

(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2015-533127

(P2015-533127A)

(43) 公表日 平成27年11月19日 (2015. 11. 19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/00 (2006. 01)	A 6 1 P 31/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
A 6 1 P 37/06 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 0 7	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 118 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-535894 (P2015-535894)	(71) 出願人	515072026
(86) (22) 出願日	平成25年10月8日 (2013. 10. 8)		セント ジュード チルドレンズ リサーチ ホスピタル
(85) 翻訳文提出日	平成27年5月13日 (2015. 5. 13)		St. Jude Children's Research Hospital
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/063934		アメリカ合衆国 テネシー州 38105 -3678 メンフィス ダニー トーマス プレイス 262 オフィス オブ テクノロジー ライセンシング メール ストップ 742
(87) 国際公開番号	W02014/058915		
(87) 国際公開日	平成26年4月17日 (2014. 4. 17)		
(31) 優先権主張番号	61/711, 193	(74) 代理人	100073184
(32) 優先日	平成24年10月8日 (2012. 10. 8)		弁理士 柳田 征史
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/712, 679	(74) 代理人	100090468
(32) 優先日	平成24年10月11日 (2012. 10. 11)		弁理士 佐久間 剛
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/784, 607		
(32) 優先日	平成25年3月14日 (2013. 3. 14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

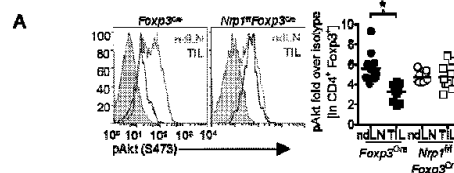
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ニューロピリン1：セマフォリン軸を介した、制御性T細胞の安定性および機能の制御に基づく療法

(57) 【要約】

本発明は、ニューロピリン1：セマフォリン軸を介して制御性T細胞の安定性および機能に影響を与えることによる、癌、感染ならびに様々な炎症状態および自己免疫状態の処置を対象とする。

FIGURE 7



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

制御性 T 細胞 (T r e g) の機能を阻害するまたはその安定性を低下させる方法であって、前記 T r e g におけるニューロピリン 1 (N r p 1) : セマフォリン軸の阻害剤に、前記 T r e g を曝露することを含む方法。

【請求項 2】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸の阻害剤は、膜貫通型セマフォリンを発現する細胞上の膜貫通型セマフォリンと、前記 T r e g 上の N r p 1 との間の相互作用を阻害する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記膜貫通型セマフォリンはクラス I V セマフォリンである、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記クラス I V セマフォリンは S e m a 4 a である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記膜貫通型セマフォリンを発現する細胞は、通常の T 細胞 (T c o n v)、古典的樹状細胞 (c D C) および形質細胞様樹状細胞 (p D C) からなる群より選択される、請求項 2 記載の方法。

【請求項 6】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸の阻害剤は、前記 T r e g における N r p 1 - V E G F 相互作用に影響を与えない、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

前記 T r e g は被検体内にあり、前記 N r p 1 : セマフォリン軸の阻害剤が該被検体に投与される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

前記被検体は癌を有する、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

前記癌はメラノーマまたは膠芽細胞腫である、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

前記被検体は、T r e g が殺菌免疫 (sterilizing immunity) を阻止する感染症を有する、請求項 7 記載の方法。

【請求項 11】

前記感染症は慢性感染症である、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

前記被検体はヒトである、請求項 7 記載の方法。

【請求項 13】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸の阻害剤は抗体である、請求項 1 ~ 12 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 14】

前記抗体は、前記 T r e g における N r p 1 - V E G F 相互作用に影響を与えない、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸の阻害剤はセマフォリン分子である、請求項 1 ~ 12 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 16】

前記セマフォリン分子は、可溶型の膜貫通型セマフォリンタンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体もしくはアナログであり、該可溶型の膜貫通型セマフォリンタンパク質、フラグメント、誘導体またはアナログは、T r e g において N r p 1 : セマフォリン軸を増強することなく、T r e g 上の N r p 1 に高い親和性および特異性で結合することができる、請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

前記膜貫通型セマフォリンはクラス I V セマフォリンである、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

前記クラス I V セマフォリンは Sema4a である、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

前記セマフォリン分子は、C 末端で IgG1 の Fc 領域に融合した Sema4a 細胞外ドメインを含む、請求項 15 記載の方法。

【請求項 20】

前記 Nr p 1 : セマフォリン軸の阻害剤は、Nr p 1 タンパク質の可溶性細胞外ドメインまたはそのフラグメントもしくは誘導体もしくはアナログであり、該 Nr p 1 タンパク質の可溶性細胞外ドメイン、フラグメント、誘導体またはアナログは、膜貫通型セマフォリンに高い親和性および特異性で結合し、それにより前記膜貫通型セマフォリンが前記 T r e g において Nr p 1 : セマフォリン軸を増強するのを防止することができる、請求項 1 ~ 12 いずれか 1 項記載の方法。

10

【請求項 21】

前記膜貫通型セマフォリンはクラス I V セマフォリンである、請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】

前記クラス I V セマフォリンは Sema4a である、請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

前記 Nr p 1 : セマフォリン軸の阻害剤は、前記 T r e g において Nr p 1 タンパク質の発現を阻害する、請求項 1 ~ 12 いずれか 1 項記載の方法。

20

【請求項 24】

前記 Nr p 1 : セマフォリン軸の阻害剤は、s i R N A またはアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

前記 Nr p 1 : セマフォリン軸の阻害剤は、Nr p 1 がその下流のシグナル伝達経路に関与するのを防止する、請求項 1 ~ 12 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 26】

前記 Nr p 1 : セマフォリン軸の阻害剤は小分子である、請求項 1 ~ 12 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 27】

30

制御性 T 細胞 (T r e g) の機能を強化するまたはその安定性を増加させる方法であって、前記 T r e g におけるニューロピリン 1 (Nr p 1) : セマフォリン軸のアゴニストに、前記 T r e g を曝露することを含む方法。

【請求項 28】

前記 Nr p 1 : セマフォリン軸のアゴニストは、膜貫通型セマフォリンを発現する細胞上の膜貫通型セマフォリンと、前記 T r e g 上の Nr p 1 との間の相互作用を強化する、請求項 27 記載の方法。

【請求項 29】

前記膜貫通型セマフォリンはクラス I V セマフォリンである、請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】

40

前記クラス I V セマフォリンは Sema4a である、請求項 29 記載の方法。

【請求項 31】

前記膜貫通型セマフォリンを発現する細胞は、通常の T 細胞 (T c o n v) 、古典的樹状細胞 (c D C) および形質細胞様樹状細胞 (p D C) からなる群より選択される、請求項 28 記載の方法。

【請求項 32】

前記 Nr p 1 : セマフォリン軸のアゴニストは、インビトロで前記 T r e g に投与される、請求項 27 記載の方法。

【請求項 33】

前記 T r e g は、被検体から抽出され、前記 Nr p 1 - セマフォリン軸のアゴニストの

50

存在下、エキソピボで増幅され、次いで (i) 前記被検体に再導入されるか、あるいは (i i) 別の被検体に投与される、請求項 3 2 記載の方法。

【請求項 3 4】

前記増幅された T r e g を投与される被検体は、自己免疫性疾患または炎症性疾患を有する、請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 3 5】

前記被検体はヒトである、請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 3 6】

前記 T r e g は被検体内にあり、前記 N r p 1 : セマフォリン軸のアゴニストは該被検体に投与される、請求項 2 7 記載の方法。

10

【請求項 3 7】

前記被検体は、自己免疫性疾患または炎症性疾患を有する、請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 3 8】

前記被検体はヒトである、請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 3 9】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸のアゴニストはセマフォリン分子である、請求項 2 7 ~ 3 8 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 4 0】

前記セマフォリン分子は多量体セマフォリン分子である、請求項 3 9 記載の方法。

【請求項 4 1】

前記セマフォリン分子は、表面またはビーズ上に固定化されている、請求項 3 9 記載の方法。

20

【請求項 4 2】

前記セマフォリン分子は、クラス I V セマフォリンまたはそのフラグメントもしくは誘導体もしくはアナログである、請求項 3 9 記載の方法。

【請求項 4 3】

前記クラス I V セマフォリンは S e m a 4 a である、請求項 4 2 記載の方法。

【請求項 4 4】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸のアゴニストは抗体である、請求項 2 7 ~ 3 8 いずれか 1 項記載の方法。

30

【請求項 4 5】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸のアゴニストは小分子である、請求項 2 7 ~ 3 8 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 4 6】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸のアゴニストは、前記 T r e g において N r p 1 発現を高める、請求項 2 7 ~ 3 8 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 4 7】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸のアゴニストは、N r p 1 のその下流のシグナル伝達経路への関与を高める、請求項 2 7 ~ 3 8 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 4 8】

疾患の処置を必要とする被検体の疾患を処置する方法であって、前記被検体の制御性 T 細胞 (T r e g) におけるニューロピリン 1 (N r p 1) : セマフォリン軸を阻害することを含む方法。

40

【請求項 4 9】

膜貫通型セマフォリンを発現する細胞上の膜貫通型セマフォリンと、前記被検体の T r e g 上の N r p 1 との間の相互作用を阻害することを含む、請求項 4 8 記載の方法。

【請求項 5 0】

前記膜貫通型セマフォリンはクラス I V セマフォリンである、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 5 1】

前記クラス I V セマフォリンは S e m a 4 a である、請求項 5 0 記載の方法。

50

【請求項 52】

前記膜貫通型セマフォリンを発現する細胞は、通常の T 細胞 (T c o n v)、古典的樹状細胞 (c D C) および形質細胞様樹状細胞 (p D C) からなる群より選択される、請求項 49 記載の方法。

【請求項 53】

前記疾患は癌である、請求項 48 記載の方法。

【請求項 54】

前記癌は、メラノーマまたは膠芽細胞腫である、請求項 53 記載の方法。

【請求項 55】

前記疾患は、T r e g が殺菌免疫を阻止する感染症である、請求項 48 記載の方法。

10

【請求項 56】

前記感染症は慢性感染症である、請求項 55 記載の方法。

【請求項 57】

前記被検体はヒトである、請求項 48 記載の方法。

【請求項 58】

前記被検体の T r e g におけるニューロピリン 1 (N r p 1) : セマフォリン軸の阻害剤の治療有効量を、前記被検体に投与することを含む、請求項 48 ~ 57 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 59】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸の阻害剤は抗体である、請求項 58 記載の方法。

20

【請求項 60】

前記抗体は、前記被検体の T r e g における N r p 1 - V E G F 相互作用に影響を与えない、請求項 59 記載の方法。

【請求項 61】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸の阻害剤はセマフォリン分子である、請求項 58 記載の方法。

【請求項 62】

前記セマフォリン分子は、可溶型の膜貫通型セマフォリントタンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体もしくはアナログであり、該可溶型の膜貫通型セマフォリントタンパク質、フラグメント、誘導体またはアナログは、前記 T r e g における N r p 1 : セマフォリン軸を増強することなく、T r e g 上の N r p 1 に高い親和性および特異性で結合することができる、請求項 61 記載の方法。

30

【請求項 63】

前記膜貫通型セマフォリンはクラス I V セマフォリンである、請求項 62 記載の方法。

【請求項 64】

前記クラス I V セマフォリンは S e m a 4 a である、請求項 63 記載の方法。

【請求項 65】

前記セマフォリン分子は、C 末端で I g G 1 の F c 領域に融合した S e m a 4 a 細胞外ドメインを含む、請求項 61 記載の方法。

【請求項 66】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸の阻害剤は、N r p 1 タンパク質の可溶性細胞外ドメインまたはそのフラグメントもしくは誘導体もしくはアナログであり、該 N r p 1 タンパク質の可溶性細胞外ドメイン、フラグメント、誘導体またはアナログは、膜貫通型セマフォリンに高い親和性および特異性で結合することができ、それにより前記膜貫通型セマフォリンが前記被検体の T r e g において N r p 1 : セマフォリン軸を増強することを妨げる、請求項 58 記載の方法。

40

【請求項 67】

前記膜貫通型セマフォリンはクラス I V セマフォリンである、請求項 66 記載の方法。

【請求項 68】

前記クラス I V セマフォリンは S e m a 4 a である、請求項 67 記載の方法。

50

【請求項 69】

前記Nr p 1：セマフォリン軸の阻害剤は、前記被検体のT r e gにおいてNr p 1タンパク質の発現を阻害する、請求項58記載の方法。

【請求項 70】

前記Nr p 1：セマフォリン軸の阻害剤は、s i R N Aまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項69記載の方法。

【請求項 71】

前記Nr p 1：セマフォリン軸の阻害剤は、Nr p 1がその下流のシグナル伝達経路に介入するのを防止する、請求項58記載の方法。

【請求項 72】

前記Nr p 1：セマフォリン軸の阻害剤は小分子である、請求項58記載の方法。

【請求項 73】

追加の免疫調節治療を前記被検体に行うことをさらに含む、請求項58記載の方法。

【請求項 74】

前記追加の免疫調節治療は、治療ワクチン、チェックポイント阻害剤またはアクチベーターを投与することを含む、請求項73記載の方法。

【請求項 75】

化学療法または放射線療法を前記被検体に行うことをさらに含む、請求項53記載の方法。

【請求項 76】

抗生物質を前記被検体に投与することをさらに含む、請求項55記載の方法。

【請求項 77】

疾患の処置を必要とする被検体の疾患を処置する方法であって、前記被検体の制御性T細胞（T r e g）においてニューロピリン1（Nr p 1）：セマフォリン軸を活性化することを含む方法。

【請求項 78】

膜貫通型セマフォリンを発現する細胞上の膜貫通型セマフォリンと、前記被検体のT r e g上のNr p 1との間の相互作用を強化することを含む、請求項77記載の方法。

【請求項 79】

前記膜貫通型セマフォリンはクラスI Vセマフォリンである、請求項78記載の方法。

【請求項 80】

前記クラスI VセマフォリンはS e m a 4 aである、請求項79記載の方法。

【請求項 81】

前記膜貫通型セマフォリンを発現する細胞は、通常のT細胞（T c o n v）、古典的樹状細胞（c D C）および形質細胞様樹状細胞（p D C）からなる群より選択される、請求項78記載の方法。

【請求項 82】

前記被検体は、自己免疫性疾患または炎症性疾患を有する、請求項77記載の方法。

【請求項 83】

前記被検体はヒトである、請求項77記載の方法。

【請求項 84】

前記被検体のT r e gにおけるニューロピリン1（Nr p 1）：セマフォリン軸のアゴニストの治療有効量を、前記被検体に投与することを含む、請求項77～83いずれか1項記載の方法。

【請求項 85】

前記Nr p 1：セマフォリン軸のアゴニストはセマフォリン分子である、請求項84記載の方法。

【請求項 86】

前記セマフォリン分子は多量体セマフォリン分子である、請求項85記載の方法。

【請求項 87】

10

20

30

40

50

前記セマフォリン分子は、表面またはビーズ上に固定化されている、請求項 8 5 記載の方法。

【請求項 8 8】

前記セマフォリン分子は、クラス I V セマフォリンまたはそのフラグメントもしくは誘導体もしくはアナログである、請求項 8 5 記載の方法。

【請求項 8 9】

前記クラス I V セマフォリンは S e m a 4 a である、請求項 8 8 記載の方法。

【請求項 9 0】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸のアゴニストは抗体である、請求項 8 4 記載の方法。

【請求項 9 1】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸のアゴニストは小分子である、請求項 8 4 記載の方法。

【請求項 9 2】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸のアゴニストは、前記被検体の T r e g において N r p 1 発現を高める、請求項 8 4 記載の方法。

【請求項 9 3】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸のアゴニストは、N r p 1 のその下流のシグナル伝達経路への関与を高める、請求項 8 4 記載の方法。

【請求項 9 4】

T r e g を強化するまたは炎症を阻止する別の治療を前記被検体に行うことをさらに含む、請求項 8 4 記載の方法。

【請求項 9 5】

被検体におけるワクチンの有効性を高めるための方法であって、前記被検体の T r e g におけるニューロピリン 1 (N r p 1) : セマフォリン軸の阻害剤の有効量を前記被検体に投与することを含む方法。

【請求項 9 6】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸の阻害剤は抗体である、請求項 9 5 記載の方法。

【請求項 9 7】

前記抗体は、前記被検体の T r e g における N r p 1 - V E G F 相互作用に影響を与えない、請求項 9 6 記載の方法。

【請求項 9 8】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸の阻害剤はセマフォリン分子である、請求項 9 5 記載の方法。

【請求項 9 9】

前記セマフォリン分子は、可溶型の膜貫通型セマフォリントンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体もしくはアナログであり、該可溶型の膜貫通型セマフォリントンパク質、フラグメント、誘導体またはアナログは、前記 T r e g における N r p 1 : セマフォリン軸を増強することなく、T r e g 上の N r p 1 に高い親和性および特異性で結合することができる、請求項 9 8 記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記膜貫通型セマフォリンはクラス I V セマフォリンである、請求項 9 9 記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記クラス I V セマフォリンは S e m a 4 a である、請求項 1 0 0 記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記セマフォリン分子は、C 末端で I g G 1 の F c 領域に融合した S e m a 4 a 細胞外ドメインを含む、請求項 9 8 記載の方法。

【請求項 1 0 3】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸の阻害剤は、N r p 1 タンパク質の可溶性細胞外ドメインまたはそのフラグメントもしくは誘導体もしくはアナログであり、該 N r p 1 タンパク質の可溶性細胞外ドメイン、フラグメント、誘導体またはアナログは、膜貫通型セマフォリンに高い親和性および特異性で結合することができ、それにより前記膜貫通型セマフォ

10

20

30

40

50

リンが前記被検体の T r e g において N r p 1 : セマフォリン軸を増強することを妨げる、請求項 9 5 記載の方法。

【請求項 1 0 4】

前記膜貫通型セマフォリンはクラス I V セマフォリンである、請求項 1 0 3 記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記クラス I V セマフォリンは S e m a 4 a である、請求項 1 0 4 記載の方法。

【請求項 1 0 6】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸の阻害剤は、前記被検体の T r e g において N r p 1 タンパク質の発現を阻害する、請求項 9 5 記載の方法。

10

【請求項 1 0 7】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸の阻害剤は、s i R N A またはアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 1 0 6 記載の方法。

【請求項 1 0 8】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸の阻害剤は、N r p 1 がその下流のシグナル伝達経路に介入するのを防止する、請求項 9 5 記載の方法。

【請求項 1 0 9】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸の阻害剤は小分子である、請求項 9 5 記載の方法。

【請求項 1 1 0】

前記被検体はヒトである、請求項 9 5 記載の方法。

20

【請求項 1 1 1】

前記ワクチンは、癌または感染症の処置または予防用である、請求項 9 5 記載の方法。

【請求項 1 1 2】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸の阻害剤は、前記ワクチンが前記被検体に投与される前に前記被検体に投与される、請求項 9 5 記載の方法。

【請求項 1 1 3】

前記 N r p 1 : セマフォリン軸の阻害剤は、前記ワクチンと一緒に前記被検体に投与される、請求項 9 5 記載の方法。

【請求項 1 1 4】

制御性 T 細胞 (T r e g) 上のニューロピリン 1 (N r p 1) : セマフォリン相互作用を阻害する単離抗体。

30

【請求項 1 1 5】

前記セマフォリンはクラス I V セマフォリンである、請求項 1 1 4 記載の抗体。

【請求項 1 1 6】

前記クラス I V セマフォリンは S e m a 4 a である、請求項 1 1 5 記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の説明】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、すべてについてその全体を本明細書に援用する 2 0 1 3 年 3 月 1 4 日に提出された米国仮特許出願第 6 1 / 7 8 4 , 6 0 7 号明細書、2 0 1 2 年 1 0 月 1 1 日に提出された米国仮特許出願第 6 1 / 7 1 2 , 6 7 9 号明細書、および 2 0 1 2 年 1 0 月 8 日に提出された米国仮特許出願第 6 1 / 7 1 1 , 1 9 3 号明細書の利益を主張する。

40

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

米国政府は、米国国立衛生研究所 (N a t i o n a l i n s t i t u t e s o f H e a l t h) からの G r a n t N o s . A I 0 9 1 9 7 7 、 A I 0 3 9 4 8 0 および A I 0 9 8 3 8 3 、ならびに N C I C o m p r e h e n s i v e C a n c e r C e n t e r S u p p o r t C O R E 助成金 C A 2 1 7 6 5 から準備された資金に基づき、本発明に一定の権利を有する。

【技術分野】

50

【0002】

本発明は、ニューロピリン1：セマフォリン軸（Neuropilin-1:Semaphorin axis）を介して制御性T細胞の安定性および機能に影響を与えることによる、癌、感染症ならびに様々な炎症状態および自己免疫状態の処置を対象とする。

【背景技術】

【0003】

制御性T細胞（Treg）は、自己免疫の予防、免疫病変の抑制および免疫ホメオスタシスの維持に重要な役割を果たしている¹。一方で、Tregは慢性ウイルス感染に対する効果的な抗腫瘍免疫および殺菌免疫（sterilizing immunity）の大きな障害にもなる。このことから、広範囲に及ぶ免疫反応を形成および制御するTregの能力が浮き彫りになる。Foxp3は、Tregの発生、維持および安定性に必要なマスター転写制御因子である^{2, 3}。非機能的Foxp3を有するマウスおよびヒトでは、Tregが欠如して、マウスのScurfyと呼ばれる致死性全身性自己免疫状態、およびヒトのIPEXが発症することから、免疫ホメオスタシスの維持におけるTregの重要性が明らかになる^{2, 3}。さらに、5つの転写因子（transcription factor quintet）は、Tregの転写シグニチャーを「ロックインし（lock-in）」、その安定性を強化する冗長性遺伝子スイッチ（redundant genetic switch）を形成する⁴。一部の外的因子、たとえばトランスフォーミング増殖因子-β（TGFβ）が、Foxp3の安定性および機能を維持および／または強化することが示されているが⁵、別の細胞外因性経路または因子が存在するかどうかは、不明である。

【0004】

組織常在性Tregは、感染または炎症反応に応答し、それにより免疫性病変を抑制する最初のリンパ系細胞の一部である^{6, 7}。一部の環境、たとえば腫瘍および慢性感染症は、高度炎症性である場合があり、したがって意図されない炎症または自己免疫疾患を限定することを目的として、Tregの安定性および機能を強化するための追加のメカニズムまたは遺伝的プログラムを必要とすることがある。その結果、多くの免疫性疾患はTreg機能の悪化あるいは限定を特徴とし、診療所では種々の疾患の処置のためTregの養子移入が積極的に進められているので、Tregの安定性および機能を制御する分子経路の特定には大きな関心が払われている。

【0005】

Tregの安定性と可塑性は、最近かなり議論の的になっている。一部の研究では、系譜特異的転写因子、たとえばTbet、IRF4およびSTAT3により誘導される特定タイプのT細胞応答の制御において同転写因子の決定的な役割が定義されてきた⁸⁻¹⁰。一方、他の研究では、実証可能な割合のTregが炎症部位において「ex-Treg」に分化し、エフェクター機能を獲得することが示唆されてきた¹¹。Tregがその転写プロファイルを変化させて、その安定性を維持し、炎症部位の免疫を調節し、その別の細胞運命を制御する細胞外因性因子および分子機構は、依然として不明である。

【0006】

ニューロピリン1（Nrp1；たとえば、GenBank受託番号NM_008737（マウス）およびNG_030328（ヒト）のほか、様々なアイソフォームを参照されたい）は、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）およびクラスIIIセマフォリンSema3aの両方に対してチロシンキナーゼ受容体の膜結合型共受容体である。Nrp1は、軸索ガイダンス、血管新生、細胞生存、遊走および浸潤において多岐にわたる役割を果たす¹⁵。Nrp1は、軸索成長円錐の崩壊を誘導し、特権を有する組織への浸潤を防ぐものであり、マウスでその遺伝子を欠損させると、胚性致死が引き起こされる¹⁶。Nrp1は、血小板由来増殖因子β（PDGFβ）およびトランスフォーミング増殖因子β（TGFβ）と相互作用することも示されている^{17, 18}。Nrp1は、Tregに高発現することが示されている¹⁹⁻²¹。T細胞におけるNrp1の役割は示唆されてきたが²²、TregにおけるNrp1の役割は特定されておらず、Nrp1はヒトTregに発現しないことが示唆されてきた²⁵。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

背景技術のセクションに記載したように、当該技術分野において、Tregの安定性および機能を制御する分子経路を特定し、その知識を癌、感染症および様々な炎症状態および自己免疫状態を処置するための新規な治療剤の開発に使用することが強く求められている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、制御性T細胞(Treg)により捕捉された(Treg-restricted)ニューロピリン1(Nrp1)が、(たとえば、通常のT細胞(Tconv)上、古典的樹状細胞(cDC)上および/または形質細胞様樹状細胞(pDC)上の)細胞表面リガンドセマフォリン-4a(Sema4a)と相互作用してTreg機能を増強し、炎症部位でのその生存を強化することを立証することにより、こうした必要性および他の必要性を満たすものである。

【0009】

一実施形態では、本発明は、制御性T細胞(Treg)の機能を阻害するまたはその安定性を低下させる方法であって、前記Tregにおいて前記Tregをニューロピリン1(Nrp1):セマフォリン軸の阻害剤に曝露することを含む方法を提供する。一実施形態では、Nrp1:セマフォリン軸の阻害剤は、膜貫通型セマフォリン(たとえば、クラスIVセマフォリンなど、たとえば、Sema4a)を発現する細胞(たとえば、通常のT細胞(Tconv)、古典的樹状細胞(cDC)または形質細胞様樹状細胞(pDC))上のそうした膜貫通型セマフォリンと、Treg上のNrp1との間の相互作用を阻害する。一実施形態では、Nrp1:セマフォリン軸の阻害剤は、前記TregにおけるNrp1-VEGF相互作用に影響を与えない。一実施形態では、前記Tregは被検体(たとえば、ヒト)内にあり、Nrp1:セマフォリン軸の阻害剤を被検体に投与する。一実施形態では、被検体は癌(たとえば、メラノーマまたは膠芽細胞腫)を有する。もう1つの実施形態では、被検体は、Tregが殺菌免疫を阻止する感染症(たとえば、慢性感染症)を有する。一実施形態では、Nrp1:セマフォリン軸の阻害剤は抗体(たとえば、前記TregにおけるNrp1-VEGF相互作用に影響を与えない抗体)である。もう1つの実施形態では、Nrp1:セマフォリン軸の阻害剤は、セマフォリン分子(たとえば、可溶性の膜貫通型セマフォリントランスポタン[たとえば、クラスIVセマフォリン、たとえば、Sema4a]またはそのフラグメントもしくは誘導体もしくはアナログ[たとえば、C末端でIgG1のFc領域に融合したSema4a細胞外ドメインなど様々な融合分子を含む]であり、前記可溶性の膜貫通型セマフォリントランスポタン、フラグメント、誘導体またはアナログは、Treg上のNrp1に高い親和性および特異性で、前記TregにおいてNrp1:セマフォリン軸を増強することなく結合することができる)。なおもう1つの実施形態では、Nrp1:セマフォリン軸の阻害剤は、Nrp1タンパク質の可溶性細胞外ドメインまたはそのフラグメントもしくは誘導体もしくはアナログであり、Nrp1タンパク質の前記可溶性細胞外ドメイン、フラグメント、誘導体またはアナログは、膜貫通型セマフォリン(たとえば、クラスIVセマフォリン、たとえば、Sema4a)に高い親和性および特異性で結合し、それにより前記膜貫通型セマフォリンが前記TregにおいてNrp1:セマフォリン軸を増強するのを防止することができる。さらなる実施形態では、Nrp1:セマフォリン軸の阻害剤は、TregにおいてNrp1タンパク質の発現を阻害する(たとえば、siRNAまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドである)。さらなる実施形態では、Nrp1:セマフォリン軸の阻害剤は、Nrp1がその下流のシグナル伝達経路に参与するのを防止する。1つの特定の実施形態では、Nrp1:セマフォリン軸の阻害剤は、C末端アミノ酸配列SEA(C末端PDZドメイン結合モチーフ)を含むNrp1タンパク質の細胞質ドメインとPTENタンパク質との間のシグナル伝達経路を阻害する。こうした阻害剤は、たとえば、C末端アミノ酸配列SE

10

20

30

40

50

Aを含むNr p 1タンパク質の細胞質ドメインの全部または一部を含むNr p 1タンパク質のペプチドもしくは小分子もしくはフラグメントまたはその誘導体もしくはアナログであってもよい。1つの特定の実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸の阻害剤は小分子である。

【0010】

別の実施形態では、本発明は、制御性T細胞（T r e g）の機能を強化するまたはその安定性を増加させる方法であって、前記T r e gにおいて前記T r e gをニューロピリン1（Nr p 1）：セマフォリン軸のアゴニストに曝露することを含む方法を提供する。一実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸のアゴニストは、膜貫通型セマフォリン（たとえば、クラスIVセマフォリン、たとえば、Sema4a）を発現する細胞（たとえば、通常

10

のT細胞（T c o n v）、古典的樹状細胞（c D C）または形質細胞様樹状細胞（p D C））上のそうした膜貫通型セマフォリンとT r e g上のNr p 1との間の相互作用を強化する。一実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸のアゴニストはインビトロでT r e gに投与される。一実施形態では、T r e gは被検体（たとえば、ヒト）から抽出され、Nr p 1－セマフォリン相互作用のアゴニストの存在下、エキソビボで増幅され、次いで（i）被検体に再導入されるか、あるいは（i i）別の被検体に投与される。一実施形態では、増幅したT r e gを投与される被検体は、自己免疫性疾患または炎症性疾患を有する。もう1つの実施形態では、T r e gは被検体（たとえば、ヒト）内にあり、Nr p 1：セマフォリン軸のアゴニストを被検体に投与する。一実施形態では、被検体は、自己免疫性疾患または炎症性疾患を有する。一実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸のア

20

ゴニストは、セマフォリン分子（たとえば、多量体セマフォリン分子および／または表面またはビーズ上に固定化されたセマフォリン分子）である。一実施形態では、セマフォリン分子は、クラスIVセマフォリン（たとえば、Sema4a）またはそのフラグメントもしくは誘導体もしくはアナログである。一実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸のアゴニストは抗体である。もう1つの実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸のアゴニストは小分子である。なおもう1つの実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸のアゴニストは、T r e g内のNr p 1発現を高める。さらなる実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸のアゴニストは、Nr p 1のその下流のシグナル伝達経路への関与を高める。

【0011】

別の実施形態では、本発明は、疾患の処置を必要とする被検体（たとえば、ヒト）の疾患を処置する方法であって、被検体の制御性T細胞（T r e g）においてニューロピリン1（Nr p 1）：セマフォリン軸を阻害することを含む方法を提供する。一実施形態では、本方法は、膜貫通型セマフォリン（たとえば、クラスIVセマフォリン、たとえば、Sema4a）を発現する細胞（たとえば、通常

30

のT細胞（T c o n v）、古典的樹状細胞（c D C）および／または形質細胞様樹状細胞（p D C））上のそうした膜貫通型セマフォリンと、被検体のT r e g上のNr p 1との間の相互作用を阻害することを含む。一実施形態では、疾患は癌（たとえば、メラノーマまたは膠芽細胞腫）である。もう1つの実施形態では、疾患はT r e gが殺菌免疫を阻止する感染症（たとえば、慢性感染症）である。一実施形態では、本方法は、被検体のT r e gにおけるニューロピリン1（Nr p 1）：セマフォリン軸の治療有効量の阻害剤を被検体に投与することを含む。一実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸の阻害剤は抗体（たとえば、被検体のT r e gにおけるNr p 1－V E G F相互作用に影響を与えない抗体）である。もう1つの実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸の阻害剤は、セマフォリン分子である（たとえば、可溶性の膜貫通型セマフォリ

40

ンタンパク質〔たとえば、クラスIVセマフォリン、たとえば、Sema4a〕またはそのフラグメントもしくは誘導体もしくはアナログ〔たとえば、C末端でI g G 1のF c領域に融合したSema4a細胞外ドメインなど様々な融合分子を含む〕であり、前記可溶性の膜貫通型セマフォリ

50

ンタンパク質、フラグメント、誘導体またはアナログは、T r e g上のNr p 1に、前記T r e gにおけるNr p 1：セマフォリン軸を増強することなく、高い親和性および特異性で結合することができる）。なおもう1つの実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸の阻害剤は、Nr p 1タンパク質の可溶性細胞外ド

メインまたはそのフラグメントもしくは誘導体もしくはアナログであり、Nr p 1タンパク質の前記可溶性細胞外ドメイン、フラグメント、誘導体またはアナログは、膜貫通型セマフォリン（たとえば、クラスI Vセマフォリン、たとえば、Sema 4 a）に高い親和性および特異性で結合し、それにより前記膜貫通型セマフォリンが被検体のT r e gにおいてNr p 1：セマフォリン軸を増強するのを防止することができる。さらなる実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸の阻害剤は、被検体のT r e gにおいてNr p 1タンパク質の発現を阻害する（たとえば、s i R N Aまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドである）。さらなる実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸の阻害剤は、Nr p 1がその下流のシグナル伝達経路に参与するのを防止する。1つの特定の実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸の阻害剤は、C末端アミノ酸配列S E A（C末端P D Zドメイン結合モチーフ）を含むNr p 1タンパク質の細胞質ドメインとP T E Nタンパク質との間のシグナル伝達経路を阻害する。こうした阻害剤は、たとえば、C末端アミノ酸配列S E Aを含むNr p 1タンパク質の細胞質ドメインの全部または一部を含むNr p 1タンパク質のペプチドもしくは小分子もしくはフラグメントまたはその誘導体もしくはアナログであってもよい。1つの特定の実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸の阻害剤は小分子である。もう1つの実施形態では、本方法は、追加の免疫調節治療薬（たとえば、治療ワクチン、チェックポイント阻害剤またはアクチベーター）を被検体に投与することをさらに含む。なおもう1つの実施形態では、本方法は被検体に化学療法または放射線療法（癌の処置のため）を行うこと、または抗生物質（感染症の処置のため）を投与することをさらに含む。

10

20

【0012】

別の実施形態では、本発明は、疾患の処置を必要とする被検体（たとえば、ヒト）の疾患を処置する方法であって、被検体の制御性T細胞（T r e g）においてニューロピリン1（Nr p 1）：セマフォリン軸を活性化することを含む方法を提供する。一実施形態では、本方法は、膜貫通型セマフォリン（たとえば、クラスI Vセマフォリン、たとえば、Sema 4 a）を発現する細胞（たとえば、通常のT細胞（T c o n v）、古典的樹状細胞（c D C）および／または形質細胞様樹状細胞（p D C））上のそうした膜貫通型セマフォリンと、被検体のT r e g上のNr p 1との間の相互作用を高めることを含む。一実施形態では、被検体は、自己免疫性疾患または炎症性疾患を有する。一実施形態では、本方法は、被検体のT r e gにおけるニューロピリン1（Nr p 1）：セマフォリン軸の治療有効量のアゴニストを被検体に投与することを含む。一実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸のアゴニストは、セマフォリン分子（たとえば、多量体セマフォリン分子および／または表面またはビーズ上に固定化されたセマフォリン分子）である。一実施形態では、セマフォリン分子は、クラスI Vセマフォリン（たとえば、Sema 4 a）またはそのフラグメントもしくは誘導体もしくはアナログである。一実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸のアゴニストは抗体である。もう1つの実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸のアゴニストは小分子である。なおもう1つの実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸のアゴニストは、被検体のT r e g内のNr p 1発現を高める。さらなる実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸のアゴニストは、Nr p 1のその下流のシグナル伝達経路への関与を高める。もう1つの実施形態では、本方法は、T r e gを強化するまたは炎症を阻止する別の治療を被検体に行うことをさらに含む。

30

40

【0013】

別の実施形態では、本発明は、被検体（たとえば、ヒト）におけるワクチン（たとえば、癌または感染症の処置用または予防用のワクチン）の有効性を高める方法であって、被検体のT r e gにおけるニューロピリン1（Nr p 1）：セマフォリン軸の有効量の阻害剤を被検体に投与することを含む方法を提供する。一実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸の阻害剤は抗体（たとえば、被検体のT r e gにおけるNr p 1－V E G F相互作用に影響を与えない抗体）である。もう1つの実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸の阻害剤は、セマフォリン分子である（たとえば、可溶性の膜貫通型セマフォリンタンパク質 [たとえば、クラスI Vセマフォリン、たとえば、Sema 4 a] またはそのフラグ

50

メントもしくは誘導体もしくはアナログ〔たとえば、C末端でIgG1のFc領域に融合したSema4a細胞外ドメインなど様々な融合分子を含む〕であり、前記可溶性の膜貫通型セマフォリンタンパク質、フラグメント、誘導体またはアナログは、Treg上のNrplに、前記TregにおけるNrpl：セマフォリン軸を増強することなく、高い親和性および特異性で結合することができる）。なおもう1つの実施形態では、Nrpl：セマフォリン軸の阻害剤は、Nrplタンパク質の可溶性細胞外ドメインまたはそのフラグメントもしくは誘導体もしくはアナログであり、Nrplタンパク質の前記可溶性細胞外ドメイン、フラグメント、誘導体またはアナログは、膜貫通型セマフォリン（たとえば、クラスIVセマフォリン、たとえば、Sema4a）に高い親和性および特異性で結合し、それにより前記膜貫通型セマフォリンが被検体のTregにおいてNrpl：セマフォリン軸を増強するのを防止することができる。さらなる実施形態では、Nrpl：セマフォリン軸の阻害剤は、被検体のTregにおいてNrplタンパク質の発現を阻害する（たとえば、siRNAまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドである）。さらなる実施形態では、Nrpl：セマフォリン軸の阻害剤は、Nrplがその下流のシグナル伝達経路に参与するのを防止する。1つの特定の実施形態では、Nrpl：セマフォリン軸の阻害剤は、C末端アミノ酸配列SEA（C末端PDZドメイン結合モチーフ）を含むNrplタンパク質の細胞質ドメインとPTENタンパク質との間のシグナル伝達経路を阻害する。こうした阻害剤は、たとえば、C末端アミノ酸配列SEAを含むNrplタンパク質の細胞質ドメインの全部または一部を含むNrplタンパク質のペプチドもしくは小分子もしくはフラグメントまたはその誘導体もしくはアナログであってもよい。1つの特定の実施形態では、Nrpl：セマフォリン軸の阻害剤は小分子である。本方法の一実施形態では、Nrpl：セマフォリン軸の阻害剤を、ワクチンを被検体に投与する前に被検体に投与する。本方法のもう1つの実施形態では、Nrpl：セマフォリン軸の阻害剤をワクチンと一緒に被検体に投与する。

【0014】

別の実施形態では、本発明は、制御性T細胞（Treg）上のニューロピリン1（Nrpl）：セマフォリン（たとえば、クラスIVセマフォリン、たとえば、Sema4a）相互作用を阻害する単離された抗体を提供する。

【0015】

本発明の前述および他の態様は、以下の説明、特許請求の範囲および図面において当業者に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1A～1Eから、セマフォリン4aが制御性T細胞の機能を増強することが立証される。図1Aは、上部ウェルにおいて表記の細胞型の存在下で制御性T細胞（Treg）を刺激したとき、下部ウェルにおいて抗CD3／抗CD28コートビーズで刺激したTconvのトランスウェル抑制アッセイ（Transwell suppression assay）を示す。一部の条件では、Treg刺激の前に共培養細胞集団を固定した。図1Bは、セマフォリン-4a（Sema4a）に対する中和抗体を加えたトランスウェル抑制アッセイを示す。図1Cは、CD4⁺またはCD8⁺Tconvに、スクランブルドsiRNAもしくはSema4a siRNAをモックトランスフェクトまたはトランスフェクトし、次いでトランスウェル抑制アッセイにおいてブースト能力を評価した。図1Dは、上部ウェルにおいてTregの単独培養物を、マウスIgG1またはSema4a-Igでコートしたビーズで刺激したトランスウェル抑制アッセイを示す。図1Eは、エキソビボで直接選別した固定した樹状細胞のほか、セマフォリン-4a（Sema4a）に対する中和抗体を加えたトランスウェル抑制アッセイを示す。結果は、5回〔A、D〕または3回〔B、C、E〕の実験の平均を表す。対応のないt検定により*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ である。

【図2-1】図2A～2Iから、NrplがTreg上でセマフォリン-4aのリガンドとして作用することが立証される。図2Aは、Tconv：Treg共培養物を中和抗N

10

20

30

40

50

r p 1 抗体またはそのアイソタイプコントロールの存在下で刺激したトランスウェル抑制アッセイを示す。図 2 B は、F o x p 3^{C r e} または N r p 1^{f / f} F o x p 3^{C r e} T r e g を用いたトランスウェル抑制アッセイを示す。図 2 C は、上部ウェルの W T、I L-10^{- / -} または E b i 3^{- / -} T r e g を、下部ウェルの S e m a 4 a-I g ビーズおよび W T または d n T G F b R I I T c o n v と共培養して用いたトランスウェル抑制アッセイを示す。図 2 D は、I L-10 および I L-35 に対する中和抗体の存在下または非存在下で S e m a 4 a-I g ビーズと培養した T r e g を用いたトランスウェル抑制アッセイを示す。図 2 E は、抗 C D 3 / C D 28 コートビーズ、I L-2、およびアイソタイプ (Iso) あるいは S e m a 4 a-I g コートビーズで刺激してから 48 時間後の T r e g における、アネキシン V および 7-AAD 染色のフローサイトメトリー解析を集計したものである。図 2 F は、臍帯血から選別し、抗 C D 3、抗 C D 28 および I L-2 と表記の期間培養したヒト T c o n v または T r e g 細胞上の N R P-1 発現を示す。図 2 G は、8 日間増幅したヒト T r e g を、N R P-1 に対する遮断抗体の存在下または非存在下、I g G もしくは h S e m a 4 a-I g コートビーズ、あるいは固定した自家ヒト T e f f と培養したトランスウェル抑制アッセイを示す。結果は、3 回 [A、D~F、H、I] または 5 回 [B、C、G] の実験の平均を表す。対応のない t 検定により * は p < 0.05、** は p < 0.01、*** は p < 0.001 である。

【図 2-2】図 2-1 の続き。図 2 H は、組換え m N r p 1 でコートしたプレートを、アイソタイプコントロール、抗 N r p 1 または抗 S e m a 4 a の存在下、S e m a 4 a-I g またはマウス I g G 1 とインキュベートした、E L I S A を用いた結合アッセイを示す。S e m a 4 a-I g またはマウス I g G 1 は、抗アイソタイプ抗体を用いて検出した。図 2 I は、中和抗 N r p 1 抗体またはそのアイソタイプコントロールの存在下、T c o n v : T r e g 共培養物を刺激したトランスウェル抑制アッセイを示す。結果は、3 回 [A、D~F、H、I] または 5 回 [B、C、G] の実験の平均を表す。対応のない t 検定により * は p < 0.05、** は p < 0.01、*** は p < 0.001 である。

【図 3】図 3 A ~ 3 C から、N r p 1 欠乏 T r e g が F o x p 3 欠乏動物の自己免疫疾患を予防することが立証される。図 3 A は、注射を投与しない、あるいは 1×10^6 F o x p 3^{C r e} または N r p 1^{f / f} F o x p 3^{C r e} T r e g を 1 ~ 2 日齢で投与した F o x p 3⁻ 雄マウスの生存曲線を示す。図 3 B は、A と同様に処置したマウスの 5 週目の臨床スコアを示す。図 3 C は、A と同様に処置したマウス由来の肝臓、肺および耳介（合算）の組織学的スコアを示す。結果は、3 回の独立した実験を表す。1 元配置分散分析により ** は p < 0.01 [A]、対応のない t 検定により ** は p < 0.001 [B ~ C]、n s は有意差なし、p > 0.05 である。

【図 4-1】図 4 A ~ 4 J から、N r p 1 欠乏 T r e g が抗腫瘍反応または高度炎症性大腸炎を抑制できないことが立証される。図 4 A は、 1.25×10^5 M C 38 メラノーマ細胞を s. c. 投与した F o x p 3^{C r e} および N r p 1^{f / f} F o x p 3^{C r e} マウスの腫瘍増殖曲線（上）および生存率プロット（下）を示す。図 4 B は、マウスに 1.25×10^5 E L 4 胸腺腫を i. d. 投与した以外は図 4 A と同様である。図 4 C は、マウスに 1.25×10^5 B 16 メラノーマを i. d. 投与した以外は図 4 A と同様である。図 4 D は、17 ~ 20 日前に $2.5 \sim 10 \times 10^5$ B 16 細胞を i. v. 注射した F o x p 3^{C r e} または N r p 1^{f / f} F o x p 3^{C r e} マウスの肺転移数を示す。図 4 E は、18 日前に B 16 を i. d. 注射した F o x p 3^{C r e} または N r p 1^{f / f} F o x p 3^{C r e} マウス由来の腫瘍浸潤リンパ球のフローサイトメトリー解析を表にしたものである。図 4 F は、 1.25×10^5 B 16 メラノーマを i. d. 投与した C 57 / B L 6 マウスの腫瘍増殖曲線を示す。腫瘍が触知可能になったとき（5 日目、矢印で示す）、マウスに抗 N r p 1 またはそのアイソタイプコントロールの注射の投与を開始した（初回量 400 μ g、3 日ごとに 200 μ g）。図 4 G は、大腸炎を誘導するため 4×10^5 C D 4⁺ C D 45 R B⁺ C D 25⁻ 細胞を投与しあるいは投与せず、次いで大腸炎の検出後 P B S、または F o x p 3^{C r e} もしくは N r p 1^{f / f} F o x p 3^{C r e} マウス由来の 1×10^6 T r e g を投与した R a g 2^{- / -} マウスの大腸の組織像を示す。結果は、5 回（A ~

C、I～J n =マウス10～25匹)、3回(D、E、F、H n =マウス8～17匹)または4回(G)の実験の平均を表す。1元配置分散分析(A～C、I～J)または対応のない t 検定(D～F、H)により*は $p<0.05$ 、**は $p<0.01$ 、***は $p<0.001$ である。

【図4-2】図4-1の続き。図4Hは、ndLN、dLNまたはTILにおける様々な免疫細胞のSema4a発現を示す。図4Iは、週2回アイソタイプコントロール、抗Sema4aまたは抗Nrpl(100 μ g)の注射と同時に 1.25×10^5 B16メラノーマをi.d.投与したC57/BL6マウスの腫瘍増殖曲線を示す。図4Jは、マウスにSema4a-Igを週2回投与した以外はgと同様の腫瘍増殖曲線を示す。結果は、5回(A～C、I～J n =マウス10～25匹)、3回(D、E、F、H n =マウス8～17匹)または4回(G)の実験の平均を表す。1元配置分散分析(A～C、I～J)または対応のない t 検定(D～F、H)により*は $p<0.05$ 、**は $p<0.01$ 、***は $p<0.001$ である。

【図5】図5A～5Dから、Sema4aによるNrplのライゲーションが、Akt-mTORシグナル伝達の調節を介してTregの安定性を促進することが立証される。図5Aは、Foxp3^{Cre}またはNrpl^{f/f}Foxp3^{Cre}TregにおけるAktシグナル伝達のフローサイトメトリー解析を示す。フローサイトメトリーにより精製されたTregを休止状態で放置するか、またはSema4a-Igもしくはアイソタイプコントロールでコートしたビーズの存在下、抗CD3/抗CD28ビーズで一晩刺激した。図5Bは、Sema4a-Igの抗TCRの存在下または非存在下、抗体でコートした脂質二重層で20分刺激したTregの免疫シナプス(IS)におけるAkt活性化のTIRF顕微鏡解析を示す。図5Cは、PMAおよびイオノマイシンで3日間増幅し、続いて500U/mLのrhIL-2中で5～7日間増幅し、3時間血清飢餓状態にし、次いでIPの前に表記の通り3時間刺激したTregを用いたNrplの免疫沈降解析を示す。図5Dは、Foxp3^{Cre}またはPtен^{f/f}Foxp3^{Cre}Tregを用いたトランスウェル抑制アッセイを示す。結果は、3回(A、B、D)の実験の平均であるか、または少なくとも3回の実験(C)の代表例である。対応のない t 検定により*は $p<0.05$ 、**は $p<0.01$ である。

【図6】図6A～6Dから、ニューロピリンがPTENを介してISにおけるAkt活性化を制限することが立証される。図6Aは、図5BのISにおけるpAktの発現(occurrence)を集計したものである。図6Bは、フローサイトメトリーにより精製し、次いで抗TCRおよびIgGあるいはSema4a-Igを含む脂質二重層で刺激したFoxp3^{Cre}またはNrpl^{f/f}Foxp3^{Cre}TregにおけるISのAktおよびpTyрの活性化のTIRF顕微鏡観察を示す。図6Cは、フローサイトメトリーにより精製し、次いで抗TCRおよびIgGあるいはSema4a-Igを含む脂質二重層で20分間刺激したFoxp3^{Cre}またはPtен^{f/f}Foxp3^{Cre}TregにおけるニューロピリンのISへのリクルートメントおよびAktの活性化のTIRF顕微鏡観察を示す。図6Dは、図6CのISにおけるpAktの発現を集計したものである。結果は、3回[A～B]または2回[C～D]の独立した実験の代表例である。1元配置分散分析により***は $p<0.001$ である。

【図7-1】図7A～7Iから、腫瘍浸潤TregがSema4a:Nrplライゲーションと同様のシグニチャーを有することが立証される。図7Aは、腫瘍浸潤TregのAkt活性化を示す。腫瘍を有するFoxp3^{Cre}またはNrpl^{f/f}Foxp3^{Cre}マウスを12日目に屠殺し、ndLNおよびTILを回収した。グラジエント遠心分離後、細胞を直ちに固定し、活性化Aktを染色した。網掛けのヒストグラムはアイソタイプコントロールを示す。結果は、以下にまとめてアイソタイプコントロール染色に対して補正した。腫瘍を有するFoxp3^{Cre}またはNrpl^{f/f}Foxp3^{Cre}マウス由来のndLN、dLNまたはTILのHelios染色(B)、IRF4/ROR γ t染色(C)を示す。結果は、3回の独立した実験の平均を表す。対応のある t 検定[A、 $n=7$]または対応のない t 検定[B-I、 $n=8\sim 25$]により*は $p<0.05$ 、*

*は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ である。

【図7-2】図7-1の続き。Ki67/BrdU染色(D)、切断型カスパーゼ-3染色(E)、Bcl2染色(F)を示す。Ki67/BrdU解析では、回収する前に動物にBrdUを14時間注射した。結果は、3回の独立した実験の平均を表す。対応のあるt検定[A、 $n=7$]または対応のないt検定[B-I、 $n=8\sim 25$]により*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ である。

【図7-3】図7-2の続き。IL-10染色(G)、CD73染色(H)およびLAG-3染色(I)を示す。IL-10では、タンパク質輸送阻害剤の存在下、細胞をPMAおよびイオノマイシンで16時間再刺激した。結果は、3回の独立した実験の平均を表す。対応のあるt検定[A、 $n=7$]または対応のないt検定[B-I、 $n=8\sim 25$]により*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ である。

【図8】図8は、ニューロピリンがどのようにTregの安定性を維持するかを模式的に示す。ナイーブTregは低Aktの活性化を維持し、これが、FoxoおよびKLF2のような因子の活性を介してその静止状態を促進する(左)。活性化時、Sema4a:Nrp1の非存在下で刺激されたTregは、高活性化のAktを有し、これがFoxoの核排出を促進し、Tregの安定性の消失を引き起こす(中央)。Sema4aによるNrp1ライゲーションは、PTENのリクルートメントを介してAkt活性化を制限し、Foxoの核排出を阻害する(右)。これが、安定性およびTreg機能の向上と関連する遺伝的プログラムを促進する。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明は、マウスおよびヒトの通常のT細胞上の免疫細胞表面リガンドセマフォリン-4a(Sema4a)と、制御性T細胞(Treg)により捕捉された受容体ニューロピリン1(Nrp1)とが相互作用して、Treg機能を増強し、その生存を強化するという予想外の観察結果に基づく。Tregにより捕捉されるNrp1を欠失したマウスは、腫瘍誘導性寛容(tumor-induced tolerance)が限定され、したがって特定の腫瘍にかなりの耐性を示すが、任意の自己免疫または炎症症候を発症しない。下記の実施例の欄に記載したように、Nrp1の遮断はさらに、既存の腫瘍に対して治療効果を有する。Nrp1は、免疫学的シナプス(IS)にリクルートされ、ホスファターゼおよびテンシンホモログ(PTEN)を介してAkt活性を抑制し、これがFoxoの核トランスロケーションを促進する。これにより、系譜特異的転写因子の誘導を抑制しながら、Tregの安定性、生存および機能を促進する転写プログラムが誘導される。よって、Nrp1ライゲーションは、高度炎症部位においてTregの安定性および機能を強化するが、免疫ホメオスタシスの維持には必要でないことから、癌および感染症における免疫療法の標的としてNrp1-セマフォリン軸の阻害が注目される一方、自己免疫および炎症の処置における標的としてNrp1-セマフォリン軸の増強も注目される。Nrp1-セマフォリン相互作用をブロックすると、他の部位ではできないが腫瘍においては、Treg機能が限定され、有害な副作用を回避しながら抗腫瘍活性を強化し得る。これは、腫瘍発生のごく初期および転移を含む後期の両方において効果的な癌の処置および予防になり得る。同様のアプローチは、Tregが障害となる他の任意の疾患(たとえば、Tregが殺菌免疫を阻止する慢性感染症、たとえば、HCV感染症、HBV感染症、HIV感染症等)に有効であり得、ワクチン接種を増強するかもしれない。一方、Nrp1-セマフォリン相互作用を強化すると、Tregが機能しない疾患(たとえば、自己免疫および炎症状態)においてTreg機能が増加すると考えられる。Treg機能を増加するためのNrp1-セマフォリン相互作用の強化に関連して、Nrp1-セマフォリン相互作用のアゴニストの存在下で患者のTregをエキソビボ増幅し、次いで同じ患者に再導入する、または別の患者に投与する養子療法アプローチも本明細書に開示される。

【0018】

定義

「Treg」または「制御性T細胞」という用語は、 $CD4^+CD25^-$ およびCD8

$+$ T細胞の増殖および／またはエフェクター機能を抑制する、またはその他の方法で免疫反応を抑制的に調節するCD4 $+$ T細胞をいう。とりわけ、Tregは、ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラーT細胞のほか、他の免疫細胞により媒介される免疫反応をダウンレギュレートすることができる。好ましい実施形態では、本発明のTregはFoxp3 $+$ である。

【0019】

「制御性T細胞機能」または「Tregの機能」という用語は同義で使われ、CD4 $+$ CD25 $^{-}$ またはCD8 $+$ T細胞の増殖の低下またはエフェクターT細胞を介した免疫反応の低下を引き起こすTregの任意の生物学的機能をいう。Treg機能は、当該技術分野において確立された技術により測定することができる。Treg機能の測定に有用なインビトロアッセイの非限定的な例として、下記の実施例の欄に記載したトランスウェル抑制アッセイのほか、より一般的には、ヒト末梢血または臍帯血（またはマウスの脾臓もしくはリンパ節）から精製された標的の通常のT細胞（Tconv）およびTregを、任意選択的に抗CD3 $+$ 抗CD28コートビーズ（または抗原提示細胞（APC）、たとえば、照射脾細胞または精製樹状細胞（DC）または照射PBMC）により活性化し、続いて通常のT細胞の増殖をインビトロ検出する（たとえば、放射性ヌクレオチド（たとえば、 $[^3\text{H}]$ ーチミジン）または蛍光ヌクレオチドの取り込みの測定により、またはCayman Chemical MTT Cell Proliferation Assay Kitにより、またはフローサイトメトリーによる緑色蛍光色素エステルCFSEまたはSeminaphtharhodaf luor（SNARF-1）色素の希釈のモニタリングにより）インビトロアッセイが挙げられる。他の一般的なアッセイは、T細胞のサイトカイン応答を測定する。有用なTreg機能のインビボアッセイとしては、Tregが重要な役割を果たす疾患の動物モデル、たとえば、（1）ホメオスタシスモデル（主としてTregにより抑制される標的細胞として恒常的に増幅するナイーブCD4 $+$ T細胞を用いる）、（2）炎症性腸疾患（IBD）回復モデル（主としてTregにより抑制される標的細胞としてTh1 T細胞（Th17）を用いる）、（3）実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデル（主としてTregにより抑制される標的細胞としてTh17およびTh1 T細胞を用いる）、（4）B16メラノーマモデル（抗腫瘍免疫の抑制）（主としてTregにより抑制される標的細胞としてCD8 $+$ T細胞を用いる）、（5）ナイーブCD4 $+$ CD45RB $^{\text{hi}}$ Tconv細胞をRag1 $^{-/-}$ マウスに移入した養子移入大腸炎における結腸炎症の抑制、および（6）Foxp3 $^{-}$ レスキューモデル（主としてTregにより抑制される標的細胞としてリンパ球を用いる）を用いたアッセイが挙げられる。一プロトコルによれば、すべてのモデルがドナーT細胞集団用のマウスのほか、レシピエント用のRag1 $^{-/-}$ マウスまたはFoxp3 $^{-}$ マウスを必要とする。様々な有用なアッセイのさらなる詳細については、たとえば、Collison and Vignali, *In Vitro Treg Suppression Assays*, Chapter 2 in *Regulatory T Cells: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Kassiotis and Liston eds., Springer, 2011, 707:21-37; Workman et al., *In Vivo Treg Suppression Assays*, Chapter 9 in *Regulatory T Cells: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Kassiotis and Liston eds., Springer, 2011, 119-156; Takahashi et al., *Int. Immunol.*, 1998, 10:1969-1980; Thornton et al., *J. Exp. Med.*, 1998, 188:287-296; Collison et al., *J. Immunol.*, 2009, 182:6121-6128; Thornton and Shevach, *J. Exp. Med.*, 1998, 188:287-296; Asseman et al., *J. Exp. Med.*, 1999, 190:995-1004; Dieckmann et al.

10

20

30

40

50

, J. Exp. Med., 2001, 193:1303-1310; Belkaid, Nature Reviews, 2007, 7:875-888; Tang and Bluestone, Nature Immunology, 2008, 9:239-244; Bettini and Vignali, Curr. Opin. Immunol., 2009, 21:612-618; Dannull et al., J Clin Invest, 2005, 115(12):3623-33; Tsaknaris, et al., J Neurosci Res., 2003, 74:296-308を参照されたい。

【0020】

「制御性T細胞 (Treg) のニューロピリン1 (Nrpl):セマフォリン軸」という用語は、本明細書で使用する場合、セマフォリン (たとえば、通常のT細胞など細胞に発現するセマフォリンまたは組換えセマフォリン)、Nrplのライゲーション、およびその後の下流のシグナル伝達により開始されるシグナル伝達経路をいう。

【0021】

TregのNrpl:セマフォリン軸と併用される「アンタゴニスト」または「阻害剤」という用語は、本明細書において同義で使われ、(i)セマフォリン:Nrplの生産的ライゲーションおよび/または架橋を妨害する、または(ii)TregにおけるNrplのすぐ下流のシグナル伝達の結果を阻害することができる任意の作用物質をいう。Tregに対するNrpl:セマフォリン相互作用の阻害は、下記の実施例の欄に記載したトランスウェル抑制アッセイを含む当該技術分野において公知の方法のいずれかにより評価することができる。

【0022】

TregのNrpl:セマフォリン軸と併用される「アゴニスト」または「増強薬」という用語は、本明細書において同義で使われ、(i)Nrpl:セマフォリンの相互作用を強化する、あるいは(ii)Tregへのセマフォリン刺激およびNrplシグナル伝達を人工的に模倣する、または(iii)TregにおけるNrplのすぐ下流のシグナル伝達の結果を活性化することができる任意の作用物質をいう。Tregに対するNrpl:セマフォリン相互作用の強化は、下記の実施例の欄に記載したトランスウェル抑制アッセイを含む当該技術分野において公知の方法のいずれかにより評価することができる。

【0023】

治療への応用については、本発明のアゴニストおよびアンタゴニストは医薬組成物として使用することができ、任意選択的に本発明の他のアゴニスト/アンタゴニストまたは他の治療分子と組み合わせてもよい。

【0024】

TregのNrpl:セマフォリン軸のアゴニストと併用される「セマフォリン分子」という用語は、本明細書で使用する場合、Treg上のNrplとの相互作用に関与する膜貫通型セマフォリン分子 (たとえば、Sema4a)、様々な表面固定型およびビーズ固定型のそうした分子のほか、Tregの機能の強化または安定性の増加に使用することができるそうした分子の多量体、誘導体、ミュータント、アナログおよびフラグメントを包含する。こうしたアゴニストセマフォリン分子の非限定的な例については下記により詳細に考察され、たとえば、Nrplを可溶性に架橋し、補体を結合できない多量体複合体を構築するIgM由来セマフォリン融合タンパク質が挙げられる。

【0025】

TregのNrpl:セマフォリン軸の阻害剤と併用される「セマフォリン分子」という用語は、本明細書で使用する場合、Treg上のNrplとの相互作用に関与する可溶性の膜貫通型セマフォリン分子 (たとえば、Sema4a) のほか、機能の阻害またはTregの安定性の低下に使用することができるそうした分子の様々な誘導体、ミュータント、アナログおよびフラグメント (様々な融合分子を含む) を包含する。そうした阻害性セマフォリン分子の非限定的な例については、下記により詳細に考察され、たとえば、Nrpl結合において内在性Sema4aとの競合に勝つSema4aの様々な可溶性フラ

グメント、およびその誘導体またはアナログが挙げられる。1つの特定の実施形態では、阻害性セマフォリン分子は、Sema4a細胞外ドメイン（GenBank受託番号NP_038686のMet1-His683フラグメント）とヒトまたはマウスIgG1のFc領域との融合体（C末端で）であるSema4a-Ig融合タンパク質である。

【0026】

「アナログ」という用語は、同一ではないが、類似の機能的特徴または構造的特徴を有する分子をいう。たとえば、ポリペプチドアナログは、天然に存在するポリペプチドと比較してアナログの機能を強化する特定の生化学的修飾を有するものの、天然に存在するポリペプチドの対応する生物活性を保持する。こうした生化学的修飾は、たとえば、リガンド結合を変化させることなくアナログのプロテアーゼ抵抗性、膜透過性を高める、あるいは半減期を延長することができる。アナログは、非天然型アミノ酸を含んでもよい。

10

【0027】

「炎症」という用語は、本明細書で使用する場合、任意の過剰なまたは望ましくない免疫反応をいう。「炎症性疾患」という用語は、本明細書で使用する場合、過剰なまたは望ましくない免疫反応を伴う任意の病変をいう。

【0028】

「約（about）」という用語は、当業者により判定された特定の値が許容誤差範囲内にあることを意味し、許容誤差範囲は、その値がどのように測定または判定されるか、すなわち、測定系の限界によってある程度異なる。たとえば、「約（about）」は、当該技術分野の慣習により許容標準偏差内にあることを意味してもよい。あるいは、「約（about）」は、所定の値の最大±20%、好ましくは最大±10%、一層好ましくは最大±5%、なお一層好ましくは最大±1%の範囲を意味してもよい。あるいは、特に生体システムまたはプロセスに関し、この用語は、ある値の10倍以内、好ましくは2倍以内にあることを意味する。特定の値が本出願および特許請求の範囲に記載される場合、他に記載がない限り、「約（about）」という用語は黙示的であり、この文脈において特定の値が許容誤差範囲内にあることを意味する。

20

【0029】

本発明の文脈では、本発明が本明細書に記載する疾患の状態のいずれかに関する限り、「処置する」、「処置」および同種のものという用語は、そうした状態に伴う少なくとも1つの症状を軽減または緩和する、あるいはそうした状態の進行を遅延または抑制することを意味する。本発明の意味において、「処置する」はさらに、疾患を阻止する、その発現（すなわち、疾患の臨床的発現前の期間）遅延させる、および／またはその発症もしくは悪化のリスクを低下することも意味する。たとえば、癌に関連して「処置する」という用語は、患者の腫瘍量をゼロにする、または転移等を予防、遅延または阻害することを意味することがある。

30

【0030】

本明細書で使用する場合、用量または量に使用される「治療上有効な」という用語は、化合物または医薬組成物の量が投与を必要とする被検体への投与時に所望の活性を得るのに十分であることをいう。本発明の文脈では、「治療上有効な」という用語は、化合物（たとえば、TregのNrpl：セマフォリン軸のアンタゴニストまたはアゴニスト）、またはそうした化合物を含む医薬組成物の量が、本発明の方法により処置される障害の発現を遅延させる、その進行を阻止する、その少なくとも1つの症状を軽減または緩和するのに十分であることをいう。活性成分の組み合わせを投与する際、その組み合わせの有効量は、個別に投与する場合に効果的であると考えられる各成分の量を含んでも、あるいは含まなくてもよい点に留意されたい。

40

【0031】

「薬学的に許容される」という語句は、本発明の組成物と併用して使用される場合、哺乳動物（たとえば、ヒト）への投与の際に、そうした組成物の分子の実体および他の成分が生理学的に許容され、典型的には有害反応を引き起こさないことを意味する。好ましくは、本明細書で使用する場合、「薬学的に許容される」という用語は、哺乳動物、より詳

50

細にはヒトへの使用について連邦政府または州政府の規制当局により承認されている、あるいは米国薬局方または他の一般に認められた薬局方に収載されていることを意味する。

【0032】

本明細書で使用する場合、「被検体」という用語は任意の哺乳動物をいう。好ましい実施形態では、被検体はヒトである。

【0033】

本明細書および添付の特許請求の範囲に使用される場合、単数形「1つの(a、an)」および「前記(the)」は、文脈上明らかに他の意味に解すべき場合を除き、複数のものを含む。

【0034】

本発明によれば、当該技術分野の技術における従来の分子生物学、微生物学および組換えDNA技術を利用してもよい。こうした技術は、文献に十分に説明されている。たとえば、とりわけSambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (herein「Sambrook et al., 1989」); DNA Cloning: A practical Approach, Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985); Transcription and Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. (1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, (1986); B. Perbal, A practical Guide To Molecular Cloning (1984); F. M. Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994)を参照されたい。

【0035】

本発明の方法

一実施形態では、本発明は、Tregの機能を阻害するまたは安定性を低下させる方法であって、前記TregにおけるNrpl：セマフォリン軸の阻害剤に前記Tregを曝露することを含む方法を提供する。一実施形態では、Nrpl：セマフォリン軸のこうした阻害剤は、通常のT細胞上の膜貫通型セマフォリン（たとえばクラスIVセマフォリン、たとえばSema4a）とTreg上のNrplとの間の相互作用を阻害する。1つの特定の実施形態では、Nrpl：セマフォリン軸の阻害剤は、前記TregにおけるNrpl-VEGF相互作用に影響を与えない。Nrpl：セマフォリン軸の阻害剤は、被検体（たとえばヒト）に、たとえば癌または感染症に罹患している被検体に直接投与してもよい。関連する実施形態では、本発明は、疾患の処置を必要とする被検体（たとえば、ヒト）の疾患（たとえば、癌または感染症）を処置する方法であって、被検体のTreg内のNrpl：セマフォリン軸を選択的に阻害する方法を提供する。

【0036】

一実施形態では、本発明の方法に有用なNrpl：セマフォリン軸の阻害剤は抗体である。1つの特定の実施形態では、こうした抗体は、TregにおけるNrpl-VEGF相互作用またはNrpl-セマフォリンクラスIII相互作用に影響を与えない。

【0037】

もう1つの実施形態では、本発明の方法に有用なNrpl：セマフォリン軸の阻害剤は、セマフォリン分子（たとえば、可溶型のsema4aタンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体もしくはアナログ）である。

【0038】

なおもう1つの実施形態では、本発明の方法に有用なNr p 1：セマフォリン軸の阻害剤は小分子である。

【0039】

本発明は、T r e gにおけるNr p 1発現を阻害する、または膜貫通型セマフォリンを発現する細胞（たとえば、通常のT細胞（T c o n v）、古典的樹状細胞（c D C）および／または形質細胞様樹状細胞（p D C））上のそうした膜貫通型セマフォリン発現を局所的に（たとえば、腫瘍において）阻害する、またはNr p 1がその下流のシグナル伝達経路に参与するのを防止する、T r e g内のNr p 1：セマフォリン軸の阻害剤をさらに包含する。

10

【0040】

別の実施形態では、本発明は、T r e gの機能を強化するまたはその安定性を増加させる方法であって、前記T r e gにおけるNr p 1：セマフォリン軸のアゴニストを前記T r e gに曝露することを含む方法を提供する。一実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸のこうしたアゴニストは、通常のT細胞上の膜貫通型セマフォリン（たとえばクラスI Vセマフォリン、たとえばS e m a 4 a）とT r e g上のNr p 1との間の相互作用を強化する。一実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸のアゴニストは、インビトロでT r e gに投与される（たとえば、T r e gは被検体（たとえば、自己免疫性疾患または炎症性疾患に罹患しているヒト）から抽出し、Nr p 1－セマフォリン相互作用のアゴニストの存在下でエキソビボ増幅し、次いで同じ被検体に再導入しても、あるいは別の被検体に投与してもよい）。もう1つの実施形態では、Nr p 1：セマフォリン軸のアゴニストは、被検体（たとえばヒト）に、たとえば、自己免疫性疾患または炎症性疾患に罹患している被検体に直接投与してもよい。関連する実施形態では、本発明は、疾患の処置を必要とする被検体（たとえば、ヒト）の疾患（たとえば、自己免疫性疾患または炎症性疾患）を処置する方法であって、被検体のT r e gにおけるNr p 1：セマフォリン軸を選択的に活性化することを含む方法を提供する。

20

【0041】

一実施形態では、本発明の方法に有用なNr p 1：セマフォリン軸のアゴニストは、セマフォリン分子（たとえば、S e m a 4 aタンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体もしくはアナログ）である。こうしたセマフォリン分子は、たとえば、表面またはビーズ上で多量体化および／または固定化されていてもよい。

30

【0042】

もう1つの実施形態では、本発明の方法に有用なNr p 1：セマフォリン軸のアゴニストは抗体である。

【0043】

なおもう1つの実施形態では、本発明の方法に有用なNr p 1：セマフォリン軸のアゴニストは小分子である。

【0044】

本発明は、T r e gにおけるNr p 1発現を強化する、または膜貫通型セマフォリンを発現する細胞（たとえば、通常のT細胞（T c o n v）、古典的樹状細胞（c D C）および／または形質細胞様樹状細胞（p D C））上のセマフォリン発現を局所的に（たとえば、糖尿病の膵島において）強化する、またはNr p 1のその下流のシグナル伝達経路への関与を強化する、T r e gにおけるNr p 1：セマフォリン軸のアゴニストをさらに包含する。

40

【0045】

T r e g上のNr p 1：セマフォリン軸の別の阻害剤およびアゴニストについては、当該技術分野において公知の様々なスクリーニング方法を用いて同定することができる（たとえば、固定化した標的分子またはそのフラグメントを使用して）。

【0046】

本発明の阻害剤またはアゴニストは、上述の治療法に使用してもよいし、あるいは前臨

50

床データを得る目的で非ヒト哺乳動物に投与してもよい。処置対象の例示的非ヒト哺乳動物として、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、齧歯動物、および前臨床試験が行われる他の哺乳動物が挙げられる。こうした哺乳動物は、処置対象の疾患の確立した動物モデルであってもよいし、あるいは目的の阻害剤またはアゴニストの毒性の研究に使用してもよい。これらの各々の実施形態において、哺乳動物を対象に用量漸増試験を行ってもよい。

【0047】

本発明の方法により処置可能な癌の非限定的な例として、たとえば、癌腫、リンパ腫、肉腫、芽腫および白血病が挙げられる。非限定的な具体例としては、たとえば、乳癌、膵癌、肝癌、肺癌、前立腺癌、結腸癌、腎癌、膀胱癌、頭頸部癌、甲状腺癌、軟部組織肉腫、卵巣癌、原発性または転移性メラノーマ、扁平上皮癌、基底細胞癌、脳癌、血管肉腫、脈管肉腫、骨肉腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、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、滑膜腫、精巣癌、子宮癌、子宮頸癌、胃腸癌、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、気管支原性癌、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、肺癌腫、上皮性癌、子宮頸癌、精巣腫瘍、神経膠腫、膠芽細胞腫、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、網膜芽細胞腫、白血病、神経芽細胞腫、小細胞性肺癌、膀胱癌腫、リンパ腫、多発性骨髄腫、髄様癌、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、骨髄腫、白血病、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ性白血病、造血器新生物(hematopoietic neoplasias)、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮癌、腎細胞癌、ヘパトーマ等が挙げられる。

【0048】

本発明の方法により処置可能な感染症としては、以下に限定されるものではないが、Tregが殺菌免疫を阻止し、たとえば、細菌、寄生虫、ウイルス、真菌または原虫により引き起こされ得る任意の感染症（特に、慢性感染症）が挙げられる。

【0049】

本発明の方法により処置可能な炎症性疾患および自己免疫疾患の非限定的な例として、たとえば、炎症性腸疾患（IBD）、潰瘍性大腸炎、クローン病、関節炎、糖尿病、多発性硬化症、たとえば、炎症性腸疾患（IBD）、潰瘍性大腸炎、クローン病、関節炎、1型糖尿病、多発性硬化症、グレーブス病、紅斑性狼瘡、強直性脊椎炎、乾癬、ベーチェット病、自閉症性腸炎(autistic enterocolitis)、ギラン・バレー症候群、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、急性散在性脳脊髄炎（ADEM）、横断性脊髄炎、自己免疫性心筋症、セリアック病、皮膚筋炎、ウェゲナー肉芽腫症、アレルギー、喘息、接触皮膚炎（人工化学物質に対する任意の反応を含む）、アテローム性動脈硬化症（または心臓もしくは血管系に影響を与える他の任意の炎症状態）等が挙げられる。

【0050】

様々な疾患の処置に使用する際、本発明の阻害剤またはアゴニストは、同一または類似の疾患に好適な他の治療薬と組み合わせてもよいことを意図している。さらに、相加または相乗効果を得るため、本発明の2種以上の阻害剤またはアゴニストを併用投与してもよい。第2の治療薬と併用投与する場合、本発明の阻害剤またはアゴニストおよび第2の治療薬は、同時に投与しても、あるいは連続的に（任意の順序で）投与してもよい。各作用物質の好適な治療上有効な投与量は、相加作用または相乗作用に伴い下げてもよい。

【0051】

本発明のNr p1：セマフォリン軸アゴニストは、Treg（たとえば、非マイトジェン抗CD3(non-mitogenic anti-CD3))、インビボでのTregの移行を強化する他の療法、あるいは炎症を阻止する療法（たとえば、IL1、INFα/β、IL6、TNF、IL13、IL23等の遮断による）と組み合わせてもよい。

【0052】

一実施形態では、本明細書に開示されたTreg上のNr p1：セマフォリン軸の阻害

10

20

30

40

50

剤は、感染症または腫瘍に対するワクチンの有効性を強化するのに有用である。感染性因子の不活化細胞または単一もしくは複数の抗原を含む感染症に対するワクチンと同様に、腫瘍ワクチンは典型的には、患者の免疫系を刺激する不活化腫瘍細胞または腫瘍抗原を含む。免疫系は、この刺激に応答して感染症または新形成を標的とする免疫応答細胞を作る。T r e gはこうした免疫応答を抑制するように作用するので、その機能および安定性を本発明の方法により阻害すると、ワクチンに対する免疫応答が強化され得る。

【0053】

本発明のT r e g阻害剤は、免疫応答（たとえば、癌または感染症の処置のため）を惹起するように作用する試薬と同時に、あるいはその試薬が被検体に投与される前（たとえば、1～14日前）に被検体に投与してもよい。

10

【0054】

本発明の阻害性化合物はさらに、抗腫瘍抗体または病因抗原に対する抗体と組み合わせて投与してもよい。

【0055】

本発明の阻害性処置剤は、他の免疫調節処置剤、たとえば、治療ワクチン（以下に限定されるものではないが、G V A X、D Cを用いたワクチン等）、チェックポイント阻害剤（以下に限定されるものではないが、C T L A 4、P D 1、L A G 3、T I M 3等を阻止する作用物質）またはアクチベーター（以下に限定されるものではないが、4 1 B B、O X 4 0等を強化する作用物質）と組み合わせてもよい。本発明の阻害性処置剤はさらに、T r e gの機能または安定性を阻害する能力を有する他の処置剤と組み合わせてもよい。こうした追加のT r e g阻害剤の一部の非限定的な例として、O N T A K、H u M a x - T a c、ゼナパックス（Z e n a p a x）およびM D X - 0 1 0が挙げられる。

20

【0056】

本発明の治療方法は、別の免疫療法および療法と組み合わせてもよい。たとえば、癌の処置に使用する場合、本発明の阻害剤は、腫瘍の種類、患者の状態、他の健康問題および種々の因子に応じて従来の癌療法、たとえば、手術、放射線治療、化学療法またはこれらの組み合わせと組み合わせて使用してもよい。ある態様では、本発明の阻害剤との併用の癌療法に有用な他の治療薬として、血管新生阻害薬が挙げられる。多くの血管新生阻害薬が同定されており、当該技術分野において公知であり、たとえば、T N P - 4 7 0、血小板因子4、トロンボスポンジン-1、メタロプロテアーゼの組織阻害剤（T I M P 1およびT I M P 2）、プロラクチン（16 K dフラグメント）、アンジオスタチン（プラスミノゲンの38 K dフラグメント）、エンドスタチン、可溶性b F G F受容体、トランスフォーミング増殖因子 β 、インターフェロン α 、可溶性K D RおよびF L T - 1受容体、胎盤性プロリフェリン関連タンパク質のほか、C a r m e l i e t a n d J a i n（2000）により記載されたものなどがある。一実施形態では、本発明の阻害剤は、V E G FアンタゴニストまたはV E G F受容体アンタゴニスト、たとえば抗V E G F抗体、V E G F変異体、可溶性V E G F受容体フラグメント、V E G FまたはV E G F Rを阻止できるアプタマー、中和抗V E G F R抗体、V E G F Rチロシンキナーゼの阻害剤およびこれらの任意の組み合わせ（たとえば、抗h V E G F抗体A 4. 6. 1、ベバシズマブまたはラニズマブ）と組み合わせて使用してもよい。

30

40

【0057】

本発明の併用処置に使用することができる化学療法化合物の非限定的な例として、たとえば、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナストロゾール、アスパラギナーゼ、b c g、ピカルタミド、ブレオマイシン、ブセレリン、ブスルファン、カンボテシン、カペシタビン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリビン、クロドロナート、コルヒチン、シクロホスファミド、シプロテロン、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ジエネストロール、ジエチルスチルベストロール、ドセタキセル、ドキソルビシン、エピルビシン、エストラジオール、エストラムスチン、エトポシド、エキセメスタン、フィルグラスチム、フルダラビン、フルドロコルチゾン、フルオロウラシル、フルオキシメステロン、フルタミド、ゲムシタビン、ゲニ

50

ステイン、ゴセレリン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イホスファミド、イマチニブ、インターフェロン、イリノテカン、イロノテカン、レトロゾール、ロイコボリン、ロイプロリド、レバミゾール、ロムスチン、メクロレタミン、メドロキシプロゲステロン、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、メスナ、メトトレキサート、マイトマイシン、ミトタン、ミトキサントロン、ニルタミド、ノコダゾール、オクトレオチド、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロネート、ペントスタチン、プリカマイシン、ポルフィマー、プロカルバジン、ラルチトレキセド、リツキシマブ、ストレプトゾシン、スラミン、タモキシフェン、テモゾロミド、テニボシド、テストステロン、チオグアニン、チオテパ、チタノセンジクロリド、トポテカン、トラスツズマブ、トレチノイン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシンおよびビノレルビンが挙げられる。

10

【0058】

これらの化学療法化合物は、その作用機序により、たとえば、以下のグループに分類することができる：代謝拮抗薬／抗癌剤、たとえばピリミジンアナログ（5-フルオロウラシル、フロクスウリジン、カベシタビン、ゲムシタビンおよびシタラビン）およびプリンアナログ、葉酸拮抗剤ならびに関連する阻害剤（メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチンおよび2-クロロデオキシアデノシン（クラドリビン））；抗増殖薬／有糸分裂阻害薬、たとえば天然物、たとえばビンカアルカロイド類（ビンブラスチン、ビンクリスチンおよびビノレルビン）、微小管破壊剤、たとえばタキサン（パクリタキセル、ドセタキセル）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ノコダゾール、エポチロンおよびナベルピン、エピジポドフィロトキシン（エトボシド、テニボシド）、DNA傷害剤（アクチノマイシン、アムサクリン、アントラサイクリン、ブレオマイシン、ブスルファン、カンプトテシン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、シトキサン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、ヘキサメチルメラミン、オキサリプラチン、イホスファミド、メルファラン、メクロレタミン、マイトマイシン、ミトキサントロン、ニトロソウレア、プリカマイシン、プロカルバジン、タキソール、タキソテル、テニボシド、トリエチレンチオホスホルアミドおよびエトボシド（VP16））；抗生物質、たとえばダクチノマイシン（アクチノマイシンD）、ダウノルビシン、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、イダルビシン、アントラサイクリン、ミトキサントロン、ブレオマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）およびマイトマイシン；酵素（L-アスパラギンを全身的に代謝し、それ自身アスパラギンを合成する能力を有さない細胞を排除するL-アスパラギナーゼ）；抗血小板薬；抗増殖／抗有糸分裂アルキル化剤、たとえばナイトロジェンマスタード（メクロレタミン、シクロホスファミドおよびアナログ、メルファラン、クロラムブシル）、エチレンイミンおよびメチルメラミン（ヘキサメチルメラミンおよびチオテパ）、アルキルスルホネートブスルファン、ニトロソウレア類（カルムスチン（BCNU）およびアナログ、ストレプトゾシン）、トラゼネスーダカルバジン（DTIC）；抗増殖／抗有糸分裂代謝拮抗薬、たとえば葉酸アナログ（メトトレキサート）；白金配位錯体（シスプラチン、カルボプラチン）、プロカルバジン、ヒドロキシ尿素、ミトタン、アミノグルテチミド；ホルモン、ホルモンアナログ（エストロゲン、タモキシフェン、ゴセレリン、ビカルタミド、ニルタミド）およびアロマターゼ阻害剤（レトロゾール、アナストロゾール）；抗凝固薬（ヘパリン、合成ヘパリン塩およびトロネビンの他の阻害剤）；線維素溶解薬（たとえば組織プラスミノゲン活性化因子、ストレプトキナーゼおよびウロキナーゼ）、アスピリン、ジピリダモール、チクロピジン、クロピドグレル、アブシキシマブ；抗遊走薬(antimigratory agent)；分泌抑制薬（ブレフェルジン）；免疫抑制薬（シクロスポリン、タクロリムス（FK-506）、シロリムス（ラパマイシン）、アザチオプリン、ミコフェノール酸モフェチル）；抗血管新生化合物（たとえば、TNF-470、ゲニステイン、ペバシズマブ）および増殖因子阻害剤（たとえば、線維芽細胞増殖因子（FGF）阻害剤）；アンジオテンシン受容体遮断薬；一酸化窒素ドナー；アンチセンスオリゴヌクレオチド；抗体（トラスツズマブ）；細胞周期阻害剤および分化誘導剤（トレチノイン）；mTOR阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤（ドキソルビシン（アドリアマイシン）、アムサクリン、カンプトテシ

20

30

40

50

ン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、エニボシド、エピルビシン、エトボシド、イダルビシンおよびミトキサントロン、トポテカン、イリノテカン）、コルチコステロイド（コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾンおよびプレドニゾロン）；増殖因子シグナル伝達キナーゼ阻害剤；ミトコンドリア機能不全誘導剤およびカスパーゼアクチベーター；およびクロマチン破壊剤。

【0059】

感染症の処置では、本発明の併用療法は、本発明のTreg阻害剤と抗生物質、抗真菌薬、抗ウイルス薬、抗寄生虫薬、抗原生動物薬またはこれらの組み合わせとの併用投与を包含してもよい。

【0060】

有用な抗生物質の非限定的な例として、リンコサミド（クリンダマイシン）；クロラムフェニコール；テトラサイクリン（たとえばテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、デメクロサイクリン、メタサイクリン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン）；アミノグリコシド（たとえばゲンタマイシン、トブラマイシン、ネチルマイシン、アミカシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、ネオマイシン）； β -ラクタム（たとえばペニシリン、セファロスポリン、イミペネム、アズトレオナム）；バンコマイシン；バシトラシン；マクロライド（エリスロマイシン）、アムホテリシン；スルホンアミド（たとえばスルファニルアミド、スルファメトキサゾール、スルファセタミド、スルファジアジン、スルフイソキサゾール、スルファシチン、スルファドキシニ、マフェニド、p-アミノ安息香酸、トリメトプリム-スルファメトキサゾール）；メテナミン；ニトロフラントイン；フェナゾピリジン；トリメトプリム；リファンピシン；メトロニダゾール；セファゾリン；リンコマイシン；スペクチノマイシン；ムピロシン；キノロン（たとえばナリジクス酸、シノキサシン、ノルフロキサシン、シプロフロキサシン、ペルフロキサシン、オフロキサシン、エノキサシン、フレロキサシン、レボフロキサシン）；ノボビオシン；ポリミキシン；グラミシジン；および抗緑膿菌剤（たとえばカルベニシリン、カルベニシリンインダニル、チカルシリン、アズロシリン、メズロシリン、ピペラシリン）またはこれらの任意の塩もしくは変異体が挙げられる。さらにPhysician's Desk Reference, 59. sup. th edition, (2005), Thomson P D R, Montvale N. J. ; Gennaro et al., Eds. Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 20. sup. th edition, (2000), Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore Md. ; Braunwald et al., Eds. Harrison's Principles of Internal Medicine, 15. sup. th edition, (2001), McGraw Hill, NY; Berkow et al., Eds. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, (1992), Merck Research Laboratories, Rahway N. J. も参照されたい。こうした抗生物質は、たとえば、Daiichi Sankyo, Inc. (Parsipanny, N. J.)、Merck (Whitehouse Station, N. J.)、Pfizer (New York, N. Y.)、Glaxo Smith Kline (Research Triangle Park, N. C.)、Johnson & Johnson (New Brunswick, N. J.)、AstraZeneca (Wilmington, Del.)、Novartis (East Hanover, N. J.)、およびSanofi-Aventis (Bridgewater, N. J.) から市販品として入手することができる。使用する抗生物質は、細菌感染症の種類によって異なる。

【0061】

有用な抗真菌剤の非限定的な例として、イミダゾール（たとえばグリセオフルビン、ミコナゾール、テルбинаフィン、フルコナゾール、ケトコナゾール、ポリコナゾールおよびイトラコナゾール）；ポリエン（たとえばアムホテリシンBおよびニスタチン）；フルシ

10

20

30

40

50

トシン；およびカンジシジンまたはこれらの任意の塩もしくは変異体が挙げられる。さらにPhysician's Desk Reference, 59. sup. th edition, (2005), Thomson P D R, Montvale N. J. ; Gennaro et al., Eds. Remington's The Science and Practice of Pharmacy 20. sup. th edition, (2000), Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore Md. ; Braunwald et al., Eds. Harrison's Principles of Internal Medicine, 15. sup. th edition, (2001), McGraw Hill, NY; Berkow et al., Eds. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, (1992), Merck Research Laboratories, Rahway N. J. も参照されたい。 10

【0062】

有用な抗ウイルス薬の非限定的な例として、インターフェロン α 、 β または γ 、ジダノシン、ラミブジン、ザナミビル、ロピニビル、ネルフィナビル、エファビレンツ、インジナビル、バラシクロビル、ジドブジン、アマンタジン、リマンチジン、リバビリン、ガンシクロビル、ホスカルネットおよびアシクロビルまたはこれらの任意の塩もしくは変異体が挙げられる。さらにPhysician's Desk Reference, 59. sup. th edition, (2005), Thomson P D R, Montvale N. J. ; Gennaro et al., Eds. Remington's The Science and Practice of Pharmacy 20. sup. th edition, (2000), Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore Md. ; Braunwald et al., Eds. Harrison's Principles of Internal Medicine, 15. sup. th edition, (2001), McGraw Hill, NY; Berkow et al., Eds. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, (1992), Merck Research Laboratories, Rahway N. J. も参照されたい。 20

【0063】

有用な抗寄生虫剤の非限定的な例として、クロロキン、メフロキン、キニーネ、プリマキン、アトバコン、スルファドキシシンおよびピリメタミンまたはこれらの任意の塩もしくは変異体が挙げられる。さらにPhysician's Desk Reference, 59. sup. th edition, (2005), Thomson P D R, Montvale N. J. ; Gennaro et al., Eds. Remington's The Science and Practice of Pharmacy 20. sup. th edition, (2000), Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore Md. ; Braunwald et al., Eds. Harrison's Principles of Internal Medicine, 15. sup. th edition, (2001), McGraw Hill, NY; Berkow et al., Eds. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, (1992), Merck Research Laboratories, Rahway N. J. も参照されたい。 30 40

【0064】

有用な抗原生動物薬の非限定的な例として、メトロニダゾール、ジロキサニド、ヨードキノール、トリメトプリム、スファメトキサゾール、ペンタミジン、クリンダマイシン、プリマキン、ピリメタミンおよびスルファジアジンまたはこれらの任意の塩もしくは変異体が挙げられる。さらにPhysician's Desk Reference, 59. sup. th edition, (2005), Thomson P D R, Mon 50

t vale N. J. ; Gennaro et al. , Eds. Remington ' s The Science and Practice of Pharmacy 20. sup. th edition, (2000) , Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore Md. ; Braunwald et al. , Eds. Harrison ' s Principles of Internal Medicine, 15. sup. th edition, (2001) , McGraw Hill, NY ; Berkow et al. , Eds. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, (1992) , Merck Research Laboratories, Rahway N. J. も参照されたい。

10

【0065】

本発明の抗体阻害剤およびアゴニスト

上記の方法に関連して、本発明は、Tregに対するNrpl：セマフォリン相互作用を阻害または増大する単離された抗体を提供する。一実施形態では、セマフォリンはクラスIVセマフォリン（たとえば、Sema4a）である。一実施形態では、抗体は、TregにおけるNrpl-VEGF相互作用またはNrpl-セマフォリンクラスIII相互作用に影響を与えない。

【0066】

本発明は、Tregに対するNrpl：セマフォリン相互作用を妨害する抗Nrpl抗体および抗セマフォリン抗体の両方を包含する。有用な抗体の例として、たとえば、(i)セマフォリン分子の「sema」ドメインおよび「PSI」ドメイン、すべてのセマフォリン分子上に進化的に保存された領域を特異的に標的とする抗体（たとえば、Takamatsu and Kumanogoh, Trends Immunol. , 2012, 33 (3) : 127-135を参照されたい）、および(ii)Nrpl上のセマフォリン結合ドメイン（VEGF結合ドメインではない）を標的とする抗体（たとえば、Parker et al. , J. Biol. Chem. , 2012, 287 (14) : 11082-11089を参照されたい）が挙げられる。

20

【0067】

阻害抗体および増強抗体のどちらの場合も、本発明は、Nrplに加えてTreg特異的タンパク質も認識し、したがって抗体が特異的にTregを標的とする二重特異性抗体もさらに提供する。たとえば、こうした二重特異性抗体は、Nrplに加えてTregの表面タンパク質を標的とすることができ、表面タンパク質として、たとえば、CD25、CD4、CD28、CD38、CD62L（セレクトリン）、OX-40リガンド（OX-40L）、CTLA4、CCR4、CCR8、FOXP3、LAG3、CD103、グルコシルコリド誘導性TNF受容体（GITR）、ガレクチン-1、TNFR2またはTGFB1が挙げられる。

30

【0068】

本発明により使用される抗体は、必要に応じてモノクローナルでも、あるいはポリクローナルでもよい。さらに抗体フラグメントを使用してもよく、たとえば、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメントまたはFvフラグメントが挙げられる。抗体は一本鎖抗体であってもよい。他の好適な改変体および／または作用物質も当業者には明らかになるであろう。キメラ抗体およびヒト化抗体も本発明の範囲内である。キメラ抗体およびヒト化抗体であれば、ヒト被験者において、対応する非キメラ抗体より免疫原性が低いであろうことが予想される。たとえば非ヒト可変領域およびヒト定常領域を含むキメラ抗体を作製するための種々のアプローチが記載されている。たとえば、Morrison et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. , 81, 6851 (1985) ; Takeda, et al. , Nature 314, 452 (1985) , Cabilly et al. , 米国特許第4, 816, 567号明細書 ; Boss et al. , 米国特許第4, 816, 397号明細書 ; Tanaguchi et al. , 欧州特許第171496号明細書 ; 欧州特許第0173494

40

50

号明細書、英国特許第2177096B号明細書を参照されたい。加えて、キメラ抗体はさらに、可変領域の一部、特に抗原結合ドメインの保存されたフレームワーク領域がヒト由来であり、超可変領域のみが非ヒト由来であるように「ヒト化」してもよい。こうした免疫グロブリン分子の改変は、当該技術分野において公知のいくつかの技術（たとえば、Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80, 7308-7312 (1983); Kozbor et al., Immunology Today, 4, 7279 (1983); Olsson et al., Meth. Enzymol., 92, 3-16 (1982)）のいずれかにより行うことができ、好ましくは国際公開第92/06193号パンフレットまたは欧州特許第0239400号明細書の教示内容に従って行う。ヒト化抗体は、たとえば、Scottgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Great Britainにより商業的に生産してもよい。

10

【0069】

ある種の実施形態では、さらに抗イディオタイプ抗体を提供する。抗イディオタイプ抗体は、別の抗体の抗原結合部位に関連する抗原決定基を認識する。抗イディオタイプ抗体は、第2抗体の作製に使用する動物と同じ種、好ましくは同じ系統の動物を免疫することにより第2抗体に対して調製することができる。たとえば、米国特許第4,699,880号明細書を参照されたい。一実施形態では、抗体はNrplもしくはセマフォリンまたはその一部に対して産生され、これらの抗体を使用して次いで抗イディオタイプ抗体を作製する。

20

【0070】

本発明は、細胞内ターゲティングおよび細胞外ターゲティングの両方の抗体を提供する。細胞内ターゲティングは、イントラボディという細胞内発現抗体の使用により達成することができる。

【0071】

目的の抗原（たとえば、NrplまたはSema4a）上の特定のエピトープに結合する追加の抗体をスクリーニングするには、たとえばAntibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載された通常の交差ブロッキングアッセイを行ってもよい。あるいは、たとえばChampene et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:1388-1394に記載されているようなエピトープマッピングを行って、抗体が目的のエピトープに結合するかどうかを判定してもよい。

30

【0072】

本発明に有用な追加の抗体はまた、たとえば米国特許出願公開第2008/0213268号明細書に記載されているようなファージディスプレイアプローチを用いて作製および選択してもよい。

【0073】

本発明の抗体はさらに、親抗体よりも物理的特性、化学的特性およびまたは生物学的特性の改善した抗体ミュータントを作製するため修飾してもよい。使用するアッセイが生物活性アッセイである場合、抗体ミュータントは好ましくは、選択したアッセイ（たとえば、トランスウェル抑制アッセイによるTregの機能または安定性、およびBcl2またはHeliosのアップレギュレーションを測定する）において、そのアッセイにおける親抗体の生物活性より少なくとも約10倍高い、好ましくは少なくとも約20倍高い、一層好ましくは少なくとも約50倍高い、場合によっては少なくとも約100倍または200倍高い生物活性を有する。

40

【0074】

抗体ミュータントを作製するため、親抗体の超可変領域の1つまたは複数に1つまたは複数のアミノ酸変化（たとえば置換）を導入してもよい。あるいは、またはさらに、フレームワーク領域残基の1つまたは複数の変化（たとえば、置換）を親抗体に導入して、そ

50

の結果第2の哺乳類種由来の抗原に対する抗体ミュータントの結合親和性を向上させてもよい。修飾するためのフレームワーク領域残基の例として、抗原に直接非共有結合するもの(Amit et al. (1986) Science 233:747-753); CDRと相互作用する/CDRのコンフォメーションに影響を与えるもの(Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917); および/またはV_L-V_Hの界面に関与するもの(欧州特許第239400B1号明細書)が挙げられる。ある種の実施形態では、こうしたフレームワーク領域残基の1つまたは複数の修飾の結果、第2の哺乳類種由来の抗原に対する抗体の結合親和性が増強される。たとえば、本発明のこの実施形態では、約1つから約5つのフレームワーク残基を変化させてもよい。超可変領域残基を変化させない場合でも、これで前臨床試験に使用するのに好適な抗体ミュータントを得るのに十分であることも珍しくない。しかしながら、通常、抗体ミュータントは、追加の超可変領域の変化を含む。変化される超可変領域残基は、無作為に変化させてもよく、特に、親抗体の初めの結合親和性により、こうした無作為に作られた抗体ミュータントを容易にスクリーニングできるような場合にそうである。

10

【0075】

こうした抗体ミュータントを作製するための1つの有用な手順は、「アラニンスキャンニング変異導入(alanine scanning mutagenesis)」と呼ばれている(Cunningham and Wells (1989) Science 244:1081-1085)。この場合、超可変領域残基の1つまたは複数のアラニンまたはポリアラニン残基で置換して、第2の哺乳類種由来の抗原とのアミノ酸の相互作用に影響を与える。次いで、置換に対して機能的感受性を示すこれらの超可変領域残基を、置換の部位または置換用の部位にさらなるまたは他の突然変異を導入することにより精密化する。こうして作られたアラニミュータントについて、本明細書に記載するようなその生物活性をスクリーニングする。

20

【0076】

本発明の抗体は、標準的手段により調製することができる。

【0077】

免疫抗原の調製ならびにポリクローナルおよびモノクローナル抗体の作製については、たとえば、Kohler et al., Nature 256:495-497 (1975) および Eur. J. Immunol. 6:511-519 (1976); Milstein et al., Nature 266:550-552 (1977); Koprowski et al., 米国特許第4,172,124号明細書; Harlow and Lane, 「Antibodies: A Laboratory Manual,」 (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N. Y., 1988); および「Current Protocols In Molecular Biology,」 (Ausubel et al., Eds.; John Wiley & Sons: New York, N. Y., 1991); Kozbar et al., Immunology Today 4:72 (1983); Cole et al., 「Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy」 (Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96 (1985)) を参照されたい。所望の特異性を有する抗体を産生する細胞は、好適なアッセイ(たとえば、ELISA)により選択することができる。

30

40

【0078】

本発明の抗体は、よく知られた技術を用いて組換え技術により作製してもよい。たとえば、Cabilly et al., 米国特許第4,816,567号明細書; Winter, 米国特許第5,225,539号明細書を参照されたい。所望の抗原をコードする核酸は、従来の手順を用いて単離あるいは合成し、さらにクローニングまたは発現のため複製可能なベクターに挿入してもよい。

【0079】

組換え技術を用いる場合、抗体は細胞内に産生させても、ペリプラズムに産生させても、あるいは直接培地に分泌させてもよく、公知の技術、たとえば、ヒドロキシルアパタイ

50

トクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析およびアフィニティークロマトグラフィーを用いてさらに単離および精製する。プロテインAアフィニティークロマトグラフィーを使用して、ヒト $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ または $\gamma 4$ 重鎖に基づく抗体を精製してもよい(Lindmark et al. (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13)。マウスアイソタイプおよびヒト $\gamma 3$ には、プロテインGアフィニティークロマトグラフィーを使用してもよい(Guss et al. (1986) EMBO J. 5:1567-1575)。

【0080】

異なる種、抗体に由来する部分を含む、キメラ抗体、ヒト化抗体、霊長類化(CDRグラフト)抗体、またはCDRグラフト一本鎖抗体の様々な部分は、従来の技術により化学的に結合しても、あるいは遺伝子工学技術を用いて隣接するタンパク質として調製してもよい。たとえば、キメラ鎖またはヒト化鎖をコードする核酸を発現させて、連続したタンパク質を得てもよい。たとえば、Cabilly et al., 米国特許第4,816,567号明細書; Cabilly et al., 欧州特許第0,125,023 B1号明細書; Boss et al., 米国特許第4,816,397号明細書; Boss et al., 欧州特許第0,120,694号B1明細書; Neuberger et al., 国際公開第86/01533号パンフレット; Neuberger et al., 欧州特許第0,194,276 B1号明細書; Winter, 米国特許第5,225,539号明細書; およびWinter, 欧州特許第0,239,400 B1号明細書を参照されたい。さらに、霊長類化抗体に関するNewman et al., Bio Technology 10:1455-1460 (1992)と、一本鎖抗体に関するLadner et al., 米国特許第4,946,778号明細書およびBird et al., Science 242:423-426 (1988))とを参照されたい。ヒト化可変領域をコードする核酸(たとえば、DNA)配列は、PCR変異誘発法を用いてヒト鎖またはヒト化鎖をコードするDNA配列、たとえば既にヒト化された可変領域由来のDNA鋳型を変化させて構築することができる(たとえば、Kamman et al., Nucl. Acids Res., 17:5404 (1989)); Sato et al., Cancer Research 53:851-856 (1993); Daugherty et al., Nucleic Acids Res. 19(9):2471-2476 (1991); およびLewis and Crowe, Gene 101:297-302 (1991)を参照されたい)。これらまたは他の好適な方法を用いて、変異体も容易に作製することができる。一実施形態では、クローン化した可変領域に変位を誘発して、所望の特異性を有する変異体をコードする配列を選択してもよい(たとえば、ファージライブラリーから; たとえば、Krebber et al., 米国特許第5,514,548号明細書; およびHoogenboom et al., 国際公開第93/06213号パンフレットを参照されたい)。

【0081】

さらに、キメラフラグメント、ヒト化フラグメント、霊長類化フラグメントまたは一本鎖抗体フラグメントなどの抗体の機能的フラグメントを作製してもよい。本抗体の機能的フラグメントは、それが由来する全長抗体の少なくとも1つの結合機能および/または調節機能を保持する。有用な抗体フラグメントとして、Fvフラグメント、Fabフラグメント、Fab'フラグメントおよびF(ab')₂フラグメントがあるが、これに限定されるものではない。こうしたフラグメントは、酵素的切断または組換え技術により作製することができる。たとえば、パイン切断またはペプシン切断では、それぞれFabフラグメントまたはF(ab')₂フラグメントが得られる。抗体はさらに、自然終結部位の上流に1つまたは複数の終止コドンを導入した抗体遺伝子を用いて種々の切断型で作製することもできる。たとえば、F(ab')₂重鎖部分をコードするキメラ遺伝子は、CH1ドメインおよび重鎖のヒンジ領域を含むように設計することができる。

【0082】

たとえば、ライブラリーから組換え抗体を選択する方法、またはヒト抗体の完全なレパ

ートリーを産生できるトランスジェニック動物（たとえば、マウス）の免疫化を利用する方法など、不可欠な特異性を有する抗体を作製または単離する他の好適な方法を使用してもよい。たとえば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555 (1993); Jakobovits et al., Nature 362:255-258 (1993); Lonberg et al., 米国特許第5,545,806号明細書; Surani et al., 米国特許第5,545,807号明細書; Cabilly et al., 米国特許第4,816,567号明細書; Cabilly et al., 欧州特許第0,125,023B1号明細書; Queen et al., 欧州特許第0,451,216B1号明細書; Boss et al., 米国特許第4,816,397号明細書; Boss et al., 欧州特許第0,120,694E1号明細書; Neuberger et al., 国際公開第86/01533号パンフレット; Neuberger et al., 欧州特許第0,194,276B1号明細書; Winter, 米国特許第5,225,539号明細書; Winter, 欧州特許第0,239,400B1号明細書; および Padlan et al., 欧州特許出願公開第0,519,596号A1明細書を参照されたい。さらに、Ladner et al., 米国特許第4,946,778号明細書; Huston, 米国特許第5,476,786号明細書; および Bird et al., Science 242:423-426 (1988) も参照されたい。

10

【0083】

ある種の実施形態では、抗体または抗体の抗原結合フラグメントは標識しても、あるいは非標識でもよく、診断目的に使用される。典型的には、診断アッセイでは、抗体のその標的への結合に起因する複合体の形成を検出する必要がある。抗体は、たとえば、放射性核種、フルオロフォア、酵素、酵素基質、酵素補助因子、酵素阻害剤、およびリガンド（たとえば、ビオチンまたはハプテン）で直接標識してもよい。多くの適切なイムノアッセイが当業者に公知である（たとえば、米国特許第3,817,827号明細書; 同第3,850,752号明細書; 同第3,901,654号明細書; および同第4,098,876号明細書を参照されたい）。

20

【0084】

本発明の抗体を含む医薬組成物は、所望の程度の純度を有する抗体を任意選択の生理学的に許容されるキャリア、賦形剤または安定剤と混合することにより（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で調製することができる。許容可能なキャリア、賦形剤または安定剤は、使用する投与量および濃度で被投与者に無毒であり、緩衝液、たとえばホスフェート、シトレートおよび他の有機酸; アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤; 防腐剤（たとえばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド; ヘキサメトニウムクロリド; 塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム; フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール; アルキルパラベン、たとえばメチルもしくはプロピルパラベン; カテコール; レゾルシノール; シクロヘキサノール; 3-ペンタノール; およびm-クレゾール）; 低分子量（約10未満の残基）ポリペプチド; タンパク質、たとえば血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリン; 親水性ポリマー、たとえばポリビニルピロリドン; アミノ酸、たとえばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンもしくはリジン; 単糖類、二糖類およびグルコース、マンノースもしくはデキストリンを含む他の糖質; キレート化剤、たとえばEDTA; 糖、たとえばスクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトール; 塩形成対イオン、たとえばナトリウム; 金属錯体（たとえば、Zn-タンパク質複合体）; ならびに/または非イオン界面活性剤、たとえばTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）もしくはポリエチレングリコール（PEG）が挙げられる。

30

40

【0085】

本発明の抗体を含む医薬組成物は、処置対象の特定の適応症に対する必要に応じて1つまたは複数の追加の活性化合物、好ましくは相互に悪影響を与えない相補活性を有するも

50

のをさらに含んでもよい。所期の目的に有効な量で組み合わせられて、様々な活性薬が存在してもよい。考えられる追加の活性化化合物の非限定的な例として、たとえば、 $IL2$ および $TGF\beta$ のほか、上記の併用処置の考察において記載された様々な作用物質が挙げられる。

【0086】

活性成分は、たとえば、コアセルベーション技術または界面重合により調製されたマイクロカプセル、たとえば、それぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-（メチルメタシラート）マイクロカプセルに、コロイド状薬物送達システム（たとえば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）に、あるいはマクロエマルジョンに封入してもよい。こ

10

【0087】

さらに、持続放出調製物を調製してもよい。持続放出調製物の好適な例として、マトリックスが形状製品、たとえば、フィルムまたはマイクロカプセルである、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられる。持続放出マトリックスの例として、ポリエステル、ヒドロゲル（たとえば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号明細書）、L-グルタミン酸および γ -エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、たとえばLUPRON DEPOT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマーおよびロイプロリドアセテートからなる注射用ミクロスフェア）、およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。ポリマー、たとえばエチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸は100日にわたり分子の放出を可能にする一方、ある種のヒドロゲルはより短い時間タンパク質を放出する。封入された抗体が長時間体内にとどまると、37℃の水分に曝されるため変性または凝集することがあり、生物活性を喪失し、免疫原性が変化する可能性がある。安定化のため、関連するメカニズムに応じて合理的な戦略を考案することができる。たとえば、凝集メカニズムがチオ-ジスルフィド相互交換による分子間S-S結合形成であることが判明した場合、安定化は、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、含水量の

20

30

【0088】

疾患の処置では、本発明の抗体の適切な投与量は処置対象の疾患、疾患の重症度および経過、抗体の投与が予防目的かそれとも治療目的か、これまでの治療、患者の病歴および抗体に対する応答、ならびに主治医の裁量によって異なる。抗体は、患者に1度に投与しても、あるいは一連の処置にわたり投与してもよい。本発明の治療の進行は、従来の技術およびアッセイにより容易にモニターすることができる。

【0089】

本発明の抗体の投与は、全身投与のほか、疾患の部位（たとえば、原発腫瘍または慢性感染部位）への直接投与を含む任意の好適な経路により行うことができる。

40

本発明のタンパク質／ペプチド阻害剤およびアゴニスト

上記に明記したように、本発明の方法に有用なNrp1：セマフォリン軸の阻害剤は、様々なセマフォリン分子、たとえば、可溶性の膜貫通型セマフォリンタンパク質（たとえば、Sema4a）のほか、その様々な阻害性フラグメント、誘導体およびアナログを含む。さらに、Nrp1：セマフォリン軸の競合阻害剤として働き得るNrp1の可溶性細胞外ドメインのほか、その様々な阻害性フラグメント、誘導体およびアナログも本発明内に含まれる。1つの特定の実施形態では、阻害性セマフォリン分子は、Sema4a細胞外ドメイン（GenBank受託番号NP_038686のMet1-His683フラグメント）と、ヒトまたはマウスIgG1のFc領域との融合体（C末端で）であるSe

50

ma4a-Ig融合タンパク質である。1つの特定の実施形態では、阻害性セマフォリン分子は、C末端アミノ酸配列SEAを含むNrpl細胞質ドメインの全部または一部を含むNrplタンパク質のフラグメント（またはその誘導体もしくはアナログ）であり、この分子はNrplタンパク質の細胞質ドメインとPTENタンパク質との間のシグナル伝達経路を阻害する。

【0090】

上記で詳細に論じたように、本発明の方法に有用なNrpl：セマフォリン軸のアゴニストは、全長セマフォリンタンパク質（たとえば、Sema4aタンパク質）のほか、そのアゴニストフラグメント、誘導体およびアナログを含む様々なセマフォリン分子を含む。こうしたアゴニストセマフォリン分子は、たとえば、多量体化しても（たとえば、IgM融合タンパク質を用いて）および／または表面またはビーズ上に固定化してもよい。

10

【0091】

可溶性阻害性形態の膜貫通型セマフォリンタンパク質は、たとえば、その完全な細胞外ドメイン（たとえば、Sema4aの全細胞外ドメイン）、またはTreg上のNrpl：セマフォリン軸を増強することなく高い親和性および特異性でNrplに結合できる、そうした細胞外ドメインのNrpl結合部分（たとえば、Fcドメインに融合された）を含む。いくつかの実施形態では、こうした阻害性形態の膜貫通型セマフォリンタンパク質は、TregにおけるNrpl-VEGF相互作用に影響を与えない。可溶性阻害性形態のNrplの細胞外ドメインは、たとえば、Nrplの全細胞外ドメインまたはTreg上のNrpl：セマフォリン軸を増強することなく高い親和性および特異性でSema4aに結合できる、そうした細胞外ドメインのSema4a結合部分（たとえば、Fcドメインに融合された）を含む。Treg上のNrpl：セマフォリン軸を阻害するセマフォリン分子またはフラグメントまたは可溶性阻害性形態のNrplの細胞外ドメインの有効性は、当該技術分野において公知のアッセイおよび実施例の欄に概説したアッセイ、特にトランスウェル抑制アッセイを用いて試験することができる。

20

【0092】

セマフォリンタンパク質およびフラグメントは、当該技術分野において周知の様々な発現系を用いて、対応する核酸のフラグメントから組換え技術により作製することができ、作製には、細菌（たとえば、E. コリ（E. coli））、酵母（たとえば、サッカロマイセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae））、昆虫（たとえば、Sf9）および哺乳動物細胞（たとえば、CHO、COS-7）など種々の宿主系が好適である。多くの発現ベクターが開発されており、これらの宿主ごとに入手可能である。ベクターとクローニングおよび発現の手順については、たとえば、Sambrook et al.（Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.（1987））およびAusubel et al., 1995に考察されている。本発明に有用な標準的な発現ベクターは当該技術分野において周知であり、プラスミド、コスミド、ファージベクター、ウイルスベクターおよび酵母人工染色体が挙げられる（これに限定されるものではない）。ベクター配列は、エシェリキア・コリ（Escherichia coli）（E. coli）の増殖のための複製起点；SV40複製起点；宿主細胞における選択のためのアンピシリン、ネオマイシンもしくはピューロマイシン耐性遺伝子；ならびに／または優性選択マーカーおよび目的の遺伝子を増幅する遺伝子（たとえば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子）を含んでもよい。

30

40

【0093】

いくつかの実施形態では、DNA配列をベクターにクローニングして融合タンパク質を作る。融合パートナーは、融合タンパク質の可視化または検出を可能にする働きをし得る。たとえば、融合パートナーは、抗体により認識されるエピトープ、ペプチドまたは核酸に結合するドメイン、またはより容易に検出できるペプチドを含んでもよい。融合パートナーとして、HA、myc、His₆、緑色蛍光タンパク質（GFP）、グルタチオン-

50

S-トランスフェラーゼ (GST)、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) 由来のプロテインA、プロテインAの2つの合成IgG結合ドメイン (ZZ)、外膜タンパク質F、 β -ガラクトシダーゼ (lacZ)、ならびに様々なバクテリオファージ λ およびバクテリオファージT7の製品があるが、これに限定されるものではない。本明細書に提供される教示内容から、融合パートナーとして他のタンパク質を使用してもよいことは明らかである。融合タンパク質からGNAL配列の単離を容易にするため、化学的切断 (たとえば、CNBr) または酵素的切断 (たとえば、V8プロテアーゼ、トリプシン) を受けやすいアミノ酸を使用して、GNALタンパク質および融合パートナーを架橋してもよい。

【0094】

好ましくは、本発明の発現ベクターはプロモーター配列を含む。構成的プロモーターおよび誘導性プロモーターの両方を含む好適なプロモーターは一般に入手することができ、当該技術分野において周知である。細菌の発現に繁用されるプロモーターとして、T7ファージ、T3ファージ、T5ファージおよびSP6ファージ、ならびにtrpオペロン、lppオペロンおよびlacオペロン由来のプロモーターが挙げられる。さらにハイブリッドプロモーター (米国特許第4,551,433号明細書を参照されたい)、たとえばtacおよびtrcを使用してもよい。細菌の発現用のプラスミドとして、pET発現ベクターpET3a、pET11a、pET12a~cおよびpET15b (米国特許第4,952,496号明細書を参照; Novagen, Madison, Wis. から入手可能) が挙げられる。E. コリ (*E. coli*) 宿主に有害なペプチドの効率的な過剰産生には、低コピー数のベクター (たとえば、pPD100) を使用してもよい (Dersch et al., FEMS Microbiol. Lett. 123:19, 1994)。T7発現ベクターの細菌宿主は、E. コリ (*E. coli*) 株HMS174 (DE3) pLysS、BL21 (DE3) pLysS、HMS174 (DE3) およびBL21 (DE3) に見られるように、誘導性プロモーター (たとえば、lacUVプロモーター; 米国特許第4,952,496号明細書を参照されたい) に作動可能に連結されたT7RNAポリメラーゼをコードするDNAの染色体コピーを含んでもよい。T7RNAポリメラーゼはさらに、T7発現ベクターと互換性があるプラスミド上に存在してもよい。ポリメラーゼは、 λ プロモーターおよびリプレッサーの制御下にあってもよい (たとえば、pGP1-2; Tabor and Richardson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:1074, 1985)。

【0095】

発現の制御に使用できる他のプロモーターとして、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター (米国特許第5,385,839号明細書および同第5,168,062号明細書)、SV40初期プロモーター領域 (Benoit and Chambon, Nature 1981, 290:304-310)、ラウス肉腫ウイルスの3'末端反復配列に含まれるプロモーター (Yamamoto, et al., Cell 1980, 22:787-797)、疱疹チミジンキナーゼプロモーター (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1981) 78:1441-1445)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列 (Brinster et al., Nature 1982; 296:3942); 原核生物発現ベクター、たとえば β -ラクタマーゼプロモーター (Villa-Komaroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1978) 75:3727-3731) またはtacプロモーター (DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1983; 80:21-25) があるが、これに限定されるものではない; さらに「Useful proteins from recombinant bacteria」 in Scientific American 1980; 242:74-94を参照されたい。使用できるさらに他の有用なプロモーターとして、酵母または他の真菌由来のプロモーターエレメント、たとえばGal4プロモーター、ADC (アルコールデヒドロゲナーゼ) プロモーター、PGK (ホスホグリセリンキナー

10

20

30

40

50

ゼ) プロモーター、アルカリホスファターゼプロモーター；および造血組織特異的性を示す転写制御領域、特に、骨髄系細胞において活性があるβグロビン遺伝子制御領域(Moogram et al., Nature 1985; 315: 338-340; Kollias et al., Cell 1986; 46: 89-94)、造血幹細胞分化因子プロモーター、エリスロポエチン受容体プロモーター(Maouche et al., Blood 1991; 15: 2557)等が挙げられる。

【0096】

本発明の発現ベクターには、他の調節配列をさらに含めてもよい。こうした配列として、エンハンサー、リボソーム結合部位、転写終結シグナル配列、分泌シグナル配列、複製起点、選択可能なマーカーおよび同種のもものが挙げられる。調節配列は、転写およびその後の翻訳を可能にするように相互に作動可能に連結される。

10

【0097】

特定の宿主において特定のコドンが存在すると、発現に有害作用を与えることがある。したがって、たとえば原核細胞または真核細胞など特定の宿主系に合わせて核酸配列を最適化してもよい。コドン使用頻度の問題を緩和するためヌクレオチド配列を変化させる方法は、当業者によく知られている(たとえば、Kane, Curr. Opin. Biotechnol. (1995) 6: 494; Makrides, Microbiol. Rev. (1996) 60: 512; および245ページから253ページにコドン使用頻度表を掲載するBrown (Ed.), Molecular Biology LabFax, BIOS Scientific Publishers, Ltd. (1991)を参照されたい)。

20

【0098】

可溶性型のタンパク質は、培養液を集める、あるいはたとえば、界面活性剤による処理、および必要に応じて音波処理または上記のような他の機械的プロセスで封入体を可溶化することにより得ることができる。可溶化または可溶型タンパク質は、様々な技術、たとえばポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)、等電点電気泳動、二次元ゲル電気泳動、クロマトグラフィー(たとえば、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、イムノアフィニティークロマトグラフィーおよびサイズカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、溶解性の違い、免疫沈降を用いて、またはタンパク質の精製のための他の任意の標準的な技術により単離することができる。

30

【0099】

あるいは、本発明のセマフォリントタンパク質またはフラグメントは、当該技術分野において公知の技術、たとえば、従来のメリフィールド固相f-Mocまたはt-Boc化学を用いて化学的に合成してもよい。ペプチド合成の方法については、Bodansky, 「Principles of Peptide Synthesis,」(Springer Verlag, Berlin (1993)) およびGrant (ed.), 「Synthetic Peptides: A User's Guide,」(W. H. Freeman and Company, New York (1992)) も参照されたい。さらに、自動ペプチド合成機も市販されている(たとえば、Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Bioscience 9600)。

40

【0100】

ある種の実施形態では、本発明は、治療の効力または安定性(たとえば、エキソビポでの有効期間およびインビポでのタンパク質分解に対する抵抗性)を強化するため、その構造の修飾によるセマフォリン分子の機能的変異体の作製も意図している。修飾ポリペプチドは、たとえば、アミノ酸置換、欠失または付加により作製することができる。たとえば、ロイシンとイソロイシンまたはバリン、アスパルテートとグルタメート、トレオニンとセリンとの単独置換、またはあるアミノ酸と構造的に関連したアミノ酸(たとえば、保存的突然変異)との同様の置換は、得られる分子の生物活性に大きな影響を与えないと予想するのが合理的である。保存的置換は、その側鎖に関連があるアミノ酸のファミリー内で

50

起こるものである。追加の方法については、たとえば、Levin et al., Nature, 2012, 484 (7395) : 529-533を参照されたい。

【0101】

本開示は、コンビナトリアルライブラリーのスクリーニングによりセマフォリンポリペプチドのコンビナトリアルミュータントのセットほか、切断ミュータントおよび機能的変異体配列を得る方法も意図している。縮重オリゴヌクレオチドの配列から潜在的なホモログのライブラリーを作成できる多くの方法がある。縮重遺伝子の配列の化学合成は、自動DNA合成機で行うことができ、次いで合成遺伝子を発現のため適切な遺伝子にライゲートすればよい。縮重遺伝子のセットにより、所望の潜在的可溶性ポリペプチド配列のセットをコードする配列のすべてが、1回の混合で得られる。縮重オリゴヌクレオチドの合成は、当該技術分野において周知である（たとえば、Narang, Tetrahedron 39:3 (1983); Itakura et al., 「Recombinant DNA,」 (Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. A G Walton, Amsterdam: Elsevier pp 273-289 (1981)); Itakura et al., Annu. Rev. Biochem. 53:323 (1984); Itakura et al., Science 198:1056 (1984); および Ike et al., Nucleic Acid Res. 11:477 (1983)を参照されたい。こうした技術は、他のタンパク質の定向進化に利用されてきた（たとえば、Scott et al., Science 249:386-390 (1990); Roberts et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:2429-2433 (1992); Devlin et al., Science 249:404-406 (1990); Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87:6378-6382 (1990); および米国特許第5, 223, 409号明細書、同第5, 198, 346号明細書および同第5, 096, 815号明細書を参照されたい）。

【0102】

あるいは、コンビナトリアルライブラリーを作成するのに、アラニンスキャニング変異導入および同種のもの (Ruf et al., Biochemistry 33:1565-1572 (1994); Wang et al., J. Biol. Chem. 269:3095-3099 (1994); Balint et al., Gene 137:109-118 (1993); Grodberg et al., Eur. J. Biochem. 218:597-601 (1993); Nagashima et al., J. Biol. Chem. 268:2888-2892 (1993); Lowman et al., Biochemistry 30:10832-10838 (1991); および Cunningham et al., Science 244:1081-1085 (1989))、リンカースキャニング変異導入 (Gustin et al., Virology 193:653-660 (1993); Brown et al., Mol. Cell Biol. 12:2644-2652 (1992); および McKnight et al., Science 232:316 (1982))、飽和変異導入 (Meyers et al., Science 232:613 (1986))、PCR変異導入 (Leung et al., Methods Cell. Mol. Biol. 1:11-19 (1989))により；またはランダム変異導入、たとえば化学的変異導入 (Miller et al., 「A Short Course in Bacterial Genetics,」 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1992); および Greener et al., Strategies in Mol. Biol. 7:32-34 (1994)) など変異誘発の他の形態を利用してもよい。特にコンビナトリアルな場合のリンカースキャニング変異導入は、切断（生理活性）型の本ポリペプチドを同定するのに好ましい方法である。

10

20

30

40

50

【0103】

点突然変異および切断により作成されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物のスクリーニング、および特定の特性を有する遺伝子産物についてのcDNAライブラリーのスクリーニングには、広範囲に及ぶ技術が当該技術分野において公知である。こうした技術は、本セマフォリンポリペプチドのコンビナトリアル変異導入により作成された遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングに適している場合がある。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするのに最も繁用される技術は典型的には、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングすること、得られたベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換すること、および所望の活性を検出すると、検出された遺伝子産物の遺伝子をコードするベクターが比較的容易に単離しやすくなる条件下、コンビナトリアル遺伝子を発現させることを含む。本明細書に（たとえば、下記の実施例の欄に）記載の例示的アッセイの一部は、コンビナトリアル変異導入技術により作成された多くの縮重配列のスクリーニングに必要なハイスループット解析に適している。

10

【0104】

ある種の実施形態では、本発明の有用なセマフォリン分子は、ペプチドおよびペプチド模倣物などの小分子である。本明細書で使用する場合、「ペプチド模倣物」という用語は、化学修飾ペプチドと、非天然のアミノ酸、ペプチドおよび同種のものを含むペプチド様分子とを含む。ペプチド模倣物は、被検体への投与の際に高い安定性などペプチドに勝る様々な利点がある。ペプチド模倣物を同定する方法は、当該技術分野において周知であり、可能性のあるペプチド模倣物のライブラリーを含むデータベースのスクリーニングが挙げられる。たとえば、Cambridge Structural Databaseには、既知の結晶構造を有する300,000を超える化合物のコレクションがある（Allen et al., Acta Crystallogr. Section B 35:2331 (1979)）。標的分子の結晶構造が入手できない場合、たとえば、プログラムCONCORDを用いて構造を作成することができる（Rusinko et al., J. Chem. Inf. Comput. Sci. 29:251 (1989)）。別のデータベース、Available Chemicals Directory (Molecular Design Limited, Informations Systems; San Leandro Calif.)には、市販されており、さらに検索してセマフォリンポリペプチドの有望なペプチド模倣物を同定することもできる約100,000の化合物がある。

20

30

【0105】

ある種の実施形態では、本発明の阻害性およびアゴニストセマフォリンポリペプチドは、翻訳後修飾をさらに含んでもよい。こうした修飾として、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化およびアシル化があるが、これに限定されるものではない。このため、修飾された可溶性ポリペプチドは、非アミノ酸要素、たとえばポリエチレングリコール、脂質、多糖または単糖およびホスフェートを含んでもよい。こうした非アミノ酸要素のポリペプチドの官能性に対する作用は、本明細書に記載の機能アッセイを用いて試験することができる。

【0106】

ある態様では、本発明のセマフォリンポリペプチドの機能的変異体または修飾体は、セマフォリンポリペプチドの少なくとも一部および1つまたは複数の融合ドメインを有する融合タンパク質を含む。こうした融合ドメインのよく知られた例として、以下に限定されるものではないが、ポリヒスチジン、Glu-Glu、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、チオレドキシン、プロテインA、プロテインG、および免疫グロブリン重鎖定常領域（Fc）、マルトース結合タンパク質（MBP）が挙げられ、これらはアフィニティークロマトグラフィーによる融合タンパク質の単離に特に有用である。

40

【0107】

アフィニティー精製においては、アフィニティークロマトグラフィーに適切なマトリックス、たとえばグルタチオン樹脂、アミラーゼ樹脂、およびニッケルまたはコバルトコン

50

ジュゲート樹脂を使用することができる。当該技術分野において周知の別の融合ドメインは、緑色蛍光タンパク質（GFP）である。融合ドメインは、特異抗体が利用できる通常短いペプチド配列である「エピトープタグ」をさらに含む。特定のモノクローナル抗体が容易に利用できるよう知られたエピトープタグとして、FLAGタグ、インフルエンザウイルス赤血球凝集素（HA）タグおよびc-mycタグが挙げられる。場合によっては、融合ドメインは、第Xa因子またはトロンビンなどのプロテアーゼ切断部位を有し、当該プロテアーゼが融合タンパク質を部分的に消化し、それによりそこから組換えタンパク質を遊離させることができる。次いで遊離したタンパク質は、その後クロマトグラフ分離により融合ドメインから単離することができる。ある種の実施形態では、可溶性ポリペプチドは、ポリペプチドを安定化することができる1つまたは複数の修飾を含む。たとえば、

10

【0108】

一実施形態では、単離または精製されたセマフォリンタンパク質は、標準的技術、たとえば化学的架橋結合（たとえば、直接または1つもしくは複数のリンカー分子を介して）により、あるいは当該タンパク質または親和性タグに対して産生された抗体、または親和性タグのリガンドを介して好適なアフィニティーマトリックスまたは固体支持体に固定化してもよい。固体支持体は、任意の好適な固相またはマトリックス、たとえばビーズ、プレートの壁または他の好適な表面（たとえば、マイクロタイタープレートのウェル）、カラム微細孔性ガラス（CPG）またはウェル内などの溶液に浸すことができるピンであってもよい。好都合には、支持体は、たとえばガラス、シリカ、ラテックス、プラスチックまたは任意の高分子材料で作られていてもよい。支持体はさらに、生分解性材料から作られていてもよい。支持体の表面は、疎水性でも、あるいは親水性でもよい。支持体は好適には機能性表面を有する。たとえば、米国特許第4,336,173号明細書；同第4,459,378号明細書；同第4,654,267号明細書を参照されたい。微粒子支持体（たとえばビーズまたは粒子）は、実質的に球状であってもよい。微粒子支持体の例には、単分散粒子、すなわち大きさが実質的に均一である粒子である（たとえば直径の標準偏差が5%未満の大きさ）。こうした粒子は、反応の再現性が非常によいという利点を有する。非磁性ポリマービーズも適用できる。こうしたビーズは、様々な製造業者、たとえばDynal Particles AS、Qiagen、Amersham Biosciences、Serotec、Seradyne、Merck、日本ペイント株式会社（Nippon Paint）、Chemagen、Promega、Prolabo、Polysciences、AgowaおよびBangs Laboratoriesから入手可能である。好適な支持体の別の例には、磁性ビーズまたは粒子がある。磁性ビーズおよび粒子は好適には、常磁性でも、あるいは超常磁性でもよい。超常磁性ビーズおよび粒子は、たとえば欧州特許第0106873号明細書に記載されている。磁性ビーズおよび粒子は、いくつかの製造者、たとえばDynal Biotech ASAから入手可能である。

20

30

【0109】

本発明のセマフォリン分子（たとえば、アゴニスト分子）はさらに、1つまたは複数の多量体化ドメイン、たとえば、IgGまたはストレプトアビジンに共有結合していても、あるいは非共有結合していてもよい。有用な有機分子ベースの多量体は、官能性環状構造、たとえばベンゼン環およびデキストランを含む。たとえば、米国特許第5,635,363号明細書、米国特許出願公開第2004/209295号明細書、国際公開第02/072631号パンフレットおよび国際公開第99/42597号パンフレットを参照されたい。多量体化ドメインへの結合は、たとえば、多量体化ドメインの反応基（たとえばデキストランポリマー上のビニルスルホン官能基）とセマフォリンタンパク質上の反応基（たとえばタンパク質表面上のアミノ基）との間の化学反応により、またはセマフォリンタンパク質の一部（たとえば、ビオチン化ペプチド成分）と多量体化ドメイン（たとえばストレプトアビジン4量体タンパク質上のビオチンの4つの結合部位）との間の非共有結

40

50

合性相互作用により、共有結合を介しても、あるいは非共有結合を介してもよい。セマフォリンと多量体化ドメインとの共有結合に適切な化学反応は、求電子試薬の活性化による求核置換（たとえばアシル化、たとえばアミドの形成、ピラゾロンの形成、イソオキサゾロンの形成；アルキル化；ビニル化；ジスルフィドの形成）、炭素-ヘテロ多重結合への付加（たとえばアルデヒドまたはケトンとホスホネートの反応によるアルケンの形成；アリール化；アルキルボロネートまたはエノールエーテルとの反応によるアレーン／ヘタレーンのアルキル化）、求核試薬の活性化を用いた求核置換（たとえば縮合；エノールエーテルまたはエナミンによる脂肪族ハライドまたはトシレートのアルキル化）、および付加環化を含む。1つまたは複数の多量体化ドメインとセマフォリンタンパク質との間に非共有結合性相互作用を与えるのに適切な分子は、以下の分子ペアおよび分子：ストレプトアビジン／ビオチン、アビジン／ビオチン、抗体／抗原、DNA／DNA、DNA／PNA、DNA／RNA、PNA／PNA、LNA／DNA、ロイシンジッパー、たとえば Fos／Jun、IgG 2 量体タンパク質、IgM 多価タンパク質、酸／塩基コイルドコイルヘリックス、キレート／金属イオン結合キレート、ストレプトアビジン（SA）およびアビジンならびにその誘導体、ビオチン、免疫グロブリン、抗体（モノクローナル、ポリクローナルおよび組換え体）、抗体フラグメントおよびその誘導体、AP-1 のロイシンジッパードメイン（jun および fos）、ヘキサ-*his*（金属キレート部分）、ヘキサ-*hat* GST（グルタチオン S-トランスフェラーゼ）グルタチオン親和性、カルモジュリン-結合ペプチド（CBP）、Streptag、セルロース結合ドメイン、マルトース結合タンパク質、S-ペプチドタグ、キチン結合タグ、免疫反応エピトープ、エピトープタグ、E2 Tag、HA エピトープタグ、Myc エピトープ、FLAG エピトープ、AU1 および AU5 エピトープ、Glu-Glu エピトープ、KT3 エピトープ、IRSpitope、Btag エピトープ、プロテインキナーゼ-C エピトープ、VSV エピトープ、糖質、脂質およびタンパク質を含む多様な化合物への結合を媒介するレクチン、たとえば Con A（カナバリア・エンシフォルミス（*Canavalia ensiformis*））または WGA（コムギ胚芽凝集素）、および テトラネクチンまたは Protein A もしくは G（抗体親和性）を含む。こうした結合物質の組み合わせも含まれる。特に、MHC 複合体をタグ化する場合、多量体化ドメインは、「抗タグ」であってもよい。「抗タグ」は、タグに結合している抗体およびこうしたタグに結合できる他の任意の分子を意味する。多量体技術については、さらに Mekhaie et al., Scientific Reports, 2011, 1:124 も参照されたい。

本発明の小分子阻害剤およびアゴニスト

本発明は、Treg 上の Nr p1：セマフォリン軸の小分子阻害剤およびアゴニストをさらに包含する。小分子は、一般に低分子量（好ましくは約 2000 ダルトン未満、約 1000 ダルトン未満、または約 500 ダルトン未満）を有する様々なグループの合成物質および天然物質である。小分子は、以下に限定されるものではないが、たとえば、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド核酸、ペプチド模造物、糖質、脂質または他の有機（炭素を含む）分子または無機分子であってもよく、合成でも、あるいは天然に存在しても、あるいは任意選択的に誘導体化されていてもよい。こうした小分子は、治療送達が可能な物質であってもよいし、あるいは送達または標的化しやすいようにさらに誘導体化してもよい。こうした小分子は、天然の供給源（たとえば、植物、真菌、微生物および同種のもの）から単離しても、あるいは合成もしくは天然化合物のランダムまたはコンビナトリアル化学ライブラリーから単離しても、あるいは合成してもよい。Werner et al., (2006) Brief Funct. Genomic Proteomic 5 (1): 32-6 を参照されたい。使用できる多くのランダムまたはコンビナトリアルライブラリーが、当該技術分野において公知である。現在、糖類、ペプチドおよび核酸を用いた化合物のランダム合成および指向性合成 (directed synthesis) 用に、多くの手段が使用されている。合成化合物のライブラリーは、Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK)、Comgenex (Princeton, N. J.)、Brandon Associates (Merrima

ck, N. H.) および Microsource (New Milford, Conn.) から市販されている。希少な化学ライブラリーは、Aldrich (Milwaukee, Wis.) から入手可能である。あるいは、細菌抽出物、真菌抽出物、植物抽出物および動物抽出物の形態の天然化合物のライブラリーは、たとえば Pan Laboratories (Bothell, Wash.) または MycoSearch (N. C.) から入手可能であるか、または容易に作製可能である。加えて、天然および人工的に作成されたライブラリーおよび化合物は、従来の化学的手段、物理的手段および生化学的手段により容易に修飾できる (Blondelle et al. , (1996) Tib Tech 14:60) 。

【0110】

分子のライブラリーを調製するための方法は当該技術分野において周知であり、多くのライブラリーが市販されている。本発明の対象となるライブラリーとして、ペプチドライブラリー、ランダム化オリゴヌクレオチドライブラリー、合成有機コンビナトリアルライブラリーおよび同種のもものが挙げられる。縮重ペプチドライブラリーは、溶液中で固定化した形態で細菌鞭毛ペプチドディスプレイライブラリーとしてまたはファージディスプレイライブラリーとして容易に調製することができる。ペプチドリガンドは、少なくとも1つのアミノ酸を含むペプチドのコンビナトリアルライブラリーから選択することができる。ライブラリーは、ペプトイドおよび非ペプチド合成部分から合成してもよい。こうしたライブラリーをさらに合成してもよく、そうしたライブラリーは、その天然に存在する対応物と比較して酵素分解を受けにくい非ペプチド合成部分を含む。ライブラリーは、たとえば、以下に限定されるものではないが、ペプチドオンプラスミド (peptide-on-plasmid) ライブラリー、ポリソームライブラリー、アプタマーライブラリー、合成ペプチドライブラリー、合成小分子ライブラリーおよび化学ライブラリーを含むことを意図している。ライブラリーは、環状炭素もしくは複素環構造、および／または、上記の官能基の1つまたは複数で置換された芳香族もしくは多環芳香族構造を含んでもよい。

【0111】

化学合成ライブラリーの例は、Fodor et al. , (1991) Science 251:767-773; Houghten et al. , (1991) Nature 354:84-86; Lam et al. , (1991) Nature 354:82-84; Medynski, (1994) BioTechnology 12:709-710; Gallop et al. , (1994) J. Medicinal Chemistry 37(9):1233-1251; 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; Jayawickreme et al. , (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1614-1618; Salmon et al. , (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11708-11712; 1993年10月14日付けの国際公開第93/20242号パンフレット; および Brenner et al. , (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5381-5383に記載されている。

【0112】

ファージディスプレイライブラリーの例は、Scott et al. , (1990) Science 249:386-390; Devlin et al. , (1990) Science, 249:404-406; Christian, et al. , (1992) J. Mol. Biol. 227:711-718; Lenstra, (1992) J. Immunol. Meth. 152:149-157; Kay et al. , (1993) Gene 128:59-65; および国際公開第94/18318号パンフレ

10

20

30

40

50

ットに記載されている。

【0113】

ライブラリーのスクリーニングは、一般に知られた任意の様々な方法により達成することができる。たとえば、ペプチドライブラリーのスクリーニングを開示している以下の参考文献を参照されたい：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; Staudt 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; すべてLadner et al. への米国特許第5,096,815号明細書; 同第5,223,409号明細書; および同第5,198,346号明細書; Rebar et al., (1993) Science 263:671-673; ならびに国際公開第94/18318号パンフレット。

10

【0114】

Nrp1:セマフォリン軸のアゴニストおよびアンタゴニストの同定およびスクリーニングは、たとえば、X線結晶解析、中性子回折、核磁気共鳴分析および構造決定のための他の技術を用いて、関連するタンパク質の構造的特徴を決定することによりさらにに行いやすくなることができる。これらの技術は、アゴニストおよびアンタゴニストの合理的設計または同定に対応する。

20

TregにおけるNrp1もしくはセマフォリンの発現または下流の分子イベントに影響を与える化合物

上記に記載したように、本発明は、TregにおけるNrp1発現を阻害する、または通常のT細胞上のセマフォリン発現を局所的に（たとえば、腫瘍において）阻害する、またはNrp1がその下流のシグナル伝達経路に関与するのを防止するTregにおけるNrp1:セマフォリン軸の阻害剤をさらに包含する。

30

【0115】

本発明は、TregにおけるNrp1発現を強化する、または通常のT細胞上のセマフォリン発現を局所的に（たとえば、糖尿病の膵島において）強化する、またはNrp1のその下流のシグナル伝達経路への関与を強化する、TregにおけるNrp1:セマフォリン軸のアゴニストをさらに包含する。

【0116】

有用な発現阻害剤の非限定的な例として、たとえば、干渉RNA（たとえば、siRNA）、dsRNA、RNAポリメラーゼIII転写DNA、リボザイムおよびアンチセンス核酸が挙げられる。発現強化の非限定的な例として、たとえば、レトロウイルス遺伝子導入、レンチウイルス遺伝子導入、プラスミドおよびトランスフェクションを用いた過剰発現が挙げられる。

40

【0117】

アンチセンスDNA、RNAおよびDNA/RNAの分子を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的mRNAへの結合によりmRNAの翻訳を直接阻止し、タンパク質翻訳を防止する働きをする。たとえば、従来のホスホジエステール技術により、たとえば、標的DNA配列の特有の領域と相補的な少なくとも約15塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成することができる(Dallas et al., (2006) Med. Sci. Monit. 12(4):RA67-74; Kalota et al., (2006) Handb. Exp. Pharmacol. 173:173-96; Lutzelburger et al., (2006) Handb. Exp. Pharmacol.

50

173:243-59)。

【0118】

s i R N A は、典型的には15～50塩基対、好ましくは21～25塩基対を含み、細胞内に発現した標的遺伝子またはRNAと同一またはほぼ同一のヌクレオチド配列を有する二本鎖構造を含む。アンチセンスポリヌクレオチドとして、モルホリノ、2'-O-メチルポリヌクレオチド、DNA、RNAおよび同種のものがあるが、これに限定されるものではない。

【0119】

RNAポリメラーゼIII転写DNAは、たとえばU6プロモーターなどのプロモーターを含む。こうしたDNAは転写されて、s i R N Aとして機能することができるスモールヘアピンRNA、またはアンチセンスRNAとして機能し得る線状RNAを細胞内に産生し得る。阻害剤はインビトロで重合されてもよく、組換えRNAはキメラ配列またはこれら群の誘導体を含む。阻害剤は、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、合成ヌクレオチド、または標的RNAおよび／もしくは遺伝子が阻害されるような任意の好適な組み合わせを含んでもよい。さらに、これらの核酸の形態は、一本鎖でも、二本鎖でも、三本鎖でも、あるいは四本鎖でもよい。(たとえばBass(2001)Nature, 411, 428-429; Elbashir et al., (2001)Nature, 411, 494-498; および国際公開第00/44895号パンフレット、国際公開第01/36646号パンフレット、国際公開第99/32619号パンフレット、国際公開第00/01846号パンフレット、国際公開第01/29058号パンフレット、国際公開第99/07409号パンフレット、国際公開第00/44914号パンフレットを参照)。

【0120】

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒できる酵素RNA分子である。リボザイム作用のメカニズムには、相補的な標的RNAとのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーション、その後のエンドヌクレアーゼ切断が関係する。mRNA配列のエンドヌクレアーゼ切断を特異的かつ効率的に触媒する操作されたハンマーヘッド型モチーフリボザイム分子も、本発明の範囲内にある。標的分子について以下の配列GUA、GUUおよびGUCを含むリボザイム切断部位を調査すると、任意の有望なRNA標的内の特異的リボザイム切断部位が最初に特定される。特定されたなら、切断部位を含む標的遺伝子の領域に対応する約15～20リボヌクレオチドの短いRNA配列について、予想される構造的特徴、たとえばオリゴヌクレオチド配列を不適なものにし得る二次構造を評価すればよい。候補標的の適合性も、たとえば、リボヌクレアーゼプロテクションアッセイを用いて、その相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの利用可能性を試験することにより評価することができる。

【0121】

本発明の発現阻害剤は、既知の方法により調製することができる。これらの方法は、たとえば、固相ホスホロアミダイト化学合成による化学合成の技術を含む。あるいは、アンチセンスRNA分子は、RNA分子をコードするDNA配列のインビトロまたはインビボ転写により作製することもできる。こうしたDNA配列は、好適なRNAポリメラーゼプロモーター、たとえばT7またはSP6ポリメラーゼプロモーターを組み込んだ多種多様なベクターに組み込むことができる。たとえば、Weintraub, H. et al., Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews-Trends in Genetics, Vol. 1(1)1986を参照されたい。

【0122】

本発明のオリゴヌクレオチドへの様々な修飾は、細胞内の安定性を高め、半減期を延長する手段として導入してもよい。考えられる修飾として、分子の5'および／または3'末端へのリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのフランキング配列の付加、またはオリゴヌクレオチド骨格内のホスホジエステラーゼ結合ではなくホスホロチオエー

トまたは2'-O-メチルの使用があるが、これに限定されるものではない。

【0123】

多種多様な標的分子に結合するアプタマー核酸配列は、容易に作製される。本発明のアプタマー核酸配列は、完全にもしくは部分的にRNAからなっても、または完全にもしくは部分的にDNAからなっても、および／または、他のヌクレオチドアナログからなってもよい。アプタマーは典型的には、SELECTとして知られる公知のインビボまたはインビトロ（最も典型的には、インビトロ）選択技術を利用することにより、特定のリガンドに結合するように開発される（Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment）。アプタマーの作製方法は、たとえば、Ellington and Szostak (1990) Nature 346:818、Tuerk and Gold (1990) Science 249:505、米国特許第5,582,981号明細書；国際公開第00/20040号パンフレット；米国特許第5,270,163号明細書；Lorsch and Szostak (1994) Biochem. 33:973；Mannironi et al., (1997) Biochem. 36:9726；Blind (1999) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 96:3606-3610；Huizenga and Szostak (1995) Biochem. 34:656-665；国際公開第99/54506号パンフレット、国際公開第99/27133号パンフレットおよび国際公開第97/42317号パンフレット；ならびに米国特許第5,756,291号明細書に記載されている。

10

20

【0124】

1つの特定の実施形態では、Nrpl：セマフォリン軸の阻害剤は、C末端アミノ酸配列SEA（C末端PDZドメイン結合モチーフ）を含むNrplタンパク質の細胞質ドメインとPTENタンパク質との間のシグナル伝達経路を阻害する。こうした阻害剤は、たとえば、C末端アミノ酸配列SEAを含むNrplタンパク質の細胞質ドメインの全部または一部を含むNrplタンパク質のペプチドもしくは小分子もしくはフラグメントまたはその誘導体もしくはアナログであってもよい。

本発明の阻害剤またはアゴニスト組成物を投与するための方法

ある種の実施形態では、本発明の阻害剤およびアゴニストは、薬学的に許容されるキャリアまたは賦形剤と共に医薬組成物として製剤化される。本化合物は、ヒトまたは動物医学に使用するのに都合のよい任意の方法で投与されるように製剤化してもよい。本組成物中には、湿潤剤、乳化剤および滑沢剤、たとえばラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウムのほか、着色剤、放出剤(release agent)、コーティング剤、防腐剤および酸化防止剤がさらに存在してもよい。

30

【0125】

製剤は好都合には単位剤形で提供してもよく、当該技術分野において周知の任意の方法により調製することができる。単一剤形を製造するのにキャリア材料と組み合わせてもよい活性成分の量は、処置対象の宿主および特定の投与モードによって異なる。単一剤形を製造するのにキャリア材料と組み合わせてもよい活性成分の量は、一般に治療効果を発揮する化合物の量である。

40

【0126】

一般に製剤は、液体キャリアもしくは微粉化した固体キャリア、またはその両方を用いて調製し、次いで必要に応じて製品に成形してもよい。

【0127】

経口投与用の製剤は、各々所定の量の1種または複数種の活性成分を含むカプセル剤、カシェ剤、丸剤、錠剤、散剤、顆粒剤の形態であってもよいし、あるいは水性液体または非水性液体中の溶液剤もしくは懸濁剤または水中油型もしくは油中水型液体エマルジョンおよび同種のものとしてもよい。

【0128】

経口投与用の固形剤形（カプセル剤、錠剤、丸剤、糖衣錠、散剤、顆粒剤および同種の

50

もの)では、1種または複数種の活性成分を1種または複数種の薬学的に許容されるキャリア、たとえばクエン酸ナトリウムまたはリン酸二カルシウム、および／または、以下の(1)充填剤または増量剤、たとえばデンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトールおよび／またはケイ酸；(2)バインダー、たとえば、カルボキシメチルセルロース、アルギネート、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロースおよび／またはアカシア；(3)保湿剤、たとえばグリセロール；(4)崩壊剤、たとえば寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモまたはタピオカデンプン、アルギン酸、特定のシリケートおよび炭酸ナトリウム；(5)溶解遅延化剤、たとえばパラフィン；(6)吸収促進剤、たとえば第四級アンモニウム化合物；(7)湿潤剤、たとえば、セチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロール；(8)吸収剤、たとえばカオリンおよびベントナイト粘土；(9)滑沢剤、たとえばタルク、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およびこれらの混合物；ならびに(10)着色剤のいずれかと混合してもよい。カプセル剤、錠剤および丸剤の場合、医薬組成物は、緩衝剤をさらに含む。同様の種類の固体組成物を、ラクトースまたは乳糖のような賦形剤のほか、高分子量ポリエチレングリコールおよび同種のものを用いて軟および硬ゼラチンカプセルの充填剤として利用してもよい。

10

【0129】

懸濁剤は、1種または複数種の活性成分に加えて、懸濁化剤、たとえばエトキシ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およびソルビタンエステル、微結晶性セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、寒天ならびにトラガントおよびこれらの混合物を含んでもよい。

20

【0130】

本発明の組成物はさらに、皮膚あるいは粘膜に局所投与することができる。これは、副作用を引き起こす可能性が最も低い直接送達の最大の機会を提供する。局所製剤は、皮膚または角質層の浸透促進剤として効果的であることが知られている多種多様の作用物質の1種または複数種をさらに含んでもよい。これらの例には、2-ピロリドン、N-メチル-2-ピロリドン、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、プロピレングリコール、メチルまたはイソプロピルアルコール、ジメチルスルホキシドおよびアズンがある。製剤を化粧品的に許容されるものにするため、別の作用物質をさらに含ませてもよい。これらの例には、脂肪、ワックス、油、色素、香料、防腐剤、安定剤および界面活性剤がある。さらに角質溶解薬、たとえば当該技術分野において公知のものを含めてもよい。例にはサリチル酸および硫黄がある。

30

【0131】

局所投与または経皮投与の剤形として、散剤、スプレー剤、軟膏剤、ペースト剤、クリーム剤、ローション剤、ゲル剤、溶液剤、パッチ剤および吸入剤が挙げられる。本治療薬は、滅菌条件下で薬学的に許容されるキャリア、および必要とされる場合がある任意の防腐剤、緩衝液または噴霧剤と混合してもよい。軟膏剤、ペースト剤、クリーム剤およびゲル剤は、当該ポリペプチド剤に加えて、賦形剤、たとえば動物性脂肪および植物性脂肪、油、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガント、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、タルクおよび酸化亜鉛またはこれらの混合物を含んでもよい。

40

【0132】

散剤およびスプレー剤は、1種または複数種の活性成分に加えて、賦形剤、たとえばラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウムおよびポリアミド粉末、またはこれらの物質の混合物を含んでもよい。スプレー剤はさらに、通常の噴霧剤、たとえばクロロフルオロヒドロカーボンおよび揮発性の非置換炭化水素、たとえばブタンおよびプロパンを含んでもよい。

【0133】

非経口投与に好適な医薬組成物は、1種または複数種の活性成分と組み合わせて、1種または複数種の薬学的に許容される等張な無菌の水溶液もしくは非水溶液、分散液、懸濁

50

液またはエマルジョン、あるいは使用直前に無菌の注射用溶液もしくは分散液に再溶解できる無菌の粉末を含んでもよく、これらは、酸化防止剤、緩衝液、静菌薬、製剤を予定のレシピエントの血液と等張にする溶質、または懸濁剤もしくは増粘剤を含んでもよい。本開示の医薬組成物に利用してもよい好適な水性および非水性キャリアの例として、水、エタノール、ポリオール（たとえばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールおよび同種のもの）およびこれらの好適な混合物、植物油、たとえばオリーブ油、ならびに注射用有機エステル、たとえばオレイン酸エチルが挙げられる。適切な流動性は、たとえば、コーティング材料、たとえばレシチンの使用、分散液の場合、必要とされる粒度の維持、および界面活性剤の使用により維持することができる。

【0134】

これらの組成物は、防腐剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤をさらに含んでもよい。微生物の作用の予防は、様々な抗細菌剤および抗真菌剤、たとえば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸および同種のものを含めることで確保することができる。さらに組成物に等張剤、たとえば糖、塩化ナトリウムおよび同種のものを含めると望ましい場合がある。さらに、注射用医薬品形態の吸収の持続化は、吸収を遅延させる作用物質、たとえばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含めることで行うことができる。

【0135】

注射用デポー形態は、生分解性ポリマー、たとえばポリラクチド-ポリグリコリドで1種または複数種の活性成分のマイクロカプセル化マトリックスを形成することにより製造することができる。活性成分とポリマーとの比および利用する特定のポリマーの性質に応じて、アンタゴニストの放出速度を制御することができる。他の生分解性ポリマーの例として、ポリ（オルトエステル）およびポリ（無水物）が挙げられる。注射用製剤は、体組織に適合するリポソームまたはマイクロエマルジョンにアンタゴニストを封入することによっても調製される。

【0136】

腔内または直腸投与用の製剤は、たとえば、カカオバター、ポリエチレングリコール、坐剤ワックスまたはサリチレートを含み、室温で固体だが、体温で液体であり、したがって直腸または腔腔で融解して活性化合物を放出する1種または複数種の好適な非刺激性賦形剤またはキャリアと、1種または複数種の活性成分を混合することにより調製することができる坐剤として提供してもよい。

【実施例】

【0137】

以下の例によって本発明をさらに記載および説明する。しかしながら、本明細書のどの箇所でそうした例および他の例を使用しても、単に例示のためのものであり、いかなる意味においても本発明または任意に例示した用語の範囲および意味を限定するものではない。同様に、本発明は、本明細書に記載する任意の特定の好ましい実施形態に限定されるものではない。実際に、本明細書を読むと本発明の多くの修正および変形が当業者に明らかになるかもしれないが、そうした変形は、本発明の精神または範囲を逸脱することなく行うことができる。したがって本発明は、添付の特許請求の範囲の用語と共に、その特許請求の範囲が権利を有する等価物の全範囲によってのみ限定される。

【0138】

実施例1

材料および方法

マウス。C57/BL6マウスおよびdntGFβRIIマウスは、Jackson Laboratoriesから購入した。Foxp3^{YFP-icre}、Foxp3⁻マウスおよびFoxp3^{DTR-gfp}マウスは、A. Y. Rudensky (HHMI/Washington University; Rubtsov et al., Immunity, 2008, 28:546-558; Fontenot et al., Nat Immunol., 2003, 4(4):330-336; Kim et al.,

Nat Immunol., 2007, 8 (2) : 191-197を参照されたい) から入手した。Il10^{-/-}マウスは、T. Geiger (St. Jude Children's Research Hospital; Selvaraj and Geiger, J Immunol., 2008, 180 (5) : 2830-2838を参照されたい) から入手した。Nrpl^{f/f}マウスは、D. Cheresch (UCSD; Acevedo et al., Blood, 2008, 111 (5) : 2674-2680を参照されたい) から入手した。Foxp3⁻×CD45.1マウスは、ヘテロ接合交雑から繁殖させた。動物実験は、St. Jude Animal Resource CenterのAmerican Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care公認の特定病原体の感染していない (specific-pathogen-free) 施設で行った。動物プロトコルは、St. Jude Animal Care and Use Committeeにより承認された。

【0139】

Nrpl抗体およびセマフォリン抗体。マウスSema-3a、マウスNrplおよびヒトSema4a-Igは、R&D Biosystemsから購入した。実験には、以下の2つの異なるNrpl遮断抗体を使用した：(i) R&D AF566は、抗Nrplマウス/ラットアフィニティー精製ポリクローナル抗体 (ヤギIgG) であり、(ii) 抗Nrplモノクローナル抗体 (ラットIgG2a) は、R&D Biosystemsから提供された (R&D Systems, clone 761704, MAB59941)。セマフォリン-4a (Sema4a) に対する以下の抗体を使用した：MBL Internationalのclone 5E3およびR&D Biosystemsのモノクローナル抗体 (clone 757129) (たとえば、図1E、図2H、図4Iを参照されたい)。Sema4a染色抗体は、MBL International (clone 5E3) から購入し、室内でビオチンまたはAlexa Fluor 647にコンジュゲートした。大部分のフローサイトメトリー抗体はBioLegendから購入した。抗Foxp3および抗EomesはeBioscienceから購入した。KLf2抗体はMilliporeから購入した。ホスホ-Akt (S473) 抗体、ホスホ-S6K1 (T421/S424) 抗体、Foxo3a抗体およびpan Akt抗体は、Cell Signaling Technologiesから購入した。PTEN-HRP抗体はSanta Cruz Biotechnologyから購入した。

【0140】

RNA干渉。対照siRNA (カタログ# 4390843) およびSema4a (カタログ# 4390771、siRNA# s73547) siRNAのプールは、Life Technologiesから購入し、製造者の指示通りに再懸濁した。通常のCD4⁺およびCD8⁺T細胞は、ネガティブセレクションにより磁気的に選別し、Amaxa (Lonza) により300pMolのsiRNAおよび2μgのpMaxGFP対照プラスミドをトランスフェクトし、Amaxaヌクレオフェクター培地で一晩放置した。次いでGFP、CD25およびCD45RBの発現に基づき細胞を選別し、トランスウェル抑制アッセイの上部ウェルでTreg細胞と共培養した。

【0141】

プラスミド。Nrpl.mCherryをAddgeneから入手し、レトロウイルス過剰発現コンストラクトを作製する鋳型とした使用した。Nrpl^{WT}をネイティブなシグナル配列を加えて作製し、pMCherryにクローニングした。Nrpl^{ΔSEA}はWTコンストラクトから作製し、セリンコドンを終止コドンに変異させて末端のSEAモチーフを欠失させた。Akt^{WT}、Akt^{DN} (Franke et al., Cell, 1995, 81 : 727-736に記載されたドミナントネガティブキナーゼ死亡K179M (dominant-negative kinase dead K179M))、およびpBabe空ベクターは、D. R. Green (Morgenstern JP, Land H., 1990, Nucleic Acids Research 1

8 (12) : 3587-96に記載) から入手した。

【0142】

ヒトT細胞集団。ヒト臍帯サンプルは、St. Louis Cord Blood BankのB. Triplet、M. HowardおよびM. McKennaから提供され、母親からインフォームドコンセントを得て経膈分娩の直後に臍静脈から採取し、St. Louis Cord Blood Bank Institutional Review Board (IRB) により承認された。研究使用は、St. Jude IRBにより承認された。

【0143】

トランスウェル抑制。FACSにより精製された 1.25×10^4 Treg (CD45RB⁺ Foxp3^{YFP-cre}) を、Millipore Millicell 96の上部チャンバー (細孔サイズ0.4 μ m) において、選別したTconv (CD45RB⁺ CD25⁻ CD4⁺ またはCD8⁺)、B細胞 (B220⁺) またはTregの存在下1:4の比率で、Sema4a-IgまたはIgGコンジュゲートラテックスビーズ (1:1の比率) の存在下、抗CD3 (145.2C11) および抗CD28 (37.51) (BioLegendから入手) コンジュゲートラテックスビーズ (Life Technologiesから購入) (1:1の比率) の存在下、および/または中和抗体の存在下で刺激した。一部の試験では、上部ウェルの共培養細胞を2% PFAで15分間固定し、Tregとの共培養の前に十分に洗浄した。精製した 2.5×10^4 Tregを、下部ウェルにおいて1:1の比率で抗CD3/抗CD28ビーズにて刺激した。細胞を72時間培養し、最後の8時間³ [H] -チミジンでパルスした。下部チャンバーを回収し、 β タカウンターで読み取った。

【0144】

ヒトの研究では、選別した臍帯血Tconv (CD4⁺ CD25⁻) およびTreg (CD4⁺ CD25⁺) を、3 μ g/mLのプレート結合抗CD3 (clone OKT3、BioLegend)、2 μ g/mLの可溶性抗CD28 (clone CD28.1、BioLegend)、および100 U/mLのrhIL-2 (St. Jude Pharmacy) で7~9日間活性化した。回収および洗浄後、トランスウェルプレート (Transwell plate) の上部ウェルにおいてTregを、固定自家TconvまたはIgG/Sema4a-Igコートラテックスビーズにて1:200の比率で刺激した。下部ウェルでは 2.5×10^4 Tconvを、OKT3/CD28.1コートラテックスビーズにて1:1の比率で刺激した。細胞を5日間培養し、³ [H] -チミジンで最後の8時間パルスした。下部チャンバーを回収し、 β タカウンターで読み取った。

【0145】

実験全体を正規化するため「トランスウェル抑制率」は、 $100 - 100 \times [(\text{特定のウェルのCPM}) / (\text{非抑制細胞の平均CPM})]$ と定義する。

【0146】

融合タンパク質。Sema4aまたはNrplの細胞外ドメインをコードする配列をpX-Igにインフレームでクローニングして、Sema4a-またはNrpl-マウスIgG1-Fc融合タンパク質コンストラクト (Sema4a-IgまたはNrpl-Ig) を作製した。このコンストラクトをJ558L B細胞にエレクトロポレーションし、単一細胞ソーティングにより高産生クローンを選択した。高産生クローンをSartoriusバイオリアクターに播種し、プロテインG精製および濃縮のため回収した。スルフェートラテックス4 μ mビーズ (Life Technologies) を1ビーズあたり3 pgのタンパク質でアイソタイプコントロール (マウスIgG1、MOPC21、R&D Biosystems) またはSema4a-Igと一晚コンジュゲートし、10% FBSでブロッキングし、培地で保存した。マウスSema-3a-Fc、Sema4a-Fc、マウスNrpl、およびヒトSema4a-Fcは、R&D Systemsから購入した。

【0147】

結合アッセイ。高タンパク結合プレート(high protein binding plate)をPBS中、500 ng/mLの組換えマウスNr p 1 (R&D Systems)で一晩コートした。1% BSAを含むPBSにて室温で1~2時間のブロッキング後、抗Sema 4 a抗体、抗Nr p 1抗体またはアイソタイプコントロール抗体の存在下で、コートプレートを様々な濃度のSema 4 a-IgまたはマウスIg G 1と2~4時間インキュベートした。次いでプレートをPBS+0.05%TWEEN-20で10回洗浄し、500 ng/mLのビオチン化抗マウスIg G 1抗体(BD Biosciences)とインキュベートして融合タンパク質(またはマウスIg G 1対照)に結合した。7回洗浄後、ストレプトアビジン-HRP (GE Healthcare)を500 ng/mLで加えてビオチン化抗体を検出した。さらに7回洗浄後、TMB基質(Thermo Scientific)を加え、1NのH₂SO₄で停止した。

10

【0148】

VEGF結合でも、Sema 4 a-Igを使用しない以外は、同じプロトコルに従い、VEGF165 (R&D Systems)をPBS中50 ng/mLで使用し、500 ng/mLの抗VEGF-ビオチン(R&D Systems)で検出し、続いてSA-HRPで検出した。Semaファミリーメンバー全体の比較のため、プレートを様々な濃度のSema 3 a-Fc、Sema 4 d-Fc、Sema 4 a-Igまたはアイソタイプコントロールで一晩コートした。ビオチン化Nr p 1-Igを加え、3時間インキュベートし、検出のためSA-HRPを使用した。

【0149】

20

mRNA解析。トリゾール試薬(Life Technologies)に溶解した細胞からRNAを抽出し、High Capacity Reverse Transcriptionキット(Applied Biosystems)を用いて逆転写した。リアルタイムPCRは、プライマーおよびプローブとTaqManマスターミックスまたはSYBRグリーン化学(Applied Biosystems)を用いて行った。

【0150】

Fox p 3 欠乏自己免疫のレスキュー。CD45.1×Fox p 3⁺/⁻雌マウスをCD45.1雄マウスに定期繁殖(timed breeding)で交配した。出産時に雄の子孫についてFox p 3⁻状況を調べた。フローサイトメトリーにより精製した1×10⁶精製Fox p 3^{C r e}またはNr p 1^{f/f}Fox p 3^{C r e}CD45.2⁺Tregを生後3日以内にFox p 3⁻雄仔腹腔内に注射した。マウスについてscurfy表現型(魚鱗癬、眼の炎症、ラント表現型および運動性の欠如)をモニターした。一部の実験では、耳介、肝臓および肺の組織学的解析のためすべてのマウスを5週で屠殺した。

30

【0151】

腫瘍モデル。Fox p 3^{C r e}、Nr p 1^{f/f}Fox p 3^{C r e}、またはFox p 3^{D T R . g f p}マウスにB16.F10メラノーマ(1.25×10⁵細胞i.d.)、EL4胸腺腫(1.25×10⁵細胞i.d.)、またはMC38結腸癌(carcinoma)(2.5×10⁵細胞s.c.)を注射した。腫瘍をデジタルカリパスで定期的に測定し、腫瘍容積を計算した。腫瘍およびリンパ節を解析のため回収した。TILは、機械的破碎後、腫瘍サンプルからパーコールグラジエントを用いて調製した。転移研究では、B16.F10を様々な用量で静脈内注射した。17~20日後、肺を回収し、H₂O₂で膨張させ、転移を数えた。B16治療実験は、注射を1.25×10⁵B16メラノーマ細胞をi.d.注射し、腫瘍が触知可能になるまで待った(5日)。5日目に、マウスにラットIg G 2 aあるいは抗Nr p 1 (R&D Systems、clone 761704)の腹腔内注射の投与を開始した(初回量400 μgおよび3日ごとに200 μg)。

40

【0152】

実験的大腸炎。6~8週齢のRAG2^{-/-}マウスに4×10⁵のコンジェニックマーカーで標識された(congenically marked)CD45RB^{h i}CD25⁻Tconv細胞を腹腔内注射した。21~28日後(大部分のマウスの体重が5%減少し、大腸炎症状を有

50

した)、 1×10^6 のFoxp3^{Cre}またはNrpl^{f/f}Foxp3^{Cre}Tregを腹腔内に注射した。体重を1日1回測定し、Tregレスキューから28日後、切片を組織学的検査のため染色した。

【0153】

シグナル伝達解析。フローサイトメトリーでは、Tregを抗CD3e／抗CD28コートビーズ、および精製された通常のT細胞あるいはSema4a-Igビーズで様々な回数刺激し、次いで1%PFAで37℃にて15分間固定した。次いで細胞を-20℃で20分間氷冷90%MeOHにて透過処理した。PBSで十分な洗浄後、細胞を、10%正常マウス血清を含むPBSでRTにて10分間ブロッキングした。次いで細胞を、1%BSAを含むPBS中の抗体(pAkt(T308)、pAkt(S473))で暗所、RTにて1時間染色した。最後に、細胞を適切な二次抗体で30分間暗所、RTにて染色し、次いで洗浄し、解析した。イムノブロット解析では、500UのrhIL-2と共に1ng/mLのホルボール-13-ミリスツールアセテートおよび10ng/mLのイオノマイシンでTregを3日間増幅し、次いで十分に培地で洗浄し、500UのrhIL-2を用いて10倍量に増幅した。IL-2を用いずに一晩放置後、Tregを、プレート結合抗CD3、可溶性抗CD28およびビーズ結合Sema4a-Igで3時間刺激し、次いで氷上にて全細胞溶解緩衝液(1%NP40、5mMのEDTA、5mMのEGTA、TWEEN-20)で15分間溶解した。一部の実験では、 3×10^6 のTregをより大量に溶解し、清澄なライセートをプロテインGビーズと3時間インキュベートしてライセート「をプレクリアした」。Nrplを、ポリクローナル抗Nrpl抗体(R&D

AF566)を用いて一晩免疫沈降させ、続いてプロテインGビーズと3時間インキュベートした。免疫ブロットに先立つ溶出および還元の前に、ビーズを溶解緩衝液で洗浄した。簡単に説明すると、沈殿物またはインプットライセートを2-メルカプトエタノールおよび4×LDSサンプル緩衝液(Life Technologies)と100℃でインキュベートし、次いで4~12%ビスートリスNuPAGEゲル(Life Technologies)にロードし、200Vで1時間泳動した。分離したゲルをCriterion Gel Blotting System(Biorad)によりPVD F膜に電気転写し、0.1%TWEEN20を追加した3%BSAを含むTBSで室温にて1時間ブロッキングした。ブロッキングした膜をHRPに直接コンジュゲートした抗PTENと一晩インキュベートし、TBS-TWEENで3回洗浄し、Western Lighting ECLを用いて画像化した。

【0154】

レトロウイルスによる形質導入。293T細胞に、pPAM-EQおよびpVSV-Gパッケージングプラスミドを用いて様々なレトロウイルスコンストラクトをトランスフェクトして、GPE86レトロウイルスプロデューサー細胞を形質導入した。Treg細胞は、フローサイトメトリーにより精製した。Tregを、96ウェル平底プレートにおいて100μL中、 5×10^4 ／ウェルで24時間500U/mLのrhIL-2の存在下、PMAおよびイオノマイシンで活性化し、細胞周期を進行させた(cycled)。ウイルス上清を、100kDa MWCOの濃縮器(Millipore)を用いて10倍濃縮し、周期が進行しているTreg細胞に500U/mLのrhIL-2および6μg/mLのポリブレンの存在下、等量に加え、2500rpm、37℃で60分遠心し、次いで24時間インキュベートした。スピンドクション(spinduction)プロセスを24時間おきに2回繰り返し、培養Tregから100μLの上清を毎日除去して、培養液量を200μL／ウェルに維持した。次いでTreg細胞を培地で洗浄し、蛍光タンパク質発現に基づき選別するか、または1μg/mLのピューロマイシンで選択し、IL-2でさらに増幅した。蛍光タンパク質または細胞内エピトープ染色(抗HA、Sigma)は、使用前に確認した。機能アッセイは、24時間放置後にIL-2を用いずに行った。

【0155】

顕微鏡観察。IS活性化のTIRF照明は、以前に記載されているように行った⁵⁰。簡単に説明すると、抗TCRを含む脂質二重層、およびSema4a-Igまたはアイソ

タイプコントロールをロードした抗マウス IgG1 捕捉抗体を調製した。Treg 細胞を二重層上で 20 分間刺激し、次いで固定し、透過処理し、ホスホ-Akt (S473)、グローバルホスホチロシン (4G10) または Nrpl に対して染色した。「pAkt + TCR クラスターの割合」は、リン酸化 Akt (S473) 陽性シナプスと、TCR クラスター形成による読み出しとして形成されたシナプスの総数との比率を表す。Foxo3a については、培地で一晚未刺激のままであったか、あるいは固定化した Sema4a-Ig またはそのアイソタイプコントロールの存在下または非存在下、固定化した抗 CD3 / 抗 CD28 で刺激した単離したばかりの Treg 上で行った。細胞を回収し、1% PFA で固定し、0.1% トリトン X-100 を含む TBS で透過処理した。正常マウス血清でブロッキング後、細胞をトリス緩衝 1% BSA 中、抗 Foxo3a (Cell Signaling Technologies) で一晚染色した。数回の洗浄後、細胞を Alexa Fluor 647 コンジュゲート抗ウサギ IgG (Life Technologies) で染色し、次いで数回洗浄した。次いで顕微鏡観察前に細胞に DAPI およびファロイジン-Alexa Fluor 546 または 488 をロードした。スピニングディスクレーザー走査型共焦点顕微鏡を用いて、10~30 細胞のランダムフィールドを可視化した。ファロイジンおよび DAPI 染色を用いて盲検マスク (blinded mask) を作製して、細胞質および核の体積をそれぞれ判定し、その後ようやく Foxo3a 染色を可視化した。20~30 スタックの Foxo3a 蛍光の核および細胞質の体積を、Slidebook (3i, Inc.) ソフトウェアを用いて任意蛍光単位 (arbitrary fluorescence unit) で計算し、Graphpad Prism で解析した。

【0156】

Affymetrix アレイおよび解析。Foxp3^{Cre} または Nrpl^{f/f} Foxp3^{Cre} Treg を、6~8 週齢マウスから 99.0% 純度にフローサイトメトリーにより選別し、プレート結合抗 CD3、抗 CD28、100 U/mL の rhIL-2、およびアイソタイプあるいは Sema4a-Ig コートラテックスビーズで 48 時間刺激した。細胞を回収し、PBS で 3 回洗浄し、トリゾール試薬 (Life Technologies) で溶解した。品質は、UV 分光光度法および Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) による解析により確認された。全 RNA (100 ng) を処理し、Affymetrix 3' IVT Express のプロトコルに従い Hartwell Center for Biotechnology & Bioinformatics で標識し、マウスハイスループット 430 PM GeneChip アレイ上にアレイ化した。シグナルデータは RMA を用いてサマライズし、可視化し、品質は主成分分析 (PCA) (Partek Genomics Suite 6.6 St Louis MO, USA) により点検した。異なる日付にスキャンした、完全に反復された実験の差を補正する必要に応じて、バッチ補正 (batch correction) を適用した。Tconv 細胞を休止 Treg と比較するため、各プローブセットに不等分散 t 検定を適用し、log2 比を計算した。この同じ解析を使用して Tconv 細胞を活性化 Treg 細胞と比較した。野生型 Treg 細胞における Sema4a 処理の作用を Nrpl 欠乏細胞における sema 処理の作用と比較するため、各プローブセットに処理および遺伝子型の 2 要因 ANOVA 交互作用 (two factor ANOVA interaction) を適用し、Storey の q 値が多重比較を補正することが分かった。各プローブセットのカテゴリの平均を確認し、Z スコアに変換し、階層的クラスタリングを行い、Spotfire Decision Site 9.1 (Tibco, Somerville MA, USA) のヒートマップにより可視化した (図 1A)。図 11B のヒートマップは、相互作用の p 値が 10% の FDR をパスし、1 クラスの最小平均発現が 6 であり、かつ最小絶対値 log 比の差が少なくとも 0.5 である上位に指定された遺伝子からなる。ボルケーノプロット (volcano plot) は、STAT/SE 11.1 (College Station TX, USA) を用いて作成した。すべてのボルケーノプロット (volcano p

lot) について、公式シンボル (official symbol) または名称を有さない遺伝子を除外した。これらのプロットでは、スコアは、 $-\log_{10}$ 変換された p 値をいう。相互作用ボルケーノプロット (volcano plot) の遺伝子では、原点からの距離の尺度 ($|(\text{スコア}/10 + |\log \text{比の差}|)/2| > 0.5$) を適用して、グラフを色分けした。統計的検定および多重比較の補正は、Partek Genomics Suite 6.6 (St Louis MO, USA) を用いて行った。Tconv 細胞と活性化 Treg 細胞との間の差が少なくとも 3 倍で、0.01 が p 値であるプローブセットの配列を検索し、次いでこれらの配列を SignalP 3.0 ソフトウェアを用いて試験して膜貫通ドメインを同定した。

【0157】

10

結果

セマフォリン 4a は、Treg 活性を刺激する、Tconv に発現するリガンドである。本発明者および共同研究者らは以前に、共培養した通常の CD4⁺T 細胞 (Tconv) の存在下または非存在下で刺激した Treg の転写および機能的プロファイルが著しく異なることを示唆したことがある^{1,2,13}。Treg は、上部チャンバーに入れた Tconv と直接接触した場合のみ、透過性トランスウェル膜を通過する Tconv を抑制することができる (本明細書でトランスウェル抑制という) ことから、Treg 機能を強化する接触依存性メカニズムが示唆される^{1,2}。本発明者らは、この特徴的な Treg 活性および転写プロファイルを誘導するシグナルを決定しようとした。本発明者らは、Treg が「自己ブーストする」ことができないことから、この活性を媒介するリガンドが Treg ではなく Tconv に発現し得るとの仮説を立てた。実際、単独、または追加の生もしくは固定した Foxp3⁺Treg もしくは B220⁺B 細胞との共培養で刺激した Treg は、上部ウェルにて制御性 T 細胞 (Treg) を刺激した際に下部ウェルにて抗 CD3/抗 CD28 コートビーズで刺激した Tconv のトランスウェル抑制アッセイにおいて、トランスウェル膜通過の抑制を媒介できなかった (図 1A)。一方、固定した CD4⁺または CD8⁺T 細胞と共培養した Treg は、トランスウェル抑制を増強できたことから、リガンドが細胞表面に発現することが示唆された^{1,2}。Foxp3、GFP マウスから選別し、抗 CD3 抗体の存在下または非存在下で照射 APC と共にまたは別にインキュベートした Tconv 集団および Treg 集団の Affymetrix 解析を用いて、休止および活性化 Treg 細胞と CD4⁺Tconv 細胞との間の遺伝子発現を比較した (48 時間後、CD4 および GFP 発現に基づき再選別した細胞抽出された RNA を Affymetrix 解析に供した)。このリストは、Tconv に主に発現する細胞表面発現タンパク質をコードする遺伝子に着目して作成した。このリストから、さらに研究するため上位 3 種の遺伝子、Sema4a (セマフォリン-4a)、Tgfb β 3 (トランスフォーミング増殖因子、 β 受容体 III) および Itgb3 (インテグリン β 3; CD61) を、免疫調節におけるそれらの役割、および qPCR による CD4⁺Tconv 細胞と Treg および B220⁺B 細胞におけるそれらの差次的発現を結び付けるこれまでの研究に基づき、選択した。Sema4a および Tgfb β 3 は CD8⁺T 細胞でも強化されたが、Itgb3 は強化されなかった。次いで本発明者らは、これらの分子が Treg 機能を増強する能力を評価するのに使用できる細胞株を同定しようとした。3T3 線維芽細胞は、多量の Tgfb β 3 および Itgb3 を発現するが、Treg のブーストを媒介できないことが明らかになった。一方、3T3 細胞は Sema4a を発現しなかった。総合すると、これらのデータから、軸索活性および免疫制御を調節することが示されている^{1,4} Sema4a について、さらに調査することが妥当であることが示唆された。

20

30

40

【0158】

Sema4a は Treg 機能を増強するのに必要かつ十分であるかどうかを判定するため、4つのアプローチを使用した。

【0159】

第1に、トランスウェル抑制アッセイにおいて Tconv による Treg ブーストの用量依存的阻害が、Sema4a 遮断 mAb (clone 5E3, MBL Intern

50

ational)で観察された(図1B)。第2に、CD4⁺およびCD8⁺Tconv細胞におけるSema4a発現のsiRNAノックダウンにより、Treg抑制をブーストするそれらの能力が限定された。これは、(i)CD4⁺またはCD8⁺Tconvに、スクランブルドsiRNAまたはSema4a siRNAをモックトランスフェクトまたはトランスフェクトした後のトランスウェル抑制アッセイにおいて、および(ii)ネガティブ磁気分離(negative magnetic separation)を用いて濃縮し、200pMのスクランブルドsiRNA(sicontrol)またはSema4a標的siRNA(Life Technologies カタログ#4390771、siRNA# s73547)(siSema4a)のプールをスクレオフェクトしたCD4⁺およびCD8⁺T細胞を再選別し、24時間抗CD3および抗CD28のトランスフェクションから16時間後に刺激し、続いてRNAを抽出し、Sema4a mRNAのqPCRを行った後に(図1C)、判定された。

【0160】

第3に、3A9 T細胞ハイブリドーマのSema4a喪失変異体は、トランスウェルアッセイにおいてTreg機能をブーストできなかったのに対し、Sema4a喪失変異体のSema4a⁺クローンまたはSema4aトランスフェクタントは、Treg抑制を増強した(図4)。Sema4a 3T3トランスフェクタント(Sema4a過剰発現コンストラクトを発現するレトロウイルスを形質導入した)も、Tregのトランスウェル抑制を増強したが、空ベクター対照細胞は、増強しなかった。

【0161】

第4に、ビーズにコートしたマウスのSema4a-Ig融合タンパク質は、Tconv細胞と同等程度に強力なトランスウェル抑制を誘導するのに十分であったが、IgG1アイソタイプコントロールは、十分でなかった(図1D)。

【0162】

さらに抗Sema4a抗体も、Treg増強の用量依存的阻害を示した(図1E)。次いで他の免疫細胞がSema4aを発現するかどうかを評価した。CD4⁺およびCD8⁺T細胞は、低いものの実証可能なSema4a発現を示した一方、リンパ節CD11c⁺樹状細胞(DC)およびDX5⁺ナチュラルキラー細胞は、高レベルのSema4aを発現するようであった(抗Sema4aで染色し、フローサイトメトリーで解析した末梢の脾臓/リンパ節調製物で判定された)。興味深いことに、リンパ節CD11c⁺DCは、Sema4a依存性にTreg抑制を増強することができた(図1E)。

【0163】

次にSema4aがTreg機能を増強するのに十分であるかどうかを判定した。Sema4a 3T3トランスフェクタントは、Tregトランスウェル抑制を増強できたが、空ベクター対照細胞はできなかった。重要な点として、ビーズにコートしたマウスのSema4a-Ig融合タンパク質は、Tconv細胞と同等程度にトランスウェル抑制を誘導するのに十分であったが、IgG1アイソタイプコントロールはそうではなかった(図1D)。

【0164】

全体として、これらのデータから、Sema4aはインビトロでTreg機能を増強するのに必要かつ十分であることが示唆される。

【0165】

Nrp-1は、Tregの機能および生存のブーストに必要なSema4a受容体である

ニューロピリン1(Nrp1)は、クラスIIIセマフォリン、Sema3aの共受容体であり、軸索のガイダンスの制御に重要な役割を有する¹⁵。Nrp1は、軸索成長円錐の崩壊を誘導し、特権を有する組織への浸潤を防ぎ、マウスで遺伝子を欠損させると、胚性致死が引き起こされる¹⁶。Nrp1は、血管内皮増殖因子(VEGF)、血小板由来増殖因子β(PDGFβ)およびトランスフォーミング増殖因子β(TGFβ)と相互作用することが示されている^{17, 18}。Nrp1は、Tregに高発現することが示さ

れており、特に胸腺由来の「天然の」Tregの有用なマーカーである(Foxp3^{C r e}およびNr p 1^{f / f} Foxp3^{C r e}マウスのCD4⁺T細胞におけるFoxp3およびニューロピリン発現のフローサイトメトリー解析により判定された)¹⁹⁻²¹。T細胞におけるNr p 1の役割は示唆されてきたが²²、TregにおけるNr p 1の役割は特定されていない。

【0166】

本発明者らは、Nr p 1が、Treg機能の増強を媒介するSema4aの受容体であり得ると想定した。第1に、Nr p 1特異的mAbは、Tregのブーストをインビトロで阻止することができた(図2A)。Sema4aとNr p 1との間の直接の相互作用は、精製された組換えNr p 1およびSema4aを用いたELISAアッセイにおいて検証された(図2H)。重要な点として、Nr p 1:Sema相互作用を破壊するが、Nr p 1:VEGF相互作用を破壊しないNr p 1およびSema4aのmAbについて、用量依存的阻害が観察された(図2H)。第2に、Nr p 1^{f / f}およびFoxp3^{C r e - Y F P}マウスを交配して作製したNr p 1欠乏Treg(本明細書でNr p 1^{f / f} Foxp3^{C r e}という)^{17, 23}は、細胞表面Nr p 1の発現がなく、Tconv細胞またはSema4a-Igコートビーズとの共培養後、トランスウェル抑制を媒介できなかった(図2B)。しかしながら、Nr p 1欠乏Tregは、接触依存性抑制を媒介する能力を保持していた(野生型またはニューロピリン欠乏Tregを抗CD3/抗CD28コートビーズの存在下、異なる濃度で共培養した古典的抑制アッセイにより判定された)。重要な点として、Sema4aとNr p 1との間の直接の相互作用は、蛍光色素標識Sema4a-Igを用いたFoxp3^{C r e}Tregのフローサイトメトリー染色により検証され、蛍光色素標識Sema4a-Igを用いたNr p 1^{f / f} Foxp3^{C r e}Tregでは検証されなかったが、精製された組換えNr p 1およびその既知のリガンドSema3aと同等と思われるSema4aを用いたELISAアッセイでは検証された。これらのデータから、Sema4aはNr p 1に結合し、Treg機能をブーストできることが明らかに立証される一方、他のセマフォリンファミリーメンバーもこの機能を果たし得た可能性がある。第2に、Nr p 1特異的mAbは、インビトロでTregのトランスウェル抑制を阻止した(図2I)。

【0167】

本発明者および共同研究者らは以前に、Tregが、TGFβではなくIL-10およびIL-35を介してトランスウェル抑制を媒介することを示したことがある¹²。本明細書では、2つの実験アプローチを使用して、Tconv細胞によりブースされるTregおよびSema4aによりブースされるTregが使用する抑制のメカニズムが同じであるかどうかを判定した。第1に、トランスウェルプレートの上部チャンバーにおいてSema4a-Igコートビーズの存在下で刺激されたTregは、下部チャンバーにおいて野生型(WT)Tconv細胞、およびTGFβ²⁴に対して非感受性であるdnTGFβRII^{-/-}Tconv細胞を同様に抑制することができたことから、TGFβは必要でないことが示唆された(図2C)。一方、それぞれIL-10およびIL-35を分泌できないIl10^{-/-}TregおよびEbi3^{-/-}Tregは、トランスウェルを通過するWT Tconvを抑制できなかった(図2C)。第2に、IL-10およびIL-35中和mAbは、WT Tregにより媒介されるトランスウェル抑制を妨げた(図2D)。Sema4a:Nr p 1ライゲーションはTreg機能を強化するようであったが、本発明者らは、Sema4a:Nr p 1ライゲーションがインビトロでTregの生存および/または安定性も強化し得ると推論した。実際、Sema4a刺激により、アネキシンVおよび7-AAD染色により判定した細胞死の量がNr p 1依存性に減少した(図2E)。アイソタイプまたはSema4a-Igの存在下、抗CD3、抗CD28、およびIL-2を用いて72時間培養した野生型およびNr p 1欠乏Tregのその後のqPCR解析、およびアイソタイプまたはSema4a-Igの存在下、抗CD3、抗CD28およびIL-2を用いて72時間刺激した細胞のIL-10に対する細胞内サイトカイン染色(刺激の最後の8時間ブレフェルジンAを加えた)から、IL-10のmRNAレ

ベルは Sema4a-Nrp1 ライゲーションにより増加せず、ICS による IL-10 + Treg の割合も増加しなかった。しかしながら、IL-10 の ELISA および細胞の上清由来の IL-35 の IP/IB により判定したところ、野生型 Treg を抗 CD3、抗 CD28 および Sema4a-Ig で刺激した場合、IL-10 および IL-35 の両方が培養物中で増加したが、Nrp1 欠乏 Treg では増加しないことが明らかになった。これらを総合すると、これらのデータから、Sema4a による Nrp1 ライゲーションは、IL-10/IL-35 依存性抑制を増強し、インビトロで Treg の生存および寿命を延長することが示唆される。

【0168】

NRP1 はヒト Treg に発現しないと示唆されてきたが²⁵、このことは、活性化 Treg または機能抑制 Treg について厳密に評価されることがない。ヒト Treg は、最大の抑制機能を得るため活性化を必要とし得るので^{12, 26}、本発明者らは、NRP1 が、機能抑制 Treg 上にのみ発現する可能性があるかと推論した。以前の研究²⁵と整合して、休止臍帯血 Treg および Tconv 細胞は、NRP1 を発現しなかった（図 2F）。抗 CD3、抗 CD28 および IL-2 による活性化は、両方の T 細胞集団において初期の NRP1 発現を誘導したが、Treg は NRP1 の長期的な安定発現を示さなかった。次いで NRP1-SEMA4A 軸がヒト Treg 機能を増強できるかどうかを評価した。以前示されたように²⁶、Tconv は、透過性トランスウェル膜におけるヒト Treg 抑制を増強することができる（図 2G）。重要な点として、この抑制活性は、抗 NRP1 mAb による阻止された一方、固定化したヒト SEMA4A は、Tconv の非存在下でヒト Treg 機能を増強するのに十分であった（図 2G）。これらのデータから、マウス Treg およびヒト Treg では同じ経路が作用する可能性が裏付けられる。

【0169】

Nrp1 欠乏 Treg は免疫ホメオスタシスを維持する

Nrp1:Sema4a 軸を破壊すると、インビトロで Treg 活性が減弱することを考慮して、本発明者らは、Treg 機能がインビボで、特に高度炎症部位で低下し得ると仮定した。Foxp3 欠損マウスは、ヒト疾患 IPEX を想起させる強い自己免疫状態を発症する。これは、広範囲な免疫浸潤および 3~6 週で死に至る組織炎症を特徴とする^{2, 27}。したがってインビボでの Treg 機能の破壊は、炎症性疾患の発症につながる可能性がある。Nrp1^{f/f} Foxp3^{Cre} マウスとその年齢および性別の一致した同腹仔 Foxp3^{Cre} 対照とを 10 ヶ月間観察し、Treg 欠乏マウスで通常対象となるすべての器官の詳細な組織学的解析を行った。盲検解析から、Nrp1^{f/f} Foxp3^{Cre} マウスは、外観、および皮膚、肺、肝臓、腸、膵臓、腎臓、唾液腺および脾臓の組織学的解析を含むあらゆる点で正常範囲内にあることが立証された。フローサイトメトリ解析により判定した T 細胞亜集団の大きさ、割合または表現型における変化は、観察されなかった。したがって、免疫ホメオスタシスにおける変化、炎症性疾患または自己免疫の発症は、Nrp1 の欠失が Treg 上に限定された高齢マウスにおいて検出できなかった。

【0170】

Foxp3 欠乏マウスの自己免疫表現型は、2 日齢のマウスへの Treg の養子移入により実質的に遅延させることができ、これは、マウスが疾患で死亡する前の数ヶ月間持続することもある^{2, 27}。疾患の発現、有病率、臨床スコアおよび組織学的スコア（肝臓、肺および耳介の）はすべて、Foxp3^{Cre} Treg レシピエントと Nrp1^{f/f} Foxp3^{Cre} Treg レシピエントとの間で同じであった（図 3）。全体として、これらのデータから、Treg 上の Nrp1 の発現は、免疫ホメオスタシスの維持、および通常 Treg の非存在下で発症すると考えられる炎症性疾患および自己免疫疾患の予防にとって必要ないことが示される。

【0171】

Nrp1 欠乏 Treg は、炎症環境において機能しない

Treg は、多くの癌において効果的な抗腫瘍免疫の大きな障害となる^{28, 29}。抗

CD25 処理または Foxp3^{DTR-gfp} マウス (Foxp3⁺Treg はジフテリア毒素受容体を発現し、DT 投与によりその条件付き枯渴を行うことができる) の使用による Treg の枯渴は、抗腫瘍免疫を大きく強化することが示されている^{30, 31}。一方で、Treg の枯渴は、Foxp3 欠乏マウスに見られるのと同様の広範囲なリンパ球増殖および自己免疫疾患も引き起こす³²。腫瘍は高度炎症環境であるので、Nrpl 欠乏 Treg が、腫瘍誘導性寛容を媒介し、効果的な抗腫瘍免疫を妨げる能力を評価した。3つの移植可能な腫瘍モデル: MC38 (免疫原性を有する結腸癌株)、EL4 (中程度の免疫原性を有する胸腺腫) および B16 (免疫原性に乏しいメラノーマ) を使用した^{33, 34}。腫瘍接種 Foxp3^{DTR-gfp} マウスの DT 処理による Treg の完全な消失の結果、腫瘍は排除されたが、マウスは、DT 処理から約3週間後に自己免疫により媒介される死亡に至る (図4A~C)。

10

【0172】

次いで Nrpl^{f/f} Foxp3^{Cre} マウスおよびその Foxp3^{Cre} 同腹仔対照の腫瘍増殖を評価した。Nrpl^{f/f} Foxp3^{Cre} マウスでは、MC38 の腫瘍増殖の有意な遅延が観察されたが、完全寛解 (CR) はまったくなかった (図4A)。一方、EL4 接種 Nrpl^{f/f} Foxp3^{Cre} マウスの約40%ではCRが観察され、ほぼすべてのマウスで腫瘍増殖が大きく低下した (図4B)。際だったのは、B16 接種 Nrpl^{f/f} Foxp3^{Cre} マウスの3分の2でCRが観察され、残りのマウスでは腫瘍増殖が低下したことであった (図4C)。肺転移性 B16 モデルを用いると、Foxp3^{Cre} 動物は、転移数が用量依存的に増加したのに対し、Nrpl^{f/f} Foxp3^{Cre} マウスは、高い腫瘍投与量でもほぼ完全な排除を示した (図4D)。皮膚の B16 腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の解析からは、Treg 集団はどちらも腫瘍に浸潤できる一方、Nrpl 欠乏 Treg は、特に高い殺腫瘍性 IFN γ + TNF α + IL-2 + サブセットにおいてエフェクター CD8⁺ T 細胞の増殖およびサイトカインの産生を抑制する能力が限定されることが示された (図4E)³⁵。よって、Treg において Nrpl シグナル伝達により引き起こされるプログラムは、抗腫瘍免疫の抑制に決定的に重要である。

20

【0173】

本発明者らはさらに、腫瘍微小環境においてどの細胞が Sema4a を発現するかを決定しようとした。驚いたことに、通常の DC (cDC)、CD8⁺T_{conv} 細胞、NK 細胞、および程度が低い、CD4⁺T_{conv} 細胞は、TIL において流入領域および非流入領域リンパ節と比較して Sema4a 表面発現をダウンレギュレートする (図4H)。代わりに、Sema4a^{hi} 腫瘍浸潤細胞の過半数 (約57%) は、PDCA1⁺B220⁺CD11c⁺ 形質細胞様樹状細胞 (pDC) であった (図4H)。驚くべきことだが、この知見は以前の文献と整合したことから、pDC は免疫寛容を誘導することができ、pDC が枯渴すると抗腫瘍免疫が増加することが示唆された (Demoulin et al., J Leukoc Biol 93, 343-352 (2013); Faget et al., Cancer Res 72, 6130-6141 (2012); Sawant et al., J Immunol 189, 4258-4265, (2012))。実際、脾臓およびリンパ節調製物から選別し、CpGオリゴヌクレオチドで一晩活性化し、1% PFA で短時間固定し、続いて十分に洗浄した pDC と共培養した Treg を用いたトランスウェル抑制アッセイにおいて、pDC は、トランスウェル抑制アッセイにおいて Sema4a 依存性に Treg 機能を増強することができた。

30

40

【0174】

これまでの研究から、セマフォリンに結合する Nrpl ドメインは、VEGF に結合するドメインと異なることが示されている⁴⁰。Treg 誘導性の腫瘍寛容を媒介する Sema4a-Nrpl 軸をさらに裏付けるため、本発明者らは、Nrpl-Sema4a 相互作用を破壊するが、Nrpl-VEGF 相互作用を破壊しない Sema4a および Nrpl 特異的 mAb を利用した。具体的には、(i) 50 ng/mL の VEGF165 の存在下、抗 Nrpl またはマウス IgG1 (抗 VEGF ビオチンを用いて検出した)、あるいは (ii) アイソタイプコントロール、抗 Nrpl または抗 Sema4a の存在下、S

50

Sema4a-IgまたはマウスIgG1、(Sema4a-IgまたはマウスIgG1は、抗アイソタイプ抗体を用いて検出した)とインキュベートした500ng/mLの組換えmNrp1でコートしたプレートを用いて、ELISAを用いた結合アッセイを行った。B16メラノーマを接種し、Nrp1遮断mAbまたはSema4a遮断mAb(100μg; R&D Systems, clone 757129)の注射を週2回投与した野生型C57/BL6マウスは、アイソタイプコントロールのそれと比較して、腫瘍増殖の有意な低下を示した(図4I)。重要な点として、Nrp1遮断mAbおよびSema4a遮断mAbの作用は、本質的に同一であった。さらに、Sema4a-Igを可溶性アンタゴニストとしてインビボで利用すると、やはり腫瘍増殖が有意に低下する(図4J)のに伴い、CD8⁺T細胞の腫瘍浸潤が同様に増加した。Nrp1の遮断が治療上の有用性を有し得るかどうかを判定するため、B16腫瘍を有するC57/BL6マウスを、高用量(400μgの初回量、週2回200μg)のNrp1遮断mAbで処置した。注目すべきは、この単独治療で腫瘍増殖が低下し、一部のマウスでCRが認められた(図4F)。

10

【0175】

Nrp1依存性Treg機能はさらに、他の確立された高度炎症環境における応答の抑制でも広く重要であり得た。Rag1^{-/-}マウスにナイーブCD4⁺CD45RB^{hi}Tconv細胞を養子移入すると、ヒト炎症性腸疾患(IBD)に類似した高度炎症性大腸炎が誘導されるが、これは、精製されたTregのその後の移入によりレスキューすることができる^{13, 36}。実際、Tconv細胞をRag1^{-/-}マウスに注射すると、著しい体重減少および免疫性病変が起こるが、これは、Foxp3^{Cre}Tregによりレスキューすることができた(図4G)。しかしながら、Nrp1欠乏Tregは、大腸炎を軽減できず、著しい体重減少および免疫性病変が起きた。よって、Nrp1により媒介されるTreg機能は、確立された炎症性疾患、たとえば大腸炎の治療に必要とされる。

20

【0176】

Nrp1ライゲーションは、PTENを介してAkt-mTORを制限して、Foxoにより媒介されるTreg安定化を惹起する

VEGFまたはクラスIIIセマフォリンによるライゲーション後の、腫瘍系、ニューロンおよび内皮におけるNrp1の下流のシグナル伝達は、研究されてきたけれども^{15, 17}、TregにおいてクラスIVセマフォリンにより誘導されるNrp1シグナル伝達経路は、知られていない。興味深いことに、Nrp1は、一部の系でAkt(プロテインキナーゼB)活性を調節することが示されている^{37, 38}。Akt-mTOR活性はTreg機能にとって有害であることが示されているので^{39, 40}、本発明者らは、Nrp1ライゲーションがAkt活性化を阻害し得るとの仮説を立てた。Foxp3^{Cre}およびNrp1^{f/f}Foxp3^{Cre}TregをSema4a-IgまたはIgGコートビーズの存在下で刺激し、Akt-mTOR活性化をフローサイトメトリーにより評価した。Nrp1ライゲーションは、Akt S473のリン酸化のほか、Tregにおいてその活性化に必要とされるS6K1 T389のリン酸化を限定した(図5A)。Aktリン酸化については、全反射照明蛍光(TIRF)顕微鏡を用いて免疫シナプス(IS)でも調べた。Foxp3^{Cre}およびNrp1^{f/f}Foxp3^{Cre}Tregを、抗TCRmAbおよびSema4a-IgあるいはIgGアイソタイプコントロールを含む脂質二重層で刺激した。ISへのNrp1の強いリクルートメントはSema4aが存在したときに観察され、これはISでのグローバルホスホチロシン(global phosphotyrosine)染色が同じであるにもかかわらず、Nrp1依存性のAkt活性の消失と同時に起こった(図5Bおよび6A~B)。

30

40

【0177】

Akt不活性化がTregの増強に十分であったかどうかを判定するため、野生型(WT)Aktあるいはドミナントネガティブキナーゼ死亡(DN)AktをコードするレトロウイルスをTregに形質導入した。DN Aktを形質導入したTregは、Sem

50

a 4 a-I gにより誘導されるのと同程度にトランスウェル抑制を媒介できたが、WT A k tではできなかったことから、N r p 1の下流のA k t-m T O R活性の抑制は、T r e gの増強を誘導する主要経路であることが示唆される。

【0178】

N r p 1は、C末端PDZドメイン結合モチーフ（アミノ酸配列：S E A）を含む小さな細胞質ドメインを有する（P e l l e t-M a n y e t a l., B i o c h e m J 411, 211-226 (2008)）。本発明者らは、I SにおけるS e m a 4 a依存性のp A k tの消失に、このドメインが必要とされるとの仮説を立てた。WT N r p 1またはPDZドメイン結合モチーフ欠乏N r p 1ミュータントをコードするレトロウイルスを、ニューロピリン欠乏T r e gに形質導入した。興味深いことに、PDZドメイン結合モチーフが消失すると、N r p 1がS e m a 4 aライゲーション後にI SでA k t活性化を阻害する能力が完全に阻止された（図）ことから、このモチーフがA k tシグナル伝達の分子阻害剤をリクルートすることが示唆された。

【0179】

ホスファターゼおよびテンシンホモログ（P T E N）は、A k t活性化を阻害することが示されている⁴¹。P T E Nは、接触依存性のT r e g抑制に必要でないようであるが⁴²、本発明者らは、P T E NがN r p 1により媒介されるA k tの不活性化に寄与し得るとの仮説を立てた。休止および活性化T r e gにおいて、低レベルの構成型P T E NとN r p 1との結合が観察され、これはS e m a 4 aライゲーションにより実質的に強化された（図5C）。さらに、P T E N欠乏T r e gは、T c o n vおよびS e m a 4 a-I g誘導性のトランスウェル抑制を媒介できなかった（図5D）。最後に、P T E N欠乏T r e gは、S e m a 4 aによる強いN r p 1リクルートメントにもかかわらず、I SでA k t活性化を阻害できなかった（フローサイトメトリーにより精製され、次いで抗T C RおよびI g GあるいはS e m a 4 a-I gを含む脂質二重層で20分間刺激されたF o x p 3^{C r e}またはP t e n^{f/f} F o x p 3^{C r e} T r e gにおけるI Sでのニューロピリンのリクルートメント、およびA k tの活性化のT I R F顕微鏡観察により判定された；図6参照C~D）。これらのデータから、P T E Nは、N r p 1により媒介されるI SでのA k t活性化の抑制およびT r e g機能の増強に必要とされることが示唆される。

【0180】

A k t活性は、A k tにより媒介されるリン酸化が14-3-3結合を介してF o x o転写因子ファミリーメンバーの核排出を促進するように、1つにはそれらの核局在を制御することにより、T r e g抑制プログラムを妨害することができる⁴³⁻⁴⁵。F o x oは、F o x p 3発現を調節し、一連のT r e g関連遺伝子を促進し、T細胞系譜特異的転写因子およびエフェクター分子の発現を限定することにより、T r e gの発生および機能の制御に重要な役割を果たしている。予想通り、非刺激T r e gはF o x o核染色を示す一方、活性化T r e gは核からF o x oを排出する。これに対し、S e m a 4 a-I gを加えると、F o x o核排出が阻害された。

【0181】

N r p 1により媒介されるT r e g増強を促進する転写プログラムを判定するため、S e m a 4 a-I gまたはI g G1コートビーズの存在下、インビトロで刺激したF o x p 3^{C r e}およびN r p 1^{f/f} F o x p 3^{C r e} T r e gに関する遺伝子発現プロファイリングを行った。具体的には、F o x p 3^{C r e}およびN r p 1^{f/f} F o x p 3^{C r e} C D 4 5 R b^{1.0} F o x p 3（YFP）⁺ C D 4⁺ T細胞を、抗C D 3、抗C D 2 8、100 U/mLのr h I L-2、および固定化したI g G1またはS e m a 4 a-I gで48時間刺激した。これらの細胞から抽出したRNAをA f f y m e t r i x遺伝子プロファイリング解析に供した。次いでマイクロアレイデータを、M S i g D Bを用いてG e n e S e t E n r i c h m e n t A n a l y s i s（G S E A）解析に供し、所定の遺伝子セットにエンリッチメントスコア（e n r i c h m e n t s c o r e（E S））、ノーマライズドエンリッチメントスコア（n o r m a l i z e d e n r i c h m e n t s c o r e（N E S））およびフォルスディスカバリーレート（F a l s e D i s

covery Rate (FDR))を与えた。さらに、Foxp3^{C_re}TregのSema4aにより影響を受けたが、Nrpl^{f/f}Foxp3^{C_re}Tregでは影響を受けなかった遺伝子についてGene Ontology DAVID解析を行った。

【0182】

一般に、TregにおけるNrplライゲーションと関連する転写の変化は、表現型の安定性の強化と整合する。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)およびGene Ontology DAVID解析から、T細胞ホメオスタシスおよびIL-7シグナル伝達などSema4aライゲーションによりアップレギュレートされるいくつかの経路、IL-2によりダウンレギュレートされる遺伝子、CD28反応性遺伝子、T細胞分化に関連する遺伝子、および疾患表現型と関連するいくつかの遺伝子セットが明らかになった(表1および3)。最もアップレギュレートされた遺伝子の統計解析から、ホメオスタシスと関連する遺伝子、特にFoxo標的Klf2^{4,6}のほか、いくつかの転写因子、細胞表面分子および抗アポトーシスBcl2が明らかになった(表3)。さらに、Foxp3^{C_re}マウスから新たに単離されたT_{conv}およびT_{reg}由来の遺伝子発現プロファイルの比較により、内部制御されたT_{reg}シグニチャーが得られたが、これは以前報告されたもの⁵と整合していた。Helios(Ikzf2)、Gpr83、Nt5eおよびSocs2を含むいくつかのT_{reg}シグニチャー遺伝子が、アップレギュレートされた。サブセットは、qPCR(Ikzf2、Socs2、Bcl2、Nt5e、Klf2、Gpr83)およびフローサイトメトリー(KLF2、Helios、Bcl2、CD62L、CD127、CD73)により確認された。

【0183】

興味深いことに、Nrplシグナル伝達は、いくつかのT細胞系譜特異的転写因子(Irf4、Rorg、Eomes)およびそれらの標的(Ilf4、Ilf5、Ilf17a)のダウンレギュレーションを誘導する(表3)。さらに、細胞シグナル伝達の一部のレギュレーター(Nedd4、Rgs16、Serpine2)およびチェックポイント阻害剤Lag3もダウンレギュレートされた。Irf4、Irf8、RorcおよびRgs16のダウンレギュレーションは、qPCRにより確認された。全体として、Nrplシグナル伝達により誘導される転写プロファイルは、Tregの最終分化を誘導または促進すると考えられるプログラムを阻害しながら、Tregの安定性、静止状態および生存を促進し得る。NrplおよびFoxoにより媒介される転写プログラム間にかなり重複があるようであることもさらに注目される^{4,5}。

【0184】

Foxoタンパク質は、Sema4a刺激によりやはりアップレギュレートされた、いくつかの遺伝子の転写を促進することができる(表3)^{4,5,47}。特に興味のある遺伝子は、Nrplに反応してアップレギュレートされたKlf2であり、Klf2は、T細胞の生存、寿命および記憶と関連する遺伝子、たとえばCD62L(Sell)およびCD127/IL-7Rα(Ilf7ra)の発現を促進する⁴⁷。実際、Sema4aの存在下でのTreg刺激は、それらの活性化により誘導されるダウンレギュレーションを限定することから、Nrplにより刺激されたTregにおいてFoxo/KLF2軸が活性であることが示唆される。

【0185】

Nrplシグナル伝達はさらに、GSEAにより決定されたいくつかの遺伝子サブセット、中でもたとえば、IRF4標的、サイトカイン転写物(Ilf4、Ilf5、Ilf17a)、Foxp3ダウンレギュレート遺伝子、およびIL-2アップレギュレート遺伝子のダウンレギュレーションも誘導する(表2)。qPCRまたはタンパク質解析により確認された標的遺伝子として、いくつかのT細胞系譜特異的転写因子(Irf4、Rorc、Eomes)、細胞シグナル伝達のレギュレーター(Rgs16)および阻害性受容体Lag3が挙げられる。全体として、Nrplシグナル伝達により誘導される転写プロファイルは、T_{reg}の最終分化およびアポトーシスを誘導または促進すると考えられるプログラムを阻害しながら、T_{reg}の安定性、静止状態および生存を促進し得る。

【0186】

インビトロで観察されたシグナル伝達現象および転写現象が生理的に重要であるかどうかを判定するため、腫瘍浸潤Tregにおける主要な観察結果を評価した。しかしながら、B16注射後に腫瘍を発症したのはNr p1^{f/f}Foxp3^{Cre}マウスの一部のみであり、したがってサンプル採取した腫瘍は、Treg上のNr p1消失の影響が大きいとは言えない腫瘍であると考えられる点に留意されたい。第1に、非流入領域リンパ節およびTILを、腫瘍を有するFoxp3^{Cre}およびNr p1^{f/f}Foxp3^{Cre}マウス回収し、エキソピボでAkt活性化を評価した。非流入領域LNは、Tregにおいて相対的に高いAkt活性化を示したのに対し、腫瘍浸潤Foxp3^{Cre}Tregは、より低いAkt活性化を示した(図7A)。重要な点として、腫瘍微小環境におけるAkt活性の調節がNr p1^{f/f}Foxp3^{Cre}Tregにおいて失われたことから、インビボでのTregの調節はNr p1により誘導されることが示唆される。第2に、TILにおけるNr p1シグナル伝達のタンパク質標的を他のリンパ球コンパートメントと比較して調査し、Heliosが腫瘍内Tregにおいてアップレギュレートされるが、IRF4およびRORγtはインビボでNr p1依存性にダウンレギュレートされることが見出された(図7B~C)。第3に、アポトーシスが減少したが、Ki67発現およびBrdU取り込みにより(図7E)、および切断型カスパーゼ3染色の増加により(図7D~E)評価したところ、このNr p1誘導性プログラムの結果、腫瘍内のTreg増殖が増加した。観察されたNr p1依存性Treg生存の強化は、抗アポトーシス因子Bcl2の発現強化と関連した(図7F)。最後に、腫瘍内Treg抑制メカニズムに対するこれらの変化の影響を調査した。IL-10のmRNAレベルは変化しなかったものの、腫瘍内IL-10⁺TregはNr p1依存性に強化された(図7G)。さらに、細胞外アデノシンを産生するCD73分子およびチェックポイント阻害剤LAG-3もNr p1依存性に維持された(図7H)。よって、Nr p1シグナル伝達は、炎症環境においてTregの安定性を強める重要なスイッチを与える。

【0187】

考察

本明細書に提供されたデータから、Treg機能の細胞接触依存性増強は、PTEN:Akt:Foxo軸を介したSema4a媒介性Nr p1ライゲーションにより媒介されることが立証される(図8)。とりわけ、Nr p1は、T細胞においてAkt活性を限定することが示唆されてきた限られた数の細胞表面受容体(たとえば、PD-148およびCTLA-449)の1つのようである。Nr p1は、特定の状況下でAktシグナル伝達を調節あるいはさらには活性化することもできる(Banerjee et al., Biochemistry 47, 3345-3351 (2008); Cao et al., Cancer Res 68, 8667-8672 (2008); Fukasawa et al., Cancer Biol Ther 6, 1173-1180 (2007); Kim et al., J Immunol 177, 5727-5735 (2006))一方、Nr p1がTregにおいて機能する特定の状況(たとえば、IS、独特の細胞型、膜貫通と可溶性リガンドへのリクルートメント)では、PTENのリクルートメントおよびAkt活性の消失を促進する異なる環境が整えられる。この経路は、安定性を強め、生存を促進することにより間接的にTreg機能を強化するが、これは、炎症部位、たとえば腫瘍および大腸炎腸粘膜において最も明らかである。Tregの安定性/可塑性の問題は非常に議論が分かれており、Tregの安定性を維持する細胞外因性刺激およびメカニズムは、依然として分かっていない⁸⁻¹¹。FoxoファミリーメンバーがFoxp3機能を強化し、Tregのホメオスタシスおよび機能を促進することを踏まえると^{4,5}、Nr p1シグナル伝達がFoxoの核局在に対するAktのマイナスの影響を相殺することは、注目に値する。実際、Foxoシグナル伝達およびNr p1シグナル伝達により誘導される転写プロファイル間には、かなりの重複が存在する^{4,5}。さらに、Nr p1シグナル伝達が、細胞静止状態に関与することが知られている、いくつかのKLF(Klf2、Klf1)の発現を調節することも興味深い^{4,6}。5つの転写因子(tran

scription factor quintet) が、T r e g の転写シグニチャー「をロックインする (lock-in)」ことも最近示された⁴。興味深いことに、これらの転写因子の一部は、N r p 1 シグナル伝達により調節される (たとえば、I k z f 2、I r f 4、G a t a 1) ことから、S e m a 4 a により媒介される N r p 1 ライゲーションが、このプログラムの細胞外因性レギュレーターになり得ることが示唆される。全体として、本明細書に提供される観察結果から、S e m a 4 a : N r p 1 軸は、炎症部位での T r e g の安定性を維持するのに必要とされる。さらに、N r p 1 : S e m a 4 a 経路は特定の病理学的または遺伝的状況下で攪乱されることがあり、これがまた、種々の正常状態および病的状態における T r e g の安定性と可塑性という見たところ相反する認識の根拠ともなり得る可能性がある。メモリー C D 4⁺ および C D 8⁺ T 細胞が N r p 1 を発現することが示されていることを踏まえると、A k t - m T O R 活性化の制限がメモリー T 細胞表現型の維持を促進し得る可能性がある (P o w e l l e t a l . , A n n u R e v I m m u n o l 3 0 , 3 9 - 6 8 (2 0 1 2)) 。

10

【0188】

T r e g は多くの癌において効果的な抗腫瘍免疫の大きな障害となるので^{28, 29}、臨床的に重要な一般的な問題は、炎症性または自己免疫性の有害事象を防止しながら、腫瘍において T r e g 機能を限定することが可能であるかどうかである。さらに、本明細書に記載の腫瘍研究における S e m a 4 a の主要な供給減が形質細胞様 D C であることも興味深い。今回、N r p 1 : S e m a 4 a 軸が、周辺のホメオタシス維持のためではなく、腫瘍性炎症部位での T r e g の安定性に必要とされる中心経路として認識されたことから、初めて抗体または可溶性アンタゴニストによる S e m a 4 a : N r p 1 の遮断が、自己免疫を惹起することなく腫瘍誘導性寛容を限定するための実行可能な治療戦略であり得ることが示唆される。

20

【0189】

参考文献

1. Vignali, D.A., Collison, L.W. & Workman, C.J. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8, 523-532 (2008).
2. Fontenot, J.D., Gavin, M.A. & Rudensky, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330-336 (2003).
3. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061 (2003).
4. Fu, W. et al. A multiply redundant genetic switch 'locks in' the transcriptional signature of regulatory T cells. *Nat Immunol* (2012). 10
5. Hill, J.A. et al. Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* 27, 786-800 (2007).
6. Belkaid, Y. & Rouse, B.T. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 6, 353-360 (2005).
7. Himmel, M.E., Hardenberg, G., Piccirillo, C.A., Steiner, T.S. & Levings, M.K. The role of Tregulatory cells and Toll-like receptors in the pathogenesis of human inflammatory bowel disease. *Immunology* 125, 145-153 (2008). 20
8. Zheng, Y. et al. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 458, 351-356 (2009).
9. Koch, M.A. et al. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol* 10, 595-602 (2009).
10. Chaudhry, A. et al. CD4⁺ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 326, 986-991 (2009).
11. Zhou, X. et al. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol* 10, 1000-1007 (2009). 30

【 0 1 9 0 】

12. Collison, L.W., Pillai, M.R., Chaturvedi, V. & Vignali, D.A. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol* 182, 6121-6128 (2009).
13. Collison, L.W. et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566-569 (2007).
14. Nkyimbeng-Takwi, E. & Chapoval, S.P. Biology and function of neuroimmune semaphorins 4A and 4D. *Immunol Res* 50, 10-21 (2011). 10
15. Kolodkin, A.L. et al. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90, 753-762 (1997).
16. Kitsukawa, T. et al. Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19, 995-1005 (1997).
17. Gu, C. et al. Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Dev Cell* 5, 45-57 (2003).
18. Glinka, Y., Stoilova, S., Mohammed, N. & Prud'homme, G.J. Neuropilin-1 exerts co-receptor function for TGF-beta-1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF-beta. *Carcinogenesis* 32, 613-621 (2011). 20
19. Bruder, D. et al. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 34, 623-630 (2004).
20. Weiss, J.M. et al. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J Exp Med* (2012).
21. Yadav, M. et al. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med* (2012).
22. Solomon, B.D., Mueller, C., Chae, W.J., Alabanza, L.M. & Bynoe, M.S. Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2040-2045 (2011). 30
23. Rubtsov, Y.P. et al. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 28, 546-558 (2008).
24. Gorclik, L. & Flavell, R.A. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 12, 171-181 (2000).
25. Milpied, P. et al. Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3+ Treg. *Eur J Immunol* 39, 1466-1471 (2009). 40
26. Chaturvedi, V., Collison, L.W., Guy, C.S., Workman, C.J. & Vignali, D.A. Cutting edge: Human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance. *J Immunol* 186, 6661-6666 (2011).

27. Collison, L.W. et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol* 11, 1093-1101 (2010).
28. Nishikawa, H. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* 127, 759-767 (2010).
29. Wang, H.Y. & Wang, R.F. Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol* 19, 217-223 (2007).
30. Onizuka, S. et al. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 59, 3128-3133 (1999). 10
31. Li, X., Kostareli, E., Suffner, J., Garbi, N. & Hammerling, G.J. Efficient Treg depletion induces Tcell infiltration and rejection of large tumors. *Eur J Immunol* 40, 3325-3335 (2010).
32. Kim, J.M., Rasmussen, J.P. & Rudensky, A.Y. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 8, 191-197 (2007).
33. Chen, L. et al. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cellmediated tumor immunity. *J Exp Med* 179, 523-532 (1994).
34. Lafreniere, R., Borkenhagen, K. & Bryant, L.D. Generation of MC-38 adenocarcinoma tumorspecific tumor infiltrating lymphocytes by murine anti-CD3 antibody and recombinant interleukin-2. *Mol Biother* 3, 26-33 (1991). 20
35. Wilde, S. et al. Human antitumor CD8+ T cells producing Th1 polycytokines show superior antigen sensitivity and tumor recognition. *J Immunol* 189, 598-605 (2012).
36. Read, S., Malmstrom, V. & Powrie, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192, 295-302 (2000).
37. Castro-Rivera, E., Ran, S., Brekken, R.A. & Minna, J.D. Semaphorin 3B inhibits the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway through neuropilin-1 in lung and breast cancer cells. *Cancer Res* 68, 8295-8303 (2008). 30
38. Gray, M.J. et al. Neuropilin-1 suppresses tumorigenic properties in a human pancreatic adenocarcinoma cell line lacking neuropilin-1 coreceptors. *Cancer Res* 65, 3664-3670 (2005).
39. Haxhinasto, S., Mathis, D. & Benoist, C. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *J Exp Med* 205, 565-574 (2008).
40. Crellin, N.K., Garcia, R.V. & Levings, M.K. Altered activation of AKT is required for the suppressive function of human CD4+CD25+ T regulatory cells. *Blood* 109, 2014-2022 (2007). 40
41. Stambolic, V. et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95, 29-39 (1998).

42. Walsh, P.T. et al. PTEN inhibits IL-2 receptor-mediated expansion of CD4⁺ CD25⁺ Tregs. *J Clin Invest* 116, 2521-2531 (2006).
43. Kerdiles, Y.M. et al. Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function. *Immunity* 33, 890-904 (2010).
44. Merckenschlager, M. & von Boehmer, H. PI3 kinase signalling blocks Foxp3 expression by sequestering Foxo factors. *J Exp Med* 207, 1347-1350 (2010).
45. Ouyang, W. et al. Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 11, 618-627 (2010). 10
46. McConnell, B.B. & Yang, V.W. Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev* 90, 1337-1381 (2010).
47. Finlay, D. & Cantrell, D. Phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin pathways control T cell migration. *Ann N Y Acad Sci* 1183, 149-157 (2010).
48. Francisco, L.M. et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* 206, 3015-3029 (2009). 20
49. Parry, R.V. et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 25, 9543-9553 (2005).
50. Wang, H. et al. Tonic ubiquitylation controls T-cell receptor:CD3 complex expression during T-cell development. *EMBO J* 29, 1285-1298 (2010).

【 0 1 9 3 】

本発明の範囲は、本明細書に記載の特定の実施形態により限定されるものではない。実際、本明細書に記載の改変に加えて本発明の様々な改変が、明細書本文から当業者に明らかになるであろう。こうした改変は、添付の特許請求の範囲の範囲に包含されることを意図している。 30

【 0 1 9 4 】

本明細書に引用する特許、出願、刊行物、試験方法、文献および他の資料はすべて、本明細書に物理的に存在しているかのようにその全体を本明細書に援用する。

【 0 1 9 5 】

【表 1 - 1】

表 1

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
MOSERLE_IFNA_RESPONSE	20	0.7801 82	2.2877 44	0	0	0	3771	tags=80%, list=17%, signal=97%
BASSO_CD40_SIGNALING_DN	57	0.5820 34	2.1776 23	0	0.00154 4	0.005	4626	tags=54%, list=21%, signal=69%
TAKEDA_TARGETS_OF_NUP98_HOXA9_FUSION_3D_UP	123	0.5030 57	2.1614 99	0	0.00164 6	0.008	4687	tags=45%, list=21%, signal=57%
ZHAN_V1_LATE_DIFFERENTIATION_GENES_UP	29	0.6040 06	1.9930 54	0	0.02794 4	0.163	2268	tags=34%, list=10%, signal=38%
BOYLAN_MULTIPLE_MYELOMA_PCA1_UP	92	0.4834 28	1.9556 8	0	0.03994 1	0.275	2885	tags=37%, list=13%, signal=42%
MORI_PRE_BI_LYMPHOCYTE_DN	59	0.5140 33	1.9484 11	0	0.03546 3	0.29	5476	tags=49%, list=25%, signal=65%
BENNETT_SYSTEMIC_LUPUS_ERYTHEMATOSUS	15	0.7085 49	1.9438 89	0	0.03252 1	0.309	1214	tags=40%, list=6%, signal=42%
DIAZ_CHRONIC_MEYLOGENOUS_LEUKEMIA_DN	93	0.4665 9	1.9271 04	0	0.03656 4	0.377	4481	tags=40%, list=20%, signal=50%
VALK_AML_CLUSTER_13	23	0.6010 74	1.8880 98	0	0.05322	0.546	2951	tags=30%, list=13%, signal=35%
LEE_DIFFERENTIATING_T_LYMPHOCYTE	108	0.4531 79	1.8856 57	0	0.04907 4	0.553	6782	tags=53%, list=31%, signal=76%
SHIIPP_DLBCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHIOMA_DN	37	0.5311 42	1.8416 07	0.001667	0.07860 2	0.748	3348	tags=41%, list=15%, signal=48%
KOBAYASHI_EGFR_SIGNALING_24HR_UP	74	0.4681 95	1.8342 32	0	0.07861 5	0.774	6106	tags=55%, list=28%, signal=77%
TAKEDA_TARGETS_OF_NUP98_HOXA9_FUSION_8D_UP	116	0.4312 39	1.8321 17	0	0.07456 3	0.783	3846	tags=34%, list=18%, signal=41%
KIM_LRRC3B_TARGETS	17	0.6460 53	1.8210 81	0.001905	0.07797 2	0.824	2963	tags=41%, list=14%, signal=48%
FARMER_BREAST_CANCER_CLUSTER_1	30	0.5528 33	1.8138 77	0.001718	0.07926 9	0.844	3680	tags=43%, list=17%, signal=52%
BROWNE_INTERFERON_RESPONSIVE_GENES	51	0.4855 45	1.8048 69	0	0.08140 4	0.867	4417	tags=43%, list=20%, signal=54%
LIAN_LIPA_TARGETS_6M	78	0.4484 16	1.7997 82	0.00159	0.08109 2	0.885	2866	tags=37%, list=13%, signal=43%
FLECHNER_BIOPSY_KIDNEY_TRANSPLANT_REJEC	76	0.4489	1.7988	0	0.07755	0.889	5328	tags=43%, list=24%,

【表 1 - 2】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
TED_VS_OK_UP		79	28		1			signal=57%
EINAV_INTERFERON_SIGNATURE_IN_CANCER	18	0.6105 28	1.7816 75	0.003617	0.08978	0.927	5629	tags=61%, list=26%, signal=82%
YU_MYC_TARGETS_DN	53	0.4780 17	1.7678 61	0.001698	0.09885 9	0.952	5167	tags=47%, list=24%, signal=62%
BOYLAN_MULTIPLE_MYELOMA_C_D_DN	247	0.3765 3	1.7619 21	0	0.10001 5	0.96	4439	tags=36%, list=20%, signal=45%
RODRIGUES_DCC_TARGETS_DN	105	0.4203 15	1.7534 3	0	0.10349 5	0.971	2763	tags=28%, list=13%, signal=31%
ZHANG_INTERFERON_RESPONSE	15	0.6396 16	1.7532 12	0.003697	0.09915 6	0.971	3609	tags=47%, list=16%, signal=56%
ZHAN_MULTIPLE_MYELOMA_PR_DN	35	0.5192 6	1.7504	0.001757	0.09793 6	0.973	3855	tags=49%, list=18%, signal=59%
ODONNELL_TARGETS_OF_MYC_AND_TFRC_UP	54	0.4678 24	1.7499 03	0.001757	0.09441 6	0.973	5445	tags=54%, list=25%, signal=71%
WIELAND_UP_BY_HBV_INFECTION	75	0.4387 72	1.7408 91	0	0.09980 4	0.979	2632	tags=24%, list=12%, signal=27%
LIU_VAV3_PROSTATE_CARCINOGENESIS_UP	78	0.4359 01	1.7212 77	0	0.11750 2	0.994	6060	tags=50%, list=28%, signal=69%
MORI_MATURE_B_LYMPHOCYTE_UP	72	0.4391 27	1.7183 23	0.001658	0.11650 8	0.995	4855	tags=38%, list=22%, signal=48%
DAUER_STAT3_TARGETS_DN	28	0.5369 05	1.7155 27	0.00726	0.11592	0.996	4417	tags=57%, list=20%, signal=71%
HOFFMANN_IMMATURE_TO_MATURE_B_LYMPHO CYTE_UP	26	0.5407 76	1.7147 34	0.009259	0.11312 8	0.996	1683	tags=31%, list=8%, signal=33%
ICHIBA_GRAFT_VERSUS_HOST_DISEASE_D7_UP	105	0.4100 42	1.7133 52	0	0.11111 8	0.996	6418	tags=48%, list=29%, signal=67%
TAKEDA_TARGETS_OF_NUP98_HOXA9_FUSION_10 D_UP	133	0.3857 52	1.6915 37	0	0.13315 6	0.999	4645	tags=36%, list=21%, signal=46%
ZIRN_TRETINOIN_RESPONSE_WT1_UP	17	0.5911 84	1.6892 55	0.013283	0.13235 6	1	5401	tags=59%, list=25%, signal=78%
MCCABE_HOXC6_TARGETS_DN	17	0.5863 01	1.6839 37	0.010772	0.13554	1	3036	tags=35%, list=14%, signal=41%
YAO_TEMPORAL_RESPONSE_TO_PROGESTERONE_ CLUSTER_3	16	0.5878 3	1.6752 09	0.009191	0.14346 7	1	1698	tags=25%, list=8%, signal=27%

【表 1 - 3】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p- val	FDR q- val	FWER p- val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
WIKMAN_ASBESTOS_LUNG_CANCER_DN	22	0.5352 19	1.6680 22	0.024074	0.14958 1	1	2001	tags=32%, list=9%, signal=35%
WINTER_HYPOXIA_DN	40	0.4722 44	1.6640 49	0	0.15017 3	1	4581	tags=48%, list=21%, signal=60%
SMID_BREAST_CANCER_NORMAL_LIKE_UP	362	0.3405	1.6616	0	0.14965 4	1	4626	tags=33%, list=21%, signal=42%
LIAN_LIPA_TARGETS_3M	65	0.4341 76	1.6613 59	0.001672	0.14613 3	1	3112	tags=35%, list=14%, signal=41%
CAIRO_HEPATOBLASTOMA_CLASSES_DN	172	0.3678 63	1.6591 35	0	0.14555 6	1	5734	tags=37%, list=26%, signal=50%
ROSS_AML_WITH_CBFY_MYH11_FUSION	43	0.4640 84	1.6586 38	0.003559	0.14278 6	1	5542	tags=51%, list=25%, signal=68%
YAO_TEMPORAL_RESPONSE_TO_PROGESTERONE_0 CLUSTER_0	71	0.4171 13	1.6460 51	0	0.15584	1	5708	tags=52%, list=26%, signal=70%
HADDAD_T_LYMPHOCYTE_AND_NK_PROGENITOR_DN	55	0.4360 19	1.6418 7	0.00659	0.1582	1	1281	tags=25%, list=6%, signal=27%
HESS_TARGETS_OF_HOXA9_AND_MEIS1_DN	76	0.4141 7	1.6317 02	0.007874	0.16943 1	1	5960	tags=51%, list=27%, signal=70%
DUNNE_TARGETS_OF_AML1_MTG8_FUSION_UP	36	0.4784 38	1.6294 28	0.010582	0.16883 3	1	2167	tags=28%, list=10%, signal=31%
YAO_TEMPORAL_RESPONSE_TO_PROGESTERONE_1 CLUSTER_1	71	0.4098 11	1.6215 62	0.001692	0.17676 4	1	5217	tags=38%, list=24%, signal=50%
ST_ADRENERGIC	31	0.4880 04	1.6107 3	0.019097	0.19059 4	1	4284	tags=29%, list=20%, signal=36%
RAMALHO_STEMNESS_DN	69	0.4096 25	1.6096 26	0.007092	0.18837 5	1	5444	tags=36%, list=25%, signal=48%
YANG_BREAST_CANCER_ESR1_BULK_UP	15	0.5701 11	1.6082 23	0.022642	0.18685 4	1	4987	tags=33%, list=23%, signal=43%
GUTIERREZ_CHRONIC_LYMPHOCYTIC_LEUKEMIA_DN	46	0.4446 19	1.6064 09	0.014363	0.18586 8	1	4049	tags=35%, list=18%, signal=43%
MARKEY_RB1_ACUTE_LOF_UP	215	0.3421 48	1.6011 09	0	0.1904	1	6081	tags=40%, list=28%, signal=55%
REACTOME_CD28_CO_STIMULATION	25	0.5093 57	1.5922 81	0.014519	0.20162 4	1	4052	tags=28%, list=19%, signal=34%
SEITZ_NEOPLASTIC_TRANSFORMATION_BY_8P_D	60	0.4170	1.5813	0.011419	0.21658	1	5045	tags=42%, list=23%,

【表 1 - 4】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p- val	FDR q- val	FWER p- val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
ELETION_UP		38	52		5			signal=54%
RIZ_ERYTHROID_DIFFERENTIATION_12HR	41	0.4476 39	1.5803 76	0.017575	0.21432 8	1	4839	tags=32%, list=22%, signal=41%
CHUNG_BLISTER_CYTOTOXICITY_DN	28	0.4848 96	1.5790 03	0.016129	0.21280 3	1	4644	tags=46%, list=21%, signal=59%
YANG_BREAST_CANCER_ESR1_UP	19	0.5400 89	1.5751 91	0.024528	0.21507 3	1	4051	tags=37%, list=19%, signal=45%
FULCHER_INFLAMMATORY_RESPONSE_LECTIN_V S_LPS_DN	318	0.3262 76	1.5682 22	0	0.22365 1	1	5907	tags=36%, list=27%, signal=49%
ZUCCHI_METASTASIS_UP	20	0.5318 76	1.5650 82	0.023636	0.22572	1	3847	tags=30%, list=18%, signal=36%
CHARAFE_BREAST_CANCER_BASAL_VS_MESENC HYMAL_DN	39	0.4526 51	1.5634 95	0.015652	0.22490 5	1	1668	tags=23%, list=8%, signal=25%
ZHAN_MULTIPLE_MYELOMA_DN	25	0.4963 99	1.5565 41	0.022887	0.23466 2	1	2712	tags=28%, list=12%, signal=32%
WEST_ADRENOCHORTICAL_CARCINOMA_VS_ADEN OMA_DN	17	0.5511 68	1.5482 03	0.025194	0.24639 4	1	2788	tags=29%, list=13%, signal=34%
LIANG_HEMATOPOIESIS_STEM_CELL_NUMBER_S MALL_VS_HUGE_DN	30	0.4775 97	1.5471 56	0.021016	0.24433 4	1	5927	tags=43%, list=27%, signal=59%
NEWMAN_ERCC6_TARGETS_UP	19	0.5145 51	1.5463 77	0.032143	0.24209 9	1	3307	tags=47%, list=15%, signal=56%
TAKEDA_TARGETS_OF_NUP98_HOXA9_FUSION_16 D_UP	124	0.3634 96	1.5449 56	0.003257	0.24099 5	1	3846	tags=30%, list=18%, signal=36%
GARGALOVIC_RESPONSE_TO_OXIDIZED_PHOSPH OLIPIDS RED_DN	17	0.5470 73	1.5372 67	0.033028	0.25250 3	1	2897	tags=29%, list=13%, signal=34%
ZHANG_ANTIVIRAL_RESPONSE_TO_RIBAVIRIN_U P	22	0.5114 79	1.5366 26	0.028725	0.24982 3	1	2272	tags=27%, list=10%, signal=30%
ICHIBA_GRAFT_VERSUS_HOST_DISEASE_35D_UP	128	0.3533 42	1.5338 23	0.004992	0.25164	1	3262	tags=25%, list=15%, signal=29%
XU_GHI_EXOGENOUS_TARGETS_DN	71	0.3875 72	1.5278 15	0.010017	0.25981 2	1	5208	tags=41%, list=24%, signal=53%
NAKAJIMA_MAST_CELL	28	0.4751 46	1.5273 63	0.036649	0.25696 9	1	1422	tags=25%, list=6%, signal=27%
RADAEVA_RESPONSE_TO_IFNA1_UP	28	0.4759 43	1.5254 65	0.025	0.25715 6	1	1652	tags=21%, list=8%, signal=23%

【表 1 - 5】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
TAKEDA_TARGETS_OF_NUP98_HOXA9_FUSION_8D_DN	142	0.3464 59	1.5251 41	0.003145	0.25424 7	1	5601	tags=39%, list=26%, signal=53%
ROY_WOUND_BLOOD_VESSEL_UP	41	0.4395 38	1.5204 34	0.028881	0.26022 9	1	3701	tags=32%, list=17%, signal=38%
KRASNOSELSKAYA_ILF3_TARGETS_UP	22	0.4992	1.5141 33	0.02852	0.26907 9	1	1532	tags=27%, list=7%, signal=29%
BIOCARTA_IL7_PATHWAY	17	0.5290 18	1.5133 42	0.054104	0.26696 5	1	6967	tags=59%, list=32%, signal=86%
SEKI_INFLAMMATORY_RESPONSE_LPS_DN	22	0.5000 8	1.5131 79	0.028829	0.26380 9	1	5462	tags=50%, list=25%, signal=67%
CHEOK_RESPONSE_TO_HD_MTX_UP	15	0.5403 4	1.5051 68	0.052533	0.27669 2	1	4411	tags=60%, list=20%, signal=75%
REACTOME_GENERATION_OF_SECOND_MESSENGER_MOLECULES	20	0.5037 59	1.5038 32	0.046632	0.27597 4	1	7129	tags=55%, list=33%, signal=81%
LIANG_SILENCED_BY_METHYLATION_2	26	0.4762 62	1.4988 88	0.036269	0.28311 2	1	2867	tags=31%, list=13%, signal=35%
GNATENKO_PLATELET_SIGNATURE	28	0.4529 62	1.4951 95	0.038321	0.28757 1	1	1177	tags=7%, list=5%, signal=8%
WALLACE_PROSTATE_CANCER_RACE_UP	213	0.3241 27	1.4874 32	0.003017	0.30127 4	1	3262	tags=25%, list=15%, signal=29%

【表 2 - 1】

表2

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
MANALO_HYPOXIA_DN	233	-0.6248	- 3.10267	0	0	0	5952	tags=75%, list=27%, signal=102%
SHEDDEN_LUNG_CANCER_POOR_SURVIVAL_A6	363	-0.5568	- 2.90709	0	0	0	6869	tags=67%, list=31%, signal=96%
ROSTY_CERVICAL_CANCER_PROLIFERATION_CLUSTE R	119	- 0.63271	- 2.88451	0	0	0	5413	tags=68%, list=25%, signal=90%
CAIRO_HEPATOBLASTOMA_CLASSES_UP	491	- 0.52038	- 2.80827	0	0	0	6692	tags=62%, list=31%, signal=87%
SOTIRIOU_BREAST_CANCER_GRADE_1_VS_3_UP	119	- 0.61776	- 2.79674	0	0	0	6027	tags=73%, list=28%, signal=100%
KOBAYASHI_EGFR_SIGNALING_24HR_DN	210	- 0.56625	- 2.76693	0	0	0	4922	tags=61%, list=22%, signal=78%
FOURNIER_ACINAR_DEVELOPMENT_LATE_2	234	- 0.54704	- 2.72639	0	0	0	6692	tags=60%, list=31%, signal=86%
BERENJENO_TRANSFORMED_BY_RHOA_UP	474	- 0.50701	- 2.724	0	0	0	6265	tags=61%, list=29%, signal=83%
WONG_EMBRYONIC_STEM_CELL_CORE	294	- 0.52557	- 2.72324	0	0	0	6153	tags=58%, list=28%, signal=80%
YAO_TEMPORAL_RESPONSE_TO_PROGESTERONE_CL USTER_11	94	- 0.61381	- 2.66053	0	0	0	5876	tags=67%, list=27%, signal=91%
CROONQUIST_IL6_DEPRIVATION_DN	70	- 0.63924	- 2.65141	0	0	0	6153	tags=80%, list=28%, signal=111%
HOFFMANN_LARGE_TO_SMALL_PRE_BII_LYMPHOCY TE_UP	89	- 0.60027	- 2.58164	0	0	0	4901	tags=64%, list=22%, signal=82%
U_MYC_TARGETS_UP	37	- 0.71553	- 2.55861	0	0	0	5413	tags=89%, list=25%, signal=118%
ODONNELL_TARGETS_OF_MYC_AND_THRC_DN	33	- 0.72466	- 2.55781	0	0	0	5292	tags=91%, list=24%, signal=120%
WINNEPENINCKX_MELANOMA_METASTASIS_UP	119	- 0.56021	- 2.55758	0	0	0	6951	tags=73%, list=32%, signal=107%
YAO_TEMPORAL_RESPONSE_TO_PROGESTERONE_CL USTER_14	115	- 0.56693	- 2.5469	0	0	0	7004	tags=70%, list=32%, signal=102%
RODRIGUES_THYROID_CARCINOMA_POORLY_DIFFER ENTIATED_UP	489	- 0.46802	- 2.53179	0	0	0	5968	tags=51%, list=27%, signal=68%
FUJII_YBX1_TARGETS_DN	125	-	-	0	0	0	4939	tags=53%, list=23%,

【 0 2 0 1】

【表 2 - 2】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
		0.54196	2.49594					signal=68%
CROONQUIST_NRAS_SIGNALING_DN	54	- 0.63419	- 2.48885	0	0	0	6153	tags=76%, list=28%, signal=105%
GRAHAM_NORMAL_QUIESCENT_VS_NORMAL_DIVIDING_DN	70	- 0.60518	- 2.48278	0	0	0	6063	tags=76%, list=28%, signal=104%
REACTOME_LATE_PHASE_OF_HIV_LIFE_CYCLE	87	-0.5748	- 2.47952	0	0	0	8431	tags=80%, list=39%, signal=130%
KAUFFMANN_MELANOMA_RELAPSE_UP	54	- 0.62378	- 2.47485	0	0	0	5554	tags=59%, list=25%, signal=79%
SCHUHMACHER_MYC_TARGETS_UP	61	- 0.61714	-2.471	0	0	0	5506	tags=64%, list=25%, signal=85%
REACTOME_CELL_CYCLE_MITOTIC	262	- 0.48339	- 2.46512	0	0	0	6909	tags=56%, list=32%, signal=81%
KAUFFMANN_DNA_REPAIR_GENES	187	- 0.50159	- 2.46045	0	0	0	6218	tags=55%, list=28%, signal=76%
PUJANA_BRCA_CENTERED_NETWORK	89	- 0.56638	- 2.45856	0	0	0	7277	tags=73%, list=33%, signal=109%
REACTOME_MITOTIC_M_M_G1_PHASES	135	- 0.53123	- 2.44983	0	0	0	6909	tags=60%, list=32%, signal=87%
REACTOME_SNRNP_ASSEMBLY	45	- 0.65052	- 2.44495	0	0	0	6439	tags=76%, list=29%, signal=107%
BASAKI_YBX1_TARGETS_UP	222	- 0.49822	- 2.44417	0	0	0	5554	tags=57%, list=25%, signal=75%
ODONNELL_TFRC_TARGETS_DN	97	- 0.55664	- 2.43787	0	0	0	6126	tags=68%, list=28%, signal=94%
FRASOR_RESPONSE_TO_SERM_OR_FULVESTRANT_DN	41	- 0.65506	- 2.42734	0	0	0	4941	tags=66%, list=23%, signal=85%
REACTOME_HIV_LIFE_CYCLE	100	- 0.54912	-2.4228	0	0	0	5861	tags=59%, list=27%, signal=80%
MUELLER_PLURINET	259	- 0.47566	- 2.41338	0	0	0	6395	tags=54%, list=29%, signal=75%
PUJANA_XPRSS_INT_NETWORK	140	- 0.51444	- 2.40556	0	0	0	7526	tags=65%, list=34%, signal=98%
RUIZ_TNC_TARGETS_DN	119	- 0.53597	- 2.40153	0	0	0	4777	tags=51%, list=22%, signal=65%

【 0 2 0 2 】

【表 2 - 3】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
REACTOME_DNA_REPAIR	94	- 0.55297	- 2.39978	0	0	0	5861	tags=61%, list=27%, signal=82%
REACTOME_S_PHASE	96	- 0.54082	- 2.37791	0	0	0	6833	tags=60%, list=31%, signal=87%
BIDUS_METASTASIS_UP	158	- 0.51165	- 2.37316	0	0	0	7136	tags=63%, list=33%, signal=93%
WHITEFORD_PEDIATRIC_CANCER_MARKERS	86	- 0.54806	- 2.36761	0	3.93E -05	0.001	7069	tags=72%, list=32%, signal=106%
REACTOME_G2_M_CHECKPOINTS	40	- 0.63598	- 2.36258	0	3.83E -05	0.001	5555	tags=70%, list=25%, signal=94%
REACTOME_METABOLISM_OF_RNA	87	- 0.54929	- 2.35909	0	3.74E -05	0.001	7211	tags=69%, list=33%, signal=102%
NAKAMURA_CANCER_MICROENVIRONMENT_DN	41	- 0.63668	- 2.35679	0	3.65E -05	0.001	3730	tags=56%, list=17%, signal=67%
BENPORATH_PROLIFERATION	116	- 0.51614	- 2.35319	0	3.56E -05	0.001	6389	tags=59%, list=29%, signal=82%
LINDGREN_BLADDER_CANCER_CLUSTER_3_UP	251	- 0.46393	- 2.34652	0	3.48E -05	0.001	6686	tags=54%, list=31%, signal=77%
WAKASUGI_HAVE_ZNF143_BINDING_SITES	53	- 0.59959	- 2.3417	0	3.40E -05	0.001	5772	tags=68%, list=26%, signal=92%
SCHLOSSER_MYC_TARGETS_REPRESSED_BY_SERUM	121	- 0.51909	- 2.34105	0	3.33E -05	0.001	6356	tags=57%, list=29%, signal=80%
REACTOME_SYNTHESIS_OF_DNA	83	- 0.54736	- 2.30879	0	1.32E -04	0.004	8423	tags=77%, list=38%, signal=125%
REACTOME_TRANSPORT_OF_MATURE_MRNA_DERIVED_FROM_AN_INTRON_CONTAINING_TRANSCRIPT	49	- 0.59175	- 2.29609	0	1.30E -04	0.004	7817	tags=78%, list=36%, signal=120%
REACTOME_MITOTIC_PROMETAPHASE	71	- 0.55579	- 2.2958	0	1.27E -04	0.004	6280	tags=59%, list=29%, signal=83%
GRAHAM_CML_DIVIDING_VS_NORMAL_QUIESCENT_UP	152	- 0.48848	- 2.29571	0	1.24E -04	0.004	6063	tags=65%, list=28%, signal=89%
REACTOME_HIV_INFECTION	175	- 0.47404	- 2.29196	0	1.22E -04	0.004	8431	tags=68%, list=39%, signal=110%
REACTOME_DNA_REPLICATION_PRE_INITIATION	72	- 0.54465	- 2.28201	0	1.20E -04	0.004	8423	tags=76%, list=38%, signal=124%
MARKEY_RB1_ACUTE_LOF_DN	213	-	-	0	1.17E	0.004	5479	tags=51%, list=25%,

【 0 2 0 3 】

10

20

30

40

【表 2 - 4】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
REN_BOUND_BY_E2F	46	0.46076	2.27719	0	-04	0.004	6811	signal=67%
BLUM_RESPONSE_TO_SALIRASIB_DN	307	-0.60126	2.27011	0	1.15E-04	0.005	6203	tags=78%, list=31%, signal=113%
GARCIA_TARGETS_OF_FLI1_AND_DAX1_DN	110	-0.43985	2.26538	0	1.42E-04	0.006	4187	tags=50%, list=28%, signal=69%
REACTOME_RNA_POLYMERASE_II_TRANSCRIPTION	86	-0.50543	2.26225	0	1.68E-04	0.006	9169	tags=47%, list=19%, signal=58%
HESS_TARGETS_OF_HOXA9_AND_MEI51_UP	61	-0.52681	2.26175	0	1.65E-04	0.006	6153	tags=80%, list=42%, signal=138%
REACTOME_CELL_CYCLE_CHECKPOINTS	105	-0.56804	2.2611	0	1.62E-04	0.006	8446	tags=69%, list=28%, signal=96%
TOYOTA_TARGETS_OF_MIR34B_AND_MIR34C	302	-0.51244	2.26088	0	1.59E-04	0.007	5294	tags=72%, list=39%, signal=117%
LE_EGR2_TARGETS_UP	99	-0.43657	2.25848	0	1.83E-04	0.01	5571	tags=47%, list=24%, signal=62%
WELCSH_BRCA1_TARGETS_1_DN	103	-0.50456	2.24365	0	2.57E-04	0.01	5398	tags=60%, list=25%, signal=80%
ZHAN_MULTIPLE_MYELOMA_PR_UP	30	-0.50022	2.24119	0	2.53E-04	0.01	5457	tags=49%, list=25%, signal=64%
SCHLOSSER_MYC_TARGETS_AND_SERUM_RESPONSE_UP	42	-0.66657	2.23876	0	2.49E-04	0.01	7170	tags=73%, list=25%, signal=98%
KANG_DOXORUBICIN_RESISTANCE_UP	42	-0.5993	2.23838	0	2.45E-04	0.01	6063	tags=79%, list=33%, signal=117%
REACTOME_TRANSCRIPTION_OF_THE_HIV_GENOME	56	-0.60911	2.23058	0	2.41E-04	0.01	8431	tags=79%, list=28%, signal=108%
YAO_TEMPORAL_RESPONSE_TO_PROGESTERONE_CL USTER 17	162	-0.55479	2.22406	0	2.37E-04	0.01	8156	tags=77%, list=39%, signal=125%
KEGG_AMINOACYL_TRNA_BIOSYNTHESIS	29	-0.46632	2.22323	0	2.34E-04	0.01	5501	tags=58%, list=37%, signal=92%
BIOCARTA_CYTOKINE_PATHWAY	19	-0.65833	2.22232	0	2.30E-04	0.01	1999	tags=76%, list=25%, signal=101%
VECCHI_GASTRIC_CANCER_EARLY_UP	312	-0.73463	2.2217	0	2.27E-04	0.01	5572	tags=58%, list=9%, signal=64%
		-0.43099	2.22032	0	2.24E-04	0.01		tags=49%, list=25%, signal=65%

【表 2 - 5】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
FINETTI_BREAST_CANCER_KINOME_RED	15	- 0.77765	- 2.22007	0	2.21E -04	0.01	3773	tags=80%, list=17%, signal=97%
SONG_TARGETS_OF_IE86_CMV_PROTEIN	42	- 0.59892	-2.2135	0	2.61E -04	0.011	6296	tags=69%, list=29%, signal=97%
FINETTI_BREAST_CANCER_BASAL_VS_LUMINAL	15	- 0.77765	2.21228	0	2.58E -04	0.011	3773	tags=80%, list=17%, signal=97%
FERREIRA_EWINGS_SARCOMA_UNSTABLE_VS_STABLE E UP	110	- 0.48933	2.21168	0	2.54E -04	0.011	6401	tags=62%, list=29%, signal=87%
REACTOME_ACTIVATION_OF_ATR_IN_RESPONSE_TO_ REPLICATION STRESS	35	- 0.63192	2.21151	0	2.51E -04	0.011	6833	tags=80%, list=31%, signal=116%
REACTOME_TRNA_AMINOACYLATION	28	- 0.65329	2.20926	0	2.47E -04	0.011	5918	tags=79%, list=27%, signal=108%
REACTOME_REV_MEDIATED_NUCLEAR_EXPORT_OF_ HIV1_RNA	31	- 0.63725	-2.2092	0	2.44E -04	0.011	6272	tags=74%, list=29%, signal=104%
PUJANA_BRCA2_PCC_NETWORK	354	- 0.42091	2.19518	0	3.01E -04	0.014	6984	tags=55%, list=32%, signal=80%
PUJANA_BREAST_CANCER_WITH_BRCA1_MUTATED_ UP	48	- 0.57048	2.19223	0	2.97E -04	0.014	7650	tags=69%, list=35%, signal=105%
BENPORATH_CYCLING_GENES	487	- 0.40496	2.18482	0	2.94E -04	0.014	6063	tags=47%, list=28%, signal=63%
TARTE_PLASMA_CELL_VS_PLASMABLAST_DN	264	- 0.43192	2.18475	0	2.90E -04	0.014	6794	tags=50%, list=31%, signal=72%
ZHANG_BREAST_CANCER_PROGENITORS_UP	356	- 0.41639	2.18359	0	2.86E -04	0.014	5110	tags=39%, list=23%, signal=50%
MOLENAAR_TARGETS_OF_CCND1_AND_CDK4_DN	38	- 0.59147	2.18357	0	2.83E -04	0.014	5413	tags=68%, list=25%, signal=91%
CHEMNITZ_RESPONSE_TO_PROSTAGLANDIN_E2_UP	105	- 0.49243	2.18272	0	2.80E -04	0.014	5603	tags=53%, list=26%, signal=71%
CHUANG_LIVER_CANCER_SUBCLASS_PROLIFERATION UP	126	- 0.48551	2.17998	0	2.94E -04	0.015	6037	tags=59%, list=28%, signal=81%
MORI_IMMATURE_B_LYMPHOCYTE_DN	51	- 0.56172	2.17923	0	3.09E -04	0.016	4901	tags=55%, list=22%, signal=71%
LI_WILMS_TUMOR_VS_FETAL_KIDNEY_1_DN	143	- 0.47552	2.17785	0	3.58E -04	0.019	6032	tags=57%, list=28%, signal=79%
REACTOME_G1_S_TRANSITION	95	-	-	0	4.24E	0.023	8423	tags=76%, list=38%,

【 0 2 0 5】

10

20

30

40

【表 2 - 6】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
		0.49882	2.16889		-04			signal=123%
REACTOME_ORC1_REMOVAL_FROM_CHROMATIN	62	- 0.53445	- 2.16413	0	4.19E -04	0.023	8423	tags=76%, list=38%, signal=123%
REACTOME_VPR_MEDIATED_NUCLEAR_IMPORT_OF_P ICS	31	- 0.62822	- 2.16243	0	4.31E -04	0.024	6272	tags=71%, list=29%, signal=99%
MARZEC_IL2_SIGNALING_UP	95	-0.5007	-2.1622	0	4.27E -04	0.024	3897	tags=46%, list=18%, signal=56%
LEE_EARLY_T_LYMPHOCYTE_UP	62	- 0.53445	- 2.16142	0	4.22E -04	0.024	6063	tags=66%, list=28%, signal=91%
BOYALT_LIVER_CANCER_SUBCLASS_G3_UP	141	- 0.46084	-2.1547	0	4.17E -04	0.024	7315	tags=61%, list=33%, signal=91%
REACTOME_TRANSPORT_OF_THE_SLBP_INDEPENDEN T_MATURE_MRNA	31	- 0.62469	-2.1546	0	4.13E -04	0.024	6272	tags=71%, list=29%, signal=99%
REACTOME_M_G1_TRANSITION	60	- 0.53293	- 2.15376	0	4.09E -04	0.024	8423	tags=75%, list=38%, signal=122%
REACTOME_FORMATION_AND_MATURATION_OF_MR NA_TRANSCRIPT	124	- 0.46416	- 2.14877	0	4.04E -04	0.024	7557	tags=61%, list=35%, signal=93%
CROONQUIST_NRAS_VS_STROMAL_STIMULATION_DN	67	- 0.52518	- 2.14495	0	4.00E -04	0.024	4737	tags=52%, list=22%, signal=66%
REACTOME_ACTIVATION_OF_THE_PRE_REPLICATIVE COMPLEX	27	- 0.64535	- 2.13937	0	4.43E -04	0.027	6833	tags=85%, list=31%, signal=124%
FURUKAWA_DUSP6_TARGETS_PC135_DN	53	- 0.54107	- 2.13646	0	4.70E -04	0.029	5506	tags=64%, list=25%, signal=86%
REACTOME_NEP_NS2_INTERACTS_WITH_THE_CELLU LAR_EXPORT_MACHINERY	29	- 0.63219	- 2.13521	0	4.65E -04	0.029	6272	tags=72%, list=29%, signal=101%
SARRIO_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION_U P	15	- 0.73215	- 2.13413	0	4.61E -04	0.029	5555	tags=93%, list=25%, signal=125%
KEGG_HOMOLOGOUS_RECOMBINATION	26	- 0.65195	- 2.13209	0	4.71E -04	0.03	4302	tags=54%, list=20%, signal=67%
REACTOME_TRANSPORT_OF_RIBONUCLEOPROTEINS_ INTO_THE_HOST_NUCLEUS	29	- 0.62504	- 2.12057	0	5.88E -04	0.038	7635	tags=83%, list=35%, signal=127%
REACTOME_TRANSCRIPTION_COUPLED_NER	44	- 0.55892	- 2.11943	0	5.82E -04	0.038	8892	tags=86%, list=41%, signal=145%
REACTOME_NUCLEAR_IMPORT_OF_REF_PROTEIN	30	- 0.63441	- 2.11724	0	5.77E -04	0.038	7635	tags=87%, list=35%, signal=133%

【 0 2 0 6 】

【表 2 - 7】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
KAUFFMANN_DNA_REPLICATION_GENES	122	- 0.46254	- 2.11386	0	6.28E-04	0.042	6879	tags=54%, list=31%, signal=78%
MITSIADES_RESPONSE_TO_APLIDIN_DN	203	-0.4327	- 2.11313	0	6.22E-04	0.042	6448	tags=51%, list=29%, signal=71%
MOOTHA_HUMAN_MITODB_6_2002	390	- 0.40354	- 2.11231	0	6.17E-04	0.042	6758	tags=46%, list=31%, signal=66%
REACTOME_PROCESSING_OF_CAPPED_INTRON_CONTAINING_PRE_MRNA	112	- 0.48203	- 2.11184	0	6.11E-04	0.042	7635	tags=64%, list=35%, signal=98%
PENG_GLUTAMINE_DEPRIVATION_DN	70	- 0.51196	- 2.11181	0	6.05E-04	0.042	6354	tags=59%, list=29%, signal=82%
REACTOME_HIV1_TRANSCRIPTION_INITIATION	39	- 0.57113	-2.1081	0	6.28E-04	0.044	8247	tags=79%, list=38%, signal=127%
RHODES_UNDIFFERENTIATED_CANCER	57	- 0.52455	- 2.10806	0	6.22E-04	0.044	7746	tags=67%, list=35%, signal=103%
TANG_SENESCENCE_TP53_TARGETS_DN	35	- 0.57539	- 2.10783	0	6.17E-04	0.044	5348	tags=63%, list=24%, signal=83%
BIOCARTA_ATRBRCA_PATHWAY	20	- 0.67215	- 2.10398	0	6.38E-04	0.046	5247	tags=70%, list=24%, signal=92%
MORI_LARGE_PRE_BII_LYMPHOCYTE_UP	53	- 0.54205	- 2.10142	0	6.47E-04	0.047	7289	tags=72%, list=33%, signal=107%
TIEN_INTESTINE_PROBIOTICS_24HR_UP	455	- 0.39298	-2.0885	0	8.14E-04	0.058	7207	tags=53%, list=33%, signal=77%
KEGG_BASAL_TRANSCRIPTION_FACTORS	31	- 0.59988	- 2.08011	0	8.59E-04	0.062	5796	tags=68%, list=26%, signal=92%
PODAR_RESPONSE_TO_ADAPHOSTIN_DN	16	-0.7055	- 2.07696	0	9.04E-04	0.065	3479	tags=63%, list=16%, signal=74%
REACTOME_REGULATION_OF_GLUKOKINASE_BY_GLUKOKINASE_REGULATORY_PROTEIN	29	- 0.60978	-2.0751	0	9.22E-04	0.067	6272	tags=72%, list=29%, signal=101%
AMUNDSON_GAMMA_RADIATION_RESPONSE	32	- 0.59312	- 2.07276	0	9.40E-04	0.069	6032	tags=66%, list=28%, signal=90%
MISSIAGLIA_REGULATED_BY_METHYLATION_DN	89	- 0.48206	- 2.07014	0	9.84E-04	0.073	6873	tags=58%, list=31%, signal=85%
SHAFER_IRF4_TARGETS_IN_ACTIVATED_B_LYMPHOCYTE	74	- 0.49013	- 2.06892	0	9.75E-04	0.073	4857	tags=49%, list=22%, signal=62%
REACTOME_EXTENSION_OF_TELOMERES	23	-	-2.066	0	0.001	0.076	5837	tags=74%, list=27%,

【 0 2 0 7 】

10

20

30

40

【表 2 - 8】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
		0.65295			017			signal=101%
DIRMEIER_LMP1_RESPONSE_LATE_UP	42	-0.5521	- 2.05234	0	0.001 257	0.092	5294	tags=45%, list=24%, signal=60%
KEGG_DNA_REPLICATION	32	-	-	0	0.001 259	0.093	6929	tags=72%, list=32%, signal=105%
GARY_CD5_TARGETS_DN	341	0.60017	2.05097	0	0.001 286	0.096	7114	tags=55%, list=32%, signal=81%
MARSON_FOXP3_TARGETS_DN	39	0.39679	2.04839	0	0.001 348	0.101	4412	tags=46%, list=20%, signal=58%
MORI_EMU_MYC_LYMPHOMA_BY_ONSET_TIME_UP	96	-0.551	2.04432	0	0.001 362	0.103	6328	tags=55%, list=29%, signal=77%
GARGALOVIC_RESPONSE_TO_OXIDIZED_PHOSPHOLIPIDS_TURQUOISE_DN	37	0.47001	2.04192	0	0.001 422	0.109	4401	tags=59%, list=20%, signal=74%
KEGG_ASTHMA	15	-	2.03863	0	0.001 518	0.118	1999	tags=47%, list=9%, signal=51%
EGUCHI_CELL_CYCLE_RB1_TARGETS	18	0.71208	2.03735	0	0.001 506	0.118	4559	tags=72%, list=21%, signal=91%
SCHLOSSER_MYC_TARGETS_AND_SERUM_RESPONSE_DN	40	0.68811	2.03727	0	0.001 507	0.119	5731	tags=60%, list=26%, signal=81%
ELVIDGE_HYPOXIA_DN	117	-	-2.0311	0	0.001 622	0.128	5371	tags=47%, list=25%, signal=62%
REACTOME_DNA_STRAND_FLONGATION	26	0.45344	-2.031	0.0021 98	0.001 622	0.129	6770	tags=77%, list=31%, signal=111%
REACTOME_TRANSCRIPTION	140	-	0.62331	0	0.001 621	0.129	7557	tags=60%, list=35%, signal=91%
MOOTHIA_MITOCHONDRIA	402	0.43535	2.03019	0	0.001 758	0.141	6758	tags=46%, list=31%, signal=65%
DANG_MYC_TARGETS_UP	109	-	-	0	0.001 857	0.15	7245	tags=55%, list=33%, signal=82%
DANG_REGULATED_BY_MYC_UP	59	0.45162	2.02125	0	0.001 843	0.15	6439	tags=59%, list=29%, signal=84%
REACTOME_HOST_INTERACTIONS_OF_HIV_FACTORS	115	-0.5127	- 2.02065	0	0.001 851	0.152	8903	tags=68%, list=41%, signal=114%
ZHANG_RESPONSE_TO_CANTHARIDIN_DN	49	0.44796	2.01819	0	0.001 838	0.152	6558	tags=59%, list=30%, signal=84%

【表 2 - 9】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
TONG_INTERACT_WITH_PTTG1	39	- 0.54688	- 2.01355	0	0.001 933	0.159	5056	tags=49%, list=23%, signal=63%
BIOCARTA_INFLAM_PATHWAY	25	- 0.61727	-2.0126	0	0.001 942	0.16	1999	tags=40%, list=9%, signal=44%
REACTOME_CDT1_ASSOCIATION_WITH_THE_CDC6_ORC_ORIGIN_COMPLEX	51	- 0.51868	-2.0036	0	0.002 08	0.173	8423	tags=73%, list=38%, signal=118%
KEGG_PYRIMIDINE_METABOLISM	86	- 0.46227	- 1.99674	0	0.002 332	0.19	4372	tags=44%, list=20%, signal=55%
RHEIN_ALL_GLUCCOCORTICOID_THERAPY_DN	315	- 0.38684	- 1.99663	0	0.002 316	0.19	7650	tags=54%, list=35%, signal=82%
BENPORATH_ES_1	299	- 0.38787	-1.9956	0	0.002 343	0.193	5302	tags=41%, list=24%, signal=54%
LY_AGING_OLD_DN	43	- 0.53325	- 1.99505	0	0.002 348	0.194	5064	tags=56%, list=23%, signal=72%
REACTOME_REGULATION_OF_APC_ACTIVATORS_BETWEEN_G1_S_AND_EARLY_ANAPHASE	67	- 0.48117	- 1.99433	0	0.002 342	0.195	8903	tags=72%, list=41%, signal=120%
MARTORIATI_MDM4_TARGETS_NEUROEPITHELIUM_UP	89	- 0.46873	- 1.99372	0	0.002 347	0.197	4616	tags=35%, list=21%, signal=44%
CHIANG_LIVER_CANCER_SUBCLASS_UNANNOTATED_DN	142	- 0.42418	- 1.99351	0	0.002 352	0.199	6920	tags=49%, list=32%, signal=72%
REACTOME_CYCLIN_E_ASSOCIATED_EVENTS_DURING_G1_S_TRANSITION	56	- 0.50105	- 1.99109	0	0.002 428	0.208	8423	tags=70%, list=38%, signal=113%
CHANG_CYCLING_GENES	37	- 0.55801	- 1.98899	0	0.002 473	0.214	4106	tags=59%, list=19%, signal=73%
RICKMAN_METASTASIS_UP	224	- 0.39927	- 1.97561	0	0.003 032	0.258	5792	tags=42%, list=26%, signal=56%
DAIRKEE_TERT_TARGETS_UP	254	-0.3908	-1.9717	0	0.003 174	0.271	5075	tags=33%, list=23%, signal=42%
ZHAN_MULTIPLE_MYELOMA_SUBGROUPS	26	- 0.60061	- 1.96794	0.0023 53	0.003 313	0.283	6794	tags=62%, list=31%, signal=89%
UDAYAKUMAR_MEDI_TARGETS_UP	108	- 0.44358	- 1.96757	0	0.003 312	0.285	4110	tags=38%, list=19%, signal=47%
BORCZUK_MALIGNANT_MESOTHELIOMA_UP	258	- 0.39069	- 1.96646	0	0.003 388	0.294	7491	tags=48%, list=34%, signal=72%
STEIN_ESRRA_TARGETS_RESPONSIVE_TO_ESTROGEN	36	-	-1.9664	0.0022	0.003	0.295	4568	tags=50%, list=21%,

【表 2 - 1 0】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADINGEDGE
_DN		0.54912		42	377			signal=63%
NADERI_BREAST_CANCER_PROGNOSIS_UP	33	- 0.56192	- 1.96618	0	0.003 365	0.296	3686	tags=52%, list=17%, signal=62%
MOREAUX_MULTIPLE_MYELOMA_BY_TACI_DN	102	- 0.44369	- 1.96265	0	0.003 508	0.306	7245	tags=54%, list=33%, signal=80%
REACTOME_CYTOSOLIC_TRNA_AMINOACYLATION	18	- 0.65663	- 1.95881	0.0021 32	0.003 581	0.314	5918	tags=83%, list=27%, signal=114%
BOYLAN_MULTIPLE_MYELOMA_C_D_UP	110	- 0.43955	- 1.95861	0	0.003 559	0.314	6352	tags=49%, list=29%, signal=69%
GRADE_COLON_AND_RECTAL_CANCER_UP	203	- 0.39763	- 1.95855	0	0.003 537	0.314	6949	tags=50%, list=32%, signal=73%
FAELT_B_CLL_WITH_VH3_21_UP	37	-0.5493	- 1.95553	0	0.003 591	0.32	6063	tags=57%, list=28%, signal=78%
KEGG_SPLICOSOME	92	- 0.44834	- 1.95543	0	0.003 588	0.321	7655	tags=62%, list=35%, signal=95%
KIM_WT1_TARGETS_DN	359	- 0.37271	- 1.95293	0	0.003 679	0.33	4941	tags=35%, list=23%, signal=44%
PENG_RAPAMYCIN_RESPONSE_DN	55	- 0.49874	- 1.94479	0	0.003 932	0.35	7835	tags=65%, list=36%, signal=102%
GOLDRATH_ANTIGEN_RESPONSE	329	-0.3714	- 1.94272	0	0.004 009	0.36	4135	tags=33%, list=19%, signal=41%
FOURNIER_ACINAR_DEVELOPMENT_LATE_DN	18	- 0.64974	-1.9417	0.0022 42	0.004 049	0.364	4508	tags=56%, list=21%, signal=70%
REACTOME_GENE_EXPRESSION	333	- 0.37499	-1.9391	0	0.004 245	0.378	7581	tags=49%, list=35%, signal=74%
SMITH_TERT_TARGETS_UP	117	- 0.42979	-1.9385	0	0.004 229	0.378	5561	tags=41%, list=25%, signal=55%
REACTOME_RNA_POLYMERASE_III_TRANSCRIPTION_I NITIATION	27	- 0.57971	- 1.93649	0	0.004 32	0.385	7276	tags=85%, list=33%, signal=127%
WEST_ADRENOCORTICAL_TUMOR_UP	251	- 0.38353	-1.9344	0	0.004 402	0.392	6315	tags=46%, list=29%, signal=64%
MONNIER_POSTRADIATION_TUMOR_ESCAPE_UP	347	- 0.37413	- 1.93378	0	0.004 395	0.393	5548	tags=43%, list=25%, signal=56%
REACTOME_ELONGATION_AND_PROCESSING_OF_CAP PED_TRANSCRIPTS	106	-0.4328	- 1.93342	0	0.004 388	0.395	9169	tags=74%, list=42%, signal=126%

10

20

30

40

【表 2 - 1 1】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
REACTOME_SCF_SKP2_MEDIATED_DEGRADATION_OF_P27_P21	50	- 0.50927	- 1.93218	0	0.004 389	0.398	8903	tags=76%, list=41%, signal=128%
REACTOME_HIV1_TRANSCRIPTION_ELONGATION	38	- 0.53048	- 1.93192	0	0.004 399	0.401	8812	tags=79%, list=40%, signal=132%
POMEROY_MEDULLOBLASTOMA_PROGNOSIS_DN	37	- 0.53422	- 1.93093	0.0024 33	0.004 427	0.403	4941	tags=38%, list=23%, signal=49%
MOREAUX_B_LYMPHOCYTE_MATURATION_BY_TACI_DN	33	- 0.54589	- 1.93023	0	0.004 427	0.404	7463	tags=73%, list=34%, signal=110%
KEGG_ALLOGRAFT_REJECTION	16	- 0.66098	- 1.92958	0	0.004 412	0.405	1560	tags=44%, list=7%, signal=47%
REACTOME_RNA_POLYMERASE_III_TRANSCRIPTION_INITIATION_FROM_TYPE_2_PROMOTER	19	-0.6396	- 1.92587	0	0.004 549	0.412	6903	tags=84%, list=32%, signal=123%
REACTOME_INFLUENZA_LIFE_CYCLE	120	- 0.42562	- 1.92572	0	0.004 533	0.413	7779	tags=37%, list=36%, signal=57%
REACTOME_GLUCOSE_TRANSPORT	38	- 0.53865	- 1.92421	0	0.004 568	0.416	6272	tags=66%, list=29%, signal=92%
LASTOWSKA_NEUROBLASTOMA_COPY_NUMBER_UP	138	- 0.41264	- 1.92201	0	0.004 635	0.425	6262	tags=48%, list=29%, signal=67%
SCIAN_CELL_CYCLE_TARGETS_OF_TP53_AND_TP73_DN	22	- 0.61497	- 1.92181	0	0.004 627	0.426	6653	tags=77%, list=30%, signal=111%
JAIN_NFKB_SIGNALING	64	- 0.48498	- 1.92171	0	0.004 602	0.426	5141	tags=44%, list=23%, signal=57%
HORIUCHI_WTAP_TARGETS_DN	244	- 0.38519	- 1.92097	0	0.004 61	0.428	6174	tags=50%, list=28%, signal=68%
LY_AGING_MIDDLE_DN	15	- 0.67338	- 1.91334	0	0.005 071	0.456	4941	tags=73%, list=23%, signal=95%
BERENIFNO_TRANSFORMED_BY_RHOA_FOREVER_DN	29	- 0.55886	- 1.90259	0	0.005 696	0.496	3614	tags=38%, list=17%, signal=45%
BLUM_RESPONSE_TO_SALIRASIB_UP	211	- 0.38676	- 1.90016	0	0.005 837	0.508	3107	tags=26%, list=14%, signal=30%
MARTORIATI_MDM4_TARGETS_FETAL_LIVER_UP	91	- 0.43519	- 1.89764	0	0.005 936	0.515	3944	tags=31%, list=18%, signal=37%
REACTOME_DOUBLE_STRAND_BREAK_REPAIR	20	- 0.62559	- 1.89719	0.0042 55	0.005 929	0.516	5837	tags=70%, list=27%, signal=95%
KIM_GASTRIC_CANCER_CHEMOSENSITIVITY	78	-	-	0	0.006	0.522	3650	tags=38%, list=17%,

【 0 2 1 1】

10

20

30

40

【表 2 - 1 2】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
SCHLOSSER_MYC_AND_SERUM_RESPONSE_SYNERGY	29	0.44364	1.89423	0	0.006 411	0.546	4807	signal=46% tags=48%, list=22%, signal=62%
REACTOME_DUAL_INCISION_REACTION_IN_TC_NER	28	- 0.54597	- 1.88921	0	0.006 559	0.556	8812	tags=86%, list=40%, signal=143%
RICKMAN_TUMOR_DIFFERENTIATED_MODERATELY_ VS_POORLY_DN	31	- 0.53885	- 1.87914	0	0.006 947	0.577	5365	tags=58%, list=25%, signal=77%
WONG_MITOCHONDRIA_GENE_MODULE	199	- 0.38573	- 1.87702	0	0.007 099	0.587	7076	tags=44%, list=32%, signal=64%
MARTINEZ_RESPONSE_TO_TRABECTEDIN_DN	194	- 0.38764	- 1.87447	0	0.007 32	0.603	7218	tags=45%, list=33%, signal=66%
DAZARD_UV_RESPONSE_CLUSTER_G2	17	-0.6373	- 1.87043	0	0.007 678	0.624	3340	tags=53%, list=15%, signal=62%
BIOCARTA_ATM_PATHWAY	19	- 0.61513	- 1.86847	0	0.007 825	0.636	4235	tags=53%, list=19%, signal=65%
RAMALHO_STEMNESS_UP	185	-0.3878	- 1.86734	0	0.007 87	0.641	6413	tags=49%, list=29%, signal=68%
REACTOME_CDC20_PHOSPHO_APC_MEDIATED_DEGR ADATION_OF_CYCLIN_A	60	- 0.46466	-1.8658	0	0.007 931	0.644	8446	tags=65%, list=39%, signal=106%
RICKMAN_TUMOR_DIFFERENTIATED_MODERATELY_ VS_POORLY_UP	31	- 0.53885	- 1.86463	0	0.008 065	0.655	5365	tags=58%, list=25%, signal=77%
REACTOME_FORMATION_OF_THE_EARLY_ELONGATI ON_COMPLEX	29	- 0.54611	- 1.86136	0.0023 42	0.008 358	0.668	8812	tags=83%, list=40%, signal=138%
FARMER_BREAST_CANCER_CLUSTER_2	29	- 0.54068	- 1.85871	0.0067 57	0.008 61	0.677	6868	tags=76%, list=31%, signal=110%
KEGG_CELL_CYCLE	117	-0.4118	- 1.85676	0	0.008 755	0.685	6324	tags=46%, list=29%, signal=65%
REACTOME_LAGGING_STRAND_SYNTHESIS	18	- 0.61461	- 1.85531	0.0022 88	0.008 883	0.696	5837	tags=67%, list=27%, signal=91%
BIOCARTA_G2_PATHWAY	23	- 0.58922	- 1.85412	0.0021 98	0.008 988	0.704	2092	tags=39%, list=10%, signal=43%
VERNELL_RETINOBLASTOMA_PATHWAY_UP	35	- 0.51946	- 1.85328	0	0.009 063	0.709	4507	tags=46%, list=21%, signal=57%
KEGG_RNA_POLYMERASE	25	- 0.57055	- 1.85044	0.0067 11	0.009 299	0.719	8812	tags=88%, list=40%, signal=147%

【0 2 1 2】

10

20

30

40

【表 2 - 1 3】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
REACTOME_SCF_BETA_TRCP_MEDIATED_DEGRADATI ON OF EMII	46	- 0.48745	- 1.85016	0.0023 47	0.009 277	0.72	8903	tags=74%, list=41%, signal=124%
REACTOME_RNA_POL_II_CTD_PHOSPHORYLATION_A ND INTERACTION WITH CE	26	- 0.55486	- 1.84559	0.0022 47	0.009 719	0.736	8812	tags=85%, list=40%, signal=141%
REACTOME_NUCLEOTIDE_EXCISION_REPAIR	49	- 0.47111	- 1.84298	0	0.009 977	0.751	5861	tags=53%, list=27%, signal=72%
KOKKINAKIS_METHIONINE_DEPRIVATION_48HR_DN	58	- 0.46731	- 1.84273	0	0.009 966	0.753	1826	tags=21%, list=8%, signal=23%
REACTOME_PHOSPHOLIPASE_CMEDIATED_CASCADE	22	- 0.56055	- 1.83603	0	0.010 787	0.791	2299	tags=32%, list=11%, signal=36%
LINDGREN_BLADDER_CANCER_CLUSTER_1_DN	307	- 0.35516	- 1.83076	0	0.011 328	0.801	6296	tags=45%, list=29%, signal=62%
CHANG_CORE_SERUM_RESPONSE_UP	56	- 0.46454	- 1.82947	0.0023 15	0.011 397	0.807	4678	tags=39%, list=21%, signal=50%
REACTOME_CHOLESTEROL_BIOSYNTHESIS	20	-0.5839	- 1.82928	0.0021 83	0.011 366	0.808	5072	tags=55%, list=23%, signal=72%
ROYLANCE_BREAST_CANCER_16Q_COPY_NUMBER_U P	29	- 0.53691	- 1.82878	0.0045 77	0.011 37	0.81	4716	tags=48%, list=22%, signal=61%
BENPORATH_ES_2	27	- 0.55087	- 1.81839	0.0044 84	0.012 88	0.856	5302	tags=59%, list=24%, signal=78%
AMIT_EGF_RESPONSE_120_HELA	55	- 0.46762	- 1.81837	0	0.012 822	0.856	4950	tags=42%, list=23%, signal=54%
COLDREN_GEFITINIB_RESISTANCE_UP	59	- 0.45676	- 1.81786	0	0.012 833	0.859	5037	tags=49%, list=23%, signal=64%
TIAN_TNF_SIGNALING_VIA_NFKB	20	- 0.59467	- 1.81746	0.0085 84	0.012 824	0.86	2350	tags=30%, list=11%, signal=34%
REACTOME_P53_INDEPENDENT_DNA_DAMAGE_RESP ONSE	42	- 0.47587	- 1.80875	0.0069 93	0.013 778	0.877	8903	tags=71%, list=41%, signal=120%
MOREIRA_RESPONSE_TO_TSA_UP	26	- 0.54433	- 1.80792	0	0.013 807	0.879	8222	tags=73%, list=38%, signal=117%
PUJANA_BREAST_CANCER_LIT_INT_NETWORK	93	- 0.42623	- 1.80673	0	0.013 938	0.883	5554	tags=45%, list=25%, signal=60%
BONOME_OVARIAN_CANCER_POOR_SURVIVAL_DN	15	- 0.63225	- 1.80075	0.0044 94	0.014 705	0.895	4297	tags=47%, list=20%, signal=58%
REACTOME_FGFR_LIGAND_BINDING_AND_ACTIVATI	26	-	-	0.0021	0.014	0.896	2299	tags=31%, list=11%,

【表 2 - 1 4】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
ON		0.54964	1.80033	41	709			signal=34%
REACTOME_SIGNALING_BY_WNT	56	- 0.45072	- 1.79818	0	0.015 068	0.902	8903	tags=63%, list=41%, signal=105%
SENGUPTA_NASOPHARYNGEAL_CARCINOMA_UP	212	- 0.37124	- 1.79813	0	0.015 003	0.902	5102	tags=42%, list=23%, signal=54%
REACTOME_RNA_POLYMERASE_III_TRANSCRIPTION_I NITIATION FROM TYPE 3 PROMOTER	20	- 0.58695	- 1.79724	0.0022 47	0.015 046	0.904	5861	tags=75%, list=27%, signal=102%
HOFFMANN_CELL_LYMPHOMA_UP	35	- 0.51003	- 1.79645	0	0.015 047	0.904	5796	tags=51%, list=26%, signal=70%
REACTOME_TAT_MEDIATED_HIV1_ELONGATION_ARR EST AND RECOVERY	28	- 0.53564	- 1.79353	0.0021 79	0.015 392	0.912	8812	tags=79%, list=40%, signal=131%
REACTOME_E2F_MEDIATED_REGULATION_OF_DNA_R PLICATION	29	- 0.53228	- 1.7906	0	0.015 682	0.918	3495	tags=52%, list=16%, signal=61%
IVANOVA_HEMATOPOIESIS_EARLY_PROGENITOR	104	- 0.40837	- 1.7891	0	0.015 873	0.919	5399	tags=43%, list=25%, signal=57%
ELVIDGE_HIF1A_AND_HIF2A_TARGETS_UP	33	- 0.51171	- 1.78889	0	0.015 819	0.919	4163	tags=45%, list=19%, signal=56%
KEGG_NUCLEOTIDE_EXCISION_REPAIR	43	- 0.47622	- 1.78586	0.0023 42	0.016 18	0.922	5837	tags=51%, list=27%, signal=70%
RICKMAN_TUMOR_DIFFERENTIATED_WELL_VS_MOD ERATELY_DN	84	- 0.41982	- 1.78206	0	0.016 747	0.929	2380	tags=26%, list=11%, signal=29%
REACTOME_RNA_POLYMERASE_I_TRANSCRIPTION_I NITIATION	21	- 0.56692	- 1.78095	0.0067 87	0.016 864	0.929	3988	tags=43%, list=18%, signal=52%
NAKAYAMA_SOFT_TISSUE_TUMORS_PCA2_UP	75	- 0.43046	- 1.78083	0	0.016 807	0.929	5413	tags=51%, list=25%, signal=67%
YAO_TEMPORAL_RESPONSE_TO_PROGESTERONE_CL USTER 16	70	- 0.42897	- 1.77415	0	0.018 068	0.942	6043	tags=53%, list=28%, signal=73%
HOFFMANN_IMMATURE_TO_MATURE_B_LYMPHOCYT E_DN	27	- 0.53522	- 1.77305	0.0021 74	0.018 146	0.943	2076	tags=33%, list=9%, signal=37%
KEGG_PROTHASOME	42	- 0.47505	- 1.77153	0	0.018 324	0.947	8666	tags=69%, list=40%, signal=114%
REACTOME_MRNA_3_END_PROCESSING	30	- 0.52256	- 1.77128	0.0063 56	0.018 337	0.947	9277	tags=83%, list=42%, signal=144%
REACTOME_MICRORNA_BIOGENESIS	18	- 0.58374	- 1.77095	0.0041 84	0.018 324	0.947	8812	tags=94%, list=40%, signal=158%

【表 2 - 1 5】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
ELVIDGE_HIF1A_TARGETS_UP	51	- 0.46192	- 1.77012	0	0.018 407	0.95	4807	tags=47%, list=22%, signal=60%
REACTOME_TELOMERE_MAINTENANCE	35	- 0.49494	- 1.76955	0.0023 09	0.018 463	0.95	5837	tags=63%, list=27%, signal=86%
GARGALOVIC_RESPONSE_TO_OXIDIZED_PHOSPHOLIPIDS_BLUE_UP	88	- 0.40513	- 1.76935	0	0.018 438	0.951	5516	tags=41%, list=25%, signal=54%
BRUECKNER_TARGETS_OF_MIRLET7A3_DN	58	- 0.44814	- 1.76909	0	0.018 383	0.951	4542	tags=33%, list=21%, signal=41%
HENDRICKS_SMARCA4_TARGETS_UP	37	- 0.49018	- 1.76748	0	0.018 566	0.953	3413	tags=32%, list=16%, signal=38%
KEGG_BASE_EXCISION_REPAIR	31	- 0.51872	- 1.76719	0.0074 07	0.018 56	0.953	5913	tags=58%, list=27%, signal=79%
ELVIDGE_HYPOXIA_BY_DMOG_DN	48	- 0.45245	- 1.76658	0.0023 87	0.018 647	0.955	4662	tags=46%, list=21%, signal=58%
KRIGE_AMINO_ACID_DEPRIVATION	24	- 0.53613	- 1.75146	0.0022 03	0.021 451	0.971	2795	tags=38%, list=13%, signal=43%
GRAHAM_CML_QUIESCENT_VS_CML_DIVIDING_UP	18	- 0.59264	- 1.75123	0.0043 76	0.021 433	0.971	3128	tags=44%, list=14%, signal=52%
REACTOME_MRNA_SPLICING	81	- 0.42193	- 1.75088	0	0.021 433	0.971	9158	tags=75%, list=42%, signal=129%
SCIBETTA_KDM5B_TARGETS_DN	62	- -0.4322	- 1.74733	0.0023 2	0.021 984	0.974	6859	tags=60%, list=31%, signal=87%
WEST_ADRENOCOROTICAL_TUMOR_MARKERS_UP	19	- 0.57446	- 1.74619	0.0045 25	0.022 091	0.975	6004	tags=79%, list=27%, signal=109%
NAGASHIMA_EGF_SIGNALING_UP	51	- -0.4524	- 1.74565	0.0023 26	0.022 148	0.975	4328	tags=41%, list=20%, signal=51%
LY_AGING_PREMATURE_DN	22	- 0.54918	- 1.74559	0.0063 03	0.022 08	0.975	5064	tags=55%, list=23%, signal=71%
REACTOME_VIF_MEDIATED_DEGRADATION_OF_APOBEC3G	45	- 0.45878	- 1.74448	0.0022 73	0.022 25	0.975	8903	tags=69%, list=41%, signal=116%
WANG_SMARCE1_TARGETS_DN	268	- 0.34773	- 1.74421	0	0.022 213	0.975	4223	tags=29%, list=19%, signal=35%
REACTOME_RNA_POLYMERASE_I_III_AND_MITOCHONDRIAL_TRANSCRIPTION	69	- 0.42423	- 1.74093	0	0.022 727	0.978	6005	tags=52%, list=27%, signal=72%
BUYTAERT_PHOTODYNAMIC_THERAPY_STRESS_DN	485	-	-	0	0.022	0.978	5555	tags=36%, list=25%,

【表 2 - 1 6】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
		0.32386	1.74085		653			signal=47%
BROWNE_HCMV_INFECTION_24HR_UP	133	- 0.37862	- 1.74079	0	0.022 578	0.978	6153	tags=46%, list=28%, signal=63%
REACTOME_SHCMEDIATED_CASCADE	21	- 0.55619	- 1.74072	0.0088 3	0.022 505	0.978	2299	tags=29%, list=11%, signal=32%
BIOCARTA_SPRY_PATHWAY	18	- 0.57942	- 1.74034	0.0066 23	0.022 501	0.978	1759	tags=28%, list=8%, signal=30%
REACTOME_ABORTIVE_ELONGATION_OF_HIV1_TRANSCRIPT_IN_THE_ABSENCE_OF_TAT	20	-0.5675	- 1.74029	0.0135 75	0.022 422	0.978	9169	tags=90%, list=42%, signal=155%
KEGG_MISMATCH_REPAIR	22	- 0.55825	- 1.73989	0.0065 22	0.022 408	0.978	8892	tags=86%, list=41%, signal=145%
REACTOME_BASE_EXCISION_REPAIR	16	- 0.59901	- 1.73733	0.0112 87	0.022 865	0.979	6552	tags=69%, list=30%, signal=98%
DOANE_BREAST_CANCER_CLASSES_DN	29	- 0.50954	- 1.73694	0.0065 79	0.022 861	0.98	2768	tags=28%, list=13%, signal=32%
LIU_SOX4_TARGETS_DN	241	-0.3473	-1.7365	0	0.022 884	0.982	6368	tags=39%, list=29%, signal=54%
BOYLAN_MULTIPLE_MYELOMA_D_UP	83	-0.4079	- 1.73612	0	0.022 886	0.982	5005	tags=40%, list=23%, signal=51%
ZHANG_RESPONSE_TO_IKK_INHIBITOR_AND_TNF_DN	69	- 0.41797	- 1.73513	0.0052 49	0.023 017	0.983	2419	tags=29%, list=11%, signal=32%
SHIPP_DLBCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_UP	41	- 0.47072	- 1.73454	0.0085 11	0.023 047	0.983	7538	tags=76%, list=34%, signal=115%
AMIT_EGF_RESPONSE_120_MCF10A	38	-0.4803	-1.7334	0.0094 12	0.023 187	0.983	6027	tags=53%, list=28%, signal=73%
BILD_MYC_ONCOGENIC_SIGNATURE	144	- 0.37447	- 1.73285	0	0.023 232	0.983	4645	tags=42%, list=21%, signal=53%
SHEPARD_BMYB_TARGETS	58	- 0.43562	- 1.73142	0.0047 62	0.023 477	0.983	6032	tags=57%, list=28%, signal=78%
REACTOME_AUTODEGRADATION_OF_CDH1_BY_CDH1_APC	55	- 0.44901	- 1.72632	0	0.024 594	0.988	8446	tags=64%, list=39%, signal=103%
REACTOME_STABILIZATION_OF_P53	45	- 0.45328	- 1.72463	0.0023 2	0.024 85	0.988	9592	tags=76%, list=44%, signal=134%
NAGASHIMA_NRG1_SIGNALING_UP	151	- 0.36805	- 1.72373	0	0.024 899	0.988	3705	tags=31%, list=17%, signal=37%

【表 2 - 1 7】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
KANNAN_TP53_TARGETS_DN	15	- 0.60828	- 1.72134	0.0105 93	0.025 342	0.988	3065	tags=40%, list=14%, signal=46%
PAL_PRMT5_TARGETS_UP	183	- 0.35915	- 1.72133	0	0.025 257	0.988	6733	tags=49%, list=31%, signal=70%
CHEN_HOXA5_TARGETS_9HR_DN	35	-0.4805	- 1.72092	0.0022 03	0.025 25	0.988	5285	tags=46%, list=24%, signal=60%
CHEOK_RESPONSE_TO_MERCAPTOPURINE_AND_HD_MTX_DN	21	- 0.56181	- 1.71985	0.0086 96	0.025 352	0.989	5476	tags=43%, list=25%, signal=57%
BHATI_G2M_ARREST_BY_2METHOXYESTRADIOL_UP	92	- 0.40056	- 1.71724	0.0025 77	0.025 853	0.989	6433	tags=47%, list=29%, signal=66%
REACTOME_REPAIR_SYNTHESIS_OF_PATCH_27_30_BA SES LONG BY DNA_POLYMERASE	15	- 0.60537	- 1.71296	0.0155 9	0.026 861	0.991	5554	tags=60%, list=25%, signal=80%
REACTOME_RNA_POLYMERASE_I_PROMOTER_ESCAPE	18	- 0.56795	- 1.70974	0.0089 09	0.027 568	0.993	3988	tags=44%, list=18%, signal=54%
KEGG_GALACTOSE_METABOLISM	25	- 0.52012	- 1.70892	0.0090 7	0.027 67	0.993	4099	tags=40%, list=19%, signal=49%
BOYLAN_MULTIPLE_MYELOMA_C_CLUSTER_UP	29	- 0.50959	- 1.70656	0.0089 69	0.028 226	0.993	2991	tags=41%, list=14%, signal=48%
LEE_METASTASIS_AND_RNA_PROCESSING_UP	15	- 0.58996	- 1.70655	0.0229 36	0.028 129	0.993	8075	tags=80%, list=37%, signal=127%
AMIT_SERUM_RESPONSE_480_MCF10A	30	- 0.49537	- 1.70219	0.0090 09	0.029 016	0.993	3413	tags=37%, list=16%, signal=43%
MOOTHA_PGC	307	- 0.33049	- 1.70183	0	0.029 001	0.993	7069	tags=46%, list=32%, signal=67%
REACTOME_MRNA_PROCESSING	30	- 0.49898	- 1.70076	0.0024 94	0.029 224	0.994	8812	tags=80%, list=40%, signal=134%
BIOCARTA_DC_PATHWAY	22	-0.5261	-1.6975	0.0118 76	0.029 891	0.994	1999	tags=32%, list=9%, signal=35%
WILCOX_PRESPONSE_TO_ROGESTERONE_UP	112	- 0.38162	- 1.69573	0	0.030 222	0.994	5072	tags=45%, list=23%, signal=58%
BIOCARTA_P53_PATHWAY	16	- 0.57249	- 1.69552	0.0107 07	0.030 177	0.994	4124	tags=56%, list=19%, signal=69%
DAZARD_RESPONSE_TO_UV_SCC_UP	72	- 0.41147	- 1.69456	0	0.030 338	0.994	3974	tags=32%, list=18%, signal=39%
GRAHAM_CML_QUIESCENT_VS_NORMAL_QUIESCENT	72	-	-	0	0.030	0.994	6001	tags=57%, list=27%,

【 0 2 1 7】

10

20

30

40

【表 2 - 1 8】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
_UP		0.40487	1.69363		502			signal=78%
LANDIS_ERBB2_BREAST_TUMORS_324_UP	139	- 0.36646	- 1.69319	0	0.030 545	0.994	4710	tags=34%, list=22%, signal=43%
CHIARADONNA_NEOPLASTIC_TRANSFORMATION_KR AS UP	119	- 0.37042	- 1.69273	0	0.030 552	0.994	5970	tags=45%, list=27%, signal=62%
KEGG_ONE_CARBON_POOL_BY_FOLATE	15	- 0.59992	- 1.69119	0.0189 47	0.030 866	0.996	4791	tags=73%, list=22%, signal=94%
DOUGLAS_BMI1_TARGETS_UP	442	- 0.31592	- 1.68759	0	0.031 609	0.996	4215	tags=29%, list=19%, signal=35%
OLSSON_E2F3_TARGETS_DN	22	- 0.53086	- 1.68742	0.0117 37	0.031 54	0.996	4086	tags=50%, list=19%, signal=61%
WILLIAMS_ESR1_TARGETS_UP	19	- 0.55372	- 1.68326	0.0105 04	0.032 535	0.999	4662	tags=47%, list=21%, signal=60%
PENG_LEUCINE_DEPRIVATION_DN	41	- 0.45777	-1.681	0.0091 53	0.033 002	0.999	8257	tags=68%, list=38%, signal=109%
KEGG_FC_EPSILON_R1_SIGNALING_PATHWAY	76	- 0.40196	- 1.68074	0.0025 77	0.032 95	0.999	1999	tags=14%, list=9%, signal=16%
RHODES_CANCER_META_SIGNATURE	52	- 0.43623	- 1.67879	0.0049 26	0.033 501	0.999	8353	tags=65%, list=38%, signal=105%
BROWNE_HCMV_INFECTION_14HR_UP	123	- 0.36371	- 1.67858	0	0.033 458	0.999	6904	tags=49%, list=32%, signal=71%
SPIELMAN_LYMPHOBLAST_EUROPEAN_VS_ASIAN_UP	406	-0.3221	-1.6748	0	0.034 351	0.999	6365	tags=38%, list=29%, signal=53%
DIRMEIER_LMPI_RESPONSE_EARLY	49	- 0.43597	- 1.67219	0.0024 1	0.034 9	0.999	5795	tags=43%, list=26%, signal=58%
KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTI ON	202	- 0.34329	- 1.67194	0	0.034 846	0.999	3494	tags=29%, list=16%, signal=34%
BOYALT_LIVER_CANCER_SUBCLASS_G12_UP	35	- 0.47501	- 1.67121	0.0116 28	0.034 991	0.999	3831	tags=37%, list=18%, signal=45%
REACTOME_PREFOLDIN_MEDIATED_TRANSFER_OF_S UBSTRATE_TO_CCT_TRIC	21	- 0.53257	- 1.66687	0.0138 57	0.036 009	0.999	7425	tags=67%, list=34%, signal=101%
GINFESTIER_BREAST_CANCER_ZNF217_AMPLIFIED_DN	226	- 0.33501	- 1.66503	0	0.036 448	0.999	6641	tags=39%, list=30%, signal=55%
REACTOME_EGFR_DOWNREGULATION	23	- 0.51833	- 1.66296	0.0205 48	0.036 971	0.999	5650	tags=35%, list=26%, signal=47%

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
REACTOME_PYRIMIDINE_METABOLISM	20	- 0.53158	- 1.66003	0.0132 74	0.037 713	0.999	1826	tags=40%, list=8%, signal=44%
VANTVEER_BREAST_CANCER_BRCA1_UP	25	- 0.51733	- 1.65758	0.0193 13	0.038 342	0.999	5293	tags=44%, list=24%, signal=58%
KEGG_GLYCINE_SERINE_AND_THREONINE_METABOLISM	25	- 0.52385	- 1.65415	0.0170 21	0.039 205	1	3223	tags=40%, list=15%, signal=47%
CHAUHAN_RESPONSE_TO_METHOXYESTRADIOL_UP	44	-0.4478	- 1.65346	0.0091 74	0.039 29	1	7597	tags=66%, list=35%, signal=101%
ACEVEDO_LIVER_CANCER_WITH_H3K9ME3_DN	57	- 0.41475	- 1.65304	0 0	0.039 293	1	5071	tags=44%, list=23%, signal=57%
PARENT_MTOR_SIGNALING_DN	34	-0.4655	- 1.65233	0.0182 65	0.039 453	1	3138	tags=32%, list=14%, signal=38%
ACEVEDO_NORMAL_TISSUE_ADJACENT_TO_LIVER_TUMOR_DN	278	- 0.32185	- 1.65157	0 0	0.039 53	1	5186	tags=31%, list=24%, signal=40%
AMUNDSON_GENOTOXIC_SIGNATURE	76	- 0.39026	- 1.64944	0.0026 32	0.040 202	1	2400	tags=26%, list=11%, signal=29%
WANG_METHYLATED_IN_BREAST_CANCER	28	- 0.48962	- 1.64877	0.0045 56	0.040 307	1	5766	tags=50%, list=26%, signal=68%
SHEPARD_CRUSH_AND_BURN_MUTANT_DN	138	- 0.36039	- 1.64233	0 0	0.042 291	1	6287	tags=46%, list=29%, signal=65%
TONKS_TARGETS_OF_RUNX1_RUNXITI_FUSION_MONOCYTE_UP	160	- 0.34785	- 1.64217	0 0	0.042 209	1	5564	tags=44%, list=25%, signal=58%
SMIRNOV_CIRCULATING_ENDOTHELIOCYTES_IN_CANCER_UP	134	- 0.35747	- 1.64134	0 0	0.042 323	1	1881	tags=22%, list=9%, signal=24%
GEORGES_CELL_CYCLE_MIR192_TARGETS	55	- 0.41585	- 1.63727	0.0090 09	0.043 643	1	6178	tags=51%, list=28%, signal=71%
VANHARANTA_UTERINE_FIBROID_WITH_7Q_DELETION UP	55	- 0.42177	- 1.63642	0.0054 64	0.043 819	1	8221	tags=60%, list=38%, signal=96%
DACOSTA_UV_RESPONSE_VIA_ERCC3_UP	263	-0.327	- 1.63636	0 0	0.043 695	1	6170	tags=39%, list=28%, signal=54%
REACTOME_GLOBAL_GENOMIC_NER	33	- 0.46089	- 1.63605	0.0117 1	0.043 666	1	5837	tags=55%, list=27%, signal=74%
REACTOME_SYNTHESIS_OF_GPI_ANCHORED_PROTEINS	23	- 0.50984	- 1.63599	0.0155 56	0.043 558	1	5332	tags=39%, list=24%, signal=52%
KEGG_PORPHYRIN_AND_CHLOROPHYLL_METABOLISM	23	-	-	0.0137	0.043	1	2880	tags=39%, list=13%,

【表 2 - 2 0】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
M		0.50638	1.63489	93	736			signal=45%
TURASHVILI_BREAST_NORMAL_DUCTAL_VS_LOBULAR_UP	43	- 0.44105	- 1.63472	0.0023 47	0.043 678	1	4159	tags=30%, list=19%, signal=37%
HSC_MATURE_FETAL	21	- 0.52771	- 1.63326	0.0205 48	0.044 137	1	6006	tags=57%, list=27%, signal=79%
STEIN_ESRRA_TARGETS_RESPONSIVE_TO_ESTROGEN_UP	21	- 0.51886	- 1.63258	0.0279 57	0.044 203	1	1226	tags=33%, list=6%, signal=35%
SHEPARD_CRUSH_AND_BURN_MUTANT_UP	125	- 0.35859	- 1.62825	0.0027 55	0.045 705	1	4532	tags=39%, list=21%, signal=49%
REACTOME_METABOLISM_OF_VITAMINS_AND_COFACTORS	40	- 0.44337	- 1.62546	0.0161 29	0.046 522	1	3969	tags=40%, list=18%, signal=49%
VANTVEER_BREAST_CANCER_ESR1_DN	176	- 0.33964	- 1.62501	0.0027 7	0.046 595	1	4524	tags=31%, list=21%, signal=38%
REACTOME_METABOLISM_OF_NUCLEOTIDES	64	- 0.40412	- 1.62145	0	0.047 924	1	4372	tags=42%, list=20%, signal=53%
SUNG_METASTASIS_STROMA_UP	89	- 0.37528	- 1.62073	0.0078 95	0.048 055	1	5198	tags=43%, list=24%, signal=56%
WEIGEL_OXIDATIVE_STRESS_BY_HNE_AND_H2O2	34	- 0.44773	- 1.61991	0.0095 24	0.048 239	1	5259	tags=32%, list=24%, signal=43%
BIOCARTA_PROTEASOME_PATHWAY	18	- 0.54104	- 1.61938	0.0195 23	0.048 296	1	9592	tags=83%, list=44%, signal=148%
KEGG_AMINO_SUGAR_AND_NUCLEOTIDE_SUGAR_METABOLISM	41	- 0.44482	- 1.61843	0.0150 38	0.048 492	1	4255	tags=37%, list=19%, signal=45%
PELLICCIOTTA_HDAC_IN_ANTIGEN_PRESENTATION_UP	57	- 0.40746	- 1.61747	0.0047 51	0.048 706	1	8257	tags=53%, list=38%, signal=84%
LANDIS_ERBB2_BREAST_PRENEOPLASTIC_UP	21	- 0.52713	- 1.61628	0.0330 4	0.049 018	1	5507	tags=48%, list=25%, signal=64%
SHEPARD_BMYB_MORPHOLINO_DN	151	- 0.34543	- 1.61546	0	0.049 17	1	4797	tags=38%, list=22%, signal=49%
YEGNASUBRAMANIAN_PROSTATE_CANCER	91	-0.3681	- 1.61505	0.0024 1	0.049 198	1	5394	tags=38%, list=25%, signal=51%
KIM_WT1_TARGETS_UP	183	- 0.34191	- 1.61475	0	0.049 181	1	4812	tags=33%, list=22%, signal=42%
MOHANKUMAR_TLX1_TARGETS_UP	325	- 0.31306	- 1.61407	0	0.049 308	1	5689	tags=37%, list=26%, signal=49%

【表 2 - 2 1】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
AMUNDSON_RESPONSE_TO_ARSENITE	159	- 0.34303	- 1.61281	0	0.049 661	1	5229	tags=31%, list=24%, signal=41%
KEGG_PANTOTHENATE_AND_COA_BIOSYNTHESIS	15	- 0.55962	- 1.61174	0.0340 14	0.049 863	1	1891	tags=27%, list=9%, signal=29%
KEGG_P53_SIGNALING_PATHWAY	61	- 0.40197	- 1.60772	0.0024 94	0.051 363	1	5516	tags=46%, list=25%, signal=61%
RIZ_ERYTHROID_DIFFERENTIATION_CCNE1	38	- 0.44707	- 1.60742	0.0168 27	0.051 366	1	4135	tags=39%, list=19%, signal=49%
HAHTOLA_MYCOSIS_FUNGOIDES_CD4_UP	52	- 0.41002	- 1.60651	0.0090 7	0.051 599	1	2819	tags=27%, list=13%, signal=31%
MAHAJAN_RESPONSE_TO_IL1A_DN	53	- 0.41564	- 1.60627	0.0068 34	0.051 554	1	4977	tags=34%, list=23%, signal=44%
KORKOLA_EMBRYONIC_CARCI_NOMA_VS_SEMINOMA_UP	19	- 0.52884	- 1.60556	0.0171 31	0.051 738	1	2193	tags=37%, list=10%, signal=41%
REACTOME_RNA_POLYMERASE_III_TRANSCRIPTION	32	- 0.45961	- 1.60364	0.0139 86	0.052 373	1	6005	tags=66%, list=27%, signal=90%
KEGG_RNA_DEGRADATION	50	- 0.42032	- 1.60343	0.0091 53	0.052 308	1	7202	tags=64%, list=33%, signal=95%
CHEN_HOXA5_TARGETS_9HR_UP	157	- 0.33909	- 1.60172	0	0.052 912	1	6240	tags=38%, list=29%, signal=53%
NAKAMURA_METASTASIS	35	- 0.45954	- 1.60126	0.0145 63	0.052 967	1	4215	tags=34%, list=19%, signal=42%
MORI_MATURE_B_LYMPHOCYTE_DN	56	- 0.41156	- 1.60091	0.0090 5	0.052 991	1	4737	tags=41%, list=22%, signal=52%
REACTOME_METABOLISM_OF_MRNA	42	- 0.43055	- 1.60047	0.0091 32	0.053 032	1	7211	tags=60%, list=33%, signal=89%
KEGG_N_GLYCAN_BIOSYNTHESIS	40	-0.4325	- 1.59985	0.0158 01	0.053 124	1	6311	tags=50%, list=29%, signal=70%
JEON_SMAD6_TARGETS_DN	18	- 0.54236	- 1.59558	0.0267 86	0.054 948	1	5348	tags=50%, list=24%, signal=66%
CLASPER_LYMPHATIC_VESSELS_DURING_METASTASIS_UP	17	- 0.55069	- 1.59427	0.0305 68	0.055 381	1	2913	tags=41%, list=13%, signal=47%
AMIT_EGF_RESPONSE_480_HELA	136	- 0.34576	- 1.59203	0.0025 91	0.056 209	1	3870	tags=29%, list=18%, signal=36%
THEILGAARD_NEUTROPHIL_AT_SKIN_WOUND_UP	65	-	-	0.0047	0.056	1	5493	tags=37%, list=25%,

【 0 2 2 1】

10

20

30

40

【表 2 - 2 2】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
		0.38845	1.59076	62	647			signal=49%
MILL_PSEUDOPODIA_HAPTOTAXIS_UP	438	- 0.29623	- 1.58848	0	0.057 541	1	6731	tags=38%, list=31%, signal=54%
KEGG_SELENOAMINO_ACID_METABOLISM	20	- 0.52272	-1.5861	0.0261 44	0.058 513	1	7217	tags=65%, list=33%, signal=97%
KORKOLA_EMBRYONAL_CARCINOMA_UP	36	- 0.44176	- 1.58582	0.0116 01	0.058 493	1	6328	tags=47%, list=29%, signal=66%
FONTAINE_FOLLICULAR_THYROID_ADENOMA_UP	57	- 0.40056	- 1.58505	0.0153 45	0.058 613	1	3065	tags=30%, list=14%, signal=35%
RIZ_ERYTHROID_DIFFERENTIATION	71	- 0.38675	- 1.58081	0.0095 92	0.060 491	1	4993	tags=37%, list=23%, signal=47%
REACTOME_PYRUVATE_METABOLISM_AND_TCA_CYCLE	32	- 0.44675	- 1.57427	0.0213 78	0.063 52	1	7132	tags=53%, list=33%, signal=79%
WANG_RESPONSE_TO_ANDROGEN_UP	23	- 0.48805	- 1.57297	0.0249 43	0.063 962	1	6045	tags=61%, list=28%, signal=84%
KEGG_STEROID_BIOSYNTHESIS	16	- 0.54002	- 1.57091	0.0272 54	0.064 832	1	5329	tags=56%, list=24%, signal=74%
JAEGER_METASTASIS_UP	37	- 0.43504	- 1.57013	0.0108 7	0.065 086	1	3001	tags=30%, list=14%, signal=34%
LEONARD_HYPOXIA	29	- 0.46322	- 1.56924	0.0176 99	0.065 355	1	2233	tags=28%, list=10%, signal=31%
STEIN_ESRRA_TARGETS	401	- 0.29457	- 1.56577	0	0.066 972	1	5116	tags=30%, list=23%, signal=39%
JIANG_TIP30_TARGETS_DN	23	- 0.49545	- 1.56502	0.0288 89	0.067 216	1	5302	tags=52%, list=24%, signal=69%
KEGG_AUTOIMMUNE_THYROID_DISEASE	23	- 0.49272	- 1.56463	0.0309 05	0.067 23	1	1694	tags=30%, list=8%, signal=33%
BIOCARTA_INTEGRIN_PATHWAY	38	- 0.42913	- 1.56369	0.0143 54	0.067 59	1	5869	tags=32%, list=27%, signal=43%
CREIGHTON_ENDOCRINE_THERAPY_RESISTANCE_2	255	- 0.30936	- 1.56175	0	0.068 38	1	4105	tags=28%, list=19%, signal=34%
HEDENFALK_BREAST_CANCER_BRCA1_VS_BRCA2	25	- 0.47245	- 1.55993	0.0330 97	0.069 118	1	3574	tags=40%, list=16%, signal=48%
MAHADEVAN_IMATINIB_RESISTANCE_UP	16	- 0.54102	- 1.55993	0.0428 27	0.068 943	1	3130	tags=38%, list=14%, signal=44%

【 0 2 2 2】

10

20

30

40

【表 2 - 2 3】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
MUELLER_METIYLATED_IN_GLIOMASTOMA	30	- 0.45712	-1.5577	0.0207 37	0.069 831	1	3426	tags=40%, list=16%, signal=47%
BOYALT_LIVER_CANCER_SUBCLASS_G23_UP	42	- 0.42862	-1.5574	0.0116 01	0.069 814	1	6673	tags=60%, list=30%, signal=85%
REACTOME_RNA_POLYMERASE_I_PROMOTER_CLEARANCE	33	- 0.43867	-	0.0215 05	0.070 054	1	3988	tags=36%, list=18%, signal=44%
BIOCARTA_MCM_PATHWAY	18	- 0.51775	-	0.0300 43	0.070 423	1	7652	tags=89%, list=35%, signal=137%
CASTELLANO_NRAS_TARGETS_UP	66	- 0.37914	-	0.0096 62	0.070 421	1	1258	tags=15%, list=6%, signal=16%
BILD_E2F3_ONCOGENIC_SIGNATURE	172	- 0.32638	-	0	0.070 248	1	3202	tags=24%, list=15%, signal=28%
WEINMANN_ADAPTATION_TO_HYPOXIA_DN	32	- 0.43747	-	0.0324 07	0.070 646	1	2418	tags=38%, list=11%, signal=42%
KAPOSI_LIVER_CANCER_POOR_SURVIVAL_UP	16	- 0.54639	-	0.0435 73	0.071 408	1	4016	tags=31%, list=18%, signal=38%
PASQUALUCCI_LYMPHOMA_BY_GC_STAGE_UP	246	- 0.31478	-	0	0.071 317	1	3587	tags=26%, list=16%, signal=30%
REACTOME_POST_TRANSLATIONAL_PROTEIN_MODIFICATION	37	- 0.43412	-	0.0172 79	0.071 446	1	6520	tags=46%, list=30%, signal=65%
CAFFAREL_RESPONSE_TO_THC_DN	21	- 0.50052	-1.5485	0.0307 02	0.073 139	1	5819	tags=52%, list=27%, signal=71%
REACTOME_G2_M_TRANSITION	71	- 0.36948	-1.5485	0.0131 23	0.072 959	1	8210	tags=52%, list=38%, signal=83%
GAJATE_RESPONSE_TO TRABECTEDIN_DN	15	- 0.53965	-	0.0467 09	0.075 117	1	7028	tags=67%, list=32%, signal=98%
STEIN_ESRRA_TARGETS_UP	298	-0.3001	-	0	0.075 021	1	4541	tags=27%, list=21%, signal=33%
MOOTHA_VOXPPOS	79	- 0.37294	-	0.0099 75	0.074 979	1	9439	tags=54%, list=43%, signal=95%
SWEET_KRAS_TARGETS_UP	17	- 0.52812	-1.5415	0.0339 7	0.075 917	1	3664	tags=29%, list=17%, signal=35%
KERLEY_RESPONSE_TO_CISPLATIN_UP	35	- 0.43382	-	0.0210 28	0.076 598	1	1839	tags=29%, list=8%, signal=31%
WINTER_HYPOXIA_UP	70	-	-1.5381	0.0126	0.077	1	2904	tags=29%, list=13%,

【 0 2 2 3】

10

20

30

40

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
		0.37486		58	262			signal=33%
HELLER_HDAC_TARGETS_DN	222	-0.30689	-1.53637	0	0.077	1	2837	tags=22%, list=13%, signal=25%
NAKAMURA_METASTASIS_MODEL_UP	32	-0.43733	-1.5362	0.0217	0.077	1	3784	tags=31%, list=17%, signal=38%
TSENG_IRS1_TARGETS_UP	110	-0.3502	-1.53609	0.0054	0.077	1	5390	tags=42%, list=25%, signal=55%
SAGIV_CD24_TARGETS_DN	36	-0.42214	-1.53213	0.0147	0.079	1	2265	tags=25%, list=10%, signal=28%
ONDER_CDH1_TARGETS_1_DN	127	-0.33147	-1.53188	0.0052	0.079	1	4540	tags=31%, list=21%, signal=40%
REACTOME_RNA_POLYMERASE_I_CHAIN_ELONGATI ON	21	-0.50165	-1.53108	0.0413	0.080	1	8169	tags=62%, list=37%, signal=99%
SLEBOS_HEAD_AND_NECK_CANCER_WITH_HPV_UP	59	-0.38344	-1.53046	0.0097	0.080	1	6770	tags=54%, list=31%, signal=78%
GENTILE_UV_LOW_DOSE_DN	17	-0.50817	-1.52488	0.0546	0.083	1	3800	tags=47%, list=17%, signal=57%
DACOSTA_UV_RESPONSE_VIA_ERCC3_COMMON_UP	48	-0.40433	-1.52453	0.0309	0.083	1	3115	tags=29%, list=14%, signal=34%
GUTIERREZ_MULTIPLE_MYELOMA_DN	29	-0.44814	-1.52383	0.0258	0.083	1	6150	tags=52%, list=28%, signal=72%
NAKAMURA_TUMOR_ZONE_PERIPHERAL_VS_CENTRA L_UP	209	-0.31195	-1.52226	0	0.084	1	6207	tags=41%, list=28%, signal=57%
GENTILE_UV_LOW_DOSE_UP	17	-0.50817	-1.5203	0.0459	0.085	1	3800	tags=47%, list=17%, signal=57%
KEGG_MELANOMA	70	-0.37406	-1.51908	0.0202	0.085	1	3471	tags=21%, list=16%, signal=25%
GAZDA_DIAMOND_BLACKFAN_ANEMIA_PROGENITO R_DN	48	-0.39891	-1.51767	0.0115	0.086	1	7491	tags=65%, list=34%, signal=98%
HEDENFALK_BREAST_CANCER_BRACX_UP	15	-0.53281	-1.51618	0.0418	0.087	1	4411	tags=33%, list=20%, signal=42%
PYEON_CANCER_HEAD_AND_NECK_VS_CERVICAL_U P	129	-0.32837	-1.51464	0.0028	0.087	1	5555	tags=40%, list=25%, signal=54%
BOHN_PRIMARY_IMMUNODEFICIENCY_SYNDROM_UP	30	-0.44959	-1.5146	0.0350	0.087	1	6557	tags=60%, list=30%, signal=86%

【表 2 - 2 5】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
KEGG_PRION_DISEASES	31	- 0.43419	- 1.50972	0.0297 24	0.090 708	1	3648	tags=29%, list=17%, signal=35%
SHAFFER_IRF4_TARGETS_IN_ACTIVATED_DENDRITIC_CELL	59	- 0.37847	- 1.50914	0.0101 27	0.090 858	1	3877	tags=34%, list=18%, signal=41%
REACTOME_FRS2MEDIATED_CASCADE	26	- 0.45398	- 1.50573	0.0348 84	0.092 953	1	2299	tags=27%, list=11%, signal=30%
REACTOME_METABOLISM_OF_PROTEINS	168	- 0.31495	- 1.50419	0.0027 1	0.093 745	1	7289	tags=32%, list=33%, signal=47%
SENESE_HDAC3_TARGETS_DN	380	- 0.28679	- 1.50414	0 0	0.093 55	1	4912	tags=31%, list=22%, signal=39%
SHAFFER_IRF4_TARGETS_IN_MYELOMA_VS_MATURE_B_LYMPHOCYTE	92	- 0.34437	- 1.50159	0.0024 57	0.094 919	1	6045	tags=42%, list=28%, signal=58%
VANTVEER_BREAST_CANCER_METASTASIS_DN	87	- 0.34766	-1.5009	0.0052 77	0.095 133	1	6885	tags=47%, list=31%, signal=68%
BROWNE_HCMV_INFECTION_18HR_UP	150	- 0.32006	-1.5001	0 0	0.095 376	1	5934	tags=39%, list=27%, signal=53%
CHO_NR4A1_TARGETS	21	- 0.48094	-1.4997	0.0390 8	0.095 394	1	2408	tags=24%, list=11%, signal=27%
LANDIS_ERBB2_BREAST_TUMORS_65_UP	21	- 0.47553	- 1.49725	0.0419 43	0.096 736	1	180	tags=14%, list=1%, signal=14%
SUNG_METASTASIS_STROMA_DN	37	- 0.42164	- 1.49584	0.0330 19	0.097 521	1	4568	tags=46%, list=21%, signal=58%
KEGG_GLIOMA	60	- 0.37437	- 1.49578	0.0289 86	0.097 335	1	3471	tags=22%, list=16%, signal=26%
LOCKWOOD_AMPLIFIED_IN_LUNG_CANCER	146	- 0.32124	- 1.49433	0.0051 81	0.098 139	1	8242	tags=52%, list=38%, signal=83%
SANA_RESPONSE_TO_IFNG_DN	69	-0.3646	- 1.49259	0.0120 77	0.099 073	1	6606	tags=46%, list=30%, signal=66%
GARGALOVIC_RESPONSE_TO_OXIDIZED_PHOSPHOLIPIDS_RED_UP	15	- 0.54264	- 1.49204	0.0446 81	0.099 25	1	4810	tags=60%, list=22%, signal=77%
WONG_PROTEASOME_GENE_MODULE	45	- 0.39346	- 1.49194	0.0239 81	0.099 068	1	6478	tags=44%, list=30%, signal=63%
REACTOME_SIGNALING_TO_RAS	25	- 0.45679	- 1.49192	0.0277 78	0.098 842	1	5189	tags=28%, list=24%, signal=37%
HOFFMANN_PRE_BI_TO_LARGE_PRE_BII_LYMPHOCYTO	18	-0.4987	-	0.0415	0.099	1	3181	tags=44%, list=15%,

【 0 2 2 5】

10

20

30

40

【表 2 - 2 6】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
E_UP			1.49113	7	205			signal=52%
KOKKINAKIS_METHIONINE_DEPRIVATION_96HR_DN	68	- 0.35949	- 1.48846	0.0069 28	0.100 901	1	4780	tags=32%, list=22%, signal=41%
FLECHNER_BIOPSY_KIDNEY_TRANSPLANT_OK_VS_D ONOR_DN	20	- 0.48691	- 1.48792	0.0582 75	0.101 095	1	3648	tags=45%, list=17%, signal=54%
FULCHER_INFLAMMATORY_RESPONSE_LECTIN_VS_L PS_UP	425	- 0.27997	- 1.48736	0	0.101 318	1	4807	tags=31%, list=22%, signal=39%
ALONSO_METASTASIS_UP	139	-0.3209	- 1.48195	0	0.104 95	1	6027	tags=37%, list=28%, signal=51%
SEKI_INFLAMMATORY_RESPONSE_LPS_UP	75	- 0.35431	-1.4819	0.0155 84	0.104 744	1	2819	tags=25%, list=13%, signal=29%
ROZANOV_MMP14_TARGETS_SUBSET	31	- 0.43222	- 1.48066	0.0312 5	0.105 382	1	3313	tags=35%, list=15%, signal=42%
LIU_TARGETS_OF_VMYB_VS_CMYB_DN	36	- 0.42063	- 1.48011	0.0393 12	0.105 606	1	1816	tags=28%, list=8%, signal=30%
YAO_TEMPORAL_RESPONSE_TO_PROGLISTURONE_CL USTER_5	28	- 0.44457	- 1.48001	0.0456 62	0.105 435	1	1428	tags=21%, list=7%, signal=23%
NAM_FXYD5_TARGETS_DN	15	- 0.51417	- 1.47977	0.0512 82	0.105 388	1	6150	tags=53%, list=28%, signal=74%
HAMAI_APOPTOSIS_VIA_TRAIL_DN	110	- 0.33103	- 1.47919	0.0053 76	0.105 494	1	4416	tags=29%, list=20%, signal=36%
ZHOU_INFLAMMATORY_RESPONSE_LIVE_UP	337	- 0.28625	- 1.47794	0	0.106 193	1	4884	tags=31%, list=22%, signal=39%
ENK_UV_RESPONSE_EPIDERMIS_UP	247	- 0.29261	- 1.47656	0	0.107 043	1	4059	tags=30%, list=19%, signal=36%
JAERVINEN_AMPLIFIED_IN_LARYNGEAL_CANCER	31	- 0.43216	- 1.47452	0.0382 78	0.108 221	1	4458	tags=42%, list=20%, signal=53%
RLACTOME_METABOLISM_OF_CARBOHYDRATES	107	-0.3253	- 1.47395	0.0025 84	0.108 405	1	6272	tags=43%, list=29%, signal=60%
REACTOME_RNA_POLYMERASE_I_TRANSCRIPTION_T ERMINATION	19	- 0.49033	- 1.47272	0.0372 09	0.109 075	1	5229	tags=42%, list=24%, signal=55%
BIOCARTA_NKT_PATHWAY	27	- 0.45331	- 1.47259	0.0462 96	0.108 961	1	1001	tags=26%, list=5%, signal=27%
CTHIN_BREAST_CANCER_COPY_NUMBER_UP	19	- 0.48619	- 1.46993	0.0562 77	0.110 731	1	4901	tags=47%, list=22%, signal=61%

【 0 2 2 6】

10

20

30

40

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
BHATI_G2M_ARREST_BY_2METHOXYXYESTRADIOL_DN	93	- 0.33428	- 1.46694	0.0109 59	0.112 645	1	5711	tags=38%, list=26%, signal=51%
KEGG_PURINE_METABOLISM	144	- 0.31203	- 1.46666	0.0027 1	0.112 641	1	6525	tags=46%, list=30%, signal=65%
KEGG_CYSSTEINE_AND_METHIONINE_METABOLISM	30	- 0.43055	- 1.46474	0.0412 84	0.113 858	1	4170	tags=33%, list=19%, signal=41%
KORKOLA_YOLK_SAC_TUMOR_UP	16	- 0.49958	- 1.46269	0.0597 7	0.115 226	1	7367	tags=50%, list=34%, signal=75%
SCHLOSSER_SERUM_RESPONSE_AUGMENTED_BY_MY_C	89	- 0.33937	- 1.46002	0.0160 43	0.116 993	1	8503	tags=63%, list=39%, signal=102%
BIOCARTA_P53IIPPOXIA_PATIIWAY	21	-0.4684	- 1.45891	0.0579 4	0.117 743	1	4235	tags=43%, list=19%, signal=53%
NUNODA_RESPONSE_TO_DASATINIB_IMATINIB_UP	28	- 0.43895	- 1.45731	0.0600 46	0.118 697	1	3952	tags=39%, list=18%, signal=48%
LEE_LIVER_CANCER_SURVIVAL_DN	105	- 0.33219	- 1.45577	0.0108 11	0.119 604	1	7770	tags=49%, list=35%, signal=75%
SHAFER_IRF4_TARGETS_IN_PLASMA_CELL_VS_MAT URE_B_LYMPHOCYTE	62	- 0.36088	- 1.45474	0.0216 35	0.120 228	1	4008	tags=31%, list=18%, signal=37%
PYLON_HPV_POSITIVE_TUMORS_UP	58	- 0.36375	- 1.45304	0.0260 05	0.121 441	1	6468	tags=48%, list=30%, signal=68%
LINDGREN_BLADDER_CANCER_WITH_LOH_IN_CHR9Q	87	- 0.33999	- 1.45283	0.0097 32	0.121 316	1	7167	tags=49%, list=33%, signal=73%
ENK_UV_RESPONSE_KERATINOCYTE_UP	442	- 0.27461	- 1.45076	0 0	0.122 851	1	6664	tags=36%, list=30%, signal=50%
MCCLUNG_DELTA_FOSB_TARGETS_2WK	43	- 0.39175	-1.4494	0.0420 56	0.123 754	1	4790	tags=37%, list=22%, signal=48%
VARELA_ZMPSTE24_TARGETS_UP	38	- 0.39554	- 1.44606	0.0334 93	0.126 183	1	3737	tags=37%, list=17%, signal=44%
ZHAN_MULTIPLE_MYELOMA_MS_UP	34	- 0.41283	- 1.44598	0.0411 9	0.125 977	1	836	tags=18%, list=4%, signal=18%
ZUCCHI_METASTASIS_DN	21	- 0.45835	- 1.44406	0.0569 48	0.127 368	1	3297	tags=29%, list=15%, signal=34%
TOOKER_GEMCITABINE_RESISTANCE_DN	108	- 0.32502	- 1.44285	0.0189 7	0.128 182	1	5342	tags=41%, list=24%, signal=54%
WEIGEL_OXIDATIVE_STRESS_RESPONSE	25	-	-	0.0618	0.128	1	6203	tags=48%, list=28%,

【表 2 - 2 8】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
REACTOME_MRNA_SPLICING_MINOR_PATHWAY	36	0.44035	1.44226	34	403			signal=67%
SCIAN_INVERSED_TARGETS_OF_TP53_AND_TP73_DN	24	- 0.40293	- 1.44226	0.035	0.128 133	1	8812	tags=72%, list=40%, signal=121%
YAO_TEMPORAL_RESPONSE_TO_PROGESTERONE_CL USTER_10	62	- 0.44228	- 1.43996	0.0508 47	0.129 878	1	2384	tags=25%, list=11%, signal=28%
GESERICK_TERT_TARGETS_DN	19	- 0.35741	- 1.43816	0.0392 16	0.131 16	1	8291	tags=58%, list=38%, signal=93%
SYED ESTRADIOL_RESPONSE	15	- 0.46809	- 1.43387	0.0638 77	0.134 421	1	5445	tags=58%, list=25%, signal=77%
REACTOME_CITRIC_ACID_CYCLE	18	- 0.50256	- 1.43354	0.0756 88	0.134 435	1	1119	tags=27%, list=5%, signal=28%
GARGALOVIC_RESPONSE_TO_OXIDIZED_PHOSPHOLIP IDS_MAGENTA_UP	19	- 0.48351	- 1.43321	0.0720 72	0.134 449	1	9447	tags=78%, list=43%, signal=137%
CAFFAREL_RESPONSE_TO_THC_24HR_5_UP	23	- 0.46937	- 1.43264	0.0728 93	0.134 647	1	5056	tags=47%, list=23%, signal=62%
TOOKER_RESPONSE_TO_BEXAROTENE_UP	108	- 0.44394	- 1.43258	0.0678 34	0.134 415	1	6027	tags=48%, list=28%, signal=66%
NIKOLSKY_BREAST_CANCER_17Q11_Q21_AMPLICON	74	- 0.32502	- 1.4324	0.0174 13	0.134 261	1	5342	tags=41%, list=24%, signal=54%
DACOSTA_UV_RESPONSE_VIA_ERCC3_XPCS_UP	15	- 0.34376	- 1.43141	0.0298 51	0.134 823	1	4558	tags=32%, list=21%, signal=41%
ZHOU_INFLAMMATORY_RESPONSE_FIMA_UP	363	- 0.49893	- 1.42982	0.0795 23	0.136 028	1	2092	tags=20%, list=10%, signal=22%
FONTAINE_PAPILLARY_THYROID_CARCINOMA_DN	61	- 0.27303	- 1.4289	0	0.136 663	1	4767	tags=28%, list=22%, signal=36%
REACTOME_E2F_TRANSCRIPTIONAL_TARGETS_AT_G1 S	19	- 0.35621	- 1.42837	0.0394 43	0.136 889	1	3080	tags=25%, list=14%, signal=29%
LUND_SILENCED_BY_METHYLATION	15	- 0.47601	- 1.42739	0.0539 91	0.137 516	1	3495	tags=47%, list=16%, signal=56%
WANG_RESPONSE_TO_FORSKOLIN_UP	17	- 0.49663	- 1.42579	0.0816 78	0.138 766	1	3242	tags=27%, list=15%, signal=31%
SESTO_RESPONSE_TO_UV_C4	17	- 0.48715	- 1.42558	0.0711 11	0.138 668	1	6045	tags=59%, list=28%, signal=81%
		- 0.47406	- 1.42534	0.0881 67	0.138 601	1	6342	tags=65%, list=29%, signal=91%

【表 2 - 2 9】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
STARK_PREFRONTAL_CORTEX_22Q11_DELETION_DN	438	- 0.27075	- 1.42474	0	0.138 849	1	6692	tags=36%, list=31%, signal=51%
BHATTACHARYA_EMBRYONIC_STEM_CELL	62	- 0.35682	- 1.42423	0.0401 89	0.138 977	1	2402	tags=24%, list=11%, signal=27%
BIOCARTA_SHH_PATHWAY	15	-0.4984	- 1.42376	0.0777 78	0.139 189	1	1205	tags=27%, list=6%, signal=28%
REACTOME_CONVERSION_FROM_APC_CDC20_TO_AP C_CDH1_IN_LATE_ANAPHASE	16	- 0.48592	-1.4233	0.0875 27	0.139 328	1	7138	tags=56%, list=33%, signal=83%
RICKMAN_TUMOR_DIFFERENTIATED_WELL_VS_POOR LY_DN	269	-0.2814	- 1.42256	0.0033 11	0.139 667	1	2935	tags=19%, list=13%, signal=22%
ABE_VEGFA_TARGETS_2HR	16	- 0.49199	- 1.42146	0.0781 25	0.140 43	1	3857	tags=31%, list=18%, signal=38%
MULLIGHAN_MLL_SIGNATURE_1_DN	190	-0.2899	- 1.41882	0.0029 33	0.142 577	1	3575	tags=25%, list=16%, signal=29%
NIKOLSKY_BREAST_CANCER_11Q12_Q14_AMPLICON	116	- 0.31321	- 1.41616	0.0142 05	0.144 815	1	5767	tags=38%, list=26%, signal=51%
RICKMAN_HEAD_AND_NECK_CANCER_D	21	- 0.46169	- 1.41475	0.0778 03	0.145 862	1	2856	tags=33%, list=13%, signal=38%
HELLER_SILENCED_BY_METHYLATION_DN	82	- 0.32818	- 1.41447	0.0408 65	0.145 871	1	3138	tags=24%, list=14%, signal=28%
REACTOME_LOSS_OF_NLP_FROM_MITOTIC_CENTROS OMES	52	- 0.36399	- 1.41391	0.0455 64	0.146 124	1	7600	tags=44%, list=35%, signal=68%
GAUSSMANN_MLL_AF4_FUSION_TARGETS_D_UP	29	-0.4174	- 1.41092	0.0642 2	0.148 574	1	125	tags=10%, list=1%, signal=10%
LIAO_HAVE_SOX4_BINDING_SITES	34	- 0.39227	- 1.40797	0.0502 39	0.151 067	1	3422	tags=29%, list=16%, signal=35%
REACTOME_G1_PHASE	15	- 0.49867	- 1.40719	0.0679 82	0.151 451	1	5167	tags=47%, list=24%, signal=61%
KFEGG_HUNTINGTONS_DISEASE	151	- 0.29949	- 1.40388	0.0191 26	0.154 37	1	9317	tags=54%, list=43%, signal=94%
DUTTA_APOPTOSIS_VIA_NFKB	27	- 0.42005	- 1.40305	0.0671 46	0.154 958	1	5445	tags=44%, list=25%, signal=59%
ZHANG_ANTIVIRAL_RESPONSE_TO_RIBAVIRIN_DN	38	- 0.38083	- 1.40241	0.0620 53	0.155 326	1	611	tags=13%, list=3%, signal=14%
CHUNG_BLISTER_CYTOTOXICITY_UP	103	-	-	0.0233	0.155	1	6392	tags=48%, list=29%,

【 0 2 2 9】

10

20

30

40

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
STREICHER_LSM1_TARGETS_DN	16	- 0.31972 0.47911	- 1.40192 1.40091	0.0818 18	0.156 243	1	3808	signal=67% tags=44%, list=17%, signal=53%
GAL_LEUKEMIC_STEM_CELL_DN	179	- 0.28739	- 1.39983	0.0060 42	0.156 978	1	5413	tags=37%, list=25%, signal=49%
KANG_CISPLATIN_RESISTANCE_UP	15	- 0.48395	- 1.39942	0.0916 67	0.157 037	1	4105	tags=40%, list=19%, signal=49%
KEGG_JAK_STAT_SIGNALING_PATHWAY	125	- 0.30333	- 1.39847	0.0145 35	0.157 726	1	2071	tags=17%, list=9%, signal=18%
NATSUME_RESPONSE_TO_INTERFERON_BETA_UP	60	- 0.34866	- 1.39702	0.0278 42	0.158 946	1	2299	tags=20%, list=11%, signal=22%
MULLIGHAN_MLL_SIGNATURE_2_DN	222	- 0.28409	- 1.39699	0.0030 86	0.158 673	1	3580	tags=25%, list=16%, signal=29%
GARGALOVIC_RESPONSE_TO_OXIDIZED_PHOSPHOLIPIDS_GREEN_UP	16	- 0.49774	- 1.39631	0.1008 77	0.159 064	1	3226	tags=44%, list=15%, signal=51%
AMIT_DELAYED_EARLY_GENES	17	-0.4758	- 1.39595	0.1122 88	0.159 133	1	4812	tags=41%, list=22%, signal=53%
DING_LUNG_CANCER_EXPRESSION_BY_COPY_NUMBER	87	- 0.32447	- 1.39372	0.0190 48	0.161 13	1	7128	tags=46%, list=33%, signal=68%
LIU_CDX2_TARGETS_UP	34	- 0.38811	- 1.39227	0.0726 87	0.162 389	1	1640	tags=26%, list=7%, signal=29%
KEGG_TYPE_1_DIABETES_MELLITUS	20	- 0.44458	- 1.39179	0.0725 27	0.162 603	1	1967	tags=30%, list=9%, signal=33%
CROMER_TUMORIGENESIS_UP	40	- 0.37638	- 1.39164	0.0586 96	0.162 456	1	4323	tags=35%, list=20%, signal=44%
DEURIG_T_CELL_PROLYMPHOCYTIC_LEUKEMIA_UP	283	- 0.27378	- 1.39152	0.0085 71	0.162 236	1	6302	tags=40%, list=29%, signal=56%
HEIDENBLAD_AMPLICON_12P11_12_DN	20	- 0.45761	-1.3913	0.0848 21	0.162 175	1	4939	tags=40%, list=23%, signal=52%
OUYANG_PROSTATE_CANCER_PROGRESSION_DN	20	- 0.44637	-1.3894	0.0790 07	0.163 869	1	5543	tags=50%, list=25%, signal=67%
JAZAG_TGFB1_SIGNALING_UP	87	- 0.32574	- 1.38754	0.0445 54	0.165 713	1	3619	tags=25%, list=17%, signal=30%
INGA_TP53_TARGETS	15	-0.4848	- 1.38524	0.1010 1	0.167 718	1	2331	tags=40%, list=11%, signal=45%

【表 2 - 3 1】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
MANALO_HYPOXIA_UP	172	- 0.29333	-1.3817	0.0115 61	0.171 048	1	3766	tags=28%, list=17%, signal=33%
XU_HGF_SIGNALING_NOT_VIA_AKT1_48HR_DN	16	- 0.48281	- 1.38157	0.0887 95	0.170 853	1	5908	tags=63%, list=27%, signal=86%
TURASHVILI_BREAST_LOBULAR_CARCINOMA_VS_DUCTAL_NORMAL_DN	69	- 0.33538	- 1.37992	0.0390 24	0.172 203	1	294	tags=10%, list=1%, signal=10%
NIKOLSKY_BREAST_CANCER_12Q13_Q21_AMPLICON	34	-0.3841	- 1.37926	0.0778 03	0.172 586	1	4173	tags=32%, list=19%, signal=40%
KEGG_ARGININE_AND_PROLINE_METABOLISM	47	-0.3636	- 1.37822	0.0707 76	0.173 393	1	3132	tags=30%, list=14%, signal=35%
REACTOME_SYNTHESIS_OF_GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL	16	- 0.47441	- 1.37695	0.1115 88	0.174 442	1	6172	tags=44%, list=28%, signal=61%
REACTOME_INACTIVATION_OF_APC_VIA_DIRECT_INHIBITION_OF_THE_APCOMPLEX	17	- 0.46918	- 1.37676	0.0888 38	0.174 322	1	7138	tags=53%, list=33%, signal=78%
ST_B_CELL_ANTIGEN_RECEPTOR	36	- 0.38174	- 1.37647	0.0581 4	0.174 34	1	3812	tags=28%, list=17%, signal=34%
GAUSSMANN_MLL_AF4_FUSION_TARGETS_F_DN	27	- 0.40752	- 1.37623	0.0956 52	0.174 294	1	2411	tags=30%, list=11%, signal=33%
KYNG_DNA_DAMAGE_BY_4NQO	17	- 0.45897	- 1.37587	0.1073 68	0.174 363	1	1732	tags=24%, list=8%, signal=26%
SU_TESTIS	62	- 0.34375	- 1.37581	0.0466 83	0.174 071	1	5348	tags=42%, list=24%, signal=55%
BROWNE_HCMV_INFECTION_2HR_UP	28	-0.407	- 1.37524	0.0820 4	0.174 391	1	3970	tags=32%, list=18%, signal=39%
REACTOME_UNFOLDED_PROTEIN_RESPONSE	18	- 0.45886	- 1.37523	0.1152 17	0.174 075	1	7114	tags=50%, list=32%, signal=74%
IVANOVA_HEMATOPOIESIS_INTERMEDIATE_PROGENITOR	29	- 0.41056	- 1.37523	0.0685 22	0.173 752	1	4404	tags=41%, list=20%, signal=52%
SENESE_HDAC1_TARGETS_UP	344	- 0.26657	- 1.37487	0 0	0.173 825	1	5259	tags=31%, list=24%, signal=40%
KEGG_PRIMARY_IMMUNODEFICIENCY	35	- 0.39068	- 1.37478	0.0776 94	0.173 6	1	3963	tags=31%, list=18%, signal=38%
AMIT_EGF_RESPONSE_60_MCF10A	33	- 0.38962	-1.3747	0.0709 53	0.173 354	1	4397	tags=36%, list=20%, signal=45%
MORI_PLASMA_CELL_UP	30	-	-1.3743	0.0725	0.173	1	6311	tags=43%, list=29%,

【 0 2 3 1 】

10

20

30

40

【表 2 - 3 2】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
		0.40091		62	49			signal=61%
FERRANDO_T_ALL_WITH_MLL_FNL_FUSION_DN	67	- 0.33108	- 1.37238	0.0292 68	0.175 255	1	6337	tags=48%, list=29%, signal=67%
DOANE_RESPONSE_TO_ANDROGEN_DN	203	- 0.27826	- 1.36984	0.0111 73	0.177 593	1	3806	tags=27%, list=17%, signal=32%
SA_TRKA_RECEPTOR	15	- 0.48644	- 1.36971	0.1085 97	0.177 44	1	1839	tags=20%, list=8%, signal=22%
YAMASHITA_LIVER_CANCER_WITH_EPCAM_UP	38	- 0.37132	- 1.36872	0.0627 91	0.178 152	1	5931	tags=29%, list=27%, signal=40%
JAZAG_TGFB1_SIGNALING_VIA_SMAD4_DN	51	- 0.35582	- 1.36801	0.0586 85	0.178 675	1	3297	tags=24%, list=15%, signal=28%
LIAO_METASTASIS	395	- 0.26093	- 1.36768	0 0	0.178 704	1	4016	tags=24%, list=18%, signal=29%
CAIRO_HEPATOBLASTOMA_UP	172	-0.2862	-1.3674	0.0054 5	0.178 707	1	5649	tags=38%, list=26%, signal=51%
HAHTOLA_SEZARY_SYNDROM_DN	32	- 0.39169	- 1.36721	0.0840 71	0.178 597	1	1716	tags=22%, list=8%, signal=24%
PROVENZANI_METASTASIS_UP	153	- 0.29047	-1.3665	0.0028 49	0.179 207	1	4855	tags=27%, list=22%, signal=34%
REACTOME_SIGNALING_TO_FRKS	32	- 0.39226	- 1.36647	0.0919 81	0.178 911	1	5189	tags=22%, list=24%, signal=29%
KEGG_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	105	- 0.30522	- 1.36542	0.0197 53	0.179 829	1	9520	tags=50%, list=43%, signal=87%
NIKOLSKY_BREAST_CANCER_6P24_P22_AMPLICON	16	- 0.45905	- 1.36526	0.1111 11	0.179 648	1	1518	tags=19%, list=7%, signal=20%
REACTOME_CENTROSOME_MATURATION	59	- 0.34139	- 1.36439	0.0422 54	0.180 28	1	7600	tags=44%, list=35%, signal=67%
GAUSSMANN_MLL_AF4_FUSION_TARGETS_G_DN	27	-0.4069	- 1.36369	0.0898 62	0.180 75	1	3580	tags=33%, list=16%, signal=40%
REACTOME_ELECTRON_TRANSPORT_CHAIN	60	- 0.34238	- 1.36326	0.0480 55	0.180 9	1	9617	tags=52%, list=44%, signal=92%
PUIFFE_INVASION_INHIBITED_BY_ASCITES_UP	62	- 0.33929	- 1.36065	0.0535 28	0.183 487	1	7069	tags=52%, list=32%, signal=76%
ALCALAY_AML_BY_NPM1_LOCALIZATION_DN	160	- 0.29008	- 1.35956	0.0202 31	0.184 411	1	5407	tags=39%, list=25%, signal=51%

【 0 2 3 2】

10

20

30

40

【表 2 - 3 3】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
REACTOME_DOWNSTREAM_SIGNALING_OF_ACTIVATED_FGFR	41	-0.3687	- 1.35949	0.0733 94	0.184 19	1	2299	tags=20%, list=11%, signal=22%
GRADE_COLON_VS_RECTAL_CANCER_DN	35	- 0.38706	-1.3576	0.0925 11	0.186 036	1	2486	tags=26%, list=11%, signal=29%
REACTOME_ZINC_TRANSPORTATION	17	- 0.46026	- 1.35645	0.1125 27	0.187 041	1	6501	tags=65%, list=30%, signal=92%
REACTOME_CHEMOKINE_RECEPTORS_BIND_CHEMOKINES	44	- 0.36558	- 1.35641	0.0693 78	0.186 759	1	561	tags=18%, list=3%, signal=19%
NOUZOVA_TRETINOIN_AND_H4_ACETYLATION	97	- 0.31025	- 1.35591	0.0246 91	0.186 986	1	6672	tags=43%, list=30%, signal=62%
PUIFFE_INVASION_INHIBITED_BY_ASCITES_DN	113	- 0.29756	- 1.35527	0.0326 63	0.187 369	1	5450	tags=29%, list=25%, signal=39%
IZADPANAH_STLM_CELL_ADIPOSE_VS_BONE_UP	92	- 0.31369	- 1.35476	0.0419 95	0.187 571	1	1854	tags=18%, list=8%, signal=20%
BERENJENO_TRANSFORMED_BY_RHOA_REVERSIBLY_DN	28	- 0.40651	- 1.35346	0.0840 71	0.188 776	1	4723	tags=43%, list=22%, signal=55%
RUGO_RESPONSE_TO_4NQO	17	- 0.45897	- 1.35286	0.1214 13	0.189 087	1	1732	tags=24%, list=8%, signal=26%
ZHAN_V2_LATE_DIFFERENTIATION_GENES	30	- 0.39762	- 1.35079	0.1108 55	0.191 172	1	829	tags=13%, list=4%, signal=14%
KEGG_BLADDER_CANCER	37	- 0.37393	-1.3502	0.0837 32	0.191 564	1	3471	tags=30%, list=16%, signal=35%
AMIT_SERUM_RESPONSE_40_MCF10A	26	-0.4153	- 1.34967	0.0833 33	0.191 81	1	3857	tags=38%, list=18%, signal=47%
BASSO_B_LYMPHOCYTE_NETWORK	117	- 0.29903	- 1.34907	0.0264 55	0.192 131	1	5766	tags=41%, list=26%, signal=55%
KEGG_GAP_JUNCTION	72	- 0.31987	- 1.34898	0.0572 92	0.191 883	1	5612	tags=31%, list=26%, signal=41%
DAIRKEE_CANCER_PRONE_RESPONSE_BPA	42	- 0.36551	- 1.34701	0.0847 06	0.193 933	1	6558	tags=45%, list=30%, signal=64%
ZHAN_MULTIPLE_MYELOMA_UP	45	- 0.35975	- 1.34516	0.0680 27	0.195 909	1	3138	tags=22%, list=14%, signal=26%
GARGALOVIC_RESPONSE_TO_OXIDIZED_PHOSPHOLIPIDS_GREEN_DN	20	- 0.43645	- 1.34499	0.1053 76	0.195 757	1	4644	tags=35%, list=21%, signal=44%
LI_AMPLIFIED_IN_LUNG_CANCER	151	-	-	0.0329	0.195	1	6606	tags=36%, list=30%,

【 0 2 3 3】

10

20

30

40

【表 2 - 3 4】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
		0.28645	1.34477	67	69			signal=51%
NIKOLSKY_BREAST_CANCER_16P13_AMPLICON	80	- 0.31761	- 1.34287	0.0417 75	0.197 573	1	6234	tags=35%, list=28%, signal=49%
DORN_ADENOVIRUS_INFECTION_12HR_DN	25	- 0.41072	- 1.33962	0.1154 73	0.201 171	1	2099	tags=24%, list=10%, signal=27%
MATTIOLI_MGUS_VS_PCL	80	- 0.31539	- 1.33921	0.0456 85	0.201 32	1	8124	tags=59%, list=37%, signal=93%
BROWNE_HCMV_INFECTION_48HR_UP	152	- 0.28689	- 1.33802	0.0219 18	0.202 463	1	3838	tags=26%, list=18%, signal=31%
REACTOME_METAL_ION_SLC_TRANSPORTERS	23	- 0.41626	- 1.33738	0.1135 27	0.202 874	1	6501	tags=57%, list=30%, signal=80%
KEGG_FRUCTOSE_AND_MANNOSE_METABOLISM	31	- 0.38665	- 1.33501	0.0957 94	0.205 558	1	3136	tags=29%, list=14%, signal=34%
ALONSO_METASTASIS_FMT_UP	28	- 0.39044	- 1.3334	0.1040 19	0.207 212	1	5944	tags=46%, list=27%, signal=64%
GAZDA_DIAMOND_BLACKFAN_ANEMIA_MYELOID_U P	24	- 0.40873	- 1.33216	0.1208 79	0.208 481	1	4222	tags=38%, list=19%, signal=46%
DAZARD_RESPONSE_TO_UV_NHEK_UP	131	- 0.28972	- 1.33138	0.032 178	0.209 178	1	3553	tags=24%, list=16%, signal=29%
BROCKE_APOPTOSIS_REVERSED_BY_IL6	114	- 0.29444	- 1.33029	0.0326 09	0.210 268	1	6301	tags=41%, list=29%, signal=58%
BARIS_THYROID_CANCER_DN	52	- 0.34946	- 1.33019	0.0707 07	0.210 052	1	4070	tags=23%, list=19%, signal=28%
WOOD_EBV_EBNA1_TARGETS_UP	98	- 0.30448	- 1.32962	0.0598 96	0.210 401	1	3669	tags=28%, list=17%, signal=33%
REACTOME_TIGHT_JUNCTION_INTERACTIONS	28	- 0.38824	- 1.32925	0.1027 4	0.210 475	1	3920	tags=36%, list=18%, signal=43%
REACTOME_REGULATION_OF_ORNITHINE_DECARBO XYLASE	46	- 0.35349	- 1.32563	0.0982 8	0.214 739	1	8423	tags=63%, list=38%, signal=102%
GALLUZZI_PERMEABILIZE_MITOCHONDRIA	35	- 0.36982	- 1.32513	0.0917 23	0.214 976	1	6001	tags=49%, list=27%, signal=67%
YAO_TEMPORAL_RESPONSE_TO_PROGESTERONE_CL USTER_4	15	- 0.46388	- 1.32412	0.1377 78	0.215 918	1	4888	tags=47%, list=22%, signal=60%
BENPORATH_ES_CORE_NINE_CORRELATED	91	- 0.30699	- 1.32391	0.0358 06	0.215 83	1	6570	tags=43%, list=30%, signal=61%

【 0 2 3 4】

10

20

30

40

【表 2 - 3 5】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
KEGG_UBIQUITIN_MEDIATED_PROTEOLYSIS	118	-0.296	- 1.32145	0.0332 41	0.218 606	1	6495	tags=36%, list=30%, signal=52%
TANAKA_METHYLATED_IN_ESOPHAGEAL_CARCI NO_MA	75	- 0.31873	- 1.32092	0.0658 23	0.218 944	1	4644	tags=32%, list=21%, signal=40%
RUGO_RESPONSE_TO_GAMMA_RADIATION	39	- 0.36072	- 1.32014	0.0985 58	0.219 606	1	1156	tags=15%, list=5%, signal=16%
XU_HGF_SIGNALING_NOT_VIA_AKT1_6HR	22	- 0.42546	- 1.31901	0.1293 86	0.220 615	1	4729	tags=45%, list=22%, signal=58%
WATTEL_AUTONOMOUS_THYROID_ADENOMA_UP	18	- 0.43983	- 1.31832	0.1381 44	0.221 187	1	2366	tags=33%, list=11%, signal=37%
ENK_UV_RESPONSE_EPIDERMIS_DN	439	- 0.24798	- 1.31748	0.0038 02	0.221 869	1	4819	tags=28%, list=22%, signal=35%
REACTOME_IRS_RELATED_EVENTS	71	- 0.32099	- 1.31736	0.0545 02	0.221 69	1	2338	tags=17%, list=11%, signal=19%
CREIGHTON_ENDOCRINE_THERAPY_RESISTANCE_1	388	- 0.25131	- 1.31344	0.0067 57	0.226 775	1	5469	tags=32%, list=25%, signal=43%
OUellet_OVARIAN_CANCER_INVASIVE_VS_LMP_UP	105	- 0.29715	- 1.31312	0.0535 71	0.226 785	1	7051	tags=42%, list=32%, signal=62%
BIOCARTA_BAD_PATHWAY	24	- 0.40186	- 1.31268	0.1215 93	0.226 992	1	1346	tags=13%, list=6%, signal=13%
REACTOME_SYNTHESIS_AND_INTERCONVERSION_OF NUCLEOTIDE_DI_AND_TRIPHOSPHATES	16	- 0.45318	- 1.31235	0.1450 89	0.227 095	1	6525	tags=63%, list=30%, signal=89%
WANG_CISPLATIN_RESPONSE_AND_XPC_UP	106	- 0.29389	- 1.31204	0.0522 19	0.227 107	1	5908	tags=36%, list=27%, signal=49%
REACTOME_FURTHER_PLATELET_RELEASE	20	-0.4288	- 1.31183	0.1206 5	0.227 023	1	196	tags=10%, list=1%, signal=10%
FLOTHO_PEDIATRIC_ALL_THERAPY_RESPONSE_DN	20	- 0.43318	- 1.31001	0.1476 09	0.229 14	1	3841	tags=45%, list=18%, signal=55%
HAMAI_APOPTOSIS_VIA_TRAIL_UP	292	- 0.25561	- 1.30972	0.0063 49	0.229 122	1	4889	tags=30%, list=22%, signal=38%
REACTOME_PHOSPHORYLATION_OF_THE_APC	15	- 0.46234	- 1.30877	0.1208 79	0.229 99	1	7138	tags=53%, list=33%, signal=79%
MULLIGHAN_NPM1_MUTATED_SIGNATURE_1_UP	211	- 0.26002	- 1.30758	0.0122 32	0.231 218	1	5047	tags=29%, list=23%, signal=38%
SWEET_LUNG_CANCER_KRAS_UP	442	-	-	0.0036	0.232	1	4747	tags=24%, list=22%,

【 0 2 3 5】

10

20

30

40

【表 2 - 3 6】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
		0.24403	1.30611	5	909			signal=30%
KYNG_DNA_DAMAGE_BY_GAMMA_RADIATION	39	- 0.36072	- 1.30513	0.1235 43	0.233 851	1	1156	tags=15%, list=5%, signal=16%
SHAFFER_IRF4_MULTIPLE_MYELOMA_PROGRAM	35	- 0.37016	-1.3046	0.1064 3	0.234 189	1	6001	tags=49%, list=27%, signal=67%
BIOCARTA_PTDINS_PATHWAY	22	- 0.41198	- 1.30389	0.1152 94	0.234 737	1	2241	tags=14%, list=10%, signal=15%
RICKMAN_TUMOR_DIFFERENTIATED_WELL_VS_POOR LY UP	175	- 0.27162	- 1.30354	0.0279 33	0.234 776	1	5781	tags=36%, list=26%, signal=49%
CUI_TCF21_TARGETS_DN	31	- 0.37395	- 1.30352	0.1076 23	0.234 418	1	3639	tags=39%, list=17%, signal=46%
JI_RESPONSE_TO_FSH_DN	44	- 0.33997	-1.3032	0.0982 14	0.234 476	1	3310	tags=23%, list=15%, signal=27%
CAIRO_LIVER_DEVELOPMENT_UP	143	- 0.27913	- 1.30278	0.0257 07	0.234 671	1	4590	tags=29%, list=21%, signal=37%
REACTOME_BRANCHED_CHAIN_AMINO_ACID_CATAB OLISM	16	- 0.44355	- 1.30278	0.1566	0.234 293	1	4842	tags=38%, list=22%, signal=48%
REACTOME_PYRUVATE_METABOLISM	15	- 0.46909	- 1.29992	0.1630 9	0.238 032	1	7030	tags=60%, list=32%, signal=88%
WINTER_HYPOXIA_METAGENE	190	- 0.26745	- 1.29969	0.0173 91	0.237 964	1	3203	tags=23%, list=15%, signal=26%
CHIESLER_BRAIN_QTL_CIS	68	- 0.31806	- 1.29925	0.0712 53	0.238 215	1	4520	tags=29%, list=21%, signal=37%
AIGNER_ZEB1_TARGETS	28	- 0.38265	- 1.29922	0.1247 11	0.237 876	1	1207	tags=21%, list=6%, signal=23%
KYNG_DNA_DAMAGE_UP	89	- 0.30141	- 1.29871	0.0829 15	0.238 145	1	2200	tags=18%, list=10%, signal=20%
WU_APOPTOSIS_BY_CDKN1A_VIA_TP53	28	- 0.39139	- 1.29864	0.1381 58	0.237 897	1	6063	tags=57%, list=28%, signal=79%
SESTO_RESPONSE_TO_UV_C0	95	- 0.30145	- 1.29724	0.0588 24	0.239 49	1	8116	tags=47%, list=37%, signal=75%
KLGG_PEROXISOME	68	- 0.30916	- 1.29473	0.0704 23	0.242 697	1	4526	tags=32%, list=21%, signal=41%
MARKEY_RB1_CHRONIC_LOF_UP	106	- 0.29214	- 1.29443	0.0458 02	0.242 773	1	7461	tags=51%, list=34%, signal=77%

【 0 2 3 6】

10

20

30

40

【表 2 - 3 7】

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADINGEDGE
SIII_SPARC_TARGETS_UP	19	- 0.41989	- 1.29379	0.1294 64	0.243 35	1	2615	tags=26%, list=12%, signal=30%
REACTOME_GLYCONEOGENESIS	26	- 0.39437	- 1.29324	0.1252 75	0.243 803	1	4616	tags=35%, list=21%, signal=44%
REACTOME_DOWN_STREAM_SIGNAL_TRANSDUCTIO N	35	- 0.35619	- 1.29187	0.1130 43	0.245 395	1	1359	tags=9%, list=6%, signal=9%
AMUNDSON_POOR_SURVIVAL_AFTER_GAMMA_RADI ATION_2G	127	- 0.28342	- 1.29163	0.0336 13	0.245 292	1	4962	tags=30%, list=23%, signal=38%

【 0 2 3 7】

10

20

30

40

【表 3 - 1】

表 3

遺伝子シンボル	遺伝子タイトル	p 値 (相互作用)	Foxp3Cre Sema/IgG	Nrp1 f/f x Foxp3 Cre Sema/IgG
Pf4	血小板因子 4(platelet factor 4)	0.00009599	1.545577742	1.009665494
Ntn4	ネトリン 4(netrin 4)	0.00000305	1.352296007	1.172896253
Gbp1	グアニル酸結合タンパク質 1(guanylate binding protein 1)	6.342E-12	1.355007012	1.16096399
Sox6	SRY ボックスを含む遺伝子 6(SRY-box containing gene 6)	0.0030674	1.443495801	0.972584119
Zbtb20	ジンクフィンガーおよび BTB ドメインを含む 20(zinc finger and BTB domain containing 20)	0.000001211	1.331835698	1.082126493
Zbtb4	ジンクフィンガーおよび BTB ドメインを含む 4(zinc finger and BTB domain containing 4)	3.64E-09	1.255748611	1.082036273
S1pr1	スフィンゴシン-1-リン酸受容体 1(sphingosine-1-phosphate receptor 1)	2.009E-09	1.204529765	1.087154433
Selp	セレクチン、血小板(selectin, platelet)	0.00203095	1.300955862	1.043575103
Klf2	Kruppel 様因子 2(肺)(Kruppel-like factor 2 (lung))	3.671E-10	1.285134665	1.106060488
Capn3	カルパイン 3(calpain 3)	0.0108324	1.269066665	1.041143567
P2rx7	プリン受容体 PX2、リガンド依存性イオンチャネル、7(purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7)	2.507E-09	1.254283105	1.062555789
Trat1	T 細胞受容体関連膜貫通アダプター 1(T cell receptor associated transmembrane adaptor 1)	2.002E-08	1.247496664	1.115014034
Klf3	Kruppel 様因子 3(塩基性)(Kruppel-like factor 3 (basic))	5.206E-08	1.242062467	1.097946279
Irf7	インターフェロン制御因子 7(interferon regulatory factor 7)	0.00003947	1.237559009	0.966178546
Sox4	SRY ボックスを含む遺伝子 4(SRY-box containing gene 4)	0.00026928	1.218840832	1.069164455
Socs3	サイトカインシグナル抑制因子 3(suppressor of cytokine signaling 3)	0.000002704	1.197338018	1.043479784

【表 3 - 2】

遺伝子シンボル	遺伝子タイトル	p 値 (相互作用)	Foxp3Cre Sema/IgG	Nrp1 f/f x Foxp3 Cre Sema/IgG
Ccr2	ケモカイン(C-C モチーフ)受容体 2(chemokine (C-C motif) receptor 2)	0.00088497	1.194479665	0.944542178
Cd86	CD86 抗原(CD86 antigen)	0.00095436	1.15990739	1.030515958
Csf1	コロニー刺激因子 1(マクロファージ)(colony stimulating factor 1 (macrophage))	0.00018162	1.139043688	0.983451169
Tnfrsf22	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー22(tumor necrosis factor receptor superfamily, member 22)	0.029579	1.135265234	0.999410833
Sele	セレクチン、内皮細胞(selectin, endothelial cell)	0.0611511	1.126037378	0.944445866
Bcl2	B 細胞白血病/リンパ腫 2(B-cell leukemia/lymphoma 2)	0.000001345	1.200530854	1.036517252
Ikzf2	IKAROS ファミリージンクフィンガー2(IKAROS family zinc finger 2)	0.00539308	1.107958566	1.029981749
Gpr83	G タンパク質共役受容体 83(G protein-coupled receptor 83)	7.928E-08	1.103769744	1.035679639
Nt5e	5'ヌクレオチダーゼ、ecto(5' nucleotidase, ecto)	7.126E-11	1.115728599	1.042848886
Pias1	活性化 STAT1 のタンパク質阻害剤(protein inhibitor of activated STAT 1)	7.054E-07	1.229350664	1.051712288
Pde2a	ホスホジエステラーゼ 2A、cGMP 刺激性(phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated)	7.143E-07	1.220384964	1.136825712
Samhd1	SAM ドメインおよび HD ドメイン、1(SAM domain and HD domain, 1)	8.458E-08	1.272371694	1.088937279
Rasgrp1	RAS グアニル放出タンパク質 1(RAS guanyl releasing protein 1)	8.266E-10	1.132277662	1.052465539
Sell	セレクチン、リンパ球(selectin, lymphocyte)	1.864E-08	1.119421504	1.040753113
Ifngr1	インターフェロンγ受容体 1(interferon gamma receptor 1)	8.769E-10	1.139298486	1.054594449
Il6st	インターロイキン 6 シグナル伝達物質(interleukin 6 signal transducer)	3.242E-08	1.124112682	1.034980857

【表 3 - 3】

遺伝子シンボル	遺伝子タイトル	p 値 (相互作用)	Foxp3Cre Sema/IgG	Nrp1 f/f x Foxp3 Cre Sema/IgG
Socs2	サイトカインシグナル抑制因子 2(suppressor of cytokine signaling 2)	0.0013229	1.165949171	1.089333063
Klrc1	キラー細胞レクチン様受容体サブファミリー C、メンバー 1(killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1)	0.0231404	0.839384892	0.958292103
Il4	インターロイキン 4(interleukin 4)	0.0456394	0.884948909	0.98797694
Il5	インターロイキン 5(interleukin 5)	0.0200249	0.866258511	0.967564087
Il17a	インターロイキン 17A(interleukin 17A)	0.0892365	0.876784798	0.980557686
Irf4	インターフェロン制御因子 4(interferon regulatory factor 4)	0.0016611	0.865581808	0.914790588
Irf8	インターフェロン制御因子 8(interferon regulatory factor 8)	1.627E-07	0.815320769	0.902639353
Casp3	カスパーゼ 3(caspase 3)	0.00101569	0.768470287	0.986386473
Lag3	リンパ球活性化遺伝子 3(lymphocyte-activation gene 3)	0.00074161	0.81582849	0.989058591
Pax3	ペアードボックス遺伝子 3(paired box gene 3)	0.0100615	0.824486955	1.028467901
Rorc	RAR 関連オーファン受容体 γ (RAR-related orphan receptor gamma)	0.0478239	0.82459593	1.058781462
Eomes	エオメソデルミンホモログ(アフリカツメガエル)(eomesodermin homolog (Xenopus laevis))	0.00329137	0.825853154	0.958256158
Il9	インターロイキン 9(interleukin 9)	0.0597995	0.83668632	0.99566111
Klf1	Kruppel 様因子 1(赤血球)(Kruppel-like factor 1 (erythroid))	0.00007452	0.845474592	1.076712711
Il17re	インターロイキン 17 受容体 E(interleukin 17 receptor E)	0.037236	0.886991987	1.012299813
Bcl7c	B 細胞 CLL/リンパ腫 7C(B-cell CLL/lymphoma 7C)	0.000004747	0.894221815	1.066003659
Alcam	活性化白血球細胞接着分子(activated leukocyte cell adhesion molecule)	0.0031076	0.793324239	0.957458743
Neddd4	神経前駆細胞発現、発生的下方制御 4(neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4)	0.000002309	0.807636853	1.058385025

【表 3 - 4】

遺伝子シンボル	遺伝子タイトル	p 値 (相互作用)	Foxp3Cre Sema/IgG	Nrp1 f/f x Foxp3 Cre Sema/IgG
Vegfc	血管内皮細胞増殖因子 C(vascular endothelial growth factor C)	0.00171023	0.769523371	1.052111027
Spry2	sprouty ホモログ 2(シヨウバエ)(sprouty homolog 2 (Drosophila))	0.00029642	0.760398934	0.91800687
Rgs16	G タンパク質シグナル伝達の調節因子 16(regulator of G-protein signaling 16)	0.00002906	0.77611906	0.915180984
Serpine2	セリン(またはシステイン)ペプチダーゼ阻害剤、クレイド E、メンバー 2(serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 2)	3.332E-09	0.69502868	0.83449972
Bcat1	分岐鎖アミノトランスフェラーゼ 1、サイトゾル(branched chain aminotransferase 1, cytosolic)	0.000004398	0.737455065	0.96648127
Pdgfb	血小板由来増殖因子、B ポリペプチド(platelet derived growth factor, B polypeptide)	0.00004784	0.656164641	0.857934741
Il3	インターロイキン 3(interleukin 3)	0.00004922	0.594682398	0.78279364

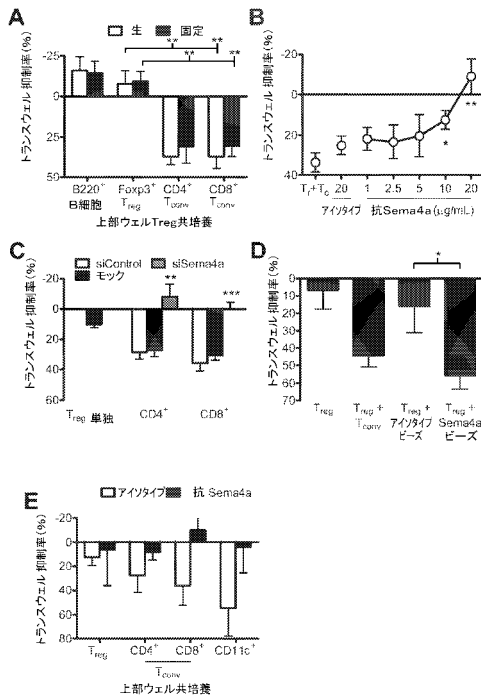
10

20

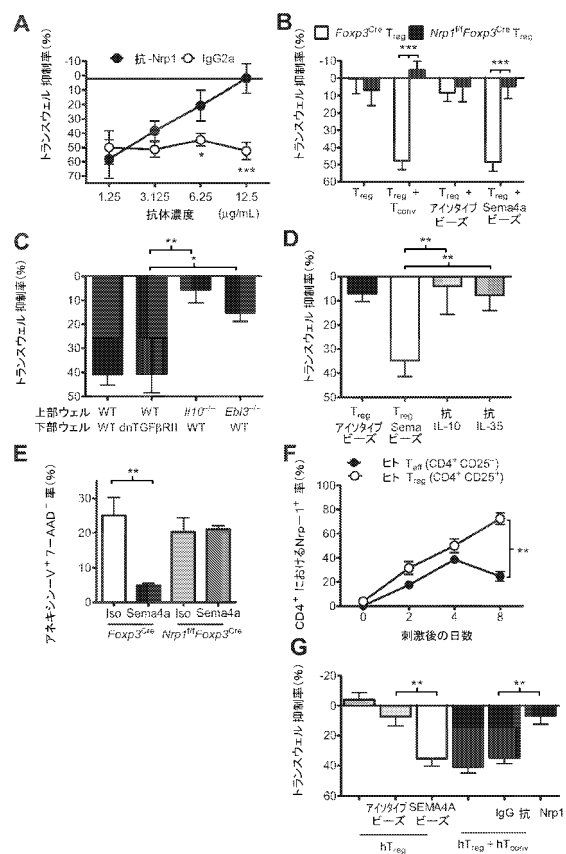
30

40

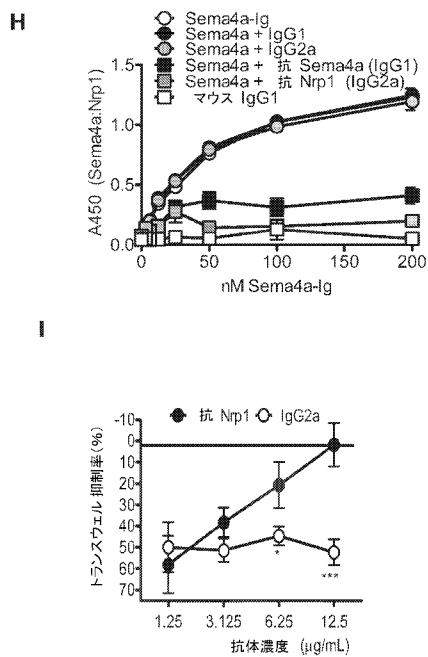
【図 1】



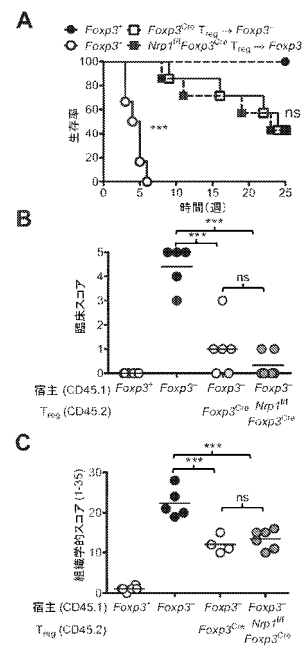
【図 2 - 1】



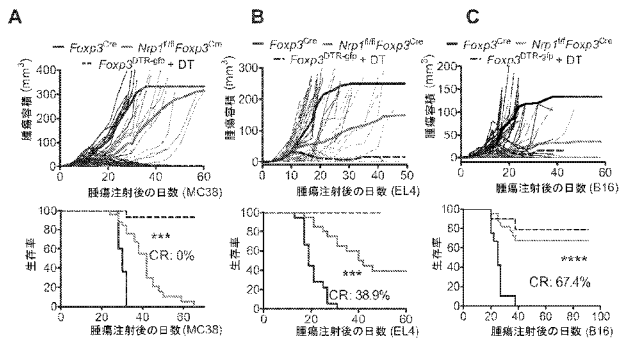
【図 2 - 2】



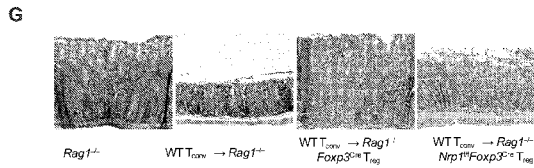
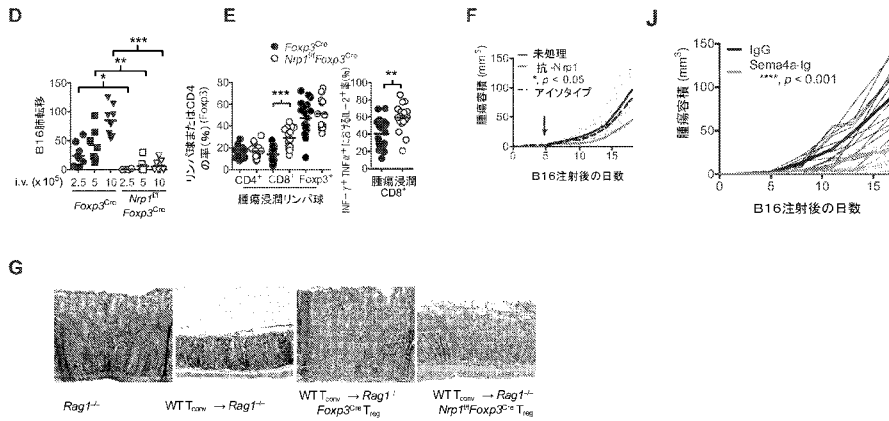
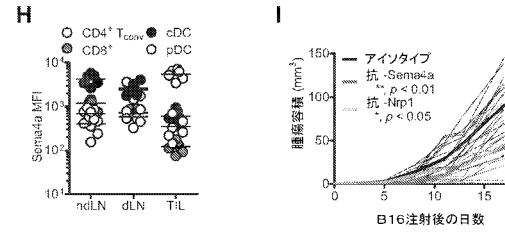
【図 3】



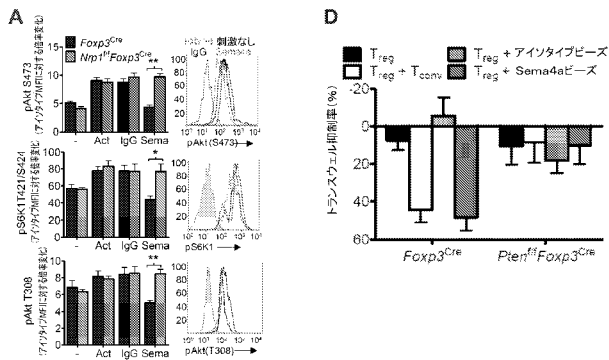
【図 4 - 1】



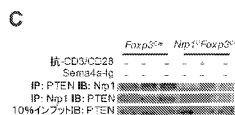
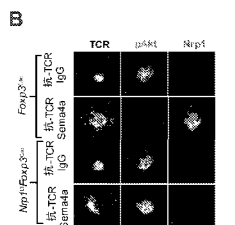
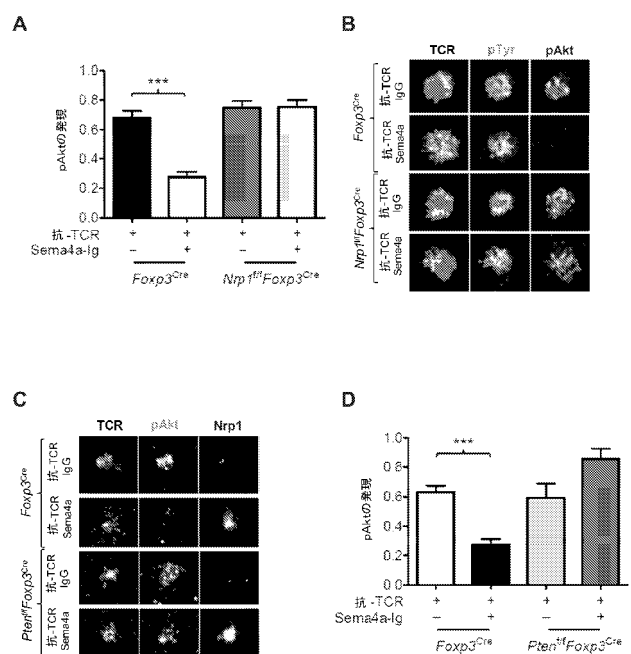
【図 4 - 2】



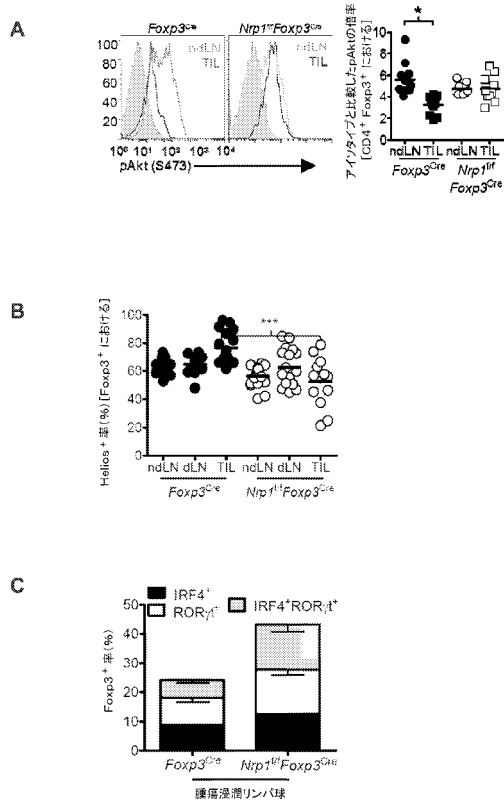
【図 5】



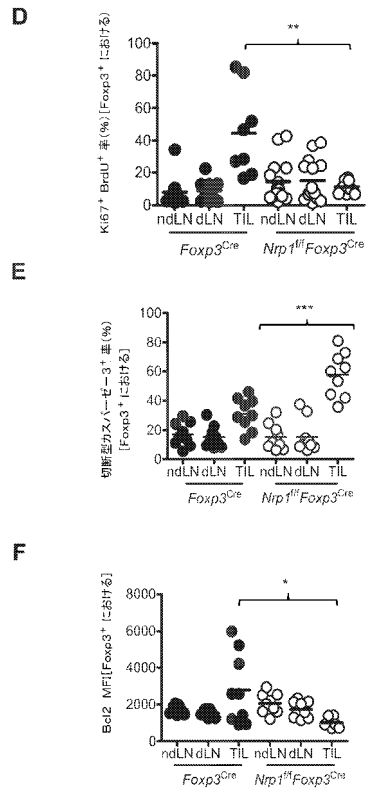
【図 6】



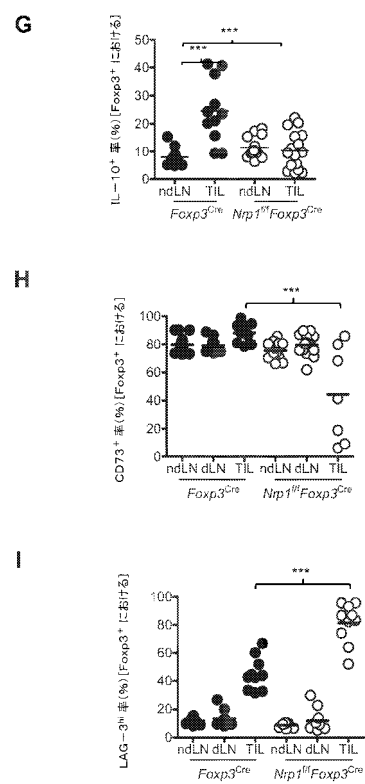
【図 7 - 1】



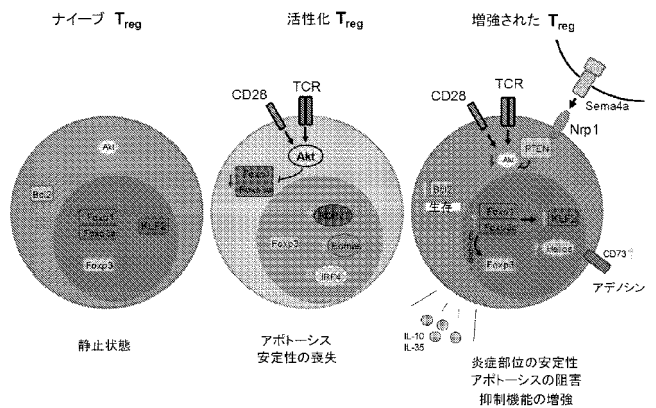
【図 7 - 2】



【図 7 - 3】



【図 8】



【国際調査報告】

PCT/US2013/063934 09.04.2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2013/063934

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

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

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

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

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

See Extra Sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-26, 48-76, 95-116

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.

PCT/US2013/063934 09.04.2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2013/063934

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61P 37/02 (2014.01) USPC - 424/154.1 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) IPC(8) - A61P 35/02, 35/04, 37/00, 37/02; C07K 16/18; C12N 5/0783 (2014.01) USPC - 424/154.1; 435/7.21, 7.24; 530/350, 387.3, 387.9, 388.1, 388.75 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 31/502, 31/506, 31/517, 31/661, 39/3955; C07K 16/18, 16/2863, 2317/34 (2014.01) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Patbase, Google Patents, Google, Pubmed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	CATALANO et al. 'The Neuroimmune Semaphorin-3A Reduces Inflammation and Progression of Experimental Autoimmune Arthritis'. Journal of Immunology. 185(10). Pages 6373-6383. 11 October 2010. entire document.	1, 2, 5, 7, 8, 12, 13, 15, 25, 48, 49, 52, 53, 57-59, 61, 72 3, 4, 6, 9-11, 14, 16-25, 50, 51, 54, 55, 56, 60, 63-71, 73, 74-76
X — Y	CA 2794123 A1 (SCHMITZ et al) 25 May 2001 (25.05.2001) entire document	95, 96, 109-114 9, 54, 75, 97-108, 115, 116
Y	TOYOFUKU et al. 'Endosomal sorting by Semaphorin 4A in retinal pigment epithelium supports photoreceptor survival'. Genes and Development. 26(8). Pages 816-829. 30 March 2012. entire document	3, 4, 17, 18, 21, 22, 63, 64, 67, 68, 100-102, 104, 105, 115, 116
Y	EP 2497498 A1 (KUMANOGOH et al) 12 September 2012 (12.09.2012) entire document	16, 20, 62, 66, 98-105
Y	WO 2012/021558 A1 (MARKHAM) 16 February 2012 (16.02.2012) entire document	23, 24, 69, 70, 73, 74, 106, 107
Y	EVANS et al. 'Neuropilin-1 Signaling through p130Cas tyrosine phosphorylation is essential for growth factor-dependent migration of glioma and endothelial cells. Molecular and Cellular Biology. Vol. 31, No. 6. Pages 1174-1185. 18 January 2011. entire document	25, 71, 108
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* 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 13 March 2014		Date of mailing of the international search report 09 APR 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

PCT/US2013/063934 09.04.2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2013/063934

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GABHANN et al. 'Targeting Neuropilin-1 to Inhibit VEGF Signaling in Cancer: Comparison of Therapeutic Approaches'. PLoS Computational Biology. Vol. 2. Issue 12. Pages 1649-1662. 29 December 2006. entire document	6, 14, 60, 97
Y	WO 2008/150868 A1 (ZHENG et al) 11 December 2008 (11.12.2008) entire document	10, 11, 55, 56, 76
Y	WO 2009/099959 A2 (ELLIS et al) 13 August 2009 (13.08.2009) entire document	76
P,Y	EP 2570434 A2 (WATTS et al) 20 March 2013 (20.03.2013) entire document	1-26, 48-76, 95-116
P,X	DELGOFFE et al. 'Regulatory T cell stability is maintained by a neuropilin-1:semaphorin-4a axis'. Nature. Vol. 501. Pages 252-256. 04 August 2013. entire document	1-26, 48-76, 95-116

PCT/US2013/063934 09.04.2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2013/063934

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I: claims 1-26, 48-76, and 95-116 are drawn to a method of treating a disease or enhancing a vaccine in a subject comprising inhibiting a function or decreasing stability of a regulatory T cell (Treg) by exposing said Treg to an inhibitor of neuropilin-1 (Nrp1): semaphorin axis in said Treg.

Group II: claims 27-47 and 77-94 are drawn to a method of treating a disease in a subject comprising enhancing a function or increasing stability of a regulatory T cell (Treg) by exposing said Treg to an agonist of neuropilin-1 (Nrp 1):semaphorin axis in said Treg.

The inventions listed in Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of Group I, a method of treating a disease or enhancing a vaccine in a subject comprising inhibiting a function or decreasing stability of a regulatory T cell (Treg) by exposing said Treg to an inhibitor of neuropilin-1 (Nrp1):semaphorin axis in said Treg, is not present in Group II; and the special technical feature of Group II, a method of treating a disease in a subject comprising enhancing a function or increasing stability of a regulatory T cell (Treg) by exposing said Treg to an agonist of neuropilin-1 (Nrp 1):semaphorin axis in said Treg, is not present in Group I.

Additionally, Groups I and II share the technical features of a method of treating a disease in a subject in need thereof comprising modulating the stability of a regulatory T cell (Treg) comprising exposing said Treg to an agent that modulates a neuropilin-1 (Nrp 1): semaphorin axis in said Treg. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, "The Neuroimmune Semaphorin-3A Reduces Inflammation and Progression of Experimental Autoimmune Arthritis," to Catalano discloses a method of treating a disease in a subject in need thereof comprising modulating a TReg by exposing the T cell to an agent that binds to a neuropilin-1 (Nrp 1): semaphorin axis in said Treg (FIGURE 6: CD4+NP-1+ T cells show a Treg-like phenotype that is reversed by a Sema3A antagonist, Pg. 8, top of page, caption to Fig.6; This study provides evidence that Sema3A transient expression is defective in activated T cells isolated from patients with RA, and its ectopic re-expression inhibits clinical manifestation of collagen-induced arthritis (CIA) or could cease further disease exacerbation on initiation of treatment., Pg. 1, right column, Para. 1; Sema3A-encoding plasmid has the ability to prevent and treat the development of CIA in DBA/1 mice, a surrogate model of human RA. DBA/1 mice were immunized with CI/CFA as described in materials and methods, Pg. 5, right column, Para. 3).

The inventions listed in Groups I and II therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 5/14 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 1/14 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 1/14	
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	
	A 6 1 K 39/395	D
	A 6 1 K 39/395	N
	A 6 1 K 31/713	
	A 6 1 K 31/7088	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), 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, RO, R S, 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, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG , NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ヴィグナリ, ダリオ エー エー
アメリカ合衆国 テネシー州 3 8 1 3 8 ジャーマンタウン ウォーターリーフ ドライヴ 2
9 0 0

(72)発明者 ウー, ソンーリョン
アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 6 1 5 シカゴ サウス ブラックストーン アヴェニュー
5 1 0 7 アpartment 1 0 0 5

(72)発明者 デルゴフ, グレグ エム
アメリカ合衆国 テネシー州 3 8 1 1 2 メンフィス ファクソン アヴェニュー 1 7 2 4

F ターム(参考) 4C084 AA17 AA20 MA02 NA05 NA14 ZA011 ZA451 ZA621 ZA681 ZA691
ZA891 ZA941 ZA961 ZB072 ZB081 ZB111 ZB131 ZB211 ZB221 ZB261
ZB271 ZB321 ZB322 ZC061 ZC351 ZC751
4C085 AA13 AA14 BB36 BB41 BB42 BB43 CC01 DD88 EE01 EE03
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA05 NA14 ZA01 ZA45
ZA62 ZA68 ZA69 ZA89 ZA94 ZA96 ZB13 ZB21 ZB26 ZB27
ZB32 ZC06 ZC35 ZC75