

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-529345

(P2018-529345A)

(43) 公表日 平成30年10月11日(2018.10.11)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/117 (2010.01)
C 12 Q 1/6853 (2018.01)
C 12 Q 1/6881 (2018.01)
G 01 N 33/48 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/117 Z N A Z
C 12 Q 1/6853 Z
C 12 Q 1/6881 Z
G 01 N 33/48 M

テーマコード(参考)

2 G 04 5

4 B 06 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2018-515528 (P2018-515528)
(86) (22) 出願日 平成28年9月22日 (2016.9.22)
(85) 翻訳文提出日 平成30年3月23日 (2018.3.23)
(86) 國際出願番号 PCT/EP2016/072579
(87) 國際公開番号 WO2017/050916
(87) 國際公開日 平成29年3月30日 (2017.3.30)
(31) 優先権主張番号 1516972.5
(32) 優先日 平成27年9月25日 (2015.9.25)
(33) 優先権主張国 英国(GB)

(71) 出願人 511145937
エピオンティス ゲーエムベーハー
ドイツ, 12489 ベルリン, ルードア
ー ショッセ 29
(74) 代理人 100088904
弁理士 庄司 隆
(74) 代理人 100124453
弁理士 資延 由利子
(74) 代理人 100135208
弁理士 大杉 阜也
(74) 代理人 100163544
弁理士 平田 縁
(72) 発明者 オレク, スフェン
ドイツ, 12207 ベルリン, ポオート
シュトラーセ 16

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫細胞、特にB細胞の同定のためのエピジェネティックマーカーとしてのLRP5

(57) 【要約】

本発明は、B細胞を同定する方法、特にin vitro方法であって、該方法が、低密度リボタンパク質受容体関連タンパク質5(LRP5)に対する哺乳動物の遺伝子領域における少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態を分析することを含み、非B細胞と比較した場合の該遺伝子領域の脱メチル化又はメチル化の欠失がB細胞の指標となる、方法に関する。本発明による分析によって、B細胞をエピジェネティックレベルで同定するとともに、複合サンプルにおいて、それらの細胞と、例えば他の血液細胞又は免疫細胞等の他の全ての細胞とを区別することができる。本発明はさらに、B細胞を、特に複合サンプルにおいて定量する改善された方法を提供する。この方法は、好ましくは全血及び/又は非トリプシン処理組織中の細胞を精製及び/又は富化する工程を伴わず行うことができる。メチル化を同定するためのキット及び特定のプライマー及びプローブが更に特許請求される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

サンプルにおいてB細胞を同定する方法であって、該方法が、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質5（LRP5）に対する哺乳動物の遺伝子領域における少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態を分析することを含み、分析される該遺伝子領域が、配列番号1による単位複製配列に位置しており、非B細胞と比較した場合の該遺伝子領域の脱メチル化がB細胞の指標となる、方法。

【請求項 2】

前記少なくとも1つのCpG位置が、分析する前記遺伝子領域内の転写開始部位、プロモーター領域、5'又は3'非翻訳領域、エクソン、イントロン、エクソン／イントロン境界より上流の5'領域、及び／又は転写停止部位より下流の3'領域に存在する、請求項1に記載の方法。10

【請求項 3】

前記少なくとも1つのCpG位置が、配列番号1による単位複製配列におけるCpG位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、及び24から選択されるCpGから選択され、又は、配列番号2若しくは配列番号3によるバイサルファイト変換される配列による単位複製配列2249番のフラグメントにおけるCpG位置3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、及び17から選択される、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

バイサルファイト転換性の分析がメチル化特異性酵素消化、バイサルファイトシークエンシングから選択される方法、プロモーターメチル化、CpGアイランドメチル化、MSP、HeavyMethyl、MethyLight、Ms-SNuPEから選択される分析、及び增幅DNAの検出に基づく他の方法を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。20

【請求項 5】

B細胞の相対量を、分析する領域におけるメチル化頻度の相対量と、GAPDHによって例示される対照遺伝子におけるメチル化頻度の相対量との比較に基づいて定量することを更に含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記サンプルがヒト血液サンプルを含む哺乳動物の体液、又は組織、器官若しくは細胞型の血液サンプル、血中リンパ球のサンプル若しくはその画分から選択される、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。30

【請求項 7】

前記B細胞と、濾胞性ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、顆粒球、単球、NK細胞、及びヘルパーT細胞から選択される細胞型の全て又は少なくとも1つとを区別することを更に含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

同定する前記細胞を、全血及び／又は非トリプシン処理組織を使用して精製及び／又は富化する工程なしに行われる、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

同定される前記B細胞に基づいて前記哺乳動物の免疫状態を決定する工程を更に含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

哺乳動物においてB細胞のレベルをモニタリングする方法であって、請求項5～9のいずれか一項に記載の方法を行うことと、さらに、同定された前記細胞の相対量を、同じ哺乳動物から先に又は並行して採取したサンプル及び／又は対照サンプルと比較することを含む、方法。

【請求項 11】

前記哺乳動物に与える化学物質及び／又は生物学的物質に応じて前記B細胞の量を測定及び／又はモニタリングすることを更に含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法

10

20

30

40

50

。

【請求項 1 2】

前記哺乳動物が自己免疫疾患、移植片拒絶反応、感染性疾患、癌及び／又はアレルギーを患っているか、又はそれらを患う可能性がある、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

哺乳動物においてB細胞を、LRP5の遺伝子領域のCpG位置のバイサルファイト接近性の分析に基づいて同定、定量及び／又はモニタリングするキットであって、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法の実行用の成分、又はa)バイサルファイト試薬、及びb)配列番号1による領域のCpG位置から選択されるCpG位置のメチル化状態の分析用の材料、若しくは配列番号4～配列番号11による配列から選択されるオリゴマーを含む、キット。
10

【請求項 1 4】

配列番号4～配列番号11のいずれかによるオリゴマー、又は配列番号1、配列番号2又は配列番号3による単位複製配列。

【請求項 1 5】

哺乳動物におけるB細胞の同定、定量及び／又はモニタリングへの請求項13に記載のキット、又は請求項14に記載のオリゴマー若しくは単位複製配列の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質5（LRP5）における哺乳動物の遺伝子領域の少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態を分析することを含み、上記遺伝子領域の脱メチル化又はメチル化の欠失が非B細胞と比べたときにB細胞の指標となる、B細胞を同定するための方法、特にin vitro方法に関する。本発明による分析は、エピジェネティックレベルでのB細胞を同定し、複合サンプルにおける他の全ての細胞、例えば他の血液細胞又は免疫細胞等からB細胞を区別することができる。本発明は、特に複合サンプルにおけるB細胞を定量する改良された方法を更に提供する。該方法は、好ましくは全血及び／又は非トリプシン処理組織中の細胞を精製及び／又は富化する工程なしに行うことできる。

【0 0 0 2】

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

【背景技術】

【0 0 0 3】

B細胞又はBリンパ球は、適応免疫系の体液性免疫におけるリンパ球の一種である。B細胞は、B細胞の外表面上でのB細胞受容体（BCR）として知られるタンパク質の存在により、T細胞及びナチュラルキラー細胞（NK細胞）等の他のリンパ球と区別することができる。この特別な受容体タンパク質によって、B細胞が特異抗原と結合することができる。哺乳動物では、骨髄において未成熟B細胞が形成される。

【0 0 0 4】

B細胞の主要機能は、抗原に応じた抗体に抗原提示細胞（APC）の役割をさせること、及び抗原相互作用による活性化の後に記憶B細胞へと発達することである。B細胞はまた、免疫調節機能のシグナル伝達に用いられるサイトカイン（タンパク質）を放出する。

【0 0 0 5】

高等生物は、個体のほとんどの細胞がDNAコードの全く同じ相補体を含有するにもかかわらず、様々な組織型において異なるパターンの遺伝子発現を行い、維持しなければならない。大抵の遺伝子調節は細胞の現状に応じた一時的なものであり、外部刺激によって変化する。一方で、持続的な調節は、エピジェネティクス（DNAの基本的な遺伝コードを変

10

20

30

40

50

更しない遺伝的な調節パターン)の基本的法則(role)である。DNAメチル化は後成的調節の典型的な形態であり、安定な細胞記憶として機能し、様々な細胞型の長期同一性を維持するうえで重要な役割を果たす。近年、後成的調節の他の形態が発見された。「5番目の塩基」である5-メチルシトシン(mC)に加えて、6番目の塩基(5-ヒドロキシメチルシトシン、hmC)、7番目の塩基(5-ホルミルシトシン、fC)及び8番目の塩基(5-カルボキシシトシン、cC)を見出すことができる(非特許文献1)。

【0006】

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

10

【0007】

異常なDNAメチル化は、しばしば健常細胞から癌性細胞への形質転換を伴う。観察される影響には、ゲノム規模での低メチル化、腫瘍抑制遺伝子のメチル化の増大及び多くの癌遺伝子の低メチル化がある(例えば非特許文献3、非特許文献4及び非特許文献5に概説される)。メチル化プロファイルは腫瘍特異的である(すなわち、特定の遺伝子又は更には個々のCpGのメチル化パターンの変化は、特定の腫瘍型の診断に用いられる)ことが認識されており、現在では、膀胱癌、乳癌、結腸癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、肺癌及び前立腺癌の大規模な診断マーカー群が存在する(例えば非特許文献5に要約される)。

20

【0008】

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

30

【0009】

特許文献1には、細胞又は細胞の混合物を同定し、血液又は組織中の細胞の分布の変化を定量し、疾患状態、特に癌を診断、予後判定、及び治療するためにDNAメチル化アレイを使用する方法が記載されている。この方法には、新鮮なアーカイブ(archival)サンプルが用いられる。

【0010】

Dai et al.(非特許文献6にて)は、卵巣腫瘍におけるWnt経路遺伝子のプロモーターCpGアイランド(CGIs)でのDNAメチル化を開示しており、患者の無増悪生存(PFS)のバイオマーカーを同定している。DNAメチル化は、臨床パラメーターとは独立して、LRP5遺伝子においてPFSと関連していた(調整済みP<0.05)。疾患進行の危険性の増大に伴い、遺伝子座でのメチル化が増大した。しかしながら、PFSの独立予測因子として最終的に同定されたのは、NKD1及びDVL1でのメチル化のみであった。

40

【0011】

Accomando et al.(非特許文献7にて)は、細胞系列特異的なDNAメチル化パターンが正常なヒト白血球サブセットを区別するものであり、これらのパターンを末梢血におけるこれらのサブセットの検出及び定量化に使用することができることを開示している。DNAメチル化を用いることで、複数の白血球サブセットが同時に定量化され、ヒトT細胞、B細胞、NK細胞、単球、好酸球、好塩基球、及び好中球を区別する細胞系列特異的なDNAメチル化シグネチャが同定された。LRP5には言及されてない。

【先行技術文献】

【特許文献】

50

【 0 0 1 2 】

【特許文献 1】国際公開第2012/162660号

【非特許文献】

【 0 0 1 3 】

【非特許文献 1】Michael J. Booth et al. Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution Science 18 May 2012, Vol. 336 no. 6083 pp. 934-937

【非特許文献 2】Antequera and Bird, Proc Natl Acad Sci USA 90: 11995-9, 1993

【非特許文献 3】Jones and Laird, Nature Genetics 21:163-167, 1999

【非特許文献 4】Esteller, Oncogene 21:5427-5440, 2002

10

【非特許文献 5】Laird, Nature Reviews/Cancer 3:253-266, 2003

【非特許文献 6】Dai et al. Systematic CpG islandmethylation profiling of genes in the wnt pathway in epithelial ovarian canceridentifies biomarkers of progression-free survival. Clin Cancer Res. 2011 Jun15;17(12):4052-62. Epub 2011 Apr 1.

【非特許文献 7】Accomando et al. Quantitative reconstructionof leukocyte subsets using DNA methylation. Genome Biol. 2014 Mar 5;15(3)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 4 】

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

20

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 5 】

本発明は、サンプルにおいてB細胞を同定する方法であって、該方法が、低密度リボタンパク質受容体関連タンパク質5 (LRP5) に対する哺乳動物 (例えばヒト) の遺伝子領域における少なくとも1つのCpG位置のメチル化状態 (バイサルファイト転換性) を分析することを含み、好ましくは、分析される該遺伝子領域が、配列番号1に基づく / による単位複製配列に位置しており、非B細胞と比較した場合の該遺伝子領域の脱メチル化がB細胞の指標となる、方法を提供することにより上記の課題を解決する。

30

【 0 0 1 6 】

低密度リボタンパク質受容体関連タンパク質5 (LRP5、又はBMND1、EVR1、EVR4、HBM、LR3、LRP7、OPPG、OPS、OPTA1、VBCH2) のタンパク質は、受容体媒介エンドサイトーシス過程においてリガンドと結合し、リガンドを内在化させる膜貫通型低密度リボタンパク質受容体である。このタンパク質は、Wntタンパク質によるシグナル伝達のためのフリックルドタンパク質ファミリー成員との共受容体としても作用し、元々はヒトにおいて1型糖尿病との関連に基づきクローニングされたものである。ヒトLRP5に対する遺伝子は、第11染色体、68312609 ~ 68449275フォワード鎖、Ensembl-ID : ENSG00000162337に見られる。

【 0 0 1 7 】

本発明について、遺伝子領域は、LRP5に関連し、LRP5をコードするゲノム領域を全て含むものとする。このため、遺伝子領域には、LRP5に属する、エンハンサー領域、プロモーター領域 (複数の場合もある) 、イントロン、エクソン、及び非コード領域 (5'領域及び / 又は3'領域) が含まれる。したがって、少なくとも1つのCpG位置が、分析する遺伝子内の転写開始部位、プロモーター領域、5'又は3'非翻訳領域、エクソン、イントロン、エクソン / イントロン境界より上流の5'領域、及び / 又は転写停止部位より下流の3'領域に存在する、本発明による方法が好ましい。

40

【 0 0 1 8 】

本発明はさらに、本発明者らによる特異的エピジェネティックマーカーとしてのLRP5遺伝子領域の驚くべき同定に基づいており、B細胞の同定及び上記分析の臨床上の日常的な適用を可能にする。

50

【 0 0 1 9 】

本発明に関して、特に配列番号1によるLRP5ゲノム領域において、B細胞を同定することができる。驚くべきことに、バイサルファイト変換性及び非変換性シトシンの識別パターンは、配列番号1による単位複製配列を用いて示される、B細胞に関わる配列番号1によるゲノム領域に、特に配列番号2及び／又は配列番号3によるバイサルファイト変換される配列において、特にまた排他的に限定される。

【 0 0 2 0 】

本発明者らは、B細胞において、開示されるCpGモチーフがほぼ完全に脱メチル化され（すなわち、70%超、好ましくは80%超、好ましくは90%超、最も好ましくは95%超）、その一方で同じモチーフは、他の免疫細胞全てにおいて完全にメチル化されていることを例証することができた。10

【 0 0 2 1 】

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

【 0 0 2 2 】

次いで、本発明による方法の別の好ましい態様は、上記の分析する領域のメチル化頻度の相対量と、例えばGAPDH等の対照遺伝子のメチル化頻度の相対量との比較に基づいてB細胞の相対量を定量することを更に含む。したがって、上記定量化は、本明細書において記載及び分析された、LRP5の遺伝子領域の（例えば、配列番号1の）バイサルファイト変換性DNAと非変換性DNAとの比に基づいて行われる。B細胞の相対量の定量化は、LRP5の細胞特異的領域のバイサルファイト変換性DNAの相対量と、細胞非特異的遺伝子（好ましくは「対照遺伝子」又は「対照領域」と呼ばれ、例えばGAPDHの遺伝子等である）のバイサルファイト変換性DNAの相対量との（好ましくは並行又は同時の）分析に基づいていることが最も好ましい。20

【 0 0 2 3 】

本発明による方法の更に好ましい実施の形態では、上記バイサルファイト転換性の分析は、配列番号1に基づいて好適に設計することのできる好適なプライマー対の少なくとも1つのプライマー、好ましくは配列番号2～配列番号4のいずれかによるオリゴマーを用いた増幅を含む。30

【 0 0 2 4 】

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

【 0 0 2 5 】

好ましくは、例えばMSP、HeavyMethyl、Scorpion、MS-SNUPE、MethylLight、バイサルファイトシークエンシング、メチル特異的制限アッセイ及び／又はデジタルPCR（例えば、Kristensen and HansenPCR-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics, and Response to Treatment Clinical Chemistry 55:8 1471-1483 (2009)を参照されたい）の状況における増幅には、ポリメラーゼ酵素、PCR増幅反応若しくは化学的増幅反応、又は下に記載されるような当業者に既知の他の増幅方法が含まれる。40

【 0 0 2 6 】

増幅によって、本発明による方法（複数の場合もある）を行うための特に好ましい「ツール」である、LRP5遺伝子領域の単位複製配列が生成される。結果として、配列番号4又は配列番号5によるオリゴマー、又は本明細書で言及されるような配列番号4及び5又は6及50

び7又は9及び10に基づくプライマー対によって増幅される単位複製配列は、本発明の好ましい実施の形態を構成する。したがって、配列番号1～配列番号3の配列（必要な場合、その相補的配列）を、増幅用のプライマーを設計するため、すなわち、関連の配列の「ビーコン」として作用させるために使用することができる。同様に、追加のプライマー及びプローブを配列番号1による単位複製配列に基づいて設計することができる。増幅を、ゲノム及び／又はバイサルファイト（すなわち、「変換された」）DNA配列のいずれかにおいて行うことができる。

【0027】

当業者であれば更に、分析する部位の量を最小限にするためにCpG位置の特定のサブセット、例えば配列番号1による単位複製配列のCpG位置から選択されるCpG位置の少なくとも1つを選択することができ、配列番号1による単位複製配列2249番のCpG位置3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22及び23から選択することが好ましい。これらの位置は、作製及び分析する単位複製配列の5'末端から数値的に数えられ、図1中の105、114、159、163、167、171、174、194、208、213、218、223、261、272、285、306、336、357、384、423及び433として示される。3、4、5、6、7、8、9又は10の位置の組合せが好ましく、この分析により本発明において有益となるに十分なデータ及び／又は情報が得られる。

【0028】

当業者であれば更に、分析する部位の量を最小限するするためにCpG位置の特定のサブセット、例えばLRP5特異的バイサルファイト変換性領域（配列番号1）の単位複製配列2249番のCpG位置5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16及び／又は17の少なくとも1つ又は配列番号1によるバイサルファイト変換性領域に存在する全ての部位を選択することができるだろう。

【0029】

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

【0030】

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

【0031】

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

【0032】

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

【0033】

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

【0034】

10

20

30

40

50

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

【0035】

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

10

20

30

40

50

【0036】

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

【0037】

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

【0038】

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

【0039】

本発明による方法の別の好ましい態様は、配列番号4～配列番号11のいずれかによるオリゴマー又は配列番号1～配列番号3による単位複製配列に関する。

【0040】

本発明の更に別の好ましい態様は次に、哺乳動物においてB細胞を、LRP5の遺伝子領域のCpG位置のバイサルファイト接近性の分析に基づいて同定、定量及び／又はモニタリングするキットであって、本明細書に記載されるような本発明による方法の実行用の成分、特にa)バイサルファイト試薬、及びb)配列番号1による領域のCpG位置から選択されるCpG位置のメチル化状態の分析用の材料、例えば配列番号4～配列番号11による配列から選択されるオリゴマーを含む、キットに関する。

【0041】

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

【0042】

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

10

【0043】

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

20

【数1】

バイオマーカー比=a/b

$$a = \sum (C \text{ 及び } / \text{ 又は } mC \text{ 及び } / \text{ 又は } hmC \text{ 及び } / \text{ 又は } fC \text{ 及び } / \text{ 又は } cC)$$

$$b = \sum (C \text{ 及び } / \text{ 又は } mC \text{ 及び } / \text{ 又は } hmC \text{ 及び } / \text{ 又は } fC \text{ 及び } / \text{ 又は } cC)$$

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

30

【0044】

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

40

【0045】

さらに、DNA修飾とは別に、ヒストンもDNAと核タンパク質との相互作用を変える翻訳後修飾を行う。修飾にはメチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、sumoylation、シトルリン化及びADP-リボース化がある。ヒストンH2A、H2B及びH3のコアも修飾することができる。ヒストン修飾は、遺伝子調節、DNA修復、染色体凝縮（有糸分裂）及び精子形成（減数分裂）等の多様な生物学的過程において作用する。また、これらの修飾において、特定の修飾パターンは様々な細胞型、細胞段階、分化状態に特異的であり、

50

バイサルファイト転換性又は或る特定の細胞及び細胞段階を同定する同様の方法においてこのようなパターンを分析することができる。本発明はまた、これらの修飾の使用を含むする。

【0046】

まとめると、LRP5遺伝子領域、特にマーカーとして本明細書に記載の単位複製配列を使用することにより、本発明者らは、サンプルにおける他の細胞型、例えば他の血液細胞に関連してB細胞を非常に特異的に同定、定量、特に差別化している。

【0047】

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

【0048】

図1に、本発明による単位複製配列2249番（配列番号1）におけるCpG部位の分析を示している。表中の横のボックスは、分析される単位複製配列におけるCpG位置（例えば、CpG 1、2等）に対応するものであり、その位置（CpG 3、4 . . . 等）に対応する、105、114、159、163、167、171、174、194、208、213、218、223、261、272、285、306、336、357、384、423、及び433）を示しており、縦列は、分析される細胞型に対応するものである。底部の略称は、それぞれBLC25がBリンパ球であり、CTL01がCD8⁺細胞傷害性T細胞であり、GR C52が顆粒球であり、MOC26がCD14⁺単球であり、NKC15がCD56⁺NK細胞であり、THC14がCD4⁺ヘルパーT細胞である。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0049】

配列番号1は、本発明による単位複製配列AMP2249のゲノム配列を示す。

【0050】

配列番号2及び配列番号3は、本発明の好ましいqPCRアッセイシステムのバイサルファイト変換される標的領域の配列を示している。

【0051】

配列番号4～配列番号11は、本発明による特異的なオリゴマー（プライマー及びプローブ）の配列を示す。

【実施例】

【0052】

実施例1

B細胞を同定するために、以下の配列（AMP2249、配列番号1）によるヒトゲノム領域に由来するバイサルファイト変換型サンプルにqPCRを行った。関連するCpGを灰色で網掛け処理している。

【表1】

```
GTATCCAAATGTCCTGCCCTCCAGGTTCATTCCTTGCCTGTAATAATATCACGGTAAAGGAAAATGTTTGTAAAG  
AGACACAGTCCTGTCACCTGAGCACAGTCGGCTGTTCTCGGTTCTCTGTGGCTTCCAGGCTGCAAGGTGCCCAT  
TGGTATTGCGGCCGTGCGCCGGCGGGCATGAATTAGCTGTGCGCCCTGGCTGCTGACGGGACGCCCTCGCCTCGA  
CTGAAAACCTACCTGGAGCTGCTCACCCCAGGGCAACCTGTAAGAAAAACGTGAAATTCTGTGCGCTTGTCAGCTG  
CAGCACGGCTGAGGTCCCAGGGCAGAGGCTCGTGCAGGGCACCTCACCAAGCCGGGATGTCAGAGCTGGCC  
AGAAGGAGCGGTGCCCATGGAGGGCTGCCAGAGGCTTCCAGGGTGTACGTTGGCAGTGAAATT  
AGAGTCGGCAGAGGAGGCCCTGGGTACACAGGGAT
```

【0053】

血液細胞亜型における単位複製配列領域の実際のエピジェネティックプロファイリングについて、分析される免疫細胞集団は以下の通りとした（図1を参照されたい）。

BLC25 = Bリンパ球

CTL01 = CD8⁺細胞傷害性T細胞

GRC52 = 頸粒球

MOC26 = CD14⁺単球

NKC15 = CD56⁺NK細胞

THC14 = CD4⁺ヘルパーT細胞

【0054】

開発された好ましいqPCRアッセイシステムのバイナルファイト変換される標的領域は以下の通りとした：

TpG特異的（配列番号2）：

【表2】

```
ATATCCAAATATCCTACCCCTCAAATTCATTCTTACCGATAAAATATCACATTTAAAAAATTTTATTAAA  
AAACCCAATCTATCACCTAACACAATCACTATTCTCAATTCTCTATAACTTTCAAACCTACAAATACCCAT  
TAATATTACACCATACACCACAAACATAAAATTAACTATACACCTAACTACTAACAAACACCTCACCTCAA  
CTAAAAAACTACCTAAACACTACCCAAAAACACATAAAAAAACATAAAAATTCTATCACTTATTACAACCTAA  
CAACACAACTATAAAATCCCATAAACAAAACCTCATACAAAACACCTCACCAACCAACAAATATCAAAACTAAC  
AAAAAAACAAATACCCATAAAAACCTACCAATACCCAAAAACCTTCAGAAATATCACATTAACAAATAAAATTC  
AAAATCAACAAAAAAACCTAAATCACACACAAAAAT
```

10

【0055】

CpG特異的（配列番号3）：

【表3】

```
ATATCCAAATATCCTACCCCTCAAATTCATTCTTACCGATAAAATATCACGTAAAAAATTTTATTAAA  
AAACCCAATCTATCACCTAACACAATCGCTATTCTCGATTCTCTATAACTTTCAAACCTACAAATACCCAT  
TAATATTACGACCGTACGCCGACGAACATAAAATTAACTATACCGCTTAACCTAACGAAACGCTCGCTCGA  
CTAAAAAACTACCTAAACACTACCCAAAAACACGTTAAAAATTCTATCGCTTATTACAACCTAA  
CAACACGACTATAAAATCCCATAAACAAAACCTCGTACAAAACACCTCACCAACCGAAATATCAAAACTAAC  
AAAAAAACGATACCCATAAAAACCTACCAATACCCAAAAACCTTCAGAAATATCACGTAAACAAATAAAATTC  
AAAATCGAACAAAAAAACCTAAATCACACACAAAAAT
```

20

【0056】

アッセイ標的領域の各配列を下線処理している。

【0057】

以下のプライマー及びプローブをqPCRに使用した：

【0058】

【表4】

Forward amplification primer	2249r	ATATCCAAATATCCTACCCCTCC (SEQ ID No. 4) 配列番号
Reverse amplification primer	2249q	ATTTTGATGATTAGGGTT (SEQ ID No. 5)
Forward primer TpG-specific	2249r_T_fw	AATATTACAACCATAACACCAACAA (SEQ ID No. 6)
Reverse primer TpG-specific	2249q_T_rev	AAGTGATAGAATTATGTTTTTATG (SEQ ID No. 7)
Probe TpG-specific	2249_TP	TTAGTTGAGGTGAGGTGTTTTTAGT (SEQ ID No. 8)
Forward primer CpG-specific	2249r_C_fw	ATTAATATTACGACCGTACGC (SEQ ID No. 9)
Reverse primer CpG-specific	2249q_C_rev	CGATAGAATTACGTTTTTAC (SEQ ID No. 10)
Probe CpG-specific	2249_CP	ACGAAACGCCCTGCCTCGA (SEQ ID No. 11)

フォワード増幅プライマー
リバース増幅プライマー

30

TpG特異的フォワードプライマー

TpG特異的リバースプライマー

TpG特異的プローブ

CpG特異的フォワードプライマー

CpG特異的リバースプライマー

CpG特異的プローブ

40

【0059】

TpG特異的PCRシステムの特異性は、図2に示されるように試験テンプレート（プラスミドDNA）を用いて実証した。

【0060】

細胞型特異性（qPCRにより測定）を以下の通りに認めた：

【0061】

【表5】

免疫細胞集団 Immune cell population	CP値 CP-value TpG-PCR	TpGコピー数 TpG-copies	CP値 CP-value CpG-PCR	CpGコピー数 CpG-copies	B細胞 B-cells [%]	
CD8+ cells CD8+細胞	35.3	11.9	26.3	5323.3	0.22	
CD4+ cells CD4+細胞	34.1	17.9	26.4	4900.0	0.36	
B-cells	25.1	8213.3	31.7	128.0	98.47	10
Granulocytes 顆粒球	35.0	13.1	26.1	5980.0	0.22	
Monocytes 単球	33.9	19.6	25.9	6913.3	0.28	
GRK01	31.4	94	26.8	3723.3	2.46	

【図面の簡単な説明】

【0062】

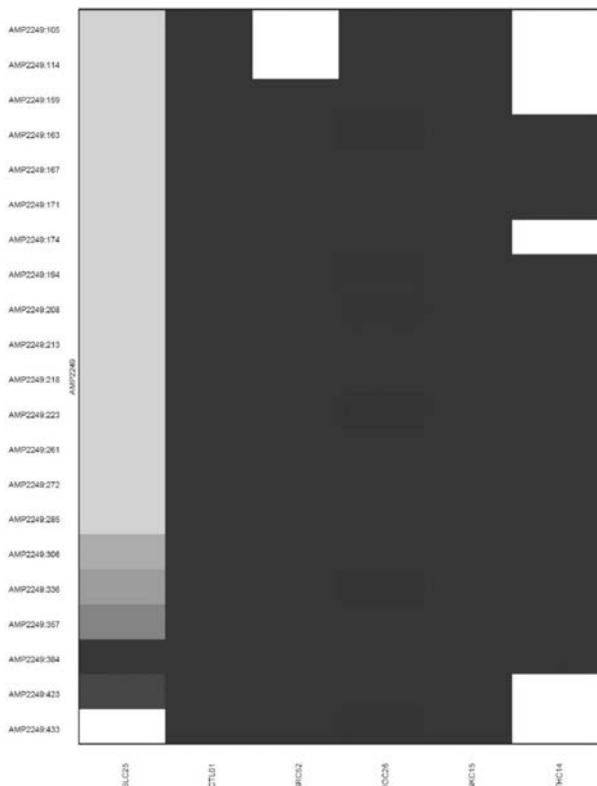
20

【図1】血液細胞亜型における単位複製配列領域の実際のエピジェネティックプロファイリングについて、分析される免疫細胞集団は以下の通りとした。図1を参照。

【図2】TpG特異的PCRシステムの特異性は、図2に示されるように試験テンプレート（プラスミドDNA）を用いて実証した。

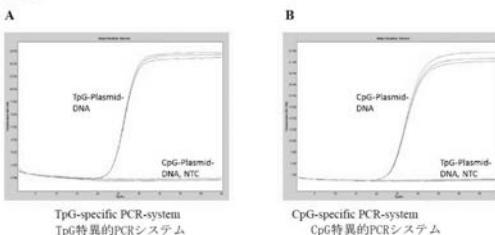
【図1】

Figure 1



【図2】

Figure 2



【配列表】

2018529345000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2016/072579						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 ADD.								
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q								
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched								
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO 2014/170497 A2 (EPIONTIS GMBH [DE]) 23 October 2014 (2014-10-23) claim 19; table 4B ----- X WO 2013/033627 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; FIRESTEIN GARY [US]; NAKANO KAZUHISA [US]) 7 March 2013 (2013-03-07) abstract -& DATABASE GSN_NUC_ALERT [Online] GSN; 7 March 2013 (2013-03-07), XP002765222, Database accession no. GS_NUC_ALERT:W02013033627.9841 -/-</td> <td style="padding: 2px;">1-15 13-15</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2014/170497 A2 (EPIONTIS GMBH [DE]) 23 October 2014 (2014-10-23) claim 19; table 4B ----- X WO 2013/033627 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; FIRESTEIN GARY [US]; NAKANO KAZUHISA [US]) 7 March 2013 (2013-03-07) abstract -& DATABASE GSN_NUC_ALERT [Online] GSN; 7 March 2013 (2013-03-07), XP002765222, Database accession no. GS_NUC_ALERT:W02013033627.9841 -/-	1-15 13-15
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
X	WO 2014/170497 A2 (EPIONTIS GMBH [DE]) 23 October 2014 (2014-10-23) claim 19; table 4B ----- X WO 2013/033627 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; FIRESTEIN GARY [US]; NAKANO KAZUHISA [US]) 7 March 2013 (2013-03-07) abstract -& DATABASE GSN_NUC_ALERT [Online] GSN; 7 March 2013 (2013-03-07), XP002765222, Database accession no. GS_NUC_ALERT:W02013033627.9841 -/-	1-15 13-15						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.						
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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 15 December 2016	Date of mailing of the international search report 12/01/2017							
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Knudsen, Henrik							

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/072579

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>-& DATABASE GSN_NUC_ALERT [Online] GSN; 7 March 2013 (2013-03-07), XP002765223, Database accession no. GS_NUC_ALERT:W02013033627.254059 -&-DATABASE GSN_NUC_ALERT [Online]</p> <p>7 March 2013 (2013-03-07), XP002765224, Database accession no. GS_NUC_ALERT:W02013033627.167227 -----</p>	
A	<p>MARKUS VIEWEG ET AL: "Methylation analysis of histone H4K12ac-associated promoters in sperm of healthy donors and subfertile patients", CLINICAL EPIGENETICS, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 7, no. 1, 19 March 2015 (2015-03-19), page 31, XP021218602, ISSN: 1868-7083, DOI: 10.1186/S13148-015-0058-4 abstract</p> <p>-----</p>	1-15
A	<p>KÜPERS L.K. ET AL: "DNA Methylation mediates the effect of maternal smoking during pregnancy on birth weight of the offspring", EUROPEAN JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY, HEALTHY LIVING: THE EUROPEAN CONGRESS OF EPIDEMIOLOGY, 201, vol. 30, 082, 25 June 2015 (2015-06-25), - 27 June 2015 (2015-06-27), pages 753-754, XP002764897, DOI: 10.1007/s10654-015-0072-z abstract</p> <p>-----</p>	1-15
X,P	<p>WO 2015/181779 A2 (PHILIBERT ROBERT [US]) 3 December 2015 (2015-12-03) abstract</p> <p>-& DATABASE Geneseq [Online]</p> <p>19 May 2016 (2016-05-19), "Human chromosome 11 CpG probe cg00464927 genomic target region.", XP002765225, retrieved from EBI accession no. GSN:BCN75900 Database accession no. BCN75900 sequence</p> <p>-/-</p>	13-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/072579

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>-& DATABASE Geneseq [Online] 19 May 2016 (2016-05-19), "Human chromosome 11 CpG probe cg13738327 genomic target region.", XP002765226, retrieved from EBI accession no. GSN:BCN74502 Database accession no. BCN74502 sequence -----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2016/072579

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2014170497	A2 23-10-2014	CA 2904658	A1	23-10-2014
		CN 105189783	A	23-12-2015
		EP 2986735	A2	24-02-2016
		JP 2016515397	A	30-05-2016
		US 2016024578	A1	28-01-2016
		WO 2014170497	A2	23-10-2014
WO 2013033627	A2 07-03-2013	US 2013129668	A1	23-05-2013
		WO 2013033627	A2	07-03-2013
WO 2015181779	A2 03-12-2015	AU 2015265431	A1	10-11-2016
		CA 2947128	A1	03-12-2015
		SG 11201608817T	A	29-11-2016
		WO 2015181779	A2	03-12-2015

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,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,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(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,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG

F ターム(参考) 2G045 AA24 DA13 FB01 FB02
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QR08 QR42 QR55 QR62 QX01
QX02