF2AK2
Prrc2b	SRD5A3	TOP3B	CYSLTR2	C17orf102
TMEM147	OR1E2	GSG1	H2AFB1	TMEM62
HMG3	FAM200A	TCF3	NPFF	LRRC32
TAS2R41	APPL2	AREG	LRRTM2	KIR2DL4
BPI	BMPRI1B	CXCL3	HCFC1R1	FGR
DSN1	GPRC5D	CBY1	CSTF3	OXER1
UBE2Q1	OCN	PDE1A	RWDD3	ZNF461
SPINK4	CCDC74A	PRMT8	SNAPC3	CCDC12
ZFP91	LIM2	XRCC2	CNIH4	GCA
SMPD2	C17orf67	CD209	FAM167A	FAM222A

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 4】

FDXACB1	MTFMT	XLOC_I2_007835	IL22RA1	DMTN
TCL1B	CRIM1	ZWINT	GPRC5C	AFG3L2
RC3H2	DRC3	RNPC3	MORC3	UGP2
CCL16	GALNT15	TGM5	ADAM2	RUVBL2
KLHDC9	SGK1	RIPPLY2	EXOG	RAB3GAP1
OR1Q1	CCL5	NO_MATCH_209	GRM7	KRTAP19-4
FAM122B	GPR142	NTMT1	CELF4	HELLS
PPARGC1B	DARS	LSM6	RNF151	ACADM
ACTA1	GALNT7	OR2T2	PTGER2	OPN1MW2
Adamts1	FAM86C1	TAAR1	XLOC_002741	MTM1
STATH	PILRA	SLC34A1	C9orf78	NOL4
WDR74	TXN2	DCTN5	LGR6	CEP44
ZNF264	GABRE	AGO1	PTAFR	MRPL50
VCAN	MRPL9	CCND2	FCER2	TCTE1
SSTR1	LOC107984344	ZNF707	NO_MATCH_34	ZFY
PATZ1	NO_MATCH_72	FAM72B	Fam76b	NKD1
RNF34	LINS1	NPY1R	TMEM108	MCEMP1
VPS11	EHD1	RPL9	IFNE	ALPPL2
SPATA2L	RAB40AL	PSMD2	ZNF418	CAGE1
CSRN2	UBA2	IL2	ACBD5	CRNN
CADM1	CALM2	RUVBL1	ZNF511	SPATA46
TMSB4XP8	LMNB1	YTHDF3	CKMT1B	CKAP2L
ADM	HNRNPA1	SMO	QPRT	CYTIP
FCGR3A	TPST2	UBXN2A	5-Mar	TIGD3
PFN1	SERPINB9	MAPKAP1	CD274	ADGRF3
MINDY3	CLDN7	BRD3	ETAA1	KCNK6
LTK	EYA3	KCNMA1	ASNS	TAAR6
CENPT	AP1S1	ST6GAL2	PDGFRA	STRC
SPATA24	NO_MATCH_254	NO_MATCH_70	CTNNBIP1	VIPAS39
RPL10A	COL9A1	POU3F2	UBL4B	TXLNB
PHB2	GAGE12B	ATP1B1	GRB2	MASP1
ATPAF2	PFKL	UFM1	GNA11	E2F6
CEP70	SCGB1D2	MYBL1	LINGO1	SLC10A2
TMEM129	TMEM86B	CCT5	PPFIA4	CEP126
CHKA	SORBS1	NO_MATCH_195	AANAT	OPN5

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 5】

NANP	TSSK4	ZNF586	RGS11	GPR34
MRPL47	HRH3	PRPF4	KCND1	CGGBP1
MPND	KRTAP13-4	NO_MATCH_111	EZR	CELF6
MAB21L3	FAM58A	RNASE9	CLK4	MRPL16
PGC	VPS37A	RPL18	CYP2C9	C11orf84
SLC29A3	ZNF497	LINC00471	CCDC185	VPS35
AVP	TOMM5	KIR3DL1	MS4A3	ING3
PCP4	POLR2H	GULP1	PRKCZ	FAAH2
HSP90AB1	RGN	PHF19	ACTN4	PRF1
PID1	VTCN1	CRYGD	TCF19	BORCS7
RIMBP3	MECOM	LINC00312	OR6C65	TEKT1
EIF5A	LEXM	ZNF414	PPCS	BRSK2
CPSF4L	GOLT1A	RPH3A	FOXS1	DYNLL2
SLC25A27	MFAP3	HAL	RBM3	ANOS1
MLLT3	CLDN9	SLC45A2	LIPF	RPS18
NO_MATCH_247	UBAC2	TMEM72	PHPT1	KLHL14
CCDC197	ODF4	ARIH2	AMZ1	JPH1
NO_MATCH_229	NINJ1	AASDH	GPR1	SEZ6L2
CYP19A1	DSCR9	PNPLA4	TERF2IP	KCND2
ROM1	ADH7	HP1BP3	KIFC1	DOK2
CISD2	CDC123	PSMB7	YTHDF2	MAPKAPK5
PFDN5	MMP15	CASP8	XLOC_010930	TACR1
FAM212B	HSPB8	SPATS2L	GRIN2B	SRGAP1
PAQR8	NNMT	TMEM167B	LGALS14	DTNB
PRKAA1	TPH1	SEC11C	APOA1	CXCR1
TRDN	KLK15	ST6GALNAC4	REEP6	GP1BA
SLC39A11	GCC2-AS1	PRKCSH	PCOLCE2	MRPL34
OCIAD2	INPP4B	LOC105379861	KCNC4	TM4SF5
GPIHBP1	STYK1	MRPS18A	NRIP3	CDH5
ATG9A	FABP12	NO_MATCH_159	ATP6V0A2	ECHDC3
HINT1	SFXN5	FASTKD3	EPC1	PSMD7
UTP3	NFKBIB	C1D	GPR65	NAPG
SAMHD1	NELFA	ALKAL1	R3HDML	ACD
RPRD1A	ASB10	NO_MATCH_248	VMP1	DTX2
NO_MATCH_123	C19orf54	BOC	MAGEB10	ZNF512B

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 6】

SERPINA3	IQCC	TBC1D23	TARSL2	ARHGAP5
PRKCE	DPYD	LHFPL1	AK3	FASTKD5
SMUG1	INPP4A	C1orf109	CCDC105	CBLC
MTHFD1L	GABBR2	CDKAL1	EGFL8	ZNF213
MYLK	RIPK3	FAM218A	HEXIM1	KRT72
SELENBP1	CCDC196	NO_MATCH_252	DIEXF	PEPD
SUV39H2	HFE2	MAPKAPK2	DNAJC7	CCNH
UPRT	PEX11A	CPLX1	PPA2	C1GALT1C1
RGS20	MRPL17	XLOC_010007	LPCAT1	EIF2B4
GADD45G	C1orf226	PPTC7	THPO	PNLIPRP3
TGM2	KLC2	DDX39A	EIF3L	GAS2L1
CRCP	MSR1	GLYATL2	TRMT10B	HAPLN2
OSBPL11	CRYBA1	TNP1	DOK6	RPS3
IMPACT	OR9Q1	KIR3DS1	MT1X	FGD5
PLAC9	ZNF132	PLD5	SERPINB6	LDHD
HMGB1	PER1	CLEC7A	FGF8	GNRHR
NME1	SYT14	ACADSB	EIF1AD	PTGR2
PIANP	HIST1H4J	SDCCAG3	CCR8	C8orf59
SNRNP40	FAXC	RBM34	LAMTOR4	SH2D4A
PFDN4	PIWIL1	TXNDC15	CAMLG	PRND
TUBAL3	TMEM55B	ARNTL	HBQ1	VN1R10P
GLMN	ABHD12	GMNN	CYP20A1	NO_MATCH_249
TMEM133	ZFP57	FBLN5	STAU2	NISCH
PDPK1	ARHGEF19	PABPC5	PSMD8	FLOT2
CSN1S1	C11orf87	ZFP37	PLPBP	KIF22
MGAT5B	SLC35F3	ADRA1A	PEX10	PTPRA
CKM	STAMBPL1	NO_MATCH_162	EEF2K	PTGDR
FAAP100	NOG	COMMD2	FAM208B	KARS
DUSP12	ATXN3	RNF24	BUD31	FAM192A
PLAT	ATP13A4	SIRT6	TAS2R50	KIF6
MET	ITPKB	CCDC146	SURF6	HLA-E
MAP3K13	NAT16	ETFRF1	2-Mar	SLC1A1
C5orf58	KCNH6	BCL2L13	HIST2H2BF	MOG
CST5	C17orf75	DBH	PRM1	POU6F1
ZMYND11	BTLA	HIST1H3E	ZFAND2A	CCK

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 7】

HTR7	POMGNT2	TNFAIP1	OR11H4	CRTC3
CST1	AK8	LENEP	CRYGC	ATP5G1
EIF3I	IRAK1BP1	CRYGB	PRAMEF15	GADD45GIP1
SNCA	PGRMC2	LOC102724993	RABGEF1	DDX18
ZNF761	C11orf53	GABRB2	ABI1	CYBB
CDK2	TBC1D26	Fgd6	CA9	APIG2
GABPB1	SLC17A2	SLC22A13	DPYSL3	LGALS9
ILK	CA5A	MOB1A	GIN51	CAVIN1
OR56B4	PYY	ANTXR2	IRF3	ZNF320
HIST1H4H	CATSPER4	HLA-DRB4	NO_MATCH_270	DNAJB1
TRAF3IP1	NT5C	NO_MATCH_221	KCNK1	LGR4
FMO2	NO_MATCH_90	USP10	OR1D4	SYNDIG1
CDKN2D	CLSTN3	CAPS	RBM10	PLCD4
SOX3	LGALS9C	EIF4E3	CLHC1	SEC61G
ASB13	POLG2	CLIC3	HIST1H2BN	AGRN
GPR19	TCEAL5	BMI1	INTS5	CTNND1
GAGE1	TAL2	SFXN1	MGST3	RITA1
FAAP24	SPATA22	CRISPLD1	STARD7	ZNF334
DPPA4	CADPS	Egln2	NXT1	DPYSL4
DCAF5	AES	VAMP1	GPKOW	MACC1
ELOVL7	FAM60A	SMIM19	NO_MATCH_153	C18orf25
DESI2	RASGEF1A	MAPK13	KIAA1551	NOXO1
SNX4	ADAD2	ATP6V1C1	U2SURP	DHCR24
COMMD6	MBP	SRP54	GMPPB	ADARB1
CTAG1A	AP2S1	SLC2A9	PAK6	NO_MATCH_47
STK33	LIPM	TDRD10	ZKSCAN5	TAZ
CRABP2	UTS2R	RFC5	RCSD1	PKN2
PCNX2	LECT2	CNNM3	MAPKAPK3	GJB6
TFR2	KIF26A	ERI2	SYCP3	NPBWR1
GSTK1	NO_MATCH_177	IL17F	C12orf43	TBC1D21
FAM106CP	TRAP1	ARMT1	GSDMD	ZNF488
NPHS2	NPRL2	DBR1	TNFAIP8	UFL1
KDEL2	ARHGAP27P1	XLOC_12_009281	TUT1	ZNF35
HIST1H4I	NO_MATCH_137	CHCHD2	FABP2	FBXO24
ZNF608	PTTG1	NCK2	MAP1LC3A	RPN1

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 8】

ZNF19	TPO	RBM4	NO_MATCH_32	MTMR14
ZFP36	FAM216A	DIDO1	PLPP6	MT1A
EIF2S3	RAB4A	TUBA4A	TIAL1	ADAMTS1
SLC28A3	RSBN1L	TMED7	ACOT4	MTFR2
POLR1D	NO_MATCH_5	SMR3A	RPL15	INHBA
LRP2BP	GTPBP2	CLEC3B	KLK11	CYP1B1
FAM204A	DBNL	CFHR3	IL31	OR52B2
OR1M1	TMEM102	HSPA14	ARNT2	KLF10
FBXO8	OXL1	SPHAR	F2R	SNX8
HUNK	STX5	OR5C1	SLC3A2	TMEM68
VAMP3	SELENOM	ATOH7	TAS2R10	PZP
ART1	RPSA	ZNF146	NO_MATCH_88	10-Sep
DYNC2LI1	MIF	Tmem208	HAGHL	UGT2A3
GPR176	SVOPL	FN1	VGLL3	JMJD6
DRG1	LGI4	CA13	CYP46A1	XLOC_004269
IFI27L2	RBM18	RORC	ZNF79	EIF4A1
MIEF2	C6orf120	NME3	PCDHGC4	TSPAN5
HLF	Rpl36a	TESK1	HS1BP3	RGS2
THNSL1	ABHD14A	KERA	WFIKK1	RPL8
LINC00314	TRIM61	PSG6	C14orf28	XLOC_l2_006804
FKBP11	MRPL1	HIST2H2AC	GAL3ST2	GBX2
TM7SF2	NO_MATCH_235	MAPK3	C8orf22	AGFG1
UBAC1	CHST8	ELK4	ZNF138	SETX
FABP1	HES1	ZXDC	PTER	C14orf37
NIPSNAP3B	UQCRQ	ZNF616	CCDC110	SHTN1
CAMK2A	TYW5	LOC100130950	PPM1B	NO_MATCH_213
KCNA3	ANKEF1	CDNF	LIMS3	CDH16
CXCL1	NO_MATCH_267	FUZ	METTL14	KRTAP13-3
DSCR8	NOL12	TMEM63C	ZNHIT1	FBP2
LPL	PPM1L	MRO	MRPL32	NTF4
DGUOK	OS9	AMTN	MOS	ABHD13
TSPYL6	C7orf33	SELENOK	MAP3K15	COMP
VSTM2A	RGS13	NO_MATCH_59	MGRPRF	RERG
LRRC15	GHRL	CENPX	MIR4697HG	TMEM140
SLCO4A1	NREP	AHCY	LINC01667	MXRA8

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 9】

CTSZ	CELA2B	LINC00467	AZGP1	SSTR5
PSKH2	VASH1	ARMC7	SGK2	EPHB2
CCDC102A	ERG28	COX14	LRRC37A	GLP1R
GINS3	NAPA	SPATA4	C20orf141	NKAPL
NOXA1	STARD7-AS1	GAS2	TSPAN2	HHATL
CHRNA6	KCTD15	BTBD6	TCHHL1	OTUD6B
SELENOS	IL21	RPRM	PCDHGB5	PTH2R
MAP3K19	RRAD	C11orf49	NSMCE4A	HOXC11
RNF41	POLD4	ADPRHL2	SNRPB2	ARSE
KRT6B	SLC43A2	AP5S1	HSD11B1L	POLR1B
TRIM51	BRMS1	CHRFAM7A	C17orf47	MPEG1
GABRR2	NOP10	SNX24	RELL1	ARHGEF7
ELMOD2	GPC4	THYN1	SPDEF	RBMX
CIR1	RAB27B	GPLD1	C21orf91	PATE1
ADAM17	TRIM29	TBXAS1	PLA2G4D	CPNE9
TAF1B	VKORC1L1	LINGO4	SURF2	PRKD1
NFATC2IP	CER1	TAGLN2	BIRC5	TMEM92
EMC3	Atp11b	CHRM2	PPP1R13L	RAF1
OXSM	ZNF587	SLC38A1	LINC00638	RAD21
PLPP5	DPPA2	ANKRD16	ZNF295-AS1	APBA3
NAT2	GLT8D1	KRTAP23-1	GBP7	PDE3A
GNG4	INVS	CEP95	LOC107987253	SLC45A3
HLA-DPB2	MRPS24	ABHD15	VPS28	HK3
KLHL12	RPL35A	CCDC59	ARHGAP18	KANSL1
HOXB5	STK25	C2orf40	MCCD1	WDR44
AIFM3	CA10	FUNDC2	OPN3	NRXN3
ADGRG3	ALDH3B1	SPAST	TNFSF8	HTR1E
CHPF2	NSMCE1	RHOD	XLOC_010651	CCDC86
LIME1	NUPR1	HIPK2	OR1A1	MGRN1
IGFBP2	DKC1	DHRS11	NDUFV3	FGF3
TMEM177	RPS29	RHO	RHPN1	XKRX
C10orf53	ZBTB18	SLC6A15	ARFRP1	COL2A1
TIMP1	DDI2	RGMB	PHF1	RAB25
YWHAG	SLC22A1	FBXL3	Timm8b	WNT5A
CYP4F11	TCL1A	ACVR1B	CD160	MICA

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 0】

KATNAL2	REG4	MKNK2	MAN2C1	KCNAB1
CACNG5	DEFA4	LINC01270	ANXA11	C12orf60
HS3ST2	DECR1	RANBP3L	ZNF44	SLC25A14
MTCH1	FLT4	MCHR1	TMEM39B	ATP6V1C2
STRBP	OR13A1	GPX3	EFCAB11	ACO1
CYP2B6	ANXA2	NUP210	VAR5	ICAM1
CLEC2D	SLC22A17	HS2ST1	PPIF	TXNIP
PPP1R3C	TMEM135	HPCAL4	GKAP1	OGFR
UBE2K	CACNG4	TRNT1	LMOD3	HEXA
TSSC4	IKBKB	SH3BGRL	NDUFA1	CCDC158
RPL23AP64	CD2	LOC105372824	PIFO	SPERT
SLC16A13	ODF3L1	FAM229B	CDC5L	NTM
TMEM95	ZNF225	PKMYT1	COA6	NID2
LINC01312	CELA3A	PIGP	RELL2	C5AR1
AP1M2	ERC1	SRP9	RBM5	GPR37
Fbrs	CORO1B	TMEM37	CLDN10	SETMAR
BOD1L1	MTUS1	CEP57	STIM2	RBM12
STAM	RNFT1	OR52K2	KRTAP19-1	ELOVL3
UXT	MYL12A	KLK1	NUP85	ZFAND4
GMP	WFDC11	UBA5	VASP	LARS2
FAM9B	NDUFAF8	IL1RN	MAGED1	OXCT1
UMODL1-AS1	UCK2	FGFBP1	HHEX	PLAUR
BACH1	LBP	ASF1B	SLC10A1	NARS
RERGL	HOMER2	SH3RF2	CELA3B	GIT2
AMDHD1	CLEC19A	NO_MATCH_142	ARV1	TAS2R42
MRM3	CDCA4	NEU4	CA1	SIX2
ZAP70	GLRX3	GLRA1	AQP5	CCAR2
TEX37	TRIM59	TIGIT	SCGB1D4	STXBPI
B3GALT5-AS1	MIER1	CNDP1	PHYH	FGF9
SAA2	TMEM254	LIMK2	STARD3	CDY2A
SET	NO_MATCH_128	PFKFB3	DYRK1B	PRKN
LTA	FAM53C	CERCAM	RRAGA	ZFYVE27
ZNF333	ZNF593	UBA52	SORCS1	S1PR4
ABCG8	OR51B5	GSTM4	SREK1	GATS
11-Sep	PAGE4	CRP	CXCL5	REXO4

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 1】

NO_MATCH_219	SLC36A2	CST8	SNU13	ARHGAP20
HRG	ASTL	DEDD2	METTL21C	CCDC47
GPR82	POLDIP2	SOAT1	ZRSR2	RAB11FTP1
GXYLT1	C6orf203	FAM107B	MAGEA5	PER3
LMBRD1	TAC4	CUTC	PPIH	SPX
Osbpl6	TEX33	IGSF6	SLC2A5	FRMD8
CCL3L1	ALDOB	ARL15	XRCC4	NSMAF
XLOC_007668	OR8A1	S100A9	PLK3	Mchr1
XPO5	LAGE3	MPPED2	OPRL1	SYCP1
IL13	DEF8	CERS6	PDCD2L	FBXO27
RPL21	LCN15	AK1	NO_MATCH_132	PYROXD2
CIAPIN1	IMPAD1	12-Sep	PSMC2	HYDIN
RHOG	GRIA1	TTC32	SARAF	PNN
COLGALT2	CD300E	SPRR3	MRPS36	DPEP3
SPATA19	FAM177A1	PADI3	CACNA2D4	PROKR2
HAGH	KLF7	PPP2R5C	PTHLH	PORCN
CFAP52	SEMG1	SNAP91	AHCYL2	KIFC2
SWSAP1	CCL2	AVIL	CHRNA4	EXOC6
NEK6	GTF2H2C	MAPRE1	CDX1	DNAJB4
CXCL16	SPIN4	ZBED4	NUCB1	HTR1F
SPINT2	LCK	SGCZ	C8orf4	POC5
CCDC106	KHDC1	ZDHHC6	DDX53	NO_MATCH_253
ACVRL1	NSUN5	BMP10	GCSH	NPM2
FUT3	C20orf96	FCMR	PRELP	CNTNAP3
NO_MATCH_186	BTG3	SLC39A8	MZT2A	HSF5
ASNA1	USP37	HSPBP1	ARHGEF40	KIF3C
TRAPPC13	RAD51C	KDELR1	CCRL2	HDAC8
DLG5	GPR156	GPR85	PCDHA4	INO80
NKG7	IL12B	ACTRT1	WDR88	HACD1
EMP3	PMS1	C14orf159	Pds5a	ATIC
KBTBD2	TCP11L2	DHRS3	FLJ44635	DHRS13
HMGCLL1	MCM10	FBXL19-AS1	RGS9	RGCC
MRPS27	ALDOA	TCEAL1	EMC4	C1orf54
IRGM	PSMC3	BEGAIN	GIPR	PAGE1
PNCK	GUCA2B	DNAH14	DMRTB1	SLC5A2

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 2】

LSMEM2	CHRA1	DIO2	OR2A7	SLC27A2
PPARA	SNAP23	TRAF2	P2RY4	WDR31
PLA1A	PAK2	NUP37	DDR1	CHMP1A
USP54	RAPSN	RPL39L	CASR	PHLDA3
OR4C5	ATP6V1E2	DAD1	ARMC10	AZIN1
ZNF782	Acss2	DALRD3	RAB29	SCN2B
ADH1A	HCP5	CYLC1	BCAN	KCNH1
IQCF2	PLTP	UCK1	ATP5A1	THY1
SERP1	RCOR3	KIAA1143	CCDC71	SOHLH1
DENR	LCE1B	EXOSC3	NXPH1	PHF14
CDK14	BTBD10	ZNF175	BOLA2	INMT
PI16	ADPRH	PATE2	CTTN	NO_MATCH_224
SLC25A3	DDX27	MIS18BP1	TMEM121	METTL17
NO_MATCH_21	MAPK14	USE1	REEP4	VLDLR
RGS4	IFIT3	MTERF4	CSRNP1	C19orf25
RAB7A	AKR1C1	NO_MATCH_243	CCDC92	ADGRE5
NO_MATCH_216	SLC35E1	GPR161	RBM28	SERPINB2
NO_MATCH_218	SLC16A11	NR4A1	RPL26	C5AR2
TARBP2	TRIM16L	SLC39A2	TTLL1	KRT4
HNRNPCL2	FOXP4	C11orf52	SCG2	MCF2L2
NEK9	PCSK1	TMPRSS6	ROR2	SUGCT
HIST1H2BM	ASF1A	KLRF1	PBXIP1	SMYD4
ALKBH3	TNFSF11	CCDC127	NUBPL	NKAP
OR2B2	OR5B12	FABP9	RPS6KA2	RGS6
EFNA1	ATPIF1	PAQR6	S100A4	NAPSA
CHORDC1	INSRR	IGFBP6	FBXL5	OR4D6
RCHY1	REG1B	NO_MATCH_48	PPP2CB	MRFAP1
NO_MATCH_33	SASS6	PLA2G16	FERD3L	ZCCHC13
SYS1	PRPSAP2	MOK	IL13RA2	LRRC25
SMCO3	CDYL	CD2BP2	LAMTOR5	U2AF1
MPC1	CASC1	RFX3	UBE2B	SUZ12
KRTAP3-2	GPR22	PRSS30P	TNFRSF14	LYPD4
WDCP	CDC20B	KRT86	OPRK1	NO_MATCH_171
SLC27A4	HERPUD2	MCHR2	MEA1	SNRPA
SLC13A2	TMEM184A	WFDC6	FFAR4	SLC22A6

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 3】

NPRL3	AQP10	RAC1	SGCA	SLC10A6
BIK	DNAL4	ARPP21	NEUROD4	ELOA2
GSTA2	HDHD3	PPBPP2	Alkbh3	TSC22D3
MDP1	FAM114A1	CCDC186	C8orf48	NFYB
EIF5B	C12orf10	NUSAP1	MAST1	GMEB1
DICER1	Usp32	ENTPD3	ADRA2C	SPINK13
TECPR2	ARHGAP27	MORN2	SLC28A2	RIBC2
ANKRD27	C20orf144	TNXB	TMA16	LY6H
RAD51	SDC2	ZNF444	MAFK	GTSE1
KLHDC3	RWDD2B	EFTUD2	MAD2L1BP	MAGED4B
DEFB123	EXO5	CTSD	CCPG1	MARS2
CBWD5	AQP4-AS1	COX6A2	IGLL1	QTRT1
ERCC8	PARS2	GAST	C16orf71	XLOC_008362
VCP	GOLT1B	NOL7	GPB1	ST6GALNAC3
ANKRD36BP1	RBX1	MB21D2	C8orf58	DDX6
MRPL3	MYO1C	MRPL2	TWF1	ERBB4
IGF2	LMNTD1	DNAJC19	UBE2D1	SCARA5
NO_MATCH_181	SFRP2	NAV1	C11orf65	CHRM3
ZMAT2	SNHG7	NO_MATCH_50	CYB561D1	AQP4
GRM4	TBX15	DLAT	CHCHD3	BRCC3
RAB43	CNR1	FRMD1	MAGEA4	RBBP4
SF3A3	ULBP1	SDHAF2	ZFYVE26	LOC105371493
ZNF621	LY6D	PEX2	PTGES3	TRAT1
CSNK2B	CFHR2	C20orf85	PPP1R2P3	SPANXB1
SHF	FA2H	LOC102725035	XLOC_12_006862	STAP1
PSORS1C1	KCTD13	DEFB121	GALR1	BLMH
OR8G2P	ACYPI	TEX12	NXPH4	CLDN3
CEP41	MYOG	PRSS22	TIPRL	CTNNA3
OR8B8	SLC22A2	SLC25A31	VPREB3	TACR2
SLC35G2	C22orf23	TOMM40L	BYSL	ACVR2A
MT1E	NO_MATCH_147	UGT1A10	UBE2E2	TTC39C
LCE2A	CKS2	LEP	ABCA11P	GPR55
ANKMY1	SPRY2	FGF1	HCAR1	CBWD2
MAGT1	AKAP13	PDIA3	PDZD7	SESN2
PMF1	CGRRF1	KRT79	SSBP3	P2RY14

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 4】

NLN	C16orf74	FOPNL	CORT	IREB2
FBXO9	MAT1A	ARHGAP25	PDCD6	MAP2K7
ORM2	SULT4A1	CLDN4	NAPRT	NT5DC1
FAHD2A	BTNL3	PSMB5	LDLRAD1	SLC25A23
NABP2	PI4KAP2	C1orf189	CHD2	GPR87
C12orf45	EFNB1	COPS8	TMEM171	YARS
EBLN2	GEMIN2	ARF5	CEPT1	TTC12
APBB3	TLE2	ABT1	PPP1R21	KCNN1
SLC35G5	OR14C36	PTCD3	TAGLN	RBM23
WBP2	KLHDC2	Ccdc28a	CHTF8	HTR6
NAP1L2	LHPP	MRPL4	GMPR2	WIP1
XLOC_012729	NT5DC2	XLOC_l2_009500	GIF2H2C_2	CRHR2
OR52N4	ZSCAN22	DKK4	GGILC1	LINC01567
RRN3	USP12	STK4	GPR25	NPBWR2
WISP1	IL15	ZNF214	CD27	TMEM52B
MRPL23	S100A2	SP8	PELI1	FAM111A
GRIA2	CCR5	FABP4	MRPS15	ENPP6
FAM98A	RXRA	ABL1	TMC6	ARHGAP11B
IL36A	CDC73	ANAPC10	ERICH2	POLR2K
UAP1	BCDIN3D	TMEM17	HYAL4	EFHC2
GLIS3-AS1	TP53BP1	TBC1D10A	HYPK	ELAVL2
EIF5	C10orf120	XLOC_l2_011911	C11orf45	PXYLP1
POLD3	ADGRD2	ATP6V0E2-AS1	RNF181	CCDC170
SLC46A2	ARL2	GRIA3	ATG12	NO_MATCH_210
TEAD1	STK17A	MSRA	XLOC_001087	ETFA
RPL7L1	AKR1C2	RHOT2	STXBP4	LEPROT
IL20RB	USP15	PRDX6	ANGPTL2	GPR39
XLOC_l2_009833	C9	NO_MATCH_165	CEACAM8	USP39
CRYZ	C20orf166-AS1	IDH3G	SLCO1A2	DPY19L4
NCK1	CD82	TFAP2A	NOL10	FBXO11
FLAD1	MUC1	WDR54	NAT8B	RASGRF1
TBC1D29	IGFL3	ELANE	XCL2	BTN3A2
CNBP	PLAC8	C6orf223	MIA3	PCGF3
TSPAN32	PITPNC1	LRRK2	HTRA4	CHRM5
TAS2R5	SEC22C	Eri3	C10orf55	SNN

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 5】

RBSN	MATK	MILR1	KT112	ZNF431
FDPS	TGFB1	ROR1	C16orf58	ALG6
NPDC1	P2RX6	RPS27	EXOC3L2	MUS81
FBLN2	CMC2	RRP7A	SHISA4	F2RL3
XLOC_012726	SLC10A3	CISH	CERK	KCNE5
OR6M1	TIGD4	FRMD3	TTC39B	NO_MATCH_275
ZNF544	OR6W1P	PNLIPRP2	NFIC	HDHC3
WDR4	CCDC51	ATP5C1	NAA10	DDX23
NO_MATCH_225	DCLRE1B	CD33	ASGR2	NDUFAF1
ITGB1BP2	FAM69A	CHEK2	CCR6	BRINP2
NRG1	C2orf88	THAP2	AGBL4	TMBIM6
B4GALT7	NO_MATCH_82	GPR83	CLDN12	KRT24
TMEM199	SNAPIN	SAFB2	TSHR	PCDHB3
NME8	CD207	TAAR8	RPGR	SAMD4B
NUDT2	TAB1	GLRX	CXCL8	ABCB9
SNX22	DDIAS	EPHX2	CCL23	TMEM252
PRDX3	BIRC7	DUPD1	CRB3	LRRC14
NME1-NME2	FAM19A5	CLC	EPHB1	TXNL4A
ST3GAL5	EXT2	HAPLN3	ALG10	NGLY1
HSD17B13	CBX8	LINC01260	FAM166B	CPO
NOP2	ZSCAN31	MSRB1	PAK3	SPICE1
CS	SHC1	Clk3	KIAA0087	FAM111B
CMAHP	MRPL53	TLX3	EXOSC7	UGT3A2
RRP36	LMO1	CHST5	SPATS2	ZNF837
TARP	SH3GL1	MCM5	RPS20	NLGN4Y
INPP1	CDK6	HSBP1	CHST12	DNAAF4
TSPAN15	MYD88	TCP10L2	NO_MATCH_174	MAP2K1
TNFRSF9	C8B	DIRAS2	LAPTM4A	TEKT4
Scm2	FNTA	SEMA3C	CENPW	FAP
SMIM21	GTF3C4	SNAPC1	NDUFA12	YIPF5
C17orf49	ADGRL4	TSPAN33	HRH2	PCDHGB1
MAP4K4	DYNLRB2	OPN1SW	NDUFA13	TRMT10C
PRPF38B	TMOD3	CASP3	UBL5	PUM3
CALHM2	HLA-DOA	EFNB3	TOMM20	MAX
SCRN2	GABRA5	HLA-DQB1	GNL2	SYPL1

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 6】

EIF1AY	JRK	PPM1A	WNT4	TSHZ3
NO_MATCH_109	NPPB	MAP6	RSAD2	SPRY1
ILVBL	DLST	INPP5A	ITPRIPL2	TRAF5
PEX11G	FAM124B	OIT3	HIST3H2A	TECTB
TROAP	FHL5	SPZ1	PSMC5	NIM1K
GGCT	ZC2HC1B	CCDC66	IL36G	OR10H3
TRAPPC2	LDHAL6A	C1R	XLOC_001866	TRPS1
C14orf119	ARMC12	NDUFA9	ST6GALNAC5	PCNA
CDC37L1	CLPTM1	PTGS2	Dolpp1	ZNF41
SLC35G1	CCNYL1	MGARP	MFAP1	PHEX
SYT12	DTYMK	NO_MATCH_17	SUN2	C2orf69
ALKBH8	TPMT	IQCF1	XLOC_003758	ANGPT1
ZBTB80S	ARSI	C1orf43	C2orf73	ZNF354C
CHMP5	CCDC82	BCAS4	TBC1D31	CSNK1E
ZNF576	PLPP4	STMN4	C4orf36	BTG1
ELL	IMPA2	RSPH14	EPHA5	ALCAM
ASAP3	LMBR1	SERPINB8	LIN37	BAG4
PIGN	ZNF141	ZNF701	SPATA32	KANK1
RGL1	FLVCR2	RNLS	XLOC_I2_015196	DCLK2
RMI1	ADORA3	APPL1	TIAM1	MCCC1
SH3KBP1	AURKB	ABTB2	ZDHHC12	MIER2
SLCO6A1	CLEC4C	LGI3	THUMPD3	IFT122
NUDT13	ACYP2	AKAP7	SCNM1	RNF10
MCF2L	BUB1	HECTD3	GIMAP8	GFER
RIPK4	BEND7	DNAH6	PERM1	MAPK4
CPSF2	ORAI2	PNLDC1	XCL1	NCMAP
SIPA1L3	LILRA1	SLC2A2	NPIPA5	DDHD2
NIPA2	TAF7	RHBDL2	NAGPA	ST8SIA5
CUL3	DIS3L2	FRMPD4	BEX2	CCDC136
BATF2	XLOC_I2_015133	GNG13	GLB1L2	THOC7
KPNA1	CDADC1	NDRG4	CLVS1	MYO19
AFF2	WTAP	TTC9B	HNRNPDL	SPG21
PAFAH1B1	MRPL48	CPE	NO_MATCH_263	PADI4
USP33	ZMAT3	GK	KIAA1456	KLHL23
RBM25	NRG4	ATG4A	CPA5	IQCF3

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 7】

MORN5	FLJ37201	GPX8	DNAJB8	CD1E
MED24	SIRPD	HIGD1A	ARF3	TMEM56
SIGLEC5	HIFX-AS1	LILRB5	RPL36AL	MRPL21
TMEM131L	DDX41	OR10G2	MTERF3	LHCGR
SLCO1B3	CH507-42P11.6	DACT3	CXCR4	DCBLD1
STARD8	NEU2	SYNC	CCDC174	SSTR4
PCDH10	CLPS	SLC6A14	PNPT1	POMT1
MSH5	NEK8	FBXW7	USP8	KLHL7
COPA	NO_MATCH_257	PLSCR1	TOMM6	RXFP1
ZNF37A	CRTC2	PPP1R14A	ZDHHC2	2-Sep
CCL15	TRUB1	RANGRF	CHPT1	SPATA13
DDB1	CYTH3	STAU1	Mbtd1	DCTN6
GAS6	INSL3	XLOC_011321	AP4B1	KIR2DL3
ERAP1	KATNA1	P3H1	FGF17	AKR7L
SLC4A2	PLA2G12A	USP42	XLOC_013643	FAM78A
SMARCA5	BTNL9	NO_MATCH_81	BORCS6	ESRP1
FYB1	PLAU	HMOX1	BAALC-AS2	SLC15A1
ELMO1	KLHL35	RPP25L	ELK3	SLFN5
MAGI1	NGF	PNPLA5	PFN2	MCCC2
PALD1	CC2D1B	RPP30	SFXN3	SYNPR
OR11H12	GLRA3	TTC31	FAM109B	CYP27A1
PSD2	CKLF	ALDH1L2	CUL4B	CUEDC1
PRSS35	DDX11	ZDHHC15	PLA2G1B	ADCYAP1R1
WAC	ABCF2	EEF1D	PNMT	ART3
DGKB	TRIP11	KCNQ1	MAPK6	IL13RA1
NOP9	PAPSS1	RASL11A	PODXL	ZNF660
AQP9	MRPL33	DIP2A	B3GALT1	HNRNPU
EFCAB3	FAM26E	MOGAT3	SCAND1	USP44
TMEM161B	ZCHC7	ZBTB43	WRAP53	RNASE3
VRK1	GBP2	C1orf158	ARHGEF6	PRIM2
ADAM18	STAT4	HCN3	SNRNP25	FZD7
C12orf76	Pkdec	LIN52	IFT27	OPCML
CSAG3	KLK10	CDPF1	PLEKHG2	AUH
ACTG1	NO_MATCH_129	AEN	FAM135B	SMPD4
LRRC56	C9orf62	TRIM44	DNAAF2	OR4F16

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 8】

CAMK1D	YBEY	USP49	RPUSD3	MAG
CHRNA7	PPP1R2P9	ALG1	NUP35	TRHR
NO_MATCH_166	UBE2L6	CCNY	STK26	PLXNA3
UBE2D2	TMEM131	TMX4	CERS2	CORO2B
SH2B3	CRIP1	YEATS4	KLF6	RASA3
ZNF436	MRPS25	UBE2Q2	THEM5	ACTR1B
RPL24	C8G	ATP5L2	SLCO3A1	CCR10
ACOX2	ZNF596	KYAT3	KCNA1	RAD51B
NDUFA11	TAS2R16	LRFN5	CD80	PIGQ
CPLX2	AGK	SKP1	NO_MATCH_212	HCAR2
SP2	KRTCAP2	TDO2	RBM33	GCGR
GJA4	CHST10	PYCR2	ATOH1	MAP4K2
APOBEC3D	ATP6V0E1	LY6E	VWCE	MID1
XLOC_l2_013192	TEX29	GSTP1	PAM16	SRSF9
ZFPM2	NAXD	MRGPRX2	KIRREL3-AS3	FCHO1
HNRNPUL1	GANAB	SCO1	SCGB3A1	TMEM139
FAM120C	CNBD2	CLMP	AP5M1	ZNF622
CMTR2	GRM2	TMEM176A	ABHD10	OLFML2B
PPME1	C9orf116	TMEM213	ADCYAP1	NOCT
CLVS2	ZNF30	XLOC_014105	CYB561A3	TYRP1
INPP5K	GPSM1	LRIG1	SLC30A5	NO_MATCH_78
TMED8	ZNF718	NDST1	GIF3C2	ACKR2
CYB5D2	SULT1A1	MRPS16	ALG9	RABEP1
UBXN11	QRFP	VAMP2	UBL7	STRIP1
TXNDC17	FBLIM1	ZNF462	PKLR	TP53RK
SPINT1	SORBS3	FAM102B	C14orf79	PPP1R12B
ARAP3	UBE3C	VMAC	ZFYVE16	SLC39A3
FASN	KRTAP10-3	TRIM42	RIN2	SYNGR2
RIPK1	INTS14	PAH	PMF1-BGLAP	VILL
SLC30A4	XLOC_010017	SLC22A9	GCSAM	ST7
NEXN	USP30	Cdk11b	YBX2	NUP155
CDK15	TRAM1	PRAMEF10	ZNF324	TRPV5
CXCL9	SAMD12	SQLE	C20orf203	DEFA6
THAP4	C1orf64	SERPINA9	CTDNEP1	PCK1
DCXR	SPNS3	FAM19A2	RAB42	KCNK7

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 9】

IL6R	TRMU	SERPING1	HAPLN4	NO_MATCH_71
XLOC_l2_006010	TSN	NDUFS6	KIAA1324L	NO_MATCH_91
C17orf62	NEURL3	CD300C	TMEM161A	NMT2
GIN1	AHSA2	TAS2R3	ALAS1	SPAG8
PCLAF	CD68	UBE2D4	ARMC5	EFCAB7
ADGRB1	RENBP	VN1R3	DGKE	NCAPG
TPRKB	KCNK16	C16orf46	SIGLEC12	C22orf31
AGMO	RPL13AP17	LINC00260	GNB1L	GPM6A
EIF3E	ING1	GNAZ	GPR89B	SERTAD3
LINC02347	TNFSF10	DNAJB7	SPDYE11	SRSF11
RNF180	ACY3	INSL5	FCGR3B	GTSF1L
NO_MATCH_18	RNASE13	HMG2	RALBP1	FFAR1
NRIP2	FAM181A	CDK19	MC2R	RPS16
TSPAN16	LYZL2	TUFM	CLDN2	BDKRB2
ARMC1	SLC35F6	TRIM2	ST8SLA1	G3BP2
HEXDC	WDR6	PTH1R	CPSF4	SUSD6
PTCD1	ENOX2	TRIM69	CIB1	PHF5A
FIBP	MTMR9	MRPS2	SRSF3	SLCO2A1
ZGPAT	PPP1R42	TRIM49C	LOC390877	TRIM21
NPY5R	AKR1A1	TSFM	TRIM73	SUMO2
PIP5KL1	OSTC	NO_MATCH_68	DEFA5	SSBP4
ARPP19	ABCC3	GNAI1	SALL4	XLOC_013901
MAK	CRYBB3	PSAT1	OR4D1	CNKSR3
PPP1R15A	KCNAB2	SLC6A11	THEG	ABI3BP
FAM71D	MAP2K6	XRRA1	ZNRD1ASP	FAM131C
NO_MATCH_163	RBBP6	TRIM9	NO_MATCH_76	EIF4EBP1
MAEL	PRH2	PJA1	C11orf58	CDC27
FAM104B	FNDC4	NCOA5	B3GAT2	PPP1R14D
SMU1	CIB4	VPS53	EPN1	GAPT
OR6V1	APOC2	LYZL4	TRA2A	TPTE2
NIPBL	UQCRCF1	TNFSF13B	MCM2	ZNF350
MGST1	GNG2	CABS1	GLUL	WBP1
FMO3	C2orf76	MIS12	EIF2AK3	PIAS2
OR8H2	SRR	KCNK9	TSPAN6	GPR137B
RNF144B	Ttl5	IL11	NO_MATCH_19	9-Sep

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 0】

SLC25A5	PNMA6A	PHKB	ETNPPL	NKRF
NPSR1	SGCD	SHISA2	TAAR2	TTLL12
CCDC24	ZNF706	SHMT2	PPID	CORO7
PAFAH1B2	TMEM218	NO_MATCH_255	GPR141	NO_MATCH_121
BAG2	MAPK10	TRAPPC1	SMAD3	POLK
RASL10B	WWC2-AS2	PCDHB5	VIPR1	SELL
CEACAM21	CCL17	STC2	CD200	Kdr
SLC35A5	DDX39B	CLEC5A	PNMA2	ZSCAN5A
DZIP3	SPATA7	ZNF585A	MCRIP2	ARHGEF10L
HMCES	STC1	TRPV3	SIK3	KRT26
UBXN10	DCTN1	OR2G6	FAM173B	C6orf58
SLC22A11	POFUT1	DUSP1	CDH13	CYP11B1
TTR	CA12	Cdk13	GPX4	CDHR5
PRDM4	ITGB3	MRGPRG	RPL27	PDZD8
H1FNT	SETD4	TMEM18	LAMTOR2	LPAR5
EHBP1	TMEM80	PLCL2	ALS2CR12	TBL3
METTL16	CYB5R4	WISP3	TMC8	ZNF513
LIN28A	FAM209B	TOR3A	CFAP46	EARS2
ZNF829	RIMBP2	NINL	EMSY	NO_MATCH_2
XLOC_l2_009328	CFAP65	LCN6	SLC34A2	GAGE5
PI3	RASGRP2	TUBB	TEPSIN	FAXDC2
RUSC1	ASPHD1	NO_MATCH_215	OR2B11	GRK6
ARC	IL34	NO_MATCH_269	PAXX	CD53
PPP1R1C	GCLM	MPHOSPH6	SLC38A5	PCDHA10
PRG3	P2RY10	NEBL	MICB	SULT2B1
PLA2G3	TPBG	PFKP	PDHA2	SPINK2
PRODH	SFTPB	TCAIM	ADAM30	ALPP
LOC401296	GFOD1	HS6ST1	HRASLS5	ABHD16A
WFDC2	IRF4	DUSP19	PPP4R2	RETNLB
XLOC_l2_011027	LANCL1	TAAR9	C12orf57	KRT83
NO_MATCH_92	Pin4	MID1IP1	XLOC_l2_005718	LRTM1
FCAR	GLIPR1L1	THEMIS	Nalcu	PHKA2
NAMPT	C15orf32	CYP3A7	PLGLB2	DUSP14
VN1R4	OLFML3	OR5D18	PCBD2	HDAC7
NO_MATCH_150	XLOC_l2_013931	NO_MATCH_272	CORO1A	TMPRSS11B

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 1】

MOXD1	MRPL57	SERTM1	SYT11	SLC39A5
TTC21A	CRADD	NUAK1	DNAJC3	SNW1
PPP2R2C	RUFY2	DUOX1	NAAA	EPS15L1
CLEC18C	NO_MATCH_192	KLHDC8A	NICN1	SPRED2
INS	F2RL1	ACADVL	TCTEX1D2	PEX6
OGDH	POLE3	DHH	COBLL1	CD1D
AP3S2	TAS2R7	HENMT1	SSH2	ELF5
C19orf47	RPL14	ANKRD54	ZNF774	GTF2I
NO_MATCH_24	PTRH1	ACP6	ZNF607	OR14J1
OR2AK2	RAB28	ZNF485	PCED1B	MED11
FAM174A	FAM234B	SPANXC	METTL9	DPF3
NO_MATCH_65	CYBRD1	ZNF76	ZNF667	RUNX1-IT1
DEFB128	TPM4	ZNF671	LY6G6F	PPP3CA
BARX1	C6orf10	GPR61	P2RY11	THAP7
PRPSAP1	C3orf20	HIPK4	INSIG1	TBXA2R
PCBP4	GLT1D1	CLDN6	CCDC151	ZNF530
KRTAP10-11	ADGRG7	NDUFAF2	GLTP	TNNI3K
HOMEZ	CKS1B	OR10J5	TTC30B	POLR2D
RACGAP1	SCML4	KRR1	PRTN3	SNX25
PBDC1	SMTNL2	DYRK4	ALG2	MFSD1
NLGN3	NAA38	CWC15	TAAR3P	ANGPTL1
BAGE2	NO_MATCH_9	LIPT1	KLKB1	LENG1
ZNF221	CAMKK2	CENPS	KRTAP4-2	BRIP1
Spire1	NO_MATCH_56	RPL26L1	LRRK1	SMCR8
VAX2	FAM180A	RIPOR2	RNGTT	IL7R
RAD51AP1	CCT7	KLHL34	MCM7	HTR2A
NMD3	CNN2	GPR20	LBR	SRSF5
HIST1H1T	PHB	POLI	CST11	SLC25A1
MAP7	TNNT2	CBX6	HNRNPD	PIK3R1
FAM189B	FUT7	PSD4	AMPD2	GADL1
LSMEM1	FAM198B	MACROD1	CAPN11	TEX13A
PRR3	ZNF415	ICE2	IFIT5	USP11
EMID1	MKNK1	PLEKHF1	GSK3B	HP
SPARC	AGFG2	MAIP1	SFSWAP	FAM78B
HPS6	HNMT	XLOC_004271	GPS1	XLOC_I2_006797

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 2】

PGLYRP1	PPP2R3C	NO_MATCH_27	TIMM10B	PRPF31
TRO	BAK1	HIF1AN	ECE2	MYPOP
GHITM	CDK20	ENPP1	GTF2E2	KCNIP2
PMPCB	B4GALT3	GLYAT	PODN	SMYD1
ANKRD20A4	RNF125	CREBRF	ADRA1D	CACNG2
N4BP2L1	HSDL1	DEFB104A	HMGH4	OPRD1
NO_MATCH_54	UVSSA	MGAT4B	TULP3	ZNF720
DPEP2	DRD3	PTPRE	RAMP2	USP4
SDHD	PCGF2	RXFP3	AEBP2	ZNF555
FGA	AUNIP	APBB1IP	PCCA	MRGPRD
TTI2	BLOC1S6	SPRYD4	TGDS	DNAJB6
SKAP1	GIP	CACNG7	ATL1	PROKR1
SH3YL1	TMPO	ALKBH5	SPNS1	TFPI
OTUD3	DCTPP1	AQP1	TYMSOS	ST6GALNAC2
SAMD7	NO_MATCH_231	OSTF1	MRPS23	PRSS50
SRBD1	MLLT11	ARID3B	UBR7	TBL1XR1
FLJ13224	DSCR10	NO_MATCH_53	AKIP1	PASD1
MSTO1	C8orf44	BIRC8	C1QTNF6	CDKN1A
NO_MATCH_214	UGDH	ADRB1	SNX3	RGMA
NO_MATCH_131	Dock10	GDNF	H2AFZ	PIGB
EPSTI1	RNF135	UBQLN2	KRTAP15-1	TACC1
NMRK2	PRSS58	EFHB	ZNF789	COG7
PTGER3	CNN3	ZMYND19	DPCR1	CCDC94
LRRC42	ALG10B	PQBP1	GSTO1	SNRNP70
VSNL1	ICA1	RHEB	XLOC_014209	CEACAM7
ADGRA1	CENPK	PAGE2	SAP130	MTNR1A
NUF2	ANAPC16	KRTAP19-7	CIRBP-AS1	YTHDC1
VSX1	ANKRD53	CBFB	LINC00115	USPL1
NUP160	FAM214B	XLOC_12_014086	COPS3	ZNF518A
ZNF26	TOLLIP	RRS1	SDCBP	NO_MATCH_73
FADS1	LRRC18	PAQR3	INO80E	SLC52A1
TNNC1	LRIF1	KDF1	HPSE2	TPCN1
Ola1	HEPACAM2	RHOJ	ACTC1	MAP4
PISD	TTLL6	SENP6	NO_MATCH_37	CYSLTR1
TESK2	OLFML2A	TIA1	FAIM2	PCM1

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 3】

WBP2NL	EIF2AK4	GPR152	TSPO2	CA14
XLOC_I2_004844	NUS1	KRTAP3-3	TFCP2	FBXO22
C12orf49	SFRP1	CCNL1	ICMT	SARS2
SMIM12	LGALS1	RPF2	VAMP4	KANSL1L
ASAH1	RNF219	UGT1A4	CRHBP	LIPC
PDE1C	MORN4	TPRG1L	ZNF223	SREK1IP1
XLOC_007477	TXNL1	OMP	NO_MATCH_122	KIAA1161
FAM126B	SLC26A2	ELOVL2	DHODH	GGT7
UBE2T	S100A3	ARPC4	DHRS7	ARSK
CNOT11	MRAS	NUDT22	POU2F2	ALPI
RAB27A	MARK4	TIMM17A	SGO2	IRF8
MDK	IL9	WDR55	ANPEP	CSDC2
CDK4	GPR32	DDAH2	IMMP2L	PRM2
ARL6IP4	SLC25A41	ATP1B4	NDUFB1	PNMA3
WRNIP1	DHRX	CXorf56	ARHGEF25	SPDYA
HLA-DPB1	SRRD	GNAO1	NO_MATCH_189	NO_MATCH_110
SSSCA1	SYNPO2L	UQCR11	LDOC1	DHX32
ATF7	ESD	ICOSLG	MCM9	PTPRH
CCDC162P	OSGEP	DPY30	C5orf22	MGEA5
PYROXD1	DKK3	SULT1C2	CDAN1	ZNF496
AK6	GNPTAB	BTBD8	CLP1	ZNF281
IL12A	CCSAP	TDGF1	GZMB	XLOC_I2_008259
NR1D2	XLOC_010072	IRGC	ACAD9	ZNF136
ERP29	L3HYPDH	HAUS6	BUB3	ATF7IP2
TIMM50	OBSL1	MXD1	IFI6	PLOD3
RPS6KA4	HSF2	TOMM34	VWA3B	AMOT
LOC554223	NO_MATCH_191	ACKR1	ADGRG6	ZNF260
HESX1	NAP1L5	PAK1IP1	LSR	ILKAP
THRSP	TALDO1	KLK4	LASP1	MTO1
FGF6	ZNF384	RET	IGSF10	MORC2
CTXN1	NO_MATCH_57	TSTD2	KRTAP10-1	HLA-F
CYP3A43	PRAC1	VPS25	KCTD4	PLEKHG6
LYZ	TCTA	GATM	GRPR	ZGRF1
GBA	PTS	TMLHE	ARRDC3	NR3C2
SPRTN	SELENOT	PCAT4	CCDC60	SNX14

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 4】

PIGC	EIF5A2	DOCK8	NMB	FTSJ3
NO_MATCH_161	C9orf139	LMNA	C5orf46	NO_MATCH_12
EEF2KMT	OR51E1	HTR3B	STAG3	MTNR1B
ECI2	TRIB3	MEI1	XLOC_013689	THAP12
VASN	IL36B	ZNF775	TIMP2	PLEKHG5
TAS2R60	KIRREL2	CDK16	PCLO	TUBD1
SLAMF8	SACM1L	ZMAT4	HLA-DPA1	SRSF4
HIST1H4A	LINC01559	FBXL17	IPO11	B4GALT6
VDAC2	MORN3	SOSTDC1	CFLAR	C5orf24
OR2W1	ZDHHC9	STPG3	AGBL3	ASGR1
HNRNPCL1	WASF3	COX7A2	SPPL3	PKNOX1
GTF2A1L	MAP3K11	OR2B3	NRAS	CUL5
LCMT1	TSPO	CCKBR	SIGLEC10	CTC1
SNCG	XLOC_007690	SLAMF1	CFAP45	ZNF268
FUT8	PMP2	HSPB9	NO_MATCH_193	BST1
PRNP	SSX4	OIP5	KLHDC1	CCDC38
UNKL	CHAD	TAS2R40	PRICKLE4	TULP2
FAM53B	PUS7L	PLK1	PLA2G12B	NEUROD1
BTF3L4	CHRNA9	Xkr6	LGALS1	KLHL10
PITPNA	NO_MATCH_117	TMEM182	CCDC34	ITK
IMMT	OR1J1	FAM49B	EZH2	NXF2
RPS11	CD99L2	TBATA	C11orf63	DUSP28
KLHL29	DDX51	FAM71C	BCL10	MLNR
RTN4	TRMT12	EIF1AX	TAS2R39	LCOR
TRIM15	SMLR1	KRTAP5-9	KRT1	CDCA3
CFAP74	NAA60	HAUS8	OR3A1	GPR101
PTGIR	POLE	UBE3D	LINC00602	P2RY2
PTK6	AP1S3	BROX	NO_MATCH_130	SLC2A11
DCTN3	CAMKV	RPTOR	ZNF286A	TMPRSS11A
PSMB2	ZFP64	SGPL1	C3AR1	USP3
BAALC	TRIM50	TRIP4	OPN1MW	OR10A2
IDO1	TREM1	HIST1H3D	UNC45A	TEX43
FKBP3	PDHB	Tex261	RCL1	EXOC1
TLR3	BTD	DHRS12	P2RY13	FAM50B
IFRD2	ELSPBP1	USP36	FGF19	KLHL36

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 5】

CASK	CENPP	TRAM2	LETM2	ALK
TRIM55	COPS5	PTPRS	SMAGP	HEYL
HTR3A	C9orf163	MFSD10	RASL10A	RBMS2
LOC149950	LINC01554	FAM193B	PRKAA2	C21orf59
CCNA2	TMEM136	RFX6	RPS28	ZNF16
TUBA3FP	SKP2	GDF3	MGAT3	CRHR1
CLEC4M	CCDC83	COQ8B	PACSIN1	EPHA1
ANXA13	BEX3	SRM	SCYL1	HLCS
DAP	GEM	CLEC2B	FADS3	OLA1
AK4	CMPK1	MAP1LC3B	GUCD1	GUCY1A3
NRN1	RAB6B	COX7B	ZNF124	ASPM
IKZF1	SPC25	NRM	ZNHIT3	NRROS
TAC3	MT3	LOC148413	EXOSC5	NTSR2
INHBE	SLC9A1	FPR1	C4BPB	SLC29A2
CGNL1	ATP6V1G3	TMEM176B	XLOC_013551	RBM14
GUCA1C	HCRTR1	TSPAN11	TRPM8	CD55
EXD2	PRR5	IL1RAP	WBP11	TEX11
ERGIC3	STAG3L2	HHIPL2	PLXNB2	TRAF6
NO_MATCH_233	TRAPPC2L	NECAP2	PARN	VNN2
HPGDS	PTGES2-AS1	XLOC_12_005179	TMEM50B	LCE4A
PAGR1	NMRAL1	ARFGAP1	LINC01366	ENC1
BMPRI1A	ZNF446	CYP2E1	GRK3	CD86
LCN8	MAPK8IP1	ORMDL2	AFM	PTPRN2
NPFFR1	MICU2	FGF21	LYRM7	ZNF385C
TCEA1	PWP1	AKIRIN2	TDRKH	GPN1
FRK	ZNF75A	P4HA2	MALSU1	SRPX2
SEMA3E	S100A13	TSPAN17	RCVRN	OR4X2
DZANK1	IZUMO4	OAZ1	DEFA1	SOCS3
DUS1L	CRACR2A	ZG16	LRRC4	MARK3
SLC35B3	NO_MATCH_29	FGFR1OP	ZDHHC7	THEMIS2
XK	GNA12	MESP2	SERP2	MRPL41
CXCL13	RNF14	THAP8	NO_MATCH_176	GPR182
UNC119	LRRC52	TBC1D14	RPS14	VSIG1
OR8B12	TSPAN3	SCD5	LYPLA1	GPR17
C17orf64	ENTHD1	PTBP2	DAB2IP	ZNF326

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 6】

WDR18	RMND5A	FCN1	POLR2A	ADGRE3
ZMYM6	NTPCR	PSG3	TCN1	GPR139
CCL4	RIC3	STMN1	NCR3LG1	VAC14
MAP3K12	CD1B	TMIGD1	COQ6	NO_MATCH_16
FLJ25758	COMMD4	STK17B	HSD17B14	CLMN
NO_MATCH_116	CSRP3	WEE2-AS1	9-Mar	RBM15
FBXO6	MTX2	RAB11A	WDR25	KLHL20
GALNT10	TIAF1	ELP5	SZRD1	FFAR2
KCNIP4	WFDC9	POMGNT1	POLR3D	MAOA
MAP1LC3C	XLOC_12_013393	CDC42EP2	NSDHL	ERVV-1
APEX2	IFITM1	Hkdc1	MCMDC2	ALDH1A1
HIST3H2BB	BRINP1	MC5R	C1orf123	FPR2
TNFSF4	USP32	ZFHX3	RPS21	P2RY12
ECEL1P2	ATF1	SEMA7A	FBXL15	BICD2
SELENOW	CLCN5	CMKLR1	SLC6A3	BRD8
LOC613266	SMAD2	EXTL3	CALML4	HIST2H2AB
ATAT1	CA4	TLR5	CACNG1	DEFB119
TMCC2	BEND5	KLHL4	H1FOO	ATG7
CFAP161	RAB40B	PCYOX1L	PPM1D	SLC1A5
GAL	CETN1	OVCA2	FEZF2	EIF4EBP3
AKAP5	TAF5L	STK11	EVA1B	NO_MATCH_113
PRH1	USP27X-AS1	AMIGO3	LY9	SSTR3
PFN3	APIP	CXCR6	CXCR2	NEUROG1
APOM	APOOL	CHAF1B	SCRG1	ZNF296
TEKT4P2	STK10	U2AF2	NECTIN2	MYL2
TMEM183A	F8	TMEM31	HSPA1B	ALPK1
UBD	AGR3	LYPD1	AOC3	TSGA10
FAM216B	NO_MATCH_22	C19orf73	ZNF626	RYK
MMD	HDGF	SMYD2	LINC00982	ZNF92
EMC7	RFPL2	NDUFAB1	RPS24	LOC102724023
BCL2L15	RFESD	SLC35C1	ITIH5	OR51M1
RPH3AL	C1orf74	NPTN	SLC35F5	IL2RB
TOM1L2	GPR84	NUFIP1	CNPY3	ENPEP
STRAP	RNF115	DHFR2	DDB2	XPO6
TMSB4X	NRF1	RGS1	AAGAB	EIF3C

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 7】

KDM4B	SPAG11B	MCTS1	PTEN	RTN4RL1
VHL	RALA	APLNR	CHD1L	VNN1
DCD	LOC100653049	SBSN	HBS1L	CD300LB
STRADA	RFK	LRRFIP1	G0S2	EDNRA
THAP10	TIGD6	PHACTR2	NO_MATCH_26	PIK3R3
MOB3C	KYAT1	CPA3	LDLR	PXDN
SERPINA1	FKBP9	SPA17	SAMD10	RBFA
TMEM42	ZNF416	SMARCB1	TRIM24	YTHDF1
PROSER3	SRD5A1	ACVR2B	SLC25A37	CD8A
DFNA5	FOXD4L6	PTGES2	SLC25A10	RNF6
NUDT15	PQLC2	RIN1	GPC5	Laptn4b
XLOC_013119	CUL1	DMKN	MLPH	NO_MATCH_217
UBE2G1	PAFAH1B3	MTX1	LY96	GPR68
PRAMEF5	ALDH8A1	MYL1	YOD1	NO_MATCH_173
SCAPER	TLE1	FASTK	PRSS21	S1PR1
MTFP1	MOGAT2	ZC3H3	CLCN2	SLC33A1
LEFTY2	TP53AIP1	ARMC6	PDSS1	SLC4A3
TRMT61B	SRPX	SMR3B	ABLIM2	CALCR
CNTF	PSMD3	OR2T4	NPHP3	CASQ2
TPH2	BNIP1	APLN	CCDC28B	EMC1
ID3	GGT2	PCDHB11	CFAP43	ENKD1
CDCA5	ARHGAP29	SNTG2	PRSS37	SPATA18
FANCI	PCDHGC5	CAT	DAZ4	SUMO3
NFE2L3	C20orf197	C3orf52	C3orf18	SLC7A13
ADI1	ZNF252P-AS1	KLF12	KRTDAP	MMP12
TRAF3IP3	MIF4GD	GHRHR	NO_MATCH_211	S1PR2
DDX20	TSEN15	BMP15	TCP10L	SSTR2
DLGAP5	KCNS3	ACSBG2	ZNF786	EVI2B
PPP1R8	LHFPL4	KLHL9	ADORA1	FAM83F
PPP3CB	CCDC84	SH2B1	ZNF274	PHACTR4
ESCO1	FXR2	CLEC4A	SARNP	AFAP1L1
NEU1	DCAF12L1	TMEM150A	CHRM1	GPR78
CSH1	RASGEF1B	DCAF15	RPUSD4	S1PR3
NR0B2	CENPC	GDF5OS	CCDC40	SERTAD1
STX3	IKBIP	LRRC10	ABCB8	USP53

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 8】

SNRK	PSME2	COL20A1	SOX12	PTGER1
ZNF521	LSM5	GM2A	GGT5	ZDHHC5
MAPK1	EIF4EBP2	NIPAL3	MAGEA1	FAM32A
MBTPS2	CYSTM1	CCR4	COX11	ZNF567
BCKDHB	ZNF580	ZNF410	PLS3	MINDY2
C17orf105	SPATA45	FMO5	C2orf27B	SART3
PHC1	ARL2BP	NO_MATCH_180	ZNF436-AS1	MAS1
RASSF4	C6orf136	ANLN	DNAJC2	ZNF645
AK2	LZTFL1	TMEM25	WARS	CCL28
TNFSF12	COX10	LINC01711	P2RX2	GPR35
MRPL44	CXCL10	EMCN	ECT2L	NFATC1
PLPP7	TMEM71	GNPDA2	LEAP2	PHF20L1
COL8A1	SETD7	TMEM19	RIOX2	ABCD3
ANKRD18A	XLOC_12_008285	ATOX1	ARHGEF16	CD24
TASP1	C14orf105	GP6	MAML3	P2RY6
GGH	TEN1	POPDC2	ZNF672	ELOA3B
NOTCH2NL	PGK2	LOC102724229	RAP2C	DPEP1
TMEM91	STOX1	GALNT3	CDK3	NPR1
ASPDH	TPX2	GCKR	BLK	RASA1
MED7	SAMM50	SKIV2L2	GLOD4	SNRNP27
TMEM200B	MTRF1	TAS1R3	PHYHIP	LINC00477
HIST1H4G	NO_MATCH_204	WRAP73	PPFIBP1	RTN4R
HSD17B6	ZNF768	SLC29A4	FOXP2	FPR3
CMAS	DDX28	KRTAP4-12	PTPRM	LRRTM1
CCL14	HINFP	RSPH3	OTC	CLCA4
ZNF473	XLOC_12_001972	NDFIP1	UNC93A	IL10RB
HM13	LRRIQ3	POLR2I	STK19	DPF2
FAM170A	PRKCB	NMT1	STAG3L4	ZNF781
GNAT2	TRIM60	CNOT4	SKIL	HTR1A
STARD5	SLITRK3	MAP3K5	PRKAR2A	PLA2G7
ATP6V1G2	GALM	HAS1	GNL3	VPS54
FHL2	SATB2-AS1	FAM71F2	RAB5A	SCFD2
P2RX5	KLK8	KEL	ZSWIM2	CXXC4
MED20	TMEM64	THADA	COQ10B	NO_MATCH_141
ZPLD1	CSHL1	USP7	TRIP10	KCNG3

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 9】

LRRC37A5P	PDAP1	BMP3	FTH1	GNB3
GC	PTPN2	SLC25A13	SNAP47	FAM83B
CHAC2	RSU1	POMC	TYROBP	SMARCD1
UHK1	STK40	RPS17	UTP14A	LTB4R
MRM2	EEF1A2	ZNF100	PRKD3	CDK11B
CABP7	CCL13	OR7A17	KRTAP10-5	GYPA
COPE	GSDMC	NO_MATCH_277	MYF6	OR1L3
LINC01587	C9orf72	VWA5A	PDCD1LG2	CIDEA
FAM206A	RTL10	PPIG	DET1	TRIP13
FAM226A	CYP4X1	OR8G5	CEP63	GRK5
OR8D2	NO_MATCH_172	POP4	OR10AG1	VANGL1
PRRT1	CRCT1	CA5B	SHD	ZNF574
EXD3	KRT222	TTC5	APOA2	SLC35F2
SMNDC1	VEGFA	SLC32A1	GPR174	C7
TUBB6	LYPLAL1	ABI2	FAAP20	VPS26B
GSTA4	TRIM35	LAMA4	NO_MATCH_168	SSBP2
ANKHD1	MT1M	CYB561D2	CPNE1	PCDHA9
RSPH10B	LOC400710	LSM4	NADK2	IL12RB1
OR8I2	AMZ2	ZC3H14	SLC29A1	CD59
SERPINB1	PRG2	XLOC_I2_015937	ADGRE2	MRGPRX4
ARHGAP15	CDK10	GTF2B	LTA4H	TBCEL
TYK2	CHCHD6	SLC43A1	PDCD2	WDR60
CCNG1	TMUB2	GAS8	AIPL1	NO_MATCH_207
SNX6	OTUB2	ARMC9	KLK14	CSNK1G2
DLG1	TEAD3	EIF3K	PDLIM7	ATP6V1B1
SSNA1	XLOC_001272	KCNK13	C9orf40	ZSCAN12
GORASP1	LIF	HMGB2	HOXC10	ZNF554
ERBB2	TBRG4	UCP1	CHLA	ZNF433
RBM48	AKR1B10	CACNA2D3	ARHGAP22	APBA2
PRR16	TEF	HIST1H4E	FLYWCH2	SLC38A4
POLR2G	GLYCTK	PRKD2	SPATA12	ASIP
NO_MATCH_40	TOB2P1	HK1	IER2	ZNF615
CAV1	PTP4A2	PDLIM1	FBXO46	CDHR3
Vps16	ARHGEF9	SMOX	RAB15	RBM6
GMPPA	USP25	OR8H1	ARHGAP11A	CNGA3

10

20

30

40

50

【表 6 - 4 0】

PSMD14	ACTB	KIF1B	GRHL3	USP5
MPZL2	TMEM237	BHMT	CEP57L1	DMD
NDUFA2	RPS6KB2	FAM160B2	SLC22A18	TM7SF3
RNASE11	THG1L	PLXNA4	FBXO30	PYGL
EIF2B2	KIF19	SLC19A3	GSTT2B	TRMT1
PTGFR	RASSF2	NO_MATCH_236	PUS7	CNGA4
GKN1	ADAM32	HOOK3	XLOC_l2_015194	GPBAR1
KCNV2	PES1	METTLL22	LLPH	SOC55
PHLDA2	DAPK1	JPH3	CA2	TMEM168
TRAF3IP2	SMIM8	FDCSP	TBCA	MIP
WDR49	STARD3NL	SLC18A1	NT5E	DTNA
KLHL33	GPN2	SPIRE2	SLC22A7	FAM45A
TCN2	MZT2B	INPP5D	GOT2	LPAR1
SP3	PIH1D1	C17orf82	SHKBP1	LPAR2
NO_MATCH_271	EPS15	ELAC1	CNN1	ITGA5
GNAL	ADAP2	ZNF543	CCDC14	CUL2
TTC7A	SLC17A4	PSMG3	HARBI1	TTC14
PAPOLA	IMPG1	SLX1B	TRIM5	CCHCR1
CELA1	LINC00898	RNF113A	KAT5	ACLY
LYRM2	TBRG1	VTN	XLOC_009142	NO_MATCH_35
GJB4	PARL	NO_MATCH_200	IKBKG	SLC16A14
UQCRH	BRICD5	CALR	FMNL1	8-Mar
AURKAIP1	SMAD4	FOXR2	AIRE	PLXNA2
POGLUT1	RIMKLB	KIR2DS2	ZNF200	ZNF599
LOC107987587	PEX3	APOD	TNP2	PRPF40B
PCDHB15	IL17A	NCOA3	E2F7	ENPP7
SFRP4	PDCD5	FOXI1	CMTM4	ITGAE
ASB3	SRSF2	KIF2A	SAR1B	UGT2B7
FAM89B	BGLAP	MRM1	PLEKHG7	ARHGEF3
TAF9B	SF3B6	MEX3D	TMEM187	IMPDH1
GGPS1	LINC00482	UBL3	ARHGEF10	WDR27
FDXR	CDK5	DNAJC15	LINC01949	CD93
TANGO6	MAGIX	PAMR1	ZNF24	BTAF1
POLR3F	XLOC_l2_008203	ZSCAN2	PSMA6	GPA33
RUBCNL	DCAF10	MCOLN3	SLC2A6	UBL4A

10

20

30

40

50

【表 6 - 4 1】

MAB21L1	XLOC_l2_009464	XIRP2	PSG5	HTR2C
C19orf18	SLAIN2	PDS5B	CALN1	SELPLG
RGS17	DDX55	CALY	NO_MATCH_93	NEUROG3
PCNP	XLOC_l2_004129	CETN2	HAUS3	ZNF10
Ergic2	HIST1H4B	SPSB3	TUBB3	KIAA0319L
TREML4	MAP3K6	ZBTB37	ZNF385B	SIDT2
GGACT	C1QTNF2	EPHX4	LIN28B	GPR75
LACC1	BCAT1	CDK2AP2	VIPR2	PRKCG
RTP4	DCDC2B	GBA3	GRM3	AMBRA1
PRELID3A	FBXL21	TGFA	LINC00508	ALPL
ATM	CDH19	ADIPOR2	LOC652276	RAPGEF6
NCOR1P1	TTC16	DTWD1	SERPINA6	GPR4
PCGF6	KLRC4	COQ9	ZCCHC11	CREB1
TCEAL4	BEX1	KLHL3	PHTF2	PDE7A
TMEM51-AS1	RBBP7	NEDD1	PRPF39	ZNF420
HCCS	CD8B	SIRT7	RABL2B	DNA2
CPVL	FAM71B	SNX20	AMT	USP1
RGR	RAB7B	WDR5B	PTMS	ZNF804B
MDH2	XLOC_003546	XLOC_l2_008131	C1QTNF4	PLEKHO1
HTR5A	CTRL	LINC01553	TMPRSS11E	VAV1
DHDDS	ZNF792	ARL17A	GHSR	LYPD3
ISCA2	ZNF57	COMMD3	DPY19L3	MED31
P2RX1	BCHE	GSTCD	ZNF467	NTSR1
NO_MATCH_154	RPE	SLC2A1	SPIB	TMEM154
IL22RA2	THTPA	LINC00174	NO_MATCH_135	SEL1L3
MAL	ZNF417	AIG1	XKR8	NGEF
SEM1	COL18A1-AS1	C4orf19	LYPD2	MPP4
ANG	LOC100653061	ZNF689	PI4KB	LPAR4
RTKN2	KIAA0753	FBXL4	LTB4R2	PIK3C2G
NDUFA8	PRR19	XLOC_003385	TXNDC16	COBL
COPS7A	SPART	RPL38	LGALS13	PVR
KLHL32	TRIML1	PTH2	ABCA8	PLD1
PDHA1	SLC27A6	ACSM1	PHIP	EXT1
Emilin1	TMEM268	COA3	C5orf34	ADRA1B
CDC7	NMNAT2	KLK5	TUBB4B	LSS

10

20

30

40

50

【表 6 - 4 2】

FAM107A	CCL24	CRYAB	ARID3A	TRPC4AP
MT1H	LYG2	NO_MATCH_38	HIST1H2AK	INTS7
TPD52	S100A16	PRR20A	ERICH6	S1PR5
MRPL43	ZNF843	PLAC8L1	TMEM144	GDAP2
MTIF3	MRPS26	HPF1	PTPN6	OMD
LOXL3	COL5A1	CYP2F1	MEF2A	ENTPD1
MIR1-1HG	CLOCK	XLOC_I2_006425	ALX1	ZNF131
SMIM2	NUTM2F	SCAND2P	PREB	AZIN2
GOLGA6L9	KLF3	RXRB	TAF7L	TMEM120B
NUPL2	PPP1R14C	CCBE1	C15orf53	ZNF227
OAT	BBS7	GZMH	TSPYL1	FANCB
DAPL1	BCL2	SLC41A2	MAGEB2	IL10RA
GNAI2	SERPINE1	Ttyh1	NFIL3	P2RY1
SLC22A14	FAM122C	XLOC_I2_005687	ZNF248	IL21R
SMAD1	NAT1	ALDH2	C15orf41	UTP14C
RSPH9	IGHMBP2	ZNF578	OR4D10	RNF220
NAA20	PPOX	SPATA6L	HIST1H2BK	SLC22A16
HACD4	SAP18	LMOD1	PSMD12	B3GNT2
LUM	CAPN6	TNFRSF6B	ERMAP	ENTPD4
TCEAL3	EEFSEC	PDRG1	SMYD3	OMG
PDE6B	PTGES	ADA2	GSTT1	MCAM
SSX2	SPRR2A	GOLGA8B	SDC1	SLC40A1
FYN	DPH1	IFITM3	MARS	DHX36
SERPINB5	CCDC189	ADAM21	PUF60	NFATC3
TMEM169	B4GALT1	OR2A12	NRCAM	ICAM3
RAB37	GATA1	WDR5	FBXO38	FAM133A
ZNRD1	SNX7	CIRBP	EWSR1	PKP2
CDIPT-AS1	ALDH3A2	Mon1a	FBXL12	ADAMTS18
CAMK2N2	ANAPC11	ELP6	PLP1	BRS3
AP5B1	SLC35F1	CLRN1	LNX2	HSD17B4
CCDC113	C1orf105	LOC107984065	MEIOC	SPN
LURAP1	MUSTN1	RABIF	GPC6	PCDHGB2
C5orf38	EPPIN	FAM153A	COG6	MYCL
TNFAIP8L3	OR2A4	IGSF8	BLID	
XAGE2	ZKSCAN4	DMPK	CLEC17A	

10

20

30

40

50

【表 6 - 4 3】

G6PC2	S100P	JAM3	TRPC5	
DUOXA2	CBWD1	TSACC	GSKIP	
MIR31HG	TNFAIP8L2	TGS1	RSBN1	
RTL8B	RPL23	GAL3ST3	OR7A5	
UCMA	TSKS	AMHR2	NUAK2	
CALCA	WASHC1	PLPP1	PCDHB7	
DCAF12	LCN2	ZNF211	ZNF776	
SDF2	MFSD8	SLC25A44	ZNF670	
RAB3C	SMCO4	PLA2G15	LARP1	
ANKRD44	DACT2	CDKL1	GDPD2	
NGRN	IZUMO2	CAP2	ACER2	
METTL18	PLA2G10	TMEM184C	ADGRG1	
CD300LF	ZAR1L	APOC4	GJB7	
ROPN1	CCDC69	TLR1	VWA2	
BRF2	ACSF3	NEK11	RPL22	
ALG1L	MYO1D	PLPPR2	AHSG	
BTN3A3	C3orf35	ARL4D	CCDC89	
GAGE7	UPK1A	RBP5	HSPB11	
LOC107987235	COMT	FGD2	TAF12	
HNRNPC	GPCPD1	NO_MATCH_99	TP73-AS1	
CYP2A6	BIN3	RHOF	PRKACG	
B4GALNT2	VCY	FAM221B	CDC14A	
APOC1	EMC9	NOB1	KRT7	
BPIFB3	ZBTB32	PGM2L1	ZNF692	
XLOC_l2_006131	HDHD2	CD151	LOC102724334	
SUN5	FAM213B	NT5C3A	RTCB	
PTPN23	SERPINF1	KRTAP9-6	CLPSL1	
ZNF484	EGLN3	XLOC_l2_014048	NHLH2	
SELENOI	GNG8	NDRG1	SEMG2	
WNT10B	SLC25A6	WDYHV1	ASB7	
LYSMD1	NO_MATCH_115	NPY2R	FFAR3	
APOBEC3G	SSR4P1	HBP1	DHRS9	
DEFB129	CIDEB	SCP2D1	GABPB2	
PLVAP	ZNF280C	SLC16A4	C8orf86	
WEE1	ACTL8	ERCC1	LONRF3	

10

20

30

40

50

【表 6 - 4 4】

SPANXA1	SLC10A7	DUSP3	PDCD1	
COX4I1	PTH	CYP17A1	SLC14A2	
WASHC3	NR1I3	SLIRP	PCDHA2	
STK16	NRBP1	MSLN	NBPF8	
CDK5RAP3	PLA2G5	DNAJB12	SLC37A4	
GPAT4	ARHGAP44	CELF3	LRRC36	
CDA	SERPIND1	CXCR5	CARD8	

10

【実施例】

【0606】

実施例 1：実施例 2～9 の材料及び方法

a. 腫瘍細胞株の生成

腫瘍試料は、患者生検又は患者由来異種移植片のいずれかから得た。組織を手動で粉碎し、2mg/ml のコラゲナーゼ I (Sigma Aldrich、St. Louis, MO)、2mg/ml のヒアルロニダーゼ (Sigma Aldrich)、及び 25g/ml の DNase I (Roche Life Sciences、Branford, CT) の溶液中に懸濁し、15mL 円錐管に移し、オービタルシェーカー上で低速で 30 分間インキュベートした。消化後、単細胞懸濁液を 100m ストレーナーで濾過し、洗浄し、0.02% のヘパリン (StemCell Technologies)、20ng/ml の hEGF (Miltenyi Biotec、Cambridge, MA)、及び 20ng/ml の hFGF-2 (Miltenyi Biotec) を補充した NeuroCult NS-A ヒト増殖キット (StemCell Technologies、Cambridge, MA) の培地を含有する組織培養フラスコ中で培養した。確立された細胞株をマイコプラズマ不含 (Venor (商標) GeM マイコプラズマ検出キット、Sigma Aldrich) で試験し、CK20 及び SOX2 に対する抗体を使用した免疫組織化学染色を通じて MCC として検証した。

20

【0607】

30

b. 細胞培養の最適化

細胞株を、以下のように CK20 及び SOX2 に対する抗体を使用した免疫組織化学染色を通じて、MCC として認証した：

【表 7 - 1】

患者	性別	細胞株源	MCPyV ウイルス状態	処理前	PD1:PD-L1 に対する応答	免疫抑制の履歴

40

50

【表 7 - 2】

277	M	PDX	ウイルス陽性	CE、化学放射線照射、MLN0128、CAV、オクトレオチド、イミキモド、カボザンチニブ	CR	-
282	M	PDX	ウイルス陰性	XRT	-	心臓移植
290	F	PDX	ウイルス陰性	-	-	-
301	M	PDX	ウイルス陽性	CE、化学放射線照射	PD	-
320	M	PDX	ウイルス陰性	CE、化学放射線照射	-	-
336	F	腫瘍	ウイルス陽性	CE、化学放射線照射	-	-
350	M	腫瘍	ウイルス陰性	XRT	PD	-
358	F	腫瘍	ウイルス陽性	XRT	副作用のため中止	アダリムマブ上の関節リウマチ
367	M	PDX	ウイルス陽性	XRT	-	-
383	M	腫瘍	ウイルス陽性	XRT	アジュバント	-
2314	F	PDX	ウイルス陽性	エベロリムス、CE、パクリタキセル	-	-

10

20

【0608】

細胞株を、以下のように11株のうち7株についてHLAタイピングすることによって、元の腫瘍試料の誘導体として認証した。

30

【表 8 - 1】

患者	HLA 対立遺伝子	腫瘍		細胞株	
MCC- 277	HLA-A	HLA-A*11:01:01	HLA-A*32:01:01	HLA-A*11:01:01	HLA-A*32:01:01
	HLA-B	HLA-B*14:01:01	HLA-B*51:01:01	HLA-B*14:01:01	HLA-B*51:01:01
	HLA-C	HLA-C*15:02:01	HLA-C*08:02:01	HLA-C*15:02:01	HLA-C*08:02:01
MCC- 301	HLA-A	HLA-A*24:02:01:01	HLA-A*02:01:01:01	HLA-A*24:02:01:01	HLA-A*02:01:01:01

40

50

【表 8 - 2】

	HLA-B	HLA-B*15:18:01	HLA-B*44:02:01:01	HLA-B*15:18:01	HLA-B*44:02:01:01
	HLA-C	HLA-C*07:04:01	HLA-C*05:01:01:02	HLA-C*07:04:01	HLA-C*05:01:01:02
MCC- 320	HLA-A	HLA-A*01:01:01:01	HLA-A*25:01:01	HLA-A*01:01:01:01	HLA-A*25:01:01
	HLA-B	HLA-B*14:01:01	HLA-B*18:01:01:02	HLA-B*14:01:01	HLA-B*18:01:01:02
	HLA-C	HLA-C*12:03:01:01	HLA-C*08:02:01	HLA-C*12:03:01:01	HLA-C*08:02:01
MCC- 336	HLA-A	HLA-A*02:01:01:01	HLA-A*02:01:01:01	HLA-A*02:01:01:01	HLA-A*02:01:01:01
	HLA-B	HLA-B*35:02:01	HLA-B*52:01:01:02	HLA-B*35:02:01	HLA-B*52:01:01:02
	HLA-C	HLA-C*12:02:02	HLA-C*04:01:01:01	HLA-C*12:02:02	HLA-C*04:01:01:01
MCC- 350	HLA-A	HLA-A*24:02:01:01	HLA-A*29:02:01:01	HLA-A*24:02:01:01	HLA-A*29:02:01:01
	HLA-B	HLA-B*07:02:01	HLA-B*08:01:01	HLA-B*07:02:01	HLA-B*08:01:01
	HLA-C	HLA-C*07:02:01:01	HLA-C*07:01:01:01	HLA-C*07:02:01:01	HLA-C*07:01:01:01
MCC- 367	HLA-A	HLA-A*01:01:01:01	HLA-A*31:01:02	HLA-A*01:01:01:01	HLA-A*31:01:02
	HLA-B	HLA-B*49:01:01	HLA-B*51:01:01	HLA-B*49:01:01	HLA-B*51:01:01
	HLA-C	HLA-C*12:03:01:01	HLA-C*01:02:01	HLA-C*12:03:01:01	HLA-C*01:02:01
MCC- 2314	HLA-A	HLA-A*24:02:01:01	HLA-A*02:01:01:01	HLA-A*24:02:01:01	HLA-A*02:01:01:01
	HLA-B	HLA-B*07:02:01	HLA-B*44:02:01:01	HLA-B*07:02:01	HLA-B*44:02:01:01
	HLA-C	HLA-C*07:02:01:03	HLA-C*05:01:01:02	HLA-C*07:02:01:03	HLA-C*05:01:01:02

【0609】

全てのMCC細胞株は、0.02%のヘパリン、20ng/mLのhEGF、20ng/mLのhFGF2を補充したNeuroCult NS-A増殖キットからの培地で維持された。細胞培養最適化に使用される他の培地には、本明細書に詳述されるようなサプリメントとともにStemflex (Gibco, Dublin, Ireland)、Neurobasal (Gibco)、及びDMEM GlutaMAX (Gibco)が含まれた。K562細胞を、10%のウシ胎仔血清、1%のペニシリン/ストレプトマイシン、HEPES、3-メルカプトエタノール、ビルビン酸ナトリウム(全てGibcoから)を補充したDMEM GlutaMAX中で保持した。細胞培養最適化に使用した培地は、NeuroCult NS-A増殖キット(StemCell Technologies)、StemFlex、0.02%のヘパリン(StemCell Technologies)、20ng/mLのhEGF(Miltenyi Biotec)、20ng/mLのhFGF2(Miltenyi Biotec)補充したNeurobasal (Gibco)、及び10%のFBS (Gibco)、1%のペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco)、1mMのビルビン酸ナトリウム (Life Techn

ologies)、10mMのHEPES (Life Technologies)、及び55nMの3-メルカプトエタノール (Gibco)を補充したDMEM GlutaMAX (Gibco)であった。

【0610】

c. 組織学

最大1000万個のMCC細胞を、10%ホルムアルデヒド中に固定した。細胞ペレットをPBSで洗浄し、パラフィンブロックに載置した。5µmの切片を切断し、染色した。

【0611】

d. フローサイトメトリー

細胞をVerseneと解離し、100mL中の100万細胞当たり5µLのヒトTruStain FcX (Fc受容体遮断溶液、Biolegend、Dedham, MA)と室温で10分間インキュベートした。蛍光色素コンジュゲート抗体又はそれぞれのアイソタイプ対照を直ちに添加し、4℃で更に30分間インキュベートした。次いで、細胞をPBSで1回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドを含有するPBS中に再懸濁し、LSR Fortessa細胞計上で分析した。追加のステップを、以下のように個々の実験について記載した。HLAクラスI実験の上方制御のために、 5×10^5 個のMCC細胞を、漸増用量のIFN α 2b、IFN3、IFN γ で24時間、又はMEK阻害剤及びDMSOで72時間処理した後、上記のようにW6/32及びLive/Deadで染色した。

【0612】

e. 免疫沈降及び質量分析

最大4000万個のMCC細胞を免疫沈降させた。簡潔に述べると、MCC細胞を採取し、40MのTris (pH8.0)、1mMのEDTA (pH8.0)、0.1Mの塩化ナトリウム、Triton X-100、0.06Mのオクチル3- β -D-グルコピラノシド、100U/mLのDNase I、1mMのフェニルメタンスルホニルフルオリド (全てSigma Aldrichから)、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)を含有する氷冷溶解緩衝液中で溶解した。細胞溶解物を4℃で22分間、12,700rpmで遠心分離した。溶解物上清をGammabind Plusセファロースビーズ (GE Healthcare)とカップリングし、10gのHLAクラスI (Clone W6/32、Santa Cruz Biotechnologies)又はHLA-E (Clone 3D12、eBiosciences, San Diego, CA)と4℃で3時間、回転攪拌下でインキュベートした。インキュベーション後、溶解物-ビーズ-抗体混合物を短時間遠心分離し、上清を廃棄した。ビーズを、プロテアーゼ阻害剤なしの溶解緩衝液、40mMのTris (pH8.0)、1mMのEDTA (pH8.0)、0.1Mの塩化ナトリウム、0.06Mのオクチル3- β -D-グルコピラノシド、及び20mMのTris緩衝液を含有する洗浄緩衝液で洗浄した。ゲル装填チップ (Fisherbrand, Fisher Scientific, Pittsburg, PA)を使用して、ビーズから可能な限り多くの流体を除去した。前述のように、最大3つのIPのペプチドを組み合わせ、酸溶出し、LC/MS/MSを使用して分析した (Abelin, Keskin Immunity)。簡潔に述べると、ペプチドを3% ACN、5% FAに再懸濁し、分析カラム (20~30cm、1.9µmのC18 Dr. Maisch、社内で充填)に充填した。ペプチドを6~30%の勾配で溶出し (EasyLC 1000又は1200、ThermoFisher Scientific)、QExactive Plus又はFusion Lumos (ThermoFisher Scientific)上で分析した。Lumos測定の場合、ペプチドはまた、単独で荷電された場合に断片化された。

【0613】

大型T抗原ペプチドの検出の場合、IFN γ で処理した367細胞株の3つのIpをブルし、酸溶出させ、ステージ先端の基本的な逆相分離を使用して分画し、画分をFAI

10

20

30

40

50

MSプロインターフェースを備えたFusion Lumos上で分析した(Klaeger et al., 調製物中)。

【0614】

質量スペクトルは、Spectrum Millソフトウェアパッケージv7.1プレリリース(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)を使用して解釈した。MS/MSスペクトルは、600~4000の範囲における前駆体MH+を有しないか、前駆体電荷が5超であるか、又は最小5未満の検出されたピークを有する場合、検索から除外された。同じクロマトグラフィーのピークで取得された同じ前駆体m/zとの類似のスペクトルの融合を無効にした。MS/MSスペクトルを、ゲノム及びそのタンパク質コード転写物のhg19注釈を有する全てのUCSCゲノムブラウザ遺伝子(63,691エントリ)、一般的なヒトウイルス配列(30,181エントリ)、26個の組織からの腫瘍で観察される反復変異タンパク質(4,167エントリ)、264個の一般的な実験室汚染物質、及びMCC細胞株で検出される体細胞変異を含有するタンパク質配列を含む、98,298エントリを含有するタンパク質配列データベースに対して検索した。MS/MS検索パラメータは、無酵素特異性；固定修飾：システインのカルバミドメチル化；可変修飾：ペプチドN末端グルタミンにおけるメチオニン、及びピログルタミン酸の酸化；±10ppmの前駆体質量公差；±10ppmの生成物質量公差、並びに30%の最小一致ピーク強度を含む。個々のスペクトルのペプチドスペクトル一致(PSM)を、PSMレベル<1% FDRで標的デコイに基づくFDR推定を適用するために、Spectrum Mill自動検証モジュールを使用して確実に割り当てられたものとして自動的に指定した。ペプチドの自動検証は、スコアを最適化するための自動閾値戦略を用いて各試料について別々に行い、デルタランク1ーランク2スコア閾値は、試料当たりの全てのLC-MS/MS実行にわたる各前駆体電荷状態(1~4)について別々に行った。スコア閾値の決定はまた、ペプチドが7の最小配列長を有し、PSMが5の最小骨格切断スコア(BCS)を有することを必要とした。ペプチド及びPSMのエクスポートを、空のビーズ試料中で同定された潜在的なキャリアオーバーペプチド及びペプチドを含む汚染物質についてフィルタリングした。IFNγ+/−試料のより公平な比較のために、PSMを、両方の条件について同様の細胞数及びのIP入力に類似する生のファイルによって濾過した。

【0615】

f. 全プロテオーム解析及び解釈

MCC細胞株のタンパク質発現を、前述のように評価した(Mertins et al., (2018) Nature Protocols 13(7):1632-61。簡潔に述べると、IFNγ処理の有無にかかわらず、MCC細胞株の細胞ペレットを8Mの尿素中で溶解し、LysC及びトリプシン(Promega)を使用してペプチドに消化した。400μgのペプチドを、TMT10試薬(Thermo Fisher, 126-MCC290、127N-MCC350-IFN、127C-MCC275-IFN、128N-MCC275、128C-MCC350、129N-MCC301-IFN、129C-MCC277、130N-MCC290-IFNγ、130C-MCC277-IFN、131-MCC301)で標識し、次いで、その後の分画及び分析のためにプールした。プールしたペプチドを、オフライン高pH逆相分画を使用して24個の画分に分離した。1画分当たり1μgを、分析カラム(20~30cm、1.9μmのC18 Reprosilビーズ(Dr. Maisch HPLC GmbH)、社内充填PicoFrit 75μm内径、10μm発光体(New Objective))に装填した。ペプチドを、6~30%の緩衝液B(0.1%のFA又は0.5%のAcOH、及び80%又は90%のACNのいずれか)の範囲の直線勾配(EasyNanoLC 1000又は1200、Thermo Scientific)で84分間、30~90%のBで9分間溶出し、90%の緩衝液Bで5分間、200nL/分で保持した。データ依存的取得の間、ペプチドをFusion Lumos(Thermo Scientific)で分析した。フルスキャンMSは、300~1,800m/zの60,000で取得し

た。A G C 目標を 4×10^5 及び 50 ms に設定した。サイクル当たりの上位 20 個の前駆体を、 $60,000$ 分解能で、 0.7 m/z 、 34 NCE 、 3×10^4 A G C 標的、及び 50 ms の最大注入時間の単離幅で H C D 断片化に供した。動的排除を有効にし、持続時間を 4.5 秒とした。

【0616】

M C C バリエーションを除外した上記のデータベースに対して S p e c t r u m M i l l を使用してスペクトルを検索して、トリプシンを指定し／消化酵素としての P を許容 (K - P 及び R - P 切断を許容) し、4 つの未切断を許容した。システインのカルバミドメチル化を固定修飾として設定した。T M T 標識は、リジンで必要とされたが、ペプチド N 末端は、標識又は非標識のいずれかとするのができた。検索した可変修飾には、タンパク質 N 末端のアセチル化、酸化メチオニン、ピログルタミン酸、脱アミドアスパラギン、及びピロカルバミドメチルシステインが含まれる。マッチ許容値を、M S 1 及び M S 2 レベルで 20 ppm に設定した。P S M スコア閾値化は、S p e c t r u m M i l l 自動検証モジュールを使用して、ペプチドスペクトラムマッチ (P S M) レベル及びタンパク質レベルでの 2 つのステップで標的 - デコイベースの F D R を適用した。ステップ 1 では、P S M レベルの自動検証は、最初に、最小配列長 8 の自動閾値戦略、自動可変範囲前駆体質量フィルタリング、並びに最適化したスコア及びデルタランク 1 - ランク 2 スコア閾値を使用して行い、各 L C - M S / M S 実行での各前駆体電荷状態について、前駆体電荷 2 ~ 4 の P S M レベルの F D R 推定値 $< 1.0 \%$ を得た。前駆体電荷 5 ~ 6 について合理的な統計を得るために、閾値を最適化して、より高い電荷状態に対して生成されるスペクトルがより少ないため、実験当たり (各実行当たりではなく) 全ての L C 実行にわたって、 0.5% 未満の P S M レベルの F D R 推定値を得た。ステップ 2 では、標的タンパク質レベルの F D R 閾値 0 を使用して、P S M を更にフィルタリングするために、タンパク質研磨自動検証を各実験に適用し、タンパク質グループ化方法は、サブグループを拡大し、上位は絶対最小タンパク質スコア 9 有する共有 (S G T) を使用する。

【0617】

g. O R F スクリーニング

$13,833$ 個の遺伝子にマッピングする $16,172$ 個の固有の O R F を含む、ヒト O R F e o m e バージョン 8.1 レンチウイルスライブラリは、B r o a d G e n e t i c P e r t u r b a t i o n s P l a t f o r m からの贈り物として提供された。 7500 万個の M C C 301 V P 細胞を、O R F e o m e レンチウイルスで形質導入して、 30% ~ 40% の感染率を達成した。2 日後、形質導入細胞を、3 日間の $0.5 \mu \text{g/mL}$ ピューロマイシン処理で選択した。形質導入の 7 ~ 10 日後、細胞を抗 H L A - A B C - P E 抗体 (W 6 / 32 クローン、B i o l e g e n d # 311405) で染色し、H L A - A B C - P E 染色の上位及び下位 10% についてゲーティングした B D F A C S A r i a I I で選別した。その後、安定して組み込まれた O R F 配列を含むゲノム D N A を、選別された細胞から単離した。スクリーニングを 3 回行った。次いで、単離されたゲノム D N A を、構築物バーコード領域のインデックス P C R 増幅のためのテンプレートとして使用した。プールされた P C R 生成物を精製し、I l l u m i n a H i S e q 上で実行した。

【0618】

h. ゲノムワイド C R I S P R - K O レンチウイルスライブラリの生成

B r u n e l l o ヒト C R I S P R ノックアウトプールプラスミドライブラリ (D o e n c h e t a l . (2016) N a t u r e 34 (2) : 184 - 91) (1 ベクター系) は、D a v i d R o o t a n d J o h n D o e n c h (W a t e r t o w n , M A , A d d g e n e # 73179) からの贈り物であった。 50 ng の B r u n e l l o ヒト C R I S P R ノックアウトプールプラスミドライブラリ (1 ベクター系) を、E l e c t r o M A X S t b l 4 コンピテント細胞 (T h e r m o F i s h e r , カタログ番号 # 11635018) にエレクトロポレーションし、 $24.5 \times 24.5 \text{ cm}$ の寒天バイオアッセイプレート上で 30°C で一晩インキュベートした。20 時間後、コ

ロニーを採取してプールし、増幅したプラスミドDNA (pDNA) を抽出して精製した。増幅後にライブラリ多様性が維持されたことを確認するために、sgRNAバーコード構築領域を増幅前及び増幅後のライブラリアリコートにおいてPCR増幅させた。PCR生成物を精製し、Illumina MiSeq上で配列決定した。増幅前及び増幅後のアリコートからの配列決定データを比較して、同様の多様性を確保した (図3A)。レンチウイルスを産生するために、HEK-293T細胞を、TransIT-LT1トランスフェクション試薬 (Mirus Bio、Madison, WI、カタログ番号# MIR2300) を使用して、pDNA、VSV-G、及びpSPAX2プラスミドでトランスフェクトした。レンチウイルスを、トランスフェクションの48時間後に採取し、急速凍結した。レンチウイルスを力価化するために、150万個の細胞のMCC-301細胞を、100、200、300、500、及び700 μ Lのウイルスで形質導入した。各条件から、細胞の半分を0.5 μ g/mLのピューロマイシンで選択した。感染率は、選択された条件及び選択されていない条件での生細胞カウントを比較することによって計算した。

10

【0619】

i. CRISPR-KOスクリーニング

19, 114遺伝子を標的とする76, 441のsgRNAを含有するヒトBrunello CRISPRノックアウトプールプラスミドライブラリは、David Root及びJohn Doench (Addgene、カタログ番号# 73178) からの贈り物であった。次いで、Brunelloプラスミドライブラリを形質転換し、エレクトロコンピテントStbl4細胞内で増殖させ、レンチウイルスをHEK-293T細胞内で産生した。その後の形質導入及びFACSスクリーニングは、以下の例外を除いて、ORFスクリーニングに類似して3回行った：1億5000万個のMCC301VP細胞は、複製ごとに形質導入され、形質導入の数日後に細胞を選別した。更に、形質導入後、フローサイトメトリー選択の前に、代表的なペレット (4000万個の細胞) を採取し、3つの複製全てから配列決定して、sgRNAの表現を評価した (図4F)。

20

【0620】

j. スクリーニングデータ分析

未処理のFASTQ読み取りを、PoolQソフトウェア (Broad Institute) を使用して、各構築物についてlog正規化スコアに変換した。3つの複製の各々について、上位と下位の10%スコア間のlog倍率変化 (LFC) を、各構築物について計算した。ORFスクリーニングの場合、次いで、ORF構築物を、それらの中央値LFCに基づいてランク付けし、対応するp値を、超幾何分布モデル (Broad Institute) を使用して計算した。CRISPRスクリーニングの場合、平均sgRNA表現 (図4C) によって測定して、不良な試料品質のために複製2を廃棄し、各sgRNAのLFC値を複製1と3との間で平均化し、次いでSTARSソフトウェア (v1.3、Broad Institute) (Doench et al., (2016) 上記参照) に入力し、それらに対応する個々のsgRNAのランクに基づいて遺伝子をランク付けするために二項分布モデルを用いた。

30

【0621】

k. CRISPR KO株の生成

配列5' CACCG-----sgRNA配列-----3' 及び5' AAAC-----sgRNAの逆相補鎖-----C3' を有する順方向及び逆方向オリゴは、Eton Biosciences (San Diego, CA) によって合成された。順方向及び逆方向のオリゴをアニーリングしてリン酸化し、BsmBI適合性オーバーハングを産生した。LentiCRISPRv2ベクター (Addgene、カタログ番号# 52961) をBsmBIで消化し、エピアルカリホスファターゼで脱リン酸化し、ゲル精製した。ベクター及びインサートを、室温でT7 DNAリガーゼと1:8の比率でライゲーションし、Stbl3細胞に形質転換した。以下のプライマー：5' -GATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATT-3' を使用したSanger配列決定により、正しいsgRNA

40

50

A クローニングを確認した。レンチウイルスを産生し、MCC-301細胞を、CRISPR-KOライブラリと同様の方法で単一の構築物レンチウイルスで形質導入した。

【0622】

l. 全エクソーム配列決定及び変異呼び出し

ゲノムDNA試料を、約180bpのサイズ分布のために最適化されたBroad Institute開発のプロトコルを使用して切断した。Kapa Hyperprepキットを使用して、末端修復、独自の分子インデックスを含有する二又アダプターによるアダプターライゲーション、及びPCRを介したP5及びP7試料バーコードの添加を含む、体細胞試料に最適化されたプロセスでライブラリを構築した。SPRI精製を行い、得られたライブラリをPico Greenで定量化した。ライブラリを正規化し、等モルプーリングを行い、ハイブリダイゼーションのための多重化セットを調製した。自動捕捉を行い、続いて濃縮されたDNAのPCRを行った。SPRI精製をクリーンアップに使用した。次いで、Pico Greenで多重プールを定量化し、Bioanalyzerを使用してDNA断片サイズを推定した。最終ライブラリをqPCRによって定量化し、標的領域の130～160倍の平均カバレッジの範囲で、50倍以上の深度で標的塩基の85%以上がカバーされるように、適切な数のレーンにわたってIlluminaフローセルに装填した。

10

【0623】

エクソーム配列決定bamファイルは、Google Cloud Storageコマンドツールgsutilバージョン4.5 (github.com/GoogleCloudPlatform/gsutil/)を使用して、Broad Genomics Firecloud/Terraプラットフォームからダウンロードした。gatkバージョン4.1.2.0 (doValle et al. (2016) BMC Bioinformatics 17 (12): 27-35)を使用して、(1) 最大MNP距離0を使用して、Mutect2コマンドで正常なbam上の参照から変異を呼び出し (Benjamin et al. (2019) bioRxiv, doi.org/10.1101/861054)、(2) CreateSomaticPanelOfNormalsコマンドを使用して、呼び出された正常変異のvcfファイルから正常のパネルを構築し、(3) Mutect2コマンドを使用して、それらそれぞれの正常な対応物と比較して、腫瘍及び細胞株の両方の対間で変異を呼び出した。これらのステップでは、以下の注釈を使用した: ftp.broadinstitute.org/bundle/b37/human__g1k__v37.fastaからダウンロードしたb37参照配列、ftp.broadinstitute.org/bundle/beta/Mutect2/af-only-gnomad.raw.sites.b37.vcf.gzからダウンロードした生殖系列リソースvcf、及びgithub.com/broadinstitute/gatk/blob/master/src/test/resources/large/whole__exome__illumina__coding__v1.Homo__sapiens__assembly19.targets.interval__listからダウンロードしたインターバルリスト。呼び出されたバリエーションを、gatk FilterMutectCallsコマンドでフィルタリングし、PASSとラベル付けされたバリエーションを抽出し、下流分析に含めた。

20

30

40

【0624】

次に、通過したバリエーションのvcfファイルを、vcf2mafバージョン1.16.17 (github.com/mskcc/vcf2maf/tree/5453f802d2f1f261708fe21c9d47b66d13e19737からダウンロードした) 及びgithub.com/Ensembl/ensembl-vep/archive/release/95.3.tar.gz (McLaren et al. (2016) Genome Biology 17 (1): 1-14) からインストールしたバリエーション効果予測因子 (VEP) バージョン95を使用して、mafファイルとして注釈を付けた。R Bioconductorパッケージmaftools (Mayak

50

onda et al. (2018) Genome Research 28 (11) : 1747-56) を使用して、遺伝子及び試料による変異の腫瘍プロットを生成した。

【0625】

m. 全ゲノム配列決定及びコピー数分析

全ゲノム配列決定は、Admera Healthによって行った。読み取りは、TrimGaloreをデフォルト設定で使用して、品質及びアダプターでトリミングした。トリミングした読み取りを、hg38及びMCPyV (NCBI受入番号: NC_010277) を含有する融合参照に対して、bowtie2-very-sensitiveを使用して整列させた。コピー数のバリエーション分析は、GATK4 CNV推奨業務を用いて行った。腫瘍由来のCNVを呼び出すために、17個の正常な血液全ゲノムから正常のパネルを生成した。

【0626】

n. RNA配列決定分析

RNA試料を、Agilent Bioanalyzer (DV200メトリック) を使用して、最初に品質について評価した。100ngのRNAを、Superscript II逆トランスクリプターゼ及びIlluminaのTruSeq RNAアクセス試料調製キットを使用した第1の鎖cDNA合成の入力として使用した。cDNAの第2の鎖の合成に続いて、UMI (独自の分子インデックス) アダプターを用いたインデックス化アダプターライゲーションを行った。その後のPCR増幅により、適合断片が濃縮された。増幅されたライブラリを定量化し、正規化し、プールし、エクソーム標的化オリゴとハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション後、ビーズクリーニング、溶出、及びPCRを行い、Illuminaフローセルレーン上で配列決定するためのライブラリプールを調製した。トランスクリプトームを、対で少なくとも5000万回の読み取りのカバレッジまで配列決定した。

【0627】

線維芽細胞及び角質細胞対照株の生のfastqファイルを、受入コードSRP126422 (対照試料「NN」から4回の複製) 及びSRP131347 (条件: 対照及び遺伝子型: 対照で6回の複製) を使用するR BioconductorパッケージSRADB (Mayakonda et al. (2018) 上記、Zhu et al. (2013) BMC Bioinformatics 14 (1) : 1-4) を使用して、SRADBからダウンロードした。これらのfastqファイルを、mkl1及びwaga細胞株のファイルとともに、STARバージョン2.7.3a (Dobin et al. (2013) Bioinformatics 29 (1) : 15-21) を使用し、ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/genocode/Gencode_human/release_19/GRCh37.p13.genome.fa.gzからダウンロードしたインデックスゲノム参照ファイル、data.broadinstitute.org/snowman/hg19/star/genocode.v19.annotation.gtfからダウンロードした転写物注釈ファイル、及び以下のオプションを使用して整列させた: --twopassMode Basic、--outSAMstrandField intronMotif、--alignIntronMax 1000000、--alignMatesGapMax 1000000、--sjdbScore 2、--outSAMtype BAM Unsorted、--outSAMattributes NH HI NM MD AS XS、--outFilterType BySJout、--outSAMunmapped Within、--genomeLoad NoSharedMemory、--outFilterScoreMinOverLread 0、--outFilterMatchNminOverLread 0、--outFilterMismatchNmax 999、及びoutFilterMultimapNmax 20。重複は、picard MarkDuplicatesバージョン2.22.0-SNAPSHOTでマークした。

10

20

30

40

50

【0628】

MCC腫瘍及び細胞株試料のRNA配列決定bamファイルを、Google Cloud Storageコマンドラインツールgsutilバージョン4.5 (github.com/GoogleCloudPlatform/gsutil/)を使用して、Broad Genomics Firecloud/Terraプラットフォームからダウンロードした。

【0629】

遺伝子カウントは、featureCountsバージョン2.0.0 (doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656)を使用して、bamファイルから得た。試料全体の平均カウントが1未満の非常に低い発現遺伝子は、分析から除外された。DESeq2 R Bioconductorパッケージ (Dobin et al. (2013) 上記、Love et al. (2014) Genome Biology 15 (12) : 550) のvst関数から得られた分散安定化カウントのベクター上のユークリッド距離を使用して、試料間距離メトリックを計算した。

【0630】

(1) ウイルス陽性及びウイルス陰性試料 (共変量として細胞株又は腫瘍について調整する)、(2) 細胞株及び腫瘍試料 (共変量としてウイルス状態について調整する)、並びに (3) DESeq2の陰性二項GLM Wald試験を使用してIFN γ プラス及びマイナス試料 (共変量としてウイルス状態について調整する) の間で差次的発現分析を行い、ここで、デフォルト設定下で複数の比較について調整したp値を使用して、有意性を評価した。試料群間の潜在的な全般的遺伝子発現差異を説明するために、RUVg (Risso et al. (2014) Nature 32 (9) : 896-902) を使用して、www.tau.ac.il/~elieis/HKG/HK_genes.txtからダウンロードされたハウスキーピング遺伝子のリストから、望ましくない変異の潜在的因子を推定した。次いで、不必要な変動の最大の因子を、DESeq2モデルで共変量として使用して、ライブラリサイズとは無関係の潜在的変動を調整した。fgsea R Bioconductorパッケージを使用して、上述の差次的発現結果に対して遺伝子セット濃縮分析を行った (Korotkevich et al. (2016) Bioinformatics. bioRxiv)。

【0631】

o. ATAC-seq

ATAC配列決定は、Admera Healthによって行った。ATAC配列決定は、hg38を参照としてペアエンド読み取りについて、Kundaje Lab ATAC-seqパイプライン (github.com/kundajelab/atac_dname_pipelines) を使用して分析した。下流分析には、擬似複製物の重複からのピークを使用した。ATAC-seqデータの品質を確認するために、各試料をCistrome DB (Zheng et al. (2019) Nucleic Acids Research 47 (D1) : D729-35) 上の一般に公開されているATAC-seqデータセットに対して、ピーク保存性を評価することによってベンチマークした。

【0632】

p. 示差ピーク分析

(1) ウイルス陽性及び陰性試料、並びに (2) IFN γ 応答性及び非応答性 (上位4つ及び下位4つに分割<詳細説明はPatrick>) の間の示差ATAC-seqピークを、DiffBind R Bioconductorパッケージを使用して呼び出した (Ross-Innes et al. (2012) Nature 481 (7381) : 389-93)。DiffBindによって呼び出される、DESeq2の陰性二項GLM Wald試験からの調整p値を使用して有意性を評価した。ChIPpeakAnno (Zhu et al. (2010) BMC Bioinformatics 11 (May) : 237) 及びTxDb.Hsapiens.UCSC.hg38.kno

10

20

30

40

50

w n G e n e (T x D b . H s a p i e n s . U C S C . h g 1 9 . k n o w n G e n e) R B i o c o n d u c t o r パッケージを使用して、ピークを最も近い T S S を有する遺伝子によって注釈を付けた。視覚化のための比較 A T A C - S e q データセットを、G E O (G S M 2 7 0 2 7 1 2 - 初代 B 細胞、G S M 2 4 7 6 3 4 0 - 5 0 1 M E L 細胞株) 及び E N C O D E (E N C F F 6 5 4 Z N I - 初代胎児包皮角質細胞) から抽出した。A T A C - S e q トラックを視覚化するために、全ての B A M ファイルを、1 0 ヌクレオチド b i n サイズ、及び 1 0 0 万読み取り当たりの転写物のキロベース当たりの読み取りの正規化方法 (R P K M) を用いて、d e e p T o o l s から b a m C o v e r a g e (a c a d e m i c . o u p . c o m / n a r / a r t i c l e / 4 4 / W 1 / W 1 6 0 / 2 4 9 9 3 0 8) を使用して同一に正規化した。得られた b i g w i g ファイルを、I n t e g r a t i v e G e n o m e V i e w e r (w w w . n c b i . n l m . n i h . g o v / p m c / a r t i c l e s / P M C 3 3 4 6 1 8 2 /) において視覚化した。

10

【0633】

q. 全ゲノム亜硫酸水素塩配列決定

全ゲノム亜硫酸水素塩配列決定 (W G B S) を、A d m e r a H e a l t h によって行った。h g 3 8 参照ゲノムを、B i s m a r k を使用して調製した。読み取りを調製した h g 3 8 ゲノムに整列させ、重複排除し、B i s m a r k をデフォルト設定で使用してメチル化状態を抽出した。

20

【0634】

B i s m a r k メチル化カウント出力ファイル (. c o v) を、b s s e q B i o c o n d u c t o r パッケージを使用して鎖崩壊させた (H a n s e n e t a l . (2 0 1 2) G e n o m e B i o l o g y 1 3 (1 0) : R 8 3) 。 4 未満の試料中で少なくとも 1 つの読み取りによって覆われた C p G 部位は、更なる分析から除外された。T x D b . H s a p i e n s . U C S C . h g 3 8 . k n o w n G e n e (T x D b . H s a p i e n s . U C S C . h g 1 9 . k n o w n G e n e) R B i o c o n d u c t o r パッケージによって注釈を付けた全ての転写物のプロモーター領域 (2 0 0 0 塩基対上流、2 0 0 塩基対下流) 。次いで、各遺伝子記号に一致する全ての転写物の各プロモーター領域内の全ての部位の生メチル化レベル (メチル化カウントをカバレッジで割ったもの) を平均化した。

30

【0635】

r. MCPyV ウイルス転写物検出 (核酸単離、ライブラリ調製及び配列決定)

O n c o P a n e l (v 3) b a i t セットによる補充の有無にかかわらず V i r o P a n e l を行うために、Q u a n t - i T P i c o G r e e n d s D N A アッセイ (T h e r m o F i s h e r) を使用して、精製した DNA を定量化した。 (S t a r r e t t e t a l . (2 0 2 0) G e n o m e M e d i c i n e 1 2 : 3 0) 。 2 0 0 n g の DNA を使用してライブラリ構築を行い、最初に、C o v a r i s L E 2 2 0 フォーカス超音波計 (C o v a r i s , W o b u r n , M A) を使用して約 2 5 0 b p に断片化し、続いて A g e n c o u r t A M P u r e X P ビーズ (B e c k m a n C o u l t e r , I n c . I n d i a n a p o l i s , I N) を使用して 1 : 1 のビーズ対試料比でサイズ選択されたクリーンアップを行った。断片化した DNA を、製造業者の推奨 (T h e r m o F i s h e r) を使用して、K A P A H T P ライブラリキットを使用して、I l l u m i n a ライブラリに変換した。アダプターライゲーションは、x G e n デュアルインデックス U M I アダプター (I D T , C o r a l v i l l e , I A) を使用して行った。

40

【0636】

試料を等体積でプールし、I l l u m i n a M i S e q ナノフローセル上で実行して、バーコード当たりの読み取り数に基づいてライブラリの量を定量化した。全ての試料は、十分なライブラリ (> 2 5 0 n g) を得て、ハイブリッド捕捉に持ち込んだ。ライブラリを等質量 (3 × 1 7 - p l e x 及び 1 × 1 8 - p l e x) でプールして、合計 7 5 0 n

50

gとした。捕捉は、OncoPanel (v3) baitセットを用いた補充の有無にかかわらず、ViroPanelを用いたSureSelectXT Fast標的濃縮アッセイ (Agilent, Technologies, Santa Clara, CA) を使用して行った。捕捉を、急速実行モードのIllumina 2500 (Illumina Inc., San Diego, CA) 上で配列決定した。

【0637】

ウイルス読み取りを抽出、組み立て、注釈、及び視覚化し、ウイルスインテグレーション部位を決定するために、カスタムperlスクリプトを記述した。ウイルス読み取り及びそれらのメイトは、最初に、ウイルスゲノムに少なくとも1つのメイトマップを有するものによって特定され、抽出された。ウイルス配列を含有する追加の読み取りを、MCPyVゲノムの31bp k-merで重複する独自の構築したbloomフィルタによって特定した。ウイルスゲノムへのメイトマッピングを有する任意の読み取りのヒトゲノム位置をBEDファイルに出力し、ウイルス対及びヒト対の配向を記憶して、重複したインテグレーション部位を正確に分断した。このBEDファイルは、その範囲に重複する読み取り数をカウントする配向に基づいて、重複する範囲にマージされた。インテグレーション接合部のカバレッジの歪みは、前述の範囲の前半及び後半で重複するウイルス-宿主読み取りペアの分画の差によって計算された。この歪み値を使用して、ウイルス-宿主接合部の配向を決定し (すなわち、正の値、接合部は範囲の3'末端にあり、負の値、接合部は範囲の5'末端にある)、これをデノボアセンブリの結果から検証した。デフォルトパラメータを有するSPADEを使用して、抽出した読み取りからインテグレートされたウイルスゲノムを組み立てた。SPADEsからのアセンブリグラフを、hg19及びMCPyV参照ゲノムに対するblastnを使用して、e値カットオフ 1×10^{-10} で注釈を付けた。注釈付きアセンブリグラフを、gggraph Rパッケージを使用して視覚化した。

【0638】

参照誘導アラインメント及びアセンブリデータによって確認されたインテグレーション部位を、ウイルスゲノム及びヒトゲノム上のインテグレーション接合部の上流及び下流の10bpを選択することによって、ヒトゲノムとウイルスゲノムとの間のマイクロホモロジーの伸長について分析した。これらの配列内で、2つの塩基対よりも長い同じ位置での同一の配列の伸長をカウントした。配列間の全体的な相同性は、Levenshtein距離によって計算した。ウイルスDNAとヒトDNAとの間に1~25bpの範囲の不定DNA配列を挿入した3つのインテグレーション接合部を分析から除外した。予想されるマイクロホモロジーは、ヒト及びMCPyVゲノムから非N含有配列の1000個の20bp対をランダムに選択することによって計算した。

【0639】

反復要素へのインテグレーション部位の近接性は、最も近いbedtools及びUCSCゲノムブラウザから取得したrepeatmasker注釈を使用して決定した。ヒトゲノム中の1000個の部位をランダムに選択することによって、反復要素の近くでのインテグレーションの予想される頻度を決定した。反復要素の2kb以内の部位を近接としてカウントした。

【0640】

体細胞変異及びウイルスインテグレーション事象の機能的注釈を、PANTHER (www.panthierdb.org) を使用して行った。

【0641】

s. RNA-seqのウイルス転写物定量化

メルケル細胞ポリオーマウイルス参照配列を、www.ebi.ac.uk/ena/data/view/EU375804&display=fastaからダウンロードした。マッピングされていない読み取りを、SAMtoolsビューバージョン1.10 (Li et al. (2009) Bioinformatics 25 (16): 2078-79) を使用して、腫瘍及び細胞株のRNA-seq bamファイルから抽出し

10

20

30

40

50

、bwaバージョン0.7.17-r1188 (Li and Durbin 2010) を使用して、MCCポリオマウイス参照配列に再整列した。最後に、MCCポリオマウイス参照に良好にマッピングされた各試料の読み取り数を、SAMtoolsビューでカウントした。

【0642】

t. 依存性マップの相関関係

DepMap 20Q2 CRISPR 依存性データは、www.depmap.org/portal/download/からダウンロードした。少なくとも1つのコード変異の基準に基づいて、DepMapポータル上のCell-Line Selector ツールを使用して、TP53 変異状態を割り当てた。ピアソン係数を、R中のtest.corを使用して計算し、この関数によって出力された両側p値を、p.adjustを使用してFDRに変換した。ggplot2、tidyverse、gridExtra、cowplot、及びスケールを使用して、プロットを生成した。GSEAは、ピアソン相関が負の場合、 $-\log(p\text{-val})$ に (-1) を乗じてランク付けされた遺伝子リストを使用して行った。

【0643】

u. 定量化及び統計分析

全ての統計分析の詳細とともに、バージョン番号を含む特定のソフトウェアパッケージは、上記のそれぞれの方法の節に列挙されている。研究の一部として、ランダム化手順又は試料サイズの計算は実行されなかった。全エクソーム配列分析、RNA-seq分析、ATAC-seq示差ピーク解析、MCPyVウイルス転写物検出、及びWGBSプロモーターシグナル抽出のための特定のパラメータ設定を含む全ての分析コードは、github.com/kdkorthauer/MCCのMITライセンスの下でGithubリポジトリで利用可能になる。Rにおける全ての解析は、バージョン3.6.2を使用して実行した。

【0644】

v. オリゴ、プライマー、及び主要なリソース

【表9-1】

オリゴ名	配列	注記
BCORL1-1 fwd	CACCGTCCCGCATCTGACAGCGCCG	ガイドRNA クローニングのためのオリゴ
BCORL1-1 rev	AAACCGGCGCTGTCAGATGCGGGAC	ガイドRNA クローニングのためのオリゴ
BCORL1-2 fwd	CACCGGGAGGCGGGATATATACCAG	ガイドRNA クローニングのためのオリゴ
BCORL1-2 rev	AAACCTGGTATATATCCCGCCTCCC	ガイドRNA クローニングのためのオリゴ
USP7-1 fwd	CACCGTTGATGACGACGTGGTGTCA	ガイドRNA クローニングのためのオリゴ
USP7-1 rev	AAACTGACACCACGTCGTCATCAAC	ガイドRNA クローニングのためのオリゴ

【表 9 - 2】

USP7-2 fwd	CACCGGGCAGTAGAACAGCTCGATG	ガイド RNA クローニングの ためのオリゴ
USP7-2 rev	AAACCATCGAGCTGTTCTACTGCCC	ガイド RNA クローニングの ためのオリゴ
PCGF1-1 fwd	CACCGCCACGAAGTAGCCGGCGCAT	ガイド RNA クローニングの ためのオリゴ
PCGF1-1 rev	AAACATGCGCCGGCTACTTCGTGGC	ガイド RNA クローニングの ためのオリゴ
PCGF1-2 fwd	CACCGGCTCATCATAGCGATAGTAG	ガイド RNA クローニングの ためのオリゴ
PCGF1-2 rev	AAACCTACTATCGCTATGATGAGCC	ガイド RNA クローニングの ためのオリゴ
CTRL-1 fwd	CACCGTGC GGCGTAATGCTTGAAAG	ガイド RNA クローニングの ためのオリゴ
CTRL-1 rev	AAACCTTTCAAGCATTACGCCGCAC	ガイド RNA クローニングの ためのオリゴ
CTRL-2 fwd	CACCGGGATTAATTCGCTAAATGAT	ガイド RNA クローニングの ためのオリゴ
CTRL-2 rev	AAACATCATTTAGCGAATTAATCCC	ガイド RNA クローニングの ためのオリゴ
B2M fwd	TCTCTGCTGGATGACGTGAG	qPCR プライマー
B2M rev	TAGCTGTGCTCGCGCTACT	qPCR プライマー
TAP1 fwd	TCAGGGCTTTCGTACAGGAG	qPCR プライマー
TAP1 rev	TCCGGAACCGTGTGTACTT	qPCR プライマー
TAP2 fwd	ACTGCATCCTGGATCTCCC	qPCR プライマー
TAP2 rev	TCGACTCACCTCCTTTCTC	qPCR プライマー
TAPBP fwd	ACCCTGGAGGTAGCAGGTCTTT	qPCR プライマー

10

20

30

40

50

【表 9 - 3】

TAPBP rev	AATCCTTGCAGGTGGACAGGTAG	qPCR プライマー
LMP2 fwd	TCAAACACTCGGTTCAACCAC	qPCR プライマー
LMP2 rev	GGAGAAGTCCACACCGGG	qPCR プライマー
LMP7 fwd	CATGGGCCATCTCAATCTG	qPCR プライマー
LMP7 rev	TCTCCAGAGCTCGCTTTACC	qPCR プライマー
HLA-A fwd	GCGGCTACTACAACCAGAGC	qPCR プライマー
HLA-A rev	GATGTAATCCTTGCCGTCGT	qPCR プライマー
HLA-B fwd	GACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAA	qPCR プライマー
HLA-B rev	CACGGGCCGCCTCCCACT	qPCR プライマー
HLA-C fwd	GGAGACACAGAAGTACAAGCG	qPCR プライマー
HLA-C rev	CGTCGTAGGCGTACTGGTCATA	qPCR プライマー
HLA-E fwd	CCTACGACGGCAAGGA	qPCR プライマー
HLA-E rev	CCCTTCTCCAGGTATTTGTG	qPCR プライマー
NLRC5 fwd	CGCTCTGTGGCCACTTTCAG	qPCR プライマー
NLRC5 rev	TGCCCCGCTGTGAGACTTCAT	qPCR プライマー
UBC fwd	ATTTGGGTCGCGGTTCTTG	qPCR プライマー
UBC rev	TGCCTTGACATTCTCGATGGT	qPCR プライマー
GAPDH fwd	TGCACCACCAACTGCTTAGC	qPCR プライマー
GAPDH rev	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	qPCR プライマー
HPRT1 fwd	TGACACTGGCAAAACAATGCA	qPCR プライマー
HPRT1 rev	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	qPCR プライマー
ACTB fwd	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	qPCR プライマー
ACTB rev	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA	qPCR プライマー

10

20

30

40

50

【表 10 - 1】

試薬又はリソース	ソース	識別子
抗体		
Brilliant Violet 421 コンジュゲート抗ヒト PD-L1 抗体	Biolegend	カタログ番号 329714
Brilliant Violet 421 コンジュゲート抗ヒト CD56 抗体	Biolegend	カタログ番号 318328
Brilliant Violet 605 コンジュゲート抗ヒト CD80 抗体	Biolegend	カタログ番号 305225
FITC コンジュゲート抗ヒト HLA-DR	Biolegend	カタログ番号 307604
PE コンジュゲート抗ヒト OX40L 抗体	Biolegend	カタログ番号 326308
PE コンジュゲート抗ヒト HLA-E	Biolegend	カタログ番号 342604
PerCP/Cy5.5 コンジュゲート抗ヒトガレクチン 9 抗体	Biolegend	カタログ番号 348910
7AAD 生存率染色溶液	Biolegend	カタログ番号 420403
ヒト TruStain FcX	Biolegend	カタログ番号 422301
PE コンジュゲートマウス IgG1 アイソタイプ対照抗体	Biolegend	カタログ番号 400112
Brilliant Violet 421 コンジュゲートマウス IgG2b アイソタイプ対照抗体	Biolegend	カタログ番号 400342
PerCP/Cy5.5 コンジュゲートマウス IgG1 アイソタイプ対照抗体	Biolegend	カタログ番号 400149

10

20

30

40

50

【表 10 - 2】

PE コンジュゲートマウス IgG1 アイソタイプ対照抗体	Biolegend	カタログ番号 400111
Brilliant Violet 605 コンジュゲート抗ヒト CD47 抗体	BD Biosciences	カタログ番号 563759
Brilliant Violet 605 コンジュゲートマウス IgG1 アイソタイプ対照抗体	BD Biosciences	カタログ番号 562652
FITC コンジュゲートマウス IgG2a アイソタイプ対照抗体	BD Biosciences	カタログ番号 555573
Alexa Fluor 647 コンジュゲート抗ヒト MHC-I 抗体	Santa Cruz Biotechnology	カタログ番号 sc32235
Alexa Fluor 647 マウス IgG2a アイソタイプ対照抗体	Santa Cruz Biotechnology	カタログ番号 sc24637
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
ヘパリン	Stem Cell Technologies	カタログ番号 07980
ヒト血清 AB	Gemini Products	カタログ番号 100-318
コビメチニブ	Selleckchem	カタログ番号 S8041
ピマセルチブ	Selleckchem	カタログ番号 S1475
トラメチニブ	Selleckchem	カタログ番号 S2673
組換えヒト IFN	Peprtech	カタログ番号 300-02BC
組換えヒト IFN	Peprtech	カタログ番号 300-02

10

20

30

40

50

【表 10-3】

組換えヒト EGF	Miltenyi Biotec	カタログ番号 130-097-749
組換えヒト FGF2	Miltenyi Biotec	カタログ番号 130-093-564
組換えヒト IL-2	Amgen	該当なし
組換えヒト IFN2b	R&D Systems	カタログ番号 1105-1
β-メルカプトエタノール	Gibco	カタログ番号 21985023
ピルビン酸ナトリウム	Gibco	カタログ番号 11360070
HEPES	Gibco	カタログ番号 15630080
ペニシリン/ストレプトマイシン	Gibco	カタログ番号 15140122
DMSO	Sigma Aldrich	カタログ番号 D2650
ヒアルロニダーゼ	Sigma Aldrich	カタログ番号 H3506
コラーゲナーゼ I	Sigma Aldrich	カタログ番号 C0130
トリス	Sigma Aldrich	カタログ番号 252859
EDTA	Sigma Aldrich	カタログ番号 03690
塩化ナトリウム	Sigma Aldrich	カタログ番号 71376

10

20

30

40

50

【表 10 - 4】

Triton-X	Sigma Aldrich	カタログ番号 T9284
オクチル β -d-グルコピラノシド	Sigma Aldrich	カタログ番号 08001
フッ化フェニルメタンスルホン	Sigma Aldrich	カタログ番号 78830
プロテアーゼ阻害剤カクテル	Sigma Aldrich	カタログ番号 4693116001
DNAse I	Sigma Aldrich	カタログ番号 4716728001
Gammabind Plus セファロースビーズ	GE Healthcare	カタログ番号 17-0886-01
重要な商業アッセイ		
CellTrace CFSE 細胞増殖キット	Invitrogen	カタログ番号 C34554
EasySep ヒト NK 細胞単離キット	Stem Cell Technologies	カタログ番号 17955
Live/Dead 固定可能 Aqua 死細胞染色キット	ThermoFisher	カタログ番号 L34965
Venor (商標) GeM マイコプラズマ検出キット	Sigma Aldrich	カタログ番号 MP0025
Software and Algorithms		
FlowJo	TreeStar	該当なし

【0645】

実施例 2 : M C C 細胞株は、一次患者試料から確実に生成される。

典型的には R P M I - 1 6 4 0 ベースの培地製剤で培養される多くの確立された M C C 株は、インビトロで多重継代されており、関連するアーカイブ原発腫瘍材料及び臨床データが一般的に欠如している。患者標本から直接一連の株を確立するために、条件を最適化して、M C C 細胞株をインビトロで増殖させるための信頼できるアプローチを生成した。M C C 腫瘍は神経内分泌組織学を示し、M C C 株の別のパネルが修飾された神経堤幹細胞培地で良好に確立されていたため、以前に膠芽腫多形腫瘍細胞株を確立するために使用された神経幹細胞培地でこれらの細胞株を培養することが細胞株の確立を促進すると仮定した。M C C - 3 3 6 腫瘍標本上で 5 つの培地製剤を試験し、増殖因子補充を伴う N e u r

ocult NS-A増殖培地は、一貫して最高のインビトロ増殖率を提供し、培養7日後に細胞数を3倍にした（図1A）。

【0646】

この方法を使用して、生検（n=4）又は患者由来異種移植片（PDX）材料（n=7）から合計11の安定した細胞株を確立した（表6）。以前に確立されたMCC株と一致して、これらの細胞株は、懸濁液中の緊密なクラスターでほとんど成長することが観察され、MCCの古典的な免疫組織化学マーカーであるCK20及びSOX2では陽性に染色された（図1B、1C）。ハイブリッドキャプチャベースの配列決定プラットフォームであるViro-Panelを使用して、447個のがん関連遺伝子及び19個の腫瘍ウイルスを検出したところ、11株のうち7株がMCPyVに陽性であり、4株がMCPyV-であった（図1D）。

10

【表11-1】

表6

患者	性別	細胞株源	MCPyV ウイルス状態	処理前	PD1:PD-L1 に対する応答	免疫抑制の履歴
277	M	PDX	ウイルス陽性	CE、 化学放射線照射、 MLN0128、CAV、 オクトレオチド、 イミキモド、 カボザンチニブ	CR	-
282	M	PDX	ウイルス陰性	XRT	-	心臓移植
290	F	PDX	ウイルス陰性	-	-	-
301	M	PDX	ウイルス陽性	CE、 化学放射線照射	PD	-
320	M	PDX	ウイルス陰性	CE、 化学放射線照射	-	-
336	F	腫瘍	ウイルス陽性	CE、 化学放射線照射	-	-
350	M	腫瘍	ウイルス陰性	XRT	PD	-

20

30

【表11-2】

358	F	腫瘍	ウイルス陽性	XRT	副作用のため中止	アダリムマブ上の関節リウマチ
367	M	PDX	ウイルス陽性	XRT	-	-
383	M	腫瘍	ウイルス陽性	XRT	アジュバント	-
2314	F	PDX	ウイルス陽性	エベロリムス、CE、 パクリタキセル	-	-

40

【0647】

11人の患者のうち7人について、マッチした末梢血単核細胞（PBMC）が利用可能であり、そこから生殖系列DNAを抽出した。マッチした原発腫瘍、細胞株、及び生殖系列供給源からのDNAの全エクソーム配列決定（WES）、並びにRNA配列決定（RN

50

A s e q) をこれらの株について行った。これらの研究は、M C C の特徴的な遺伝的改変を示す細胞株、並びに対応する腫瘍と細胞株との間のゲノム及び転写の類似性を明らかにした (表 6)。M C P y V⁻ 及び M C P y V⁺ 試料は、それぞれ、予想される対照的な高い (細胞株当たりの非サイレントコーディング変異の中央値 6 4 7、範囲 3 5 4 ~ 9 4 0) 及び低い (中央値 4 0、範囲 1 8 ~ 7 3) 変異負荷を示した (図 1 E 及びデータ未掲載)。更に、2 つの分析された M C P y V⁻ 株は、いずれも、以前の研究と一致して、R B 1 及び T P 5 3 (データ未掲載) における変異を含んでいた (G o h e t a l. (2 0 1 6) O n c o t a r g e t 7 (3) : 3 4 0 3 - 1 5)、K n e p p e r e t a l. (2 0 1 9 a) C l i n i c a l C a n c e r R e s e a r c h 2 5 (1 9) : 5 9 6 1 - 7 1)。各細胞株において見出された変異のうち、9 4 . 4 % の中央値は、対応する腫瘍又は P D X 試料においても検出され (範囲 5 1 ~ 1 0 0 %)、変異プロファイルに基づいて、腫瘍-細胞株対が互いに最も密接に関連していた (図 1 F)。注目すべきことに、いくつかの P D X 由来の腫瘍試料 (表 6) は、マウス細胞汚染に起因する可能性が高い、それらの対応する細胞株 (図 1 E) よりも高い変異負荷を示した。

10

20

30

40

50

【0 6 4 8】

R N A s e q データ内で、M C P y V⁻ S T 及び L T 抗原にマッピングする転写物を、V i r o P a n e l (図 1 D、1 G) によって M C P y V⁺ であることが決定された全ての試料においてデータ検出した。R N A - s e q に基づく M C C 腫瘍及び細胞株の無監督階層クラスタリング分析によって、各細胞株は、試料のタイプによるクラスタリングではなく、対応する親腫瘍と最も密接に関連することが観察され (平均ペアワイズスピアマン相関 0 . 9 2) (図 1 H)、これらの細胞株が、それらが由来する腫瘍を忠実に再現することを確認した。加えて、リボ- s e q を使用して、翻訳された注釈なしの O R F を予測することができる (図 1 I)。

【0 6 4 9】

親腫瘍に関して生成された細胞株の遺伝子プロファイル及び転写プロファイルにおける一貫性に加えて、これらの株はまた、それらの親腫瘍のような表面 H L A I 表面発現における一貫した欠陥を示した。汎クラス I 抗 H L A - A B C 抗体を使用したフローサイトメトリーによって、1 1 株全てが、顕著に低く、ほとんど存在しない H L A I を示した (図 1 J)。M C C 細胞上のかかるインサイツ H L A クラス I 発現の不在は、4 株の親腫瘍の免疫組織化学染色によって確認された (図 1 K)。更に、フローサイトメトリーによる低いクラス I 表面発現は、十分に研究された M C P y V⁺ 株 M K L - 1 及び W a G a と同等であった (図 1 L)。3 つの株は、I F N - γ 曝露に応答しなかったが (M C C - 3 3 6、- 3 5 0、- 3 5 8)、8 つの株は、I F N - γ 曝露によって誘導され得る H L A I 表面発現を示した (M F I による中央値 5 . 7 倍の増加、範囲 2 . 5 ~ 1 2 . 4)。2 つの株について、H L A I は、I F N - α - 2 b 及び I F N - 1 3 (図 1 M) によって上方制御され得、別の株 (M C C - 3 0 1) は、I F N - γ を伴う誘導性 H L A - D R 発現を同様に有していた (図 1 N)。これらのデータは、M C C 試料の大部分が、ゲノムレベルではなく、転写レベルで可逆的な H L A クラス I 経路の欠陥を有することを示唆する。

【0 6 5 0】

実施例 3 : M C C 株は、基礎となる N L R C 5 改変を伴う複数のクラス I 遺伝子の転写下方制御を示す。

M C C 株における障害された H L A I 表面発現の機構を解明するために、材料が利用可能であるウイルス陽性及び陰性の両方の株のサブセットについて、詳細なゲノム及びエピゲノム特性評価を行った (表 7)。I F N - γ 曝露後の M C C における遺伝子発現の改変を定義するために、ベースライン時及び I F N - γ 刺激後の 1 1 個の M C C 株全てにおいて、転写物発現を評価した。表皮角質細胞及び皮膚線維芽細胞は、それぞれ M C P y V⁻ 及び M C P y V⁺ M C C の細胞起源の有力な候補であり (S u n s h i n e e t a l. (2 0 1 8) O n c o g e n e 3 7 (1 1) : 1 4 0 9 - 1 6)、両方とも皮膚内に常在するため、M C C 株の発現を、それらの細胞と比較した (B u t t e r f i e l d

et al. (2017) PLoS One 12 (12) : e0189664)、Swindell et al. (2017) Scientific Reports 7 (1) : 18045)。ベースライン時に、MCC株は、いくつかのクラスI経路遺伝子、最も顕著にはHLA-B、TAP1、TAP2、PSMB8、及びPSMB9の低いmRNA発現を示し、2つのよく研究されたMCC細胞株であるMKL-1及びWaGaにおいて、発現プロファイルは概して類似していた(図2A)。IFN- γ 処理は、11個のMCC株のうちの10個においてクラスI遺伝子を顕著に上方制御し(図2B、表8)、この傾向は、4つのMCC株のマッチしたプロテオームにおいて確認された(図2C)。フローサイトメトリー(図1I)によって非IFN応答性であったMCC株は、IFN誘導HLA-A、-B、及び-C mRNA上方制御(MCC-336)の欠如、並びにIFN誘導STAT1/p-STAT1タンパク質発現の欠如(図2A、2D、2E)などの可変欠陥を示した。

10

【表12】

表7

患者	腫瘍及び細胞株 WES	細胞株 WGS	腫瘍 RNA-seq	細胞株+/- IFN:RNA-seq	細胞株+/-IFN:全リン酸プロテオーム	ATAC-seq	WGBS	腫瘍:HLA ペプチドーム	細胞株+/- IFN:HLA ペプチドーム
277	X	X	X	X	X	X	X	X	X
282		X	X	X		X	X		
290		X	X	X	X	X	X	X	X
301	X	X	X	X	X	X	X		X
320	X	X		X		X	X		
336	X	X	X	X		X	X		
350	X	X	X	X	X	X	X		
358			X	X					
367	X	X	X	X		X	X		X
383				X					
2314	X	X	X	X		X	X		

20

30

40

50

【表 13-1】

表 8 : ベースライン時及び I F N γ 刺激後の 11 個の M C C 細胞株の D E S e q 分析。F D R = 0.01 カットオフ。負の L F C は、I F N γ で処理した試料における上方制御を示す。

log2 倍率変							
baseMean	化	lfcSE	stat	P 値	padj	ensemblID	記号
737.61219	-3.8235466	0.49197449	-7.7718391	7.74E-15	2.30E-12	ENSG00000187608.5	ISG15
429.856494	-3.995204	0.60395352	-6.6150853	3.71E-11	7.96E-09	ENSG00000157873.13	TNFRSF14
2.53224988	-4.2047423	0.94141369	-4.466413	7.95E-06	0.00090579	ENSG00000225931.3	該当なし
306.683679	-2.8543837	0.36225466	-7.8794946	3.29E-15	1.03E-12	ENSG00000116663.6	FBXO6
30.9609199	-3.2331262	0.75273663	-4.2951625	1.75E-05	0.00193537	ENSG00000173369.11	C1QB
4505.34673	-2.3277354	0.45338652	-5.1341081	2.83E-07	3.82E-05	ENSG00000126709.10	IFI6
1565.32413	-0.5387475	0.13041279	-4.1310938	3.61E-05	0.00363267	ENSG00000220785.3	MTMR9LP
3432.58269	-0.8512104	0.20898338	-4.0731007	4.64E-05	0.00455845	ENSG00000116514.12	RNF19B
807.146321	-1.2235072	0.28307901	-4.3221404	1.55E-05	0.00172619	ENSG00000142920.12	AZIN2
4668.38365	0.67628768	0.14788691	4.57300581	4.81E-06	0.00055831	ENSG00000117399.9	CDC20

30

40

50

【表 13 - 2】

733.073398	-1.493707	0.27795021	-5.3740092	7.70E-08	1.13E-05	ENSG00000142961.10	MOB3C	
5.45481892	-5.1726162	0.89251196	-5.7955707	6.81E-09	1.12E-06	ENSG00000230812.1	該当なし	
8603.43775	-0.3836358	0.09904608	-3.8733064	0.00010737	0.00969881	ENSG00000077254.10	USP33	
130.523058	-7.7332581	0.96504001	-8.0134068	1.12E-15	3.68E-13	ENSG00000137959.11	IFI44L	
887.55803	-8.9543704	1.01498021	-8.8222119	1.12E-18	4.52E-16	ENSG00000137965.6	IFI44	
50.0400965	-1.8278699	0.31760936	-5.7550883	8.66E-09	1.42E-06	ENSG00000122432.12	SPATA1	
186.636266	-9.2148342	0.67374151	-13.677106	1.39E-42	2.27E-39	ENSG00000117226.7	GBP3	
10681.5088	-10.095742	0.81082348	-12.45122	1.38E-35	1.40E-32	ENSG00000117228.9	GBP1	10
284.534786	-6.2350364	0.72993711	-8.5418817	1.32E-17	4.91E-15	ENSG00000162645.8	GBP2	
758.052751	-10.330761	0.87528061	-11.802799	3.78E-32	3.08E-29	ENSG00000162654.8	GBP4	
276.049095	-5.8538857	0.44265315	-13.224543	6.33E-40	7.75E-37	ENSG00000154451.10	GBP5	
3588.44644	-7.9265386	0.43681701	-18.146131	1.38E-73	1.01E-69	ENSG00000225492.2	GBP1P1	
6252.06883	-0.7264747	0.13566003	-5.3551124	8.55E-08	1.22E-05	ENSG00000143106.8	PSMA5	
765.074779	-3.7414089	0.36225487	-10.328112	5.26E-25	2.97E-22	ENSG00000184371.9	CSF1	
5881.08817	-1.6522279	0.24625693	-6.7093662	1.95E-11	4.29E-09	ENSG00000155363.14	MOV10	
3778.53797	-0.3499462	0.08801924	-3.9757917	7.01E-05	0.00671295	ENSG00000121848.9	該当なし	
32585.8155	-1.0676432	0.18111126	-5.8949576	3.75E-09	6.36E-07	ENSG00000160710.11	ADAR	20
163.260719	-5.9462553	1.233604	-4.8202303	1.43E-06	0.00017851	ENSG00000163565.14	IFI16	
1241.49316	-0.6380783	0.13586087	-4.6965572	2.65E-06	0.000319	ENSG00000000457.9	SCYL3	
278.174332	-3.2156169	0.50940837	-6.312454	2.75E-10	5.45E-08	ENSG00000235750.5	KIAA0040	
604.684858	-3.4654178	0.7512412	-4.6129229	3.97E-06	0.00046669	ENSG00000184731.5	FAM110C	
27.9091113	-3.7242927	0.75334044	-4.9437048	7.67E-07	9.83E-05	ENSG00000225964.1	NRIR	
1011.67564	-2.8295832	0.45739818	-6.1862581	6.16E-10	1.17E-07	ENSG00000134326.7	CMPK2	
1525.78994	-4.6385891	0.52492551	-8.8366616	9.86E-19	4.02E-16	ENSG00000134321.7	RSAD2	
154.723863	-0.8530222	0.20559557	-4.14903	3.34E-05	0.00339433	ENSG00000173567.10	ADGRF3	
22.519641	-3.8039207	0.49760753	-7.6444194	2.10E-14	5.87E-12	ENSG00000152689.13	RASGRP3	30
9628.05326	-1.3672396	0.24566348	-5.5654979	2.61E-08	4.04E-06	ENSG00000055332.12	EIF2AK2	
317.694297	-0.5688074	0.13836195	-4.1110102	3.94E-05	0.00395007	ENSG00000144182.12	LIPT1	
19.3370989	-2.3383337	0.47489185	-4.9239289	8.48E-07	0.00010788	ENSG00000224789.1	該当なし	
1642.86004	-1.1988465	0.29247544	-4.0989646	4.15E-05	0.00413314	ENSG00000144118.9	RALB	
47.5933423	-2.8699117	0.51644397	-5.557063	2.74E-08	4.22E-06	ENSG00000054219.9	LY75	
2144.22498	-4.034425	0.51604644	-7.8179495	5.37E-15	1.63E-12	ENSG00000115267.5	IFIH1	
2863.88892	-0.5343727	0.12805713	-4.1729246	3.01E-05	0.00308916	ENSG00000138433.11	CIR1	
2998.87025	-1.931128	0.45637728	-4.2314288	2.32E-05	0.00246295	ENSG00000151689.8	INPP1	
62446.3512	-4.434093	0.20252029	-21.894561	2.93E-106	8.60E-102	ENSG00000115415.14	STAT1	
15.6568451	-4.6685599	0.56687721	-8.2355753	1.79E-16	6.10E-14	ENSG00000229023.1	該当なし	40

【表 13-3】

358.983013	-1.0983337	0.24195208	-4.5394677	5.64E-06	0.00064724	ENSG00000163251.3	FZD5	
532.489006	-4.1539852	0.71671084	-5.7959012	6.80E-09	1.12E-06	ENSG00000188282.8	RUFY4	
2633.99179	-1.70319	0.16583086	-10.270646	9.56E-25	5.30E-22	ENSG00000123992.14	DNPEP	
822.116878	-5.9124606	0.78305481	-7.5505068	4.34E-14	1.17E-11	ENSG00000135899.12	SP110	
4.38787916	-4.0713127	0.75815716	-5.3700115	7.87E-08	1.15E-05	ENSG00000079263.14	SP140	
31.9574927	-4.748526	0.92110029	-5.1552757	2.53E-07	3.44E-05	ENSG00000185404.12	SP140L	
176.899362	-6.1781587	0.74044969	-8.3437927	7.19E-17	2.55E-14	ENSG00000067066.12	SP100	
489.003471	-1.1875496	0.29529724	-4.0215398	5.78E-05	0.00557713	ENSG00000163702.14	IL17RC	10
3.90267133	-5.1220192	1.0270859	-4.9869433	6.13E-07	7.94E-05	ENSG00000231280.1	該当なし	
2641.45613	-5.0035905	0.36904215	-13.558317	7.07E-42	9.45E-39	ENSG00000182179.6	UBA7	
913.021769	-1.7258766	0.36940042	-4.6721025	2.98E-06	0.00035606	ENSG00000041880.10	PARP3	
7336.92706	-5.1123294	0.44475489	-11.494712	1.40E-30	1.06E-27	ENSG00000138496.12	PARP9	
5785.99283	-4.6029819	0.45433708	-10.131205	4.02E-24	2.07E-21	ENSG00000163840.5	DTX3L	
1.86850191	-3.777983	0.93951153	-4.0212205	5.79E-05	0.00557713	ENSG00000173200.8	PARP15	
12051.8632	-9.5124504	0.69528453	-13.681378	1.31E-42	2.27E-39	ENSG00000173193.9	PARP14	
16636.4037	-0.5501989	0.1367503	-4.0233836	5.74E-05	0.00556261	ENSG00000017260.15	ATP2C1	
							TMEM108-	20
39.9014474	-3.6489879	0.66551795	-5.4829293	4.18E-08	6.30E-06	ENSG00000251011.1	AS1	
2488.92758	-1.9175703	0.39534607	-4.8503589	1.23E-06	0.00015407	ENSG00000188313.8	PLSCR1	
86.4459157	-3.1923753	0.7519567	-4.2454245	2.18E-05	0.00233946	ENSG00000114805.12	PLCH1	
66.8300456	-4.1315141	0.77211564	-5.3509007	8.75E-08	1.24E-05	ENSG00000114204.10	SERPINI2	
162.237393	-4.563601	0.73662697	-6.1952673	5.82E-10	1.11E-07	ENSG00000174776.6	WDR49	
15.5030652	-4.4304635	0.88651062	-4.9976429	5.80E-07	7.54E-05	ENSG00000121858.6	TNFSF10	
100.27005	-9.7664391	0.83826389	-11.650793	2.27E-31	1.81E-28	ENSG00000136514.2	RTP4	
322.630799	-2.9529352	0.52640004	-5.609679	2.03E-08	3.15E-06	ENSG00000113916.13	BCL6	
6892.05182	-1.8713028	0.19948294	-9.380766	6.55E-21	2.96E-18	ENSG00000002549.8	LAP3	
211.193901	-2.6467285	0.46907387	-5.6424556	1.68E-08	2.66E-06	ENSG00000185774.10	KCNIP4	30
1743.57366	-2.41664	0.56954916	-4.2430754	2.20E-05	0.00235276	ENSG00000145246.9	ATP10D	
357.247212	-7.1736796	0.90792832	-7.9011519	2.76E-15	8.73E-13	ENSG00000128052.8	KDR	
29.8302512	-1.9353111	0.42562106	-4.5470284	5.44E-06	0.00062687	ENSG00000249700.4	SRD5A3-AS1	
613.01113	-11.741625	0.93673037	-12.53469	4.82E-36	5.25E-33	ENSG00000138755.5	CXCL9	
463.70535	-5.8896056	0.52056523	-11.313867	1.12E-29	8.03E-27	ENSG00000169245.4	CXCL10	
400.13107	-4.6722976	0.64941778	-7.1945945	6.26E-13	1.56E-10	ENSG00000169248.8	CXCL11	
971.948802	-9.026515	0.81940486	-11.01594	3.20E-28	2.19E-25	ENSG00000138642.10	HERC6	
826.4622	-2.1560071	0.55713086	-3.8698397	0.00010891	0.00978497	ENSG00000138646.4	HERC5	
27.3654855	-6.7810866	1.00625711	-6.7389204	1.60E-11	3.52E-09	ENSG00000164136.12	IL15	40

【表 13 - 4】

10.6710715	-4.8732259	0.94650465	-5.148655	2.62E-07	3.55E-05	ENSG00000183090.5	FREM3	10
540.179187	-3.0051706	0.4150247	-7.2409438	4.46E-13	1.12E-10	ENSG00000256043.2	CTSO	
4007.1413	-7.2981902	0.57962796	-12.591163	2.36E-36	2.67E-33	ENSG00000137628.12	DDX60	
1279.85024	-3.4606835	0.43152536	-8.0196526	1.06E-15	3.54E-13	ENSG00000181381.9	DDX60L	
1441.65616	-1.5881183	0.17833775	-8.9051157	5.33E-19	2.21E-16	ENSG00000168310.6	IRF2	
123.515844	-1.8533896	0.30669268	-6.0431492	1.51E-09	2.72E-07	ENSG00000271646.1	該当なし	
16.9034358	-6.0189651	0.88029443	-6.8374455	8.06E-12	1.87E-09	ENSG00000164342.8	TLR3	
46.0643916	-3.64788	0.51514091	-7.0813246	1.43E-12	3.50E-10	ENSG00000248693.1	該当なし	
3950.73396	-2.3307071	0.20970864	-11.114025	1.07E-28	7.50E-26	ENSG00000164307.8	ERAP1	
2357.23316	-3.9313244	0.74683526	-5.2639781	1.41E-07	1.99E-05	ENSG00000164308.12	ERAP2	
143.593351	-1.8949887	0.36326139	-5.2165983	1.82E-07	2.54E-05	ENSG00000238000.1	該当なし	20
1231.90737	-3.7099074	0.34488155	-10.757048	5.49E-27	3.58E-24	ENSG00000197536.6	C5orf56	
13.6015475	-3.2740327	0.63313427	-5.1711506	2.33E-07	3.19E-05	ENSG00000238160.1	該当なし	
45.7490278	-3.6838099	0.47064419	-7.8271652	4.99E-15	1.53E-12	ENSG00000202533.1	該当なし	
43.5846283	-2.2803371	0.38251438	-5.9614416	2.50E-09	4.37E-07	ENSG00000234290.2	該当なし	
8827.1479	-5.3847842	0.30310638	-17.765328	1.31E-70	7.71E-67	ENSG00000125347.9	IRF1	
8506.34864	-8.4943849	0.71110038	-11.945409	6.86E-33	5.76E-30	ENSG00000019582.10	CD74	
42.2431901	-4.6559605	0.76758996	-6.0656871	1.31E-09	2.38E-07	ENSG00000113263.8	ITK	
2403.05295	-6.0891068	0.78439158	-7.7628406	8.30E-15	2.44E-12	ENSG00000186470.9	BTN3A2	
2750.38209	-6.5816686	0.66694197	-9.8684277	5.71E-23	2.79E-20	ENSG00000026950.12	BTN3A1	
27.1509251	-4.4586863	1.01379967	-4.3979954	1.09E-05	0.00122516	ENSG00000124549.10	BTN2A3P	30
2209.06227	-6.9296874	0.72527379	-9.5545812	1.24E-21	5.79E-19	ENSG00000111801.11	BTN3A3	
1248.67163	-0.9872832	0.25467903	-3.8765782	0.00010594	0.00960615	ENSG00000112763.11	BTN2A1	
2104.13959	-7.2893033	0.74532007	-9.7800979	1.37E-22	6.50E-20	ENSG00000204642.9	HLA-F	
6.65168958	-3.3667593	0.68997805	-4.8795166	1.06E-06	0.00013352	ENSG00000204632.7	HLA-G	
594.384724	-3.8830179	0.62100295	-6.2528171	4.03E-10	7.90E-08	ENSG00000206341.6	HLA-H	
12183.3964	-3.7023024	0.53944569	-6.8631606	6.74E-12	1.58E-09	ENSG00000206503.7	HLA-A	
27.7431104	-4.551376	0.69817858	-6.5189282	7.08E-11	1.47E-08	ENSG00000204622.6	HLA-J	
4015.70697	-0.6803101	0.11881275	-5.7259015	1.03E-08	1.66E-06	ENSG00000234127.4	TRIM26	
28.825266	-1.2459717	0.25318923	-4.9211086	8.61E-07	0.00010898	ENSG00000233892.1	該当なし	
63.6973362	-2.336374	0.49375517	-4.7318473	2.22E-06	0.00027123	ENSG00000243753.1	HLA-L	40
29328.8204	-2.6080529	0.34230442	-7.6191037	2.55E-14	7.01E-12	ENSG00000204592.5	HLA-E	
15690.8228	-4.1551201	0.68961204	-6.025301	1.69E-09	3.01E-07	ENSG00000204525.10	HLA-C	
26351.7068	-4.9211669	0.77622894	-6.3398395	2.30E-10	4.60E-08	ENSG00000234745.5	HLA-B	
2.65118174	-4.1377374	0.87127079	-4.7490832	2.04E-06	0.00025119	ENSG00000271581.1	該当なし	
1709.10902	-5.131482	0.73627891	-6.9694812	3.18E-12	7.60E-10	ENSG00000206337.6	HCP5	

【表 13-5】

286.616839	-4.0960936	0.49414563	-8.2892437	1.14E-16	3.94E-14	ENSG00000166278.10	C2	10
87.8474596	-7.332932	0.73464244	-9.9816341	1.83E-23	9.29E-21	ENSG00000243649.4	CFB	
190.73699	-1.2449859	0.22451401	-5.5452481	2.94E-08	4.47E-06	ENSG00000244731.3	C4A	
135.903291	-2.2481543	0.419693	-5.3566639	8.48E-08	1.21E-05	ENSG00000224389.4	C4B	
2051.81717	-10.073772	0.81091412	-12.422736	1.97E-35	1.93E-32	ENSG00000204287.9	HLA-DRA	
9.8285994	-5.9804428	0.93728232	-6.3806205	1.76E-10	3.60E-08	ENSG00000198502.5	HLA-DRB5	
110.723979	-7.2780908	0.84423139	-8.6209669	6.64E-18	2.53E-15	ENSG00000196126.6	HLA-DRB1	
151.99633	-7.3348967	1.07983707	-6.7925958	1.10E-11	2.51E-09	ENSG00000179344.12	HLA-DQB1	
187.06255	-3.5979372	0.78128091	-4.6051774	4.12E-06	0.00048239	ENSG00000241106.2	HLA-DOB	
5778.85898	-4.8445298	0.59768989	-8.1054238	5.26E-16	1.78E-13	ENSG00000204267.9	TAP2	
4981.82102	-4.6241388	0.59776915	-7.7356599	1.03E-14	2.99E-12	ENSG00000204264.4	PSMB8	20
640.126622	-4.8286362	0.46343413	-10.41925	2.03E-25	1.21E-22	ENSG00000204261.4	PSMB8-AS1	
2511.33775	-8.0371901	0.57142058	-14.065279	6.21E-45	1.22E-41	ENSG00000240065.3	PSMB9	
18731.2377	-6.3263209	0.46506367	-13.603129	3.84E-42	5.93E-39	ENSG00000168394.9	TAP1	
570.015888	-5.7272936	0.84758985	-6.7571522	1.41E-11	3.16E-09	ENSG00000242574.4	HLA-DMB	
559.811367	-3.2372583	0.52399538	-6.1780284	6.49E-10	1.22E-07	ENSG00000204257.10	HLA-DMA	
29.0759101	-7.7892911	1.01437527	-7.6789047	1.60E-14	4.53E-12	ENSG00000204252.8	HLA-DOA	
810.438861	-9.3025844	0.93688774	-9.9292413	3.11E-23	1.55E-20	ENSG00000231389.3	HLA-DPA1	
327.952734	-7.6127896	0.96046756	-7.9261288	2.26E-15	7.30E-13	ENSG00000223865.6	HLA-DPB1	
4879.31406	-2.0254996	0.19103012	-10.603038	2.88E-26	1.84E-23	ENSG00000231925.7	TAPBP	
1175.11719	-5.2054755	0.4203783	-12.382836	3.24E-35	3.07E-32	ENSG00000010030.9	ETV7	30
33.1358206	-5.2760081	0.70230564	-7.5124103	5.80E-14	1.54E-11	ENSG00000224666.2	該当なし	
3.31472881	-2.0066922	0.4837896	-4.1478614	3.36E-05	0.00339993	ENSG00000213500.3	該当なし	
5088.27069	-0.9246883	0.16455638	-5.6192793	1.92E-08	3.01E-06	ENSG0000024048.6	UBR2	
37.6087858	-3.2630942	0.55388441	-5.891291	3.83E-09	6.47E-07	ENSG00000224944.1	CASC6	
56.8816262	-4.6922947	0.85457407	-5.4907992	4.00E-08	6.06E-06	ENSG00000203797.5	DDO	
732.609123	-1.1819726	0.28231822	-4.1866676	2.83E-05	0.00292848	ENSG00000078269.9	SYNJ2	
							RPS6KA2-	
1.55500118	-4.0285437	1.02762111	-3.9202617	8.85E-05	0.00822388	ENSG00000231654.1	AS1	
532.62702	-1.4001105	0.21155994	-6.6180321	3.64E-11	7.86E-09	ENSG00000026297.11	RNASET2	
161.894218	-1.5996433	0.31471243	-5.082873	3.72E-07	4.96E-05	ENSG00000197146.2	該当なし	40
1918.85287	-0.5210831	0.10107232	-5.155547	2.53E-07	3.44E-05	ENSG00000106346.7	USP42	
692.082136	-1.3168481	0.21681848	-6.073505	1.25E-09	2.28E-07	ENSG00000106100.6	NOD1	
700.715265	-9.2213323	0.748937	-12.312561	7.75E-35	6.90E-32	ENSG00000177409.7	SAMD9L	
871.52677	-2.4114168	0.48894446	-4.9318829	8.14E-07	0.00010403	ENSG00000169871.8	TRIM56	
1255.61783	-2.7357726	0.45902627	-5.9599478	2.52E-09	4.39E-07	ENSG00000260336.1	該当なし	

【表 13 - 6】

126.691963	-7.3811574	0.70999783	-10.396028	2.58E-25	1.52E-22	ENSG00000146859.6	TMEM140	
25.5438465	-7.7472933	0.90402379	-8.5697893	1.04E-17	3.91E-15	ENSG00000272941.1	該当なし	
4554.11932	-1.1999617	0.27101971	-4.427581	9.53E-06	0.00107684	ENSG00000105939.8	ZC3HAV1	
10.5761715	-2.1618685	0.5040651	-4.2888676	1.80E-05	0.00197612	ENSG00000229677.1	該当なし	
3195.50436	-2.7583447	0.35460882	-7.7785566	7.34E-15	2.20E-12	ENSG00000059378.8	PARP12	
60.9845409	-3.3484516	0.72112359	-4.6433811	3.43E-06	0.00040605	ENSG00000146955.6	RAB19	
33.8923367	-3.0329438	0.70850819	-4.2807463	1.86E-05	0.00204199	ENSG00000170379.15	TCAF2	
9.20748189	-3.1605291	0.67298411	-4.6962908	2.65E-06	0.000319	ENSG00000253882.2	LOC154761	10
5821.92064	-1.5208844	0.20488385	-7.4231543	1.14E-13	3.00E-11	ENSG00000013374.11	NUB1	
9.10350204	-3.8378642	0.75565576	-5.0788526	3.80E-07	5.05E-05	ENSG00000245025.2	該当なし	
5.89586011	-3.2650575	0.80040108	-4.0792767	4.52E-05	0.00445393	ENSG00000189233.7	NUGGC	
85.9924625	-5.8245751	1.02434738	-5.6861327	1.30E-08	2.09E-06	ENSG00000131203.8	IDO1	
201.486824	-3.934137	0.58025616	-6.7800003	1.20E-11	2.72E-09	ENSG00000177182.6	CLVS1	
18.4232328	-3.7534423	0.95356038	-3.9362398	8.28E-05	0.00776911	ENSG00000104432.8	IL7	
40.0969891	-6.2772804	0.91720405	-6.8439302	7.70E-12	1.80E-09	ENSG00000261618.1	該当なし	
1671.47134	-3.4301598	0.43245576	-7.9318166	2.16E-15	7.05E-13	ENSG00000178685.9	PARP10	
484.75493	-6.1190722	0.5372126	-11.390411	4.67E-30	3.43E-27	ENSG00000120217.9	CD274	20
2.59773443	-3.5303666	0.84313639	-4.1871833	2.82E-05	0.00292848	ENSG00000171855.5	IFNB1	
2166.4722	-2.9387063	0.34824514	-8.4386142	3.21E-17	1.18E-14	ENSG00000107201.5	DDX58	
2460.55558	-0.8648321	0.22167751	-3.9013072	9.57E-05	0.00875676	ENSG00000196116.6	TDRD7	
55.5305318	-6.4834699	0.70390569	-9.2107082	3.24E-20	1.40E-17	ENSG00000134470.15	IL15RA	
3904.27922	-1.4818012	0.27359097	-5.4161187	6.09E-08	9.13E-06	ENSG00000123240.12	OPTN	
270.659916	-2.3150457	0.44555306	-5.1958924	2.04E-07	2.81E-05	ENSG00000026103.15	FAS	
1.25412727	-3.7326989	0.95415389	-3.9120512	9.15E-05	0.00845511	ENSG00000238991.1	該当なし	
1739.45949	-6.1515865	0.514384	-11.959133	5.82E-33	5.03E-30	ENSG00000119922.7	IFIT2	
2895.70187	-9.3980365	0.66708086	-14.088302	4.48E-45	9.41E-42	ENSG00000119917.9	IFIT3	
1783.16077	-3.4648817	0.56757239	-6.1047397	1.03E-09	1.89E-07	ENSG00000185745.8	IFIT1	30
7.06767141	-3.8632825	0.71844249	-5.3773023	7.56E-08	1.12E-05	ENSG00000232709.1	該当なし	
1767.5877	-5.830895	0.5407361	-10.783254	4.13E-27	2.76E-24	ENSG00000197142.6	ACSL5	
1253.83182	-1.8331978	0.31888467	-5.7487799	8.99E-09	1.47E-06	ENSG00000165806.15	CASP7	
195.217173	-8.7626723	0.85570067	-10.240348	1.31E-24	6.86E-22	ENSG00000185885.11	IFITM1	
190.638355	-7.436322	0.71744576	-10.364995	3.58E-25	2.06E-22	ENSG00000142089.11	IFITM3	
991.706394	-5.5860285	0.67097977	-8.3251817	8.42E-17	2.94E-14	ENSG00000132109.8	TRIM21	
72.3003417	-4.922578	0.85754005	-5.7403477	9.45E-09	1.53E-06	ENSG00000132256.14	TRIM5	
3077.15661	-9.3940584	0.60583783	-15.505896	3.16E-54	1.03E-50	ENSG00000132274.11	TRIM22	
2709.03913	-0.5299723	0.13450523	-3.9401611	8.14E-05	0.0076677	ENSG00000129084.13	PSMA1	40

【表 13-7】

14249.8676	-0.8150764	0.13232549	-6.1596324	7.29E-10	1.36E-07	ENSG00000049449.4	RCN1
7.54173208	-2.8404026	0.54180001	-5.2425296	1.58E-07	2.23E-05	ENSG00000186714.8	CCDC73
5676.28523	-4.9824212	0.39867998	-12.497295	7.72E-36	8.10E-33	ENSG00000156587.11	UBE2L6
518.398909	-10.056317	0.70023575	-14.361331	9.05E-47	2.22E-43	ENSG00000149131.11	SERPING1
2457.44307	-2.678702	0.67410147	-3.9737371	7.08E-05	0.0067363	ENSG00000166801.11	FAM111A
50.3618844	-6.0480775	0.61517047	-9.8315471	8.23E-23	3.97E-20	ENSG00000110446.5	SLC15A3
3.48776546	-4.1556644	1.07305484	-3.8727419	0.00010762	0.00969881	ENSG00000133317.10	LGALS12
4100.66705	-9.0747418	1.01336658	-8.9550435	3.40E-19	1.43E-16	ENSG00000133321.6	RARRES3
96.8776213	-2.5306473	0.59454003	-4.2564792	2.08E-05	0.00225143	ENSG00000176485.6	PLA2G16
3.66146029	-3.1830397	0.78671369	-4.0459951	5.21E-05	0.0050855	ENSG00000168070.7	MAJIN
962.04231	-7.3622989	0.46283001	-15.907134	5.65E-57	2.37E-53	ENSG00000168062.5	BATF2
284.466048	-5.6984073	0.77655333	-7.3380759	2.17E-13	5.54E-11	ENSG00000110092.3	CCND1
5416.7121	-1.4970147	0.31554667	-4.7441942	2.09E-06	0.00025626	ENSG00000137496.13	IL18BP
86.5292868	-4.0242499	0.85082427	-4.7298249	2.25E-06	0.00027281	ENSG00000196954.8	CASP4
86.3483135	-7.9066477	0.86481221	-9.1426179	6.10E-20	2.60E-17	ENSG00000137752.18	CASP1
25.9930397	-6.2886232	1.05434286	-5.9644955	2.45E-09	4.32E-07	ENSG00000204397.3	CARD16
849.23957	-2.5475479	0.33379712	-7.6320246	2.31E-14	6.41E-12	ENSG00000139192.7	TAPBPL
9.48792178	-5.5895318	0.89294738	-6.2596431	3.86E-10	7.61E-08	ENSG00000121380.8	BCL2L14
3.24141877	-4.8500677	1.06904876	-4.5368068	5.71E-06	0.0006529	ENSG00000179256.2	SMCO3
18.2976937	-1.7479676	0.44787647	-3.9027895	9.51E-05	0.00873049	ENSG00000135436.4	FAM186B
12431.5081	-2.0275945	0.2347174	-8.6384498	5.70E-18	2.20E-15	ENSG00000170581.9	STAT2
21.1578879	-2.4451024	0.40574918	-6.0261427	1.68E-09	3.01E-07	ENSG00000252206.1	該当なし
311.077937	-1.4626037	0.29367108	-4.9804146	6.34E-07	8.18E-05	ENSG00000127311.5	HELB
30.0156117	-1.2865089	0.32016928	-4.0182148	5.86E-05	0.00563028	ENSG00000238528.1	該当なし
247.042569	-2.6458946	0.49241437	-5.3733091	7.73E-08	1.13E-05	ENSG00000136048.9	DRAM1
131.700791	-8.2184601	0.57560089	-14.278053	3.00E-46	6.78E-43	ENSG00000256262.1	USP30-AS1
5476.88062	-0.588256	0.11981832	-4.9095661	9.13E-07	0.0001151	ENSG00000135148.7	TRAFFD1
3169.8844	-4.6208221	0.61422448	-7.5230185	5.35E-14	1.43E-11	ENSG00000089127.8	OAS1
12648.6455	-2.2774593	0.35800182	-6.3615857	2.00E-10	4.02E-08	ENSG00000111331.8	OAS3
216.868607	-5.4424779	0.69471996	-7.83406	4.72E-15	1.46E-12	ENSG00000111335.8	OAS2
18.3800514	-6.7369471	1.25685336	-5.3601696	8.31E-08	1.20E-05	ENSG00000271579.1	該当なし
43.2106926	-6.1285625	0.93678133	-6.5421484	6.06E-11	1.28E-08	ENSG00000135114.8	OASL
8307.14509	-1.0867987	0.25996776	-4.1805134	2.91E-05	0.00299832	ENSG00000102699.5	PARP4
45.5348666	-3.8365002	0.83169206	-4.6128854	3.97E-06	0.00046669	ENSG00000133106.10	EPSTI1
191.472605	-1.9666907	0.25971048	-7.5726274	3.66E-14	9.95E-12	ENSG00000225131.1	該当なし
3431.95089	-1.102044	0.27933395	-3.9452564	7.97E-05	0.0075306	ENSG00000088387.13	DOCK9

10

20

30

40

50

【表 13 - 8】

49.0661707	-5.4359894	0.68797885	-7.9013903	2.76E-15	8.73E-13	ENSG000000258573.1	LOC254028
3280.29066	-0.4424716	0.0999832	-4.4254591	9.62E-06	0.00108332	ENSG000000129472.8	RAB2B
11499.7042	-1.9641717	0.19175798	-10.242973	1.27E-24	6.80E-22	ENSG000000092010.10	PSME1
91.9770188	-2.0307372	0.2984238	-6.804877	1.01E-11	2.32E-09	ENSG000000259321.1	該当なし
12925.7557	-1.9188476	0.18353687	-10.454835	1.39E-25	8.52E-23	ENSG000000100911.9	PSME2
1679.37002	-0.6386818	0.10727146	-5.9538838	2.62E-09	4.50E-07	ENSG000000092098.12	RNF31
350.31012	-0.9955612	0.13589203	-7.3261189	2.37E-13	6.00E-11	ENSG000000259529.1	該当なし
1075.01997	-2.5372825	0.18699831	-13.568478	6.16E-42	9.05E-39	ENSG000000213928.4	IRF9
6117.2793	-0.4148686	0.10562551	-3.9277307	8.58E-05	0.00802347	ENSG000000100567.8	PSMA3
18.0897127	-3.3925602	0.83429812	-4.0663644	4.78E-05	0.00467654	ENSG000000258733.1	該当なし
3258.13525	-1.4165974	0.2635785	-5.37448	7.68E-08	1.13E-05	ENSG000000133943.16	DGLUCY
7.78292119	-2.3367098	0.56283204	-4.1517	3.30E-05	0.00336661	ENSG000000100599.11	RIN3
1248.98521	-3.3997434	0.44030388	-7.7213568	1.15E-14	3.32E-12	ENSG000000165949.8	IFI27
26865.7274	-3.3203114	0.31664319	-10.485971	1.00E-25	6.26E-23	ENSG000000140105.13	WARS
59.2840167	-1.6392512	0.42091433	-3.8945008	9.84E-05	0.00895054	ENSG000000092529.18	CAPN3
132.331846	-4.4428556	0.5082297	-8.7418259	2.29E-18	8.99E-16	ENSG000000229474.2	PATL2
68403.5012	-3.9272295	0.3187407	-12.321079	6.98E-35	6.40E-32	ENSG000000166710.13	B2M
4581.40129	-2.8291886	0.59294627	-4.771408	1.83E-06	0.00022583	ENSG000000185880.8	TRIM69
12123.3488	-0.9131382	0.23333414	-3.913436	9.10E-05	0.00843327	ENSG000000129003.11	VPS13C
4122.34976	-1.4211082	0.19288726	-7.3675586	1.74E-13	4.48E-11	ENSG000000140464.15	PML
202.940872	-2.4161568	0.51573592	-4.6848721	2.80E-06	0.00033593	ENSG000000172183.10	ISG20
23.3577616	-1.7431538	0.44453151	-3.9213277	8.81E-05	0.00821357	ENSG000000153060.3	TEKT5
4778.32652	-10.077203	0.57823472	-17.427531	5.10E-68	2.50E-64	ENSG000000179583.13	CIITA
605.072586	-1.2855528	0.21963732	-5.8530709	4.83E-09	8.10E-07	ENSG000000263013.1	該当なし
26.1881728	-3.296014	0.50390652	-6.5409235	6.11E-11	1.28E-08	ENSG000000262222.1	該当なし
131.509115	-3.4741967	0.41263991	-8.4194393	3.78E-17	1.37E-14	ENSG000000263179.1	該当なし
54.2659379	-2.5853025	0.45540541	-5.6769253	1.37E-08	2.19E-06	ENSG000000185338.4	SOCS1
3471.69997	0.5496168	0.13884871	3.9583862	7.55E-05	0.00715146	ENSG000000166851.10	PLK1
60.4547195	-1.9735391	0.46409399	-4.2524556	2.11E-05	0.00228385	ENSG000000238045.5	該当なし
34.7824075	-3.3387462	0.72552655	-4.601825	4.19E-06	0.00048827	ENSG000000261690.1	該当なし
2420.95015	-1.512441	0.26949564	-5.6121167	2.00E-08	3.12E-06	ENSG000000013364.14	MVP
237.376364	-0.6585723	0.1568655	-4.1983244	2.69E-05	0.00280149	ENSG000000260083.1	MIR762HG
14.8405197	-3.5848016	0.7118158	-5.0361367	4.75E-07	6.23E-05	ENSG000000261644.1	該当なし
4.68503844	-3.4126103	0.79507258	-4.2921998	1.77E-05	0.00195401	ENSG000000260929.1	該当なし
2257.34807	-1.5322666	0.37465617	-4.089794	4.32E-05	0.00428547	ENSG000000125148.6	MT2A
16039.9939	-5.849547	0.40669045	-14.383291	6.59E-47	1.76E-43	ENSG000000140853.11	NLRC5

10

20

30

40

50

【表 13 - 9】

82.810706	-2.0392713	0.50541767	-4.0348239	5.46E-05	0.00531596	ENSG00000006210.6	CX3CL1	
261.583856	-2.4136265	0.36874533	-6.5455107	5.93E-11	1.26E-08	ENSG00000261884.2	該当なし	
682.250859	-5.2554908	0.37426172	-14.042288	8.59E-45	1.58E-41	ENSG00000205220.7	PSMB10	
190.143607	-2.9565557	0.50979992	-5.7994433	6.65E-09	1.11E-06	ENSG00000168404.8	MLKL	
85.7583476	-3.7045545	0.48111356	-7.6999586	1.36E-14	3.88E-12	ENSG00000135697.5	BCO1	
991.673424	-2.9271174	0.69264352	-4.2260084	2.38E-05	0.00250491	ENSG00000140968.6	IRF8	
1681.2406	-11.472196	0.89793118	-12.776253	2.23E-37	2.62E-34	ENSG00000132530.12	XAF1	
13.212154	-6.4922487	1.04408182	-6.2181417	5.03E-10	9.66E-08	ENSG00000177294.6	FBXO39	10
531.467061	-2.738824	0.40607712	-6.7445907	1.53E-11	3.42E-09	ENSG00000168961.12	LGALS9	
4.52450765	-4.9910286	1.25610408	-3.9734196	7.08E-05	0.0067363	ENSG00000108700.4	CCL8	
4.53977031	-4.0396178	0.80113166	-5.0423895	4.60E-07	6.08E-05	ENSG00000204952.2	FBXO47	
4.1330195	-4.9504425	0.79253744	-6.24632	4.20E-10	8.18E-08	ENSG00000196859.3	KRT39	
255.593602	-3.0628481	0.4341717	-7.0544628	1.73E-12	4.21E-10	ENSG00000108771.8	DHX58	
14861.2825	-0.9181196	0.14395173	-6.3779683	1.79E-10	3.64E-08	ENSG00000168610.10	STAT3	
684.66562	-6.4538253	0.41286384	-15.631849	4.42E-55	1.62E-51	ENSG00000068079.3	IFI35	
7028.73307	-1.0481409	0.2187598	-4.7912868	1.66E-06	0.00020543	ENSG00000121060.10	TRIM25	
29.8807978	-1.4454119	0.37077991	-3.8983015	9.69E-05	0.00883861	ENSG00000263120.1	該当なし	20
							LOC1009966	
522.496308	-0.6047704	0.13586846	-4.4511464	8.54E-06	0.00096889	ENSG00000267248.1	60	
404.150661	-1.2051601	0.2948651	-4.0871577	4.37E-05	0.00431985	ENSG00000070540.8	WIPI1	
9.69419508	-2.4189706	0.57416894	-4.2129945	2.52E-05	0.00263487	ENSG00000204277.1	LINC01993	
217.61773	-1.7967774	0.41989098	-4.2791522	1.88E-05	0.00204903	ENSG00000184557.3	SOCS3	
11338.1837	-1.5018416	0.21036246	-7.1393042	9.38E-13	2.32E-10	ENSG00000108679.8	LGALS3BP	
20298.4722	-3.097208	0.32796313	-9.443769	3.60E-21	1.65E-18	ENSG00000173821.15	RNF213	
14.0120087	-3.3344613	0.62169488	-5.3635013	8.16E-08	1.18E-05	ENSG00000262979.1	該当なし	
							LOC1002943	
103.733534	1.31984285	0.33788745	3.90616121	9.38E-05	0.00863661	ENSG00000263069.1	62	30
							DLGAP1-	
29.5532967	-7.0061412	1.62697915	-4.3062268	1.66E-05	0.00184808	ENSG00000261520.1	AS5	
3634.68146	-0.9927847	0.24188875	-4.1043029	4.06E-05	0.0040526	ENSG00000141682.11	PMAIP1	
47.2825426	-5.7424034	0.77560719	-7.4037522	1.32E-13	3.44E-11	ENSG00000131142.9	CCL25	
1027.55832	-3.6015707	0.60466183	-5.9563387	2.58E-09	4.46E-07	ENSG00000130813.13	C19orf66	
769.525802	-6.6326508	0.49009453	-13.533411	9.93E-42	1.27E-38	ENSG00000090339.4	ICAM1	
99.7971261	-2.5813817	0.56732392	-4.550102	5.36E-06	0.00062022	ENSG00000214212.4	C19orf38	
16.2891687	-3.9111664	0.77584797	-5.0411505	4.63E-07	6.10E-05	ENSG00000102575.6	ACP5	
5.65368256	-5.0802512	0.76398561	-6.6496687	2.94E-11	6.39E-09	ENSG00000269720.1	CCDC194	40

【表 13-10】

1465.43962	-9.5673043	0.50400551	-18.982539	2.38E-80	2.33E-76	ENSG00000130303.8	BST2	
24.7986922	-6.5672834	0.71073077	-9.2401845	2.46E-20	1.10E-17	ENSG00000269640.1	該当なし	
20.4257187	-4.5611438	0.65221217	-6.9933436	2.68E-12	6.46E-10	ENSG00000096996.11	IL12RB1	
20.9119476	-5.881068	0.66708521	-8.8160671	1.19E-18	4.71E-16	ENSG00000226025.5	LGALS17A	
257.465194	-6.0098552	0.65202829	-9.2171694	3.05E-20	1.34E-17	ENSG00000079385.17	CEACAM1	
3617.34738	-0.6282935	0.15084294	-4.1652164	3.11E-05	0.00318427	ENSG00000104805.11	NUCB1	
67.3670225	-2.0119212	0.30788119	-6.5347326	6.37E-11	1.33E-08	ENSG00000090554.8	FLT3LG	
13.5194097	-1.7008527	0.33439742	-5.0863214	3.65E-07	4.90E-05	ENSG00000273189.1	該当なし	10
418.010719	-2.7725499	0.65719821	-4.2187424	2.46E-05	0.00257777	ENSG00000172296.8	SPTLC3	
4121.33373	-2.6625379	0.38237701	-6.9631221	3.33E-12	7.89E-10	ENSG00000101347.7	SAMHD1	
5756.43438	-1.1094117	0.21271951	-5.2153737	1.83E-07	2.54E-05	ENSG00000124201.10	ZNFX1	
16.4918121	-5.3465586	0.94936237	-5.6317364	1.78E-08	2.82E-06	ENSG00000124256.10	ZBP1	
2137.70314	-1.000098	0.1635005	-6.1167889	9.55E-10	1.78E-07	ENSG00000060491.12	OGFR	
2335.57646	-1.7389911	0.41134107	-4.2276136	2.36E-05	0.00249606	ENSG00000130589.12	HELZ2	
107.035452	-5.048124	0.90933839	-5.5514251	2.83E-08	4.34E-06	ENSG00000183486.8	MX2	
2566.0096	-7.1681582	0.85475042	-8.3862588	5.02E-17	1.80E-14	ENSG00000157601.9	MX1	20
1062.40299	-1.899427	0.31079309	-6.1115483	9.87E-10	1.82E-07	ENSG00000184979.9	USP18	
6387.49478	-0.4100632	0.09658705	-4.2455294	2.18E-05	0.00233946	ENSG00000100225.13	FBXO7	
14516.1354	-9.0410367	0.6667928	-13.55899	7.01E-42	9.45E-39	ENSG00000221963.5	APOL6	
1197.87044	-8.0935685	0.79005105	-10.244361	1.25E-24	6.80E-22	ENSG00000128284.15	APOL3	
3093.12736	-5.6746799	0.91164287	-6.2246742	4.83E-10	9.33E-08	ENSG00000100336.13	APOL4	
8380.66124	-4.6866688	0.40591266	-11.546003	7.73E-31	5.98E-28	ENSG00000128335.9	APOL2	
2807.98718	-10.559232	0.5449176	-19.377667	1.19E-83	1.75E-79	ENSG00000100342.16	APOL1	
22.4106156	-3.1395815	0.67445118	-4.6550166	3.24E-06	0.00038534	ENSG00000179750.11	APOBEC3B	
66.2645125	-4.4633645	0.74215208	-6.0140834	1.81E-09	3.20E-07	ENSG00000243811.3	APOBEC3D	30
293.226914	-4.3018455	0.66165903	-6.5016048	7.95E-11	1.63E-08	ENSG00000128394.12	APOBEC3F	
341.237288	-5.0794124	0.85572467	-5.9358022	2.92E-09	4.99E-07	ENSG00000239713.3	APOBEC3G	
54.88906	-2.3335954	0.54716557	-4.2648798	2.00E-05	0.0021764	ENSG00000183569.13	SERHL2	
27.2866699	-1.6451284	0.38777135	-4.2425217	2.21E-05	0.00235276	ENSG00000231010.1	該当なし	
506.414767	-0.7657969	0.1465539	-5.22536	1.74E-07	2.43E-05	ENSG00000185753.8	CXorf38	
29.178915	-2.158004	0.52150097	-4.1380632	3.50E-05	0.0035362	ENSG00000260802.1	SERTM2	
380.599844	-0.7462903	0.14919842	-5.0019991	5.67E-07	7.41E-05	ENSG00000156500.10	FAM122C	
1790.83039	-6.264907	0.40442087	-15.491058	3.99E-54	1.17E-50	ENSG00000155962.8	CLIC2	
5.10923122	-4.4251083	0.81863278	-5.4054863	6.46E-08	9.64E-06	ENSG00000225008.1	該当なし	40

【0651】

MCC細胞のバルクトランスクリプトーム配列決定で観察されたHLA I下方制御における不均一性の程度を調べるために、HLA発現を、高スループット液滴ベースの単一細胞ランスクリプトーム分析によって2つの新鮮なMCC生検（MCC350 [MCPyV-] 及びMCC336 [MCPyV+]）について評価した。Cell Rangerを使用して両方の試料からの読み取りをhg19に整列させ、Seuratパイプラインを使用して転写物量を分析した（実施例1を参照のこと）。試料QCに続いて、細胞をLouvainクラスタリングを使用してグループ化した。2つの試料にわたって同定された合計xx 15, 808個の細胞（平均4231.9遺伝子／細胞）から、7つの異なる

る転写的に定義されたクラスターが検出された。CD45発現によって同定された免疫細胞は、クラスター6を含み、クラスター0～5は、SOX2、SYP、及びATH1の発現によって同定されたMCC細胞であった（図2F、2G）。全てのMCCクラスターは、MCC細胞株における表面HLA I発現の前述のバルク特性評価と一致して、ほぼ不在のHLA-B、TAP1/2、PSMB8/9、及びNLRC5発現、並びに低HLA-A及び-C発現を示した（図2F、2H）。対照的に、クラスター6（免疫細胞）は、HLA-A、-B、及び-C転写物の平均8.22倍高い発現を示した。

【0652】

複数のクラスI遺伝子の顕著なRNAレベル及びタンパク質レベルの下方制御を考慮して、最初に、これらの観察のための可能な遺伝的基盤を特定しようとした。WESによって、MCC-320におけるHLA-F及び-H変異を除いて、MCC株は、27の正準HLA I経路遺伝子において顕著な体細胞変異を有していなかった（表9）。インターフェロン遺伝子（REACTOME__INTERFERON__SIGNALING遺伝子セット内に含まれるもの）で合計32個の変異が検出されたが、Polyphenによっておそらく損傷していると予測されたのは2個のみであり、正準インターフェロン遺伝子IFNGR1/2、JAK1/2、STAT1、及びIRF1/2では変異は検出されなかった（表9）。しかしながら、NLRC5のコピー数損失は、コピー数変動分析を行った8つの株中5つで検出された（図2I及びデータ未掲載）。NLRC5は、これらの遺伝子のプロモーターにおける保存されたS/X/Y領域に局在するいくつかのHLA I経路成分（すなわち、HLA-A、-B、-C、-E、-F、B2M、TAP1、及びPSMB9（LMP2））の転写活性化因子であり、MCC株におけるNLRC5とこれらの他のクラスI遺伝子との間に正の相関が観察された（図2J）。マッチした全ゲノム亜硫酸水素塩配列決定の分析により、他のクラスI抗原提示遺伝子と比較したNLRC5プロモーターの過メチル化も検出され（図2K、表10）、MCCにおいてNLRC5が抑制され得る更なる機構が示唆された。これらの観察と一致して、NLRC5コピー数の損失及びプロモーターメチル化は、多様ながんにわたる一般的な変化として最近認識されている。エピジェネティックな風景を更に調べるために、クラスI経路遺伝子におけるクロマチンアクセシビリティもまた、ATAC-Seqデータを使用して調査した（図2L-2N）。NLRC5の分析は結論が出ないことがわかったが、角質細胞、B細胞、及びNLRC5などの対照と比較して、HLA-A及びHLA-Bの転写開始部位に明確なピークが見られないことから、黒色腫株501-Mel（図2L、2O）-C及びNLRC5（図2L）が観察され、クラスI遺伝子のエピジェネティックサイレンシングの更なる証拠が示された。

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 1】

表 9

	変異遺伝子	変異型	変異を伴う試料	ウイルス 状態
クラス I 経路	HLA-F	ミスセンス	MCC-320 T、CL	陰性
インターフェロン経路	ADAR	ミスセンス	MCC-320 T、CL	陰性
	NUP210	マルチヒット	MCC-320 T、CL	陰性
	SEC13	ミスセンス	MCC-320 T、CL	陰性
	TRIM3	ミスセンス	MCC-320 T、CL	陰性
	TRIM29	フレームシフト の欠失	MCC-320 T	陰性
	DDX58	ミスセンス	MCC-350 T、CL	陰性
	HLA-DQA1	ナンセンス	MCC-350 T、CL	陰性
	TRIM6	ミスセンス	MCC-350 T、CL	陰性
	GBP6	ミスセンス	MCC-350 T	陰性
	CAMK2G	ミスセンス	MCC-301 T	陽性
	PDE12	ミスセンス	MCC-301 T	陽性
	PIAS1	ミスセンス	MCC-367	陽性
	IFNA16	フレームシフト の欠失	MCC-2314 CL	陽性
	NUP155	スプライス部位	MCC-2314 CL	陽性

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

	NUP214	ミスセンス	MCC-2314 T	陽性
	TRIM8	フレームシフト の挿入	MCC-2314 T	陽性
	EIF4E	ミスセンス	MCC-336	陽性
腫瘍抑制剤	RB1	ナンセンス	MCC-350 T、CL	陰性
	RB1	スプライス部位	MCC-320 T、CL	陰性
	TP53	ミスセンス	MCC-350 T、CL	陰性
	TP53	ミスセンス	MCC-320 T、CL	陰性
	NOTCH1	ミスセンス	MCC-320 T、CL	陰性

10

【表 1 5】

20

表 1 0

遺伝子									
試料		MCC-282	MCC-290	MCC-301	MCC-320	MCC-336	MCC-350	MCC-367	MCC-2314
ウイルス状態		陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陽性
IFN 応答性		IFN 応答性	IFN 応答性	IFN 応答性	IFN 応答性	非 IFN 応答性	非 IFN 応答性	IFN 応答性	IFN 応答性
	HLA-A	0.153	0.362	0.149	0.579	0.276	0.141	0.236	0.129
	HLA-B	0.19	0.172	0.149	0.202	0.149	0.135	0.116	0.24
	HLA-C	0.192	0.199	0.188	0.234	0.113	0.168	0.127	0.191
	B2M	0.221	0.325	0.188	0.4	0.257	0.301	0.151	0.21
	TAP1	0.467	0.44	0.497	0.491	0.491	0.416	0.404	0.525
	TAP2	0.577	0.667	0.689	0.676	0.65	0.553	0.597	0.655
	TAPBP	0.268	0.517	0.267	0.534	0.56	0.429	0.135	0.39
	PSMB8	0.313	0.359	0.346	0.351	0.394	0.339	0.253	0.411
	PSMB9	0.167	0.202	0.175	0.191	0.224	0.172	0.126	0.23
	NLRC5	0.785	0.776	0.839	0.824	0.785	0.651	0.727	0.842

30

【0 6 5 3】

実施例 4：IFN- γ 誘導 HLA I 上方制御は、HLA ペプチドームのシフトに関連している。

HLA I の発現の低下は、MCC における HLA 提示ペプチドの数及び多様性の低下をもたらし、腫瘍の免疫原性に影響を与えることが予想される。実際、汎 HLA クラス I 抗体を用いた腫瘍細胞溶解物の免疫沈降に続いて（図 3 A、方法を参照のこと）、質量分析によるクラス I 結合ペプチドの直接検出のための標準的なワークフローを使用して、ベースラインでの同様に低い総ペプチドカウントが、親腫瘍及び細胞株で検出された。IFN- γ 刺激に続いて、クラス I 結合ペプチドの存在量の中央値 2.5 倍の増加が、4 つの細胞株にわたって検出された（図 3 B）。ベースライン時に、腫瘍と細胞株との間で免疫ペプチドームアミノ酸シグネチャの高いレベルの相関が観察されたが、IFN- γ 処理の前後では、細胞株間で低い相関が観察された（図 3 C）。細胞株ペプチドームは、それらのペプチドの 50 % 超を対応する腫瘍ペプチドームと共有し（図 3 D）、同様の結合モチーフを示したが、IFN- γ 処理は、全体的なモチーフを改変するように見えた（図 3 E）。これらの観察を更に調べるために、同定されたペプチドが結合した最も可能性の高い HLA 対立遺伝子を推測した。各クラス I HLA 対立遺伝子上に提示されるペプチドの推定頻度は、対応する腫瘍と細胞株との間で類似していた（図 3 F、3 G）。IFN- γ に

40

50

曝露されたか、又は曝露されていない細胞株を比較した場合、各HLA対立遺伝子にマッピングするペプチドの頻度に劇的な変化が観察され、最も顕著には、HLA-B提示ペプチドの増加である（図3E、3H）。これは、プロモーターに2つのインターフェロン応答性要素を有するHLA-Bに起因するHLA-Aよりも、インターフェロンがHLA-Bを強く上方制御するという以前の観察と一致する。

【0654】

MCPyV+株について、IFN- γ 刺激に続くHLA-Iのこの上方制御が、MCPyV特異的エピトープを提示する能力の増加をもたらすと仮定した。実際に、MCPyV+株であるMCC-367に関して、LTのOBDDメイン(TSDKAEELY)に由来するペプチド配列が検出され、これは、その細胞株のHLA *A0101に対する強力な結合剤として予測された(ランク=0.018、HLAthena)(Sarkizova et al. (2020) Nature 38(2):199-209)。

10

【0655】

実施例5：相補的ゲノムスケールの機能喪失及び獲得スクリーニングは、MCCにおけるHLA-I発現の既知かつ新規の潜在的制御因子を特定する。

NLR C5コピー数の損失及びプロモーターメチル化は、HLA-I経路のサイレンシングを実施する際の寄与因子として特定されたが、少なくとも3つの株(MCC-290、-301、-320)は、正常なNLR C5コピー数を示し、低レベルのHLA-I発現を有していた。したがって、高レベルのHLA-I表面損失及び複数のクラスI成分の下方制御の基礎となる代替経路及び機構の同定が試みられた。

20

【0656】

この目的のために、対合したゲノムスケールのCRISPR-KO機能喪失及びオープンリーディングフレーム(ORF)機能獲得スクリーニングは、MCCにおけるHLA-I表面発現の新規の制御因子を体系的に特定するように設計された。これらのスクリーニングは、ウイルス陽性MCC-301株で実施されたが、これはその堅牢な成長速度のためであり、またその低い変異背景のためでもあり、制御解除された遺伝子の役割に焦点を当てることを可能にした。また、このMCPyV+コンテキストで特定された新規の影響を受けた経路が、MCPyV-MCCでミラーリングされると仮定し、ここで、HLA-I抑制は、これらの同じ経路に影響を与える体細胞変異を通じて達成され得る。MCC-301細胞を、ORF又はCas9+sgRNA構築物のいずれかを含有するゲノムワイドレンチウイルスライブラリを用いて低い感染多重度(MOI)で形質導入した。抗HLA-A-B-C抗体で細胞を染色した後、HLA-I-高集団及びHLA-I-低集団は、蛍光活性化細胞選別(FACS)に基づく細胞選別単離を行い、各スクリーニングは、生物学的に3回行った(図4A)。注目すべきことに、CRISPRライブラリではなくORFライブラリでの形質導入は、おそらくインターフェロン関連遺伝子ORF発現細胞からのインターフェロン分泌に起因して、HLA-I表面発現の全集団的な増加をもたらした。これは、ORFライブラリ特異的効果であり、GFP形質導入細胞が表面HLA-Iの増加を示さなかったため、レンチウイルス形質導入プロセスによるものではなかった(図4B)。ORFスクリーニングについては、3回の複製から中央値の構築物log₂倍率変化があったが、CRISPRスクリーンについては、試料の質が不良であった1回の複製を破棄し、残りの2回の高品質の複製を平均化した(図4C)。

30

40

【0657】

ORFスクリーニングは、log₂倍率変化の中央値の2倍超の増加(HLA-I-高対HLA-I-低における濃縮)を伴って75回のヒットを生じさせた。予想どおり、これらのヒットは、遺伝子セット濃縮分析(GSEA)によって、インターフェロン及びHLA-I経路遺伝子について高度に濃縮された(Subramanian et al. (2005) PNAS USA 102(43):15545-50)(図4D、表1及び2)。いくつかの実施形態では、2倍の変化(例えば、増加又は減少)を使用して、表1、2、3、4、又は5内からバイオマーカーを選択する。上位のヒットはIFNGであり、インターフェロンシグナル伝達経路遺伝子は上位12のうちの4つを含む。加えて、

50

H L A - B 及び - C は、それぞれ、ヒット # 1 0 及び # 3 8 であった。顕著には、M Y C L は、上位のネガティブヒットであることがわかった（図 4 D）。M Y C L は、M C P y V + M C C における中心的な転写因子であり、S T は、E P 4 0 0 クロマチン修飾因子複合体に M Y C L を結合及び動員して、がん形成に必要な広範なエピジェネティック変化を引き起こす。

【0658】

C R I S P R - K O スクリーニングはまた、H L A クラス I 経路のいくつかの既知の構成要素を特定した。F A C S の前の C R I S P R ライブラリ形質導入細胞の配列決定により、適切な s g R N A 表現が存在することが確認された（図 4 C）。次いで、ポジティブヒット及びネガティブヒットを、S T A R S アルゴリズムに従ってランク付けした（D o e n c h e t a l . , (2 0 1 6) 、上記。上位のネガティブヒット（そのノックアウトが H L A I - 低集団において最高の濃縮をもたらした遺伝子）は、T A P B P （図 4 E 、表 1 及び 2 ）であり、部分的に折り畳まれた H L A I 重鎖のシャペロンとして作用し、非結合 H L A I と T A P との間の結合を促進する主要なクラス I 経路構成要素であった。I F N 経路遺伝子 I R F 1 （# 2 1 ）及びクラス I 遺伝子 C A L R （# 8 4 ）及び B 2 M （# 1 4 1 ）を含む他の顕著なネガティブヒットも特定されたが、G S E A は、タンパク質翻訳に関連する遺伝子セットの濃縮を示した。（図 4 E 、表 1 及び 2 ）。

【0659】

C R I S P R 正ヒットの中で、ポリコーン抑制性複合体 P R C 1 . 1 のいくつかの構成要素が繰り返し特定され、これには、スクリーンの上位 2 つのヒットが含まれる：B C O R L 1 （# 1 ） 、U S P 7 （# 2 ） 、及び P C G F 1 （# 4 6 ） 。各々の場合、これらの遺伝子の少なくとも 2 つの s g R N A について、> 4 . 5 倍の濃縮が観察された（図 4 G ） 。P R C 1 . 1 は、C p G 島における H 2 A K 1 1 9 のユビキチン化を通じて遺伝子発現をサイレンシングする非正準ポリコーン抑制複合体である。スクリーニングヒットに加えて、P R C 1 . 1 複合体の他の構成要素としては、K D M 2 B 、S K P 1 、R I N G 1 A / B 、R Y B P / Y A F 2 、及び B C O R （B C O R L 1 と交換可能）が挙げられる。

【0660】

両方のスクリーニングにおける顕著なポジティブヒット及びネガティブヒットは、少なくとも 2 回の複製間で高い一致性を示した（図 4 I ） 。O R F スクリーニングポジティブヒットを検証するために、インターフェロン又は H L A I 経路に関連しない上位 7 1 ヒットに焦点を当てて、M C C - 3 0 1 に単一の O R F 過剰発現株を生成した。フローサイトメトリーを使用して、7 1 個の候補ヒットのうち 8 個（11.3%）が、T F E B 、C X o r f 6 7 、及び Y Y 1 を含む形質導入後の生存率も維持しながら、M F I （H L A - A B C ）を G F P 形質導入対照と比較して 2 倍超上方制御することが確認された（図 4 H ） 。

【0661】

C R I S P R スクリーニングについては、P R C 1 . 1 成分 B C O R L 1 、P C G F 1 、及び U S P 7 に対する 2 つの最高スコアの s g R N A を使用して、一連の M C C - 3 0 1 K O 株を生成することによって、上位ヒットの標的化検証を行った。C a s 9 によるゲノム編集を、T I D E を使用した S a n g e r 配列決定によって確認し（B r i n k m a n e t a l . , (2 0 1 4) N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 4 2 (2 2) : e 1 6 8 ）図 4 I 、機能的ノックダウンを、ウエスタンブロット又は q R T - P C R によって確認した。各遺伝子のノックアウトは、対照非標的化 s g R N A で形質導入された M C C - 3 0 1 と比較して、フローサイトメトリーによる表面 H L A I 発現を増加させた（図 4 J ） 。全体として、並列スクリーニングにわたる上位ヒットのレビューは、ポリコーン抑制複合体 [P R C 1 . 1 成分 U S P 7 、P C G F 1 、及び B C O R L 1 ; O R F ヒット C X o r f 6 7 及び Y Y 1 ; P R C 2 成分 E E D 及び S U Z 1 2 （C R I S P R ポジティブヒット # 1 6 2 及び # 4 0 9 ）] 並びに S T - M Y C L - E P 4 0 0 複合体 [M Y C L 及び C R I S P R ポジティブヒット B R D 8 （# 5 1 ） 、D M A P 1 （# 9 3 ） 、K A T 5 （# 6 1 9 ） 、及び E P 4 0 0 （# 8 8 6 ）] に関連するいくつかのヒ

10

20

30

40

50

ットを明らかにした。MYCL及びPRC1.1成分USP7の両方が、MCPyVと直接相互作用することが報告されているタンパク質をコードするため(Cheng et al., (2017) PLoS Pathogens 13(10):e1006668)(Czech-Sioli et al., (2020) J. Virology 94(5) doi.org/10.1128/JVI.01638-19)(図4K)、したがって、これらをより詳細な特性評価のために選択した。更に、PRC1.1 KO株のTIDE分析を行い、各ノックアウト株におけるインデルを有する細胞のパーセンテージの決定を可能にした(図4L)。重複ヒットを特定したMCC-301 CRISPR HLA-ABCスクリーニング及び独立K562スクリーニング(Burret et al., 2019)の分析。

10

【0662】

実施例6: MYCLはMCCにおけるHLA I抑制を媒介する

MYCL過剰発現は、HLA I-高IMR90線維芽細胞株におけるHLA Iを低減したため、MYCL不活性化が、HLA I-低MCC株におけるクラスIを還元するのに十分であるかどうかを調査した。MYCL shRNAをMCPyV+MKL-1細胞株に導入し、MYCLノックダウンをスクランブルshRNA対照と比較した。これらのノックダウン株のRNA-seq分析により、HLA-B、-C、及びTAP1を含むいくつかのクラスI遺伝子の発現が2倍超増加し、GSEAによる抗原プロセッシング/提示のシグネチャの濃縮が明らかになった($q=0.04$ 、図5A、5B及びデータ未掲載)。STは、ST-EP400-MYCL複合体を介してMYCL機能に結合し、強化するため(Cheng et al., (2017) PLoS Pathogens 13(10):e1006668)、ウイルス抗原不活性化もクラスIを上方制御する可能性があることが疑われた。実際、ST及びLTの共有エクソンを標的とするshRNAを用いてWaGa細胞株(MCPyV+)を形質導入し、両方のMCPyVウイルス抗原を不活性化をもたらした後、HLA-B、-C、及びNLRC5における1.5倍超の増加を含む、類似しているがより控えめなクラスI遺伝子の上方制御が観察された(図5C及びデータ未掲載)。更に、2つの異なるshRNAを有するMKL-1におけるEP400のノックダウンは、HLA-B及びHLA-Cの4倍超の増加をもたらした(図5D)。これらの所見は、MCCにおけるHLA I制御とST-EP400-MYCL複合体成分の発現を直接的に関連付けている。

20

30

【0663】

実施例7: MYCLはMCPyV-MCC及び他のがんに関連している

MYCLのHLA I抑制効果がウイルス陰性MCCにも同様に一般化したかどうかを判定するために、MYCLのコピー数ステータスをMCPyV-MCCで評価した。MYCLを包含する染色体1pのコピー数獲得は、MCCにおけるより一般的なコピー数変更のうちの1つとして以前に報告された。実際、MYCLコピー数($\log_2$ コピー数比0.22~0.64)において、4つのウイルス陰性MCC株のうちの3つが増加し(図5E)、MCPyV-MCCがウイルス抗原の不在下でMYCLシグナル伝達を増強し得る機構を示唆する。この機構が他のがんによって用いられ得るかどうかを判定するために、一般に公開されているRNA-seqデータをCancer Cell Line Encyclopedia(Ghandi et al., (2019) Nature 569(7757):503-8)から照会した。SCLC及び神経芽細胞腫などのHLA I経路成分の発現が低いがん細胞株は、MYCファミリーメンバーMYCL及びMYCNのそれぞれの過剰発現も頻繁に特性評価した(図5F)。

40

【0664】

実施例8: PRC1.1成分はMYCLによって制御される

HLAクラスI遺伝子の発現の間の関連性を調べるために、MCPyV+及びMCPyV-の両方を含む52個のMCC腫瘍のRNA-seqコホートにおけるスクリーニングヒットを調べた。バルククラスI発現データを混乱させる免疫細胞浸潤の可能性を説明するために、ESTIMATE(Yoshihara et al., (2013) Natu

50

re Communications 4:2612) を使用して、腫瘍純度を計算した。MYCL は、このコホートにおけるクラス I 発現とは関連していなかったが、いくつかのクラス I 遺伝子と、MCPyV+MCC における PRC1.1 成分 KDM2B 及び USP7、並びに MCPyV-MCC における BCOR 及び USP7 との間に負の相関が観察された ($p < 0.05$ 、図 5G)。これらの所見は、PRC1.1 と MYCL 及び HLA クラス I 遺伝子との関係の更なる調査を動機付けた。以前に生成された ChIP-seq データ (Cheng et al. (2017) 上記) の再分析では、ST-MYCL-EP400 複合体の成分が、PRC1.1 遺伝子 USP7 及び PCGF1 のプロモーターに結合するが、BCOR 又は BCORL1 には結合しないことが観察された (図 6A、6B)。その後、MAX 及び EP400 の USP7 及び PCGF1 への結合を、MKL-1 細胞において ChIP-qPCR によって確認した (図 6C)。これらの結果は、PRC1.1 が HLA I を制御する際に MYCL の下流で作用する可能性を示唆した。

10

【0665】

実施例 9: USP7 の薬理的阻害は、MCPyV± 及び MCPyV-MCC における HLA I を PRC1.1 依存的に復元する。

MCC における HLA クラス I 制御における PRC1.1 の役割を調べるために、選択的低分子阻害剤が開発されている USP7 に焦点を当てた。強力かつ不可逆的な USP7 阻害剤である XL177A の活性を、対照として機能する 500 倍より少ない効力を示すエナンチオマー化合物である、XL177B と比較した (Schauer et al. (2020) Scientific Reports 10 (1): 5324)。2つの MCPyV+ 株 (MCC-301、MCC-277) 及び 2つの MCPyV- 株 (MCC-290、MCC-320) を、様々な阻害剤濃度で 3 日間処理した。100 nM で、対照化合物 XL177B とは有意に異なる、XL177A に応答して、3つの株 (MCC-277、-290、-301) での DMSO と比較したフローサイトメトリーによる表面 HLA クラス I の発現において、平均 1.89 倍 (範囲 1.60~2.27) の増加が観察された (p 値 0.002~0.02、倍率変化は DMSO と比較して XL177A を指し、 p 値は XL177A 対 XL177B の比較である) (図 6D)。MCC-320 は、HLA I の発現において統計的に有意な増加を示さなかった。

20

【0666】

USP7 は、無数の機能を有することが知られており (例えば、MDM2 脱ユビキチン化による p53 の制御)、PRC1.1 でのその役割が最近発見されたばかりであるため (Maat et al. (2019) bioRxiv. doi.org/10.1101/221093)、HLA I に対する USP7 の効果が、実際に PRC1.1 によって媒介されたかどうかを調査した。がん依存性マップ内のデータ (Dempster et al. (2019) bioRxiv. doi.org/10.1101/720243)、Meyers et al. (2017) Nature Genetics 49 (12): 1779-84) を利用して、生存共依存性が、かかる遺伝子が同じ複合体又は経路内で機能し得ることを暗示するという根拠を用いて、がん細胞株にわたる USP7 の生存依存性と相関する遺伝子を同定した。TP53-WT 株は、USP7 遺伝子とポリコム遺伝子との間に共依存性を示さなかったが、TP53 変異株は、USP7 遺伝子と PRC1.1 遺伝子 PCGF1 及び RING1 との間に高い相関性を示した (それぞれ 6 及び 13 の相関ランク、並びに $p < 0.0003$ 及び 0.003) (図 6E 及びデータ未掲載)。更に、GSEA 分析により、TP53 変異体細胞株における USP7 共依存性遺伝子内で最も濃縮された遺伝子セットとしてのヒストンユビキチン化のプロセスが明らかになった (図 6F 及びデータ未掲載)。これらの結果は、その主な役割が p53 制御であるが、USP7 が PRC1.1 においても重要な役割を果たすことを示す。

30

40

【0667】

USP7 が PRC1.1 を介して作用している場合、USP7 の阻害が、有能な PRC1.1 複合体の発現を欠く株に適用される場合、HLA I 発現に影響を及ぼさない。MCC-301 PCGF1-KO 株において USP7 を阻害し、表面クラス I について、

50

フローサイトメトリーによって結果を確認した（図 6 E）。EP400-ST-MYCL 複合体が USP7 プロモーターに結合するという CHIP-seq の証拠に基づいて、MYCL はまた、HLA 抑制のために少なくとも部分的に USP7 に依存することが疑われた。

【0668】

MCC における HLA I の制御因子を理解することは、ウイルス感染症及びがんの両方の設定におけるクラス I 抗原提示抑制の広範な洞察機構を提供する可能性がある。11 個の堅牢な MCC 細胞株の生成及びゲノム特性評価を通じて、表面 HLA I の喪失が、複数のクラス I 経路遺伝子の転写下方制御及び NLR C5 への改変によって支持されることが示された。MCPyV+MCC 株におけるゲノムワイドスクリーニングを通じて、PRC1.1 及び MYCL を含む HLA I の新規の上流制御因子が同定され、これはウイルス抗原駆動 HLA I 抑制を媒介すると考えられている。

10

【0669】

MCC における低表面 HLA I、並びに TAP1/2 及び PSMB8/9 (LMP7/2) の転写損失が実証されている。本明細書に提示されるように、これらのクラス I 遺伝子の下方制御が確認され、HLA クラス I 転写活性化因子 NLR C5 も改変の標的であることが示され、新たな MCC 細胞株の多くにおいてコピー数 (CN) の減少及びプロモーターのメチル化の両方を示す。NLR C5 発現は、多くのがんにもわたるいくつかのクラス I 遺伝子の発現と相関することが知られており、7,730 人のがん患者の TCGA コホートの 28.6% において、NLR C5 の CN 損失が観察された。しかしながら、NLR C5 が依然としてこれらの MCC 株において発現されることを考慮すると、正常な組織対照と比較して低レベルであるが、おそらくウイルス抗原シグナル伝達に起因して、MCC におけるクラス I の下方制御を調整する他のエピジェネティック制御因子が存在する可能性があるとは仮定した。かかる HLA 制御因子の薬理的阻害は、本明細書で実証される IFN- γ 処理後の HLA 提示ウイルスエピトープを検出する能力によって証明されるように、MCC 腫瘍の免疫原性を増加させることができる。

20

【0670】

したがって、PRC1.1 及び MYCL が MCC における HLA I 表面発現の負の制御因子であることを見出したゲノムスケール機能獲得及び喪失スクリーニングを行った。MYCL は、ST 抗原によってウイルス陽性 MCC において活性化され、ウイルス陰性 MCC において頻繁に増幅される、HLA I の興味深い候補制御因子である。加えて、MYC 及び MYCN は、それぞれ、黒色腫及び神経芽細胞腫における HLA I 表面発現を抑制することが知られている。MYCL と ST との間の既知の相互作用、及びいずれか 1 つのノックダウンがクラス I 遺伝子を上方制御することを実証する本明細書に提示される実験に基づいて、MCPyV は、MYCL との ST 相互作用を通じてクラス I を抑制することができる。ST が多数の下流標的遺伝子をトランス活性化する MYCL 及び EP400 複合体を動員する能力を考慮すると、これらの標的遺伝子のうちの 1 つ以上が MHC I の抑制に寄与すると仮定された。2 つの顕著な ST-MYCL-EP400 下流標的遺伝子は、USP7 及び PCGF1 であり、両方とも CRISPR スクリーニングヒット及び PRC1.1 複合体の構成要素成分である。

30

40

【0671】

PRC1.1 は、タンデムに作用する抑制性クロマチン修飾因子である、ポリコーム複合体のファミリーに属する。従来のモデルでは、PRC2 は、非メチル化 CpG 島に抑制性 H3K27me3 マークを沈着させ、これらのマークは、その後、H2AK119 をユビキチン化する正準 PRC1 を動員する。いくつかの非正準 PRC1 バリエーション複合体も同定されており、これらのうちの 1 つは、PRC2 とは独立して、非メチル化 CpG 島を標的とすることができる PRC1.1 である。ポリコーム複合体は、がんにおいて重要であり、がん遺伝子及び腫瘍抑制剤の両方として関与しており、PRC2 阻害剤は、リンパ腫及び肉腫における初期臨床試験において有望であることが示されている。ポリコーム複合体と HLA クラス I 制御との間のつながりは、新しく有望な発展である。PRC2 は、

50

最近、白血病細胞株 K562 (Burr et al., (2019) Cancer Cell 36 (4) : 385–401. e8) 内の独立した CRISPR スクリーニングを通じて HLA I のリプレッサーとして同定され、この研究は、PRC1.1 複合体との新規のつながりも確立している。MCC の文脈内では、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤などのエピジェネティック修飾因子がクラス I を上方制御することができることが示されているが、この研究は、クラス I 遺伝子の周りのエピジェネティックランドスケープの作成に関与する特定のプレイヤーのうちのいくつかを特定する。Burrらは、1つのMCC株においても同様に PRC2 KO 媒介性 HLA I 上方制御を検証し、MCCにおけるポリコム複合体の意義に更なる信憑性をもたらした。本明細書に提示されるスクリーニング及び Burrらのスクリーニングは、PCGF1を含むいくつかの重複したヒットを特定し、クラス I を抑制するために PRC1.1 と PRC2 との間の協調を示唆する可能性がある。本明細書に提示される研究は、小分子 USP7 阻害剤によるクラス I の上方制御を示し、PRC1.1 の薬理学的標的化のための経路を提供する。

10

20

30

40

50

【0672】

しかしながら、HLA I 制御における PRC1.1 及び MYCL の役割は、文脈及び細胞型に依存し得ることを考慮することが重要である。PRC1.1 は、非メチル化 CpG 島を標的とするが、その特異性を洗練する追加の因子が存在するかどうかは不明である。ゲノムワイドスクリーニングは、単一の MCPyV⁺ MCC 株 (MCC-301) で行われたが、52 MCC 腫瘍の大きなコホート内の HLA クラス I といくつかの PRC1.1 成分との間に逆相関が観察された。更に、Burr et al. 2019 の K562 CRISPR スクリーニングにおける別のポリコム複合体の同定は、収束生物学を更に示す。

【0673】

HLA I 喪失は、ウイルス感染症及びがんにおける免疫回避の重要な機構であり、これらの機構をよりよく理解することは、HLA I の回復のための標的を同定するのに役立ち得る。MCC におけるゲノムスケールスクリーニングを通じて、とりわけ PRC1.1 及び MYCL が、HLA I 表面発現の新規の抑制因子として同定された。これらの結果は、治療標的を特定し、MCPyV ウイルス抗原が HLA クラス I 遺伝子を調節することができる 2 つの方法を強調する。

【0674】

実施例 10：実施例 11～19 の材料及び方法

a. データ及びコードの利用可能性

WES、RNA-seq、scRNA-seq、及び WGBS の DbGap 提出 (受入番号 phs002260) は、現在保留中であり、一般公開される。全エクソーム配列決定分析、RNA-seq 分析、MCPyV ウイルス転写物検出、及び WGBS プロモーターシグナル抽出のための全ての分析コードは、github.com/kdkorthauer/MCCのMITライセンス下でGithubリポジトリで利用可能になる。全てのプロテオミクス及び免疫ペプトミクス実験の元の質量スペクトル、免疫ペプトーム実験のペプチドスペクトラムマッチのテーブル、及び検索に使用されるタンパク質配列データベースは、公開プロテオミクスリポジトリ Massive (massive.ucsd.edu) に保管されており、ftp://MSV000087251@massive.ucsd.eduにおいてユーザ名：MSV000087251、パスワード：modulationでアクセス可能である。

【0675】

b. 実験モデル及び対象の詳細

ヒト対象：

MCC 腫瘍試料については、患者は、Dana-Farber Cancer Institute で IRB プロトコル # 09-156 に基づいて同意した。患者の臨床注釈を表 6 に列挙する。

【0676】

細胞株：

新たに誘導されたMCC細胞株を、0.02%のヘパリン (StemCell Technologies)、20 ng/mlのhEGF (Miltenyi Biotec)、及び20 ng/mlのhFGF-2 (Miltenyi Biotec)を補充したNeuroCult NS-Aヒト増殖培地 (StemCell Technologies) 中37℃で培養した。細胞株の性別を表6に記載する。CK20及びSOX2に対する抗体を使用した免疫組織化学染色によって、細胞株をMCCとして認証した(図1B、図1P)。細胞株を、HLAタイピングによって元の腫瘍試料の誘導体として認証し、これは11株のうち7株について利用可能であった(以下を参照のこと)。MKL-1及びWaGa株を、10%ウシ胎仔血清(FBS; Gibco)及び1%ペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco)を補充したRPMI-1640培地中で増殖させた。

10

【0677】

HLAタイピング。

全エクソーム配列決定データを有する11個のMCC株のうちの7個についてのHLAタイピング。

20

30

40

50

【表 16】

患者	HLA 対 立遺伝子	腫瘍		細胞株	
MCC- 277	HLA-A	HLA-A*11:01:01	HLA-A*32:01:01	HLA-A*11:01:01	HLA-A*32:01:01
	HLA-B	HLA-B*14:01:01	HLA-B*51:01:01	HLA-B*14:01:01	HLA-B*51:01:01
	HLA-C	HLA-C*15:02:01	HLA-C*08:02:01	HLA-C*15:02:01	HLA-C*08:02:01
MCC- 301	HLA-A	HLA-A*24:02:01:01	HLA-A*02:01:01:01	HLA-A*24:02:01:01	HLA-A*02:01:01:01
	HLA-B	HLA-B*15:18:01	HLA-B*44:02:01:01	HLA-B*15:18:01	HLA-B*44:02:01:01
	HLA-C	HLA-C*07:04:01	HLA-C*05:01:01:02	HLA-C*07:04:01	HLA-C*05:01:01:02
MCC- 320	HLA-A	HLA-A*01:01:01:01	HLA-A*25:01:01	HLA-A*01:01:01:01	HLA-A*25:01:01
	HLA-B	HLA-B*14:01:01	HLA-B*18:01:01:02	HLA-B*14:01:01	HLA-B*18:01:01:02
	HLA-C	HLA-C*12:03:01:01	HLA-C*08:02:01	HLA-C*12:03:01:01	HLA-C*08:02:01
MCC- 336	HLA-A	HLA-A*02:01:01:01	HLA-A*02:01:01:01	HLA-A*02:01:01:01	HLA-A*02:01:01:01
	HLA-B	HLA-B*35:02:01	HLA-B*52:01:01:02	HLA-B*35:02:01	HLA-B*52:01:01:02
	HLA-C	HLA-C*12:02:02	HLA-C*04:01:01:01	HLA-C*12:02:02	HLA-C*04:01:01:01
MCC- 350	HLA-A	HLA-A*24:02:01:01	HLA-A*29:02:01:01	HLA-A*24:02:01:01	HLA-A*29:02:01:01
	HLA-B	HLA-B*07:02:01	HLA-B*08:01:01	HLA-B*07:02:01	HLA-B*08:01:01
	HLA-C	HLA-C*07:02:01:01	HLA-C*07:01:01:01	HLA-C*07:02:01:01	HLA-C*07:01:01:01
MCC- 367	HLA-A	HLA-A*01:01:01:01	HLA-A*31:01:02	HLA-A*01:01:01:01	HLA-A*31:01:02
	HLA-B	HLA-B*49:01:01	HLA-B*51:01:01	HLA-B*49:01:01	HLA-B*51:01:01
	HLA-C	HLA-C*12:03:01:01	HLA-C*01:02:01	HLA-C*12:03:01:01	HLA-C*01:02:01
MCC- 2314	HLA-A	HLA-A*24:02:01:01	HLA-A*02:01:01:01	HLA-A*24:02:01:01	HLA-A*02:01:01:01
	HLA-B	HLA-B*07:02:01	HLA-B*44:02:01:01	HLA-B*07:02:01	HLA-B*44:02:01:01
	HLA-C	HLA-C*07:02:01:03	HLA-C*05:01:01:02	HLA-C*07:02:01:03	HLA-C*05:01:01:02

【0678】

c. 腫瘍細胞株の生成

腫瘍試料は、患者生検又は患者由来異種移植片のいずれかから得た。組織を手動で粉碎し、2mg/mlのコラゲナーゼI (Sigma Aldrich)、2mg/mlのヒアルロニダーゼ (Sigma Aldrich)、及び25ug/mlのDNase I (Roche Life Sciences)の溶液中に懸濁し、15mL円錐管に移し、オービタルシェーカー上で低速で30分間インキュベートした。消化後、単一細胞懸濁液を100マイクロストレーナーに通し、洗浄し、0.02%のヘパリン (Stem Cell Technologies)、20ng/mlのhEGF (Miltenyi B

iotec)、及び20ng/mlのhFGF-2(Miltenyi Biotec)を補充したNeuroCult NS-Aヒト増殖キット(StemCell Technologies)の培地を含有する組織培養フラスコ中で培養した。利用可能な場合、過剰の腫瘍単細胞懸濁液を90% FBS及び10% DMSO中で凍結し、液体窒素中で保存した。確立された細胞株をマイコプラズマ不含(Venor(商標)Gemマイコプラズマ検出キット、Sigma Aldrich)として試験し、CK20及びSOX2に対する抗体を使用した免疫組織化学染色を通じてMCCとして検証した。全てのMCC細胞株は、0.02%のヘパリン、20ng/mLのhEGF、及び20ng/mLのhFGF2を補充したNeuroCult NS-A増殖キットからの培地で維持された。細胞培養最適化に使用される他の培地としては、StemFlex(Gibco); 0.02%のヘパリン(StemCell Technologies)、20ng/mLのhEGF(Miltenyi Biotec)、及び20ng/mLのhFGF2(Miltenyi Biotec)を補充したNeurobasal(Gibco); 10%のFBS(Gibco)、1%のペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco)、1mMのビルビン酸ナトリウム(Life Technologies)、10mMのHEPES(Life Technologies)、及び55nMのβ-メルカプトエタノール(Gibco)を補充したDMEM GlutaMAX(Gibco); 並びに20%のFBS(Gibco)及び1%のペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco)を補充したRPMI-1640(Gibco)が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0679】

d. 組織学及び免疫組織化学

全てのIHCは、Leica Bond III自動染色プラットフォームで行った。細胞株から、最大1000万個のMCC細胞をペレット化し、ホルムアルデヒド中に固定し、PBSで洗浄し、パラフィンブロック上に載置した。単一の染色については、5ミクロンの切片を切断し、SOX2又はCK20について染色した。Leica Biosystems Refine検出キットを、SOX2についてのクエン酸塩抗原回収(Abcam #97959、ポリクローナル、1:100希釈)、及びサイトケラチン20についてのEDTA抗原回収(CK20; Dako #M7019、クローンKs20.8、1:50希釈)とともに使用した。アーカイブ腫瘍標本の二重免疫組織化学染色には、MCCマーカーSOX2(CST、D6D9、1:50希釈; 赤色発色素)を使用し、HLAクラスI(Abcam、EMR8-5、1:6,000希釈; 褐色発色素)又はHLAクラスII(Dako M0775、CR3/43、1:750希釈; 褐色発色素)のいずれかを、自動染色システム(Bond III、Leica Biosystems)を製造業者のプロトコルに従って使用した。HLA I又はHLA II膜染色を示したSOX2+MCC細胞の割合を、2名の理事会認定病理学者のコンセンサスによって評価した。

【0680】

e. 免疫蛍光

染色は、BOND RX完全自動染色器(Leica Biosystems)上で一晩行った。厚さ5µmのホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織切片を、60℃で3時間焼成した後、BOND RXに装填した。スライドを脱パラフィン化し(BOND DeWax溶液、Leica Biosystems, Cat. AR9590)、一連の勾配エタノールを介して脱イオン水に再水和した。抗原回収を、BONDエピトープ回収溶液1(ER1; pH6)又は2(ER2; pH9)(Leica Biosystems, Cat. AR9961、AR9640)中で95℃で行った。脱パラフィン化、再水和、及び抗原回収は全て、BOND RXによって事前にプログラムされ、実行された。次に、スライドを、以下の一次抗体で連続的に染色した: SOX2(クローンB6D9、Cell Signaling、希釈1:200; Opal 690 1:100)、CD8(クローン4B11、Leica、希釈1:200; Opal 480 1:150)、PD-L1(クローンE1L3N、Cell Signaling、希釈1:300;

Opal 520 1:150)、及びPD-1 (クローンEPR4877 [2]、Abcam、希釈1:300; Opal 620 1:300) (ER1で20分間)、並びにFOXP3 (クローンD608R、Cell Signaling、希釈1:100; Opal 570 1:300) (ER2溶液で40分間)。各一次抗体を30分間インキュベートした。その後、抗マウス+抗ウサギOpalポリマーホースラディッシュペルオキシダーゼ (Akoya Biosciences, Cat. ARH1001EA) を、10分間のインキュベーション時間を有する二次標識として適用した。抗体複合体のシグナルを標識し、スライドを10分間インキュベートすることによって、それらの対応するOpalフルオロフォア試薬 (Akoya) によって視覚化した。スライドをSpectral DAPI溶液 (Akoya) 中で10分間インキュベートし、空気乾燥させ、Prolong Diamond褪色防止用封入剤 (Life Technologies、カタログP36965) とともに載置し、Vectra Polarisマルチスペクトルイメージングプラットフォーム (Vectra Polaris、Akoya Biosciences) を使用して画像化した。目的の代表的な腫瘍領域を病理学者によって同定し、試料当たり2~6の視野を取得した。画像をスペクトルの混合せず、Inform 2.4 (Akoya) 内の監視対象機械学習アルゴリズムを使用して、病理学者の監督下で細胞同定を行った。

10

【0681】

f. フローサイトメトリー

細胞をVerseneと解離し、100 μ L中の100万細胞当たり5 μ LのヒトTruStain FcX (Fc受容体遮断溶液; Biolegend #422302) と室温で10分間インキュベートした。フルオロフォアコンジュゲート抗体又はそれぞれのアイソタイプ対照を添加し、4°Cで更に30分間インキュベートした。次いで、細胞をPBSで1回洗浄し、PBS又は4%パラホルムアルデヒド中に再懸濁し、LSR Fortessa細胞計上で分析した。HLA-I及びHLA-IIの検出には、以下の抗体を使用した: PE (BioLegend #311406)、APC (BioLegend #311410)、又はAF647 (Santa Cruz Biotechnology #sc32235 AF647)、及びHLA-DR-FITC (BioLegend #307604) にコンジュゲートしたHLA-ABC (W6/32クローン)。

20

【0682】

g. 全エクソーム配列決定及び変異呼び出し

ゲノムDNA試料を、約180bpのサイズ分布のために最適化されたBroad Institute開発のプロトコルを使用して剪断した。Kapa Hyperprepキットを使用して、末端修復、独自の分子インデックスを含有する二又アダプターによるアダプターライゲーション、及びPCRを介したP5及びP7試料バーコードの添加を含む、体細胞試料に最適化されたプロセスでライブラリを構築した。SPRI精製を行い、得られたライブラリをPico Greenで定量化した。ライブラリを正規化し、等モルプリーピングを行い、ハイブリダイゼーションのための多重化セットを調製した。自動捕捉を行い、続いて濃縮されたDNAのPCRを行った。SPRI精製をクリーンアップに使用した。次いで、Pico Greenで多重プールを定量化し、Bioanalyzerを使用してDNA断片サイズを推定した。最終ライブラリをqPCRによって定量化し、標的領域の130~160倍の平均カバレッジの範囲で、50倍以上の深度で標的塩基の85%以上がカバーされるように、適切な数のレーンにわたってIlluminaフローセルに装填した。

30

40

【0683】

エクソーム配列決定BAMファイルを、Google Cloud Storageコマンドラインツールgsutilバージョン4.5 (github.com/GoogleCloudPlatform/gsutil/) を使用して、Broad Genomics Firecloud/Terraプラットフォームからダウンロードした。GATKバージョン4.1.2.0を使用して、(1) 最大MNP距離0を使用して、Mut

50

ect2コマンドで正常なBAM上の参照から変異を呼び出し、(2) CreateSomaticPanelOfNormalsコマンドを使用して、呼び出された正常変異のVCFファイルから正常のパネルを構築し、(3) Mutect2コマンドを使用して、それらそれぞれの正常な対応物と比較して、腫瘍及び細胞株の両方の対間で変異を呼び出した。これらのステップでは、以下の注釈を使用した：ftp://ftp.broadinstitute.org/bundle/b37/human_g1k_v37.fastaからダウンロードしたb37参照配列、ftp://ftp.broadinstitute.org/bundle/beta/Mutect2/af-only-gnomad.raw.sites.b37.vcf.gzからダウンロードした生殖系列リソースVCF、及びhttps://github.com/broadinstitute/gatk/blob/master/src/test/resources/large/whole_exome_illumina_coding_v1.Homo_sapiens_assembly19.targets.interval_listからダウンロードしたインターバルリスト。呼び出されたバリエーションを、GATK FilterMutectCallsコマンドでフィルタリングし、PASSとラベル付けされたバリエーションを抽出し、下流分析に含めた。

【0684】

次に、通過したバリエーションのVCFファイルを、vcf2mafバージョン1.16.17(github.com/mskcc/vcf2maf/tree/5453f802d2f1f261708fe21c9d47b66d13e19737からダウンロードした)及びgithub.com/Ensembl/ensembl-vep/archive/release/95.3.tar.gzからインストールしたバリエーション効果予測因子バージョン95を使用して、MAFファイルとして注釈を付けた。R Bioconductorパッケージmaftools⁷¹を使用して、遺伝子及び試料による変異の腫瘍プロットを生成した。標準的なクラスI及びクラスII PCRベースのタイピング(Brigham及びWomen's Hospital Tissue Typing Laboratory)を使用して、患者HLAアロタイプを評価した。

【0685】

h. 全ゲノム配列決定及びコピー数分析

全ゲノム配列決定は、Admera Healthによって行った。読み取りは、TrimGaloreをデフォルト設定で使用して、品質及びアダプターでトリミングした。トリミングした読み取りを、hg38及びMCPyV(NCBI受入番号:NC_010277)を含有する融合参照に対して、bowtie2-very-sensitiveを使用して整列させた。コピー数のバリエーション分析は、GATK4 CNV推奨業務を用いて行った。腫瘍由来のCNVを呼び出すために、17個の正常な血液全ゲノムから正常のパネルを生成した。hg38にマッピングされた全てのCNV呼び出しは、BroadInstitute(software.broadinstitute.org/software/igv/)からのIntegrative Genomicsビューアを使用して視覚化された。

【0686】

i. RNA配列決定及び分析

MCC腫瘍及び新たに生成された細胞株からの試料について、RNAを、Agilent Bioanalyzer(DV200メトリック)を使用して、最初に質について評価した。100ngのRNAを、Superscript III逆トランスクリプターゼ及びIlluminaのTruSeq RNAアクセス試料調製キットを使用した第1の鎖cDNA合成の入力として使用した。cDNAの第2の鎖の合成に続いて、UMI(独自の分子インデックス)アダプターを用いたインデックス化アダプターライゲーションを行った。その後のPCR増幅により、適合断片が濃縮された。増幅されたライブラリを定量化し、正規化し、プールし、エクソーム標的化オリゴとハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション後、ビーズクリーニング、溶出、及びPCRを行い、Illumina

フローセルレーン上で配列決定するためのライブラリプールを調製した。トランスクリプトームを、対で少なくとも5000万回の読み取りのカバレッジまで配列決定した。

【0687】

線維芽細胞及び角質細胞対照株については、受入コードSRP126422（対照試料「NN」から4回の複製）及びSRP131347（条件：対照及び遺伝子型：対照で6回の複製）でR BioconductorパッケージSRADBを使用して、Sequence Read Archiveから生のFASTQファイルをダウンロードした。以下に記載される対照shScr MKL-1及びWaGa細胞株から、MKL-1及びWaGaに関する生のFASTQファイル入手した（方法：MKL-1 shMYCL及びWaGa shST/LT株生成及び配列決定）。次いで、線維芽細胞、角質細胞、MKL-1、及びWaGaからのFASTQファイルを、STARバージョン2.7.3aを使用し、ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/genocode/Gencode_human/release_19/GRCh37.p13.genome.fa.gzからダウンロードしたインデックスゲノム参照ファイル、https://data.broadinstitute.org/snowman/hg19/star/gencode.v19.annotation.gtfからダウンロードした転写物注釈ファイルを使用し、以下のオプションを用いて整列させた：--twopassMode Basic、--outSAMstrandField intronMotif、--alignIntronMax 1000000、--alignMatesGapMax 1000000、--sjdbScore 2、--outSAMtype BAM Unsorted、--outSAMattributes NH HI NM MD AS XS、--outFilterType BySJout、--outSAMunmapped Within、--genomeLoad NoSharedMemory、--outFilterScoreMinOverLread 0、--outFilterMatchNminOverLread 0、--outFilterMismatchNmax 999、及びoutFilterMultimapNmax 20。重複は、picard MarkDuplicatesバージョン2.22.0-SNAPSHOTでマークした。

【0688】

MCC腫瘍及び細胞株試料のRNA配列決定BAMファイルを、Google Cloud Storageコマンドラインツールgsutilバージョン4.5（github.com/GoogleCloudPlatform/gsutil/）を使用して、Broad Genomics Firecloud/Terraプラットフォームからダウンロードした。

【0689】

遺伝子カウントは、featureCountsバージョン2.0.0を使用して、BAMファイルから得た。試料全体の平均カウントが1未満の非常に低い発現遺伝子は、分析から除外された。DESeq2 R Bioconductorパッケージのvst関数から得られた分散安定化カウントのベクター上のユークリッド距離を使用して、試料間距離メトリック（図1G）を計算した。

【0690】

DESeq2の陰性二項GLM Wald検定を使用して、IFN- γ + 試料と-試料との間で示差発現分析を実行し（共変量としてウイルス状態を調整する）、ここで、有意性は、デフォルト設定下での複数の比較に対して調整したp値を使用して評価した。試料群間の潜在的な全般的な遺伝子発現差異を説明するために、RUVgを使用して、www.tau.ac.il/~elieis/HKG/HK_genes.txtからダウンロードされたハウスキーピング遺伝子のリストから、望ましくない変異の潜在的因子を推定した。次いで、不必要な変動の最大の因子を、DESeq2モデルで共変量として使用して、ライブラリサイズとは無関係の潜在の変動を調整した。RUVgによって戻される変動の潜在的な因子について調整された正規化されたカウントを、図2Aにおいて視覚化

した。

【0691】

j. MCPyVウイルスDNA及びRNA検出

MCC腫瘍試料中のMCPyVのDNA検出をViroPanelで行った。RNA-seqのウイルス転写物の定量化の場合、メルケル細胞ポリオーマウイルス参照配列を、www.ebi.ac.uk/ena/data/view/EU375804&display=fastaからダウンロードした。ヒト参照配列にマッピングされなかった読み取りを、SAMtoolsビューバージョン1.10を使用して腫瘍及び細胞株のRNA-seq及びViroPanel BAMファイルから抽出し、BWAバージョン0.7.17-r1188を使用して修飾されたメルケル細胞ポリオーマウイルス参照配列（HM355825.1、VP2コード配列が終了したときに参照配列が終了するように再循環させた）に再整列させた。各位置のカバレッジは、'samtools depth -aa-d0' コマンドを使用してsamtoolsで評価し、カバレッジ深度は、ggplot2及びgggenesパッケージを使用してRバージョン3.5.1でプロットした。

【0692】

k. 単一細胞RNA配列決定

MCC-336 (MCPyV+) 及びMCC-350 (MCPyV-) からの腫瘍試料を、単一細胞RNA-seq (scRNAseq) について処理した。細胞を解凍し、RPMI 及び10%のFBS中で2回洗浄した後、死細胞枯渇を受けた (Miltenyi 130-090-101)。生存MCC腫瘍細胞を、1,000細胞/μLの細胞濃度で0.04%のBSAを含むPBSに再懸濁した。17,000個の細胞を、製造業者の指示に従って、10×Genomics Chromium (商標) 装置 (10×Genomics) 上に装填した。scRNAseqライブラリを、Chromium (商標) 単一細胞5'ライブラリ及びゲルビーズキット (10×Genomics) を使用して処理した。増幅されたcDNAライブラリ及び最終シーケンシングライブラリの品質制御は、Bioanalyzer High Sensitivity DNAキット (Agilent) を使用して行った。ScRNAseqライブラリを4nM濃度に正規化し、プールし、次いで、プールしたライブラリをIllumina NovaSeq S4プラットフォーム上で配列決定した。配列決定パラメータは、150bpの読み取り1、150bpの読み取り2、及び8bpのインデックス1であった。両方の試料からの読み取りを脱多重化し、Cell Ranger (v. 3.0.2) を使用してhg19に整列させ、転写物量をSeurat (v. 3.1.5) Rパッケージを使用して共分析した。>1,500及び<7,500遺伝子、及び<10%ミトコンドリア遺伝子を発現する細胞のみを更なる分析のために保持し、合計15,808個の細胞を平均深度4,231.9遺伝子/細胞に配列決定した。データを正規化し、上位2,000の変数特徴を特定した。その後、遺伝子カウント、ミトコンドリアパーセンテージ、及び細胞周期段階からの変動を回帰させながら、データをスケールリングした。この後、主成分分析、Harmony (v. 1.0)⁸¹を使用したバッチ補正、UMAP分析、最後に、解像度=0.3でのLouvainクラスタリングが続いた。免疫細胞クラスターは、CD45 (PTPRC) の発現によって同定し、MCCクラスターは、ATOH1、SYP、及びSOX2の発現によって同定した。

【0693】

l. 免疫沈降、質量分析、及びペプチド同定

最大4000万又は0.2gのMCC細胞を免疫沈降させた。簡潔に述べると、MCC細胞を採取し、40MのTris (pH8.0)、1mMのEDTA (pH8.0)、0.1Mの塩化ナトリウム、Triton X-100、0.06Mのオクチルβ-D-グルコピラノシド、100U/mLのDNase I、1mMのフェニルメタンスルホンフルオリド (全てSigma Aldrichから)、及びプロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche Diagnostics) を含有する氷冷溶解緩衝液中で溶解した。細胞

溶解物を4℃で22分間、12,700rpmで遠心分離した。溶解物上清をGamma bind Plusセファロースビーズ(GE Healthcare)とカップリングし、10μgのHLA-I抗体(クローンW6/32, Santa Cruz Biotechnologies)と回転攪拌下、4℃で3時間インキュベートした。インキュベーション後、溶解物-ビーズ-抗体混合物を短時間遠心分離し、上清を廃棄した。プロテアーゼ阻害剤を含まない、40mMのTris(pH8.0)、1mMのEDTA(pH8.0)、0.1Mの塩化ナトリウム、0.06Mのオクチルβ-D-グルコピラノシド、及び20mMのTris緩衝液を含有する洗浄緩衝液からなる溶解緩衝液でビーズを洗浄した。ゲル装填チップ(Fisherbrand)を使用して、ビーズから可能な限り多くの流体を除去した。最大3回の免疫沈降のペプチドを組み合わせ、酸溶出し、LC/MS/MSを使用して分析した。簡潔に述べると、ペプチドを5%ギ酸を含む3%アセトニトリルに再懸濁し、分析カラム(1.9μmのC18 Reprosilビーズを含む20~30cm、Dr. Maisch HPLC GmbH)、社内充填)に装填した。ペプチドを6~30%の勾配(EasyLC 1000又は1200、Thermo Fisher Scientific)で溶出させ、QExactive Plus、Fusion Lumos、又はOrbitrap Exploris 480(Thermo Fisher Scientific)で分析した。Lumos測定の場合、ペプチドはまた、単独で荷電された場合に断片化された。Orbitrap Explorisの測定(2回の免疫沈降プール、+/- IFN-γ、図3)及び大型T抗原ペプチドの検出(IFN-γで処理したMCC-367細胞株の3回の免疫沈降)の場合、ペプチドを、2パンチのSDB-XC材料(Empore 3M)及び漸増濃度のアセトニトリル(0.1% NH4OH、pH10中5%、10%、及び30%)を用いて、ステージ先端の基本的な逆相分離を使用して更に分画した。画分を、FAIMSproインターフェースを備えたFusion Lumos又はOrbitrap Exploris 480で分析した。

10

20

30

40

50

【0694】

上記のように、USP7阻害剤で処理した細胞株の免疫ペプチドームを溶出し、続いて、TMT6試薬(Thermo Fisher; 126-USP7iA、127-WT、128 USP7iA、129WT、130-USP7iB、131 USP7iB)で標識し、次いで、5mMのギ酸アンモニウム(pH10)中の漸増濃度のアセトニトリル(10%、15%、及び50%)を用いた基本的な逆相分画、並びにFAIMSproを用いたOrbitrap Exploris 480上での分析を使用して、その後の分画のためにプールした。データ取得パラメータは上記のとおりであり、NCEは34秒及び2秒の動的除外に設定した。

【0695】

質量スペクトルは、Spectrum Millソフトウェアパッケージv7.1プレリリース(Broad Institute, Cambridge, MA)を使用して解釈した。MS/MSスペクトルは、600~4000の範囲における前駆体MH+を有しないか、前駆体電荷が5超であるか、又は最小5未満の検出されたピークを有する場合、検索から除外された。同じクロマトグラフィーのピークで取得された同じ前駆体m/zとの類似のスペクトルの融合を無効にした。MS/MSスペクトルを、ゲノム及びそのタンパク質コード転写物のhg19注釈を有する全てのUCSCゲノムブラウザ遺伝子(52,788エントリ)、一般的なヒトウイルス配列(30,181エントリ)、26個の組織からの腫瘍で観察される反復変異タンパク質(4,595エントリ)、264個の一般的な実験室汚染物質、及びMCC細胞株で検出される体細胞変異を含有するタンパク質配列(3,076エントリ)を含む、90,904エントリを含有するタンパク質配列データベースに対して検索した。MS/MS検索パラメータは、無酵素特異性;ESI-QEXACTIVE-HCD-HLA-v3器具スコアリング;固定修飾:システインのシステイン化;可変修飾:ペプチドN末端グルタミンにおけるメチオニンの酸化、システインのカルバミドメチル化、及びピログルタミン酸;前駆体質量公差±10ppm;生成物

質量公差 ± 10 ppm、並びに最小一致ピーク強度30%を含む。個々のスペクトルのペプチドスペクトル一致 (PSM) を、PSMレベル $< 1\%$ FDRで標的デコイに基づくFDR推定を適用するために、Spectrum Mill自動検証モジュールを使用して確実に割り当てられたものとして自動的に指定した。ペプチドの自動検証は、スコアを最適化するための自動閾値戦略を用いて各試料について別々に行い、デルタランク1ーランク2スコア閾値は、試料当たりの全てのLC-MS/MS実行にわたる各前駆体電荷状態 (1~4) について別々に行った。スコア閾値の決定はまた、ペプチドが7の最小配列長を有し、PSMが5の最小骨格切断スコアを有することを必要とした。ペプチド及びPSMのエクスポートを、空のビーズ試料中で同定された潜在的なキャリアオーバーペプチド及びペプチドを含む汚染物質についてフィルタリングした。TMT標識試料については、ケラチンタンパク質に由来するペプチドを除去し、TMT強度値を全般的な中央値に対して正規化した。P値は、RにおけるLIMMAパッケージに基づいて、社内ソフトウェアを使用して計算した。

10

【0696】

m. 全プロテオーム解析及び解釈

MCC細胞株のタンパク質発現を評価した。簡潔に述べると、IFN- γ 処理の有無にかかわらず、MCC細胞株の細胞ペレットを8Mの尿素中で溶解し、LysC及びトリプシン (Promega) を使用してペプチドに消化した。400 μ gのペプチドを、TMT10試薬 (Thermo Fisher, 126-MCC-290、127N-MCC-350__IFN、127C MCC-275__IFN、128N MCC-275、128C MCC-350、129N__MCC-301__IFN、129C-MCC-277__IFN、130N-MCC-290__IFN γ 、130C MCC-277、131MCC-301) で標識し、次いで、その後の分画及び分析のためにプールした。プールしたペプチドを、オフライン高pH逆相分画を使用して24個の画分に分離した。1画分当たり1 μ gを、分析カラム (20~30 cm、1.9 μ mのC18 Reprosil ビーズ [Dr. Maisch HPLC GmbH]、社内充填、PicoFrit 75 μ m内径、10 μ m発光体 [New Objective]) に装填した。ペプチドを、6~30%の緩衝液B (0.1%のギ酸又は0.5%のAcOH、及び80%又は90%のアセトニトリルのいずれか) の範囲の直線勾配 (EasyNanoLC 1000又は1200、Thermo Scientific) で84分間、30~90%のBで9分間溶出し、90%の緩衝液Bで5分間、200 nL/分で保持した。データ依存的取得の間、ペプチドをFusion Lumos (Thermo Scientific) で分析した。フルスキャンMSは、300~1,800 m/zの60,000で取得した。AGC目標を4e5及び50 msに設定した。サイクル当たりの上位20個の前駆体を、60,000分解能で、0.7 m/zの単離幅、34 NCE、3e4 AGC標的、及び50 msの最大注入時間でHCD断片化に供した。動的排除を有効にし、持続時間を45秒とした。

20

30

【0697】

MCCバリエーションを除外した上記のデータベースに対してSpectrum Millを使用してスペクトルを検索して、トリプシンを指定し/消化酵素としてのPを許容 (K-P及びR-P切断を許容) し、4つの未切断及びESI-QEXACTIVE-HCD-v3を許容した。システインのカルバミドメチル化を固定修飾として設定した。TMT標識は、リジンで必要とされたが、ペプチドN末端は、標識又は非標識のいずれかとすることができた。検索した可変修飾には、タンパク質N末端のアセチル化、酸化メチオニン、ピログルタミン酸、脱アミドアスパラギン、及びピロカルバミドメチルシステインが含まれる。マッチ許容値を、MS1及びMS2レベルで20 ppmに設定した。PSMスコア閾値化は、Spectrum Mill自動検証モジュールを使用して、ペプチドスペクトラムマッチ (PSM) レベル及びタンパク質レベルでの2つのステップで標的-デコイベースのFDRを適用した。ステップ1では、PSMレベルの自動検証は、最初に、最小配列長8の自動閾値戦略、自動可変範囲前駆体質量フィルタリング、並びに最適化した

40

50

スコア及びデルタランク1ーランク2スコア閾値を使用して行い、各LC-MS/MS実行での各前駆体電荷状態について、前駆体電荷2～4のPSMレベルのFDR推定値<1.0%を得た。前駆体電荷5～6について合理的な統計を得るために、閾値を最適化して、より高い電荷状態に対して生成されるスペクトルがより少ないため、実験当たり（各実行当たりではなく）全てのLC実行にわたって、0.5%未満のPSMレベルのFDR推定値を得た。ステップ2では、標的タンパク質レベルのFDR閾値0を使用して、PSMを更にフィルタリングするために、タンパク質研磨自動検証を各実験に適用し、タンパク質グループ化方法は、サブグループを拡大し、上位使用は絶対最小タンパク質スコア9で（SGT）を共有した。TMT10レポーターイオン強度を、ロット番号TB266293について試薬製造業者の分析証明書（www.thermofisher.com/order/catalog/product/90406）から得られたCramer's Rule及び補正因子に従って決定因子計算を実施するafRICA補正法を使用して、Spectrum Millタンパク質/ペプチド概要モジュール内の同位体不純物について補正した。

10

【0698】

n. ELISpot

患者MCC-367からのマッチする患者末梢血単核細胞（PBMC）を解凍し、ウェル当たり 10^7 個の細胞を24ウェルプレートに一晩播種した。細胞を、10%ヒト血清及び20ng/ml IL-7（Peprotech）を補充した完全DMEM中の10ug/mlのLT抗原ペプチドTSDKAIELY（MCC-367 HLAペプチドドーム中で同定、図3F）で刺激した。3日間の刺激後、細胞に20単位/mlのIL-2（Peprotech）を補充した。10日間の刺激後、細胞を一晩サイトカイン除去した。10ug/mlのTSDKAIELYペプチドを用いたIFN- γ ELISpotアッセイで、ウェル当たり50,000個の細胞を刺激した。DMSO及びHIV-GAGペプチドを陰性対照として使用した。CEF（Mabtech）及びPHA（Sigma Aldrich）を陽性対照として使用した（図示せず）。ELISpot及びT細胞培養方法は、以前に詳細に記載された。

20

【0699】

o. ORFスクリーニング

13,833個の遺伝子にマッピングする16,172個の固有のORFを含む、ヒトORFeomeバージョン8.1レンチウイルスライブラリは、Broad Genetic Perturbations Platformからの贈り物として提供された。7500万個のMCC-301細胞を、ORFeomeレンチウイルスで形質導入して、およそ30～40%の感染率を達成した。2日後、形質導入細胞を、3日間の0.5ug/mlピューロマイシン（Santa Cruz Biotechnology #SC-10871）処理で選択した。形質導入の7～10日後、細胞を抗HLA-ABC-PE抗体（W6/32クローン、Biolegend #311405）で染色し、HLA-ABC-PE染色の上部及び下部10%についてゲーティングしたBD FACSAria IIで選別した。選別した細胞をPBSで洗浄し、急速凍結し、-80℃で保存した。その後、安定して組み込まれたORF配列を含むゲノムDNAを、選別した細胞ペレットから単離した。スクリーニングを3回行った。次いで、単離されたゲノムDNAを、構築物バーコード領域のインデックスPCR増幅のためのテンプレートとして使用した。プールされたPCR生成物を精製し、Illumina HiSeq上で実行した。

30

40

【0700】

p. CRISPR-KOスクリーニング

BrunelloヒトCRISPRノックアウトプールプラスミドライブラリ（1ベクター系）は、David Root and John Doench（Addgene #73179）からの贈り物であった。50ngのBrunelloプラスミドライブラリを、ElectroMAX Stbl4コンピテント細胞（ThermoFisher #11635018）にエレクトロポレーションし、30℃、24.5×24.5cmの

50

寒天バイオアッセイプレート上で一晚インキュベートした。20時間後、コロニーを採取してプールし、増幅したプラスミドDNA (pDNA) を抽出して精製した。増幅後にライブラリ多様性が維持されたことを確認するために、sgRNAバーコード構築領域を増幅前及び増幅後のライブラリアリコートにおいてPCR増幅させた。PCR生成物を精製し、Illumina MiSeq上で配列決定した。増幅前及び増幅後のアリコートからの配列決定データを比較して、同様の多様性を確保した。レンチウイルスを産生するために、HEK-293T細胞を、TransIT-LT1トランスフェクション試薬 (Mirus #MIR2300) を使用して、pDNA、VSV-G、及びpsPAX2プラスミドでトランスフェクトした。レンチウイルスを、トランスフェクションの48時間後に採取し、急速凍結した。レンチウイルスを滴定するために、150万個の細胞のMCC-301細胞を、100、200、300、500、及び700 μ Lのウイルスで形質導入した。各条件から、細胞の半分以上を0.5 μ g/mLのピューロマイシン (Santa Cruz Biotechnology #SC-10871) で選択し、残りの半分以上を未処理のままにした。感染率は、選択された条件及び選択されていない条件での生細胞数を比較することによって計算した。

10

【0701】

レンチウイルス形質導入及びFACSスクリーニングは、以下の例外を除いて、ORFスクリーニングに類似して3回行った：1億5000万個のMCC-301細胞は、複製ごとに形質導入され、形質導入の10~14日後に細胞を選別した。更に、形質導入後、フローサイトメトリー選択の前に、代表的なペレット (4000万個の細胞) を採取し、3つの複製全てから配列決定して、sgRNAの表現を評価した (図4F)。

20

【0702】

q. スクリーニングデータ分析

未処理のFASTQ読み取りを、PoolQ v2.2.0 (portals.broadinstitute.org/gpp/public/software/poolq) を使用して、各構築物のlog₂正規化スコアに変換した。3つの複製の各々について、HLA-E高及びHLA-E低の集団の正規化されたカウントスコア間のlog₂倍率変化 (LFC) を、各構築物について計算した。

【0703】

ORFスクリーニングの場合、次いで、ORF構築物を、それらの中央値LFC値に基づいてランク付けし、対応するp値を、超幾何分布モデル (portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/crispr-gene-scoring) を使用して計算した。1つの遺伝子にマッピングする複数のORFが存在する場合、LFC値を全ての構築物にわたって平均化して、遺伝子レベルの値を生成した。各選別された集団の試料の質を、log正規化されたORF構築物スコア (log₂ (ORF構築物読み取り/総読み取り $\times 10^6 + 1$)) を計算し、全ての構築物が等しく表されている場合、平均構築物頻度が予想される頻度の10%以上であることを確認することによって評価した (平均log正規化されたスコアカットオフ2.84に対応する) (図4F (左))。

30

【0704】

CRISPRスクリーニングの場合、対応するlog正規化スコアカットオフ3.80) と同等のカットオフ基準を使用して、複製2 HLA-E高の選別された集団の平均log正規化スコアがわずかに0.413であったため、複製2を破棄した (図4F (右))。その後、各sgRNAのLFC値を、複製物1と3との間でのみ平均化し、次いで、対応する個々のsgRNAのランクに基づいて遺伝子をランク付けするために二項分布モデルを用いる、STARSソフトウェア (portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/crispr-gene-scoring) に入力した。

40

【0705】

GSEA分析の場合、ランク付けされたORF及びCRISPRリストは、特定の遺伝

50

子にマッピング又は標的化する全ての構築物の L F C 値を平均化し、この平均 L F C に基づいて遺伝子をランク付けすることによって生成された。次いで、これらのランク付けされたリストを、G S E A P r e r a n k e d (濃縮統計-重み付け、最大遺伝子セットサイズ-500、最小遺伝子セットサイズ-15)の入力として使用した。

【0706】

r. ORF 株の生成

p L X _ T R C 3 1 7 プラスミドにクローニングされた単一の ORF 構築物は、B r o a d I n s t i t u t e G e n e t i c P e r t u r b a t i o n P l a t f o r m (p o r t a l s . b r o a d i n s t i t u t e . o r g / g p p / p u b l i c /) からの贈り物であった。ORF プラスミド、p s P A X 2、及び V S V - G を、H E K - 2 9 3 T 細胞にトランスフェクトして、レンチウイルスを産生した。M C C - 3 0 1 及び M C C - 2 7 7 細胞を、2 μ g / m L のポリブレン中の個々の ORF レンチウイルスで形質導入し、スピニングを 2,000 rpm で 30°C で 2 時間行った。形質導入の 2 日後、形質導入細胞を、3 日間の 0.5 μ g / m L のピューロマイシン処理で選択した。上述のように(方法: フローサイトメトリーを参照のこと)、M C C - 3 0 1 株については P E コンジュゲート H L A - A B C (W 6 / 3 2) 抗体 (B i o L e g e n d # 3 1 1 4 0 6)、又は M C C - 2 7 7 株については A F 6 4 7 コンジュゲート H L A - A B C (W 6 / 3 2) 抗体 (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y # s c 2 4 6 3 7) のいずれかを使用して、フローサイトメトリーを行った。

【0707】

s. CRISPR KO 株の生成

配列 5' C A C C G - - - s g R N A 配列 - - - 3' 及び 5' A A A C - - - s g R N A の逆相補鎖 - - - C 3' を有する順方向及び逆方向オリゴは、E t o n B i o s c i e n c e s によって合成された。順方向及び逆方向のオリゴをアニーリングしてリン酸化し、B s m B I 適合性オーバーハングを産生した。L e n t i C R I S P R v 2 ベクター (A d d g e n e , # 5 2 9 6 1) を B s m B I で消化し、エピアルカリホスファターゼで脱リン酸化し、ゲル精製した。ベクター及びインサートを、室温で T 7 D N A リガーゼと 1 : 8 の比率でライゲーションし、S t b l 3 化学的コンピテント細胞に形質転換した (T h e r m o F i s h e r # C 7 3 7 3 0 3) 。以下のプライマー: 5' - G A T A C A A G G C T G T T A G A G A G A T A A T T - 3' を使用した S a n g e r 配列決定により、正しい s g R N A クローニングを確認した。レンチウイルスは、H E K - 2 9 3 T 細胞 (p s P A X 2 , V S V - G , 及びクローニングされた C R I S P R プラスミド) において産生され、M C C - 3 0 1 細胞は、単一のノックアウト株についての単一の構築物レンチウイルスで、又は 2 つの異なる s g R N A を含有する 2 つのレンチウイルスプールで、二重ノックアウト株についての同じ遺伝子に対して形質導入された。形質導入は、C R I S P R - K O ライブラリと同様に行った。単一ノックアウト株の遺伝子編集を検証するために、単一ノックアウト株及び W T M C C - 3 0 1 の両方からゲノム DNA を抽出した。次いで、ゲノム DNA を P C R のテンプレートとして使用し、プライマーを推定 s g R N A 結合部位に隣接させるように設計した。P C R 生成物を精製し、S a n g e r を E t o n B i o s c i e n c e s で配列決定した。次いで、W T M C C - 3 0 1 を参照として、編集した細胞のパーセントを、T I D E ⁴⁹ によって決定した。上述のように(方法: フローサイトメトリーを参照のこと)、単一ノックアウト株については P E コンジュゲート H L A - A B C (W 6 / 3 2) 抗体 (B i o L e g e n d # 3 1 1 4 0 6)、又は二重ノックアウト株については A F 6 4 7 コンジュゲート H L A - A B C (W 6 / 3 2) 抗体 (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y # s c 2 4 6 3 7) のいずれかを使用して、フローサイトメトリーを行った。

【0708】

t. ウェスタンブロット分析

簡潔に述べると、非標的化対照である P C G F 1、B C O R L 1、又は U S P 7 に対して、100 万個の M C C - 3 0 1 細胞を単一のレンチウイルス構築物で形質導入した。形

10

20

30

40

50

質導入の2日後、細胞を0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のピューロマイシン処理で3日間選択に供した。IFN- γ 処理の場合、MCC-301細胞株を、ウェスタンブロット分析のために採取する前に、示された用量のIFN- γ で24時間処理した。細胞を遠心分離によって収集し、PBSで洗浄し、プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤(Millipore)、並びに2-メルカプトエタノール(Bio-Rad)を補充したEBC緩衝液(50 mMのTris-HCl、200 mMのNaCl、0.5%のNP-40、0.5 mMのEDTA)で溶解して、全細胞抽出物を得た。細胞抽出物を、遠心分離によって明らかにした。各試料のタンパク質含有量を、BioRad Bradfordアッセイを使用して、6 $\times$ Laemmli緩衝液(Boston bioproducts)を添加し、試料を95 $^{\circ}\text{C}$ で5分間沸騰させた後に決定した。分析のために4~20%勾配ゲル(Bio-Rad)を実行し、タンパク質を0.2 μm のニトロセルロース膜(Bio-Rad)に移した。膜をTBST中の5%乳を使用して、室温で1時間遮断し、続いて製造業者の使用に従ってTBST中の5%乳中、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩希釈した適切な一次抗体[USP7 (Life Technologies #PA534911)、PCGF1 (E8, Santa Cruz Biotechnology #SC-515371)、TAP1 (Cell Signaling Technology #12341S)、TAP2 (Cell Signaling Technology #12259S)、p53 (Santa Cruz Biotechnology #SC-126)、汎MYC (Abcam #ab195207)、Vinculin (Sigma #V9131)、TBP (Cell Signaling Technology #8515S)]でインキュベートした。翌日、膜をTBSTで3回洗浄し、TBST中の1%乳中、室温1時間希釈した適切な二次抗体(Bethyl、ヤギ抗マウス #A90-116P又はヤギ抗ウサギ #A120-101P)とインキュベートした。膜をTBSTで3回洗浄し、Immobilon Western Chemiluminescent (Millipore) HRP基質と短時間インキュベートした後、G-boxイメージングシステム(Syngene)上のシグナルを視覚化した。生のウェスタンブロット画像を、ImageJソフトウェアを使用して視覚化のために処理した。

10

20

30

40

50

【0709】

u. MKL-1 shMYCL及びWaGa shST/LT RNA-seq、並びにフローサイトメトリー

レンチウイルスPLKOベクター(shScr)から構成的に発現されるスクランブルshRNAは、以前に報告されている(Addgene #1864)。MYCL及びEP400 shRNA標的配列は、Block-iT RNAi Designer (Life Technologies)を使用して設計した。MYCL標的-GACCAA GAGGAAGAATCACAA、shEP400-2標的-GCTGCGAAGAAG CTCGTTAGA、shEP400-3標的-GGAGCAGCTTACACCAAT TGA。shScr、shMYCL、shEP400-2、及びshEP400-3()のアニーリングされた順方向及び逆方向オリゴを、ドキシサイクリン誘導性shRNAベクターTet-pLKO-puro(Dmitri Wiederschain, Addgene #21915からの贈り物)のAgeI/EcoRI部位間でクローニングした。293T細胞は、Tet-PLKO-puroプラスミド+psPAX2パッケージ及びVSV-Gエンベローププラスミド(Addgene #12260及び#12259)でトランスフェクトされ、MKL-1細胞形質導入のためのレンチウイルス粒子を生成した。形質導入されたMKL-1細胞を、1 μg のピューロマイシンで4日間選択して、Dox誘導性MKL-1 shScr、shMYCL、shEP400-2、及びshEP400-3株を生成した。Dox誘導性WaGa shST/LT株は、Roland Houbenからの贈り物であった。

【0710】

RNA-seqについて、細胞を以下のようにDOXで処理した。MKL-1 shMYCL及びshScr-2日間のDox、MKL-1 shEP400-2、-3及びs

hScr-6日間のDox、Doxの有無にかかわらずWaGa-shST/LT細胞-6日間。全RNAを、RNeasy Plusミニキット (Qiagen) を使用して抽出した。mRNAを、NEB-Next Poly (A) mRNA磁気単離モジュール (New England Biolabs) で単離した。配列決定ライブラリを、Illumina (New England Biolabs) のためのNEBNext mRNAライブラリプレップマスターミックスセットで調製し、Qubit、Bioanalyzer、及びqPCR QC分析を通過させた。Illumina HiSeq 2000システムで、50サイクルのシングルエンド配列決定を行った。読み取りをTOPHATによってhg19ゲノムにマッピングした。HTSeqを使用して、遺伝子名を含むカウントファイルを作成した。RパッケージDESeq2を使用して、カウントを正規化し、100万当たりの総読み取り数 (TPM) を計算し、遺伝子発現の差を決定した。示差的に発現した遺伝子のMAプロットを検査することによって、品質管理を行った。RNA-seqデータは、受入番号GSE69878を有するGene Expression Omnibusから入手可能である。GSEA分析の場合、DESeq2からのLFC値に基づいて遺伝子をランク付けした。次いで、これらのランク付けされたリストを、GSEAPreranked (濃縮統計-重み付け、最大遺伝子セットサイズ-500、最小遺伝子セットサイズ-15) の入力として使用した。

10

【0711】

フローサイトメトリーの場合、shMYCL及びshScr-MKL-1細胞を0.2 µg/mLのドキシサイクリンで7日間処理し、ドキシサイクリン含有培地で3日ごとに更新した。加えて、構成的に発現した (Addgene、#17486) shRNA耐性MYCL (shMYCL+MYCL) 構築物を含有するshMYCL細胞を同一に処理した。単一細胞懸濁液を、Versene (Gibco 15040066) での処理を介して非酵素的に調製した。細胞をヒトTrue-Stain FcX (BioLegend #422302) とインキュベートし、続いてAlexa Fluor 647にコンジュゲートした抗HLA-A/B/C抗体 (SCBT、#32235) 又はアイソタイプマッチIgG対照 (SCBT、#24637) で染色した。染色した細胞を100 µmフィルターに通し、フローサイトメトリー (BD、LSR Fortessa) を介して蛍光を測定した。FSC-H/FSC-Aの判別を利用して単一細胞を選択し、Alexa Fluor 647蛍光の幾何平均を単一細胞集団から計算した。

20

30

40

50

【表 17-1】

オリゴ

オリゴ名	配列	注記
BCORL1-1 fwd	CACCGTCCCGCATCTGACAGCGCCG	ガイド RNA クローニングのためのオリゴ
BCORL1-1 rev	AAACCGGCGCTGTCAGATGCGGGAC	ガイド RNA クローニングのためのオリゴ
BCORL1-2 fwd	CACCGGGAGGCGGGATATATACCAG	ガイド RNA クローニングのためのオリゴ
BCORL1-2 rev	AAACCTGGTATATATCCCGCCTCCC	ガイド RNA クローニングのためのオリゴ
USP7-1 fwd	CACCGTTGATGACGACGTGGTGTCA	ガイド RNA クローニングのためのオリゴ
USP7-1 rev	AAACTGACACCACGTCGTCATCAAC	ガイド RNA クローニングのためのオリゴ
USP7-2 fwd	CACCGGGCAGTAGAACAGCTCGATG	ガイド RNA クローニングのためのオリゴ
USP7-2 rev	AAACCATCGAGCTGTTCTACTGCCC	ガイド RNA クローニングのためのオリゴ
PCGF1-1 fwd	CACCGCCACGAAGTAGCCGGCGCAT	ガイド RNA クローニングのためのオリゴ

10

20

30

40

50

【表 17-2】

PCGF1-1 rev	AAACATGCGCCGGCTACTTCGTGGC	ガイド RNA クローニングのためのオリゴ
PCGF1-2 fwd	CACCGGCTCATCATAGCGATAGTAG	ガイド RNA クローニングのためのオリゴ
PCGF1-2 rev	AAACCTACTATCGCTATGATGAGCC	ガイド RNA クローニングのためのオリゴ
CTRL-1 fwd	CACCGTGCGGCGTAATGCTTGAAAG	ガイド RNA クローニングのためのオリゴ
CTRL-1 rev	AAACCTTTCAAGCATTACGCCGCAC	ガイド RNA クローニングのためのオリゴ
CTRL-2 fwd	CACCGGGATTAATTCGCTAAATGAT	ガイド RNA クローニングのためのオリゴ
CTRL-2 rev	AAACATCATTTAGCGAATTAATCCC	ガイド RNA クローニングのためのオリゴ
shMYCL fwd	CCGGACCAAGAGGAAGAATCACAAAT CAAGAGTTGTGATTCTTCCTCTTGGT CTTTT	shRNA のためのオリゴ
shMYCL rev	AATTAAAAAGACCAAGAGGAAGAAT CACAACTCTTGATTGTGATTCTTCCTC TTGG	shRNA のためのオリゴ
shEP400-2 fwd	ccggCTGCGAAGAAGCTCGTTAGATCA AGAGTCTAACGAGCTTCTTCGCAGCttt tt	shRNA のためのオリゴ
shEP400-2 rev	aattAAAAAGCTGCGAAGAAGCTCGTT AGACTCTTGATCTAACGAGCTTCTTC GCAG	shRNA のためのオリゴ
shEP400-3 fwd	ccggAGCAGCTTACACCAATTGAtcaaga gTCAATTGGTGTAAAGCTGCTCctttt	shRNA のためのオリゴ
shEP400-3 rev	aattAAAAAGGAGCAGCTTACACCAAT TGACTCTTGATCAATTGGTGTAAAGCT GCT	shRNA のためのオリゴ
LentiCRISPRv2 配 列決定プライマー	GATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATT	該当なし
USP7 ChIP fwd	CCAACGACCAACTCCCTAAAT	ChIP-qPCR プライマー
USP7 ChIP rev	AAGGCACTGTAGTTTGAGGTATAG	ChIP-qPCR プライマー
PCGF1 ChIP fwd	TCGCCTCCTTCATCACAATA	ChIP-qPCR プライマー

10

20

30

40

【表 17-3】

PCGF1 ChIP rev	CGAGTCCACGTGAGGGAA	ChIP-qPCR プライマー
Intergenic ChIP fwd	CTTCTTCCTTCCGGCTTTCT	ChIP-qPCR プライマー
Intergenic ChIP rev	AGCTGGGAGAGGACACACAC	ChIP-qPCR プライマー

【0712】

v. ChIP-seq 及び ChIP-qPCR

MAX、EP400、ST、H3K4me3、及び H3K27ac の ChIP-seq

50

データを生成した。ChIP-qPCRについては、UCSCゲノムブラウザ（）に示されるChIP-seqデータに基づいてPrimerQuest (IdtDNA) を使用して、以下のプライマーを設計した。以下の指示マニュアルに従って、AriaMx Real-time PCRシステム (Agilent) 上でBrilliant III 超高速SYBR緑色qPCRマスターミックス (Agilent) を使用して、qPCRを行った。

【0713】

w. MCC腫瘍RNA-seqコホート

DFCIで52人の患者から腫瘍生検を収集し、RNALater (Sigma-Aldrich) の添加を介したRNA単離のために保存した。保存された組織をTissue Ruptor (QIAGEN) を介して均質化し、RNAをAllPrep DNA/RNAミニキット (QIAGEN) を介して採取した。RNAは、IlluminaのためのNEBNext Ultra II RNA Library Prepキット (NEB) を利用したライブラリ構築に提出した。NovaSeq 6000システム上で各方向に150サイクル (Novogene)、ペアエンド配列決定を行った。生のペアエンド配列決定データを、FastQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) を介して品質について広く評価した。品質管理を通過した試料は、GRCh38.p13ゲノムアセンブリのためにEnsembl遺伝子注釈を利用して、Salmonを介して転写物レベルに定量した。正規化された遺伝子レベルのカウントを、TxImport及びDESeq2で調製した。ウイルス陽性又はウイルス陰性試料を特定するために、ペアエンド読み取りをBWAを介してMCPyVゲノム (R17b単離物) にマッピングし、MCPyV特異的読み取り (>100) を含有するそれらの試料をウイルス陽性とみなした。RNA-seqヒートマップについて、log₂の正規化された遺伝子レベルのカウントのzスコアを計算した。1つの腫瘍試料は、この試料で分析した18個の遺伝子のうち7個において、zスコアが>3.5又は<-3.5であったため、その後、外れ値として廃棄された (比較のために、他の全ての試料における18個の遺伝子全てのzスコアの範囲は、-3.45~2.47であった)。その後、残りの51個の腫瘍試料をユークリッド距離によってクラスターリングして、RNA-seqヒートマップを生成した。腫瘍純度は、ESTIMATE Rパッケージを使用して決定した。腫瘍純度パーセンテージは、公開されているように、等式： $\cos(0.6049872018 + 0.0001467884 \times \text{ESTIMATE スコア})$ を使用して、ESTIMATEスコアから計算した。

【0714】

x. PCGF1-KO RNA-seq及びウエスタンブロット

RNAを、MCC-301 PCGF1-KO #2株 (2番目に高いスコアリングガイドRNA) 及び非標的化sgRNA対照及びCas9で形質導入したMCC-301株の3つの技術的複製から抽出した。「RNA配列決定及び分析」で上述したように、試料の調製及び配列決定を行った。その後、生のFASTQファイルを、FastQC (Babraham Institute) を介して配列決定の質について広く評価し、通過した質のものを更なる分析に使用した。サーモンを使用して、生の読み取りを、以下の規定を伴うGRCh38.p13.v99 (Ensembl) のデコイ感知トランスクリプトームにマッピングした：--writeUnmappedNames、--seqBias、--gcBias、--validateMappings。生の転写物レベルのカウントを、TxImportを介して遺伝子レベルのカウントに変換し、DESeq2を使用して示差遺伝子発現分析を行った。

【0715】

TAP1ウエスタンブロットについては、MKL-1細胞においてIFN-γ滴定を最初に行い (図4Q)、TAP1発現が検出可能となったIFN-γ範囲を決定した。その後、MCC-301 PCGF1-KO及び対照sgRNA株におけるTAP1ウエスタンブロットに、0、100、及び1,000 U/mLのIFN-γ濃度を使用した。

【0716】

y. 細胞周期分析

100万個のMKL-1対照又はp53 KO細胞を播種し、DMSO、XL177A (100nM) 又はXL177B (100nM) で3日間処理した。3日間の処理の最後の1時間の間に、細胞を10 μ MのEdUヌクレオチドでパルスした。細胞を遠心分離によって収集し、Accutase (商標) (Stem Cell Technologies) で処理して塊を分解し、PBSで洗浄し、PBS中の4%ホルムアルデヒド溶液を使用して室温で15分間固定した。細胞をPBS中の1% BSAで洗浄し、70%氷冷エタノール中に再懸濁し、追加の固定及び透過化のために-20℃で一晩インキュベートした。細胞を、データを取得する日まで-20℃で70%エタノールに保存した。データ取得日に、遠心分離によって細胞を収集し、PBSで2回洗浄した。細胞中に組み込まれたEdUを、30分間ロッキングしながら、室温でCLICK反応カクテル (PBS中1mMのCuSO₄、100 μ MのTHPTA、100mMのアスコルビン酸ナトリウム、及び2.2 μ MのAlexa 647アジド) で標識した。次いで、試料をPBS中の1% BSAで1回洗浄し、続いてPBSで2回洗浄し、1 μ g/mlのDAPI、100ng/mlのRNase A溶液により室温で1時間インキュベートして、DNAを染色した。次いで、試料をストレーナチューブに通し、BD Fortessa分析器を使用して分析した。フローサイトメトリーデータFlowJoソフトウェアを使用して分析した。各細胞サイクル相における細胞のパーセンテージを、GraphPad PRISMソフトウェアを使用して表した。

10

20

【0717】

z. USP7阻害剤実験

MCC-301 USP7阻害剤実験のために、250万個のMCC細胞をT25フラスコに播種し、USP7阻害剤XL177A及び対照鏡像異性体XL177Bとともに10 μ M、1 μ M、100nM、及び10nMでインキュベートした。細胞を3~4日間インキュベートした。インキュベーション後、100万個の細胞をVersene (Gibco) で処理して、細胞クラスターを解離した。表面Fc受容体を、5 μ LのヒトTruStain FcX (Biolegend #422302) で遮断した。表面HLA-Iを5 μ LのPan HLAクラス I抗体 (クローンW6/32、Santa Cruz Biotechnologies) で30分間、4℃の暗所で染色した。細胞をPBSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒド固定緩衝液 (Biolegend) で固定した。細胞を、BD LSRFortessa上で分析した。MCC-301データは、4つの独立した実験の代表である。統計分析を行うために、各細胞株について、最初に、DMSO群及び全ての実験群のMFIに対して一元配置分散分析を行った。次いで、各濃度について個々のウェルチt検定を行い、XL177AとXL177Bとの間のMFI (阻害剤) / 平均MFI (DMSO対照) の倍率変化を比較した。

30

40

【0718】

MKL-1 USP7阻害剤の実験の場合、p53-WT対照株 (WT、スクランブル、AAVS1) 及び3つのp53-KO株をUSP7阻害剤で処理し、MCC-301について上述したように、表面HLA Iについてフローサイトメトリーによって評価した。対照株とp53-KO株との間では、二乗平均平方根誤差がかなり異なっていたため (12.2894及び6.69844)、2つの群を二元配置分散分析によって別々に分析し、薬物治療は、両方の症例においてMFIの変動の統計的に有意なソースであることがわかった (対照ではP=0.0003及びp53-KO株ではP<0.0001)。分散分析は、XL177A、XL177B、及びDMSO処理間の事後Tukeyの多重比較検定を行い、図6Hに示されるp値を生成した。

【0719】

aa. 依存性マップの相関関係

DepMap 20Q2 CRISPR依存性データは、www.depmap.org/portal/downloadからダウンロードした。少なくとも1つのコード変

50

異の基準に基づいて、DepMapポータル上のCell-Line Selector ツールを使用して、TP53変異状態を割り当てた。ピアソン係数を、R中のtest.corを使用して計算し、この関数によって出力された両側p値を、p.adjustを使用してFDRに変換した。ggplot2、tidyverse、gridExtra、cowplot、及びスケールを使用して、プロットを生成した。GSEAは、ピアソン相関が負の場合、 $-\log(p\text{-val})$ に (-1) を乗じてランク付けされた遺伝子リストを使用して行った。

【0720】

定量化及び統計分析

全てのフローサイトメトリー棒グラフは、1つの試料を示す図1J及び図1Nを除いて、3つの技術的又は生物学的複製の平均蛍光強度を示す。特に断りのない限り、エラーバーは、標準偏差を示す。全ての実験において、0.05のP値を有意性閾値として使用した。各図で使用される特定の統計検定は、図の凡例及び／又は方法の節で言及されている。

【0721】

全ての統計分析の詳細とともに、バージョン番号を含む特定のソフトウェアは、上記のそれぞれの方法の節に列挙されている。研究の一部として、ランダム化手順又は試料サイズの計算は実行されなかった。全エクソーム配列決定分析、RNA-seq分析、MCPyVウイルス転写物検出、及びWGBSプロモーターシグナル抽出のための特定のパラメータ設定を含む全ての分析コードは、www.github.com/kdkorthauer/MCCのMITライセンス下でGitHubリポジトリで利用可能になる。Rにおける全ての解析は、バージョン3.6.2を使用して実行した。

【0722】

実施例11：一次患者試料からのMCC細胞株の確実な生成

多くの確立されたMCC株は、インビトロで多重継代され、関連するアーカイブ原発腫瘍材料が欠如しているため、MCC株を生成するための信頼できるアプローチが確立された。MCCは、典型的にはRPMI-1640培地で培養されるが、MCCの神経内分泌組織学及び神経幹細胞培地によるMCC株の生成に成功した以前の報告に基づいて、以前に膠芽腫細胞株を確立するために使用された神経幹細胞培地が細胞株の確立を促進すると仮定した。試験した5つの培地製剤のうち、成長因子補充を有するNeuroCult NS-A増殖培地は、インビトロでの成長率が一貫して最も高く、培養7日後に細胞数が3倍になり（図1A）、複数のMCC腫瘍細胞株の確実な成長を促進した（図1P）。この方法を使用して、生検（ $n=4$ ）又は患者由来異種移植片（PDX）材料（ $n=7$ ）から11の安定した細胞株を確立した（表6）。確立された古典的MCC株と一致して、これらの株は、MCC-320におけるCK20陰性度を除いて、ほとんどが懸濁液中の密なクラスター中で増殖し、MCCマーカーSOX2及びCK20について染色陽性となった（図1B、図1C）。11個の株のうち7個の株（63.6%）が、ViroPanelを使用してMCPyV+であることが決定された（図1D）。

【0723】

一致した細胞株及び生殖系列DNAが利用可能であった11人の患者のうち7人からの腫瘍DNAに対して、全エクソーム配列決定（WES）を行った（表11）。MCPyV-（ $n=2$ ）及びMCPyV+（ $n=5$ ）試料は、それぞれ、予想されるように、コントラストの高い（細胞株当たりの非サイレントコード変異の中央値647、範囲354～940）及び低い（中央値40、範囲18～73）TMB（図1E、表11）を示した。分析した2つのMCPyV-株は、以前の研究と一致するRB1及びTP53（表11）における変異を含有した。対応する腫瘍又はPDX試料において、94.4%の細胞株変異の中央値が検出され（51～100%の範囲）、腫瘍細胞株対は、変異プロファイルに基づいて互いに最も密接に関連付けられた（図1F）。注目すべきことに、いくつかのPDX由来の腫瘍試料（表6）は、マウス細胞汚染に関連するバリエーションに起因する可能性が高い、それらの対応する細胞株（図1E）よりも高い変異負荷を示した。利用可能なマッ

10

20

30

40

50

チした腫瘍及び細胞株対の対応するRNA配列決定（RNA-seq）（表1）は、全てのMCPyV+試料中でMCPyV ST及びLT抗原転写物を検出した（図1G、図1D）。これらのトランスクリプトームの無監督階層クラスタリングによって、各細胞株は、試料の種類によるクラスタリングではなく、対応する親腫瘍と最も密接に関連付けられ（平均ペアワイズスピアマン相関0.92）（図1G、図1H）、これらの細胞株がそれらの親腫瘍を忠実に再現することを確認する。

【表18-1】

表11a：Omic sデータの要約

患者	腫瘍及び細胞株 WES	細胞株 WGS	腫瘍 RNA-seq	細胞株+/- IFN:RNA-seq	細胞株+/- IFN:全リン酸プロテオーム	ATAC-seq	WGBS	腫瘍:HLA ペプチドーム	細胞株+/- IFN:HLA ペプチドーム
277	X	X	X	X	X	X	X	X	X
282		X	X	X		X	X		
290		X	X	X	X	X	X	X	X
301	X	X	X	X	X	X	X		X
320	X	X		X		X	X		
336	X	X	X	X		X	X		
350	X	X	X	X	X	X	X		
358			X	X					

【表18-2】

367	X	X	X	X		X	X		X
383				X					
2314	X	X	X	X		X	X		

10

20

30

40

50

【表 19 - 1】

表 11b : HLA1 及び INF 変異

Start_Position	End_Position	Variant_Classification	Reference_Allele	Tumor_Seq_Allele1	Tumor_Seq_Allele2	HGVSc	HGVSp_Short	Transcript_ID	PolyPhen
99812397	99812397	Missense_Mutation	T	T	C	c.212A>G	p.D71G	ENST00000505992	possibly_damaging(0.86)
99812415	99812415	Missense_Mutation	T	T	G	c.194A>C	p.K65T	ENST00000505992	良性(0.009)
8662559	8662559	Missense_Mutation	A	A	T	c.922T>A	p.F308I	ENST00000402157	probably_damaging(0.942)
32609998	32609998	Nonsense_Mutation	G	G	A	c.581G>A	p.W194*	ENST00000343139	
32480240	32480240	Missense_Mutation	T	T	A	c.1751A>T	p.Q584L	ENST00000379883	良性(0.28)
5626619	5626619	Missense_Mutation	G	G	A	c.656G>A	p.R219Q	ENST00000380097	possibly_damaging(0.535)
21503317	21503317	5'UTR	G	G	A	c.-558C>T		ENST00000602326	
89845947	89845947	Missense_Mutation	A	A	T	c.628A>T	p.N210Y	ENST00000370456	良性(0.012)
37350366	37350370	Splice_Site	GCCTT	GCCTT	-	c.724-3_725del	p.X242_splice	ENST00000231498	
21216761	21216765	Frame_Shift_Del	GCAAG	GCAAG	-	c.540_544del	p.N180Kfs*17	ENST00000380216	
134038378	134038378	Missense_Mutation	G	G	T	c.2541G>T	p.R847S	ENST00000359428	良性(0.085)
104414446	104414447	Frame_Shift_Ins	-	-	GA	c.611_612dup	p.Q205Sfs*22	ENST00000302424	
113143670	113143670	Intron	T	T	C	c.2603+1072T>C		ENST00000524665	

10

20

30

40

50

【表 19 - 2】

113143673	113143673	Intron	G	G	A	c.2603+10 75G>A		ENST000005 24665	
114948093	114948103	Frame_Shift_Del	CGCAGC ACAAG	CGCAGC ACAAG	-	c.2697_270 7del	p.L900K fs*17	ENST000003 58465	
57545433	57545433	Missense_Mutation	A	A	G	c.1532A>G	p.N511S	ENST000003 11180	良性(0.005)
75579353	75579353	Missense_Mutation	A	A	G	c.1204T>C	p.S402P	ENST000003 22680	良性(0)
75579373	75579373	Missense_Mutation	G	G	A	c.1184C>T	p.S395L	ENST000003 22680	良性(0)
122176613	122176613	Intron	T	T	C	c.432+345 8A>G		ENST000003 44337	
154570945	154570945	Missense_Mutation	G	G	A	c.1718C>T	p.A573V	ENST000003 68474	probably_damaging(0.985)
10354319	10354319	Missense_Mutation	C	C	T	c.260G>A	p.R87K	ENST000003 50697	良性(0)
13367344	13367344	Missense_Mutation	G	G	A	c.4595C>T	p.S1532 F	ENST000002 54508	良性(0.065)
13419064	13419064	Splice_Site	T	T	C	c.1046- 2A>G	p.X349_ splice	ENST000002 54508	
29692923	29692924	Missense_Mutation	GG	GG	AA	c.726_727d elinsAA	p.E243K	ENST000002 59951	
6477826	6477826	Missense_Mutation	G	G	A	c.1130C>T	p.P377L	ENST000005 25074	良性(0.005)
8642077	8642078	Missense_Mutation	GG	GG	AA	c.3146_314 7delinsTT	p.P1049 L	ENST000004 02157	良性(0.283)
16593520	16593520	Missense_Mutation	G	G	T	c.755C>A	p.P252Q	ENST000002 69881	良性(0.001)
29856334	29856336	RNA	AGG	AGG	-	n.620_622 del		ENST000003 83326	
7481061	7481061	Intron	C	C	T	c.906+37C >T		ENST000002 93831	
120008206	120008227	Frame_Shift_Del	GCCGAT GCAGGA GTCGCA CAGC	GCCGAT GCAGGA GTCGCA CAGC	-	c.513_534d el	p.L172Tf s*80	ENST000003 41846	

【表 19 - 3】

68445929	68445929	Missense_Mutation	A	A	C	c.830A>C	p.N277T	ENST000002 49636	良性(0.005)

10

20

30

40

50

【表 20-1】

表 11c : 検索されたHLA 1 及びINF 遺伝子のリスト

HLA クラス I 遺伝子	インターフェロン経路 (リアクトーム)	インターフェロン経路 (リアクトーム)	インターフェロン経路 (リアクトーム)	インターフェロン経路 (リアクトーム)	インターフェロン経路 (リアクトーム)	インターフェロン経路 (リアクトーム)
HLA-A	AAAS	FLNB	ICAM1	IFNG	MX1	OAS2
HLA-B	ABCE1	GBP1	IFI27	IFNGR1	MX2	OAS3
HLA-C	ADAR	GBP2	IFI30	IFNGR2	NCAM1	OASL
B2M	ARIH1	GBP3	IFI35	IP6K2	NDC1	PDE12
TAP1	B2M	GBP4	IFI6	IRF1	NEDD4	PIAS1
TAP2	BST2	GBP5	IFIT1	IRF2	NUP107	PIN1
TAPBP	CAMK2A	GBP6	IFIT2	IRF3	NUP133	PLCG1
PSMB8	CAMK2B	GBP7	IFIT3	IRF4	NUP153	PML
PSMB9	CAMK2D	HERC5	IFITM1	IRF5	NUP155	POM121
NLRC5	CAMK2G	HLA-A	IFITM2	IRF6	NUP160	POM121C
TAPBPL	CD44	HLA-B	IFITM3	IRF7	NUP188	PPM1B
ERAP1	CIITA	HLA-C	IFNA1	IRF8	NUP205	PRKCD
ERAP2	DDX58	HLA-DPA1	IFNA10	IRF9	NUP210	PSMB8
CIITA	EGR1	HLA-DPB1	IFNA13	ISG15	NUP214	PTAFR
CALR	EIF2AK2	HLA-DQA1	IFNA14	ISG20	NUP35	PTPN1
CANX	EIF4A1	HLA-DQA2	IFNA16	JAK1	NUP37	PTPN11
PDIA3	EIF4A2	HLA-DQB1	IFNA17	JAK2	NUP42	PTPN2
CREB1	EIF4A3	HLA-DQB2	IFNA2	KPNA1	NUP43	PTPN6
HLA-E	EIF4E	HLA-DRA	IFNA21	KPNA2	NUP50	RAE1
HLA-F	EIF4E2	HLA-DRB1	IFNA4	KPNA3	NUP54	RANBP2
HLA-G	EIF4E3	HLA-DRB3	IFNA5	KPNA4	NUP58	RNASEL
NFYA	EIF4G1	HLA-DRB4	IFNA6	KPNA5	NUP62	RPS27A
NFYB	EIF4G2	HLA-DRB5	IFNA7	KPNA7	NUP85	RSAD2
NFYC	EIF4G3	HLA-E	IFNA8	KPNB1	NUP88	SAMHD1
RFX5	FCGR1A	HLA-F	IFNAR1	MAPK3	NUP93	SEC13

【表 20-2】

RFXANK	FCGR1B	HLA-G	IFNAR2	MID1	NUP98	SEH1L
RFXAP	FLNA	HLA-H	IFNB1	MT2A	OAS1	SOCS1

10

20

30

40

50

【表 2 1】

インターフェ ロン経路 (リアクトーム)	インターフェロ ン経路 (リアクトーム)
SOCS3	TRIM8
SP100	TYK2
STAT1	UBA52
STAT2	UBA7
SUMO1	UBB
TPR	UBC
TRIM10	UBE2E1
TRIM14	UBE2L6
TRIM17	UBE2N
TRIM2	USP18
TRIM21	USP41
TRIM22	VCAM1
TRIM25	XAF1
TRIM26	
TRIM29	
TRIM3	
TRIM31	
TRIM34	
TRIM35	
TRIM38	
TRIM45	
TRIM46	
TRIM48	
TRIM5	
TRIM6	
TRIM62	
TRIM68	

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表 1 1 d : プロモーターメチル化データ

	遺伝子								
試料		MCC-282	MCC-290	MCC-301	MCC-320	MCC-336	MCC-350	MCC-367	MCC-2314
ウイル ス状態		陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陽性
IFN 応答 性		IFN-応答 性	IFN-応答 性	IFN-応答 性	IFN-応答 性	非 IFN-応答 性	非 IFN-応答 性	IFN-応答 性	IFN-応答 性
	HLA-A	0.153	0.362	0.149	0.579	0.276	0.141	0.236	0.129
	HLA-B	0.19	0.172	0.149	0.202	0.149	0.135	0.116	0.24
	HLA-C	0.192	0.199	0.188	0.234	0.113	0.168	0.127	0.191
	B2M	0.221	0.325	0.188	0.4	0.257	0.301	0.151	0.21
	TAP1	0.467	0.44	0.497	0.491	0.491	0.416	0.404	0.525
	TAP2	0.577	0.667	0.689	0.676	0.65	0.553	0.597	0.655
	TAPBP	0.268	0.517	0.267	0.534	0.56	0.429	0.135	0.39
	PSMB8	0.313	0.359	0.346	0.351	0.394	0.339	0.253	0.411
	PSMB9	0.167	0.202	0.175	0.191	0.224	0.172	0.126	0.23
	NLRC5	0.785	0.776	0.839	0.824	0.785	0.651	0.727	0.842

10

20

【0 7 2 4】

1 1 個の M C C 株のうち 1 0 個は、フローサイトメトリーによって表面 H L A - I が顕著に低く、ほとんど存在しないことを示した（図 1 D）。この低表面 H L A - I は、十分に研究された M C P y V + 株 M K L - 1 及び W a G a と同様であった（図 1 L）。3 つの株（M C C - 3 3 6、- 3 5 0、- 3 5 8）は、I F N - γ 曝露後に H L A - I を有意に上方制御しなかったが（M F I の 1 . 1 5 倍以下の増加）、8 つの株は、2 . 5 倍以上の増加を示した（中央値 5 . 7、範囲 2 . 5 ~ 1 2 . 4）。更に、I F N - α - 2 b 及び I F N - β が H L A - I を上方制御することが 2 つの株で確認されたが（図 1 M）、I F N - γ はまた、M C C - 3 0 1 細胞株における H L A - D R 発現も上方制御した（図 1 N）。

30

【0 7 2 5】

これらの細胞株の結果は、9 つの対応する親腫瘍上の H L A - I 発現の免疫組織化学（I H C）特性評価と一致し、大部分（9 つのうちの 6 つ）は、1 5 % 未満の腫瘍細胞において H L A - I 陽性染色を示し（図 1 J；図 2 I）、並びに最小限の H L A クラス I I（図 1 R）を示した。腫瘍浸潤 C D 8 + T 細胞密度（中央値 5 6 . 6 細胞 / m m ²、範囲 0 ~ 1 0 3 1 . 8）は、M C C についての以前の報告と同等であった（図 1 S）。更に、連続ホルマリン固定パラフィン包埋（F F P E）腫瘍試料の入手可能性により、次いで、我々は、経時的な H L A - I 発現の変化を評価することができた。M C C - 2 9 0 を除く全ての細胞株は、治療後の腫瘍に由来し、最も一般的には放射線 ± シスプラチン / エトポシド（表 6）であり、治療前の試料は、6 人の患者に対して利用可能であった。6 例のうちの 5 例では、処理後標本は、対の処理前標本（図 1 O）よりも少ない H L A - I 陽性細胞を示し、治療抵抗性の機構としての H L A - I 損失を更に示唆した。

40

【0 7 2 6】

実施例 1 2 : M C C 株は、複数のクラス I 遺伝子の転写下方制御及び N L R C 5 改変を示す。

M C C 株における H L A - I 表面発現障害の機構を明らかにするために、材料が利用可

50

能であったMCPyV+及びMCPyV-株のサブセットの詳細なゲノム及び転写特性評価を行った(表11)。クラスI APMの転写改変を定義するために、IFN-γ刺激の前後の11個のMCC株全てのトランスクリプトームを評価した。ベースライン時に、MCC株は、それぞれMCPyV-及びMCPyV+MCCの起源細胞の候補である、対照表皮角質細胞及び真皮線維芽細胞と比較して、HLA-B、TAP1、TAP2、PSMB8、及びPSMB9の低い発現を示した(図2A)。IFN-γ処理は、クラスI遺伝子を顕著に上方制御し(図2B、表11)、この傾向は、4つのMCC株のマッチングしたプロテオームにおいて確認された(図2C)。非IFN-γ応答性株(図1J)は、MCC-336におけるIFN誘導HLA-A、-B、及び-C mRNAの上方制御の欠如(図2A)、並びにSTAT1リン酸化の欠如を含む、MCC-350におけるタンパク質レベルでのIFN誘導HLA-I及びIFN経路の上方制御の全体的欠如(図2C、図2D~E)などの可変欠陥を示した。

10

【0727】

バルクRNA-seqデータで観察されたHLA-I下方制御の不均一性を調べるために、2つの新鮮なMCC生検(MCC-350 [MCPyV-] 及びMCC-336 [MCPyV+])の高スループット、液滴ベースの単一細胞トランスクリプトーム配列決定を行った。2つの試料にわたって同定された合計15,808個の細胞(平均4231.9遺伝子/細胞)から、7つの異なる転写的に定義されたクラスターが検出された。CD45+免疫細胞は、クラスター6を含んでいたが、クラスター0~5は、SOX2、SYN、及びATOH1の発現によって特定されるMCC細胞であった(図2F、図2G)。全てのMCCクラスターは、ほぼ不在のHLA-B、TAP1/2、PSMB8/9、及びNLRC5発現並びに低HLA-A及び-C発現を示し(図2F、図2H)、バルクRNA-seqデータと一致した。対照的に、クラスター6(免疫細胞)は、HLA-A、-B、及び-C転写物の平均21倍高いレベルを示した。

20

【0728】

ベースライン時のクラスI遺伝子の顕著なRNAレベル及びタンパク質レベルの下方制御を考慮して、これらの観察の可能性のある遺伝的基盤を調べた。WESにより、MCC-320におけるHLA-F及び-H変異を除いて、クラスI APM遺伝子に顕著な変異を有するMCC株はなかった(表11)。全ての分析株にわたるIFN経路遺伝子で合計32個の変異が検出されたが、Polyphenによっておそらく損傷すると予測されたのは2個のみであり、IFNGR1/2、JAK1/2、STAT1、又はIRF1/2では変異は検出されなかった(表11)。しかしながら、NLRC5のコピー数損失は、分析した8つの株中5つ(62.5%)で検出された(図2I、表11)。NLRC5は、プロモーター内の保存されたS/X/Y領域に局在するいくつかのクラスI経路遺伝子の転写活性化因子である。NLRC5コピー数の損失は、最近、多くのがんにわたる一般的な改変として認識されている。

30

【0729】

実施例13: IFN-γ誘導HLA I上方制御は、HLAペプチドームのシフトに関連している。

HLA-Iの発現の低下は、MCCにおけるHLA提示ペプチドの数及び多様性の低下をもたらし、腫瘍の免疫原性に影響を与えることが予想される。実際に、液体クロマトグラフィータンデム質量分析(LC-MS/MS)(方法)によるクラスI結合ペプチドの直接検出のためのワークフローを使用して、汎HLA-I抗体を用いた腫瘍細胞溶解物の免疫沈降後(図3M)、親腫瘍及び細胞株におけるベースライン時の同様に低い総ペプチドカウントが検出された(図3A~B)。IFN-γ刺激後、免疫沈降のための同等の入力材料を使用して、7つの細胞株にわたってクラスI結合ペプチドの存在量の中央値12倍の増加を検出した(図3K、図3A~B、方法)。細胞株と親腫瘍との間のベースライン免疫ペプチドームアミノ酸シグネチャは、高度に相関しており(図3C)、細胞株ペプチドームは、対応する腫瘍ペプチドームとそれらのペプチドの50%超を共有していた(図3D)。対照的に、IFN-γ処理の前後の相関が低く、IFN-γ曝露による全体的

40

50

な結合モチーフの改変が観察された（図3 K及び3 E、図3 N）。これらの観察を更に調べるために、同定されたペプチドによって結合した最も可能性の高いHLA対立遺伝子を推測した。IFN- γ 処理の有無にかかわらず細胞株を比較すると、各HLA対立遺伝子にマッピングするペプチドの頻度に劇的な変化が観察され、最も顕著なのは、HLA-B提示ペプチドの増加であった（図3 F～G）。

【0730】

MCPyV+株について、IFN- γ 刺激に続くHLA-Iのこの上方制御が、MCPyV-特異的エピトープを提示する能力の増加をもたらすと仮定した。実際、MCPyV+株MCC-367について、LT抗原(TSDKAIELY)の起点結合ドメイン(OBD)に由来するペプチド配列が検出され、これは、その細胞株のHLA* A01:01対立遺伝子(ランク=0.018、HLAthena)の強力な結合剤として予測された（図3 J、方法）。このMCC-367由来エピトープに対する反応性は、ELISPOTアッセイによって自己T細胞によって確認され、このエピトープの免疫原性が実証された（図3 L）。

【0731】

実施例14：MCCにおけるHLA-Iの新規制御因子を同定するための相補的ゲノムスケール機能獲得及び喪失スクリーニング

複数のクラスI APM遺伝子の同時転写下方制御は、この抑制が上流制御因子によって調整されたことを示唆した。NLRC5コピー数減少は顕著な事象であったが、8つの株中5つ(62.5%)でしか観察されなかったため、他の制御因子の存在が疑われた。この目的のために、MCPyV+MCC-301株における対ゲノムスケールオープンリーディングフレーム(ORF)機能獲得及びCRISPR-Cas9ノックアウト(KO)機能喪失スクリーニングを生成して、MCCにおけるHLA-I表面発現の新規の制御因子を系統的に特定した。MCC-301株は、3つの理由で選択された。第一に、MCPyV+MCCの低TMBは、ウイルス抗原シグナル伝達又は細胞型特異的因子に関連し得るHLA-I抑制の均質な機構の可能性を増加させる。第二に、HLA-IのIFN- γ 媒介性誘導性は、HLA-Iの上方制御を禁止するであろうハードワイヤされたゲノム改変の可能性をほぼ排除する。最後に、かかるスクリーニングは、MCC-301(図1 P)などの堅牢な成長を有する細胞株を必要とする。

【0732】

MCC-301細胞を、ゲノムスケールORF又はCas9+sgRNAレンチウイルスライブラリ(Methods)を用いて低い多重度の感染で形質導入した。抗HLA-ABC抗体で細胞を染色した後、HLA-I-高集団及びHLA-I-低集団は、蛍光活性化細胞選別(FACS)に基づく細胞選別単離を受け、各スクリーニングは、3回行った(図4 A)。HLA-I-高集団とHLA-I-低集団の中央値log₂倍率変化(LFC)濃縮に従って構築物をランク付けし、CRISPRスクリーニングについては、sgRNAランキングを、STARSアルゴリズム(方法)を使用して遺伝子レベルのランキングに集計した。

【0733】

実施例15：ORFスクリーンを介してMCCにおけるHLA-I抑制の媒介因子として同定されたMYCL

ORFスクリーニングは、HLA-I-高集団とHLA-I-低集団では、4倍超の濃縮で75ヒットを生じた。予想されるように、これらのヒットは、遺伝子セット濃縮分析(GSEA)によって、IFN及びHLA-I経路遺伝子について高度に濃縮された(図4 D)。上位ヒットは、IFNGであり、IFN経路遺伝子は、上位12ヒットのうちの4つを占めた(33%)。HLA-B及び-Cは、#10及び#38にランク付けされた。注目すべきことに、ORFライブラリによる形質導入は、おそらくIFN遺伝子ORFで形質導入された細胞からのIFN分泌に起因して、HLA-Iの集団全体の増加をもたらした。GFP形質導入細胞は、表面HLA-Iの増加を示さなかったため、レンチウイルス形質導入によるものではなく、ORFライブラリ特異的効果が確認された(図4 C)

。更に、これらの顕著なヒットは、少なくとも2つの複製物の間で高い一致性を示したことが確認された（図4F-I）。

【0734】

多くの高度に濃縮されたポジティブヒットは、IFN又はHLA-I経路に直接関係しない上位のポジティブヒットに焦点を当てて、MCC-301において71個の単一ORF過剰発現株を生成することによって検証された。フローサイトメトリーによって、71個の候補ヒットのうち8個（11.3%）は、GFP対照と比較して2倍超の表面HLA-Iを上方制御したが、同時に、ポリコム関連遺伝子EZH1P（CXorf67）及びYY1（図4H）を含む形質導入後も生存率を維持した。更なる検証として、ORFをMCPyV+MCC-277株に形質導入し、HLA-Iのレベルの上昇を確認した（図4H）。HLA-Iのレベルを上昇させた遺伝子とは対照的に、MYCLは、上位のネガティブヒットであった（図4D）。MYCLは、MCPyV+MCCにおける重要な転写因子であり、STは、EP400クロマチン修飾因子複合体にMYCLを結合及び動員して、がん形成に必要な広範なエピジェネティック変化を引き起こす。検証として、MKL-1細胞におけるMYCLノックダウンは、スクランブルshRNA対照と比較して、フローサイトメトリーによる表面HLA-Iの増加をもたらしたことが観察され（ $P=0.003$ ）、この効果は、外因性MCLのレスキュー発現によって否定された（図4M）。

10

【0735】

MYCLがHLA-I表面発現にどのように影響するかを更に調べるために、MKL-1 MYCL shRNA株のRNA-seqを行った。スクランブルshRNA対照株と比較して、HLA-B、HLA-C、TAP1、及びPSMB9を含むクラスI遺伝子の発現において、GSEAによる抗原プロセッシング／提示のシグネチャのための濃縮で、2倍超の増加を観察した（ $q=0.04$ 、図4N、図5B）。STは、ST-EP400-MYCL複合体を介してMYCL機能に結合し、強化するため、ウイルス抗原不活性化もクラスIを上方制御する可能性があることが疑われた。これらの所見の範囲を更に拡大するために、別の確立されたMCPyV+MCC株であるWaGaを選択して、ST及びLTの共有エクソンを標的とするshRNAで形質導入し、両方のMCPyVウイルス抗原の不活性化をもたらした。HLA-B、HLA-C、及びNLRC5における1.5倍超の増加を含む、類似しているが、より控えめなクラスI遺伝子の上方制御が観察された（図4O）。更に、2つの異なるshRNAを有するMKL-1におけるEP400のノックダウンは、HLA-B及びHLA-Cの3倍超の増加をもたらした（図5J）。したがって、これらの所見は、MCCにおけるHLA-Iの下方制御におけるST-EP400-MYCL複合体成分の継続的な発現を暗示する。

20

30

【0736】

MYCLのHLA-I抑制効果がMCPyV-MCC及び他のがんに一般化したかどうかを判定するために、MCPyV-MCCにおけるMYCLのコピー数ステータスを評価した。MYCLを包含する染色体1pのコピー数獲得は、MCCにおけるより一般的なコピー数改変のうちの1つとして以前に報告された。4つのMCPyV-MCC株のうちの3つ（75%）は、MYCLコピー数の獲得（コピー数比1.16~1.56、図5E）を示し、MCPyV-MCCがウイルス抗原の不在下でMYCLシグナル伝達を増強し得る機構を示唆している。MYCLが他のがんにおけるHLA-I発現に関連しているかどうかを判定するために、Cancer Cell Line EncyclopediaからのRNA-seqデータを検索した。特に、HLA-I経路成分の発現が低い小細胞肺癌及び神経芽細胞腫などの他の神経内分泌がんもまた、それぞれMYCファミリーメンバーのMYCL及びMYCNの過剰発現を頻繁に特徴とした（図5F）。全体として、MYCLは、平均HLA-I遺伝子発現と負の相関を示した（ピアソン相関 $r=-0.33$ 、 $P=0.04$ ）。

40

【0737】

実施例16：CRISPR機能喪失スクリーニングによってMCCにおけるHLA-Iの

50

新規の負の制御因子として同定された PRC1.1 複合体

CRISPR-KOスクリーニングは、いくつかのクラス I APM 遺伝子も同定した。上位ネガティブヒットは、非結合 HLA-I と TAP との間の結合を容易にする部分的に折り畳まれた HLA-I 重鎖のためのシャペロンである TAPBP (図 4 E) であった。他の顕著なネガティブヒットとしては、IFN 経路遺伝子 IRF1 (#21) 及びクラス I 遺伝子 CALR (#84) 及び B2M (#141) が挙げられた。ORF スクリーニングで以前に MYCL を同定したところ、CRISPR ポジティブヒット内の他の STORMYCL-EP400 複合体メンバーには、BRD8 (#51)、DMAP1 (#93)、KAT5 (#619)、及び EP400 (#886) が含まれることが観察された。加えて、CRISPR ポジティブヒット内のポリコーム抑制複合体 1.1 (PRC1.1) のいくつかの構成要素が同定され、スクリーニングの上位 2 つのヒットが含まれた。USP7 (#1)、BCORL1 (#2)、及び PCGF1 (#50)。これらの遺伝子について、2 つの CRISPR 複製物間の高い一致性が観察され (図 4 F 及び I、方法)、4 つの sgRNA のうちの少なくとも 2 つについては、4.5 倍超の濃縮が観察された (図 4 G)。PRC1.1 は、CpG 島における H2AK119 のモノユビキチン化を通じて遺伝子発現をサイレンシングする非正準ポリコーム抑制複合体である。PRC1.1 の他の構成要素としては、KDM2B、SKP1、RING1A/B、RYBP/YAF2、及び BCOR (BCORL1 の代わりになり得る) が挙げられる。全体として、並列スクリーニングにわたる上位ヒットのレビューは、ポリコーム抑制複合体に関連するいくつかのヒットを明らかにした: PRC1.1 成分 USP7、BCORL1、及び PCGF1; ポリコーム抑制複合体 2 (PRC2) 及び YY1 の阻害剤である ORF ヒット EZHIP; 並びに PRC2 成分 EED 及び SUZ12 (CRISPR ポジティブヒット #162 及び #409)。

10

20

30

40

50

【0738】

PRC1.1 遺伝子 USP7、BCORL1、及び PCGF1 に対する一連の MCC-301 KO 株を生成した。非標的化 sgRNA 対照株と比較して、各遺伝子のノックアウトは、フローサイトメトリーによって評価されるように、ベースライン表面 HLA-I 発現レベルを増加させた (図 5 H)。PCGF1 ノックアウトは、IFN- γ 誘導 HLA-I 上方制御も同様に増加させた (図 4 P)。遺伝子編集及びタンパク質ノックアウトを、抗体が利用可能である遺伝子において、TIDE (図 4 L) を使用した Sanger 配列決定によって、及びウエスタンブロット (図 5 H) によって確認した。

【0739】

PRC1.1 機能の喪失に関連する特定のクラス I APM 遺伝子発現変化を定義するために、PCGF1 が PRC1.1 機能に不可欠であることを以前の研究が実証したため、MCC-301 における PCGF1-KO 株及び非標的化 sgRNA 対照株からの RNA-seq データを生成した。PCGF1-KO 株において上方制御された遺伝子は、標的遺伝子を抑制するために PRC2 と協調する PRC1.1 の既知の役割と一致する、「PRC2 標的遺伝子」シグネチャ (図 5 I) のために著しく濃縮された。顕著なことに、クラス I APM 遺伝子 TAP1、TAP2、及び PSMB8 の発現の 5 倍超の増加、並びにクラス I トランスアクトベーター NLRC5 のよりわずかな増加が認められた (図 5 I)。更なる確認のために、ベースライン時及び PCGF1-KO 株における IFN- γ 処理後の両方でウエスタンブロットによる TAP1 のタンパク質発現の増加が観察された (図 5 J)。51 個の MCC 腫瘍生検の RNA-seq コホートを評価して、HLA-I 遺伝子の発現と PRC1.1 との間の関連性を検討した。バルククラス I 発現の測定を混乱させ得る免疫細胞浸潤の可能性を説明するために、ESTIMATE⁵¹ を適用して、腫瘍純度 (純度中央値 87%、範囲 41~99%) を計算した。いくつかのクラス I 遺伝子と PRC1.1 成分 BCOR 及び KDM2B との間に負の相関が観察された ($P < 0.05$ 、図 5 G)。

【0740】

MYCL と PRC1.1 との間に関係があるかどうかを探索するために、MKL-1 細

胞内で以前に生成されたChIP-seqデータを分析した。ST-MYCL-EP400複合体の構成要素がPRC1.1遺伝子USP7及びPCGF1のプロモーターに結合しているが、BCOR又はBCORL1に結合していないことが観察された（図6A、図6B）。MAX及びEP400のUSP7及びPCGF1への結合を、ChIP-qPCRによって更に確認した（図6G）。これらの結果は、PRC1.1がMYCLの下流で作用し得ることを示す。更に、MYCL及びPRC1.1成分USP7の両方は、それぞれ、MCPyV-ST及びLTウイルス抗原と直接相互作用することが報告されているタンパク質をコードし、ウイルス抗原がMYCL及びPRC1.1を介して配位して、HLA-I表面発現を抑制し得るモデルを示唆している（図4K）。

【0741】

実施例17：USP7の薬理的阻害は、MCCにおけるHLA-Iを復元する

PRC1.1成分USP7の選択的低分子阻害剤が、以前に開発されている。しかしながら、USP7は、MDM2脱ユビキチン化によるp53の制御など多くの機能を有し、PRC1.1との関連が最近発見されたため、PRC1.1におけるUSP7の役割の程度が調査された。がん依存性マップを調べることにより、がん細胞株にわたるUSP7の生存依存性と相関する遺伝子が同定され、生存共依存性は、かかる遺伝子が同じ複合体又は経路内で機能し得ることを意味するという根拠が得られた。TP53野生型(WT)株は、USP7遺伝子とポリコム遺伝子との間に共依存性を示さなかったが、TP53変異体株は、USP7遺伝子とPRC1.1遺伝子PCGF1及びRING1との間に高い相関性を示した（それぞれ、6番目及び13番目に高い相関係数、 $FDR = 2.46 \times 10^{-4}$ 及び 2.97×10^{-3} ）（図6E）。更に、GSEA分析は、TP53変異体細胞株におけるUSP7共依存性遺伝子内で最も濃縮された遺伝子セットとして、ヒストンユビキチン化を明らかにした（図6F）。これらの結果は、USP7がPRC1.1機能において重要な役割を果たすという概念を更に支持する。

【0742】

強力で不可逆的なUSP7阻害剤であるXL177Aの活性を、500倍強力ではないが、より高い用量で標的上の活性を示すXL177Aのエナンチオマーである、XL177Bと比較した。2つのMCPyV+株（MCC-301及び-277）並びに2つのMCPyV-株（MCC-290及び-320）を、様々な阻害剤濃度で3日間処理した。100nMでは、2つのMCPyV+株において、DMSOと比較して、フローサイトメトリーによる表面HLA-Iの発現において、平均2.0倍（範囲1.78~2.27）の増加が観察された。MCPyV-株内では、MCC-290におけるHLA-Iレベルのより穏やかな増加が観察されたが、MCC-320では観察されなかった（図6D）。p53制御におけるUSP7の顕著な役割を考慮して、HLAに対するUSP7の効果がp53依存性であるかどうかを評価した。特に、MKL-1におけるTP53-KO及びTP53-WTの両方の株のXL177A処理は、XL177B及びDMSOと比較して表面HLA-Iを増加させた（図6H、図6K）。更に、USP7阻害は、SからG1相へのわずかな細胞周期シフトを誘導したが、この効果は、TP53-WT及びTP53-KOの両方の文脈で類似していた（図6L）。HLA-I提示に対するUSP7阻害の機能的結果を評価するために、XL177A及びXL177Bで処理したMCC-301細胞のHLA-I結合ペプチドームを分析した。XL177A処理細胞は、XL177B及び未処理細胞と比較して、より高い存在量の表示されたペプチドを示した（図6I）。3つの条件のうちの2つの間で存在量が有意に異なる（ $P < 0.05$ ）282個のペプチドのうち、270個（95.7%）は、未処理細胞と比較して、XL177Aにおいてより存在量が多かった。特に、XL177A処理は、それぞれのHLA-I遺伝子（HLA-A、-B、-C）上に表示されるペプチドの頻度に影響を与えなかった（図6J）。

【0743】

実施例18：考察

表面HLA-I損失は、がんにおける免疫回避の広範な機構であり、免疫療法への耐性を促進する。ウイルス駆動がんとして、MCPyV+MCCは、ウイルス抗原が正常な生

10

20

30

40

50

理学を破壊する機構を研究するための非常に有益な基質を提供する。出願人は、MCPyV ウイルス抗原が、MCPyV-MCC 腫瘍を含む他のがんにおいて表現型模写され得る制御機構の異常を通じて、クラス I 抗原提示も抑制することを疑った。HLA-I の制御因子に対する偏りのないゲノムスケールスクリーニングを通じて、MCPyV+MCC における ST-MYCL-EP400 複合体の一部として作用し、MCPyV-MCC において頻繁に増幅される MYCL が同定された。ST 抗原は、MYCL を EP400 複合体に動員して、MCC 発がんに必要な広範なエピジェネティック変化を引き起こし、本明細書の結果は、MYCL 活性による HLA-I の抑制における ST の新規の機能を特定する。HLA に対する MYC ファミリータンパク質の効果は、他のがんにも同様に一般化し、MYC 及び MYCN は、それぞれ、黒色腫及び神経芽細胞腫における HLA-I を抑制することができる。

10

【0744】

CRISPR スクリーニングにおける PRC1.1 の同定は、HLA-I を抑制するエピジェネティック制御機構の重要性を明確に確認する。PRC1.1 は、CpG 島内で H2AK119 をモノユビキチン化する非正準ポリコーム複合体であり、抑制性 H3K27 トリメチル化マークを沈着させる PRC2 の動員を促進する。PRC2 は、最近、白血病及びリンパ腫細胞株における独立した CRISPR スクリーニングを通じて、HLA-I リプレッサーとして同定され、この研究は、PRC1.1 との新規接続を確立する。これらのスクリーニングはまた、PCGF1 () を同定し、PRC2 サブユニットは、CRISPR スクリーニングで、PRC2 阻害剤 EZHIP は、ORF スクリーニングで同定した。

20

【0745】

HLA-I 喪失の拮抗は、有効な抗腫瘍細胞毒性 T 細胞応答にとって重要であり、臨床的に高い関心を持つ場合、HLA-I 上方制御薬は、チェックポイント遮断などの免疫療法に対する応答を増強し得る。本明細書における小分子 USP7 阻害剤研究は、PRC1.1 阻害を介した MCC における HLA-I の薬理学的上方制御のための手段を提供する。IFN- γ が HLA-I を上方制御する非特異的な炎症機構とは対照的に、USP7 阻害は、PRC1.1 の破壊を介して、クラス I 抗原提示における根本的な腫瘍固有のエピジェネティック欠陥を逆転させる。したがって、USP7 阻害は、炎症性微小環境を必要とせずに、ベースライン腫瘍 HLA-I 発現を上昇させる。

30

【0746】

ST-MYCL-EP400 複合体による USP7 及び PCGF1 プロモーターの占有は、MCPyV ST 抗原が PRC1.1 の発現を増加させるために MYCL をともに最適化し、その後、クラス I APM 遺伝子発現を抑制する可能性のある統一機構を示唆している。

【0747】

参照による組み込み

本明細書で言及される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、個々の刊行物、特許、又は特許出願が各々参照により組み込まれると具体的かつ個別に示されるかのように、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。矛盾する場合には、本明細書のいずれの定義も含む本出願が支配する。

40

【0748】

The Institute for Genomic Research (TIGR) のワールドワイドウェブ tigr.org 及び／又は National Center for Information (NCBI) のワールドワイドウェブ ncbi.nlm.nih.gov によって管理されているものなどの公開データベースのエントリと相関する受入番号を参照する任意のポリヌクレオチド及びポリペプチド配列もまた、参照によりそれら全体が組み込まれる。

【0749】

等価物

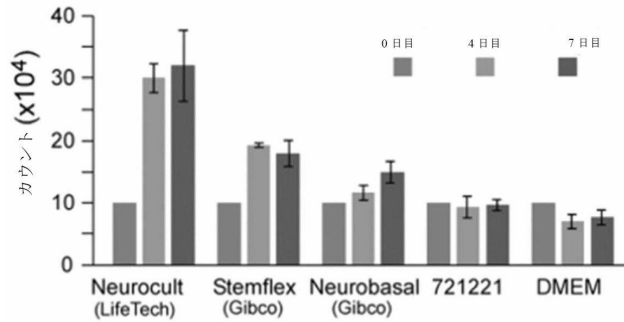
50

当業者であれば、通例の実験のみを使用して、本明細書に記載の本開示によって包含される特定の実施形態に対する多くの等価物を認識するか、又は確定することができるであろう。かかる等価物は、以下の特許請求の範囲によって包含されるよう意図されている。

【図面】

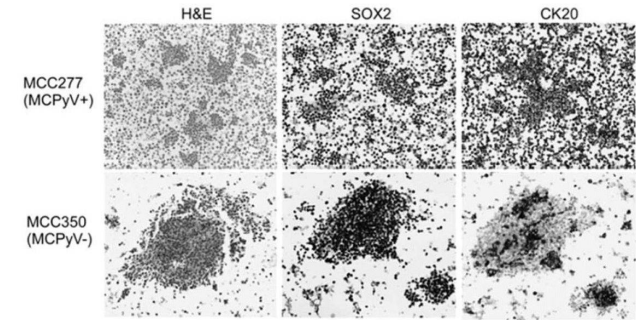
【図 1 A】

【図 1 A】



【図 1 B】

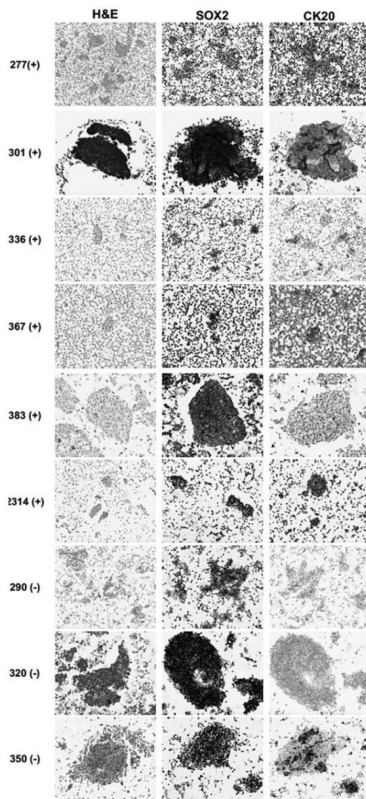
【図 1 B】



10

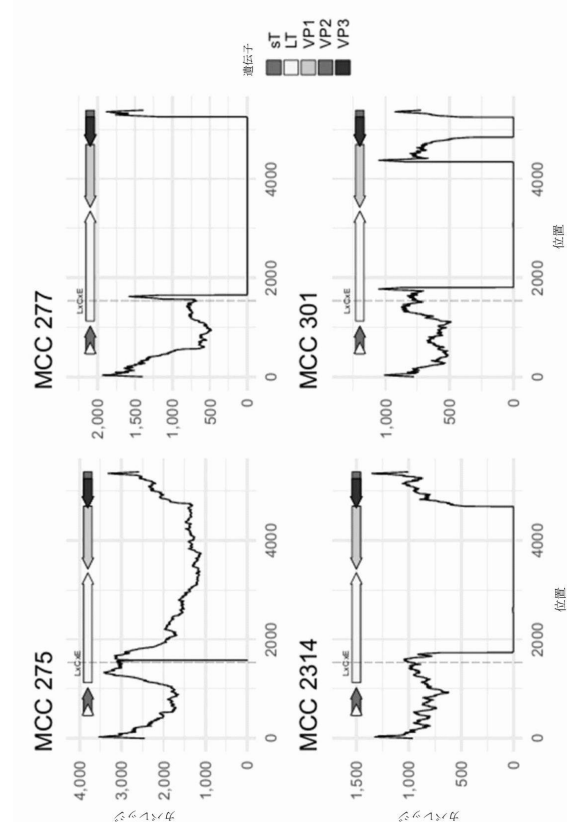
【図 1 C】

【図 1 C】



【図 1 D - 1】

【図 1 D】



20

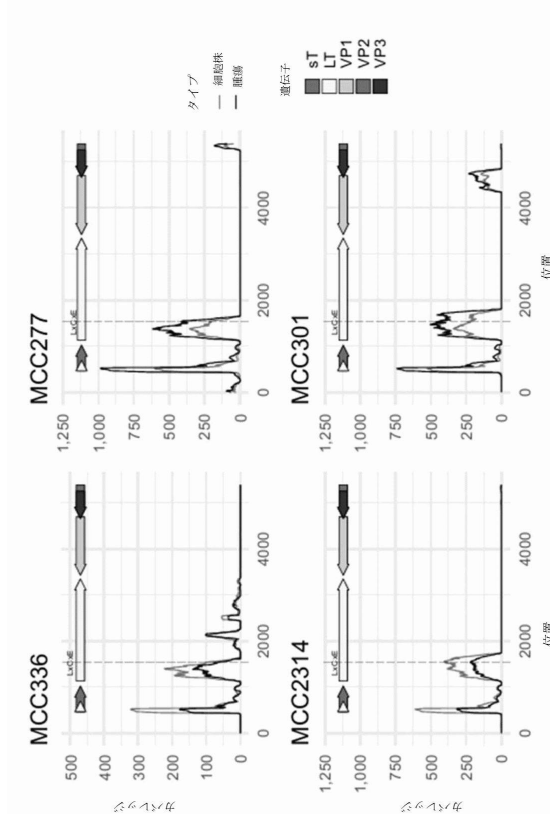
30

40

50

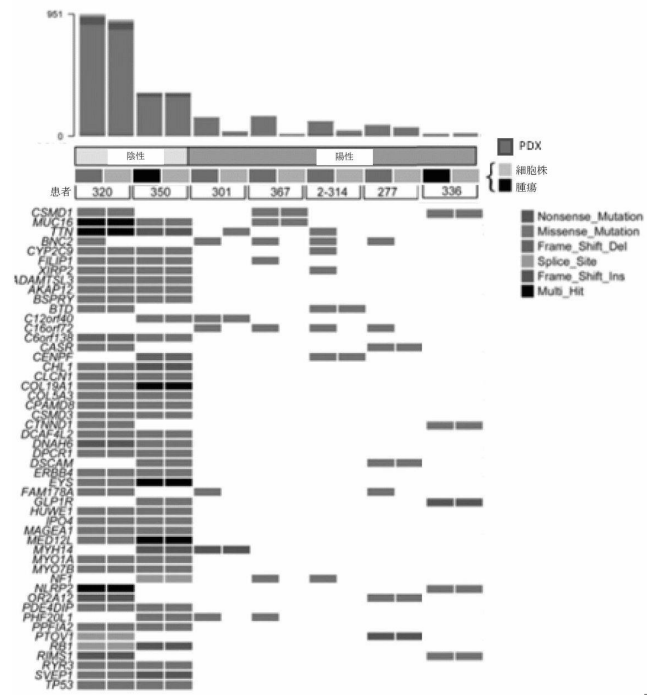
【図 1 D - 2】

【図 1 D】 (続き)



【図 1 E】

【図 1 E】

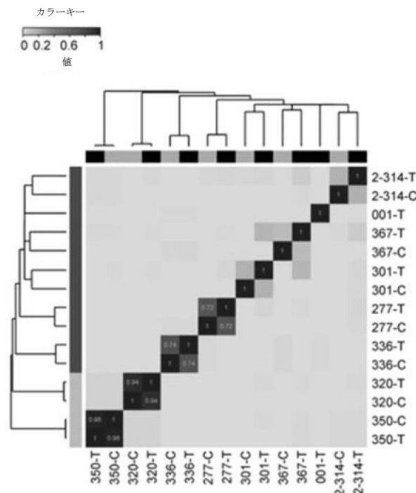


10

20

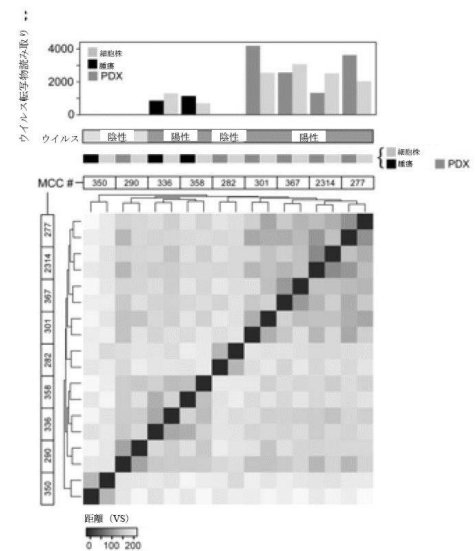
【図 1 F】

【図 1 F】



【図 1 G】

【図 1 G】



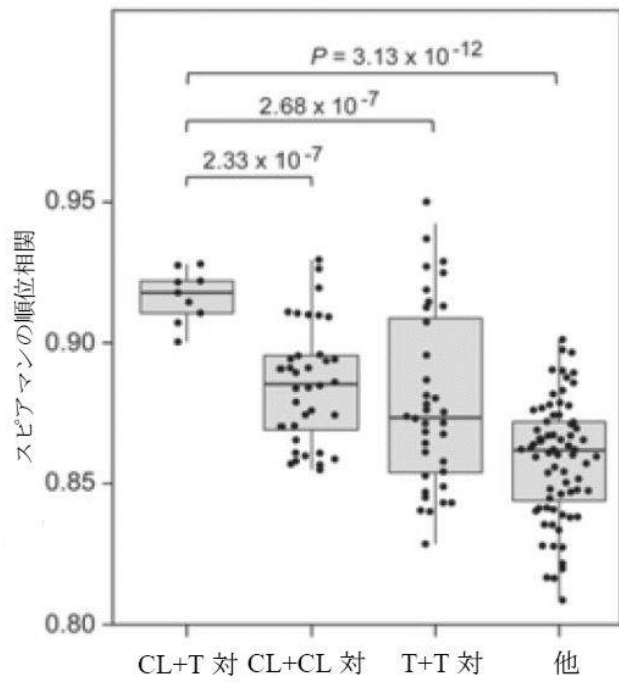
30

40

50

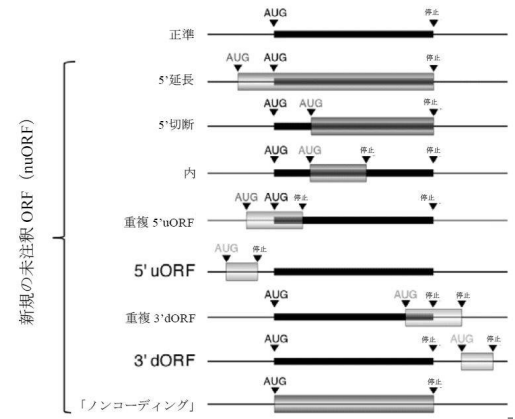
【図 1 H】

【図 1 H】



【図 1 I】

【図 1 I】

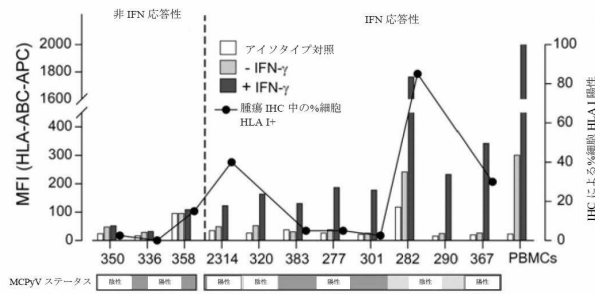


10

20

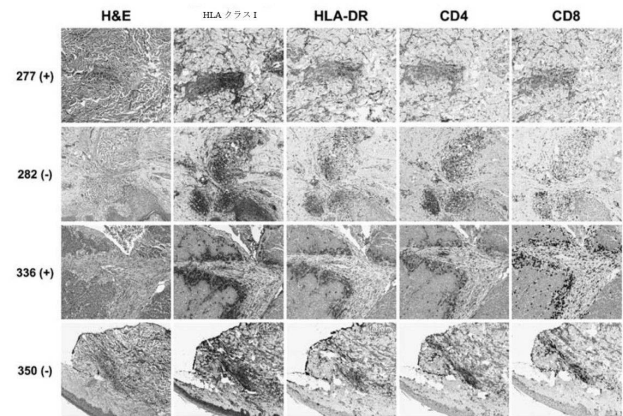
【図 1 J】

【図 1 J】



【図 1 K】

【図 1 K】



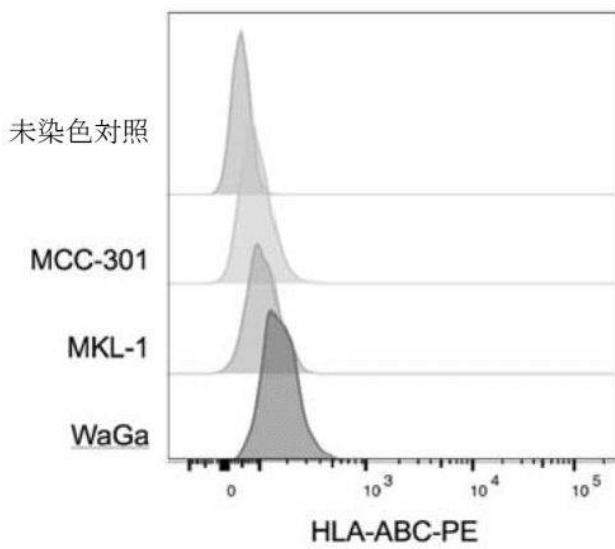
30

40

50

【図 1 L】

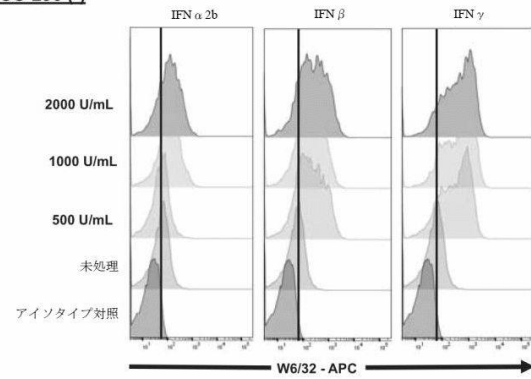
【図 1 L】



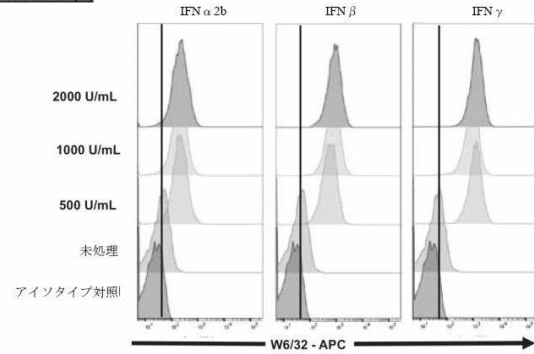
【図 1 M】

【図 1 M】

MCC-290 (-)

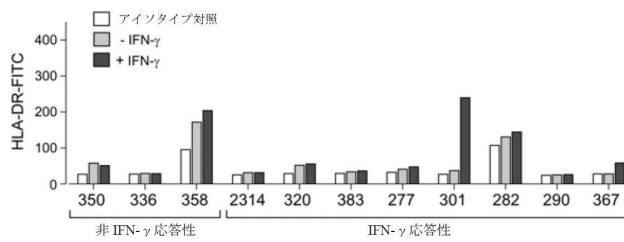


MCC-301(+)



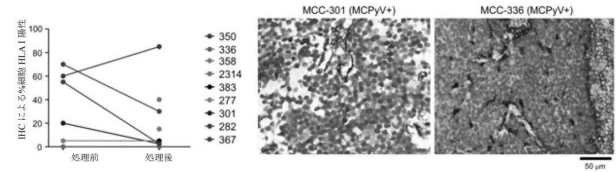
【図 1 N】

【図 1 N】



【図 1 O】

【図 1 O】



10

20

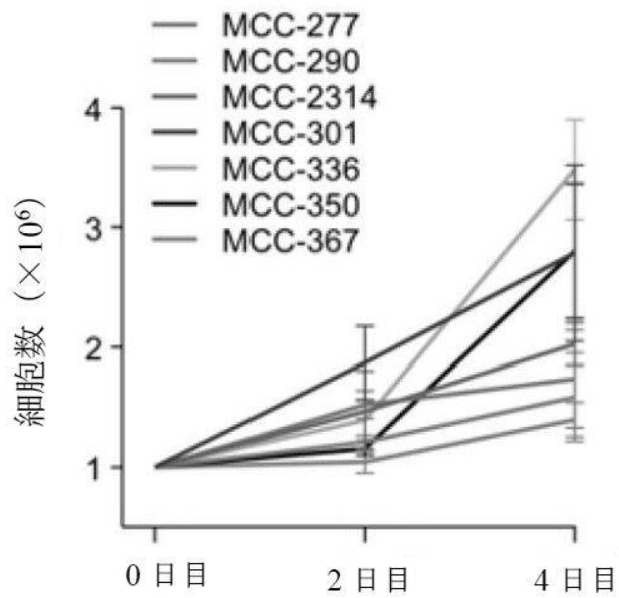
30

40

50

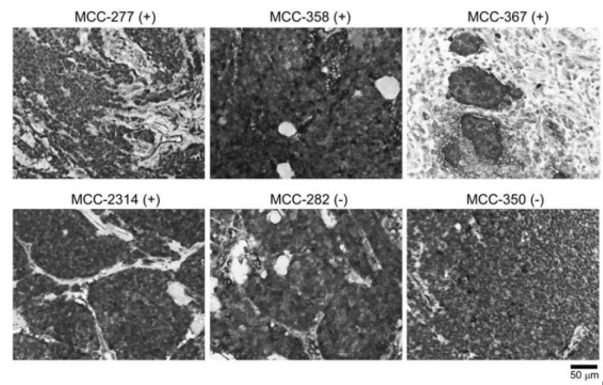
【図 1 P】

【図 1 P】



【図 1 Q】

【図 1 Q】

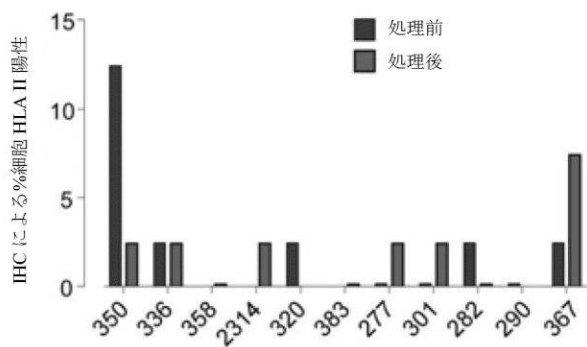


10

20

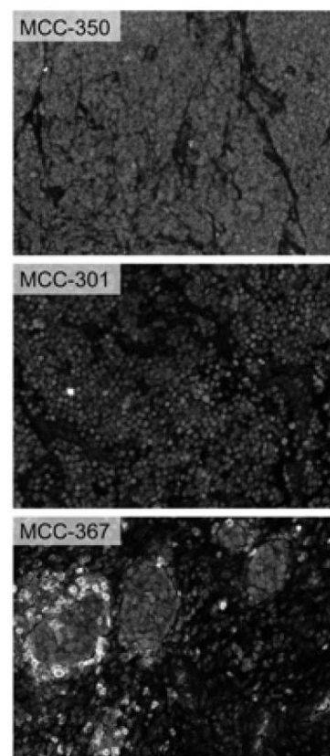
【図 1 R】

【図 1 R】



【図 1 S】

【図 1 S】



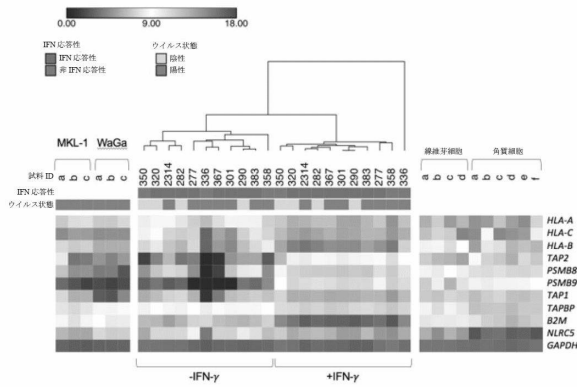
30

40

50

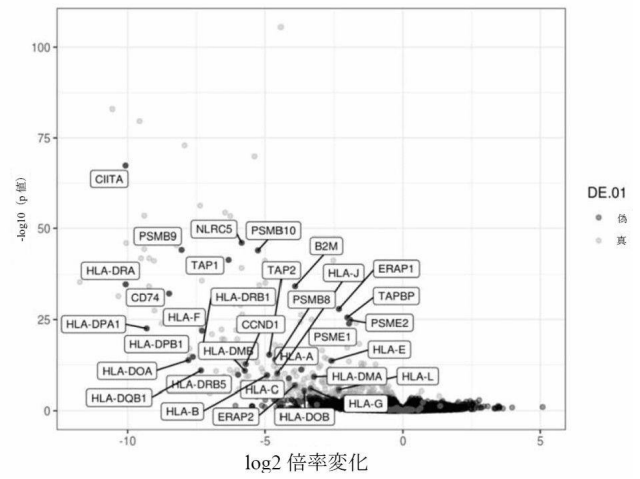
【図 2 A】

【図 2 A】



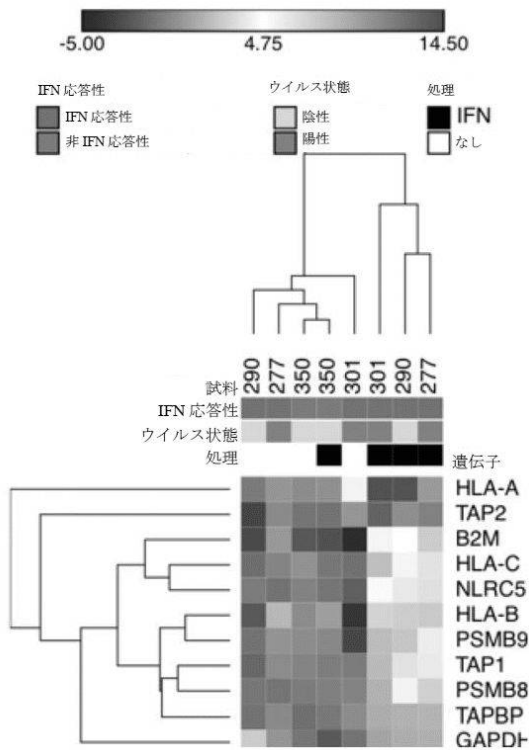
【図 2 B】

【図 2 B】



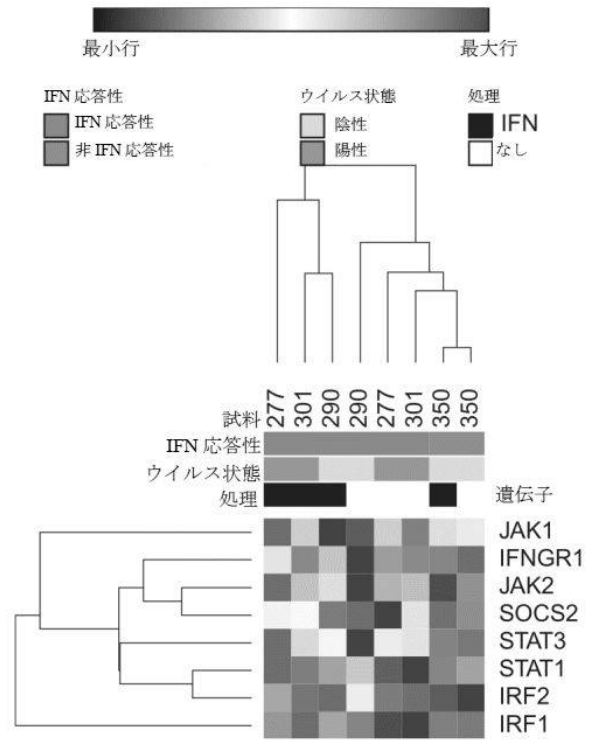
【図 2 C】

【図 2 C】



【図 2 D】

【図 2 D】



10

20

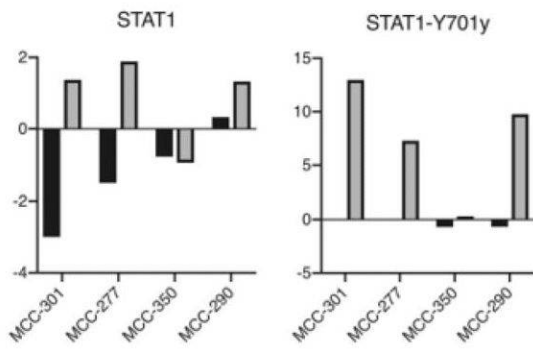
30

40

50

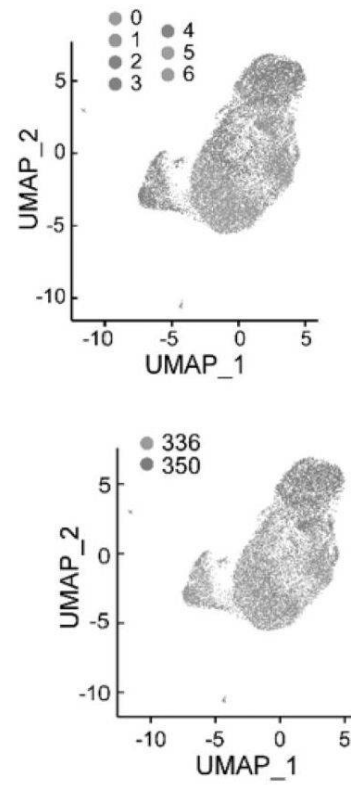
【図 2 E】

【図 2 E】



【図 2 F】

【図 2 F】

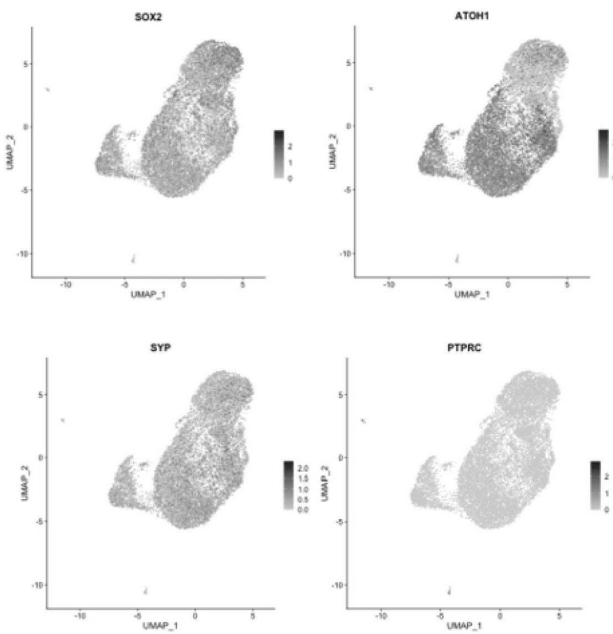


10

20

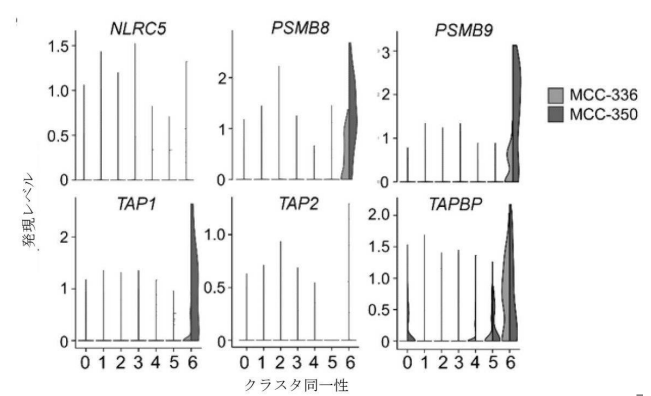
【図 2 G】

【図 2 G】



【図 2 H】

【図 2 H】



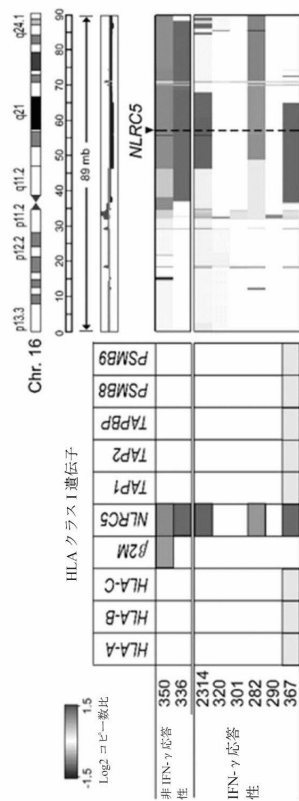
30

40

50

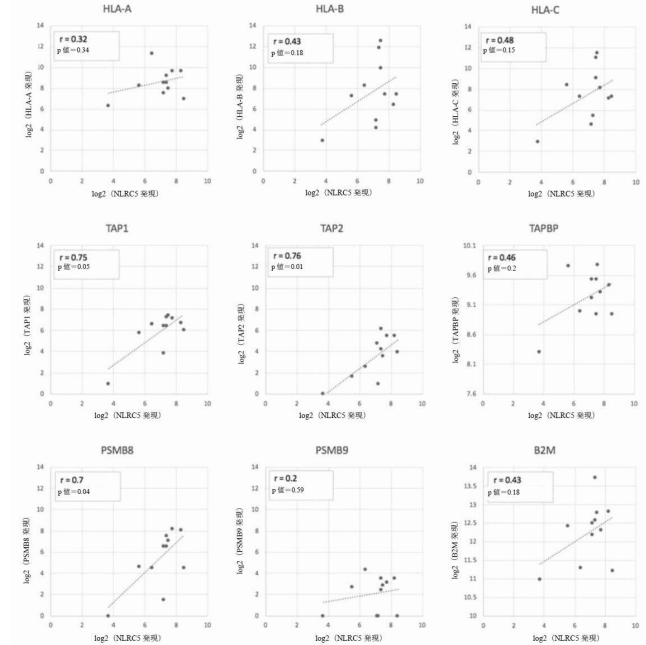
【図 2 I】

【図 2 I】



【図 2 J】

【図 2 J】

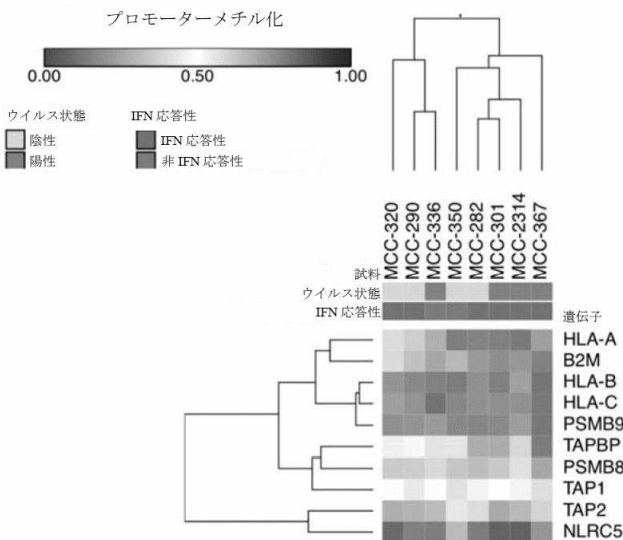


10

20

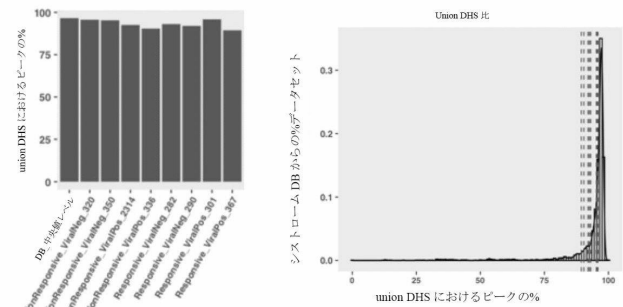
【図 2 K】

【図 2 K】



【図 2 L】

【図 2 L】



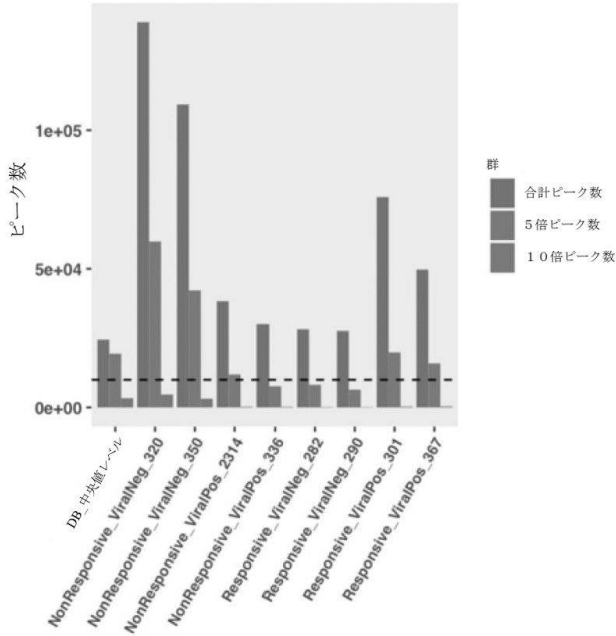
30

40

50

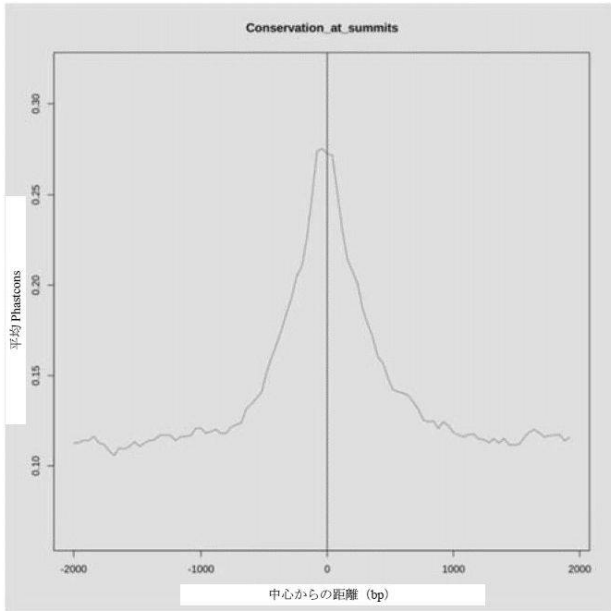
【図 2 M】

【図 2 M】



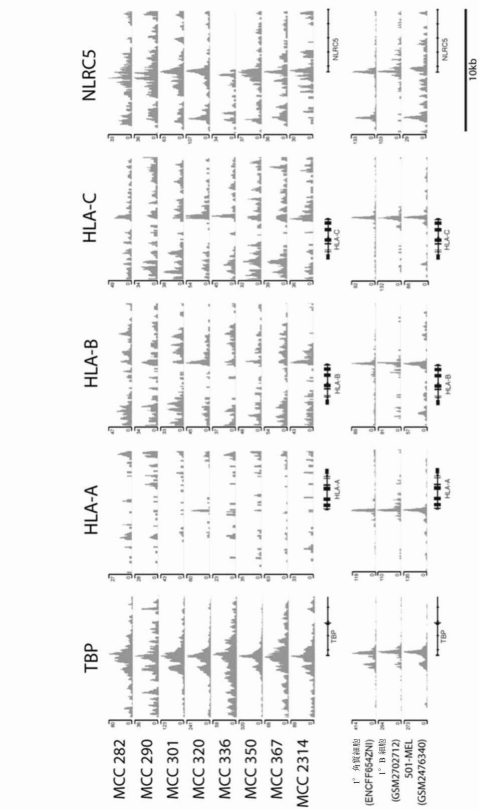
【図 2 N】

【図 2 N】



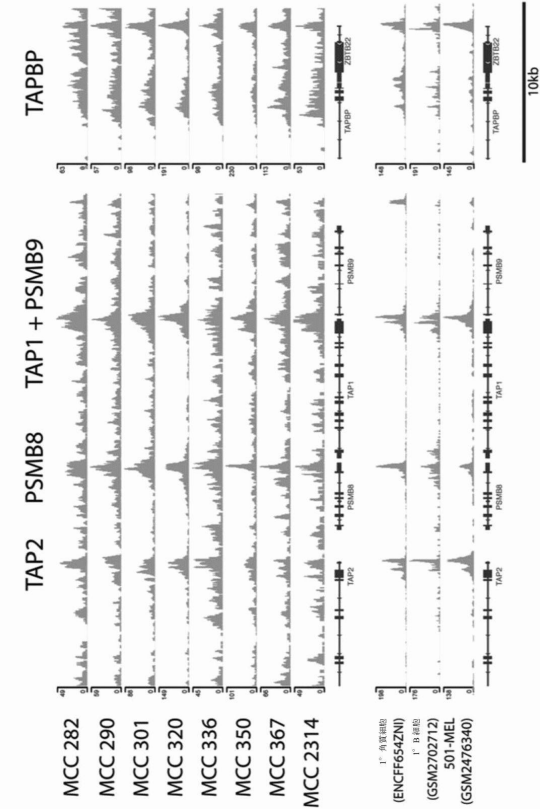
【図 2 O - 1】

【図 2 O】



【図 2 O - 2】

【図 2 O】 (続き)



10

20

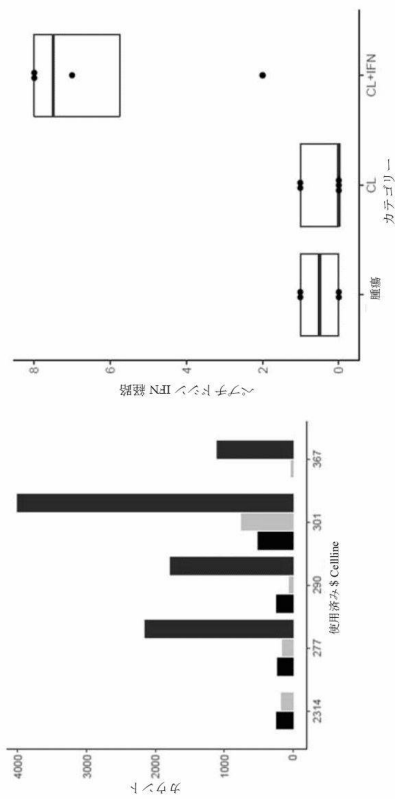
30

40

50

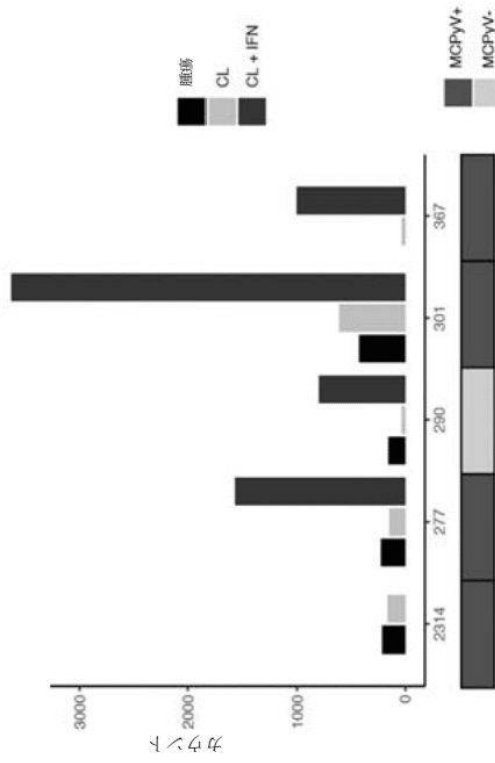
【図 3 A】

【図 3 A】



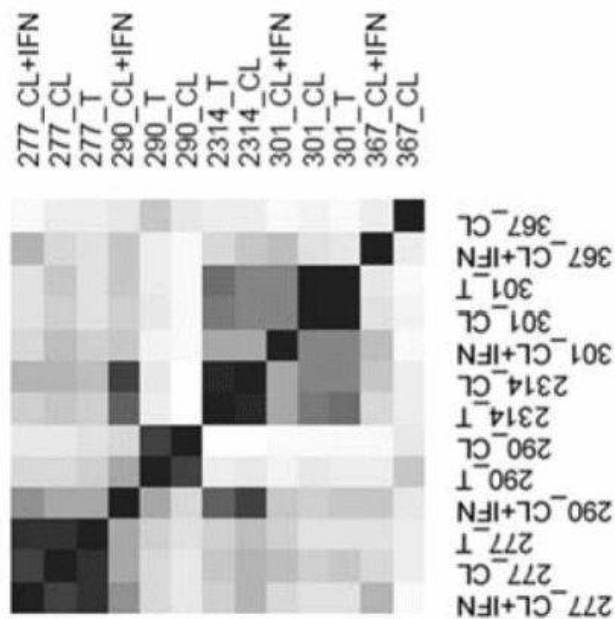
【図 3 B】

【図 3 B】



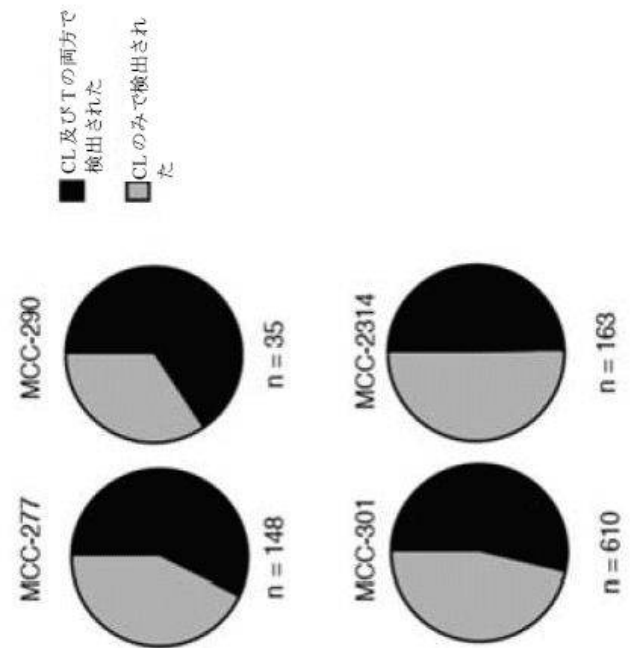
【図 3 C】

【図 3 C】



【図 3 D】

【図 3 D】



10

20

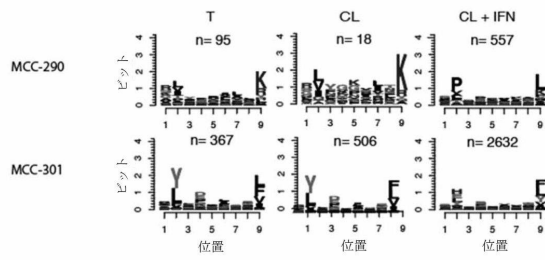
30

40

50

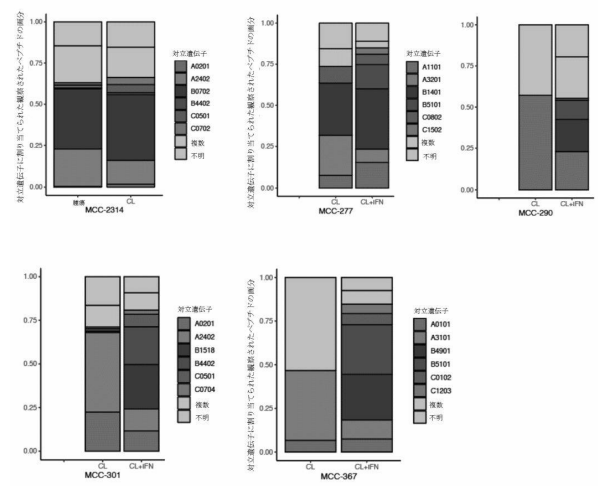
【図 3 E】

【図 3 E】

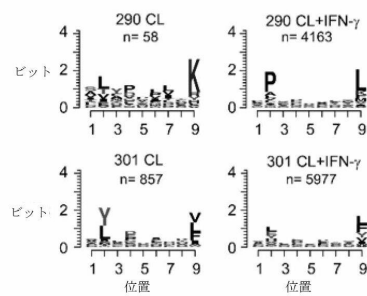


【図 3 F】

【図 3 F】

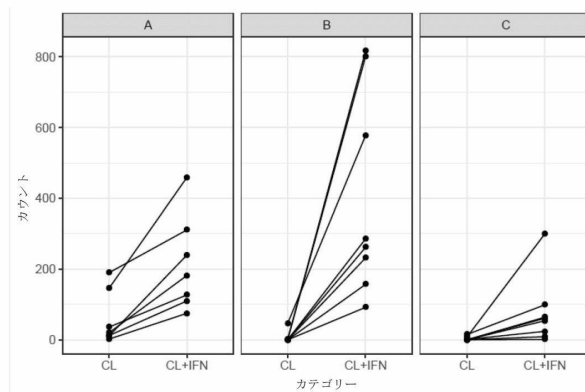


10



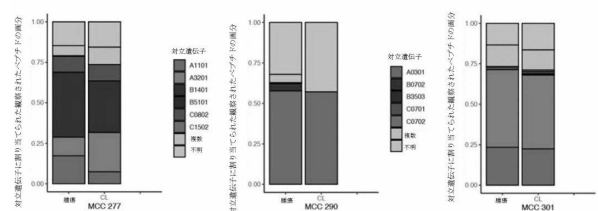
【図 3 G】

【図 3 G】

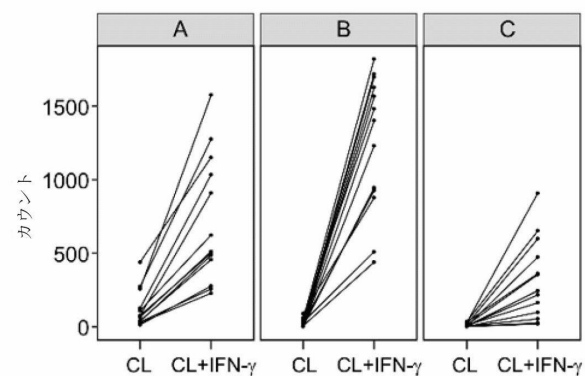


【図 3 H】

【図 3 H】



30

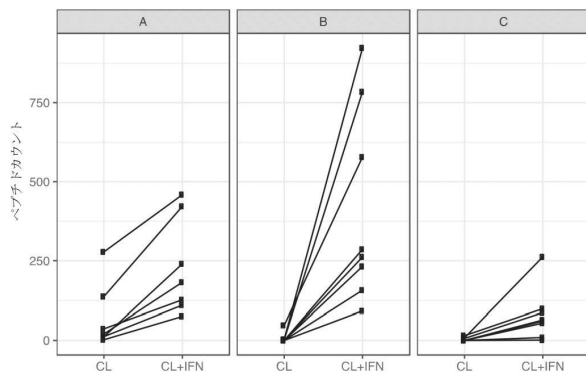


40

50

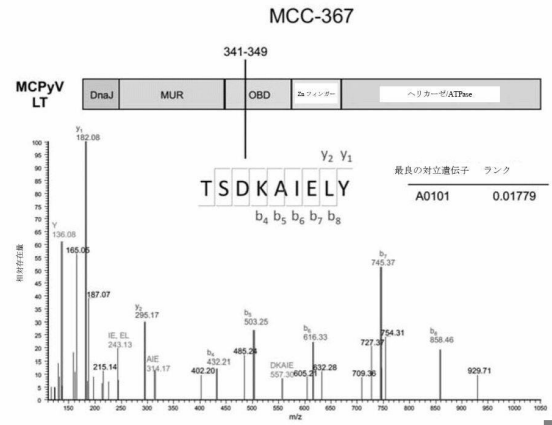
【図 3 I】

【図 3 I】



【図 3 J】

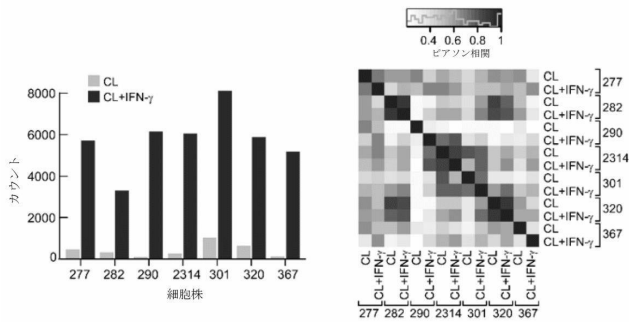
【図 3 J】



10

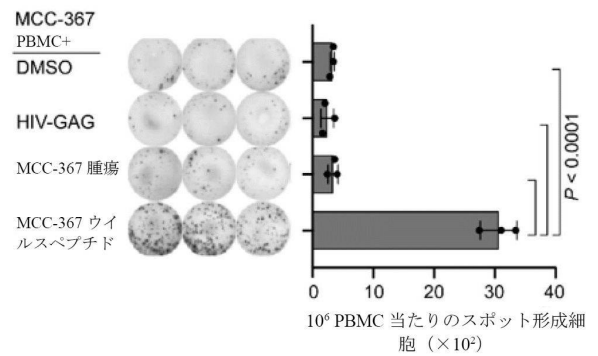
【図 3 K】

【図 3 K】



【図 3 L】

【図 3 L】



20

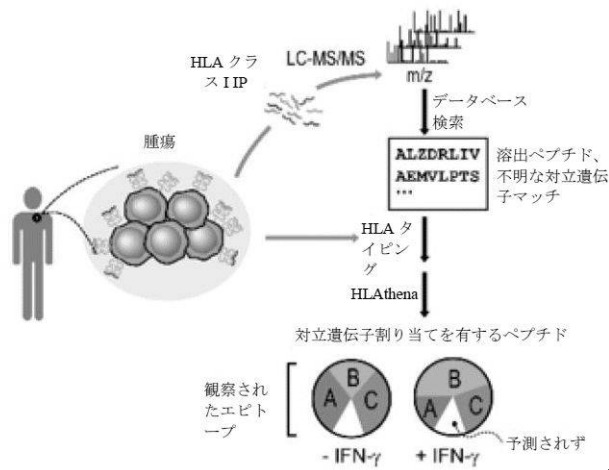
30

40

50

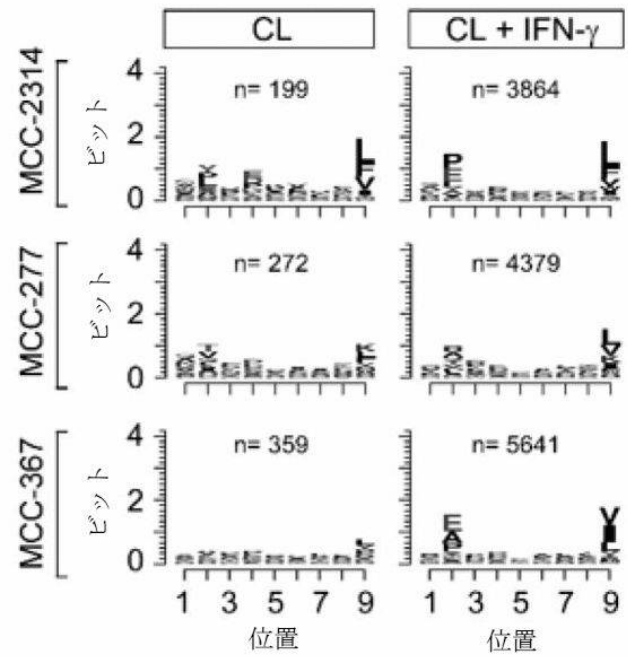
【図 3 M】

【図 3 M】



【図 3 N】

【図 3 N】

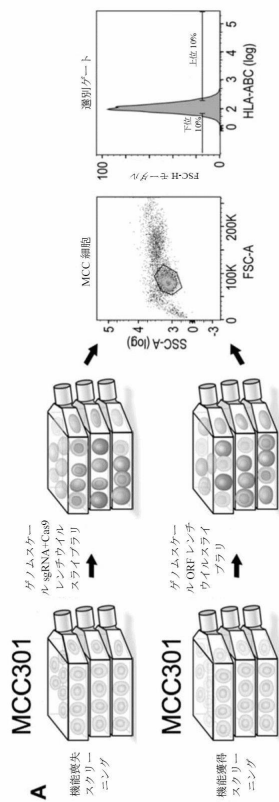


10

20

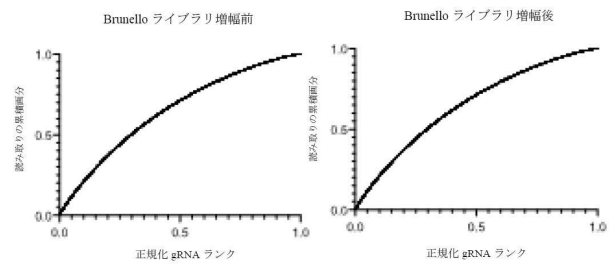
【図 4 A】

【図 4 A】



【図 4 B】

【図 4 B】



QC メトリック	増幅前	増幅後
完全マッチの読み取り	92.4%	91.2%
未検出の sgRNA	0.14%	0.11%
スキュー比	0.82	0.82
Lorenz 曲線の AUC	0.65	0.65

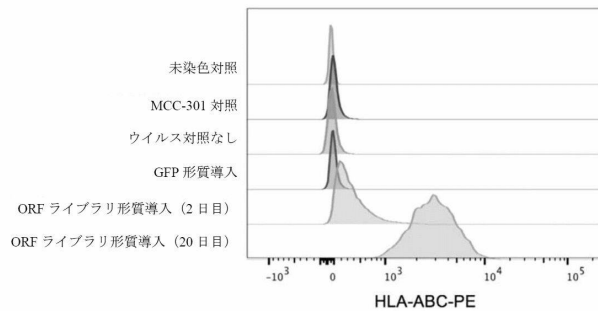
30

40

50

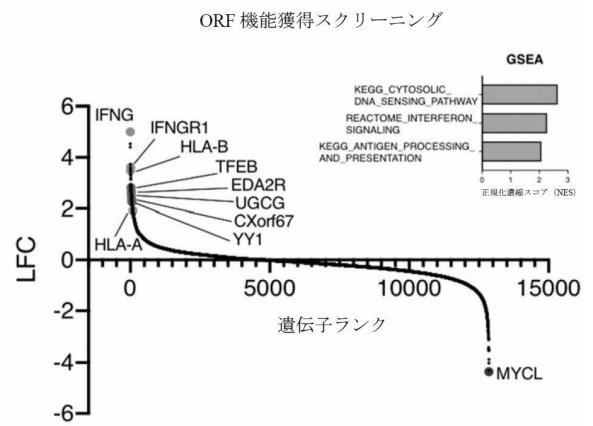
【図 4 C】

【図 4 C】



【図 4 D】

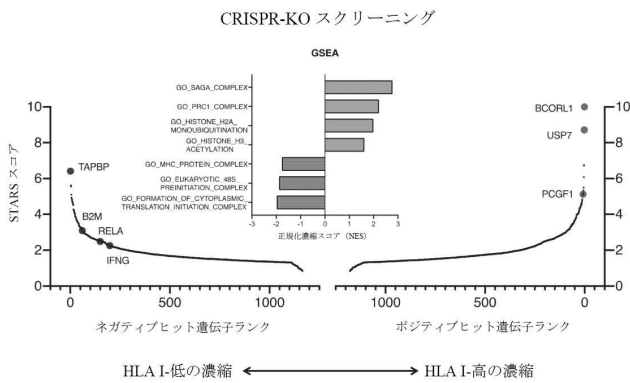
【図 4 D】



10

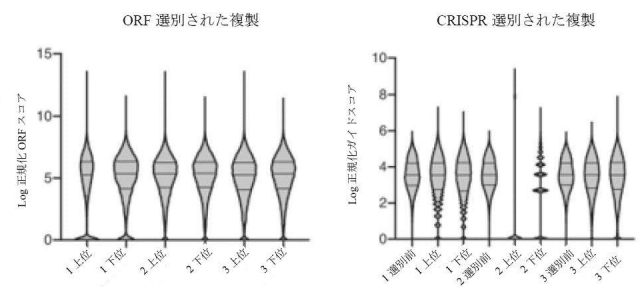
【図 4 E】

【図 4 E】



【図 4 F】

【図 4 F】



20

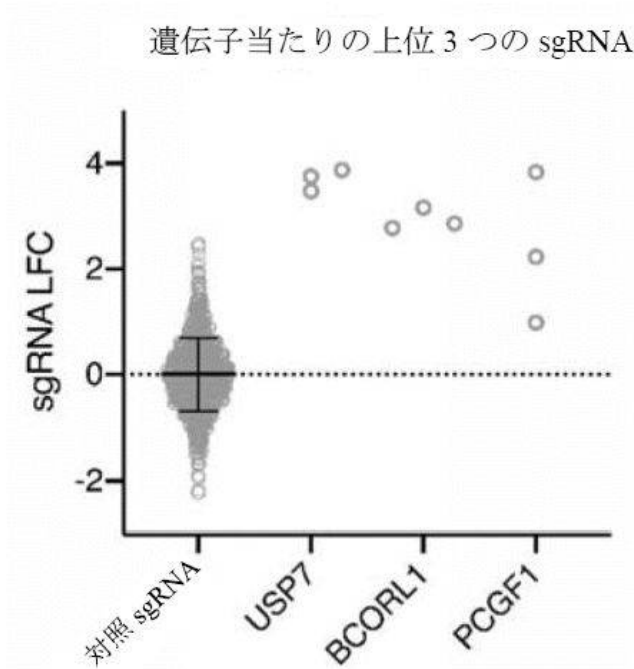
30

40

50

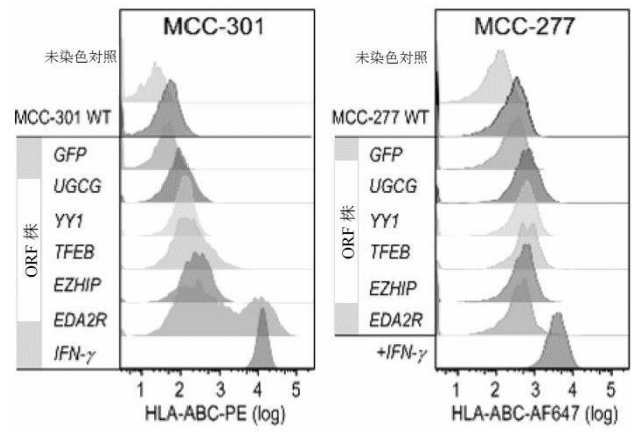
【図 4 G】

【図 4 G】



【図 4 H】

【図 4 H】

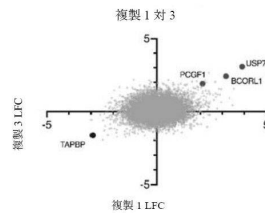
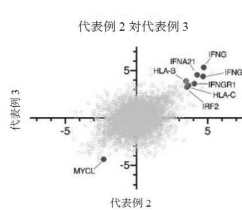


10

20

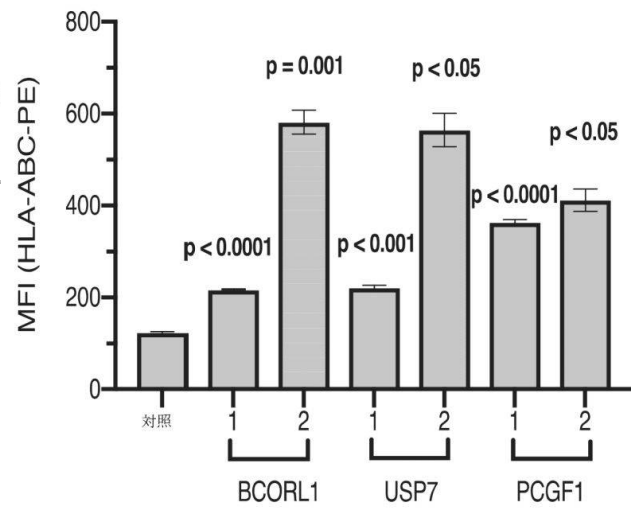
【図 4 I】

【図 4 I】



【図 4 J】

【図 4 J】



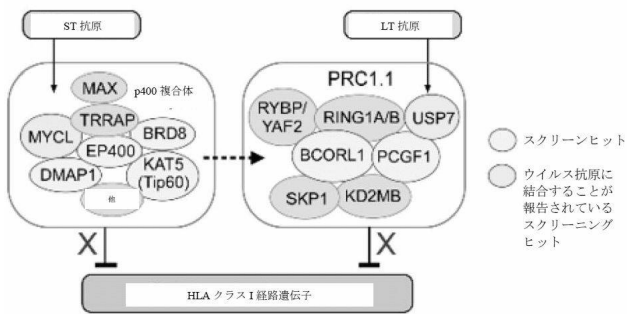
30

40

50

【図 4 K】

【図 4 K】

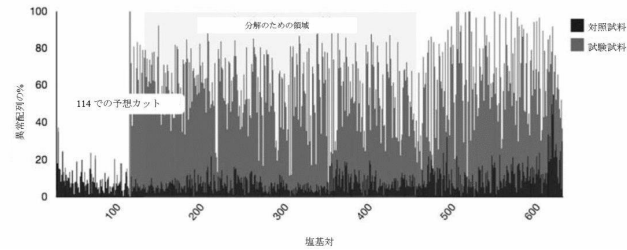


【図 4 L】

【図 4 L】

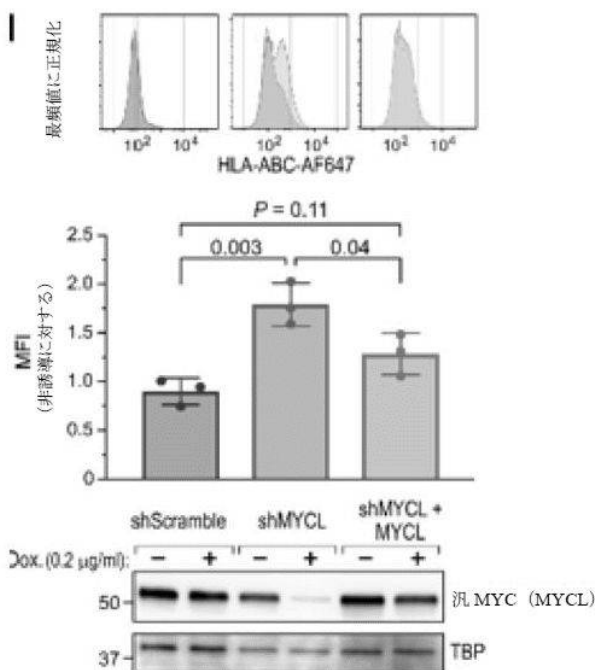
遺伝子	sgRNA	TIDE による%インデル
BCORL1	1	93.4%
	2	77.9%
USP7	1	50.2%
	2	70.3%
PCGF1	1	56.2%
	2	65%
FLCN	1	不良なアライメントトレース
	2	71.9%
ASXL1	1	44.5%
	2	53.7%

PCGF1-2 TIDE 分析



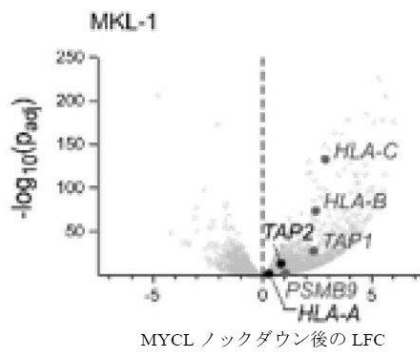
【図 4 M】

【図 4 M】



【図 4 N】

【図 4 N】



10

20

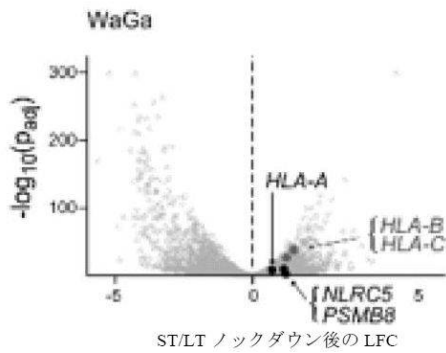
30

40

50

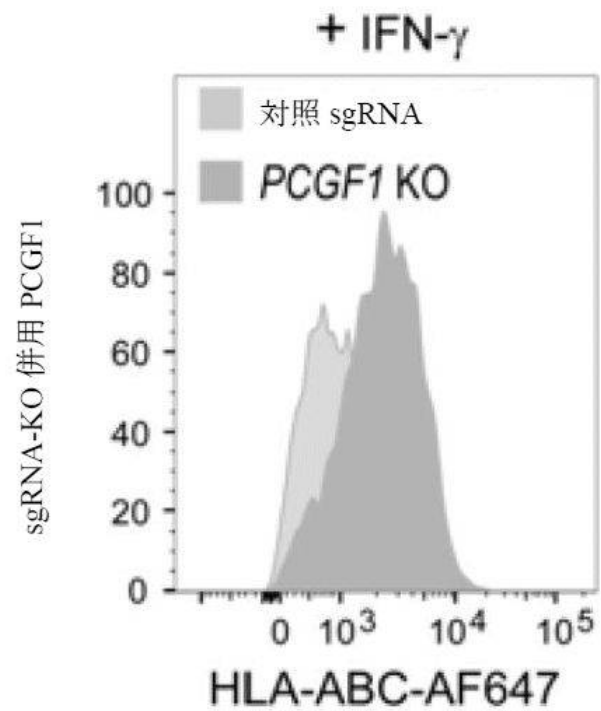
【図 4 O】

【図 4 O】



【図 4 P】

【図 4 P】

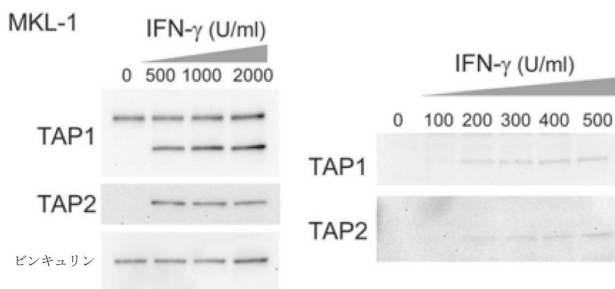


10

20

【図 4 Q】

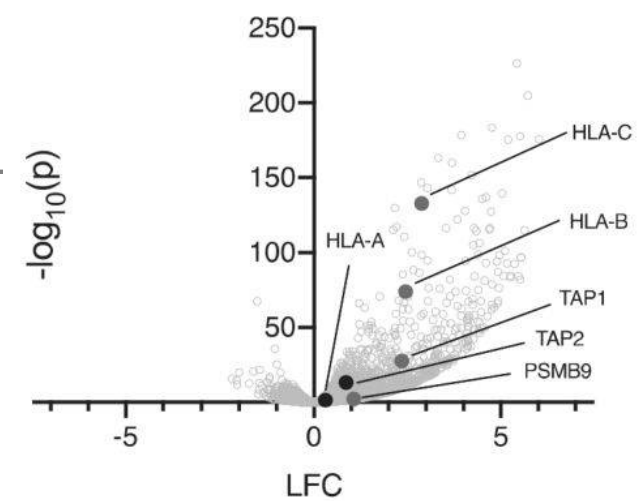
【図 4 Q】



【図 5 A】

【図 5 A】

MYCL shRNA ノックダウン (MKL-1)

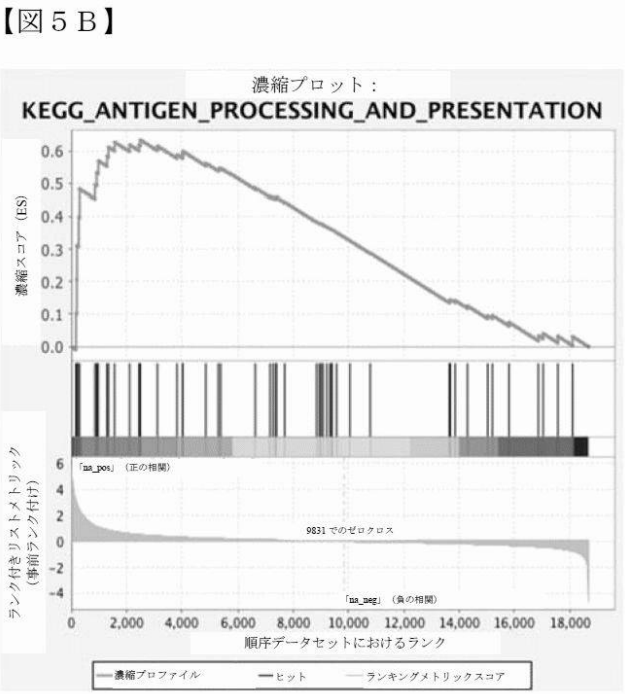


30

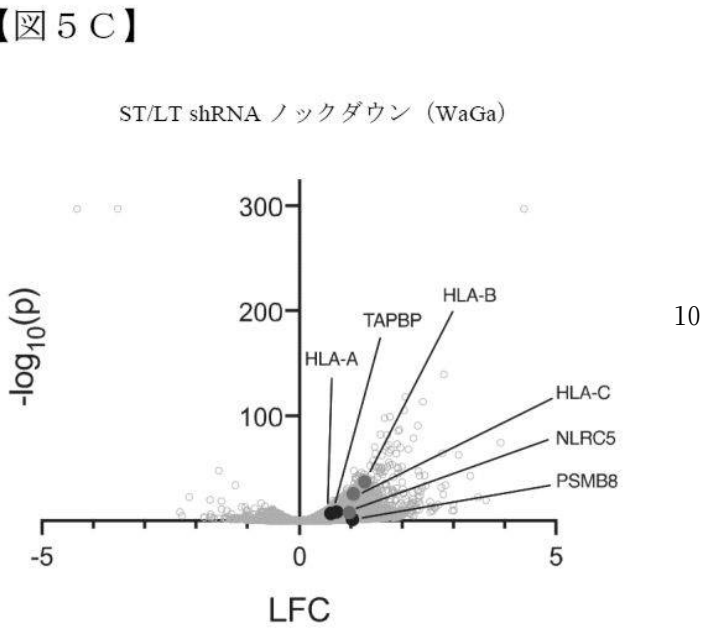
40

50

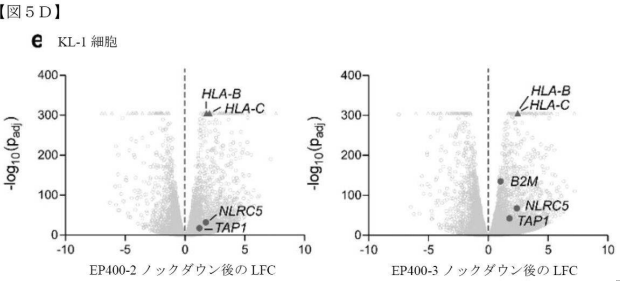
【図 5 B】



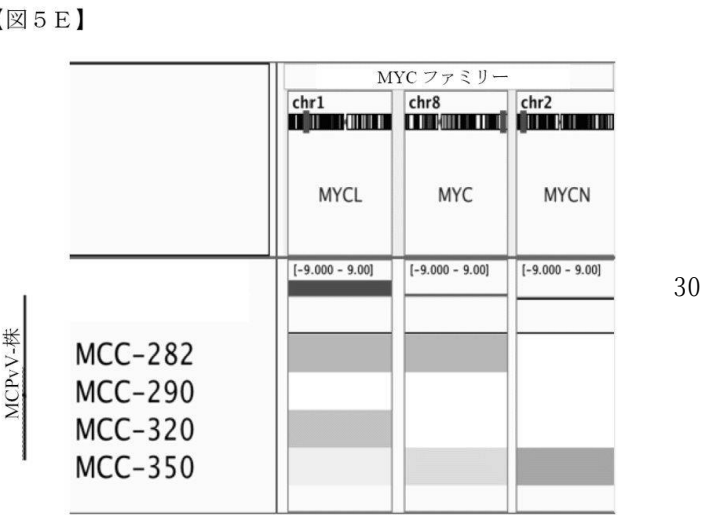
【図 5 C】



【図 5 D】



【図 5 E】



10

20

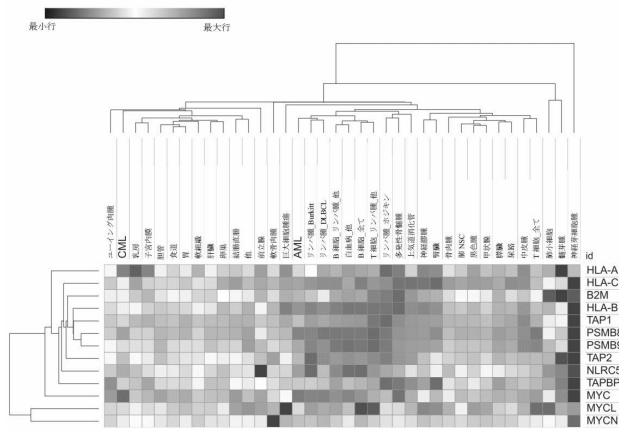
30

40

50

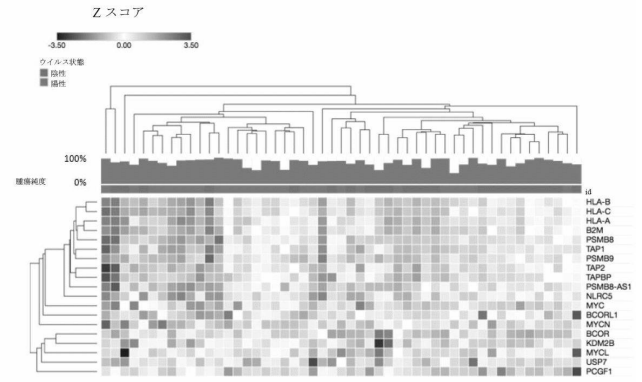
【図 5 F】

【図 5 F】

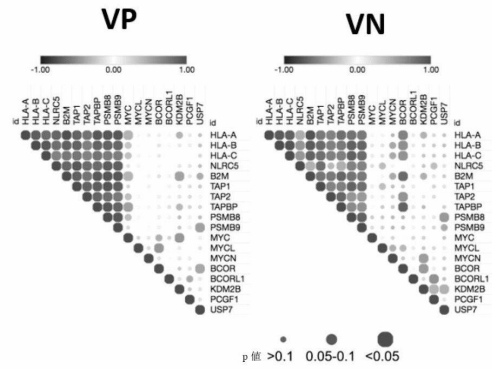


【図 5 G】

【図 5 G】



ピアソン相関

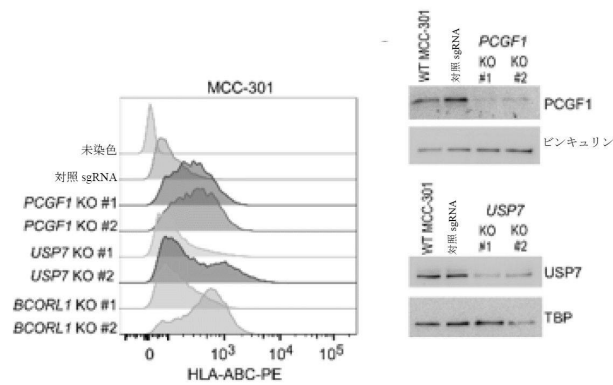


10

20

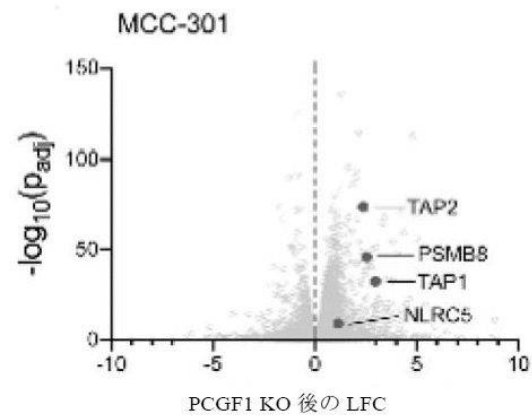
【図 5 H】

【図 5 H】



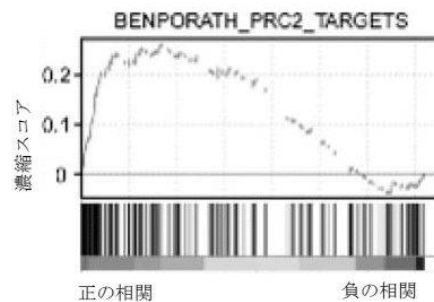
【図 5 I】

【図 5 I】



30

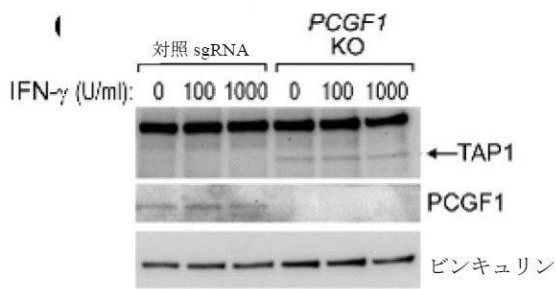
40



50

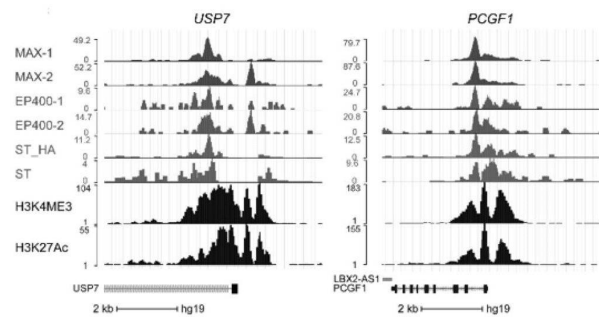
【図 5 J】

【図 5 J】



【図 6 A】

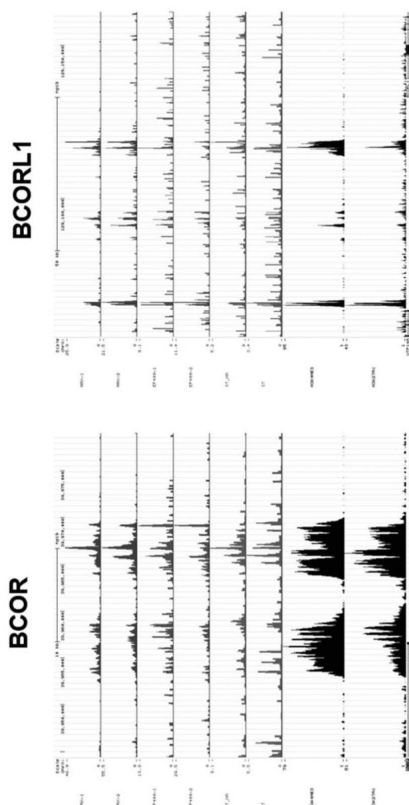
【図 6 A】



10

【図 6 B】

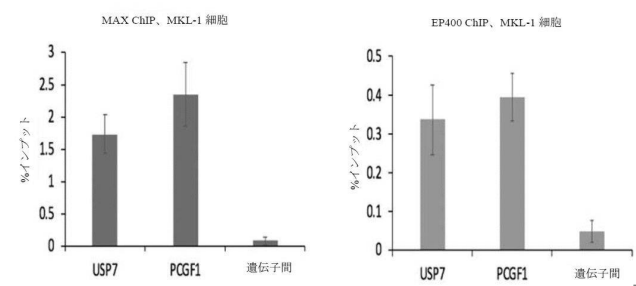
【図 6 B】



20

【図 6 C】

【図 6 C】



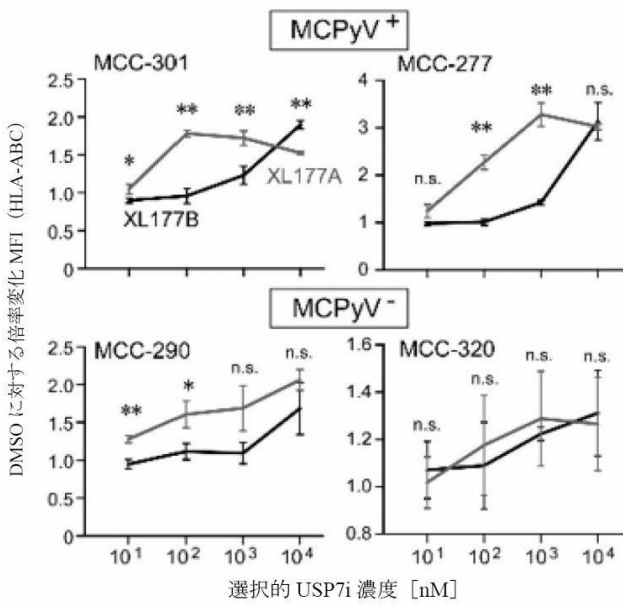
30

40

50

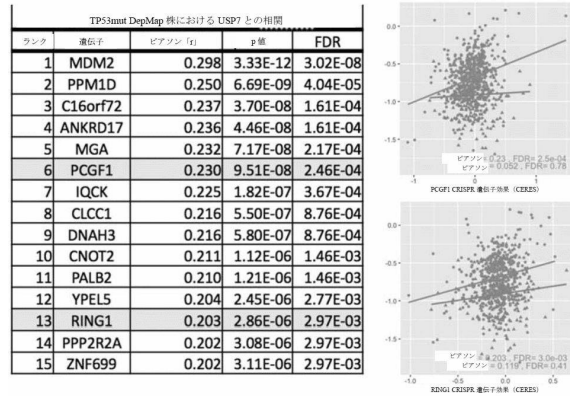
【図 6 D】

【図 6 D】



【図 6 E】

【図 6 E】

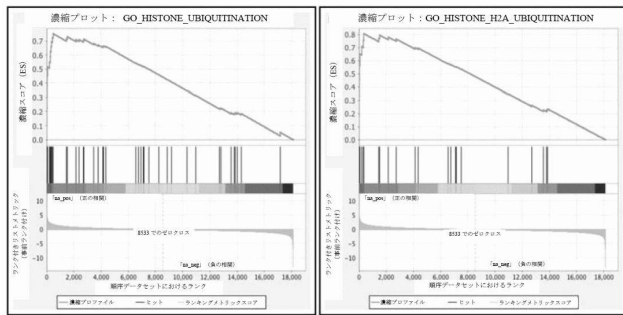


10

20

【図 6 F】

【図 6 F】

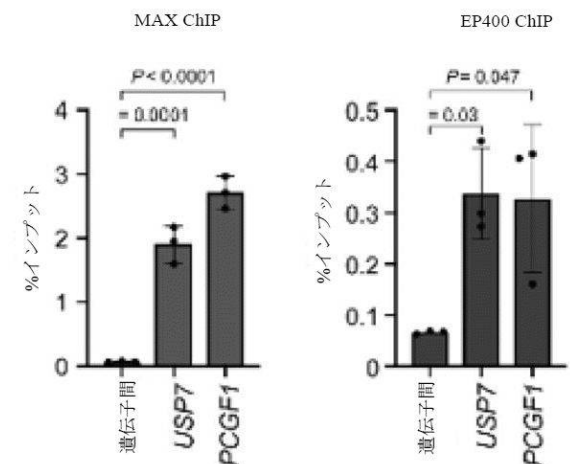


GSEA : TP53-mut 細胞株における USP7 共依存性

名称	NES	FDR q-val
GO_HISTONE_UBIQUITINATION	2.451961	0
GO_HISTONE_H2A_UBIQUITINATION	2.2843597	8.35E-04
GO_G0_TO_G1_TRANSITION	2.2705896	5.57E-04
GO_INTERSTRAND_CROSS_LINK_REPAIR	2.2658875	4.18E-04
GO_CHROMATIN_ORGANIZATION_INVOLVED_IN_REGULATION_OF_TRANSCRIPTION	2.2190564	8.38E-04

【図 6 G】

【図 6 G】



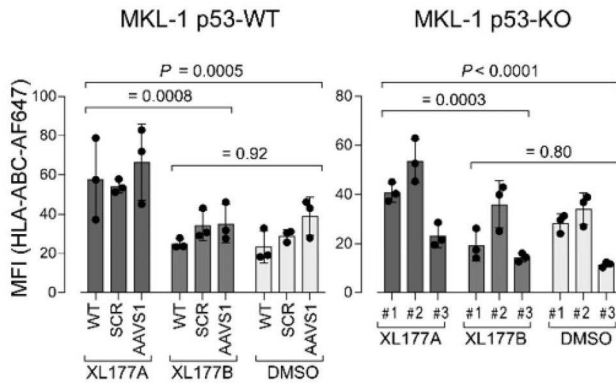
30

40

50

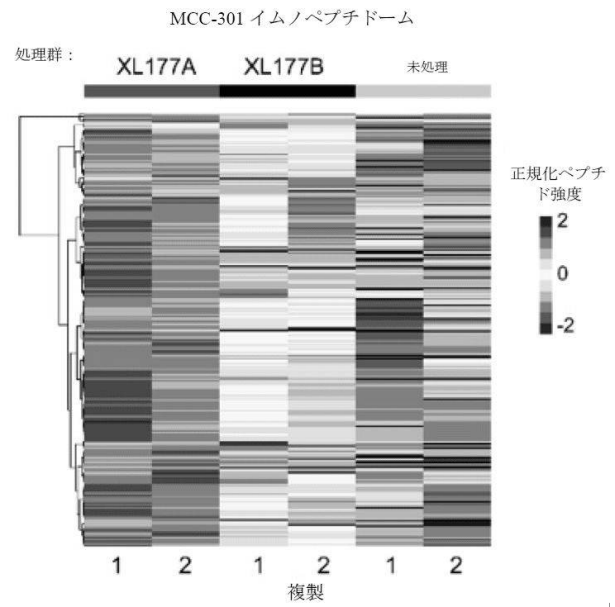
【図 6 H】

【図 6 H】



【図 6 I】

【図 6 I】

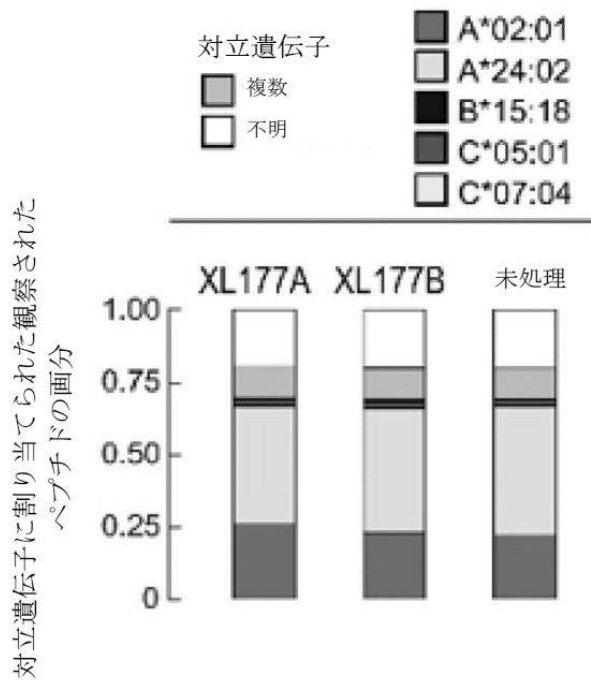


10

20

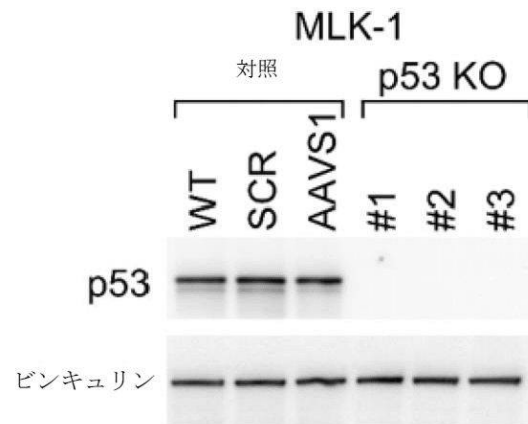
【図 6 J】

【図 6 J】



【図 6 K】

【図 6 K】



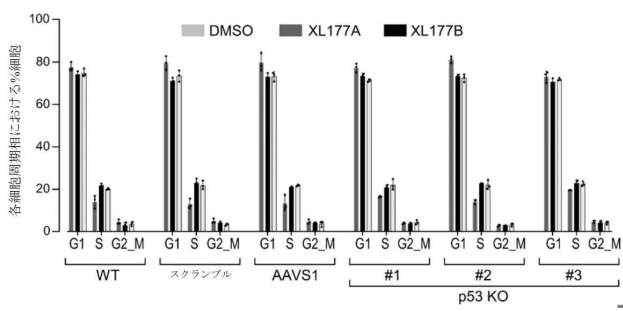
30

40

50

【図 6 L】

【図 6 L】



10

【配列表】

2023529026000001.app

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/035205

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61P 35/00; C07K 14/705; C12Q 1/6886 (2021.01)

CPC - A61P 35/00; C07K 14/70539; C12Q 2600/106; C12Q 2600/118; C12Q 2600/158 (2021.08)

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)

see Search History document

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

see Search History document

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

see Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2019/0338290 A1 (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER) 07 November 2019 (07.11.2019) entire document	1-4, 11 — 30-32, 34, 35, 39, 58-60, 69, 70
X — Y	WO 2019/144126 A1 (PASCAL BIOSCIENCES INC. et al) 25 July 2019 (25.07.2019) entire document	29, 33, 36-38, 57 — 30-32, 34, 35, 39, 58-60
X	US 2011/0070268 A1 (BRICHARD et al) 24 March 2011 (24.03.2011) entire document	68
X	US 2016/0222118 A1 (GENENTECH, INC.) 04 August 2016 (04.08.2016) entire document	71-74
Y	US 2016/0265050 A1 (BIONTECH AG et al) 15 September 2016 (15.09.2016) entire document	69, 70

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 September 2021

Date of mailing of the international search report

SEP 27 2021

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Harry Kim

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/035205

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/035205

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.: 5-10, 12-28, 40, 41, 43-56, 61-67, 75-85
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:

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 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.:

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.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 31/7105(2006.01)
 A 6 1 K 31/711 (2006.01)
 A 6 1 K 31/7088(2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 39/12 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/06 (2006.01)
 C 1 2 N 15/12 (2006.01)
 C 1 2 N 5/09 (2010.01)
 C 1 2 N 15/113 (2010.01)
 C 0 7 K 16/18 (2006.01)
 C 1 2 N 15/115 (2010.01)

A 6 1 K 31/7105
 A 6 1 K 31/711
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 39/395 E
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 K 39/12
 C 1 2 Q 1/06
 C 1 2 N 15/12 Z N A
 C 1 2 N 5/09
 C 1 2 N 15/113 Z
 C 0 7 K 16/18
 C 1 2 N 15/115 Z

4 H 0 4 5

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

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ウー, キャサリン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 4 6, ブルックライン, メイソン テラス 1 1 7

(72)発明者 デカプリオ, ジェイムズ エー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 8 1, ウェルスリー, パトニー ロード 5

(72)発明者 ケスキ, デリン ビー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 3 5 6-1 0 1 2, ニュートン, ワシントン ストリ
 ト 7 2

(72)発明者 リー, パトリック シー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 2 1 5-5 4 5 0, ボストン, ブルックライン アベニ
 ュー 4 5 0, デイナーファーバー キャンサー インスティテュート, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 バーレージ, サラ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 4, サマービル, ジョセフィーン アベニュー 2 8

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA19 QA20 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QS31

4B065 AA90X AC20 CA44

4C084 AA19 AA20 MA02 MA13 MA17 MA22 MA23 MA24 MA28 MA32

MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA55 MA56 MA60 MA63 MA66 NA05

ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC751

4C085 AA03 AA13 AA14 BA51 BB11 CC23 EE03 GG01 GG03 GG04
 GG08

4C086 AA01 AA02 EA16 MA13 MA17 MA22 MA23 MA24 MA28 MA32

F ターム (参考) 2 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA55 MA56 MA59 MA60
 MA63 MA66 NA05 NA14 ZB26 ZB27 ZC75
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 EA50