

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2007/069423

発行日 平成21年5月21日 (2009.5.21)

(43) 国際公開日 平成19年6月21日 (2007.6.21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	2GO45
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 Q	4BO24
GO1N 33/15 (2006.01)	GO1N 33/15 Z	4BO63
GO1N 33/50 (2006.01)	GO1N 33/50 Z	4BO65
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4CO84
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 29 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2007-550105 (P2007-550105)	(71) 出願人	503359821 独立行政法人理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2006/322732	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(22) 国際出願日	平成18年11月15日 (2006.11.15)	(72) 発明者	増田 健一 神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番2 2号 独立行政法人理化学研究所 横浜研 究所内
(31) 優先権主張番号	特願2005-358327 (P2005-358327)	(72) 発明者	石井 保之 神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番2 2号 独立行政法人理化学研究所 横浜研 究所内
(32) 優先日	平成17年12月12日 (2005.12.12)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2006-157690 (P2006-157690)		
(32) 優先日	平成18年6月6日 (2006.6.6)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレルギー診断用マーカー

(57) 【要約】

本発明は、アレルギーを特異的に検出する検査系、並びにアレルギーの増悪を鋭敏に反映する検査系などを提供する。

より詳細には、本発明は、プライマー、核酸プローブおよび抗体からなる群より選ばれる1以上のCHD2測定用手段を含む、診断用、特にアレルギーの診断用試薬、あるいは肥満細胞および/または幼若化T細胞の検出用試薬；動物から採取された生体サンプルにおいてCHD2の発現を測定し、該動物のアレルギーを評価することを含む、アレルギーの検査方法、あるいは肥満細胞および/または幼若化T細胞の検出方法などを提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プライマー、核酸プローブおよび抗体からなる群より選ばれる 1 以上の C H D 2 測定用手段を含む、診断用試薬。

【請求項 2】

アレルギーの診断用試薬である、請求項 1 記載の試薬。

【請求項 3】

アレルギーの有無または程度の診断用試薬である、請求項 1 記載の試薬。

【請求項 4】

ヒトまたはイヌにおける診断用試薬である、請求項 1 記載の試薬。

10

【請求項 5】

プライマー、核酸プローブおよび抗体からなる群より選ばれる 1 以上の C H D 2 測定用手段を含む、肥満細胞および／または幼若化 T 細胞の検出用試薬。

【請求項 6】

動物から採取された生体サンプルにおいて C H D 2 の発現を測定し、該動物のアレルギーを評価することを含む、アレルギーの検査方法。

【請求項 7】

肥満細胞および／または幼若化 T 細胞を含むサンプルにおいて C H D 2 の発現を測定することを含む、肥満細胞および／または幼若化 T 細胞の検出方法。

【請求項 8】

C H D 2 の発現または機能を調節する物質を含む、医薬、試薬または食品。

20

【請求項 9】

C H D 2 の発現または機能を調節する物質を含む、アレルギー疾患、免疫疾患または寄生虫性疾患の予防・治療薬。

【請求項 10】

C H D 2 の発現または機能を調節する物質を含む、肥満細胞および／または T 細胞の機能の調節剤。

【請求項 11】

被験物が C H D 2 の発現または機能を調節するか否かを評価することを含む、医薬、試薬または食品として有効な候補物のスクリーニング方法。

30

【請求項 12】

被験物が C H D 2 の発現または機能を調節するか否かを評価することを含む、アレルギー疾患、免疫疾患または寄生虫性疾患を予防・治療し得る物質のスクリーニング方法。

【請求項 13】

被験物が C H D 2 の発現または機能を調節するか否かを評価することを含む、肥満細胞および／または T 細胞の機能を調節し得る物質のスクリーニング方法。

【請求項 14】

以下からなる群より選ばれるいずれかの物質、細胞または動物：

(a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と 70% 以上のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドまたはその部分ペプチド；

40

(b) 配列番号 1 で表されるヌクレオチド配列の相補配列とハイストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドまたはその部分ヌクレオチド；

(c) (a) の発現ベクター；

(d) (c) の発現ベクターが組み込まれた形質転換体；

(e) C H D 2 タンパク質またはその部分ペプチドに対する抗体；

(f) C H D 2 タンパク質またはその部分ペプチドに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ；

(g) C H D 2 に対するアンチセンス核酸、リボザイム、RNA i 誘導性核酸、ターゲティングベクター、2 以上のプライマーのセットまたは核酸プローブ；

50

(h) C H D 2 の発現が調節された細胞または動物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アレルギー等の検査方法、診断用試薬等の試薬、医薬、食品、スクリーニング方法などを提供する。

【背景技術】

【0002】

アレルギーは近年、その患者数が増加していることから社会的に大きな問題となっている。その診断とそれに基づく適確な治療法の開発は社会的ニーズが大きい。アレルギーの診断はこれまでに主に感作抗原の同定（どんなアレルゲンにアレルギー反応を示すかを調べることを）を目的に行われてきた。このような検査には、皮内反応あるいはプリックテスト、さらに血清中の抗原特異的 I g E を測定する血清 I g E 検査がある。皮内反応やプリックテストはスギ花粉抗原液などを患者皮膚に皮内注射あるいは傷に塗布して膨疹（注射部位の皮膚の腫れ）ができるかどうか調べることによって、アレルギー反応を起こす物質を見つける検査方法である。また、血清中 I g E 検査は、血液中の I g E がどんな物質に対して作られているかを調べる検査であり、I g E が作られた物質は体内でアレルギー反応を起こす物質と想定されるため、I g E が反応する物質はすなわちアレルゲンであると判定される。

【0003】

このように従来のアレルギーの検査はアレルゲンとなる物質を見つけるためには有用である。しかし、陽性と判定された物質はアレルギー反応を起こす可能性があると考えられるものの、実際にアレルギー症状を起こすかどうかは不明であり、さらに、これら検査結果は、過去にアレルギーを獲得したことを示すだけであって現在はその物質にアレルギー反応を起こしているかどうかは不明であることが問題であった。このようなことから、症状が類似するアレルギーと感染症（感冒、インフルエンザなど）の鑑別、さらにアレルギー反応が実際に起こっているかどうかの判断には、従来のアレルギー検査は無効であり、これらの判断は現場の臨床医の経験に任されているのが現状で客観的判断はされていない。従って、実際に起こっているアレルギーだけを感知する検査系（アレルギーを特異的に検出する検査）、さらにはアレルギーの増悪を鋭敏に反映する検査系の開発が求められている。

【0004】

ところで、クロマチンヘリカーゼ DNA 結合タンパク質 2 (chromodomain helicase DNA binding protein 2: C H D 2) は、例えば、ヒト由来のものが GenBank アクセッション番号: NML001271 により登録されている。しかしながら、C H D 2 について科学的に意義ある報告は何らなされていない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、アレルギーを特異的に検出する検査系、さらにはアレルギーの増悪を鋭敏に反映する検査系などを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、C H D 2 がアレルギーを起こす主たる細胞である肥満細胞および幼若化 (blastogenic) T 細胞 (本明細書中、活性化 (activated) T 細胞と同義である) に特異的に発現していることを見出した。肥満細胞および幼若化 T 細胞はアレルギーの病変部に顕著に認められることから、C H D 2 の発現を観察することにより、肥満細胞および幼若化 T 細胞が関わるアレルギー反応の検出が可能になると考えられる。従って、C H D 2 の発現検査系はアレルギーの診断およびモニター指標として有用であり得る。

本発明者らはまた、CHD2の発現または機能を調節する物質が、医薬、試薬または食品として有用であり得ること、特にアレルギー疾患または免疫疾患等の疾患の予防・治療、あるいは肥満細胞およびT細胞（例、幼若化T細胞）の機能、分化または増殖の調節に有用であり得ること、ならびにCHD2の発現または機能を調節する物質のスクリーニングは、医薬、試薬または食品の開発、例えば、アレルギー疾患または免疫疾患等の疾患の予防・治療薬、あるいは肥満細胞およびT細胞の機能、分化または増殖を調節し得る物質の開発に有用であり得ることなどを見出した。

【0007】

以上の知見に基づき、本発明者らは、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、以下の発明などを提供する。

10

〔1〕プライマー、核酸プローブおよび抗体からなる群より選ばれる1以上のCHD2測定用手段を含む、診断用試薬。

〔2〕アレルギーの診断用試薬である、上記〔1〕の試薬。

〔3〕アレルギーの有無または程度の診断用試薬である、上記〔1〕の試薬。

〔4〕ヒトまたはイヌにおける診断用試薬である、上記〔1〕の試薬。

〔5〕プライマー、核酸プローブおよび抗体からなる群より選ばれる1以上のCHD2測定用手段を含む、肥満細胞および/または幼若化T細胞の検出用試薬。

〔6〕動物から採取された生体サンプルにおいてCHD2の発現を測定し、該動物のアレルギーを評価することを含む、アレルギーの検査方法。

〔7〕肥満細胞および/または幼若化T細胞を含むサンプルにおいてCHD2の発現を測定することを含む、肥満細胞および/または幼若化T細胞の検出方法。

20

〔8〕CHD2の発現または機能を調節する物質を含む、医薬、試薬または食品。

〔9〕CHD2の発現または機能を調節する物質を含む、アレルギー疾患、免疫疾患または寄生虫性疾患の予防・治療薬。

〔10〕CHD2の発現または機能を調節する物質を含む、肥満細胞および/またはT細胞の機能の調節剤。

〔11〕被験物がCHD2の発現または機能を調節するか否かを評価することを含む、医薬、試薬または食品として有効な候補物のスクリーニング方法。

〔12〕被験物がCHD2の発現または機能を調節するか否かを評価することを含む、アレルギー疾患、免疫疾患または寄生虫性疾患を予防・治療し得る物質のスクリーニング方法。

30

〔13〕被験物がCHD2の発現または機能を調節するか否かを評価することを含む、肥満細胞および/またはT細胞の機能を調節し得る物質のスクリーニング方法。

〔14〕以下からなる群より選ばれるいずれかの物質、細胞または動物：

(a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列と70%以上のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドまたはその部分ペプチド；

(b) 配列番号1で表されるヌクレオチド配列の相補配列とハイストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドまたはその部分ヌクレオチド；

(c) (a)の発現ベクター；

40

(d) (c)の発現ベクターが組み込まれた形質転換体；

(e) CHD2タンパク質またはその部分ペプチドに対する抗体；

(f) CHD2タンパク質またはその部分ペプチドに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ；

(g) CHD2に対するアンチセンス核酸、リボザイム、RNAi誘導性核酸、ターゲットイングベクター、2以上のプライマーのセットまたは核酸プローブ；

(h) CHD2の発現が調節された細胞または動物。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】マウスの各種臓器におけるCHD2の発現を示す図である。

50

【図2】 マウス肥満細胞におけるCHD2の発現を示す図である。

【図3】 マウスT細胞、B細胞におけるCHD2の発現を示す図である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明は、アレルギー等の病態または疾患の検査（または診断）方法を提供する。

【0010】

一実施形態では、本発明の検査方法は、例えば、(a) 動物から採取された生体サンプルにおいてCHD2の発現を測定し、(b) 該動物のアレルギーを評価することを含み得る。

【0011】

10

CHD2 (chromodomain helicase DNA binding protein 2) は、chromatin organization modifierドメインとSNF2 related helicase/ATPaseドメインにより特徴付けられるタンパク質ファミリーに属し、クロマチン構造を調節してDNAの転写に影響を与えると考えられるタンパク質である。CHD2の配列情報としては、各種動物由来のものがGenBankに登録されている。例えば、ヒトCHD2についてはGenBankアクセッション番号：NM_001271、マウスCHD2についてはGenBankアクセッション番号：XM_145698、イヌCHD2についてはGenBankアクセッション番号：XM_854029及びXM_536179、ラットCHD2についてはGenBankアクセッション番号：XM_218790、チンパンジーCHD2についてはGenBankアクセッション番号：XM_510607がGenBankに登録されている。

【0012】

20

上記(a)において、生体サンプルが採取され得る動物は、アレルギーを生じ得る任意の動物であり得る。本発明が適用され得る動物としては、例えば、霊長類、齧歯動物等の哺乳動物、あるいはペット、家畜、使役動物が挙げられる。より詳細には、本発明が適用され得る動物としては、例えば、ヒト、サル、チンパンジー、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ラクダ、ラマが挙げられる。

【0013】

本発明において用いられ得る生体サンプルは、上述の動物、即ち、アレルギーが疑われる、および/またはアレルギーを有し得る動物から採取された生体サンプルであり得る。CHD2の発現は、皮膚、肺、消化管等の外部環境に接する組織または臓器では認められないことから、このような組織または臓器においてCHD2の発現が認められた場合には、肥満細胞または幼若化T細胞が浸潤してアレルギー反応が生じていると考えられる。従って、生体サンプルは、CHD2の発現が通常認められないこのような組織または臓器由来のサンプルであり得、例えば、鼻粘膜、口腔粘膜、皮膚、眼（例、結膜、角膜）、皮膚、気管、肺、消化管、膀胱、膈粘膜、尿道、耳垢（耳道）、喀痰等の粘液等の組織または臓器由来のサンプルが挙げられる。なお、侵襲性が低いという観点からは、上記のうち、鼻粘膜、口腔粘膜、皮膚、眼、膈粘膜、耳垢、喀痰等の粘液などの組織由来のサンプルが好ましい。

30

【0014】

本発明の検査方法の対象となり得るアレルギーは、生体が曝され得る、生体が摂取し得る、または生体に適用され得る物質または組成物により生じるものである限り特に限定されない。このような物質または組成物としては、例えば、花粉（例、スギ、ヒノキ、ブタクサ、シラカバ、牧草）、食品（例、牛乳、そば、卵、ピーナッツ、カニ、エビ、果物、ごま、そば、小麦、米、とうもろこし、肉類またはそれらの加工品）、ヒト以外の生物またはその由来物（例、ダニ、ゴキブリ、またはイヌ、ネコ、ウサギ等の動物またはオウム、インコ等の鳥類の体毛、糞便、尿、フケ）、薬物（例、ペニシリン等の抗生物質、アスピリン等の抗炎症薬、セボフルレン等の吸入麻酔薬、皮膚外用薬）、医療用品（例、喘息患者に対する気管支洗浄液、歯科用品）、生活用品（例、化粧品、整髪料、クリーム、洗剤、塗料、殺虫剤、アクセサリー）、その他の物質または組成物など（例、ラテックス、ホルムアルデヒド、ニッケル等の金属、樹脂、日光）が挙げられる。以下、このような物

40

50

質または組成物を、必要に応じてアレルゲンと省略する。

【0015】

なお、本発明の検査方法の対象となり得るアレルギーは、肥満細胞およびT細胞が関与するアレルギーであるI型およびIV型アレルギーであり得る。従って、これらのアレルギーを、II型およびIII型アレルギーと鑑別することが可能である。

【0016】

CHD2の発現の測定は、CHD2遺伝子の転写産物またはCHD2タンパク質を対象として自体公知の方法により行うことができる。例えば、CHD2遺伝子の転写産物の発現量は、生体サンプルからのtotal RNAの調製後、PCR（例、RT-PCR、リアルタイムPCR、定量的PCR）、LAMP（Loop-mediated isothermal amplification）（例えば、WO00/28082参照）、ICAN（Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids）（例えば、WO00/56877参照）等の遺伝子増幅法、あるいはノザンブロッティング、マイクロアレイなどにより測定され得る。また、翻訳産物の発現量は、生体サンプルからの抽出液の調製後、免疫学的手法により測定され得る。このような免疫学的手法としては、例えば、酵素免疫測定法（EIA）（例、直接競合ELISA、間接競合ELISA、サンドイッチELISA）、放射免疫測定法（RIA）、蛍光免疫測定法（FIA）、免疫クロマト法、ルミネッセンス免疫測定法、スピン免疫測定法、ウエスタンブロット法、免疫組織化学的染色法が挙げられる。CHD2の発現の測定を可能とする上記以外の方法としては、例えば、質量分析法が挙げられる。

【0017】

上記（b）において、CHD2の発現の測定結果に基づき、動物におけるアレルギーが評価され得る。動物におけるアレルギーの評価は、種々の観点より行うことができる。

【0018】

例えば、動物におけるアレルギーの評価は、アレルギー反応の有無の観点より行われ得る。CHD2の発現が通常認められない組織または臓器由来のサンプルにおいてCHD2の発現が認められた場合、肥満細胞および／または幼若化T細胞が当該組織または臓器に浸潤していると考えられる。従って、このような組織または臓器においてCHD2の発現が確認された場合には、アレルギー反応が現に生じていると考えられる。これらの理由により、本発明の検査方法は、現に生じているアレルギーを検知できる、診断特異度が高い、高感度である等の利点を有する。

【0019】

アレルギー反応の有無の評価はまた、アレルギー様症状を有する動物を対象として行うことも有益である。このような態様では、アレルギー様症状を有する動物において、該症状が本当にアレルギーに起因するものであるか否かが評価され得る。換言すれば、アレルギー様症状を示す疾患とアレルギーとの鑑別が可能である。これは、アレルギー様症状を示す疾患の多くは、肥満細胞および／または幼若化T細胞が組織または臓器に浸潤し得ないことに起因する。本発明の検査方法によりアレルギーとの鑑別が可能である、アレルギー様症状を示す疾患は、肥満細胞および／または幼若化T細胞が組織または臓器に浸潤し得ない疾患である限り特に限定されないが、例えば、感染症（例、感冒、インフルエンザ、真菌症、ブドウ球菌感染症、風疹等の皮膚ウイルス感染症）、自己免疫疾患（例、膠原病）、異物、腫瘍、乾癬、シックハウス症候群、寄生虫性疾患が挙げられる。

【0020】

動物におけるアレルギーの評価はまた、アレルギー反応の程度の観点より行われ得る。アレルギー反応の程度は、組織または臓器に浸潤する肥満細胞数および／または幼若化T細胞数、ひいては当該組織または臓器由来の生体サンプルにおけるCHD2の発現量に相関し得ると考えられるため、CHD2の発現量に基づきアレルギー反応の程度を評価することが可能である。従って、本発明の検査方法は、例えば、抗アレルギー療法（例、減感作療法）における治療効果のモニタリングに有用である。

【0021】

別の実施形態では、本発明の検査方法は、例えば、T細胞および肥満細胞の発生、分化

、成熟に関連する検査（例、免疫疾患の検査、免疫療法等のモニタリング）に有用である。

【0022】

本発明はまた、診断用試薬を提供する。

【0023】

本発明の試薬は、例えば、CHD2測定用手段を含み得る。CHD2測定用手段は、CHD2の発現の測定が可能である限り特に限定されないが、例えば、プライマー、核酸プローブ、抗体が挙げられる。本発明はまた、このようなCHD2測定用手段自体をも提供する。本発明の試薬は、例えば、本発明の検査方法を簡便に行うことを可能にする。

【0024】

本発明の試薬に含まれ得るプライマーは、CHD2遺伝子の増幅および検出を可能とする限り特に限定されない。例えば、プライマーのサイズは、少なくとも約12bp以上、好ましくは約15～100bp、より好ましくは約16～50bp、さらにより好ましくは約18～35bpであり得る。また、遺伝子増幅法の種類に応じて必要とされるプライマー数が異なるため、本発明の試薬に含まれ得るプライマー数は特に限定されないが、例えば、本発明の試薬は、2以上のプライマーを含み得る。2以上のプライマーは、予め混合されていても、混合されていなくてもよい。このようなプライマーは、自体公知の方法により作製できる。

【0025】

本発明の試薬に含まれ得る核酸プローブは、CHD2遺伝子の検出を可能とする限り特に限定されない。核酸プローブはDNA、RNAのいずれでもよいが、安定性等を考慮するとDNAが好ましい。核酸プローブはまた、1本鎖又は2本鎖のいずれでもよい。核酸プローブのサイズは、CHD2遺伝子の転写産物に特異的にハイブリダイズし得る限り特に限定されないが、例えば約15bp以上、好ましくは約15～1000bp、より好ましくは約50～500bpである。核酸プローブは、マイクロアレイのように基板上に固定された形態で提供されてもよい。このような核酸プローブは、自体公知の方法により作製できる。

【0026】

本発明の試薬に含まれ得る抗体は、CHD2タンパク質に特異的に結合し得る抗体である限り特に限定されない。例えば、CHD2タンパク質に対する抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれでもよい。抗体はまた、抗体のフラグメント（例、Fab、F(ab')₂）、組換え抗体（例、scFv）であってもよい。抗体は、プレート等の基板上に固定された形態で提供されてもよい。抗体は、自体公知の方法により作製できる。

【0027】

例えば、ポリクローナル抗体は、CHD2タンパク質あるいはその部分ペプチド（必要に応じて、ウシ血清アルブミン、KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) 等のキャリアタンパク質に架橋した複合体とすることもできる）を抗原として、市販のアジュバント（例、完全または不完全フロイントアジュバント）とともに、動物の皮下あるいは腹腔内に2～3週間おきに2～4回程度投与し（部分採血した血清の抗体価を公知の抗原抗体反応により測定し、その上昇を確認しておく）、最終免疫から約3～約10日後に全血を採取して抗血清を精製することにより取得できる。抗原を投与する動物としては、ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ハムスターなどの哺乳動物が挙げられる。

【0028】

また、モノクローナル抗体は、細胞融合法（例、渡邊武、細胞融合法の原理とモノクローナル抗体の作成、谷内昭、高橋利忠編、「モノクローナル抗体とがん—基礎と臨床—」、第2-14頁、サイエンスフォーラム出版、1985年）により作製できる。例えば、マウスに該因子を市販のアジュバントと共に2～4回皮下あるいは腹腔内に投与し、最終投与の約3日後に脾臓あるいはリンパ節を採取し、白血球を採取する。この白血球と骨髓腫細胞（例、NS-1、P3X63Ag8など）を細胞融合して該因子に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得る。細胞融合はPEG法 [J. Immunol. Methods, 81(2): 223-228 (1985)]

10

20

30

40

50

85)]でも電圧パルス法 [Hybridoma, 7(6): 627-633 (1988)]であってもよい。所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、周知のE I AまたはR I A法等を用いて抗原と特異的に結合する抗体を、培養上清中から検出することにより選択できる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養は、インビトロ、またはマウスもしくはラット、好ましくはマウス腹水中等のインビボで行うことができ、抗体はそれぞれハイブリドーマの培養上清および動物の腹水から取得できる。

【0029】

C H D 2測定用手段は、必要に応じて、標識用物質で標識された形態で提供され得る。標識用物質としては、例えば、F I T C、F A M等の蛍光物質、ルミノール、ルシフェリン、ルシゲニン等の発光物質、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、¹²⁵I等の放射性同位体、ビオチン、ストレプトアビジン等の親和性物質などが挙げられる。

10

【0030】

本発明の試薬は、C H D 2測定用手段に加え、さらなる構成要素を含むキットの形態で提供されてもよい。この場合、キットに含まれる各構成要素は、互いに隔離された形態、例えば、異なる容器に格納された形態で提供され得る。例えば、C H D 2測定用手段が標識用物質で標識されていない場合、このようなキットは、標識用物質をさらに含み得る。このようなキットはまた、ポジティブコントロール（例、C H D 2遺伝子をコードするポリヌクレオチドまたはその部分ヌクレオチド、C H D 2タンパク質またはその部分ペプチド）を含み得る。

【0031】

より詳細には、本発明の試薬がキットの形態で提供される場合、C H D 2測定用手段の種類に応じたさらなる構成要素を含み得る。例えば、C H D 2測定用手段がプライマーである場合、キットは、逆転写酵素、核酸抽出液をさらに含み得る。C H D 2測定用手段が核酸プローブである場合、キットは、核酸抽出液をさらに含んでもよい。C H D 2測定用手段が抗体である場合、キットは、2次抗体（例、抗I g G抗体）、2次抗体の検出用試薬をさらに含んでもよい。

20

【0032】

また、本発明の試薬がキットの形態で提供される場合、動物から生体サンプルを採取し得る手段をさらに含み得る。動物から生体サンプルを採取し得る手段は、動物から生体サンプルを入手可能である限り特に限定されないが、例えば、非生検器具（例、綿棒、メス、テープ等の細胞採取用具、あるいは水疱、膿疱からの内溶液採取用具（例、注射針））、生検器具（例、生検針）などが挙げられる。

30

【0033】

本発明は、肥満細胞および/または幼若化T細胞の検出方法を提供する。

【0034】

本発明の検出方法は、例えば、肥満細胞および/または幼若化T細胞を含むサンプルにおいてC H D 2の発現を測定することを含み得る。本発明の検出方法は、例えば、上述した検査方法に準じてインビトロで行うことができる。本発明の検出方法は、例えば、上述した検査方法に有用である。

【0035】

本発明の検出方法はまた、アレルギーを誘発し得ない、またはアレルギーを誘発し得る物質または組成物（例、食品、飲料水）のスクリーニングに有用であり、アレルギーを誘発し得ない物質または組成物の開発、あるいはアレルギーを誘発し得る物質または組成物の同定を可能とする。この場合、肥満細胞および/または幼若化T細胞を含むサンプルとして、被験物に曝された、被験物を摂取した、または被験物が適用された上述の動物由来の生体サンプル（生体サンプルa）が使用され得る。この場合、被験物は、生体が曝され得る、生体が摂取し得る、または生体に適用（例、投与）され得る物質または組成物である限り特に限定されない。このような態様では、本発明の検出方法は、生体サンプルaにおけるC H D 2の発現の測定後、被験物がアレルギーを誘発し得るか否かを評価することを含み得る。被験物としては、例えば、後述するものが使用できる。

40

50

【0036】

本発明の検出方法はさらに、アレルギーを抑制し得る物質または組成物（例、食品、飲料水）のスクリーニングに有用であり、アレルギーを抑制し得る物質または組成物の開発を可能とする。この場合、肥満細胞および／または幼若化T細胞を含むサンプルとして、アレルギーに曝された、アレルギーを摂取した、またはアレルギーが適用され、かつ被験物に曝された、被験物を摂取した、または被験物が適用された上述の動物由来の生体サンプル（生体サンプルb）が使用され得る。この場合、被験物は、生体が曝され得る、生体が摂取し得る、または生体に適用され得る物質または組成物である限り特に限定されない。このような態様では、本発明の検出方法は、生体サンプルbにおけるCHD2の発現の測定後、被験物が、アレルギーにより誘発され得るアレルギーを抑制し得るか否かを評価することを含み得る。被験物としては、例えば、後述するものが使用できる。

10

【0037】

本発明はまた、肥満細胞および／または幼若化T細胞の検出用試薬を提供する。本発明の検出用試薬は、上述した1以上のCHD2測定用手段を含み得る。本発明の検出用試薬は、例えば、上述した診断用試薬に準じて作製、使用できる。本発明の検出用試薬はまた、本発明の検出方法を簡便に行うことを可能とする。

【0038】

本発明は、CHD2の発現または機能を調節する物質を含む剤（または組成物）を提供する。本発明はまた、CHD2の発現または機能を調節する物質自体をも提供する。CHD2の生物学的役割についてはこれまで何ら報告がないが、本発明者らは、CHD2が肥満細胞および幼若化T細胞において特異的に発現していることから、肥満細胞およびT細胞（例、幼若化T細胞）において重要な役割を果たし得ることを見出した。

20

【0039】

一実施形態では、CHD2の発現または機能を調節する物質は、CHD2の発現を促進する物質であり得る。なお、本明細書で使用される場合、CHD2の発現の促進としては、CHD2（タンパク質）自体の補充をも含むものとする。CHD2の発現を促進する物質としては、例えば、CHD2（タンパク質）、CHD2をコードする核酸を含む発現ベクター（CHD2発現ベクター）、低分子化合物が挙げられる。

【0040】

本発明の剤に含まれ得るCHD2は、上述の動物由来の天然CHD2またはその変異体であり得るが、好ましくはヒト由来の天然CHD2またはその変異体であり得る。CHD2は、肥満細胞および／またはT細胞（例、幼若化T細胞）の機能、あるいはその分化または増殖を調節（例、促進または抑制）し得る限り、あるいはchromatin organization modifierドメインまたはSNF2 related helicase/ATPaseドメインの機能（例、DNA結合能）を保持し得る限り、そのコードするアミノ酸配列（例、配列番号1で表されるヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列、あるいは配列番号2で表されるアミノ酸配列）において1以上のアミノ酸の変異（例、欠失、置換、付加、挿入）を有していてもよい。

30

【0041】

より詳細には、本発明の剤に含まれ得るCHD2は、配列番号1で表されるヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列、あるいは配列番号2で表されるアミノ酸配列に対して、例えば約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらにより好ましくは約95%以上、最も好ましくは約97%、約98%または約99%以上のアミノ酸配列同一性を有するものであり得る。同一性（%）は自体公知の方法により決定できる。例えば、同一性（%）は、当該分野で慣用のプログラム（例えば、BLAST、FASTA等）を初期設定で用いて決定することができる。また、別の局面では、同一性（%）は、当該分野で公知の任意のアルゴリズム、例えば、Needlemanら(1970) (J. Mol. Biol. 48: 444-453)、Myers及びMiller (CABIOS, 1988, 4: 11-17)のアルゴリズム等を使用して決定することができる。Needlemanらのアルゴリズムは、GCGソフトウェアパッケージ(www.gcg.comで入手可能)のGAPプログラムに組み込まれており、同一性（%）は、例え

40

50

ば、BLOSUM 62 matrix又はPAM250 matrix、並びにgap weight: 16、14、12、10、8、6若しくは4、及びlength weight: 1、2、3、4、5若しくは6のいずれかを使用することによって決定することができる。また、Myers及びMillerのアルゴリズムは、GCC配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラムに組み込まれている。アミノ酸配列を比較するためにALIGNプログラムを利用する場合、例えば、PAM120 weight residue table、gap length penalty 12、gap penalty 4を用いることができる。同一性 (%) は、上記の任意の方法で決定されたものであれば構わないが、好ましくは計算に際して、上記の方法のなかで最も低い値を示す方法が採用され得る。CHD 2の部分ペプチドは、所定の有用性 (例、免疫原性) を示し得る長さである限り特に限定されず、例えば、少なくとも約8個以上、好ましくは約10個以上、より好ましくは約12個以上の連続するアミノ酸からなり得る。

【0042】

本発明の剤に含まれ得るCHD 2はまた、天然のCHD 2発現細胞から回収され得るタンパク質、または組換えタンパク質であり得る。CHD 2は、自体公知の方法により調製でき、例えば、a) 天然のCHD 2発現細胞からCHD 2を回収してもよく、b) 宿主細胞 (例、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞) にCHD 2発現ベクター (後述) を導入することにより形質転換体を作製し、該形質転換体により産生されるCHD 2を回収してもよく、c) ウサギ網状赤血球ライセート、コムギ胚芽ライセート、大腸菌ライセート等を用いる無細胞系によりCHD 2を合成してもよい。CHD 2は、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法；透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法；イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法；アフィニティークロマトグラフィー、CHD 2抗体の使用などの特異的親和性を利用する方法；逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法；等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法；これらを組合せた方法などにより適宜精製される。

【0043】

本発明の剤に含まれ得るCHD 2発現ベクターに挿入される、CHD 2をコードするポリヌクレオチドは、上記アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有するものであり得る。CHD 2発現ベクターに挿入される上記ポリヌクレオチドはまた、配列番号1で表されるヌクレオチド配列に対してハイストリンジェント条件下でハイブリダイズし得るポリヌクレオチドであり得る。ハイストリンジェント条件下でのハイブリダイゼーションの条件は、既報の条件を参考に設定することができる (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 6.3.1-6.3.6, 1999)。例えば、ハイストリンジェント条件下でのハイブリダイゼーションの条件としては、6×SSC (sodium chloride/sodium citrate) /45℃でのハイブリダイゼーション、次いで0.2×SSC/0.1% SDS/50~65℃での1回または2回以上の洗浄が挙げられる。CHD 2をコードするポリヌクレオチドの部分ヌクレオチドは、例えば、少なくとも約15または16個以上、好ましくは約18個以上、より好ましくは約20個以上の長さであり得る。

【0044】

別の実施形態では、CHD 2の発現または機能を調節する物質は、CHD 2の発現を抑制する物質であり得る。CHD 2の発現を抑制する物質としては、例えば、アンチセンス核酸、リボザイム、RNA i誘導性核酸 (例、siRNA)、CHD 2に対する転写活性化因子が結合する領域を模倣するデコイ核酸、ターゲティングベクター (例、CHD 2遺伝子の相同組換えを誘導し得るCHD 2遺伝子に相同な第一および第二のポリヌクレオチド、ならびに必要に応じて選択マーカーを含むベクター)、低分子化合物が挙げられる。

【0045】

別の実施形態では、CHD 2の発現または機能を調節する物質は、CHD 2の機能を抑制する物質であり得る。CHD 2の機能を抑制する物質としては、例えば、CHD 2の作用を妨げ得る物質である限り特に限定されないが、CHD 2阻害タンパク質 (例、CHD 2ドミナントネガティブ変異体、上述したCHD 2抗体、あるいはキメラ抗体、ヒト化ま

たはヒト型抗体)、これらをコードする核酸を含む発現ベクターが挙げられる。

【0046】

CHD2の発現または機能を調節する物質が、核酸分子またはタンパク質分子である場合、本発明の剤は、核酸分子またはタンパク質分子をコードする核酸分子を含む発現ベクターを有効成分とすることもできる。当該発現ベクターは、上記の核酸分子をコードするオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドが、投与対象である哺乳動物の細胞内でプロモーター活性を発揮し得るプロモーターに機能的に連結されていなければならない。使用されるプロモーターは、投与対象で機能し得るものであれば特に制限されず、例えば、SV40由来初期プロモーター、サイトメガロウイルスLTR、ラウス肉腫ウイルスLTR、MoMuLV由来LTR、アデノウイルス由来初期プロモーター等のウイルスプロモーター、ならびに β -アクチン遺伝子プロモーター、PGK遺伝子プロモーター、トランスフェリン遺伝子プロモーター等の哺乳動物の構成タンパク質遺伝子プロモーターなどが挙げられる。また、使用されるプロモーターとしては、CHD2発現細胞(例、肥満細胞、幼若化T細胞等のT細胞)に特異的なプロモーターを用いてもよい。このようなプロモーターは、CHD2発現細胞に特異的に発現している任意の遺伝子のプロモーターであり得るが、例えば、肥満細胞特異的プロモーターとしては、ckit、FcεRIa、FcεRIbを、幼若化T細胞等のT細胞特異的プロモーターとしては、IL-2、OX-40、Sproutyを使用できる。本発明はまた、このようなプロモーターを有する発現ベクターを提供する。

10

【0047】

発現ベクターは、好ましくは核酸分子をコードするオリゴ(ポリ)ヌクレオチドの下流に転写終結シグナル、すなわちターミネーター領域を含む。さらに、形質転換細胞選択のための選択マーカー遺伝子(テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン、ハイグロマイシン、ホスフィノスリシン等の薬剤に対する抵抗性を付与する遺伝子、栄養要求性変異を相補する遺伝子等)をさらに含むこともできる。

20

【0048】

発現ベクターとして使用される基本骨格のベクターは、プラスミドまたはウイルスベクターであり得るが、ヒト等の哺乳動物への投与に好適なベクターとしては、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルス、センダイウイルス、レンチウイルス等のウイルスベクターが挙げられる。

30

【0049】

本発明の剤は、CHD2の発現または機能を調節する物質に加え、任意の担体、例えば医薬上許容され得る担体を含むことができる。医薬上許容され得る担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニット、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、ナトリウム-グリコーラースターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン酸、メントール、グリシリン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。

40

【0050】

経口投与に好適な製剤は、水、生理食塩水のような希釈液に有効量の物質を溶解させた液剤、有効量の物質を固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、サッシェ剤または錠剤、

50

適当な分散媒中に有効量の物質を懸濁させた懸濁液剤、有効量の物質を溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化させた乳剤、あるいは散剤、顆粒剤等である。

【0051】

非経口的な投与（例、静脈内注射、皮下注射、筋肉注射、局所注入など）に好適な製剤としては、水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。当該製剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分および医薬上許容され得る担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌のビヒクルに溶解または懸濁すればよい状態で保存することもできる。

10

【0052】

本発明の剤の投与量は、有効成分の活性や種類、投与様式（例、経口、非経口）、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なり一概に云えないが、通常、成人1日あたり有効成分量として約0.001mg～約2.0gである。

【0053】

本発明の剤は、例えば、医薬、試薬または食品として有用である。例えば、本発明の剤は、免疫疾患（例、自己免疫疾患、免疫不全症）、アレルギー疾患（例、スギ花粉症、喘息、アトピー性皮膚炎）、寄生虫性疾患（例、アニサキス症、疥癬）の予防・治療のために、あるいは肥満細胞および/またはT細胞（例、幼若化T細胞）の機能の調節、あるいはそれらの分化または増殖の調節のために使用することができる。

20

【0054】

本発明は、被験物がCHD2の発現または機能を調節し得るか否かを評価することを含む、医薬、試薬または食品として有効な候補物、あるいは肥満細胞および/またはT細胞（例、幼若化T細胞）の機能、またはその分化または増殖を調節し得る物質のスクリーニング方法、ならびに当該スクリーニング方法により得られる物質、および当該物質を含む剤（または組成物）を提供する。

【0055】

スクリーニング方法に供される被験物は、いかなる化合物または組成物であってもよく、例えば、核酸（例、ヌクレオシド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド）、糖質（例、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖）、脂質（例、飽和または不飽和の直鎖、分岐鎖および/または環を含む脂肪酸）、アミノ酸、タンパク質（例、オリゴペプチド、ポリペプチド）、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、天然成分（例、微生物、動植物、海洋生物等由来の成分）、あるいは食品、飲料水等が挙げられる。

30

【0056】

本発明のスクリーニング方法は、被験物がCHD2の発現または機能を調節し得るか否かを評価可能である限り、如何なる形態でも行われ得る。例えば、本発明のスクリーニング方法は、1) CHD2の発現を測定可能な細胞を用いたCHD2の発現の測定、2) CHD2の機能を測定可能な再構成系を用いたCHD2の機能の測定、3) CHD2発現細胞を用いたCHD2の機能の測定、4) 動物を用いたCHD2の発現または機能の測定などに基づき行われ得る。

40

【0057】

上記1)において、CHD2の発現を測定可能な細胞を用いるスクリーニング方法は、例えば、下記の工程(a)～(c)を含み得る：

(a) 被験物とCHD2の発現を測定可能な細胞とを接触させる工程；

(b) 被験物を接触させた細胞におけるCHD2の発現量を測定し、該発現量を被験物を接触させない対照細胞におけるCHD2の発現量と比較する工程；

50

(c) 上記 (b) の比較結果に基づいて、CHD 2 の発現量を調節する被験物を選択する工程。

【0058】

上記方法の工程 (a) では、被験物がCHD 2 の発現を測定可能な細胞と接触条件下におかれる。CHD 2 の発現を測定可能な細胞に対する被験物の接触は、培地中で行われ得る。

【0059】

CHD 2 の発現を測定可能な細胞とは、CHD 2 の産物 (例、転写産物、翻訳産物) の発現レベルを直接的または間接的に評価可能な細胞をいう。CHD 2 の産物の発現レベルを直接的に評価可能な細胞は、CHD 2 発現細胞であり得、一方、CHD 2 の産物の発現レベルを間接的に評価可能な細胞は、CHD 2 遺伝子の転写調節領域についてレポーターアッセイを可能とする細胞であり得る。CHD 2 の発現を測定可能な細胞は、上述した動物の細胞であり得る。

【0060】

CHD 2 発現細胞は、CHD 2 を潜在的に発現するものである限り特に限定されない。かかる細胞は、当業者であれば容易に同定でき、初代培養細胞、当該初代培養細胞から誘導された細胞株、市販の細胞株、セルバンクより入手可能な細胞株などを使用できる。また、CHD 2 発現細胞としては、肥満細胞、幼若化T細胞を使用することもまた好ましい。また、アレルギー疾患、免疫疾患、寄生虫性疾患等の疾患モデル動物由来の細胞を用いてもよい。

【0061】

CHD 2 遺伝子の転写調節領域についてレポーターアッセイを可能とする細胞は、CHD 2 遺伝子の転写調節領域、当該領域に機能可能に連結されたレポーター遺伝子を含む細胞である。CHD 2 遺伝子の転写調節領域、レポーター遺伝子は、発現ベクター中に挿入され得る。CHD 2 遺伝子の転写調節領域は、CHD 2 の発現を制御し得る領域である限り特に限定されないが、例えば、CHD 2 遺伝子の転写開始点から上流約 2 k b p までの領域、あるいは該領域の塩基配列において 1 以上の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、且つCHD 2 の転写を制御する能力を有する領域などが挙げられる。レポーター遺伝子は、検出可能なタンパク質または検出可能な物質を生成する酵素をコードする遺伝子であればよく、例えばGFP (緑色蛍光タンパク質) 遺伝子、GUS (β -グルクロニダーゼ) 遺伝子、LUC (ルシフェラーゼ) 遺伝子、CAT (クロラムフェニコルアセチルトランスフェラーゼ) 遺伝子等が挙げられる。

【0062】

CHD 2 遺伝子の転写調節領域、当該領域に機能可能に連結されたレポーター遺伝子が導入される細胞は、CHD 2 遺伝子の転写調節機能を評価できる限り、即ち、該レポーター遺伝子の発現量が定量的に解析可能である限り特に限定されない。しかしながら、CHD 2 に対する生理的な転写調節因子を発現し、CHD 2 の発現調節の評価により適切であると考えられることから、該導入される細胞としては、CHD 2 発現細胞が好ましい。

【0063】

被験物とCHD 2 の発現を測定可能な細胞とが接触される培地は、用いられる細胞の種類などに応じて適宜選択されるが、例えば、約 5 ~ 20 % のウシ胎仔血清を含む最少必須培地 (MEM)、ダルベッコ改変最少必須培地 (DMEM)、RPMI 1640 培地、199 培地などである。培養条件もまた、用いられる細胞の種類などに応じて適宜決定されるが、例えば、培地の pH は約 6 ~ 約 8 であり、培養温度は通常約 30 ~ 約 40 °C であり、培養時間は約 12 ~ 約 72 時間である。

【0064】

上記方法の工程 (b) では、先ず、被験物を接触させた細胞におけるCHD 2 の発現量が測定される。発現量の測定は、用いた細胞の種類などを考慮し、上述した自体公知の方法により行われ得る。また、CHD 2 の発現を測定可能な細胞として、CHD 2 転写調節領域についてレポーターアッセイを可能とする細胞を用いた場合、発現量は、レポーター

のシグナル強度に基づき測定され得る。

【0065】

次いで、被験物を接触させた細胞におけるCHD2の発現量が、被験物を接触させない対照細胞におけるCHD2の発現量と比較される。発現量の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行なわれる。被験物を接触させない対照細胞におけるCHD2の発現量は、被験物を接触させた細胞におけるCHD2の発現量の測定に対し、事前に測定した発現量であっても、同時に測定した発現量であってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定した発現量であることが好ましい。

【0066】

上記方法の工程(c)では、CHD2の発現量を調節する被験物が選択される。例えば、CHD2の発現量を増加させる(発現を促進する)、またはCHD2の発現量を減少させる(発現を抑制する)被験物は、例えば、上述した疾患の予防・治療に、あるいは肥満細胞および/またはT細胞(例、幼若化T細胞)の機能、あるいは分化または増殖の調節に有用である。

【0067】

上記2)において、CHD2の機能を測定可能な再構成系とは、CHD2(タンパク質)およびその他の因子(例、核酸分子、タンパク質)を含む、被験物によるCHD2の機能調節を評価可能な非培養細胞系をいう。再構成系を用いる本発明のスクリーニング方法は、例えば、下記の工程(a)~(c)を含み得る：

- (a) 被験物、ならびにCHD2(タンパク質)およびその結合因子を接触させる工程；
- (b) 被験物を接触させた場合におけるCHD2およびその結合因子を含む複合体量を測定し、該量を被験物を接触させない場合の該複合体量と比較する工程；
- (c) 上記(b)の比較結果に基づいて、CHD2の機能を調節する被験物を選択する工程。

【0068】

上記方法の工程(a)では、CHD2およびその結合因子を含む複合体の形成が可能であるアッセイ系において、被験物、CHD2およびその結合因子が接触される。結合因子としては、例えば、DNAが挙げられる。なお、CHD2およびその結合因子の一方または双方は、それらの複合体の検出を容易にするため標識されていてもよい。標識としては、例えば、上述した標識用物質による標識の他、レポーター遺伝子によりコードされ得るタンパク質との融合が挙げられる。また、本アッセイ系では、CHD2および/またはその他の因子(例、結合因子)等を含む細胞ホモジネート(例、CHD2発現ベクターおよび/またはCHD2の結合因子の発現ベクターをトランスフェクトした細胞のホモジネート)も使用することができる。

【0069】

上記方法の工程(b)では、先ず、被験物を接触させた場合における複合体量が測定される。複合体量の測定は、自体公知の方法により行うことができ、例えば、免疫学的手法(例、免疫沈降法、ELISA)、表面プラズモン共鳴を利用する相互作用解析法(例、Biacore^{T M}の使用)が挙げられる。

【0070】

次いで、被験物を接触させた場合の複合体量が、被験物を接触させない場合の複合体量と比較される。複合体量の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行なわれる。被験物を接触させない場合の複合体量は、被験物を接触させた場合の複合体量の測定に対し、事前に測定した複合体量であっても、同時に測定した複合体量であってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定した複合体量であることが好ましい。

【0071】

上記方法の工程(c)では、複合体量を調節する被験物が選択される。例えば、CHD2の複合体量を増加させる(複合体の形成を促進する)、またはCHD2の複合体量を減少させる(複合体の形成を抑制する)被験物は、例えば、上述した疾患の予防・治療に、あるいは肥満細胞および/またはT細胞(例、幼若化T細胞)の機能、あるいは分化また

は増殖の調節に有用である。

【0072】

上記3)において、CHD2発現細胞を用いるCHD2の機能レベルを測定するスクリーニング方法は、例えば、下記の工程(a)～(c)を含み得る：

- (a) 被験物とCHD2発現細胞とを接触させる工程；
- (b) 被験物を接触させた細胞におけるCHD2の機能レベルを測定し、該機能レベルを被験物を接触させない対照細胞における機能レベルと比較する工程；
- (c) 上記(b)の比較結果に基づいて、CHD2の機能レベルを調節する被験物を選択する工程。

【0073】

上記方法の工程(a)では、被験物がCHD2発現細胞と接触条件下におかれる。CHD2発現細胞に対する被験物の接触は、培地中で行われ得る。ここで用いられるCHD2発現細胞は、タンパク質レベルでのCHD2のアッセイが可能な程度にCHD2を発現し得る細胞であり得る。このようなCHD2発現細胞の好ましい例としては、CHD2発現ベクターおよび/またはCHD2の結合因子の発現ベクターがトランスフェクトされた細胞(例、肥満細胞、T細胞)が挙げられる。CHD2発現細胞に対する被験物の接触は、培地中で行われ得る。

10

【0074】

上記方法の工程(b)では、まず、被験物を接触させた細胞におけるCHD2の機能レベルが測定される。CHD2の機能レベルは、例えば、上記2)の方法の他、ツーハイブリッドシステムにより測定できる。なお、本工程(b)における機能レベルの比較、および上記方法の工程(c)は、上記方法2)と同様に行われ得る。

20

【0075】

上記4)において、動物を用いる本発明のスクリーニング方法は、例えば、下記の工程(a)～(c)を含み得る：

- (a) 被験物を動物に投与する工程；
- (b) 被験物を投与した動物におけるCHD2の発現量または機能レベルを測定し、該発現量を被験物を投与しない対照動物におけるCHD2の発現量または機能レベルと比較する工程；
- (c) 上記(b)の比較結果に基づいて、CHD2の発現量または機能レベルを調節する被験物を選択する工程。

30

なお、本方法論は、(b)および(c)の工程のみを必須とすることもできる。

【0076】

上記方法の工程(a)では、動物として、例えば、上述の動物が使用される。動物としてはまた、上述した疾患モデル動物が使用され得る。被験物の動物への投与は自体公知の方法により行われ得る。

【0077】

上記方法の工程(b)では、CHD2の発現量または機能レベルの測定は自体公知の方法により測定され得る。例えば、動物から単離または採取された肥満細胞またはT細胞(例、幼若化T細胞)あるいは上述した生体サンプルにおけるCHD2の発現量または機能レベルが、上記1)～3)の方法の工程(b)と同様の方法論により測定され得る。本工程(b)における発現量の比較および上記方法の工程(c)もまた、上記1)～3)の方法論と同様に行われ得る。

40

【0078】

本発明は、CHD2の発現が調節された細胞および動物を提供する。発現の調節は、発現の抑制(例、ノックアウト)、または発現の促進(過剰または安定発現)であり得る。本発明の細胞および動物は、CHD2の発現が一過的または構成的に調節されたものであり得るが、構成的に調節されたものが好ましい。本発明の細胞としては、肥満細胞およびT細胞(例、幼若化T細胞)もまた好ましく、本発明の動物としては、このような細胞特異的に発現が調節されたものもまた好ましい。本発明の細胞は、本発明の動物由来の細胞

50

であり得、また、初代培養細胞または細胞株であり得る。このような細胞および動物は、本明細書中に記載されるベクター（例、肥満細胞および/またはT細胞（例、幼若化T細胞）特異的発現ベクター等の発現ベクター、あるいはターゲティングベクター）等を用いることで、自体公知の方法により作製できる。

【0079】

本明細書中で挙げられた特許および特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、本明細書での引用により、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

【0080】

以下に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明するが、本発明は下記実施例等に何ら制約されるものではない。 10

【実施例】

【0081】

材料および方法

1) マウス骨髄由来肥満細胞の作製

BALB/cマウス、メス、8週齢およびscidマウス、メス、8週齢の大腿骨骨髄を採取し、マウスインターロイキン-3 (5 ng/ml) 添加 α -MEM培地で4から8週間培養してマウス骨髄由来肥満細胞を作製した。これらを回収してRNAを抽出し、RT-PCRのテンプレートとした。また、レチノイン酸 (ATRA) (1 μ M)、マウスIL-4 (50 ng/ml)、リポポリサッカライド (10 μ g/ml) で4または14時間刺激培養した細胞を回収した。 20

【0082】

2) マウスB細胞、T細胞の分離

BALB/cマウス、メス、8週齢の脾臓からMACS (magnetic cell sorting: 磁石を付けた抗体によって細胞を分離する方法) によりB細胞とT細胞を分離し、その一部はそのまま凍結してRNAを抽出した。残りはマウスインターロイキン-4 (50 ng/ml) およびリポポリサッカライド (10 μ g/ml) で4時間、14時間刺激した後、細胞を回収してRNAを抽出した。

【0083】

3) マウス由来サンプルからのRNA抽出とcDNAの作製

BALB/cマウス、メス、8週齢およびscidマウス、メス、8週齢より各種臓器を採取し、上述のとおり分離培養した肥満細胞、T細胞、B細胞からTotal RNAを抽出した。Total RNAの抽出にはFast RNA extraction kitを用いた。抽出したRNAは20-100 μ g/mlの濃度に調製し、reverse transcriptase によりcDNAを作製した。cDNA作製RT反応はGeneAmp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems)を用い、25°C 10分、42°C 15分、72°C 10分で行った。 30

【0084】

4) マウスCHD2についてのプライマー設計

マウスCHD2をRT-PCRで検出するために、コンピューターソフトウェア、Genetyx (Genetyx Corporation) を用いてプライマーを設定した。プライマーは報告されているマウスCHD2の予想cDNA配列539-557 (forward primer) と738-719 (reverse primer) で作製し、その塩基配列はそれぞれ5' -acgacgacgatgatgaa-3' (配列番号3)、5' -ggctcctttctttcccagtc-3' (配列番号4) とした。 40

【0085】

5) マウスCHD2についてのPCR反応

RT反応によって得たcDNAをテンプレートとして上記プライマーペアを用いて95°C 5分でdenature後、95°C 1分、55°C 1分、72°C 1分30秒で40サイクルの反応を遺伝子増幅器で行い、3%アガロースゲルに電気泳動後エチジウムブロマイドで染色し、UV発光下にて増幅されたPCR産物の有無を観察した。

【0086】

6) ヒト末梢血の分離とヒトT細胞、B細胞の純化

ボランティア1名より末梢血10ccを採取し、PBSで2倍希釈後にフィコールに重層して150 Orpm、40分間遠心して単核球分画 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) を採取 50

した。

PBMCからMACS (magnetic cell sorting) システム (pan T cell Isolation KitおよびB cell Isolation Kit, MiltenYi Biotec) を用いて定法に従ってヒトT細胞、B細胞をそれぞれ純化した。

また、末梢血由来培養肥満細胞を、IL-3 (1 ng/ml)、幹細胞因子 (200 ng/ml)、IL-6 (50 ng/ml) でメチルセルロースにおいて6週間培養し、次いでSCF (100 ng/ml)、IL-6 (50 ng/ml) で液体培地において培養、維持して、当該培養肥満細胞を純化した。

【0087】

7) ヒト由来サンプルからのRNA抽出及びPCR

ヒトT細胞、非T細胞、B細胞、PBMC、肥満細胞からRNA抽出キット、RNeasy Mini Kit (10
キアゲン) を用いてRNAを抽出した。抽出したRNAを20-100 μ g/mlの濃度に調製し、逆転写
酵素を用いてcDNAを作製した。

cDNA作製のためのRT反応は、GeneAmp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems) を用い
て、25 $^{\circ}$ C 10分、42 $^{\circ}$ C 15分、72 $^{\circ}$ C 10分で行った。

ヒトCHD2 mRNAをRT-PCRで検出するために、コンピューターソフトウェア、Genetyx (Ge
netyx Corporation) を用いてプライマーを設計した。プライマーは既報のヒトCHD2 cDNA
配列 (AF006514) を元に648-668 (forward primer) と853-835 (reverse primer) の位置
で作製した。それらの塩基配列はそれぞれ、5' -GCACAGGACTTCAAAGCAAAC-3' (配列番号
5)、5' -TGTCCACTTCCTGGATCAC-3' (配列番号6) であり、ヒトCHD2 PCR産物の大きさは206bpである。また、内部標準分子としてヒトGAPDHを利用した。ヒトGAPDH mRNA発現解
析は、既報のプライマーペア (Stefan Bauer, et al., PNAS, 2001;98 9237-9242) を用
いて、157bpのPCR産物を検出するように行った。20

RT反応によって得たcDNAをテンプレートとして上記プライマーペアを用いてヒトCHD2 m
RNA検出には、95 $^{\circ}$ C 5分で変性後、95 $^{\circ}$ C 30秒、62 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 1分30秒で29サイクルの反応を
遺伝子増幅器で行い、ヒトGAPDH検出には95 $^{\circ}$ C 5分でdenature後、95 $^{\circ}$ C 30秒、58 $^{\circ}$ C 1分、72
 $^{\circ}$ C 1分30秒で29サイクルの反応を遺伝子増幅器で行い、3%アガロースゲルに電気泳動後エ
チジウムブロマイドで染色し、UV発光下にて増幅されたPCR産物の有無を観察した。また
、このPCR産物の配列を解析して、ヒトCHD2 mRNA由来の断片であることを確認した。

【0088】

8) イヌ由来サンプルからのRNA抽出とリアルタイム定量PCR

イヌから採取した皮膚サンプルをTissue Lyser (キアゲン) を用いて5分間破碎した後
、RNA抽出キットRNeasy Mini Kit (キアゲン) を用いてRNA抽出を行った。採取したRNAを
50 ng/mlの濃度に調製し、Applied Biosystems 7500リアルタイムPCRシステム (アプライ
ドバイオシステムズジャパン) を用いたTaqManリアルタイムPCR法により、イヌCHD2およ
びアレルギー性皮膚炎で発現している他の分子 (c-kit、幹細胞因子)、並びに内部標準
用分子 (GAPDH) のmRNA発現を定量的に測定した。

実験に用いたプライマーとプローブは、下記表1の通りである。

【0089】

30

【表 1】

分子名	アクセッション番号	位置	塩基配列
CHD2	XM_536179		
	Forward Primer	5257-5274	CAAGAAGAGGAGGAGCAA (配列番号7)
	Reverse Primer	5352-5371	GTGGAGTGTGGGACTGAGATA (配列番号8)
	QuantiProbe	5293-5309	ATTGGTGGTAAGAAGCC (配列番号9)
幹細胞因子 (SCF)	NM_001012735		
	Forward Primer	592-611	CAGCAGTAGCAGTAATAGGAA (配列番号10)
	Reverse Primer	686-704	GCTCCAAAAGCAAACCCAA (配列番号11)
	QuantiProbe	636-652	CAACTTACAATGgGCAG (配列番号12)
c-kit	NM_001003181		
	Forward Primer	1736-1753	ATAGACCCAACACAGCTTC (配列番号13)
	Reverse Primer	1798-1817	CAGCACCCAAAGTTTCCCAA (配列番号14)
	QuantiProbe	1777-1793	TCCCAGAAACAGGCTGA (配列番号15)
GAPDH	NM_001003142		
	Forward Primer	739-756	CTGGAGAAAGCTGCCAAA (配列番号16)
	Reverse Primer	839-856	TGTTGAAGTCACAGGAGA (配列番号17)
	QuantiProbe	770-786	AGAAGGTAGTGAAGCAG (配列番号18)

10

【0090】

20

実施例 1：マウスの各種臓器における CHD2 の発現

マウスの各種臓器における CHD2 の発現を、上記 3) ~ 5) に従い測定した。結果を図 1 に示す。

その結果、肝臓、腎臓、大脳、胸腺にのみ発現が認められた。

【0091】

実施例 2：マウス肥満細胞における CHD2 の発現

次いで、マウス肥満細胞における CHD2 の発現を、上記 1)、3) ~ 5) に従い測定した。結果を図 2 に示す。

その結果、マウス骨髄由来培養肥満細胞 (BMFC) に CHD2 は高発現していた。また、T 細胞と B 細胞を持たない scid マウスでは、骨髄由来培養肥満細胞に弱く発現が認められると同時に、肝臓、腎臓には発現が認められず、心臓においてのみ弱い発現が認められた。なお、他の動物由来の肥満細胞でも CHD2 の発現が認められるか確認したところ、イヌ由来肥満細胞株でも同様に CHD2 が高発現していた (データ示さず)。

30

以上より、CHD2 は肥満細胞に強く発現している分子であることがわかった。また、BALB/c マウスで認められた肝臓、腎臓に発現していた CHD2 は、scid マウス (B 細胞、T 細胞欠損) において肝臓、腎臓に発現が認められなかったことから、肥満細胞由来の発現であると推察された。

【0092】

実施例 3：マウス T 細胞、B 細胞における CHD2 の発現パターン

マウス T 細胞、B 細胞における CHD2 の発現パターンを、上記 2) ~ 5) に従い測定した。結果を図 3 に示す。

40

その結果、マウス脾臓由来 B 細胞および T 細胞には CHD2 の発現は認められなかったが、脾臓 T 細胞を interleukin-4 (IL-4) と lipopolysaccharide (LPS) で刺激すると 4 時間後に一過性に CHD2 の発現が認められた。また、胸腺 T 細胞 (幼若) には CHD2 は恒常的に発現していることがわかった。

以上より、CHD2 は脾臓の幼若化 T 細胞および胸腺 T 細胞に発現することがわかった。

【0093】

実施例 4：ヒト肥満細胞、T 細胞、B 細胞における CHD2 の発現

次いで、ヒト肥満細胞、T 細胞、B 細胞における CHD2 の発現を、上記 6)、7) に従い測定した。

50

その結果、ヒトCHD2 mRNAは、肥満細胞に強発現していたが、T細胞、B細胞では、非常に弱い発現が認められた。

以上より、CHD2はヒトにおいても肥満細胞の検出に有用であることがわかった。

【0094】

実施例5：ヒト鼻拭い液中のCHD2の発現

スギ花粉症アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜を滅菌綿棒で数回こすった後、綿棒をRNeasy Mini Kit (キアゲン) のキットの細胞溶解液に浸した。その溶解液から定法どおりにRNAを抽出し、上記7)と同様の条件でRT-PCR法によってヒトCHD2、及び内部標準分子ヒトGAPDH mRNAの発現を測定した。陽性コントロールとしてヒト末梢血由来培養肥満細胞のRNAを利用した。

10

その結果、スギ花粉症アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜拭い液においてもヒトCHD2の発現が認められた。

以上より、ヒト由来サンプルにおけるCHD2発現を測定することで、ヒトにおけるアレルギーを診断し得ることがわかった。

【0095】

実施例6：イヌのアレルギー性皮膚炎病変部におけるCHD2の発現

イヌアレルギー性皮膚炎と臨床的に診断された症例の皮膚バイオプシーサンプルを5 mm径のパンチバイオプシーにより採取した。このバイオプシーサンプルを用いて、イヌのアレルギー性皮膚炎病変部におけるCHD2 mRNAの発現を測定した。RNA抽出とリアルタイム定量PCRは、上記8)の方法に従って行った。

20

その結果、CHD2 mRNAの発現は、アレルギー病変部で発現が上昇する分子で肥満細胞の浸潤の指標となるSCF及びc-kitと同様に、肥満細胞の浸潤が高い症例では高かったものの、肥満細胞の浸潤が低い症例では低かったことから、SCF及びc-kitのmRNA発現との相関性が認められた。

以上より、イヌのアレルギー性皮膚炎においても肥満細胞が関連するアレルギーのマーカーとしてCHD2が利用できることがわかった。また、ヒトだけでなく、動物の医療分野においてもCHD2の検出によってアレルギー診断が可能であることがわかった。

【産業上の利用可能性】

【0096】

本発明の検査方法は、アレルギーの有無または程度の検査、あるいはT細胞および肥満細胞の発生、分化、成熟に関連する検査(例、免疫疾患の検査、免疫療法等のモニタリング)などに有用である。

30

本発明の検出方法は、上述した検査方法、アレルギーを誘発し得ない物質または組成物の開発、アレルギーを誘発し得る物質または組成物の同定、アレルギーを抑制し得る物質または組成物の開発などに有用である。

本発明の診断用試薬および検出用試薬は、本発明の検査方法および検出方法を簡便に行うことを可能にするため有用である。

本発明の医薬、試薬または食品は、アレルギー疾患、免疫疾患または寄生虫性疾患の予防・治療薬として、CHD2の発現または機能の調節剤として、あるいはそれらに関連する機能性食品として有用である。

40

本発明のスクリーニング方法は、上記の医薬、試薬または食品の開発に有用である。

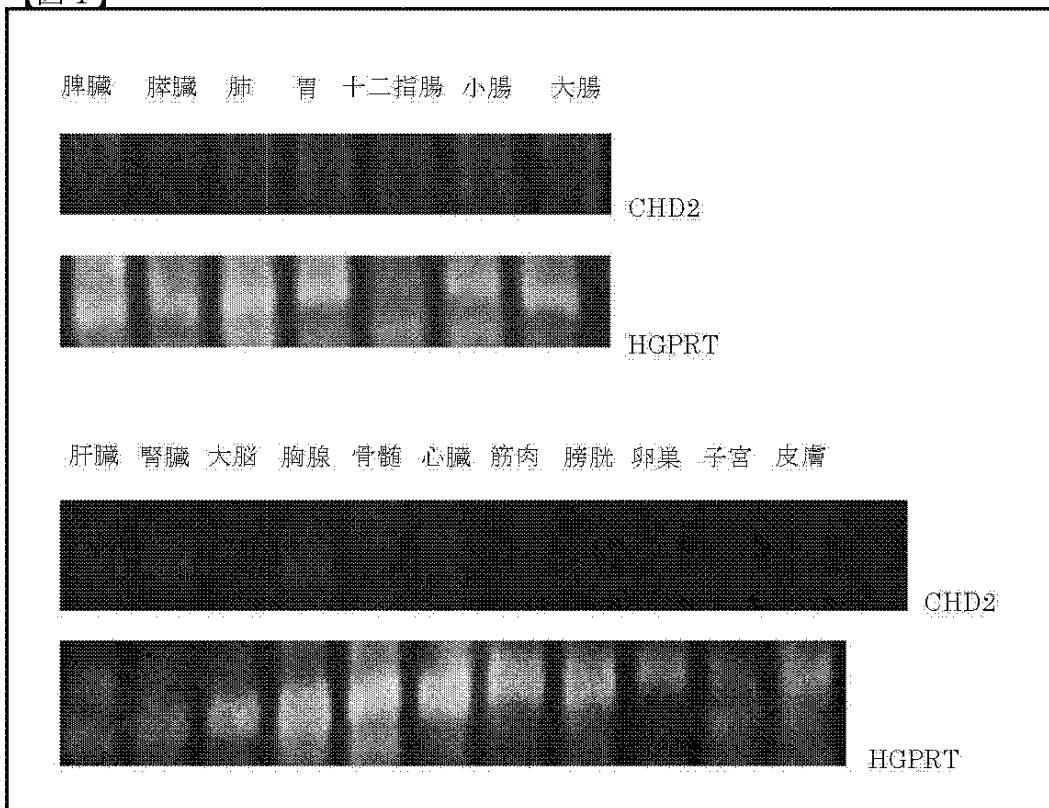
本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチド、本発明のポリヌクレオチドまたはその部分ヌクレオチド、本発明の発現ベクター、本発明の発現ベクターが組み込まれた形質転換体、本発明の抗体、本発明のハイブリドーマ、本発明のアンチセンス核酸、本発明のリボザイム、本発明のRNAi誘導性核酸、本発明のターゲティングベクター、本発明のプライマーセットまたは本発明の核酸プローブ、本発明の細胞、本発明の動物は、本発明の検査方法および検出方法を行うために、並びに本発明の診断用試薬および検出用試薬の開発などに有用である。

本出願は、2005年12月12日に日本で出願された特願2005-358327、及び2006年6月6日に日本で出願された特願2006-157690を基礎としてお

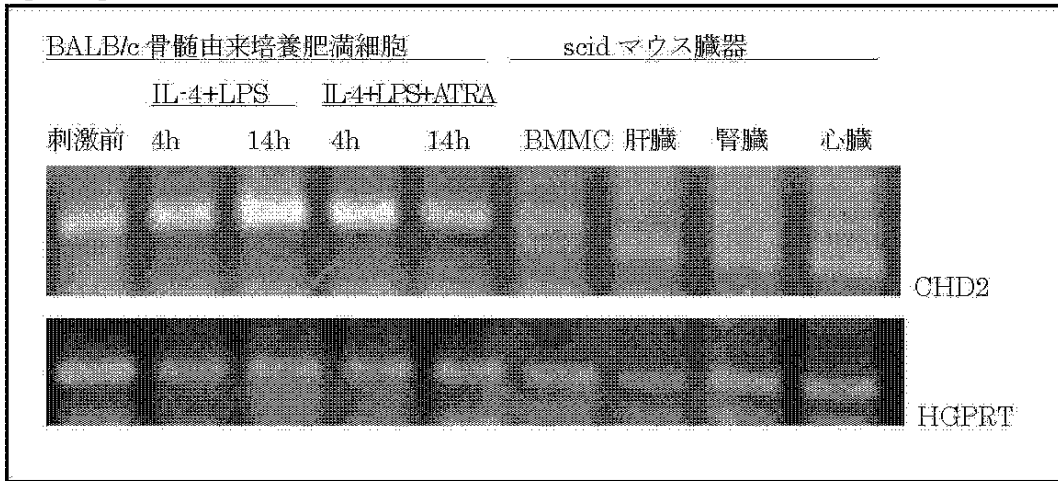
50

り、その内容は本明細書中に援用される。

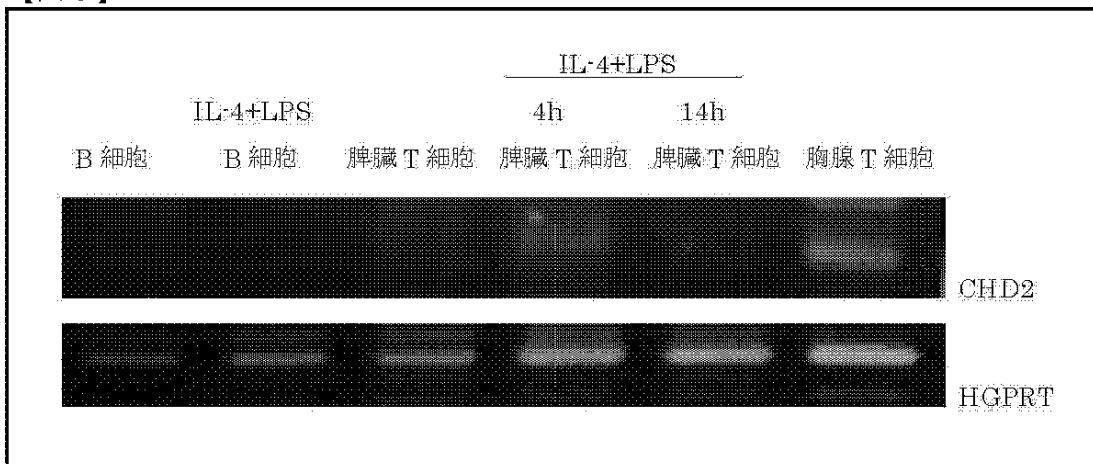
【図1】



【図 2】



【図 3】



【配列表】

2007069423000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/322732

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/68(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P37/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, 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) G01N33/48-98, G01N33/15		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (DIALOG), JMEDPLUS (JDream2), JSTPLUS (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2005-532788 A (GENE SIGNAL), 04 November, 2005 (04.11.05), Claims 7, 39; Par. Nos. [0268] to [0273], sequence Nos. 33, 84 & US 2005/153917 A1 & WO 2003/074073 A2 & EP 1515742 A2 & EP 1566387 A2 & FR 2836687 A1	1, 4, 11, 14/2, 3, 5-7, 12, 13
X/A	JP 2004-528043 A (Exelixis, Inc.), 16 September, 2004 (16.09.04), Claims; Par. No. [0007], sequence Nos. 22, 23 & US 2005/170344 A1 & WO 2002/098899 A2 & EP 1402053 A2	1, 4, 11, 14/2, 3, 5-7, 12, 13
X	WOODAGE et al "Characterization of the CHD family of proteins" Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Oct 14;94(21):11472-7	14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 December, 2006 (07.12.06)		Date of mailing of the international search report 19 December, 2006 (19.12.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/322732

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68
(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53
(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/322732

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.: 8-10
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:
These claims relate to compounds that are so-called specified by the function alone and it is completely unknown what specific compounds are involved in the scope thereof and what are not. Thus, these claims are described in an extremely unclear manner.
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:

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

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 2 2 7 3 2	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 特別ページ参照			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/48-98, G01N33/15			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2006年 日本国実用新案登録公報 1996-2006年 日本国登録実用新案公報 1994-2006年			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus (STN), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (DIALOG), JMEDPlus (JDream2), JSTPlus (JDream2)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X/A	JP 2005-532788 A (ジーン シグナル) 2005.11.04, 請求項7、請求項39、【0268】-【0273】、配列番号33, 84 & US 2005/153917 A1 & WO 2003/074073 A2 & EP 1515742 A2 & EP 1566387 A2 & FR 2836687 A1	1, 4, 11, 14/ 2, 3, 5-7, 12, 13	
X/A	JP 2004-528043 A (エクセリクシス・インコーポレイテッド) 2004.09.16, 特許請求の範囲、【0007】、配列番号22, 23 & US 2005/170344 A1 & WO 2002/098899 A2 & EP 1402053 A2	1, 4, 11, 14/ 2, 3, 5-7, 12, 13	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 07.12.2006		国際調査報告の発送日 19.12.2006	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 山村 祥子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 9 2 1 7

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 2 2 7 3 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WOODAGE et al” Characterization of the CHD family of proteins” Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Oct 14;94(21):11472-7	14

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 2 2 7 3 2

発明の属する分野の分類

G01N33/68(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i,
A61P37/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i,
C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i,
C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i,
G01N33/53(2006.01)i

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2006/322732

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 8-10 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
いわゆる機能のみによって特定された化合物に関連する請求項であり、具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのか全く不明であり、同項の記載は著しく不明確である。
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2005年4月)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	テーマコード(参考)		
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A	4 H 0 4 5
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	A	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	B	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/19		
A 0 1 K	67/027	(2006.01)	C 1 2 N	1/15		
C 1 2 N	15/02	(2006.01)	A 0 1 K	67/027		
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	C	
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	14/47		
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	C 0 7 K	16/18		
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/08		
A 6 1 P	33/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/02		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	33/00		
			A 6 1 P	43/00	1 0 5	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,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,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,L A,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MC,MK,MN,MW,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 阪口 雅弘

神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番2号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA11 CA18 DA36 FB01 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA11 AA20 BA44 BA53 BA80 CA02 CA04 CA09 CA11
 CA12 CA20 DA01 DA02 DA05 DA11 DA12 GA11 HA11 HA13
 HA14 HA17 HA20
 4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ21 QQ41 QQ53 QQ61
 QQ79 QQ89 QQ91 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42 QR48 QR55
 QR56 QR62 QR72 QR77 QS16 QS25 QS33 QS34 QS36 QX01
 QX02
 4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X AA91X AA91Y AA93Y AB01 AB05 AC14
 BA02 CA24 CA25 CA43 CA44 CA46
 4C084 AA17 NA14 ZB072 ZB132 ZB212 ZB382
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	过敏诊断标记		
公开(公告)号	JPWO2007069423A1	公开(公告)日	2009-05-21
申请号	JP2007550105	申请日	2006-11-15
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人理化学研究所		
[标]发明人	增田健一 石井保之 阪口雅弘		
发明人	增田 健一 石井 保之 阪口 雅弘		
IPC分类号	C12N15/09 G01N33/53 G01N33/15 G01N33/50 C12Q1/02 C12Q1/68 C12N5/10 C12N1/21 C12N1/19 C12N1/15 A01K67/027 C12N15/02 C07K14/47 C07K16/18 A61K45/00 A61P37/08 A61P37/02 A61P33/00 A61P43/00		
CPC分类号	G01N33/6893 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/56972 G01N2800/24		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A G01N33/53.Q G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12Q1/02 C12Q1/68.A C12N5/00.A C12N5/00.B C12N1/21 C12N1/19 C12N1/15 A01K67/027 C12N15/00.C C07K14/47 C07K16/18 A61K45/00 A61P37/08 A61P37/02 A61P33/00 A61P43/00.105		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA11 2G045/CA18 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA44 4B024/BA53 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA17 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB072 4C084/ZB132 4C084/ZB212 4C084/ZB382 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50		
代理人(译)	高岛肇		
优先权	2005358327 2005-12-12 JP 2006157690 2006-06-06 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种专门检测过敏的测试系统，灵敏地反映过敏加剧的测试系统等。更具体地，本发明包括用于测量CHD 2的手段，其选自用于诊断的引物，核酸探针和抗体，特别是用于变态反应或肥大细胞和/或成胚的诊断试剂。用于检测T细胞的试剂；测量从动物收集的生物样品中CHD2的表达，包括评估动物的过敏性，测试过敏性方法或肥大细胞和/或原始T细胞的方法 提供检测方法。

【表 1】

分子名	アクセッション 番号	位置	塩基配列
CHD2	XM_536179		
	Forward Primer	5257-5274	CAAGAAGAGGAGGAGCAA (配列番号 7)
	Reverse Primer	5352-5371	GTGGAGTGTGGGACTGAGATA (配列番号 8)
	QuantiProbe	5293-5309	ATTGGTGGTAAGAAGCC (配列番号 9)
幹細胞因子 (SCF)	NM_001012735		
	Forward Primer	592-611	CAGCAGTAGCAGTAATAGGAA (配列番号 10)
	Reverse Primer	688-704	GCTCCAAAAGCAACCCAA (配列番号 11)
	QuantiProbe	636-652	CAACTTACAAATGgCAG (配列番号 12)
c-kit	NM_001003181		
	Forward Primer	1736-1753	ATAGACCCAACACAGCTTC (配列番号 13)
	Reverse Primer	1798-1817	CAGCACCCAAGTTTCCCAA (配列番号 14)
	QuantiProbe	1777-1793	TCCAGAAACAGGCTGA (配列番号 15)
GAPDH	NM_001003142		
	Forward Primer	739-756	CTGGAGAAAGCTGCCAAA (配列番号 16)
	Reverse Primer	839-856	TGTTGAAAGTCACAGGAGA (配列番号 17)
	QuantiProbe	770-786	AGAAGGTAGTGAAGCAG (配列番号 18)