

(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2006-502728

(P2006-502728A)

(43) 公表日 平成18年1月26日(2006.1.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 9/00 (2006.01)	A 6 1 K 9/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	4 B O 6 3
A 6 1 K 9/20 (2006.01)	A 6 1 K 9/20	4 C O 7 6
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-544486 (P2004-544486)
 (86) (22) 出願日 平成15年10月16日 (2003.10.16)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年6月14日 (2005.6.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2003/004493
 (87) 国際公開番号 W02004/035825
 (87) 国際公開日 平成16年4月29日 (2004.4.29)
 (31) 優先権主張番号 0223982.0
 (32) 優先日 平成14年10月16日 (2002.10.16)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 505138705
 イミュノクリン、エルティアーディー、
 イギリス、エヌ12 8エヌビー ロンド
 ン、バラーズ レーン 289-293、
 ロウランドソン ハウス
 (71) 出願人 801000061
 財団法人大阪産業振興機構
 大阪府大阪市中央区本町橋2番5号 マイ
 ドームおおさか内
 (74) 代理人 110000040
 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナ
 ズ
 (72) 発明者 宮澤 正▲頭▼
 大阪府大阪狭山市大野東377番地の2
 近畿大学医学部免疫学教室内
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マーカー遺伝子

(57) 【要約】

【課題】

【解決手段】 感染症にかかりやすい素因を決定する方法、特にHIVを有する感染症、なら
 びに感染症の療法が説明されている。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

感染症にかかりやすい素因を決定する方法であって、前記方法が、被験者から DNA 運搬サンプルを得る工程、および前記サンプルを分析し、マイクロサテライト遺伝子座 D 2 2 S 9 2 9、D 2 2 S 2 7 7、D 2 2 S 2 6 4、D 2 2 S 4 2 3 & D 2 2 S 4 1 8 または D 2 2 S 2 7 2 の少なくとも 1 つに存在するアレルを同定する工程を含み、マイクロサテライト遺伝子座 D 2 2 S 9 2 9、D 2 2 S 2 7 7、D 2 2 S 2 6 4、D 2 2 S 4 2 3 & D 2 2 S 4 1 8 または D 2 2 S 2 7 2 における特定なアレルの存在が、感染症に対する抵抗性を示す方法。

【請求項 2】

感染症に対する抵抗性を決定する方法であって、前記方法が、被験者から DNA 運搬サンプルを得る工程、および前記サンプルを分析し、マイクロサテライト遺伝子座 D 2 2 S 9 2 9、D 2 2 S 2 7 7、D 2 2 S 2 6 4、D 2 2 S 4 2 3 & D 2 2 S 4 1 8 または D 2 2 S 2 7 2 の少なくとも 1 つに存在するアレルを同定する工程を含み、マイクロサテライト遺伝子座 D 2 2 S 9 2 9、D 2 2 S 2 7 7、D 2 2 S 2 6 4、D 2 2 S 4 2 3 & D 2 2 S 4 1 8 または D 2 2 S 2 7 2 における特定なアレルの存在が、感染症に対する抵抗性を示す方法。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の方法であって、前記サンプルが、分析され、マイクロサテライト遺伝子座 D 2 2 S 9 2 9、D 2 2 S 2 7 7、D 2 2 S 2 6 4、D 2 2 S 4 2 3 & D 2 2 S 4 1 8 もしくは D 2 2 S 2 7 2 またはそれに相補的な核酸の相同体、スプライス変異体または誘導体の存在を決定する方法。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法であって、前記方法が、ウイルス性感染症にかかりやすい素因の決定に用いられる方法。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法であって、前記ウイルスが、オンコウイルス、レトロウイルス、レンチウイルスおよびスプマウイルスからなる群から選択される方法。

【請求項 6】

請求項 4 または請求項 5 に記載の方法であって、前記ウイルスが、内在性レトロウイルスである方法。

【請求項 7】

請求項 3 ~ 6 のいずれか一つに記載の方法であって、前記ウイルスが、HIV ウイルスである方法。

【請求項 8】

先行する請求項のいずれかに記載の方法であって、前記サンプルが、非侵襲的に得られる方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一つに記載の方法であって、前記サンプルが、血液、尿、精液、口腔スワブ、皮膚細胞、切り取った爪、毛、高部腔スワブまたは子宮頸部スミアである方法。

【請求項 10】

先行する請求項のいずれかに記載の方法であって、前記サンプルが、核酸増幅技術の使用により増幅される方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法であって、前記核酸増幅技術が、PCR またはローリング・サークル複製である方法。

【請求項 12】

先行する請求項のいずれかに記載の方法であって、前記サンプルが、DNA 断片長解析、DNA ハイブリダイゼーション技術、DNA 配列同定、一本鎖長多型 (SSLP) 分析

10

20

30

40

50

または標準鎖構造(RSC)分析を用いて、前記マイクロサテライト遺伝子座における特定の遺伝子型の存在または不在について分析される方法。

【請求項13】

請求項12に記載の方法であって、前記分析が、一本鎖長多型(SSLP)分析を用い、前記マイクロサテライトマーカのPCR増幅用フランキングプライマーセットが、

D22S277 左、TTCTTGTGTGGTAGTCTGGG; (配列番号:1)

D22S277 右、TACCNACTCCCCAAACTATG; (配列番号:2)

D22S272 左、GAGTTTTGTTTGCCTGGCAC; (配列番号:3)

D22S272 右、AATGCACGACCCACCTAAAG; (配列番号:4)

D22S276 左、CATTCTGCCAAGCAATTTAT; (配列番号:5)

D22S276 右、GCTGCTCTTTAAGTTTCTTGACC; (配列番号:6)

D22S929 左、GGAGCTGCATGTACTAGCTGG; (配列番号:7)

D22S929 右、GCATTTATGGAGTATCCACAG; (配列番号:8)

D22S1169 左、GCACACACATGCACATAATC; (配列番号:9)および

D22S1169 右、AACAACTTCCAGCAGACG. (配列番号:10)、

相補的な核酸もしくはフラグメント、多型、スプライス変異体またはその相同体から選択される方法。

10

【請求項14】

感染症にかかりやすい素因の診断用キットであって、前記キットが、マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S423 & D22S418またはD22S272の少なくとも1つにおける遺伝子型の決定用試薬を含むキット。

20

【請求項15】

感染症にかかりやすい素因の診断用キットであって、前記キットが、マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S423 & D22S418もしくはD22S272又はそれに相補的な核酸、フラグメント、多型、スプライス変異体もしくはその相同体の少なくとも1つにおける遺伝子型の決定用試薬を含むキット。

【請求項16】

マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S423 & D22S418もしくはD22S272、またはそれに相補的な核酸、またはそのフラグメント、多型、スプライス変異体もしくは相同体の少なくとも1つを抱く染色体フラグメントを運ぶベクター。

30

【請求項17】

感染症にかかりやすい素因を有する被験者を治療するための遺伝子治療における請求項16に記載のベクターの使用。

【請求項18】

前記感染症の治療用薬物の製造における請求項16に記載のベクターの使用。

【請求項19】

感染症の治療または予防または療法における請求項16に記載のベクターまたは請求項18に記載の薬物の使用。

40

【請求項20】

請求項17に記載の使用であって、前記感染症が、ウイルス性感染症である使用。

【請求項21】

請求項17から20のいずれかひとつに記載の使用であって、前記感染症が、HIVウイルスによる感染症である使用。

【請求項22】

マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S423 & D22S418もしくはD22S272、前記遺伝子の相補的な核酸もしくはフラグメント、多型、スプライス変異体、相補的な核酸もしくは相同体に隣接する染色体

50

部分に位置する遺伝子によりエンコードされる、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、またはグリコシル化、スルホン化、アセチル化もしくは他の翻訳後誘導体、機能的な誘導体、アミノ酸配列の相同体もしくはフラグメントを含む組成物。

【請求項 23】

感染症の治療または予防における請求項 22 に記載の組成物の使用。

【請求項 24】

ウイルス性感染症の治療または予防における請求項 22 に記載の組成物の使用。

【請求項 25】

HIV の治療、予防または他の療法における請求項 22 に記載の組成物の使用。

【請求項 26】

請求項 22 に記載の組成物であって、前記組成物が、医薬組成物である組成物。

【請求項 27】

請求項 22 に記載の組成物であって、前記組成物が、ワクチンである組成物。

【請求項 28】

避妊薬における請求項 22 に記載の組成物の使用。

【請求項 29】

マイクロサテライト遺伝子座 D22S929、D22S277、D22S264、D22S423 & D22S418 もしくは D22S272、前記遺伝子の相補的な核酸もしくはフラグメント、多型、スプライス変異体もしくは相同体に隣接する染色体部分に位置する遺伝子によりエンコードされる、タンパク質、またはグリコシル化、スルホン化、アセチル化もしくは他の翻訳後誘導体、機能的な誘導体、前記タンパク質の相同体もしくはフラグメントを含む避妊薬。

【請求項 30】

隔膜、子宮頸キャップ、コンドーム、スポンジもしくは他の膈内もしくは障壁デバイス、被覆 IUD デバイス、経口避妊用ピル、避妊用のインプラントもしくは注射剤、または殺精子のゲル剤、 pessary、発泡体、フィルムもしくは乳剤の形態である請求項 28 に記載の避妊薬。

【請求項 31】

殺菌薬における請求項 22 に記載の組成物の使用。

【請求項 32】

粘膜的に投与可能な形態におけるクレーム 31 に記載の殺菌薬の使用。

【請求項 33】

ウイルス性疾患に対する粘膜性ワクチン注射における請求項 31 に記載の殺菌薬の使用。

【請求項 34】

HIV ウイルスに対する粘膜性ワクチン注射における請求項 33 に記載の殺菌薬の使用。

【請求項 35】

感染症の治療または予防のための薬物の製造における、マイクロサテライト遺伝子座 D22S929、D22S277、D22S264、D22S423 & D22S418 もしくは D22S272、前記遺伝子の相補的な核酸もしくはフラグメント、多型、スプライス変異体もしくは相同体に隣接する染色体部分に位置する遺伝子によりエンコードされる、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、またはグリコシル化、スルホン化、アセチル化もしくは他の翻訳後誘導体、機能的な誘導体、前記タンパク質の相同体もしくはフラグメントの使用。

【請求項 36】

請求項 35 に記載の使用であって、前記感染症が、ウイルス性感染症である使用。

【請求項 37】

請求項 35 または請求項 36 に記載の使用であって、前記感染症が、HIV である使用。

10

20

30

40

50

【請求項 38】

配列番号 1 ~ 10 のいずれか一つによる裸の DNA 配列の少なくとも一つを含むワクチン。

【請求項 39】

マイクロサテライト遺伝子座 D 2 2 S 9 2 9、D 2 2 S 2 7 7、D 2 2 S 2 6 4、D 2 2 S 4 2 3 & D 2 2 S 4 1 8 もしくは D 2 2 S 2 7 2、または前記遺伝子のフラグメント、多型、スプライス変異体、相補的核酸もしくは相同体を含む DNA 配列を含むワクチン。

【請求項 40】

マイクロサテライト遺伝子座 D 2 2 S 9 2 9、D 2 2 S 2 7 7、D 2 2 S 2 6 4、D 2 2 S 4 2 3 & D 2 2 S 4 1 8 もしくは D 2 2 S 2 7 2 または前記遺伝子のフラグメント、多型、スプライス変異体、相補的核酸もしくは相同体をエンコードする DNA を含むワクチンであって、前記 DNA が裸であるワクチン。 10

【請求項 41】

アジュバントを更に含む請求項 38 ~ 40 のいずれか一つに記載のワクチン。

【請求項 42】

請求項 27、請求項 33 または請求項 38 ~ 41 のいずれか一つに記載のワクチンであって、非経口的にまたは経口的に投与可能であるワクチン。

【請求項 43】

請求項 38 ~ 41 のいずれか一つに記載のワクチンであって、前記ワクチンが、免疫原性であるワクチン。 20

【請求項 44】

前記 DNA に結合可能か、またはさもなければ前記 DNA を識別可能な化合物をスクリーニングするための、チップまたは分析プレートにおける、マイクロサテライト遺伝子座 D 2 2 S 9 2 9、D 2 2 S 2 7 7、D 2 2 S 2 6 4、D 2 2 S 4 2 3 & D 2 2 S 4 1 8 もしくは D 2 2 S 2 7 2、または前記遺伝子のフラグメント、多型、スプライス変異体、相補的核酸もしくは相同体をエンコードする DNA の使用。

【請求項 45】

マイクロサテライト遺伝子座 D 2 2 S 9 2 9、D 2 2 S 2 7 7、D 2 2 S 2 6 4、D 2 2 S 4 2 3 & D 2 2 S 4 1 8 もしくは D 2 2 S 2 7 2 または、前記遺伝子のフラグメント、多型、スプライス変異体、相補的核酸もしくは相同体をエンコードする DNA を含むチップまたは分析プレート。 30

【請求項 46】

薬剤における請求項 44 に記載のチップまたは分析プレートの使用。

【請求項 47】

マイクロサテライト遺伝子座 D 2 2 S 9 2 9、D 2 2 S 2 7 7、D 2 2 S 2 6 4、D 2 2 S 4 2 3 & D 2 2 S 4 1 8 もしくは D 2 2 S 2 7 2、前記遺伝子の相補的な核酸もしくはフラグメント、多型、スプライス変異体もしくは相同体に隣接する染色体部分に位置する遺伝子によりエンコードされた、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、またはグリコシル化、スルホン化、アセチル化もしくは他の翻訳後誘導体、機能的な誘導体、前記タンパク質の相同体もしくはフラグメントを含むチップまたは分析プレート。 40

【請求項 48】

マイクロサテライト遺伝子座 D 2 2 S 9 2 9、D 2 2 S 2 7 7、D 2 2 S 2 6 4、D 2 2 S 4 2 3 & D 2 2 S 4 1 8 もしくは D 2 2 S 2 7 2、前記遺伝子の相補的な核酸もしくはフラグメント、多型、スプライス変異体もしくは相同体に隣接する染色体部分に位置する遺伝子によりエンコードされた、前記ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、またはグリコシル化、スルホン化、アセチル化もしくは他の翻訳後誘導体、機能的な誘導体、前記タンパク質の相同体もしくはフラグメントに、結合することができ、またはさもなければ識別することができ、修飾でき、もしくは擬態することができる化合物のスクリーニングにおける、請求項 47 に記載のチップまたは分析プレートの使用。 50

【請求項 49】

ハイスループット・スクリーニング法における請求項 45～48のいずれか1つに記載のチップまたは分析プレートの使用。

【請求項 50】

マイクロサテライト遺伝子座 D 2 2 S 9 2 9、D 2 2 S 2 7 7、D 2 2 S 2 6 4、D 2 2 S 4 2 3 & D 2 2 S 4 1 8 もしくは D 2 2 S 2 7 2、前記遺伝子の相補的な核酸もしくはフラグメント、多型、スプライス変異体もしくは相同体に隣接する染色体部分に位置する遺伝子によりエンコードされた、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、またはグリコシル化、スルホン化、アセチル化もしくは他の翻訳後誘導体、機能的な誘導体、前記タンパク質の相同体またはフラグメントの、感染症に対する抵抗性を提供するか、または抗ウイルス活性を有する免疫グロブリン A を製造するための使用。

10

【請求項 51】

マイクロサテライト遺伝子座 D 2 2 S 9 2 9、D 2 2 S 2 7 7、D 2 2 S 2 6 4、D 2 2 S 4 2 3 & D 2 2 S 4 1 8 もしくは D 2 2 S 2 7 2、前記遺伝子の相補的な核酸もしくはフラグメント、多型、スプライス変異体もしくは相同体の、感染症に対する抵抗性を提供するか、または抗ウイルス活性を有する免疫グロブリン A を製造するための使用。

【請求項 52】

請求項 50 または 請求項 51 により製造された、感染症に対する抵抗性を提供するか、または抗ウイルス活性を有する免疫グロブリン A。

【請求項 53】

請求項 52 に記載の免疫グロブリン A の医薬組成物における使用。

20

【請求項 54】

請求項 52 に記載の免疫グロブリン A の前記感染症の治療用薬物の製造における使用。

【請求項 55】

ウイルス性感染症の治療における請求項 54 に記載の使用。

【請求項 56】

請求項 55 に記載の使用であって、前記ウイルスが、HIVウイルスである使用。

【請求項 57】

治療を受けている患者に粘膜応答を引き起こし、前記患者に防御免疫を引き起こす請求項 51 または 請求項 54 に記載の使用。

30

【請求項 58】

請求項 52 に記載の免疫グロブリン A を含む粘膜ワクチン。

【請求項 59】

抗原または病原体特異免疫を引き起こすための請求項 58 に記載のワクチンの使用。

【請求項 60】

HIVウイルスに対する粘膜ワクチン注射の製造における、請求項 58 に記載のワクチンおよび請求項 31 に記載の殺菌薬の使用。

【請求項 61】

HIVに対する中和抗体の製造を制御する遺伝子座をエンコードする核酸。

【請求項 62】

請求項 61 に記載の核酸であって、前記核酸が、DNAである核酸。

40

【請求項 63】

請求項 61 または 請求項 62 に記載の核酸であって、前記遺伝子座が、マウス D 1 5 M i t 7 1 と シンテニーである核酸。

【請求項 64】

請求項 61～63のいずれか1つに記載の核酸であって、前記遺伝子座が、ヒト D 2 2 S 2 7 2、D 2 2 S 4 2 3、D 2 2 S 2 8 4、D 2 2 S 2 9 9 から選択される核酸。

【請求項 65】

請求項 61～64のいずれか1つに記載の核酸であって、前記遺伝子座が、D 2 2 S 2 7 2 または D 2 2 S 4 2 3 である核酸。

50

【請求項 66】

請求項 61 ~ 65 のいずれか 1 つに記載の核酸の薬剤における使用。

【請求項 67】

HIV 感染症の治療または予防のための薬物の製造における請求項 66 に記載の使用。

【請求項 68】

請求項 61 ~ 65 のいずれか 1 つに記載の核酸によりエンコードされたペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質。

【請求項 69】

請求項 68 に記載のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の薬剤における使用。

【請求項 70】

請求項 68 に記載のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の、HIV 感染症の治療または予防のための薬物の製造における使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マーカー遺伝子およびその使用に関するものである。より詳細には、本発明は、感染症にかかりやすい素因を示すマーカー遺伝子に関する。

【背景技術】

【0002】

マーカー遺伝子を使用することにより、特定疾患にかかりやすい素因を診断することが可能であることが、当該分野で知られている。例えば、腫瘍遺伝子または腫瘍抑圧遺伝子は、特定の癌に対する羅病性を表示するとして、特に突然変異した腫瘍遺伝子および欠失された腫瘍抑圧遺伝子と、特定の癌との間の関連の観点から、広く考えられている。加えて、癌（例えば乳癌）にかかるリスクがより大きくなることが予測される遺伝子（例えば B R C A 遺伝子）が、同定されている。感染症（特にウイルス性感染症）に対して高度に感受性が強い、または感染症（特にウイルス性感染症）に対して抵抗力がある個体もいくらか存在することも、知られている。疾患羅病性を予測することは、公知の原因となる薬品、化学物質またはウイルスとの不必要な接触を避け、公知および発展途上の予防手段を取るために、疾病素質遺伝子を有する者にとって、有益である。また、ウイルス性疾患に対するワクチンの設計または、遺伝子治療にとっても有用である。

20

30

【0003】

加えて、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染症のような重大なウイルス性疾患に対する効果的なワクチンの開発は、地球的な社会経済の副次的問題を伴う緊急事項である。HIV は、後天性免疫不全症候群（AIDS）の原因因子である。そのようなワクチンの開発の鍵の一つが、HIV 感染症に対する自然抵抗性のメカニズムを理解することである。幾つかの宿主遺伝子が、HIV 感染症に対する抵抗性とおそらく関連があり、かつ、HIV 血清変換後の AIDS の遅延された進展または促進された進展のいずれかと関連がある [1]。これらの宿主遺伝子は、ケモカイン受容体およびサイトカイン、キラー免疫グロブリン様受容体（KIRs）（天然キラー細胞受容体についてのリガンドとして役に立つ）ならびに、主要組織適合複合体（MHC）内のものをエンコードする遺伝子を含む [1

40

【0004】

HIV 感染症に対する自然抵抗性の例としては、連続した HIV への暴露にもかかわらず、HIV 陽性にならない個体がいづらか存在することが、知られている。生まれつき抵抗力がある個体の幾つかは、CCR 32 として知られている突然変異した HIV コレセプター遺伝子を有している [1 ~ 5]。しかし、この突然変異は劣性であり、細胞への HIV 侵入に対する抵抗性を付与する同型接合性は、ほんのまれにしか、見出されない。従って、上記突然変異は、HIV 感染症に対して自然発生の抵抗性を示す個体の大多数の説明とはなりえない。HIV 感染症に対する自然抵抗性を示す現存するヒト集団の中で、HIV への多数のおよび繰り返しの暴露の証拠があり、しかし、それにもかかわらず、HIV

50

Vに反応性な血清IgG抗体を有さない、HIV暴露血清反応陰性の(ESNs)またはHIV-1-暴露かつ感染していない個体(EUs)として知られる人々の特異な集団が存在する[12、13]。これらESNs/EUsからの尿道または膣の分泌物におけるHIV抗原特異性T-リンパ球応答の検出と、HIV-反応性IgA抗体の検出により、彼らはHIVに暴露されているが、その暴露により感染症を生じていないことが示されている[10~17]。ESN/EU状態を、先に報告した遺伝的多型と関連づける試みは、今のところ成功していない[10、14]。

【0005】

加えて、ある明らかに抵抗力がある集団の人々において、このウイルスへの多数のおよび繰り返しの暴露にもかかわらず、あるHIV-1-感染個体における臨床的進行の不在と、検出可能なHIV-1ゲノムの欠乏とが、HIV感染症への予防的および治療的手段の発展を考慮すると、2つの顕著な現象である[18~20]。表現型的に、末梢血液単核細胞(PBMCs)から、検出可能な血漿HIV-1のRNAおよびHIV-1のcDNAの不在にもかかわらず、強力なHIV-1抗原特異性T-リンパ球応答およびHIV-1-反応性粘膜IgA生産を示す個体が存在する[21~23]。彼らは、しばしば、HIV-1-暴露かつ感染していない個体(EUs)と呼ばれる。そのようなEUsから単離された粘膜IgAにより及ぼされるHIV-1-中和活性の立証により[24~26]、HIV-1-中和抗体の迅速な生産と、クラス転換が、HIV感染症に対する在りうる免疫抵抗性に寄与するかもしれないことが、示唆された。HIV-1-関連類人猿免疫不全ウイルス(SIV)またはHIV-1とSIVとの間の病原体キメラに対する中和抗体の保護的役割は、また、非ヒト霊長目動物における、受動伝達およびワクチン誘導活性免疫化実験により、証明された[27~30]。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかし、おそらく保護的な粘膜抗HIV-1抗体の効果的生産に影響を及ぼすであろう遺伝的要因は、現在のところ知られていない。

【課題を解決するための手段】

【0007】

しかし、インフォームドコンセントを伴う、そのような個体からのDNAサンプルを研究することにより、本発明者らは、ESNsが、レトロウイルス抵抗性遺伝子、Rfv-3を含む、マウス染色体15の領域にシテニーである、染色体22の領域以内で、マイクロサテライト遺伝子座で、特異で稀なアレルを有することを見出した。従って、本発明者らは、特定の遺伝子型または多型を同定し、その遺伝子型または多型は、HIV感染症に対する抵抗性と関連があるようである。これは、ESNまたはEU-状態として知られていたHIV感染症の確立に対する自然な後天性免疫抵抗性が、遺伝子的に影響を受けるであろうことの最初の立証である。

【0008】

故に、本発明者らは、マーカー遺伝子(それは、感染症、特にウイルス性感染症、より詳細にはHIV感染症にかかりやすい素因の現れである)およびその多型を同定した。

【0009】

よって、本発明は、感染症にかかりやすい素因を決定する方法を提供し、その方法は、被験者からDNA運搬サンプルを得る工程と、前記サンプルを分析してマイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S1166、D22S423、D22S1169、D22S418またはD22S272の少なくとも一つに存在するアレルを同定する工程とを含み、マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S1166、D22S423、D22S1169、D22S418またはD22S272における特定なアレルの存在は、感染症に対する抵抗性を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

10

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

本発明はまた、相補的RNAを含む、これらの遺伝子座に対し相補的な核酸ならびに、それによりエンコードされたアミノ酸配列および、その相同体、スプライス変異体または機能的な同等物を包含する。

【 0 0 1 1 】

好ましくは、前記方法は、個体におけるウイルス性感染症にかかりやすい素因の決定に用いられる。ウイルス性感染症にかかりやすい素因は、ウイルス、例えばレトロウイルス、例えば、オンコウイルス、レンチウイルスまたはスプマウイルスに関するものであるのが、好ましい。HTLVおよびBLV（ウシ白血病ウイルス）は、白血病を引き起こすオンコウイルスの例である。HIVおよびSIVは、炎症性疾患および消耗性疾患を引き起こすレンチウイルスの例である。ヒトスプマウイルスは、スプマウイルスの例である。HIV感染症にかかりやすい素因の決定が、最も好ましい。

10

【 0 0 1 2 】

前記レトロウイルスは、内在性レトロウイルス、すなわち、ある生理的刺激にตอบสนองして、細胞内で生産されるウイルスであってもよい。内在性ウイルスは、感染症により広がらず、しかし、継承される。例えば、HIV陽性な母の子として生まれた子供は、血清変換が誕生の後、（特に乳児が母乳で育てられていない場合）起こりうるが、通常、HIV陽性である。

【 0 0 1 3 】

従って、ここで用いられる用語「感染症」は、内在性レトロウイルスおよびそれらの活性化ならびに感染性因子への暴露による感染症の従来の意味を含むよう意図される。ヒト内在性レトロウイルス（HERV）は、内在性レトロウイルスの例である。

20

【 0 0 1 4 】

前記サンプルは、侵襲的に、または非侵襲的に得られてもよい。好ましいサンプルには、血液、尿、精液、口腔スワブ、皮膚細胞、切り取った爪、毛または子宮頸部スミアサンプルを含む。

【 0 0 1 5 】

前記サンプルから単離されたDNAは、核酸増幅技術、例えば、PCRまたはローリング・サークル複製または他の通常の核酸増幅技術の使用により増幅されるのが好ましい。本発明において、等効用を有する、いずれの核酸増幅技術を使用してもよく、上記方法に本発明を限定することを意図するものではない。

30

【 0 0 1 6 】

よって、本発明は、また、前記サンプルが、DNA断片長解析、DNAハイブリダイゼーション技術、DNA配列同定、一本鎖長多型（SSLP）分析または標準鎖構造（reference strand conformation）（RSC）分析を用いて、前記マイクロサテライト遺伝子座における特定の遺伝子型の存在または不在について分析される方法を提供する。

【 0 0 1 7 】

より詳細には、本発明は、一本鎖長多型（SSLP）分析を用い、前記マイクロサテライトマーカのPCR増幅用フランキング（flanking）プライマーセットが、

40

D22S277左、TTCTTGTGTGGTAGTCTGGG; (配列番号: 1)

D22S277右、TACCNACTCCCCAACTATG; (配列番号: 2)

D22S272左、GAGTTTTGTTTGCCTGGCAC; (配列番号: 3)

D22S272右、AATGCACGACCCACCTAAAG; (配列番号: 4)

D22S276左、CATTCTGCCAAGCAATTTAT; (配列番号: 5)

D22S276右、GCTGCTCTTTAAGTTTCTTGACC; (配列番号: 6)

D22S929左、GGAGCTGCATGTAAGTCTGG; (配列番号: 7)

D22S929右、GCATTTATGGAGTATCCACAG; (配列番号: 8)

D22S1169左、GCACACACATGCACATAATC; (配列番号: 9) および

D22S1169右、AACAACTTCCAGCAGACG. (配列番号: 10)

その相補的な核酸もしくはフラグメント、多型、スプライス変異体または相同体から選択

50

される分析を提供する。

【0018】

前記サンプルは、前記指示されたマイクロサテライト遺伝子座における特定の遺伝子型の存在または不在について、DNA断片長解析、DNAハイブリダイゼーション技術、DNA配列同定、一本鎖長多型(SSLP)分析または標準鎖構造(RSC)分析(これらが、当該分野でよく知られている)を用いて分析されるのが好ましい。

【0019】

前記マイクロサテライトマーカのPCR増幅用のフランキングプライマーセットの配列は、以下の実施例に示す。これらの配列のフラグメント、多型または相同体は、また、本発明の範囲に含まれる。

【0020】

第2の観点において、本発明はまた、感染症にかかりやすい素因の診断用キットを提供する。前記キットは、前記マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S1166、D22S423、D22S1169、D22S418またはD22S272の少なくとも1つにおける遺伝子型の決定のための試薬を含む。

【0021】

好ましい実施形態において、前記試薬は、SSLPマーカの増幅用PCRプライマーである。前記診断キットは、人々を遺伝子グループに分類するのに用いられてもよい。そのグループ間で、感染症のための予防的および治療的手段の効果が比較され、測定される。故に、自然抵抗性を有する人々への治療的手段の不必要な使用が避けられ、治療薬の投薬量が減らされ、一方、予防的手段およびワクチンの使用を、極度な罹病性を有する者(そのような努力が、さらに成功を予想される)のような人々に集中させることが可能である。

【0022】

故に、本発明はまた、ウイルス性疾患、特に、レトロウイルス性疾患、より詳細には、HIV感染症にかかりやすい素因の決定における、前記マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S1166、D22S423、D22S1169、D22S418またはD22S272の少なくとも1つの使用を含む。前記遺伝子座の組み合わせを用いてもよい。

【0023】

感染症に対する抵抗性を示唆するのが前記特定のアレルの存在であること、故に、本発明の特定のアレルの不在が、前記感染症にかかる素因または罹病性を示唆することに注目するのが、重要である。本発明の最も好ましい実施形態において、問題になっている感染症において、HIVウイルスが、AIDSの原因因子である。この観点から、本発明は、個体がHIV感染症に対して抵抗力があるかどうか、または、彼らがそれに感染しやすく、従って、前記疾患にかかるリスクが高いかどうかを測定する方法を提供する。

【0024】

故に、本発明はまた、感染症に対する抵抗性を決定する方法を提供する。前記方法は、被験者からDNA運搬サンプルを得る工程、および前記サンプルを分析し、マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S423 & D22S418またはD22S272の少なくとも1つに存在する前記アレルを同定する工程を含み、マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S423 & D22S418またはD22S272における特定のアレルの存在が、感染症に対する抵抗性を示す。

【0025】

別の観点において、本発明は、HIV感染症にかかりやすい素因を診断するための方法を提供する。この方法は、前記マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S1166、D22S423、D22S1169、D22S418またはD22S272の1、複数または各々の存在または不在について、DNAサ

10

20

30

40

50

ンプルを分析する工程を含む。

【0026】

さらなる観点において、本発明はまた、前記マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S1166、D22S423、D22S1169、D22S418またはD22S272の少なくとも一つを含む染色体フラグメントを運ぶベクターの使用による、感染症にかかりやすい素因を有する被験者を治療するための遺伝子治療のような治療の方法を提供する。以下に説明するように、ウイルス性感染症に対する抵抗性と関連がある免疫細胞機能に影響を及ぼす遺伝子は、前記マイクロサテライト遺伝子座に隣接するヒト染色体のセグメント中に位置することが、非常に予想されている。理論により結びつけられることを望むことなく、この遺伝子（推定上、マウスRfv-3のヒト相同体と呼ばれる）が、被験者個体に感染症抵抗性を付与することが予想され、故に、感染症の治療、予防または療法における、この遺伝子、その転写物、発現ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質、グリコシル化、スルホン化、アセチル化もしくは他の翻訳後誘導体、機能的な誘導体、それらの相同体もしくはフラグメントの使用は、本発明の更なる観点である。

10

【0027】

前記マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S1166、D22S423、D22S1169、D22S418またはD22S272全ては、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質フラグメントをエンコードする。これらのペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質フラグメントおよびそれらの二次的または三次的な誘導体は、全て、ウイルス抵抗性に関連しており、ウイルス性感染症にかかりやすい素因を有すると同定された人において、それらを使用することは、感染症の防止または予防において、有利であろう。

20

【0028】

加えて、前記グリコシル化、スルホン化、リン酸エステル化、アセチル化または他の付加もしくは置換生成物、相同体、スプライス変異体、転写物変異体、または前記マイクロサテライト遺伝子座の核酸配列から誘導可能な生成物は、この目的のために用いられてもよく、故に、本発明の一部を構成すると考えられる。

【0029】

よって、本発明はまた、1またはそれ以上の前記マイクロサテライトD22S929、D22S277、D22S264、D22S1166、D22S423、D22S1169、D22S418またはD22S272によりエンコードされる、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質フラグメントを含む組成物を提供する。本発明はまた、感染症の治療または予防における使用のための、1またはそれ以上の前記マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S1166、D22S423、D22S1169、D22S418またはD22S272によりエンコードされる、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質フラグメントを含む医薬組成物を提供する。

30

【0030】

前記組成物は、殺菌薬、医薬組成物または栄養補助食品もしくは食品添加物であってもよい。前記医薬組成物は、製剤化学の分野において通常知られている添加剤、例えば、ビヒクル、溶剤、希釈剤、結合剤、賦形剤、固化防止剤、保存剤、緩衝剤、安定剤または保水剤を含んでもよい。前記製剤は、錠剤、乳剤、クリーム、懸濁剤、注射可能な懸濁剤、シロップ剤、座剤、膣坐剤、パッチ、含浸インプラントまたは他の通常の運搬方法の形態であってもよい。

40

【0031】

前記組成物が殺菌薬である場合、前記組成物は、粘膜的投与可能な(administerable)製剤、例えば、経口、経鼻、直腸または膣の適用のための製剤で提供されるのが好ましい。直腸または膣の適用のためには、前記殺菌剤組成物は、ゲル剤、クリーム、座剤、膣坐剤の形態または直腸もしくは膣の適用のための他の通常の形態であってもよい。

【0032】

50

前記殺菌薬はまた、特に本発明の前記組成物が免疫学的反応を幾らか引き起こすために用いられるとき、ウイルス性疾患に対する粘膜ワクチン注射として用いられてもよい。

【0033】

典型的には、予防すべきウイルス性感染症がHIV（性的接触により移るであろう）である場合、前記組成物は、避妊薬と組みあわせてもよい。そのような場合、前記避妊薬は、隔膜（diaphragm）、子宮頸キャップ、コンドーム、スポンジもしくは他の膈内もしくは障壁デバイス、被覆IUDデバイス、経口避妊用ピル、避妊用のインプラントもしくは注射剤または、殺精子のゲル剤、ペッサリー、発泡体、フィルムもしくは乳剤であってもよい。

【0034】

従って、さらなる観点において、本発明は、前記マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S1166、D22S423、D22S1169、D22S418またはD22S272の1またはそれ以上によりエンコードされた、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質フラグメントをさらに含む避妊薬を提供する。

10

【0035】

本発明の前記避妊薬は、また、前記マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S1166、D22S423、D22S1169、D22S418またはD22S272の核酸配列から誘導可能な、二次的もしくは三次的な誘導體、グリコシル化、スルホン化、リン酸エステル化もしくは他の付加もしくは置換生成物、相同体、転写物変異体もしくは生成物を、さらに含んでもよい。

20

【0036】

さらなる観点において、本発明はまた、前記感染症の治療用薬物の製造における、前記マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S1166、D22S423、D22S1169、D22S418またはD22S272の1以上によりエンコードされた、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質フラグメントの使用を提供する。

【0037】

加えて、本発明は、前記感染症の治療用薬物の製造における、前記マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S1166、D22S423、D22S1169、D22S418またはD22S272の核酸配列から誘導可能な、二次的もしくは三次的な誘導體、グリコシル化、スルホン化、リン酸エステル化もしくは他の付加もしくは置換生成物、相同体、転写物変異体もしくは生成物の使用に拡大する。

30

【0038】

前記感染症は、ウイルス性感染症であるのが好ましく、レトロウイルス性感染症であるのがより好ましい。最も好ましい実施形態において、前記ウイルスは、HIVウイルスまたはHTLVウイルスである。

【0039】

本発明はまた、感染症に対する抵抗性を決定する方法を提供する。前記方法は、被験者からDNA運搬サンプルを得る工程、および前記サンプルを分析し、マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S423 & D22S418またはD22S272の少なくとも1つに存在するアレルを同定する工程を含み、マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S423 & D22S418またはD22S272における特定のアレルの存在が、感染症に対する抵抗性を示す。

40

【0040】

本発明の方法は、適切なマイクロサテライトマーカーを含むキットを用いることにより、行ってもよい。よって、本発明はまた、感染症にかかりやすい素因の診断用キットを提供し、前記キットは、マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D

50

D 2 2 S 2 6 4、D 2 2 S 4 2 3 & D 2 2 S 4 1 8 または D 2 2 S 2 7 2 の少なくとも 1 つにおける遺伝子型の決定用試薬を含む。前記キットは、マイクロサテライト遺伝子座 D 2 2 S 9 2 9、D 2 2 S 2 7 7、D 2 2 S 2 6 4、D 2 2 S 4 2 3 & D 2 2 S 4 1 8 または D 2 2 S 2 7 2、又はそれに相補的な核酸、フラグメント、多型、スプライス変異体もしくはその相同体の少なくとも 1 つについての遺伝子型を決定するための試薬を含むのがより好ましい。

【0041】

本発明の別の観点において、前記マイクロサテライト遺伝子座の DNA は、ベクター中に組み込まれていてもよい。研究目的のため、前記ベクターは、細胞をトランスフェクトするのに用いられてもよい。前記ベクターはまた、薬物（例えば感染症の治療のための薬物）の製造または、DNA ワクチンの形成または製剤において、または遺伝子治療において、用いられてもよい。

10

【0042】

故に、別の観点において、本発明はまた、マイクロサテライト遺伝子座 D 2 2 S 9 2 9、D 2 2 S 2 7 7、D 2 2 S 2 6 4、D 2 2 S 4 2 3 & D 2 2 S 4 1 8 もしくは D 2 2 S 2 7 2 または、それに相補的な核酸もしくはそのフラグメント、多型、スプライス変異体もしくは相同体の少なくとも 1 つを抱く染色体フラグメントを運ぶベクターを提供する。

【0043】

そのようなベクターの薬剤における使用は、感染症、特にウイルス性感染症、詳細には HIV ウイルスによる感染症の予防または治療において、有利であろう。

20

【0044】

これらのマイクロサテライト遺伝子座の DNA は、DNA ワクチンの生産において、特に有用である。本発明の DNA ワクチンは、裸の、アジュバント DNA または封入 DNA を含んでもよい。前記遺伝子座の前記 DNA 配列は、前記遺伝子座もしくはフラグメント、多型、スプライス変異体もしくはその相同体の DNA 配列に相補的な核酸配列を用いるワクチンの製造に用いてもよい。

【0045】

そのようなワクチンは、経口的にまたは非経口的に投与可能であってもよい。非経口的投与の例には、注射による投与（皮下、静脈または筋肉であろうとなかろうと）、吸入による投与、および粘膜投与を含む。しかし、非経口的投与のこれらの例は、限定または網羅を意図するものではない。

30

【0046】

本発明のワクチンは、免疫原性であるのが好ましい。

【0047】

ワクチンまたは他の医薬の製造のため、これらの遺伝子座をエンコードする DNA ならびに、それらのフラグメント、多型、スプライス変異体、相補的核酸または相同体と共に結合し、またはさもなければ識別し、かつ/または修飾もしくは調節する化合物を同定するのに有用である。これらの化合物は、特に、多くの化合物が選別される場合、チップまたは分析プレートの形態で提供されると、有用である。故に、本発明はまた、前記 DNA に結合可能か、またはさもなければ前記 DNA を識別可能な化合物のスクリーニングのためのチップまたは分析プレートにおける、前記マイクロサテライト遺伝子座 D 2 2 S 9 2 9、D 2 2 S 2 7 7、D 2 2 S 2 6 4、D 2 2 S 4 2 3 & D 2 2 S 4 1 8 もしくは D 2 2 S 2 7 2、または前記遺伝子のフラグメント、多型、スプライス変異体、相補的核酸もしくは相同体をエンコードする DNA の使用を提供する。

40

【0048】

この観点において、本発明はまた、前記マイクロサテライト遺伝子座 D 2 2 S 9 2 9、D 2 2 S 2 7 7、D 2 2 S 2 6 4、D 2 2 S 4 2 3 & D 2 2 S 4 1 8 もしくは D 2 2 S 2 7 2 または、前記遺伝子のフラグメント、多型、スプライス変異体、相補的核酸もしくは相同体をエンコードする DNA を含むチップまたは分析プレートを提供する。

【0049】

50

前記チップまたは分析プレートは、医療的診断または研究において用いられてもよい。

【0050】

前記DNAは、アミノ酸配列（これも用いられてもよい）をエンコードするので、本発明はまた、前記マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S423 & D22S418もしくはD22S272、前記遺伝子の相補的な核酸もしくはフラグメント、多型、スプライス変異体もしくは相同体に隣接する染色体部分に位置する遺伝子によりエンコードされた、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質または、グリコシル化、スルホン化、アセチル化もしくは他の翻訳後誘導体、機能的な誘導体、前記タンパク質の相同体もしくはフラグメントを含むチップまたは分析プレートを提供する。

10

【0051】

加えて、本発明は、前記マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S423 & D22S418もしくはD22S272、前記遺伝子の相補的な核酸もしくはフラグメント、多型、スプライス変異体もしくは相同体に隣接する染色体部分に位置する遺伝子によりエンコードされた、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、またはグリコシル化、スルホン化、アセチル化もしくは他の翻訳後誘導体、機能的な誘導体、前記タンパク質の相同体もしくはフラグメントに結合するか、またはさもなくば、識別し、修飾するかまたは擬態することが可能な化合物のスクリーニングにおける、そのようなチップまたは分析プレートの使用を包含する。

【0052】

本発明者らは、本発明のペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質および前記核酸配列が、免疫グロブリンA (IgA) の生産を刺激し、それらが、感染症に対する抵抗性を促進することを予測した。特に、そのような化合物は、IgA、特に、ウイルス反応性粘膜IgAの粘膜生産を刺激するのに用いることが可能である。

20

【0053】

故に、本発明はまた、前記マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S423 & D22S418もしくはD22S272、または前記遺伝子に相補的な核酸もしくはフラグメント、多型、スプライス変異体もしくは相同体に隣接する染色体部分に位置する遺伝子によりエンコードされた、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、またはグリコシル化、スルホン化、アセチル化もしくは他の翻訳後誘導体、機能的な誘導体、前記タンパク質の相同体もしくはフラグメントの、免疫グロブリンA (感染症に対する抵抗性を提供するか、または抗ウイルス活性を有する) を生産するための使用を提供する。

30

【0054】

加えて、本発明は、マイクロサテライト遺伝子座D22S929、D22S277、D22S264、D22S423 & D22S418もしくはD22S272、前記遺伝子の相補的な核酸もしくはフラグメント、多型、スプライス変異体もしくは相同体の、免疫グロブリンA (感染症に対する抵抗性を提供するか、または抗ウイルス活性を有する) の生産を引き起こすための使用を提供する。

【0055】

そのようにして生産されたIgAは、感染症、特にウイルス性感染症、最も詳細にはHIV感染症の治療または予防のための組成物において、用いることができる。

40

【0056】

IgAは、単独でまたは、前述の医薬組成物のいずれかと組み合わせて用いられてもよい。

【0057】

ウイルス侵入および複製およびレトロウイルス性感染症に対する免疫応答に影響を与える宿主遺伝要因は、マウスモデルを用いることにより、広く研究されている [31 - 34]。フレンド・マウス白血病ウイルスコンプレックス (FV) は、複製成分フレンド・マウス・ヘルパーウイルス (F-MuLV) と、不完全な脾臓フォーカス形成ウイルスとか

50

ら構成される。FVは、感染しやすい血統の免疫適格成熟マウスへの接種によりすぐ、感染赤血球前駆細胞の迅速な増殖を誘導する。過酷な免疫抑制と関連するFVの持続的感染は、最終的に、細胞転写物因子の挿入活性化または腫瘍抑圧遺伝子の破壊により、白血球細胞のモノクローナルまたはオリゴクローナルの拡大の出現を引き起こす。宿主遺伝子遺伝子座、Fv-1-Fv-4は、標的細胞におけるウイルス侵入および複製を直接制御するが、同定されている[35-38]。しかし、宿主動物が上記遺伝子座において同じ感染しやすい遺伝子型を分け合うときでさえ、疾患の発生および進行の割合は、FV抗原への免疫応答に影響を及ぼす幾つかの遺伝子座における宿主遺伝子型次第で、依然として激しく変化する[33]。2つの主要組織適合複合体(MHC)クラスII遺伝子座は、ウイルス外皮抗原のTヘルパー細胞認識を直接制限し[39、40]、一方、クラスI遺伝子座は、ウイルス抗原特異性T-細胞からのサイトカインの生産に影響を及ぼす[41]。MHCクラスIb領域に位置する別の遺伝子座は、天然のキラー細胞機能に影響を及ぼすかもしれない[42、43]。染色体15に位置しており、従って、MHCに関連性のない別の宿主遺伝子座は、依然として、FV感染後のウイルス血症の持続性に強く影響を及ぼす[33、44-46]。同じ非MHC遺伝子座における遺伝子型は、また、感染細胞表面におけるウイルス抗原の発現を調整する細胞毒性抗体の生産に影響を及ぼす[47]。しかし、ウイルス血症の持続性と、ウイルス-中和抗体の生産との間の有り得る関係は、直接試験されていない。ここで、我々は、FV感染によりすぐウイルス-中和抗体の生産に影響を及ぼすマウス遺伝子座に関する、連鎖分析を行った。

10

20

【0058】

このマウス研究の拡大により、意外にも、我々発明者らは、HIV-感染していない個体における、HIV-1への強力な免疫応答と関連するヒト染色体マーカーの立証を行った。

【0059】

前記遺伝子Rfv-3は、フレンド白血球レトロウイルスに感染したマウスが、感染後、30~60日までにウイルス血症から回復するかどうかを決定する単独常染色体遺伝子として、元々定義されていた[49、50]。この遺伝子は、マウス染色体15上に位置付けられている[51、52]が、その分子的同定は依然として知られていない。フレンド・レトロウイルス感染症に対する免疫抵抗性はまた、前記ウイルス外皮抗原へのT-リンパ球応答を制御する、マウス主要組織適合複合体(MHC)、H2の遺伝子により影響を受ける[20、53、54]。類似遺伝子型血統においてテストしたとき、ウイルス-中和抗体の初期の生産が、Rfv-3遺伝子座に抵抗力があるアレル(Rfv-3^r)、またはマウスMHCに応答ハプロタイプ(H2^b)のいずれかを有するマウスにおいて観察され(図1)、Rfv-3およびH2は、共通の経路により、免疫システムに影響を与えるであろうことが示唆された。さらに、Rfv-3^rアレルとH2^bハプロタイプの両方を有するマウスは、Rfv-3^rを欠くH2^{a/b}マウスと比較して、ウイルス-中和抗体のより高いレベルと、IgMからIgGへのクラス転換のより高い頻度を示し(図1)、さらに、H2と協同して、Rfv-3が、T-ヘルパー細胞機能を調節しているかもしれないことを示している。これは、HIV特異的IgA生産が、IgGの明白な不在において、なぜESNにおいて検出されるのかと潜在的関連性があった(例えば、表1参照)。特に、HIV-1抗原特異性Tヘルパー細胞応答性と、T細胞からのサイトカイン生産のパターンとが、ESNとHIV-感染個体との間で相違していてもよい[14、16、48]。

30

40

【0060】

感染日後(PID)15でRfv-3-関連表現型(ウイルス-中和抗体の力価により定義された)が隔離された(B10.AxA)xA戻し交配マウスを用い、本発明者らは、詳細な連鎖分析を行い、D15Mit1とD15Mit118との間のマウス染色体15の3-Mbpセグメント以内にこの遺伝子を位置付けた(図2、4、5、8)。前記マウスマーカーの物理的マッピングのため、アンサンブル・ゲノム・ブラウザー(<http://www.ensembl.org/>)において、マウス染色体15のこの領域にシン

50

テニ—な、ヒト染色体22のセグメントに関して見出した情報を用い、2つの種間で相
 同性な遺伝子を、公知の単純配列長多型 (SSLP) マーカーに沿って並べた。その結果、
 多形性であり、かつ、Rfv-3- 連関遺伝子のヒト相同体の近辺に位置するSSLP遺
 伝子座が幾つか同定された (図2、4、5、8)。末梢血液単核細胞 (PBMCs) は、
 書面にされたインフォームドコンセントの下、予め文書で示されたESN個体およびHI
 V- 感染個体により提供された。名簿に登録された前記ESN全てを、精液または膣の分
 泌物の細胞における血清HIV- 1- 反応性IgG、血漿HIV RNAおよびHIV c
 DNAに関してテストしたところ、それらのどれも、HIV- 1の存在を示さず、一方、
 前記HIV- 感染個体は、これらのテストにおいて全て陽性であった。前記PBMCsか
 ら単離されたゲノムDNAをテンプレートとして用いて、染色体22以内の前記SSLP
 10 遺伝子座におけるアレルが、PCR- 増幅フラグメントのサイズを決定することにより、
 同定された (図3および表1)。その結果、D22S277遺伝子座におけるアレル頻度
 の分布は、ESN群とHIV- 感染群との間で著しく相違した (2×11 表について X^2
 $= 20.2$ 、フィッシャーの直接確率検定により $p = 0.020$)。異なった見方では
 、テストした前記18人のESNのうち10人が、前記D22S277遺伝子座に、15
 4- bp、156- bpまたは158- bpのフラグメントを生じる3つの特異なアレル
 のうち少なくとも1つを有し、一方、これらの3つのアレルのうち1つは、テストされた
 18人のHIV- 感染人のなかで、ほんの2人の個体にのみ、見出された ($X^2 = 8.0$
 、フィッシャーの直接確率検定によれば $p = 0.012$)。これらの3つのアレルは、稀
 20 なものの中で、ゲノムデータベース (<http://gdbwww.gdb.org/>) において、それぞれ、7
 、5%および9%の頻度で報告されている。一方、160- bpまたは162- bpのフ
 ラグメントを生じる前記アレルは、それぞれ29%および14%の頻度で報告され、白人
 の中でむしろ普通であり、これらの後者アレルは、両方の集団において、同等の頻度で観
 察された (表1)。従って、18人のESNsのうち2人は、158- bpのフラグメン
 トを生じるアレルについて同型接合であり、3人は、前記3つの稀なアレルのうち2つ
 の間の接合体であったことが、強調されるべきである。対照的に、前記稀なアレルのそのよ
 うな接合体は、前記HIV- 感染個体の中には見出されなかった (18のうち5対18の
 うち0、フィッシャーの直接確率検定により、生じる $p = 0.045$)。

【0061】

特異な稀なアレルの分布において、顕著さが少なく、しかし同様の非対称が、周囲の染
 30 色体遺伝子座においてもまた観察されるので、ESNsの中で前記D22S277遺伝子
 座における特異なアレルの上記集積は、符合しているようには見えない (表1)。実際、
 D22S929に、144- bpまたは146- bpのフラグメントを生じるアレルが、
 18人のESNの中で5人に見出され、1人の個体は、前記2つのアレルの一つについて
 同型接合でさえあり、一方、テストした前記17人のHIV- 感染個体の中でほんの1人
 の個体が、そのようなアレルを有していた。132bp、142bpまたは148- bp
 のフラグメントのいずれか一つを生じる稀なアレルが、D22S272遺伝子座において
 、18人のESNsのうち5人に、しかし、18人のテストしたHIV- 感染個体のほん
 の1人に見出された。しかし、アレル頻度の分布 (図2、4、5、8) または稀なアレル
 40 を有する個体の頻度 (表1) のいずれも、この領域 (例えばD22S1169) から離れた
 遺伝子座において前記ESN集団およびHIV- 感染集団の間で著しく相違していない

【0062】

【表 1】

HIV-暴露血清陰性および HIV-感染個体のヒト染色体 22 以内の、SSLP
遺伝子座における遺伝子型

個体	尿道または膣のス ワブにおける HIV-1-反応性抗体 (ELISA 吸光度)		SSLP 遺伝子座				
	IgA	IgG	D22S929	D22S277	D22S272	D22S276	D22S1169
ESN1-1	0.784	0.002	132/142	166 (赤毛)	134/140	243/251	126/128
ESN1-2	0.811	ND	140 (赤毛)	<u>156</u> /160	134 (赤毛)	245 (赤毛)	120/126
ESN1-3	0.217	ND	138/ <u>144</u>	164/170	134 (赤毛)	245 (赤毛)	120/126
ESN1-4	0.557	0.021	<u>144</u> (赤毛)	162/166	<u>132/148</u>	243/249	126/130
ESN1-5	0.911	0.006	138 (赤毛)	<u>158</u> /162	<u>132/142</u>	243/251	126 (赤毛)
ESN1-6	0.217	0.006	138/140	162/164	134/ <u>142</u>	245/251	128/130
ESN1-7	0.248	0.001	138/ <u>146</u>	160/162	134/136	243/251	126/128
ESN1-8	0.852	0.004	138/140	<u>158</u> /164	<u>132</u> /140	243/245	126/128
ESN2-1	1.012	ND	134/ <u>144</u>	<u>154</u> /160	140/150	<u>241</u> /253	120/126
ESN2-2	0.478	ND	134/142	<u>156</u> /164	134/140	243 (赤毛)	118/126
ESN2-3	0.263	0.008	134/136	<u>158</u> (赤毛)	134/ <u>148</u>	<u>241</u> /243	120/128
ESN2-4	0.171	0.008	138/ <u>146</u>	160/164	134/140	243/245	126/130
ESN2-5	0.279	0.007	138/140	160/164	134/136	243/245	118/126

10

20

30

40

ESN2-6	0.246	0.008	138 (赤毛)	<u>158 (赤毛)</u>	134/140	ND	120 (赤毛)
ESN2-7	0.204	0.008	140/142	<u>154/158</u>	134 (赤毛)	ND	120/130
ESN2-8	0.200	0.008	138 (赤毛)	160 (赤毛)	134 (赤毛)	ND	126/128
ESN2-9	0.206	0.006	138 (赤毛)	<u>156/158</u>	140 (赤毛)	243 (赤毛)	118/128
ESN2-10	0.101	0.008	132/140	<u>154/158</u>	134 (赤毛)	241 (赤毛)	120/126
HIV1-1	0.114	1.112	138 (赤毛)	162/172	140 (赤毛)	243/251	126/130
HIV1-2	0.300	1.080	138/140	160/166	134 (赤毛)	243/245	120/126
HIV1-3	0.201	0.754	134/138	168/170	134/136	243 (赤毛)	126 (赤毛)
HIV1-4	0.308	ND	132/138	160/162	134/140	243/245	126 (赤毛)
HIV1-5	0.121	0.587	134/138	160/168	134 (赤毛)	243/245	ND
HIV1-6	0.114	1.120	132/136	<u>158/160</u>	134/140	243/251	118/130
HIV1-7	0.201	0.880	136/140	<u>158/160</u>	134/136	<u>241/243</u>	126/130
HIV1-8	0.412	0.951	136/138	162/164	134/150	245 (赤毛)	118/126
HIV2-1	0.408	0.741	138/ <u>144</u>	160/172	134/140	ND	128/130
HIV2-2	0.301	0.983	138 (赤毛)	164/166	134/140	ND	126 (赤毛)
HIV2-3	ND	ND	140/142	160/164	134/ <u>142</u>	ND	118/126
HIV2-4	0.303	0.360	136 (赤毛)	150/166	134/140	ND	128/130
HIV2-5	0.251	0.449	138/140	162/168	134/140	245 (赤毛)	<u>124/126</u>
HIV2-6	0.513	0.338	ND	166 (赤毛)	134 (赤毛)	ND	120 (赤毛)
HIV2-7	0.514	0.107	132/138	164/172	134 (赤毛)	ND	126/130

10

20

30

40

HIV2-8	ND	ND	138/142	160/170	140/144	ND	120 (株)
HIV2-9	0.204	ND	138/142	162 (株)	134/136	ND	118/126
HIV2-10	0.228	ND	138 (株)	162/170	134/140	245/251	128/130

【0063】

各遺伝子座における稀なアレル（これらの頻度は10%未満と報告されている）は、太字で下線で示した。ND、測定せず；ホモ、同型接合。HIV-1に対する血清IgG反応性は、ESNsにおいて、検出不可能であった。

【0064】

上記データは、HIV暴露後の早い段階で、抗レトロウイルス抗体を生じ、クラス転換させる能力を付与する遺伝子の優性応答アレル（おそらくマウスRfv-3^rに相長的）が、前記D22S277遺伝子座の近くに存在し、位置し、その結果、前記ESN状態は、前記154-bp、156-bpまたは158-bpのフラグメントを生じるD22S277アレルと一緒に分離されるという仮定と一致する。HIV-感染症に対する抵抗性および/またはAIDS進行の推移に影響を及ぼすと予め報告されているヒト遺伝子（CCR5およびCCR2は3p21に位置し、SDF1は10q11.1に位置し、HLAは6p21.3に位置し、KIRsは19q13.4に位置し、IL10は1q31-32に位置する。）は、前記ヒト染色体のこの領域には位置していなかった。

【0065】

HIV感染症に対する抵抗性について確立された遺伝的根拠は、前記HIVコレセプター遺伝子、CCR5の突然変異形態（この受容体の細胞表面発現が欠落する結果になる）についての同型接合性である[1-5]。しかし、前記突然変異、CCR5 32が、稀であり、前記同型接合性が、白人のほんの1%にのみ見出されている[1、3]ので、ESN状態のより普通の現象の原因となり得ない。実際、前記CCR5 32突然変異は、先に書面化されたESNsにおいては見出されなかった[10、14、48]。一方、大部分のESNsは、HIV外皮誘導抗原ペプチドでの刺激と同時に、HIV-血清陽性との比較において、PBMCsからの、より高いIL-2生産と、より低いIL-10生産を示した[14]。従って、T-細胞機能を調節するいくつかの遺伝子は、ESNsと、HIV-血清陽性との間で相違するかもしれない可能性がある。Rfv-3が、マウスにおける幾らかのT-ヘルパー細胞機能を調整しているようなので（図1）、そのヒト相同体の分析と共に、その分子的性質の同定が、我々に、HIV感染症の予防的および治療的手段への全く新しい方向性を提供するかもしれない。

【0066】

本発明の実施形態を、例示のみを目的として、添付の図面により説明されたような、以下の実施例を参照して、以下に説明する。

図1は、マウスの類似遺伝子型血統におけるPID16-20で検出されたフレンドウイルス-中和抗体の力価を示す。

図2は、マウス染色体15とヒト染色体22のシンテニーな領域以内に位置するSSLPマーカーと相同性遺伝子との順序と、その間の距離の図表示である。

図3は、D22S277遺伝子座における遺伝子型を示す。

図4は、マウス染色体15とヒト染色体22のシンテニーな領域以内に位置するSSLPマーカーの順序と、その間の距離を示す。抗HIV IgA生産を制御する遺伝子座は、抗レトロウイルス抗体生産を制御するマウス遺伝子に厳密にシンテニーに位置していた。

図5は、フレンドのウイルスに対する抵抗性を付与するマウス遺伝子と、ヒトウイルス抵抗性遺伝子との間の完全な同一性を示す。

10

20

30

40

50

図6は、HIV-1-暴露したが、感染していない個体にのみ観察される、染色体22にわたる連鎖不平衡の断絶を示す図表説明である。このことにより、HIV-1暴露したが、感染していない個体の祖先に起こった、過去の突然変異または組換え事象の証拠が示される。

図7は、HIV-1抵抗力があるアレルの部位マッピングおよび頻度ならびにマウス染色体15上のマウス抗体制御遺伝子座およびヒト染色体22のシニエーな領域の図表説明を示し、また、HIV-1-暴露したが、感染していない個体にのみ観察される、染色体22にわたる連鎖不平衡の断絶ならびに、HIV-1暴露したが、感染していない個体の祖先に起こった、過去の突然変異または組換え事象の証拠を示す。

【実施例1】

10

【0067】

図1から理解されるように、前記のように、マウスを、フレンドレトロウイルスコンプレックスの $H2^a/a$ 群について150脾臓フォーカス形成ユニット(SFFU)、または、フレンドレトロウイルスコンプレックスの $H2^a/b$ 群について1,500SFFUのいずれかで、接種した[54、56、57]。それらマウスは、PID16-20でエーテル麻酔下、眼窩後方洞から採血され、各血清を、フレンド白血病ヘルパーウイルス感染力を中和する能力について、病巣酵素抗体法分析によりテストした[54、56、57]。各個体マウスから得られた全血清の中和力価を示す。 $H2^a/b$ マウスからの血清は、また、IgGクラスの中和抗体の存在について、それらを、50mMの2-メルカプトエタノールで前記のように処理することにより、テストし[54、56、57]、ウイルス-中和IgGを含んでいたものを、閉じた記号で示す。 $H2^a/a$ (B10.AxA)xAの戻し交配マウスは、それらの実験的に同定されたD15Mit71アレルを基に、Rfv-3^{s/s}群またはRfv-3^{r/s}群のいずれかに分割した。定義により、 $H2^a/a$ およびRfv-3^{r/s}である(B10.AxA)_{F1}マウスの抗体力価を、四角形の記号で示す。平均力価を、各遺伝子グループ間で学生t検定により比較し、星印は、統計的に著しい相違を示す($p < 0.0001$)。Rfv-3^{r/s}、 $H2^a/b$ マウスの中で中和IgGを有する個体(6/11)の頻度は、Rfv-3^{s/s}、 $H2^a/b$ マウスのそれよりも、著しく高かった(1/14)(フィッシャーの直接確率検定により $p = 0.02$)。

20

【0068】

30

図2、4および5の図表説明において、セントロメア(O)は、左に配置した。Rfv-3遺伝子座の位置は、185(B10.AxA)xAの戻し交配マウスを用いて、連鎖分析により決定した。SLP遺伝子型とPID15におけるウイルス-中和抗体力価との間の強力な関係($X^2 = 62.2$)が、前記D15Mit71遺伝子座において観察された。前記Rfv-3遺伝子座の位置は、前記8匹の危篤動物(染色体組換えが、前記D15Mit105遺伝子座と前記D15Mit107遺伝子座との間に同定されている)における前記SLP遺伝子型と、抗体力価とを関係づけることにより、示された領域に、さらに狭められた。前記ESN感染群と、前記HIV-感染群との間の各ヒト遺伝子座におけるアレル頻度の分布における相違を、 $2 \times$ (アレルの数)表について、 X^2 分析を行うことにより、分析した。上記で測定した X^2 値を、各マイクロサテライト遺伝子座の名前の下に示した。

40

【0069】

図3は、PCRおよびフラグメント分析を、各サンプルについて少なくとも3回行った、前記D22S277遺伝子座における遺伝子型を示し、2つの別々の実験からの代表的結果をここに示す。

【0070】

ESNおよびHIV-血清陽性個体

HIV血清状態について一致しない18の異性間カップルを、研究において登録した。11のカップルにおいて、コンドームなしの挿入的性交の長期経歴にかかわらず、女性のパートナーがHIV-感染しており、一方、男性のパートナーがHIV-血清陰性であっ

50

た。残りの7カップルにおいて、男性のパートナーが、HIV-感染であり、一方、女性のパートナーがHIV血清反応陰性であった。ESNに関する試験対象患者基準は、研究期間の前4ヶ月以内に、潜在的に危険な状態にある性交の少なくとも1回の挿入がある、少なくとも4年の間多重的無防備な性的挿入の経歴であった。前記カップルは、4年のうちに平均8回の無防備な性的挿入/年(範囲5~>40)を報告していた。膣性交が基準であり、口腔性交は、ほんの非常に稀に行われた。肛門性交は、いずれのカップルにも報告されなかった。HIV-1ウイルス血症を、先に説明したようにテストし[14、16]、全てのESNsにおいて、検出不可能であった。前記ESNsにおいて、HIV-1の粘膜的限定存在の可能性を除外するため、cDNAを前記のようにして精液又は膣液中、分析した[14、16]。HIV-1 cDNAを、全ての前記HIV-感染個体において検出したが、前記ESNsにおいては検出しなかった。血清および尿道または膣のスワブにおけるHIV-1特異性抗体の滴度を、前記のようにして行った[14-17、48、55]。前記ESNsは、検出可能なHIV-反応性IgGをかれらの血清中に有さず、一方、全ての前記HIV-感染個体は、HIV-1に対して反応性な血清IgGについて、陽性であった。すべての分析を、盲検的に行った。ミラノのルイジ・サッコ病院(Luigi Sacco Hospital, Milano)およびフィレンツェのサンタ・マリア・アヌツィア病院(Santa Maria Annunziata Hospital, Florence)の研究倫理委員会は、このプロトコルを承認した。書面にされたインフォームドコンセントが、登録前の全ての患者から得られた。

10

20

30

40

50

【0071】

前記Rfv-3遺伝子の染色体マッピング

(B10.AxA)xA戻し交配マウスを、前記のように、繁殖させ、150の脾臓フォーカス形成ユニット(SFFU)のフレンド・ウイルス・コンプレックスで感染させ、PID15において前記眼窩後方の洞から採血した[56、57]。フレンド・ウイルス-中和抗体の血清力価は、前記のように測定した[54、56、57]。後部チップを切断して、ゲノムDNAを調製し、SSLP遺伝子座D15Mit22、D15Mit28、D15Mit71、D15Mit171およびD15Mit42におけるアレルを、特定の部位のPCRプライマーを用いて同定した[51、52]。D15Mit28とD15Mit171との間に組換えを有する個体は、前記更なるSSLP遺伝子座におけるこれらの遺伝子型について、さらに分析した(図2、4、5)。

【0072】

ヒトSSLPマーカの分析

各ESN個体およびHIV-感染個体のPBMCsから抽出したゲノムDNA(0.5 μg)を、以下のフランキングプライマーセット[58]:

D22S277 左、TTCTTGTGTGGTAGTCTGGG; (配列番号:1)

D22S277 右、TACCNACTCCCCAACTATG; (配列番号:2)

D22S272 左、GAGTTTTGTTTGCCTGGCAC; (配列番号:3)

D22S272 右、AATGCACGACCCACCTAAAG; (配列番号:4)

D22S276 左、CATTCTGCCAAGCAATTTAT; (配列番号:5)

D22S276 右、GCTGCTCTTTAAGTTTCTTGACC; (配列番号:6)

D22S929 左、GGAGCTGCATGTACTAGCTGG; (配列番号:7)

D22S929 右、GCATTTATGGAGTATCCACAG; (配列番号:8)

D22S1169 左、GCACACACATGCACATAATC; (配列番号:9) および

D22S1169 右、AACAACTTCCAGCAGACG. (配列番号:10)

を用いる40サイクルのPCR増幅のためのテンプレートとして、用いた。

【0073】

各上記セットの左プライマーは、フラグメント分析における検出のため、5'末端をCy5でロングリードタワー(Long Read Tower)DNAシーケンサー(アマシャム・ファルマシア・バイオテックUK、リミテッド、英国のバッキンガムシャー(Amersham Pharmacia Biotech UK, Ltd., Buckinghamshire, UK))でラベルした。PCR増幅を以下の条件で

、組換えTaqポリメラーゼ(インビトジェン・ライフ・テクノロジーズ、米国カルフォルニア州カールスバッド(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, U.S.A.))を用いて行った: 94 で2分間初期の変性、各増幅サイクルは、94 で30秒、55 で30秒、および74 で90秒を含み、最後の伸長は74 で10分であった。遺伝子型について、各PCR増幅フラグメント(50~100fmol)を、適切なサイズのマーカーと共に上記DNA配列に適用し、前記フラグメントサイズを、製造者の取り扱い説明者に従い、前記ALF発現サイズプログラムを用いて同定した。

【実施例2】

【0074】

方法

マウスおよびウイルス

B10.A/S1cマウスおよびA/WySnJマウスの繁殖対を、日本SLCインク(日本、浜松)およびメイン州バーハーバーのザ・ジャクソン・ラボラトリー(The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine)からそれぞれ購入した。これらの親の血統ならびに(B10.A×A)F1および(B10.A×A)×A戻し交配マウスを、繁殖させ、特定の病原体の無い条件下で酪農学園大学および近畿大学薬学部の動物施設で維持した。以下の実験手順は、動物委員会により承認され、各大学の適切なガイドラインのもと、行われた。FVおよび静脈接種の調製は、前記のようにして行われた[42、43、64、65]。

【0075】

ウイルス-中和抗体の分析

マウスを、150脾臓フォーカス形成ユニットのFVで感染させ、感染後、指示された日数のとき、エーテル麻酔下、前記眼窩後方の洞から採血した。血清を集め、用いるまで凍結して保管した。F-MuLV-中和抗体の血清力価を前記のように測定した[43、64、65]。要するに、各血清の連続的2倍希釈物を、F-MuLV、FB29の伝染性分子クローンで慢性的に感染されたマウスダニ(Mus dunni)細胞クローンの培養物から集められたプール上清の標準希釈物と混合し、培養し、24-ウエル組織培養プレート中の感染していないマウスダニ細胞の培養物上に接種した。2日後、F-MuLV-感染細胞の病巣を、前記F-MuLV env遺伝子生成物に特異的なモノクローナル抗体を用いる病巣酵素抗体法分析により、可視化した[74]。全ての分析を、各血清希釈物について、2つのウエルにおいて、行った。中和は、感染細胞病巣の平均数が、前記ウイルスを希釈剤のみと混合したコントロールウエルにおけるものと比較して、<1/4まで減少した場合、著しいと判断した。抗体力価は、著しい中和を生じる最も高い血清希釈により定義した。

【0076】

マウスにおける単純配列長多型(SSLP)の分析

ゲノムDNAを、製造者の取り扱い説明書に従い、DNイージー・ティッシュ(DNeasy Tissue)キット(QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)を用いて、各マウスの後部チップから調製した。各マイクロサテライト遺伝子座について1対のオリゴヌクレオチド・プライマーを、前記マウスゲノム部位(<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/mouse/>, The Whitehead Institute/MIT Center for genome Research, Massachusetts)の遺伝的および物理的マップ内のデータベース中に挙げられている配列情報に基づき、調製し、ゲノムDNAフラグメントのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により、増幅に用いた。50ngの各テンプレートDNAを、製造者の取り扱い説明書に従い、組換えTaqポリメラーゼ(インビトジェン・ライフ・テクノロジーズ、カルフォルニア州カールスバッド)を用いるクイック・サーモ・パーソナルPCRシステム(Quick Thermo Personal)(Nippon Genetics, Tokyo, Japan)により、35サイクルの増幅に付した。PCR生成物は、4%アガロースゲル剤中、電気泳動により分離され、UV光の下、臭化エチジウム染色により、可視化された。

【0077】

10

20

30

40

50

連鎖分析

有意な力価 ($2^{1 \cdot 5}$) の F - M u L V - 中和抗体を有する戻し交配マウスを、プロデューサーとして選定し、一方、検出限界以下の抗体力価 ($< 2^{1 \cdot 3}$) を有するものを、非プロデューサーとして選定した。カットオフポイントは、16の A / W y S n マウスの F - M u L V - 中和力価 (すべては、検出限界以下だった) と、P I D 15 における15の (B 1 0 . A x A / W y S n) F₁ マウス ($2^{1 \cdot 5}$) の群において観察された最低中和力価を基に、決定した。各試験染色体遺伝子座における遺伝子型と、ウイルス - 中和抗体の存在または不在との間の相関関係を、 2×2 の分割表に基づき、ピアソンの χ^2 テストにより分析した。前記染色体遺伝子座およびロッドスコアのマップオーダーを、M A P M A K E R / E X P ソフトウェア・バージョン 3 . 0 b (ゲノム研究のためのホワイトヘッド・インスティテュート / M I T センター) を用いて、多点解析により決定した。

10

【0078】

D 1 5 M i t 1 遺伝子座の物理的マッピング

前記 D 1 5 M i t 6 8 遺伝子座と前記 D 1 5 M i t 1 1 8 遺伝子座との間の、マウス染色体 15 のセグメントをカバーするバクテリアの人工染色体 (B A C) の 3 8 のオーバーラップクローンを、前記 R P C I - 2 3 M e s C 5 7 B L / 6 マウス B A C ライブラリー (カルフォルニア州オークランド、子供病院オークランド研究所 (Children's Hospital Oakland Research Institute, Oakland, California)) から選択し、得た。各マイクロサテライト遺伝子座の存在を、前記のようにして、P C R 分析により、各単離 B A C クローンをテンプレートとして用いて検出した。期待したサイズの P C R 生成物が、テンプレートとして、D 1 5 M i t 1 および R P 2 3 - 2 9 0 M 7 D N A について前記プライマーセットを用いて得られ、前記フランキングプライマーの存在およびこのマイクロサテライト遺伝子座の公知構造とマッチする反復配列を、この B A C クローンのデータベース - 報告配列において、同定した (アクセション No . A L 5 9 1 7 4 6) 。このマイクロサテライト配列の存在は、オーバーラップ B A C クローン、R P 2 3 - 3 0 5 P 1 0 において検出されなかった。

20

【0079】

E U I および H I V - 1 - 感染個体

H I V - 1 血清状態に一致しない 4 2 の異性間カップルを、本研究において、登録した。32のカップルにおいて、コンドームなしの挿入的性交の長期経歴にかかわらず、女性のパートナーが H I V - 1 - 感染であり、一方、男性のパートナーが H I V 血清反応陰性であった。残りの 10 のカップルにおいて、男性のパートナーは、H I V - 1 - 感染であり、一方、女性のパートナーが H I V - 血清陰性であった。E U I 群に関する試験対象患者基準は、研究期間の前 4 ヶ月以内に、潜在的に危険な状態にある性交の少なくとも 1 回の挿入がある、少なくとも 4 年間の間、多重的無防備な性的挿入の経歴であった。前記カップルは、4 年のうちに平均 8 回の無防備な性的挿入 / 年 (範囲 5 ~ > 4 0) を報告していた。49のさらなる年齢および性別が合う H I V - 1 - 感染個体を、イタリア、フローレンス、オスダレ・サンタ・マリア・アヌツィアの伝染性疾患ユニットにより、登録した。最後に、47の感染していない年齢および性別が合う健康なコントロール個体を、ミラノのルイジ・サッコ病院およびフローレンスのサンタ・マリア・アヌツィア病院から、ボランティアとして登録した。ミラノのルイジ・サッコ病院およびフィレンツェのサンタ・マリア・アヌツィア病院の研究倫理委員会は、このプロトコルを承認し、登録者の遺伝子型分析は、近畿大学薬学部の倫理委員会により承認された。書面にされたインフォームド consent が、記入前の全ての患者から得られ、サンプルは、匿名扱いされ、盲検的に分析した。

30

40

【0080】

表現型定義

血漿 H I V - 1 ロードは、先に説明したように、A M P L I C O R H I V モニタテスト (ロッシュ診断システム、ナトリー、ニュージャージー) を用いて、定量し [2 1 、 2 3] 、全ての E U I s および健康なコントロールにおいて検出不可能であった。前記 E U

50

I sにおいて、H I V - 1の粘膜的限定存在の可能性を除外するため、逆転写物および前記のようなP C R法により、可能性のあるH I V - 1 c D N Aを前記のようにして精液又は膿液中、分析した[2 1、2 3]。H I V - 1 c D N Aは、前記E U I sにおいて検出されなかった。血清および尿道または膣のスワブにおけるH I V - 1 - 特定の抗体の滴定を、前記のようにして、H I V E I Aテスト(カルフォルニア州、バークレー、カリプターバイオメジカルコーポレーション)を用いて、酵素関連イムノ分析により行った[2 1 - 2 6]。前記E U I sは、彼らの血清中、検出可能なH I V - 反応性I g Gは有さなかった一方、全てのH I V - 感染個体は、H I V - 1に対して血清I g G反応性について陽性であった。末梢血液におけるH I V - 1 - 反応性記憶T - 細胞の検出および列挙について、酵素関連イムノスポット(E L I S P O T)分析を前記のように行った[2 3]。要するに、P B M C sは、イムノ優性および無差別エピトープ(前記H I V - 1外皮グリコタンパク質、g p 1 6 0において同定された)を表現する5の合成ペプチドの混合物で刺激され、抗インターフェロン(I F N) - 抗体 - 被覆9 6 ウエルプレートにおいて培養された。分泌I F N - のスポットは、可視化され、ビオチン接合抗I F N - 抗体(スウェーデン、ナッカ、マブテック(Mabtech, Nacka, Sweden)、ストレプトアビジン接合アルカリホスファターゼ(マブテック)、およびホスファターゼ基質キット(カルフォルニア州、ヘラクレス、バイオ・ラッド・ラボラトリーズ(Bio-Rad Laboratories, Hercules, California))を用いて、カウントした。

10

【 0 0 8 1 】

ヒトS S L Pマーカーの分析

20

各試験個体のP B M C sから抽出された5 0 0 n gのゲノムD N Aを、エンSEMBL(E n s e m b l)ゲノムブラウザに記述されている配列データを基に合成したフランキングプライマーセットを用いるP C R増幅の4 0サイクルについて、前記テンプレートとして用いた。各左プライマーを、A B I 3 1 0 0 D N Aシーケンサー(アプライド・バイオシステム・フォスターシティ、カルフォルニア州(Applied Biosystems, Foster City, California))でのフラグメント分析における検出のため、蛍光(florescent)染料でラベルした。P C R増幅を、以下の条件下で、組換えT a qポリメラーゼ(インビトジェン・ライフ・テクノロジーズ)を用いて行った: 9 4 で2分の初期の変性、各増幅サイクルは、9 4 で3 0秒、5 5 で3 0秒、および7 4 で9 0秒を含み、最後の伸長は、7 4 で1 0分であった。遺伝子型について、各P C R増幅フラグメント(5 0 - 1 0 0 f m o l)を、適切なサイズのマーカーと共に上記D N Aシーケンサーに適用した。ピーク同定とサイズ測定を、ジーンスキャンソフトウェア(GeneScan software) (アプライド・バイオシステム(Applied Biosystems))で行った。完全なフラグメントのサイズの決定について、各試験遺伝子座について少なくとも2つの同型接合個体から得られるP C R生成物を、p C R 2 . 1 - T O P Oベクター(インビトジェン・ライフ・テクノロジーズ)にクローン化し、前記M 1 3フォワードプライマーを用いることにより、配列決定した。配列決定は、少なくとも6つの同一クローンが各アレルについて観察されるまで、繰り返された。

30

【 0 0 8 2 】

統計分析

40

アレル頻度分布と免疫学的分析の結果との比較について用いられた標準統計値を、文章および表注釈の対応部分において明記した。3つの表現型群の間で異なる頻度を有する優性アレルの可能性のある存在を試験するために、数学的分析を、以下のようにして行った。 $x_{i j}$ を、前記E U I群について前記遺伝子型 i / j ($i j$)を有する個体の数として定義した。[前記において、

【 0 0 8 3 】

【数 1】

$$n = \sum_{i,j} x_{ij}$$

は、この群に属する個体の全数である。 $x = (x_{ij})_{i,j}$ が、パラメータ $a = (a_{ij})_{i,j}$ を有する多項式分布を有すると仮定する [前記において、

【0084】

10

【数 2】

$$\sum_{i,j} a_{ij} = 1$$

]。便宜上、 $a_{ji} = a_{ij}$ とする。同様に、表記法 y, b および z, c を、前記 HIV - 1 - 感染群および健康な制御群についてそれぞれ定義した。前記 EUI 群について前記アレリ i を有する前記個体の前記頻度は、

【0085】

20

【数 3】

$$a_i = \sum_k a_{ik}.$$

として表現された。同様に、 b_i および c_i を定義する。前記 EUI 群および HIV 群について前記アレリ i を有する個体の頻度が同じであるという仮定は、 $H_i : a_i = b_i$ として表現される。同様に、また、仮定 $a_i = c_i$ は、前記 EUI を健康な制御群と比較するために考慮される。

30

【0086】

本研究において、我々は、多重仮説 H_i 's をテストし、対応する統計 P 値を得た。各 H_i についての判断を、プリセット危険率有意水準においてたとえ行ったとしても、全体判断は、実際、より大きな危険率有意水準で行われるかもしれない、というのは、誤差率は、1 より多いテストの後、蓄積しているからであることに、注目されたい。上記のような帰無仮説の誤った排除は、以下のような閉じたテスト手順を用いることにより、解決することができる [77]。

【0087】

【数 4】

40

$$\mathcal{H}$$

を、前記仮説 H_i 's の全ての交点からなる閉じたセットとする。いずれの仮定

【0088】

【数 5】

$$H \in \mathcal{H}$$

について、共通の有意なレベルを有する前記排除領域を作ることが可能と仮定する。閉じ

50

たテスト手順によれば、対応する排除領域を用いて、Hを含む仮説全てを我々が排除した後にはのみ、われわれは、

【0089】

【数6】

$$H \in \mathcal{H}$$

を排除することができるという。従って、残りの問題は、前記排除領域を設定することである。

【0090】

t_i を、前記仮定 H_i について、標準化されたテスト統計値とする。対応する排除領域は、

【0091】

【数7】

$$W_i = \{|t_i| > e_i\}$$

となる。共通の仮定 H を考慮する。例えば、H を、 H_1, \dots, H_I の交点とする。対応する排除領域は、

【0092】

【数8】

$$W = \{\max_{i=1, \dots, I} |t_i| > e\}$$

で定義することができる。我々は、以下の分散安定化タイプを、標準化テスト統計値として用いた。

【0093】

【数9】

$$t_i = (\sin^{-1} \sqrt{x_i/n_x} - \sin^{-1} \sqrt{y_i/n_y}) / \sqrt{1/4n_x + 1/4n_y}$$

前記式中、

【0094】

【数10】

$$n_x = \sum_{i,j} x_{ij} \text{ および } n_y = \sum_{i,j} y_{ij}$$

【0095】

一般に用いられそうな比とピアソンの χ^2 テストを超える利点として、上記のタイプにより、我々は、P値が小さいほど、対応する帰無仮説の前記排除が強くなると解釈するのが可能になった。というのも、逆正弦の分散が、サンプルとは無関係に一定であったからである。前記手順はまた、別のメリットがある:もし、最大交点仮定

【0096】

10

20

30

40

【数 1 1】

$$H \in H$$

が、排除されれば、前記最小 P 値に対応する前記個体仮定が、閉じたテスト手順の観点から、自動的に排除されうる。加えて、もし、前記最小 P 値に対応する前記仮定のみが、前記個体仮説のうち排除されるなら、前記閉じたテスト手順の観点から、排除のみされた仮定である。もし、アレルの数が I であれば、I 仮説、 H_i 's がある。単純にするため、 H_i 's について対応する P 値を、 $p_1 < \dots < p_I$ と考える。前記最大交点仮定は、 H_i 's の交点である。この仮定が排除されれば、換言すれば、もし、前記対応 P 値が前記共通危険率有意水準より低ければ、前記最小 P 値に対応する前記仮定 H_1 は、前記閉じたテスト手順の観点から排除されうる。加えて、もし、 $p_1 < \dots < p_2 < \dots$ であれば、排除された仮定は、 H_1 のみである。

10

【0097】

t_i 's の結合分布は、通常、前記帰無仮説の下の変量正規分布により近似することができ、従って、対応する近似 P 値は、容易に前記個体仮説について計算することができる。共通の仮定についての近似 P 値は、前記中心極限定理と前記パラメータ・ブートストラップを用いて、計算することができる [78]。この手順は、単純なボンデローニ補正より強力であることに注意されたい。小さい頻度のアレルの存在による不必要な妨害を避けるため、我々は、共通の仮定を考慮したとき、0.1 より大きな推定頻度である仮説のみをテストした。これは、0.1 より小さな頻度のアレルは、全体の群の表現型を表現し得ないからである。近似多変量から 100, 000 の無作為抽出サンプルを引き出すことにより、計算を行った。本研究において、我々は、感染後 15 日における FV - 感染 (B10 . A x A) x A 戻し交配マウスにおけるウイルス - 中和抗体の検出可能力価の存在または不在が、染色体 15 遺伝子座におけるそれらの遺伝子型と強固に関連していることを示した。連鎖地図データは、前記ウイルス中和抗体の生産を制御する単一遺伝子は、前記 D15 Mit 71 遺伝子座の近傍に位置し、予め染色体上に位置付けられた Rfv - 3 遺伝子座と共有化していることを示している [45、46]。前記 Rfv - 3 - 関連表現型が FV 感染症後 35 ~ 40 日までのウイルス血症のクリアランスにより、定義されており [44 - 46]、中和抗体が、染色体 15 (図 4) 上の前記 B10 - 誘導優性アレルを有するマウスにおいて感染後 15 日において検出可能であるので、ウイルス中和抗体の初期生産が、ウイルス血症の初期クリアランスと関連していることは、大いに予想される。図 1 から理解されるように、a、FV 感染後、異なる時点での (B10 . A x A) F1

20

30

【0098】

【数 1 2】



40

マウスおよび A

【0099】

【数 1 3】



マウスにおけるウイルス - 中和抗体の平均力価 (n = 11 - 16) における変化。S . E . M . は、筋で示した。破線は、検出限界を示す。b、PID15 においてテストした各

50

個体マウスにおけるウイルス - 中和抗体の力価。D 1 5 M i t 7 1 遺伝子座における遺伝子型は、前記 A - 誘導アレル

【 0 1 0 0 】

【 数 1 4 】

(○)

についての同型接合か、または B 1 0 . A 誘導および A - 誘導アレル

【 0 1 0 1 】

【 数 1 5 】

(●)

についての異形接合のいずれかについてである。

【 0 1 0 2 】

マウス染色体 1 5 にシテニーなヒト染色体 2 2 のセグメント以内に位置するマイクロサテライト遺伝子座における遺伝子型が、H I V - 1 - 感染していない個体における粘膜抗 H I V I g A の存在と関連していたことは、最も興味をそそられる。多重比較について修正を行った後でさえ、前記 D 2 2 S 4 2 3 遺伝子座 (アレル 2 2 1 を有する個体の頻度が、前記 E U I 群において、前記 H I V - 1 - 感染群においてよりも、著しく高い) において、最も高い相関関係が観察された。このマーカー遺伝子座は、前記ウイルス中和抗体の生産を制御する遺伝子座を抱くマウス染色体 1 5 の領域に対応する染色体部分の中央に位置する (図 4)。図 4 において、物理的マッピングおよびシテニー・データは、エンSEMBL (E n s e m b l) ゲノムブラウザにおいて準拠したものを基にした。セントロメア

【 0 1 0 3 】

【 数 1 6 】

(○)

は、左に配置した。F V - 中和抗体の生産を制御するマウス遺伝子座の位置は、1 4 3 (B 1 0 . A x A) x A 戻し交配マウスを用いる連鎖分析により決定し、8 匹の危篤動物 (染色体組換えが、前記 D 1 5 M i t 1 0 5 遺伝子座と前記 D 1 5 M i t 1 0 7 遺伝子座との間に同定された) において、前記 S S L P 遺伝子型と抗体力価とを、相関づけることにより示された領域にまで、さらに狭められた。遺伝子型が、前記 E U I 群と H I V - 感染群との間で比較されたヒト S S L P 遺伝子座もまた、示す。前記 D 2 2 S 2 7 7 遺伝子座における前記アレル 1 5 6 および 1 5 8 (これらは、(染色体ごとに、それぞれ、5 . 6 % および 9 . 3 %) 前記データベース - 報告白人 C E P H 人口 [5 9 , 6 0] の中で稀である) が、前記 E U I 群において、より頻繁に観察された (それぞれ、9 . 5 % および 1 7 . 9 %) ことも、注目に値するであろう。H I V - 1 - 感染群および健康に制御されている群の個体において観察されるこれらのアレルの頻度は、前記 C E P H 人口において報告されているものと、同等であり、H I V - 1 - 感染群と健康に制御されている群を合わせ、前記 E U I 群と比較したとき、前記アレル 1 5 6 の頻度 (両側フィッシャーの直接確率検定により P = 0 . 0 3 5) と、前記アレル 1 5 8 の頻度 (前記同じ検定により P = 0

10

20

30

40

50

・ 0061) において、著しい相違があった。マイクロサテライト突然変異の割合が、コドン遺伝子におけるポイント突然変異の割合よりも、ずっと高く [61]、最も普通の段階的突然変異が、> 20 反復のマイクロサテライトについて、反復数の減少に向かって偏っている [62] ので、前記 D 2 2 S 2 7 7 遺伝子座における前記アレル 1 5 6 および 1 5 8 (それぞれ、2 5 および 2 6 ジヌクレオチド) は、前記感染していない個体における HIV - 1 に対し、増強された免疫応答と、関連している同じ推定アレルに両方が関連していると仮定するのが正当である。この観点で、前記アレル 1 5 6 および 1 5 8 が、両方、単独優性遺伝要因に関連していると仮定して行った前記分散安定化分析により、前記 E U I および HIV - 1 - 感染との間の著しい相違が立証でき、前記 E U I 群および健康に制御されている群がそれぞれ $P = 0.0066$ および 0.0079 において、これら 2 つの個体無効仮説は、また、多重比較についての修正をそれぞれ $P = 0.0378$ および 0.0448 で前記閉じたテスト手順で行った後、排除された (著しい相違を確認した)。さらに、同じ比較を、前記 HIV - 1 - 感染個体と健康的な制御個体とを合わせた群と、前記 E U I 群との間で行ったとき、前記アレル 1 5 6 または 1 5 8 のいずれかを有する個体の頻度が、前記 E U I s の中で著しく高く ($P = 0.0019$)、これは、多重比較について修正を行った ($P = 0.0121$) 後でさえ、非常に著しかった。従って、マウス染色体 1 5 にシンテニーであるヒト染色体 2 2 のセグメント以内の多重遺伝子座における遺伝子型は、HIV - 感染していないイタリア人において、HIV - 1 に対して強粘膜および T - 細胞免疫応答の存在と著しく関連している。

10

【 0 1 0 4 】

20

F V - 感染マウスにおけるウイルス - 中和抗体の生産は、 $CD4^+$ T ヘルパー細胞機能に左右され [63]、前記ウイルス外皮エピトープの前記 T - 細胞認識が、ウイルス - 中和抗体のクラス転換の動態に強く影響を及ぼす [64、65]。同様に、本研究に登録した、HIV - 1 - 暴露かつ感染していない個体は、末梢血液中に、HIV - 感染個体と比較して、著しく多い量の粘膜抗 HIV - 1 I g A と、より多い数の HIV - 1 外皮 - 反応性 T 細胞を有していた (表 2)。

【 0 1 0 5 】

【表 2】

本研究で遺伝子的に分析した 3 つの群の HIV-1-関連表現型

群	年齢	血漿 HIV 負荷 (コピー/ml)	尿道/膣の抗 HIV-1 IgA (光学濃度)	血清抗 HIV-1 IgG ((光学濃度)	HIV-1 外皮-反応性 IFN- γ ELISPOT (/10 ⁶ 細胞)
HIV-1-暴露かつ感染していない	40.1 \pm 1.4	検出不可能 (すべて) ^a	0.556 \pm 0.047 ^b	0.004 \pm 0.0006	131.2 \pm 11.3 ^c
HIV-1-感染	40.8 \pm 1.9	5.0 \pm 3.4 $\times 10^5$	0.360 \pm 0.039	0.793 \pm 0.069	63.4 \pm 9.2
健康的コントロール	37.8 \pm 3.6	検出不可能 (すべて) ^a	0.002 \pm 0.0006	0.002 \pm 0.0001	< 5

数は平均 \pm S.E.M. ^a全ての登録者は、血漿 HIV RNA を測定することにより、かつ PBMCs の全 RNA から HIV cDNA を検出することにより、HIV ゲノムの存在についてテストした。暴露かつ感染していない個体の場合、HIV cDNA のありうる存在もまた、粘膜生検の PCR によりテストした。暴露かつ感染していない群および健康に制御された群における個体全ては、これらのテスト全てについて、陰性であった。^bウェルチの *t* 検定により、 $P = 0.0022$ における HIV-1-感染 個体についての平均よりも、著しく高かった。^cウェルチの *t* 検定により、 $P = 0.015$ における前記 HIV-1-感染個体について平均より著しく高い。

【0106】

従って、これら全てのデータは、遺伝子の優性応答アレル (FV 感染症の初期段階においてレトロウイルス-中和抗体を引き起こす能力を付与するマウスのアレルにおそらく相同性である) が、染色体 22 に存在し、前記 22q13.1 セグメントの近くに位置するという仮定と一致する。HIV-感染症に対する抵抗性および/または後天性免疫不全症候群への進行に影響を及ぼすと先に報告されたヒト遺伝子のいずれも、3p21 に位置する CCR5 および CCR2、10q11.1 に位置する SDF1、6p21.3 に位置する HLA、19q13.4 に位置する KIRs および 1q31-32 に位置する IL10 (参照 3、38-47) のような、前記ヒト染色体のこの領域に位置していなかった。加えて、前記 CCR5 32 突然変異 (同型接合体における前記 HIV コレセプターの細胞表面発現の欠如に結果としてなる [20、66-69]) は、本研究の登録者に見られなかった (データ示さず) 一方、3/42 の EUIs が、非相同の CCR5-32 欠失の存在を示した。この突然変異が、イタリアおよびタイにおいて、前記 HIV-1-暴露かつ感染していない個体のなかで、まれであることが知られている [21、26、74]。全体で、本発明者の結果により、HIV-1 感染に対する免疫抵抗性を付与する新規遺伝要因の存在が示された。

10

20

30

40

50

【0107】

中和抗体を制御するマウス遺伝子座の連鎖地図

FVの侵入および複製に影響を与える宿主遺伝子と、ウイルス抗原への宿主T-細胞応答に影響を及ぼすものの効果を除外するため、遺伝的分析を、FV-感染しやすいFv-1^{b/b}、Fv-2^s (Fv-2^{r/s}またはFv-2^{s/s}のいずれか)およびH2^{a/a}の遺伝子型を分け合うマウスのB10.A血統およびA血統の異種交配を用いて行った。(B10.A×A)F₁およびAマウスを、FV感染後、異なる時点でウイルス-中和抗体のそれらの生産について、比較したとき、これらのマウスのいずれも、感染後10日で中和抗体の検出可能なレベルを有していなかった。中和抗体は、親Aマウスにおいて、感染後の日(PID)15および20に検出不可能であった。対照的に、感染(B10.A×A)F₁マウスの全ての個体は、PID15において著しい中和力価および、PID20においてテストされたとき、PID15においてのものと比較して、著しく増加した力価を有していた(図1)。従って、(B10.A×A)×A戻し交配マウスにおいて中和抗体力価の可能な隔離を、PIDs15、17および21において、それらを採血することにより、テストした。ウイルス-中和抗体は、PID15において、143の(B10.A×A)×A戻し交配マウスの63(44%)において、検出不可能であり(図1)、単一遺伝子座が中和抗体の生産または生産の欠乏に関係していることが示唆される。連鎖分析について、ウイルス血症の持続性に影響を及ぼす前記Rfv-3遺伝子座が、この染色体上に位置付けられたので、遺伝子型が染色体15上に集中し、43の別々の戻し交配個体を用いて行われた初期の分析が、PID17におけるウイルス-中和力価と、染色体15における4つの遺伝子座、D15Mit22、D15Mit28、D15Mit42およびD15Mit161(データ示さず)における遺伝子型との間に、著しい相関関係を示した。143の戻し交配マウスを用いて行われた連鎖分析の結果により、染色体15におけるマーカー遺伝子座での遺伝子型と、PID15におけるウイルス-中和抗体の力価との間に、最も強力な相関関係($X^2 = 74.0$ 、 $P = 1.17 \times 10^{-7}$)が観察されたとともに、前記D15Mit71遺伝子座において強力な相関関係が示された(表3)。

10

20

【0108】

【表 3】

PID 15 における FV-中和抗体の生産を制御する推定遺伝子座
のマッピング

遺伝的遺伝子座	ロッドスコア	X ² 値
D15Mit22	4.37	22.3
D15Mit28	13.60	62.8
D15Mit71	16.38	74.0
D15Mit171	11.15	50.7
D15Mit42	7.09	31.7
D1Mit48	1.79	7.7
D2Mit184	連関せず	1.4
D14Mit115	連関せず	2.7

10

20

【0109】

MAPMAKER/EXPを有する連鎖地図に、ウイルス血症の初期クリアランスと関連している前記 Rfv-3 遺伝子座の先のマッピングと一致する、前記 D15Mit71 遺伝子座と D15Mit171 遺伝子座との間の PID15 における、ウイルス-中和抗体の存在または不在を決定する遺伝子座の位置を示した。FV-中和抗体の生産に影響を与える遺伝子座のさらなるマッピングを、前記 D15Mit28 遺伝子座と D15Mit171 遺伝子座の間の重要な組換えを有する前記戻し交配動物の遺伝子型により行った。この目的のため、前記 D15Mit71 遺伝子座を囲む染色体15の約12Mbp領域を、18の多形性マイクロサテライトマーカーでカバーし、各個体戻し交配マウスにおいてそれらの遺伝子型を決定した。その結果、この領域内に相互組換えを有する8の戻し交配マウスが同定された(図4)。D15Mit1は、エンセンプル・ゲノム・ブラウザ(1118724419859_0

30

)において達成されたマウスゲノムの物理的マップに現在は含まれていないが、マウス染色体15のセグメントを抱くバクテリア人工染色体、RP23-290M7(塩基数47915-48097)のクローン以内に、このマイクロサテライトマーカーのフランキングプライマーと反復配列を我々は同定したことに注目されたい。従って、前記 D15Mit1 遺伝子座の物理的マップは、図4に含まれる。PID15におけるウイルス-中和抗体の生産と、D15Mit71、D15Mit2、D15Mit214、D15Mit69およびD15Mit70遺伝子座における遺伝子型間の著しい相関関係(両側フィッシャーの直接確率検定により $P = 0.029$)が、これらの相互組換え動物において観察されたので、FV-中和抗体の生産を制御する遺伝子座が、最も幅広く、D15Mit1にテロメアであり、かつD15Mit118遺伝子座にセントロメアである領域以内に位置することが予想される。

40

【0110】

50

H I V - 1 - 暴露かつ感染していないイタリア人の遺伝的分析

本発明者らは、次に、前記マウス遺伝子座の推定類似 (ortholog) が、ヒトレトロウイルス感染症において、抗体生産に影響を及ぼすかもしれないという可能性を研究した。H I V - 1 および結果として生じる希少なマルチケース (multicase) 家族の伝達の失敗のため、影響が及んだ兄弟と、影響が及ばなかった兄弟とを比較することによる標準連鎖分析が不可能であった。従って、本発明者らは、おそらく保護的な抗 H I V - 1 免疫応答が、感染していない個体において、優性遺伝要因の存在と関連しており、この因子が、感染個体において欠乏していると仮定して、個体の、暴露されたが感染していない群と、H I V - 1 - 感染群との間の遺伝子型を比較することにより、シンプルな関連研究を行った。加えて、本発明者らは、また、上記推定遺伝要因が、F V 感染の初期段階においてウイルス - 中和抗体を引き起こす能力を付与するマウス遺伝子座の類似かもしれないと、仮定した。従って、本発明者らは、マウス染色体 15 にシテニーなヒト染色体 22 のセグメントにおける多形性遺伝的マーカーに集中した (図 4)。検出不可能な血液および細胞の H I V ゲノムにもかかわらず、粘膜抗 H I V - 1 I g A を有し、H I V - 1 ペプチド特異性 T - 細胞サイトカイン生産を示す H I V - 1 - 感染個体の 42 人の感染していないパートナー；前記 E U I s の感染パートナーを含む 49 人の H I V - 1 - 感染個体；および 47 人の感染していない健康に制御された人を、書面にされたインフォームドコンセントをもって、イタリアのミラノおよびフローレンスから登録し、図 4 に示す遺伝子座において、遺伝子分類した。前記 3 つの表現型群のウイルス学的および免疫学的パラメータを、表 2 にまとめた。3 つの群の間で可能性のある遺伝的相違は、2 つの方法で比較した。最初に、試験した遺伝子座におけるアレル頻度の分布を、 $2 \times$ (アレルの数) の分割表について、ピアソンの X^2 分析を用いて、前記 3 つの表現型群の各対の間で比較した。民族学的興味のため、合わせた群として、登録者のアレル頻度分布もまた、ゲノムデータベース (G D B、バージョン 6.4) に報告されている C E P H 家族白人のものと比較した。第 2 に、所定の遺伝子座に問題になっているアレルを有する個体の頻度を、方法のセクションにおいて説明したように、分散安定化統計値を用いて、3 つの表現型群の間で数学的に比較した。従って、登録したイタリア人と、C E P H 家族白人住民との間の試験した遺伝子座におけるアレル頻度の分布は、前記 D 2 2 S 4 2 3 遺伝子座と前記 D 2 2 S 1 1 6 6 遺伝子座 (それぞれ、 $P = 0.0061$ および 0.0087) において以外は、相違しなかった。アレル頻度を 3 つの表現型の間で比較したとき、D 2 2 S 2 7 7 遺伝子座におけるそれらの分布は、 $P = 0.039$ において、前記 E U I 群と、健康に制御された群との間で相違していた。他の遺伝子座において、著しい相違は観察されなかった。

【 0 1 1 1 】

所定の遺伝子座において、特定なアレルを有する個体の頻度を、優性モデルを採用することにより 3 つの表現型群の間で比較したとき、目的の数学的分析により、著しい相違を有する多重遺伝子座が明らかにされた (表 4)。

【 0 1 1 2 】

【表 4】

染色体 22q 関連分析

細胞遺伝的 位置	遺伝子座	アレル サイズ (bp)	EUI 群に おける頻 度 ^a	～と比較 して ^b	P 値	
					個体仮 定	共通仮定 ^c
22q11.21	D22S264	188	0.405	HIV	0.0142	ns
		198	0.238	HC	0.0128	ns
22q12.2	D22S277	158	0.310	HIV	0.0152	ns
		162	0.262	HC	0.0371	ns
22q13.1	D22S272	134	0.667	HC	0.0243	0.0466
22q13.1	D22S423	221	0.333	HIV	0.0087	0.0317
	D22S1166	134	0.571	HC	0.0266	ns
22q13.2	D22S418	145	0.605	HC	0.0475	ns
22q13.32	D22S1169	126	0.643	HC	0.0313	ns

^a 少なくとも1つの染色体の上に表示されたアレルを有する個体の頻度。^b HIV、HIV-1-感染個体; HC、健康に制御。^c ns, $P < 0.05$ レベルにおいて著しくない。

【0113】

これらの個体相違点は、閉じたテスト手順を用いることにより、多重比較による単独帰無（等頻度）仮定の可能性のある誤った排除について、さらに試験した。その結果、前記 D22S272 遺伝子座においてアレル 134 を有する個体の頻度は、前記 EUI 群と、健康に制御された群との間で著しく相違しており、D22S423 遺伝子座にアレル 221 を有する個体の頻度も、前記 EUI 個体と HIV-感染個体との間で著しく相違していた。

【0114】

本発明者らは、アレル D22S929、D22S272、D22S284 および D22S1166 が、以下の表において、

【0115】

【数17】

、 および

により示されるように、感染していない HIV-暴露患者において、より煩雑であること

を見出す一方、前記アレル D 2 2 S 2 9 9 は、以下の表において、

【 0 1 1 6 】

【 数 1 8 】



により示されるように、頻度がより少ないことが確認された。

【 0 1 1 7 】

【表 5】

	D22S264	D22S929	D22S277	D22S283	D22S426	D22S272	D22S284	D22S423	D22S299	D22S276	D22S1166	D22S1157	D22S1169	D22S418
ESN3-23		138 赤毛	168 赤毛	128 130	212 赤毛	134 140	90 92	230	182 190	243 赤毛	130 赤毛			134 140
ESN3-1		138 赤毛	168 赤毛	128 136	214 216	140 赤毛	90 赤毛	230	180 182	243 259	130 赤毛			132 140
ESN3-5		138 赤毛	162 138	132 216	216 赤毛	140 赤毛	90 赤毛	230	180 188	243 245	130 赤毛			132 134
ESN3-15		138 140	168 赤毛	128 144	212 216	134 140	82 90	226 230	186 186	243 赤毛	130 赤毛			132 134
ESN3-17		138 140	166 138	132 216	212 216	134 赤毛	82 赤毛	228 230	180 182	245 赤毛	130 138			132 赤毛
ESN3-8		136 138	162 140	142 216	216 134	140 赤毛	90 赤毛	230	178 184	243 245	130 132			136 144
ESN3-2		138 赤毛	160 136	140 216	216 赤毛	134 赤毛	90 94	220	180 182	243 245	128 134			140 158
ESN1-8	206	208 138	164 138	160 132	218 赤毛	132 140	90 94	220	180 182	243 245	128 134			142 156
ESN3-12		136 138	160 136	140 216	216 赤毛	130 134	80 90	228	180 186	243 245	130 134			142 156
ESN1-5	188	198 138	162 138	144 138	216 赤毛	132 142	86 90	230	188 188	243 245	124 130			142 156
ESN3-20		138 赤毛	164 138	138 144	216 赤毛	140 赤毛	80 90	232	186 186	243 245	134 138			132 140
ESN2-9	188	赤毛	138 赤毛	138 赤毛		140 赤毛				243 赤毛			118 128	
ESN2-6		138 赤毛	164 138	138 赤毛		134 140				243 245			120 赤毛	
ESN2-5	198	206 138	140 138	140 赤毛		134 136				243 245			118 126	
ESN2-8		138 赤毛	164 138	138 赤毛		134 赤毛				243 赤毛			126 128	
ESN2-2	196	赤毛	134 142	164 164		134 140				241 253			118 126	
ESN2-1	188	202 134	144 160			140 150				241 243			120 126	
ESN2-3	198	赤毛	134 136			134 148				241 243			120 126	
ESN1-2	196	198 140	赤毛	160 160	216 赤毛	134 赤毛				243 赤毛	138 138	218 232	120 126	
ESN3-4		138 赤毛	162 166	124 136	214 216	136 140	90 赤毛	220 230	186 186	243 245	130 赤毛			132 134
ESN3-3		138 赤毛	162 174	128 134	214 赤毛	134 赤毛	90 赤毛	220 230	186 186	245 赤毛	134 134			132 134
ESN3-6		138 赤毛	162 164	140 140	216 218	134 136	90 赤毛	226	182 182	245 赤毛	124 134			140 144
ESN3-16		138 140	160 赤毛	122 130	214 216	134 140	86 90	222	188 赤毛	243 245	130 赤毛			132 140
ESN3-22		138 140	160 164	134 138	216 赤毛	134 140	90 94	220 230	182 赤毛	245 赤毛	130 赤毛			140 142
ESN1-6	188	206 138	140 162	164 164	216 赤毛	134 142	80 92	226	186 188	245 赤毛		220 228	128 130	
ESN3-19		138 146	160 164	132 142	212 218	134 140	80 90	226	180 186	243 245	128 130			140 158
ESN3-14		138 144	168 赤毛	136 146	214 218	140 赤毛	80 90	220	180 188	243 赤毛	124 130			132 赤毛
ESN1-3	202	204 138	144 164	170 170	216 赤毛	134 赤毛			184 194	243 赤毛		220 234	120 126	
ESN2-4	188	190 138	146 160	164 164		134 140			184 194	243 245		220 234	126 130	
ESN1-4	188	202 144	赤毛	162 166	212 216	132 148	90 赤毛		182 182	243 249	124 134	218 222	126 130	
ESN2-7		140 142	160 赤毛		216 赤毛	134 赤毛				243 245		220 230	130	
ESN3-10		140 150	166 170	140 142	216 赤毛	134 赤毛	88 90	222 230	180 180	245 赤毛	128 132			132 134
ESN3-13		138 赤毛	162 赤毛	130 130	214 216	134 152	88 92	220	180 188	243 245	124 132			132 140
ESN3-21		138 赤毛	160 170	116 142	214 216	140 154	88 92	220 224	180 赤毛	243 245	130 赤毛			140 赤毛
ESN3-24		138 140	160 164	134 赤毛	216 220	140 148	88 90	214 226	184 192	243 赤毛	130 赤毛			140 158
ESN3-9		138 142	164 170	128 144	212 216	136 140	88 94	226	188 188	245 赤毛	132 132			132 140
ESN1-7	196	204 138	146 160	162 162	216 赤毛	134 136	88 90		180 赤毛	243 赤毛		220 228	126 128	
ESN1-1	198	200 142	166 赤毛		214 216	134 140	88 90		178 182	243 245	124 130	222 232	126 128	
ESN3-7		140 138	162 170	124 136	214 赤毛	134 赤毛	90 赤毛	230 赤毛	182 184	243 赤毛	134 134			136 140
ESN3-11		138 138	164 168	144 144	212 220	134 140	90 92	230 赤毛	180 186	243 245	130 赤毛			142 156
ESN3-18		138 138	160 170	144 144	216 赤毛	136 赤毛	88 90	220 234	182 186	243 245	128 136			132 140
ESN2-10			140 140			134 赤毛				241 赤毛		120	126	

【 0 1 1 8 】

10

20

30

40

【表 6】

	D22S264	D22S929	D22S277	D22S283	D22S426	D22S272	D22S284	D22S423	D22S299	D22S276	D22S166	D22S157	D22S169	D22S418
HIV1-7	202 204	136 140	160	160	212 216	134 136			186	241 243	128 130	220 228	126 130	
HIV3-4		138 140	160 164	128 146	216 216	134 140	90 94	230 232	180 188	243 245	130 130		132 130	
HIV1-1	198 208	138 140	162 172		214 222	140 140	90 94		180	243	130 130	220 232	126 130	
HIV1-2	196 198	138 140	160 166		214 216	134 136	90 90		180 186	243 245	ND	220 234	120 126	
HIV1-3	202 198	134 138	168 170		216 216	134 136	90 92		186	243 245	130 130	230	234 130	
HIV1-5	190 198	134 138	160 168		214 216	134 136	90 90		186	243 245	122 124	232 234		
HIV1-8	198 204	136 138			216 218	134 150	80 90		178 180	245 245	128 130	222 232	118 126	
HIV2-1		138 144	160 172			134 140							128 130	
HIV2-2	202 198	138 140	164 166			134 140				245 245			126 130	
HIV2-5	194 198	138 140	162 168			134 140							124 126	
HIV2-8		138 142	160 170			140 144							120 130	
HIV2-9		138 142	162 170			134 136							118 126	
HIV2-10	204 198	138 140	162 170			134 140				245 245			128 130	
HIV2-11		138 140				134 136								
HIV3-3		136 138	168 170	132 146	212 216	140 140	80 82	226 232	186	251 251	128 128		132 130	
HIV2-3	202 204	140 142	160 164			134 142							118 126	
HIV2-4	190 198	136 140	150 166			134 140							128 130	
HIV2-6		166 166	166 166			134 136							120 130	
HIV3-1		136 142	160 166	136 140	218 218	142 140	80 82	230 230	172	245 245	130 134		144 152	
HIV3-2		136 138	160 166	140 140	214 216	142 148	90 90	220 230	178 180	243 245	130 130		132 130	
HIV1-4	198 204	138 138	160 162		216 218	134 140	84 90		180 188	243 245	130 134	226 234	126 130	
HIV1-6	190 198	138 136			216 216	134 140			186 188	243 243	134 134	228 230	118 130	
HIV2-7		138 138	164 172			134 136							126 130	

10

20

30

40

【表 7】

	D22S264	D22S299	D22S277	D22S283	D22S426	D22S272	D22S284	D22S423	D22S299	D22S276	D22S166	D22S157	D22S169	D22S418
nomal1-2	198 198	138 138	160 160		214 赤毛	134 赤毛	90 赤毛		182 186	245 赤毛	130 赤毛	220 230	126 赤毛	
nomal1-1	188 202	144 144	162 162		214 216	134 140	90 94		180 188	243 赤毛	130 138	222 230	120 126	
HC3-22		134 144	162 162	146 146	214 216	140 赤毛	80 94		188 245	245 赤毛	130 赤毛			140 142
HC3-25		138 140	170 170	128 136	216 赤毛	132 134	88 92	230 赤毛	180 赤毛	243 245	130 赤毛			134 156
HC3-20		160 134	146 216	134 140	134 140	140 赤毛	90 216	235 赤毛	180 赤毛	243 赤毛	124 128			132 140
HC3-9		136 168	132 142	168 132	216 赤毛	132 134	90 92	222 230	180 186	243 245	124 128			132 赤毛
nomal1-7	188 198	136 138	168 168		216 赤毛	138 140	90 赤毛		180 186	243 253		222 128	130	
nomal1-5	198 206	138 142			216 218		90 赤毛		180 188	243 赤毛		222 232	120 128	
nomal1-6	202 204	138 赤毛	160 164		212 216	134 140	90 赤毛		180 182	243 245		220 232	120 赤毛	
nomal1-8	198 202	138 140	166 170		216 218	134 142	78 90		188 243	245 245		220 118	130	
nomal2-1		138 赤毛				134 146							126 赤毛	
nomal2-3		138 赤毛				134 赤毛							120 赤毛	
nomal2-4		138 142				140 赤毛							124 赤毛	
nomal2-7		138 赤毛				134 赤毛							120 126	
HC3-21		138 赤毛	160 166	128 138	214 216	134 赤毛	80 90	220 230	186 186	245 赤毛	130 134			134 赤毛
HC3-1		138 赤毛	162 166	130 132	216 赤毛	134 140	82 90	235 238	182 188	245 245	128 赤毛			140 160
HC3-3		138 140	160 162	134 138	212 赤毛	140 152	90 94	228 228	180 188	245 245	126 126			132 赤毛
HC3-5		136 138	170 赤毛	142 144	214 216	134 赤毛	90 赤毛	216 230	188 188	243 253	134			132 134
HC3-8		138 140	160 164	128 146	216 赤毛	134 140	88 90	230 230	180 188	241 243	130 赤毛			132 赤毛
HC3-10		138 140		122 144	212 214	134 140	88 90	235 230	180 188	245 245	130 赤毛			132 134
HC3-12		138 赤毛	160 赤毛	136 142	216 赤毛	136 140	92 94	235 220	182 赤毛	249 249	134			132 赤毛
HC3-18		138 142	162 168	130 142	216 218	134 140	94 96	214 220	180 188	243 247	130 132			132 134
HC3-19		134 138	162 赤毛	136 138	214 216	134 150	80 80	235 235	182 赤毛	245 245	128 138			140 赤毛
HC3-28		138 赤毛	162 166	114 140	216 赤毛	134 赤毛	80 90	230 赤毛	180 186	245 245	126 128			132 140
HC3-15		138 140	160 162	136 136	212 216	134 148	86 90	230 赤毛	186 186	245 245	124 136			132 140
HC3-26		138 140	160 164	128 128	214 216	134 赤毛	86 86	228 230	186 186	245 赤毛	126 126			156 赤毛
HC3-27		138 赤毛	162 164	132 214	216 134 赤毛	134 赤毛	90 92	222 228	180 186	243 245	130 132			132 140
HC3-2		134 136	162 166	124 124	216 赤毛	134 赤毛	78 90	235 220	182 188	245 245	122 130			132 134
HC3-14		149 赤毛		142 142	216 赤毛	134 赤毛	86 86	222 赤毛	180 188	243 245				156 赤毛
HC3-17		140 150	162 168	134 134	212 216	134 140	80 84	214 220	186 186	243 245				132 134
nomal1-3	188 198	136 140	162 166		216 218	140 148	82 86		172 176	243 赤毛	138 138	214 216	120 124	
nomal2-5		134 146				134 140							120 128	
nomal2-9		136 赤毛				134 赤毛							120 126	
nomal2-10		140 148	160 162	128 134	212 216	134 140	90 赤毛	226 226	186 186	243 245	128 128			132 134
HC3-4		140 赤毛	162 164	136 138	216 赤毛	134 赤毛	80 赤毛	210 210	182 188	243 245	130 130			140 赤毛
HC3-6		140 赤毛	160 赤毛	130 赤毛	216 218	134 140	90 赤毛	235 235	186 186	243 245	124 130			132 134
HC3-16		140 赤毛	160 赤毛	130 赤毛	216 220	134 140	90 赤毛		182 182	245 赤毛	134 134	220 232	126 128	
nomal1-4	198 202	138 138	168 赤毛			134 140	90 赤毛						126 128	
nomal2-2		138 138	164 赤毛		216 216	134 140	80 赤毛	218 230	188 188	239 245	134 134			156 赤毛
HC3-24		138 138	136 赤毛			134 赤毛							126 128	
nomal2-8		136 136				134 赤毛							126 128	
HC3-23		138 144	162 168	130 142	216 赤毛	134 赤毛	90 92	218 232	186 赤毛	243 245	128 134			136 156
HC3-7		136 166	170 170	144 214	216 134 142	142 80	90 218	220 220	188 188	243 243	134 134			134 156
HC3-13		138 136	162 168	128 128	212 220	134 赤毛	80 90	220 222	182 186	241 243	134 134			132 144
HC3-29		140 140	160 赤毛	144 144	216 赤毛	134 142	84 90	220 赤毛	178 188	245 245	124 124			132 140
HC3-11		138 140	168 170	136 136	216 赤毛	134 140	90 220	220 赤毛	180 182	243 247	130 130			140 赤毛

【 0 1 2 0 】

10

20

30

40

【数 1 9】

References

1. O'Brien, S. J., Nelson, G. W., Winkler, C. A. & Smith, M. W. Polygenic and multifactorial disease gene association in man: Lessons from AIDS. *Annu. Rev. Genet.* **34**, 563–591 (2000).
2. Dean, M. *et al.* Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. *Science* **273**, 1856-1862 (1996). 10
3. Liu, R. *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**, 367-377 (1996).
4. Samson, M. *et al.* Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**, 722-725 (1996). 20
5. Martin, M. P. *et al.* Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of *CCR5*. *Science* **282**, 1907-1911 (1998).
6. Smith, M. W. *et al.* Contrasting genetic influence of *CCR2* and *CCR5* receptor gene variants on HIV-1 infection and disease progression. *Science* **277**, 959-965 (1997).
7. Winkler, C. *et al.* Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. *Science* **279**, 389-393 (1998). 30
8. Carrington, M. *et al.* HLA and HIV: Heterozygote advantage and *B*35-Cw*04* disadvantage. *Science* **283**, 1748-1752 (1999).
9. Shin, H. D. *et al.* Genetic restriction of HIV-1 infection and AIDS progression by promoter alleles of interleukin 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**,14467-14472 (2000).
10. Beyrer, C. *et al.* Epidemiologic and biologic characterization of a cohort of human immunodeficiency virus type 1 highly exposed, persistently seronegative female sex workers in northern Thailand. *J. Infect. Dis.* **79**, 59-68 (1999). 40

【 0 1 2 1 】

【数 2 0】

11. Martin, M. P. *et al.* Epistatic interaction between *KIR3DS1* and *HLA-B* delays the progression to AIDS. *Nature Genet.* **31**, 429-434 (2002).
12. Rowland-Jones, S. L. & McMichael, A. Immune responses in HIV-exposed seronegatives: Have they repelled the virus? *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 448-455 (1995). 10
13. Shearer, G. M. & Clerici, M. Protective immunity against HIV infection: Has nature done the experiment for us? *Immunol. Today* **17**, 21-24 (1996).
14. Mazzoli, S. *et al.* HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. *Nature Med.* **3**, 1250-1257, 1997.
15. Kaul, R. *et al.* HIV-1 specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS* **13**, 23-29 (1999). 20
16. Biasin, M. *et al.* Mucosal and systemic immune activation is present in human immunodeficiency virus-exposed seronegative women. *J. Infect. Dis.* **182**, 1365-1374 (2000).
17. Belec, L. *et al.* Cervicovaginal secretory antibodies to HIV type 1 that block viral transcytosis through epithelial barriers in highly exposed HIV-1-seronegative African women. *J. Infect. Dis.* **184**, 1412-1422 (2001). 30
18. Rowland-Jones, S.L. & McMichael, A. Immune responses in HIV-exposed seronegatives: Have they repelled the virus? *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 448-455 (1995).
19. Shearer, G.M. & Clerici, M. Protective immunity against HIV infection: Has nature done the experiment for us? *Immunol. Today* **17**, 21-24 (1996).
20. O'Brien, S.J., Nelson, G.W., Winkler, C.A. & Smith, M.W. Polygenic and multifactorial disease gene association in man: Lessons from AIDS. *Annu. Rev. Genet.* **34**, 563-591 (2000). 40
21. Mazzoli, S. *et al.* HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. *Nature Med.* **3**, 1250-1257 (1997).

【 0 1 2 2】

50

【 数 2 1 】

22. Kaul, R. *et al.* HIV-1 specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS* **13**, 23-29 (1999).
23. Biasin, M. *et al.* Mucosal and systemic immune activation is present in human immunodeficiency virus-exposed seronegative women. *J. Infect. Dis.* **182**, 1365-1374 (2000).
24. Mazzoli, S. *et al.* Human immunodeficiency virus (HIV)-specific IgA and HIV neutralizing activity in the serum of exposed seronegative partners of HIV-seropositive persons. *J. Infect. Dis.* **180**, 871-875 (1999). 10
25. Belec, L. *et al.* Cervicovaginal secretory antibodies to HIV type 1 that block viral transcytosis through epithelial barriers in highly exposed HIV-1-seronegative African women. *J. Infect. Dis.* **184**, 1412-1422 (2100).
26. Locaputo, S. *et al.* Mucosal and systemic HIV-specific immunity in HIV-exposed but uninfected heterosexual males. *AIDS* **17**, 531-538 (2002). 20
27. Letvin, N. *et al.* Potent, protective anti-HIV immune responses generated by bimodal HIV envelope DNA plus protein vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9378-9383 (1997).
28. Mascola, J.R. *et al.* Protection of macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J. Virol.* **73**, 4009-4018 (1998).
29. Mascola, J.R. *et al.* Protection of macaques against vaginal transmission of pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat. Med.* **6**, 207-210 (2000). 30
30. Earl, P.L. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of oligomeric human immunodeficiency virus type 1 gp140. *J. Virol.* **75**, 645-653 (2001).
31. Teich, N., Wyke, J., Mak, T., Bernstein, A. & Hardy, W. Pathogenesis of retrovirus-induced disease. *RNA Tumor Viruses*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York (19872), pp785-998. 40
32. Kabat, D. Molecular biology of Friend viral erythroleukemia. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **148**, 1-42 (1989).

【 0 1 2 3 】

【数 2 2】

33. Chesebro, B., Miyazawa, M. & Britt, W.J. Host genetic control of spontaneous and induced immunity to Friend murine retrovirus infection. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 477-499 (1990).
34. Hoatlin, M.E. & Kabat, D. Host-range control of a retroviral disease: Friend erythroleukemia. *Trends Microbiol.* **3**, 51-57 (1995). 10
35. Best, S., Le Tissier, P. Towers, G. & Stoye, J.P. Positional cloning of the mouse retrovirus restriction gene *Fv1*. *Nature* **382**, 826-829 (1996).
36. Persons, D.A. et al. *Fv2* encodes a truncated form of the Stk receptor tyrosine kinase. *Nat. Genet.* **23**, 159-165 (1999).
37. Ikeda, H., Laigret, F., Martin, M.A. & Repaske, R. Characterization of a molecularly cloned retroviral sequence associated with *Fv-4* resistance. *J. Virol.* **55**, 768-777 (1985). 20
38. Ikeda, H. & Sugimura, H. *Fv-4* resistance gene: a truncated endogenous murine leukaemia virus with ecotropic interference properties. *J. Virol.* **63**, 5405-5412 (1989).
39. Miyazawa, M., Nishio, J. & Chesebro, B. Genetic control of T cell responsiveness to the Friend murine leukaemia virus envelope antigen. Identification of the class II loci of H-2 as immune response genes. *J. Exp. Med.* **168**, 1587-1605 (1988). 30
40. Iwashiro, M. et al. Multiplicity of virus-encoded helper T-cell epitopes expressed on FBL-3 tumor cells. *J. Virol.* **67**, 4533-4542 (1993).
41. Peterson, K.E., Iwashiro, M., Hasenkrug, K.J. & Chesebro, B. Major histocompatibility complex class I gene controls the generation of gamma interferon-producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells important for recovery from Friend retrovirus-induced leukaemia. *J. Virol.* **74**, 5363-5367 (2000).
42. Miyazawa, M., Nishio, J., Wehrly, K., David, C.S. & Chesebro, B. Spontaneous recovery from Friend retrovirus-induced leukaemia. Mapping of the *Rfv-2* gene in the Q/TL region of mouse MHC. *J. Immuno.* **148**, 1964-1976 (1992). 40

【0 1 2 4】

【 数 2 3 】

43. Iwanami, N., Niwa, A., Yasutomi, Y., Tabata, N. & Miyazawa, M. Role of natural killer cells in resistance against Friend retrovirus-induced leukaemia. *J. Virol.* **75**, 3152-3163 (2001).
44. Chesebro, B. & Wehrly, K. Studies on the role of the host immune response in recovery from Friend virus leukaemia. I. Antiviral and antileukemia cell antibodies. *J. Exp. Med.* **143**, 73-84 (1976). 10
45. Hasenkrug, K.J. *et al.* Chromosome mapping of *Rfv3*, a host resistance gene to Friend murine retrovirus. *J. Virol.* **69**, 2617-2620 (1995).
46. Super, H.J. *et al.* Fine mapping of the Friend retrovirus resistance gene, *Rfv3*, on mouse chromosome 15. *J. Virol.* **73**, 7848-7852 (1999).
47. Doig, D. & Chesebro, B. Anti-Friend virus antibody is associated with recovery from viremia and loss of viral leukaemia cell-surface antigens in leukemic mice. Identification of *Rfv-3* as a gene locus influencing antibody production. *J. Exp. Med.* **150**, 10-19 (1979). 20
48. Locaputo, S. *et al.* Mucosal and systemic HIV-specific immunity in HIV-exposed but uninfected heterosexual males. *AIDS*, in press (2002).
49. Chesebro, B. & Wehrly, K. Studies on the role of the host immune response in recovery from Friend virus leukaemia. I. Antiviral and antileukemia cell antibodies. *J. Exp. Med.* **143**, 73-84 (1976). 30
50. Chesebro, B., Miyazawa, M. & Britt, W.J. Host genetic control of spontaneous and induced immunity to Friend murine retrovirus infection. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 477-499 (1990).
51. Hasenkrug, K.J. *et al.* Chromosome mapping of *Rfv3*, a host resistance gene to Friend murine retrovirus. *J. Virol.* **69**, 2617-2620 (1995).
52. Super, H.J. *et al.* Fine mapping of the Friend retrovirus resistance gene, *Rfv3*, on mouse chromosome 15. *J. Virol.* **73**, 7848-7852 (1999). 40
53. Miyazawa, M., Nishio, J. & Chesebro, B. Genetic control of T cell responsiveness to the Friend murine leukaemia virus envelope antigen. Identification of the class II loci of H-2 as immune response genes. *J. Exp. Med.* **168**, 1587-1605 (1988).

【 0 1 2 5 】

50

【 数 2 4 】

54. Miyazawa, M., Nishio, J., Wehrly, K. & Chesebro, B. Influence of MHC genes on spontaneous recovery from Friend retrovirus-induced leukaemia. *J. Immunol.* **148**, 644-646 (1992).
55. Mazzoli, S. *et al.* Human immunodeficiency virus (HIV)-specific IgA and HIV neutralizing activity in the serum of exposed seronegative partners of HIV seropositive persons. *J. Infect. Dis.* **180**, 871-875 (1999). 10
56. Miyazawa, M., Nishio, J. & Chesebro, B. Protection against Friend retrovirus-induced leukaemia by recombinant vaccinia viruses expressing the *gag* gene. *J. Virol.* **66**, 4497-4507 (1992).
57. Miyazawa, M. *et al.* Immunization with a single T helper cell epitope abrogates Friend virus-induced early erythroid proliferation and prevents late leukaemia development. *J. Immunol.* **155**, 748-758 (1995). 20
58. Weissenbach, J. A second-generation linkage map of the human chromosome. *Nature* **359**, 794-801 (1992).
59. Weissenbach, J. *et al.* A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* **359**, 794-801 (1992).
60. Gyapay, G. *et al.* The 1993-94 Genethobon human genetic linkage map. *Nature Genet.* **7**, 246-339 (1994). 30
61. Li, Y.-C. *et al.* Microsatellites: genetic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* **11**, 2453-2465 (2002).
62. Whittaker, J.C. *et al.* Likelihood-based estimation of microsatellite mutation rates. *Genetics* **164**, 781-787 (2003).
63. Super, H. J., Brooks, D., Hasenkrug, K. & Chesebro, B. Requirement for CD4⁺ T cells in the Friend murine retrovirus neutralizing antibody response: evidence for functional T cells in genetic low-recovery mice. *J. Virol.* **72**, 9400-9403 (1998). 40

【 0 1 2 6 】

【 数 2 5 】

64. Miyazawa, M., Nishio, J., Wehrly, K & Chesebro, B. Influence of MHC genes on spontaneous recovery from Friend retrovirus-induced leukemia. *J. Immunol.* **148**, 644-646 (1992).
65. Miyazawa, M. *et al.* Immunization with a single T helper cell epitope abrogates Friend virus-induced early erythroid proliferation and prevents late leukemia development. *J. Immunol.* **155**, 748-758 (1995). 10
66. Dean, M. *et al.* Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. *Science* **273**, 1856-1862 (1996).
67. Liu, R. *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**, 367-377 (1996). 20
68. Samson, M. *et al.* Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the *CCR-5* chemokine receptor gene. *Nature* **382**, 722-725 (1996).
69. Martin, M.P. *et al.* Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of *CCR5*. *Science* **282**, 1907-1911 (1998). 30
70. Smith, M.W. *et al.* Contrasting genetic influence of *CCR2* and *CCR5* receptor gene variants on HIV-1 infection and disease progression. *Science* **277**, 959-965 (1997).
71. Winkler, C. *et al.* Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. *Science* **279**, 389-393 (1998).
72. Carrington, M. *et al.* HLA and HIV: Heterozygote advantage and *B*35-Cw*04* disadvantage. *Science* **283**, 1748-1752 (1999). 40

【 0 1 2 7 】

【数 2 6】

73. Shin, H.D. *et al.* Genetic restriction of HIV-1 infection and AIDS progression by promoter alleles of interleukin 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**,14467-14472 (2000).
74. Beyrer, C. *et al.* Epidemiologic and biologic characterization of a cohort of human immunodeficiency virus type 1 highly exposed, persistently seronegative female sex workers in northern Thailand. *J. Infect. Dis.* **79**, 59-68 (1999). 10
75. Martin, M.P. *et al.* Epistatic interaction between *KIR3DS1* and *HLA-B* delays the progression to AIDS. *Nature Genet.* **31**, 429-434 (2002).
76. Robertson. M.N., *et al.* Production of monoclonal antibodies reactive with a denatured form of the Friend murine leukaemia virus gp70 envelope glycoprotein: use in a focal infectivity assay, immunohistochemical studies, electron microscopy and Western blotting. *J. Virol. Methods* **34**, 255-271 (1991). 20
77. Hsu, J.C. *Multiple comparisons: theory and methods.* Chapman & Hall/CRC, New York (1996), 277pp.
78. Hall, P. *The bootstrap and edgeworth expansion.* Springer, New York (1992), 352pp. 30

【図面の簡単な説明】

【0 1 2 8】

【図 1】図 1 は、マウスの類似遺伝子型血統における P I D 1 6 - 2 0 で検出されたフレンドウイルス - 中和抗体の力価を示す。

【図 2】図 2 は、マウス染色体 1 5 とヒト染色体 2 2 のシンテニーな領域以内に位置する S S L P マーカーおよび相同性遺伝子との順序と、その間の距離の図表示である。

【図 3】図 3 は、D 2 2 S 2 7 7 遺伝子座における遺伝子型を示す。 40

【図 4】図 4 は、マウス染色体 1 5 とヒト染色体 2 2 のシンテニーな領域以内に位置する S S L P マーカーの順序と、その間の距離を示す。

【図 5】図 5 は、フレンドのウイルスに対する抵抗性を付与するマウス遺伝子と、ヒトウイルス抵抗性遺伝子との間の完全な同一性を示す。

【図 6】図 6 は、H I V - 1 - 暴露したが、感染していない個体にのみ観察される、染色体 2 2 にわたる連鎖不平衡の断絶を示す図表説明である。

【図 7】図 7 は、H I V - 1 抵抗力があるアレルの部位マッピングおよび頻度ならびにマウス染色体 1 5 上のマウス抗体制御遺伝子座およびヒト染色体 2 2 のシンテニーな領域の図表説明である。

【配列表】

2006502728000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		National Application No. PCT/GB 03/04493
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 C12Q1/70		
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 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KRUMLAUF R. ET AL.: "CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF GENOMIC LIBRARIES FROM SPECIFIC HUMAN CHROMOSOMES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 79, no. 9, 1982, pages 2971-2975, XP002276750 ISSN: 0027-8424 paragraph bridging pages 2971-2972 --- -/--	16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the International filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
27 April 2004		07/05/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Barz, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/GB 03/04493

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DUNHAM I. ET AL.: "THE DNA SEQUENCE OF HUMAN CHROMOSOME 22" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 402, no. 6761, 2 December 1999 (1999-12-02), pages 489-495, XP001180206 ISSN: 0028-0836 the whole document ---	16,61-65
A	WO 00/61811 A (SMITH M.W. ET AL.) 19 October 2000 (2000-10-19) abstract; claims 1-27 ---	1-21, 38-46, 51,57, 61-67
A	HOGAN C.M. ET AL.: "Host determinants in HIV infection and disease: Part 2: Genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics" ANNALS OF INTERNAL MEDICINE, vol. 134, no. 10, 15 May 2001 (2001-05-15), pages 978-996, XP002276751 ISSN: 0003-4819 the whole document ---	1-21, 38-46, 51,57, 61-67
A	O'BRIEN S.J. ET AL.: "Polygenic and multifactorial disease gene association in man: Lessons from AIDS." ANNUAL REVIEW OF GENETICS. UNITED STATES 2000, vol. 34, 2000, pages 563-591, XP002276752 ISSN: 0066-4197 abstract; table 2 page 582, line 5-14 ---	1-21, 38-46, 51,57, 61-67
A	DEAN M. ET AL.: "GENETIC RESTRICTION OF HIV-1 INFECTION AND PROGRESSION TO AIDS BY A DELETION ALLELE OF THE CKR5 STRUCTURAL GENE" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 273, 27 September 1996 (1996-09-27), pages 1856-1862, XP000198489 ISSN: 0036-8075 abstract; figures 2,3 ---	1-21, 38-46, 51,57, 61-67
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/GB 03/04493

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ROWLAND-JONES S.L. ET AL.: "Immune response in HIV-exposed seronegatives: Have they repelled the virus?" CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, vol. 7, no. 4, 1995, pages 448-455, XP001180618 ISSN: 0952-7915 cited in the application the whole document ---	1-21, 38-46, 51,57, 61-67
A	SHEARER G.M. ET AL.: "Protective immunity against HIV infection: has nature done the experiment for us?" IMMUNOLOGY TODAY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 17, no. 1, 1996, pages 21-24, XP004034638 ISSN: 0167-5699 cited in the application the whole document ---	1-21, 38-46, 51,57, 61-67
A	HASENKRUG K.J. ET AL.: "Immunity to retroviral infection: the Friend virus model." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, UNITED STATES 22 JUL 1997, vol. 94, no. 15, 22 July 1997 (1997-07-22), pages 7811-7816, XP002276754 ISSN: 0027-8424 the whole document ---	1-21, 38-46, 51,57, 61-67
A	GHOSH S. ET AL.: "The Finland-United States investigation of non-insulin-dependent diabetes mellitus genetics (FUSION) study. I. An autosomal genome scan for genes that predispose to type 2 diabetes" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 67, no. 5, November 2000 (2000-11), pages 1174-1185, XP002276755 ISSN: 0002-9297 abstract ---	16,61-65
A	TOREN AMOS ET AL: "Genetic linkage of autosomal-dominant Alport syndrome with leukocyte inclusions and macrothrombocytopenia (Fechtner syndrome) to chromosome 22q11-13" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 65, no. 6, December 1999 (1999-12), pages 1711-1717, XP002276756 ISSN: 0002-9297 abstract -----	16,61-65

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB 03/04493

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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:
Although claim 1-7 and 9-13 are directed to a diagnostic method encompassing a potential surgical step ("obtaining a DNA bearing sample from a subject"), the search has been carried out for the corresponding methods lacking said surgical step.
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ GB 03/04493

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 14-15, 49, 57, 61-63, and 66-67 (all partially), 22-37, 47-48, 50, 52-56, 58-60, 68-70 (completely)

Claims 14-15 relate to kits which are suitable for the diagnosis of a predisposition to infection and which comprise reagents for determination of genotype of at least one of a group of microsatellite loci. Since, however, said reagents are not defined in terms of technical features (e.g. the sequences of PCR primers), the skilled person is not able to determine which reagents fall under the wording of said claims. Consequently, lack of clarity within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for kits comprising those reagents which are disclosed in the present application as being suitable for determining the genotype of at least one of the listed microsatellite loci, i.e. primers having the sequences shown in SEQ ID NO's 1-10.

Claims 22-37 and 47-50 relate to compositions, contraceptives, chips or assay plates, or uses thereof, comprising a polypeptide "encoded by the gene located in the chromosomal segment adjacent to" a defined group of microsatellite loci. Since, however, neither said "gene" itself nor the "chromosomal segment adjacent to" said loci is clearly and unambiguously defined in the present application, the skilled person is totally unable to understand which gene product is meant in claims 22-37. Consequently, said claims cannot be searched.

Claim 52 relates to an immunoglobulin A defined by a desirable property ("providing resistance to infection") and by reference to the procedure of its production ("produced according to claim 50 or 51"). Since, however, said claim does not contain any technical features defining said immunoglobulin A, the skilled person is not in the position to clearly and unambiguously the nature of said immunoglobulin A. Thus, in the absence of any technical features of said immunoglobulin A, a meaningful search is impossible for claim 52. Consequently, claims 53-56 and 58-60 cannot be searched either, because they refer back to claim 52.

Claims 61-63 relate to a nucleic acid defined only in terms the function of its product ("controlling the production of neutralizing antibodies to HIV"). Since, however, said claims provide no technical features of the nucleic acid locus (chromosomal position, sequence?), the skilled person is totally unable to understand which nucleic acids fall under the wording of said claims. Therefore, lack of clarity (Article 6 PCT) arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of claims 61-63 which do appear to be clear, namely the subject-matter of claims 64-65.

Claims 49, 57, and 66-67 have only been searched partially, i.e. the search has been restricted to those parts of said claims which depend on searched claims. In other words, claim 49 has only been search as far as it depends on claims 45-46, claim 57 only as far as it depends on claim

International Application No. PCT/ GB 03 /04493

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

51, and claims 66-67 as far as they depend on claims 64-65.

Finally, a meaningful search is also impossible for claims 68-70, because they relate to gene products (or medical use thereof) which are only defined in terms of the genomic loci encoding them. Since, however, said loci are very large, the skilled person is not able to determine which gene products are meant. Consequently, a lack of clarity within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of said claims impossible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 03/04493

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0061811 A	19-10-2000	AU 4334400 A WO 0061811 A2	14-11-2000 19-10-2000

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 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
C 0 7 K 16/10 (2006.01)	C 0 7 K 16/10	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566 (2006.01)	G 0 1 N 33/566	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, M W, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 クレリッチ、マリオ

イタリア、アイ - 2 0 1 5 7 ミラノ、ヴィア ジーピー グラッシ 74、ディスプ リタ ヴ
ィアルバ、ミラノ ユニヴァーシティ メディカル スクール、チェアー オブ イミュノロジー

F ターム(参考) 2G045 AA35 CB01 DA13 FB03
4B024 AA01 AA14 BA51 CA01 DA03 GA11 HA12 HA17
4B063 QA07 QQ02 QQ43 QQ57 QR08 QR32 QR42 QR55 QR62 QS25
QS34 QS36 QX01
4C076 AA08 AA11 AA17 AA36 AA71 AA99 BB01 BB11 BB21 BB30
BB32 CC31 CC32 CC35
4C084 AA01 AA02 AA03 AA13 MA17 MA22 MA23 MA28 MA35 MA36
MA52 MA56 MA63 MA66 MA67 NA14 ZB33 ZB35 ZC55
4C085 AA03 BB11 CC21
4H045 AA11 BA10 CA05 DA76 EA29 EA53 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2006502728A5	公开(公告)日	2010-07-01
申请号	JP2004544486	申请日	2003-10-16
[标]申请(专利权)人(译)	免疫亲和清洁萨尔瓦多茶迪伊		
申请(专利权)人(译)	大阪产业振兴机构		
[标]发明人	宮澤正顯 クレリッチマリオ		
发明人	宮澤 正▲顯▼ クレリッチ、マリオ		
IPC分类号	C12N15/09 A61K9/00 A61K9/08 A61K9/20 A61K39/00 A61K48/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 C07K16/10 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 A61K38/00		
CPC分类号	A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 C12Q1/6883 C12Q1/703 C12Q2600/156 C12Q2600/172		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K9/00 A61K9/08 A61K9/20 A61K39/00.H A61K48/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 C07K16/10 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 A61K37 /02		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA51 4B024 /CA01 4B024/DA03 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA17 4B063/QA07 4B063/QQ02 4B063/QQ43 4B063/QQ57 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063 /QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4C076/AA08 4C076/AA11 4C076/AA17 4C076/AA36 4C076/AA71 4C076/AA99 4C076/BB01 4C076/BB11 4C076/BB21 4C076/BB30 4C076/BB32 4C076/CC31 4C076 /CC32 4C076/CC35 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA13 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA28 4C084/MA35 4C084/MA36 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA63 4C084 /MA66 4C084/MA67 4C084/NA14 4C084/ZB33 4C084/ZB35 4C084/ZC55 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/CC21 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA05 4H045/DA76 4H045/EA29 4H045/EA53 4H045 /FA74		
优先权	2002023982 2002-10-16 GB		
其他公开文献	JP2006502728A		

摘要(译)

描述了确定感染倾向，特别是HIV感染以及感染治疗的方法。