

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02002/033069

発行日 平成16年2月26日(2004.2.26)

(43) 国際公開日 平成14年4月25日(2002.4.25)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 N 15/09  
 A O 1 K 67/027  
 A 6 1 K 31/711  
 A 6 1 K 38/00  
 A 6 1 K 39/395

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A  
 A O 1 K 67/027  
 A 6 1 K 31/711  
 A 6 1 K 39/395 D  
 A 6 1 K 39/395 N

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 109 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2002-536438 (P2002-536438)	(71) 出願人	597177471 株式会社ジェノックス創薬研究所
(21) 国際出願番号	PCT/JP2001/008574		茨城県つくば市東光台5-1-3
(22) 国際出願日	平成13年9月28日(2001.9.28)	(71) 出願人	502196050
(31) 優先権主張番号	特願2000-314093 (P2000-314093)		国立成育医療センター総長
(32) 優先日	平成12年10月13日(2000.10.13)		東京都世田谷区大蔵2丁目10-1
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100102978
(81) 指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), CA, JP, US		弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100108774
			弁理士 橋本 一憲
		(72) 発明者	杉田 雄二
			神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大 学生物工学研究センター内 株式会社ジェ ノックス創薬研究所内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレルギー性疾患の検査方法

(57) 【要約】

ディファレンシャルディスプレイ法により、アトピー性皮膚炎患者の好酸球において発現に差の見られる遺伝子を探索した。その結果、軽症の患者の好酸球において、有意に発現が上昇している17の遺伝子が単離された。本発明者らは、これらの遺伝子をアレルギー性疾患の検査、および治療薬候補化合物のスクリーニングに使用できることを見出した。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

次の工程を含む、初期アレルギー性疾患の検査方法。

a) 被検者の好酸球細胞における、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含む遺伝子の発現レベルを測定する工程

b) 健常者の好酸球細胞における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程

## 【請求項 2】

アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、請求項 1 に記載の検査方法。

## 【請求項 3】

遺伝子の発現レベルを、cDNAのPCRによって測定する請求項 1 に記載の検査方法。

## 【請求項 4】

配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも15塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドからなる、初期アレルギー性疾患検査用試薬。

## 【請求項 5】

次の工程を含む、候補化合物が下記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法。

(1) 下記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドを発現する細胞に候補化合物を接触させる工程

(a) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むポリヌクレオチド。

(b) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、初期のアレルギー性疾患患者の好酸球において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(2) 前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、

## 【請求項 6】

細胞が株化白血球細胞である請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

次の工程を含む、候補化合物が下記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法。

(a) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むポリヌクレオチド。

(b) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、初期のアレルギー性疾患患者

10

20

30

40

50

の好酸球において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(1) 被験動物に候補化合物を投与する工程、および

(2) 被験動物の好酸球細胞における前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現強度を測定する工程、

【請求項8】

請求項5、または請求項7に記載の方法によって、前記発現レベルに与える影響を検出し、対照と比較して前記発現レベルを低下させる化合物を選択する工程を含む、前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを低下させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項9】

次の工程を含む、候補化合物が配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含む遺伝子の転写調節領域の活性に与える影響を検出する方法。

(1) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含む遺伝子の転写調節領域と、この転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子とを含むベクターを導入した細胞と候補物質を接触させる工程、および

(2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、

【請求項10】

請求項9に記載の方法によって、候補化合物の前記活性に与える影響を検出し、対照と比較して前記活性を低下させる化合物を選択する工程を含む、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含む遺伝子の転写調節領域の活性を低下させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項11】

配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含む遺伝子の転写調節領域と、この転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子とを含むベクター。

【請求項12】

請求項11に記載のベクターを導入した細胞。

【請求項13】

請求項8、または請求項10に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有する、アレルギー性疾患の治療薬。

【請求項14】

配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むポリヌクレオチド、またはその一部のアンチセンスDNAを主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬。

【請求項15】

「1858-05」、「1901-21」、「1913-17」、「1852-09」、「1945-03」、「1948-16」、「1833-02」、「1873-30」、

10

20

30

40

50

「1937-03」、「1949-02」、「1956-04」、「1919-13」、「1917-03」、「1941-20」、「1930-03」、「1921-05」、「1925-08」タンパク質のアミノ酸配列からなるペプチドを認識する抗体を主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬。

【請求項16】

下記の(a)または(b)に記載のポリヌクレオチド。

(a) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むポリヌクレオチド。

(b) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、初期のアレルギー性疾患患者の好酸球において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項17】

請求項16に記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質。

【請求項18】

請求項16に記載のポリヌクレオチドを発現可能に保持するベクター。

【請求項19】

請求項16に記載のポリヌクレオチド、または請求項18に記載のベクターを保持する形質転換細胞。

【請求項20】

請求項19に記載の形質転換細胞を培養し、その発現産物を回収する工程を含む、請求項17に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項21】

請求項17に記載の蛋白質に対する抗体。

【請求項22】

請求項21に記載の抗体と、請求項17に記載の蛋白質の免疫学的な反応を観察する工程を含む、請求項17に記載の蛋白質の免疫学的測定方法。

【請求項23】

配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドであって、少なくとも15塩基の長さを持つオリゴヌクレオチド。

【請求項24】

請求項23に記載のオリゴヌクレオチドと、請求項16に記載のポリヌクレオチドとのハイブリダイズを観察する工程を含む、請求項16に記載のポリヌクレオチドの測定方法。

【請求項25】

下記の(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの好酸球細胞における発現強度を増加させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物からなる初期アレルギー性疾患モデル動物。

(a) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むポリヌクレオチド。

(b) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11

10

20

30

40

50

1、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、初期のアレルギー性疾患患者の好酸球において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項26】

配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17のいずれかに記載の塩基配列、またはその相補配列にハイブリダイズする少なくとも15塩基の長さを有するポリヌクレオチドと、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17のいずれかに記載の塩基配列からなる遺伝子を発現する細胞からなる、アレルギー性疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングするためのキット。

10

【請求項27】

「1858-05」、「1901-21」、「1913-17」、「1852-09」、「1945-03」、「1948-16」、「1833-02」、「1873-30」、「1937-03」、「1949-02」、「1956-04」、「1919-13」、「1917-03」、「1941-20」、「1930-03」、「1921-05」、「1925-08」タンパク質のアミノ酸配列からなるペプチドを認識する抗体と、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、または配列番号：17に記載の塩基配列からなる遺伝子を発現する細胞からなる、アレルギー性疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングするためのキット。

20

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、初期アレルギー性疾患に関連する遺伝子、並びに該遺伝子の発現を指標としたアレルギー性疾患の検査方法およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法に関する。

30

背景技術

アトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患は、多因子性の病気(multifactorial diseases)と考えられている。これらの病気は多くの異なる遺伝子の発現の相互作用によって起こり、これらの個々の遺伝子の発現は、複数の環境要因によって影響を受ける。このため、特定の病気を起こす特定の遺伝子を解明することは、非常に困難である。

またアレルギー性疾患には、変異や欠陥を有する遺伝子の発現や、特定の遺伝子の過剰発現や発現量の減少が関わっていると考えられている。病気に関して遺伝子発現が果たしている役割を解明するためには、遺伝子が発症にどのように関わり、薬剤などの外的な刺激が遺伝子発現をどのように変化させるのかを理解する必要がある。

40

近年の遺伝子発現の解析技術の発達により、多くの臨床試料で、遺伝子の発現を解析・比較することが可能となった。このような方法としては、ディファレンシャルディスプレイ(DD)法が有用である。ディファレンシャルディスプレイ法は、リアンおよびパディー(Liang and Pardee)によって1992年に最初に開発された(Science, 1992, 257:967-971)。この方法を用いることによって、1回に数十種類以上のサンプルをスクリーニングすることができ、それらのサンプル中で発現が変化した遺伝子を検出することが可能である。このような方法を用いて、変異が生じた遺伝子や、時間や環境とともに発現が変わるような遺伝子を調べることによって、病因遺伝子の解明のために重要な情報がもたらされることが期待される。これらの遺伝子には

50

、環境要因によって発現に影響を受けるような遺伝子も含まれる。

さて、現在アレルギー疾患の診断においては、一般に、問診、家族歴、そして本人の既往症の確認が重要な要素となっている。またアレルギーをより客観的な情報に基づいて診断するために、血液を試料とする試験方法や、アレルゲンに対する患者の免疫学的な応答を観察する方法も実施されている。前者の例として、アレルゲン特異的IgE測定、白血球ヒスタミン遊離試験、あるいはリンパ球幼若化試験等が挙げられる。アレルゲン特異的IgEの存在は、そのアレルゲンに対するアレルギー反応の証明である。しかし患者によっては、必ずしもアレルゲン特異的なIgEを検出できるとは限らない場合もある。また、その測定原理上、診断に必要なアレルゲンの全てに対して、試験を実施しなければならない。白血球ヒスタミン遊離試験やリンパ球幼若化試験は、免疫システムのアレルゲンに対する反応を*in vitro*で観察する方法である。これらの方法は、操作が煩雑である。

10

一方、患者を実際にアレルゲンに接触させたときに観察される免疫応答をアレルギーの診断に役立てる方法(後者)も公知である。ブリック・テスト、スクラッチ・テスト、パッチ・テスト、皮内反応、あるいは誘発試験等が、この種の試験に含まれる。これらの試験では、患者のアレルギー反応を直接診断することができる反面、実際に被検者をアレルゲンに曝露する侵襲性の高い検査であると言えることができる。

この他、アレルゲンに関わらず、アレルギー反応の関与を証明するための試験方法も試みられている。たとえば、血清IgE値が高値である場合、その患者にはアレルギー反応が起きていると推定することができる。血清IgE値は、アレルゲン特異IgEの総量に相当する情報である。アレルゲンの種類に関わらずIgEの総量を決定することは容易であるが、非アトピー型気管支炎等の疾患を持つ患者では、IgEが低値となる場合がある。好酸球数とECP値は、I型アレルギーに引き続いて起きる遅延型反応や、アレルギー性炎症反応に関連する診断項目である。好酸球の数は、アレルギー症状の進展を反映するとされている。また、好酸球の顆粒に含まれる蛋白質であるECP(eosinophil cationic protein)も、喘息患者の発作に伴って強く活性化される。これらの診断項目は、確かにアレルギー症状を反映するものではある。しかし現実には、好酸球の増多はアレルギー症状の進行にともなって顕著に表れてくるのが一般的な所見である。したがって好酸球の明らかな増多が見られる時期には、顕著なアレルギー症状を伴っているケースが多い。そのため、初期のアレルギー性疾患の指標として好酸球数を用いることはできない。

20

30

したがって、患者に対する危険が少なく、しかも早期の診断に必要な情報を容易に得ることができる、アレルギー性疾患のマーカーが提供されれば有用である。このようなマーカーは、アレルギー性疾患の発症に深く関与していると考えられるので、診断のみならず、アレルギー症状のコントロールにおいても、重要な標的となる可能性がある。

#### 発明の開示

本発明は、特に初期アレルギー性疾患の指標とすることができる新たな遺伝子の提供を課題とする。さらに、本発明は該指標に基づく、初期アレルギー性疾患の検査方法およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

初期アレルギー性疾患に関与する遺伝子は、アレルギー症状の、より上流にあって、他の遺伝子の発現を誘導していく役割を果たしていると考えられる。本発明者らは、このような遺伝子を特定することができれば、その発現状態を調べることによって初期アレルギー性疾患の診断が可能となると考えた。

40

また本発明者らは、このような遺伝子が、アレルギー性疾患の治療においても、重要な標的となりうると考えた。初期アレルギー性疾患に有効な薬剤は、アレルギーの初期の段階のみならず、重症化した後においても、病態の本質的な原因に対して有効な治療薬となる可能性がある。このような治療薬には、単なる対症療法ではなく、アレルギーの根治につながる薬理作用を期待できる。

まず本発明者らは、健常者とアトピー性皮膚炎の患者から得られた末梢血好酸球において発現に差の見られる遺伝子を単離した。発現レベルの違いに基づいて遺伝子を取得する方

50

法としては、本発明者らが開発したDDシステム(WO 00/65046)を応用した。この方法は、既に確立された「蛍光DD(Fluorescent DD)法」(T. Itoら, 1994, FEBS Lett. 351:231-236)の手順に基づき、複数のヒトの血液から調製した白血球細胞RNAサンプルを解析できるDDシステムである。一方、遺伝子の発現状態を比較する対象としては、好酸球を選択した。好酸球は、アレルギー症状の重要な指標とされている。したがって、好酸球細胞において、発現レベルに差を生じる遺伝子は、アレルギー症状と密接に関連していると考えられる。

続いて本発明者らは、DDシステムによって取得した遺伝子について、進行度の異なるアレルギー性疾患患者と健常者でその発現レベルを比較した。進行度の異なる患者と健常者との比較によって、初期アレルギー性疾患患者と健常者とで好酸球における発現レベルに差がある遺伝子を選択すれば、初期アレルギー性疾患に関連する遺伝子を見出すことができると考えた。

このような戦略に基づいて末梢血好酸球における遺伝子の発現状態を解析した結果、本発明者らは、以下に記載する17の遺伝子がいずれも初期のアレルギー性疾患患者の好酸球において、有意に発現が増加していることを確認した。これらの遺伝子は、それぞれ以下の配列番号に記載された塩基配列を含む。

「1858-05」/配列番号：1

「1901-21」/配列番号：2

「1913-17」/配列番号：3

「1852-09」/配列番号：4

「1945-03」/配列番号：5

「1948-16」/配列番号：6

「1833-02」/配列番号：7

「1873-30」/配列番号：8

「1937-03」/配列番号：9

「1949-02」/配列番号：10

「1956-04」/配列番号：11

「1919-13」/配列番号：12

「1917-03」/配列番号：13

「1941-20」/配列番号：14

「1930-03」/配列番号：15

「1921-05」/配列番号：16

「1925-08」/配列番号：17

以下、本明細書中では、これらの遺伝子を各々「1858-05」遺伝子、「1901-21」遺伝子、「1913-17」遺伝子、「1852-09」遺伝子、「1945-03」遺伝子、「1948-16」遺伝子、「1833-02」遺伝子、「1873-30」遺伝子、「1937-03」遺伝子、「1949-02」遺伝子、「1956-04」遺伝子、「1919-13」遺伝子、「1917-03」遺伝子、「1941-20」遺伝子、「1930-03」遺伝子、「1921-05」遺伝子、および「1925-08」遺伝子と言う。また、これらの遺伝子によりコードされるタンパク質を各々「1858-05」タンパク質、「1901-21」タンパク質、「1913-17」タンパク質、「1852-09」タンパク質、「1945-03」タンパク質、「1948-16」タンパク質、「1833-02」タンパク質、「1873-30」タンパク質、「1937-03」タンパク質、「1949-02」タンパク質、「1956-04」タンパク質、「1919-13」タンパク質、「1917-03」タンパク質、「1941-20」タンパク質、「1930-03」タンパク質、「1921-05」タンパク質、「1925-08」タンパク質と呼ぶ。これらの遺伝子についてデータベース検索を行ったところ、以下の遺伝子については、相同性を有する塩基配列を含む遺伝子が見出された。

「1833-02」遺伝子：機能未知(KIAA0006、Accession No D13631)

10

20

30

40

50

「1873-30」遺伝子：塩基配列NM\_\_017719.1、

「1949-02」遺伝子：塩基配列HSA23852、

「1917-03」遺伝子：分泌タンパクをコードすると思われる塩基配列(KIAA1245; GenBank AB033071)そして、

「1925-08」遺伝子：同じく分泌タンパク質をコードすると考えられる塩基配列(X97610; GenBank Z09912)

これらの遺伝子はいずれもアレルギー性疾患との関連性は示唆されていない。

その他の遺伝子は、公知の遺伝子データベースに同一の塩基配列を見出すことができず、いずれも新規な遺伝子であると考えられた。さらに本発明者らは、これらの遺伝子の発現量を指標として、アレルギー性疾患の検査、およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニングを行うことが可能であることを見出し、本発明を完成した。 10

すなわち、本発明は、初期アレルギー性疾患において高い発現を示す遺伝子とその応用に関する。より具体的には、該遺伝子の発現を指標としたアレルギー性疾患の検査方法、および候補化合物の該遺伝子の発現に与える影響を検出する方法、更にこの検出方法に基づくアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法に関する。

〔1〕次の工程を含む、初期アレルギー性疾患の検査方法。

a) 被検者の好酸球細胞における、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含む遺伝子の発現レベルを測定する工程 20

b) 健常者の好酸球細胞における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程

〔2〕アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、〔1〕に記載の検査方法。

〔3〕遺伝子の発現レベルを、cDNAのPCRによって測定する〔1〕に記載の検査方法。

〔4〕配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも15塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドからなる、初期アレルギー性疾患検査用試薬。 30

〔5〕次の工程を含む、候補化合物が下記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法。

(1) 下記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドを発現する細胞に候補化合物を接触させる工程

(a) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むポリヌクレオチド。

(b) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、初期のアレルギー性疾患患者の好酸球において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。 40

(2) 前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、

〔6〕細胞が株化白血球細胞である〔5〕に記載の方法。

〔7〕次の工程を含む、候補化合物が下記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法。

(a) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列 50

番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むポリヌクレオチド。

(b) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、初期のアレルギー性疾患患者の好酸球において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(1) 被験動物に候補化合物を投与する工程、および

(2) 被験動物の好酸球細胞における前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現強度を測定する工程、

[8][5]、または[7]に記載の方法によって、前記発現レベルに与える影響を検出し、対照と比較して前記発現レベルを低下させる化合物を選択する工程を含む、前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを低下させる化合物のスクリーニング方法。

[9] 次の工程を含む、候補化合物が配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含む遺伝子の転写調節領域の活性に与える影響を検出する方法。

(1) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含む遺伝子の転写調節領域と、この転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子とを含むベクターを導入した細胞と候補物質を接触させる工程、および

(2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程

[10][9]に記載の方法によって、候補化合物の前記活性に与える影響を検出し、対照と比較して前記活性を低下させる化合物を選択する工程を含む、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含む遺伝子の転写調節領域の活性を低下させる化合物のスクリーニング方法。

[11] 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含む遺伝子の転写調節領域と、この転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子とを含むベクター。

[12][11]に記載のベクターを導入した細胞。

[13][8]、または[10]に記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有する、アレルギー性疾患の治療薬。

[14] 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むポリヌクレオチド、またはその一部のアンチセンスDNAを主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬。

[15] 「1858-05」、「1901-21」、「1913-17」、「1852-09」、「1945-03」、「1948-16」、「1833-02」、「1873-

10

20

30

40

50

30」、「1937-03」、「1949-02」、「1956-04」、「1919-13」、「1917-03」、「1941-20」、「1930-03」、「1921-05」、「1925-08」タンパク質のアミノ酸配列からなるペプチドを認識する抗体を主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬。

〔16〕下記の(a)または(b)に記載のポリヌクレオチド。

(a) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むポリヌクレオチド。

(b) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、初期のアレルギー性疾患患者の好酸球において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

〔17〕〔16〕に記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質。

〔18〕〔16〕に記載のポリヌクレオチドを発現可能に保持するベクター。

〔19〕〔16〕に記載のポリヌクレオチド、または〔18〕に記載のベクターを保持する形質転換細胞。

〔20〕〔19〕に記載の形質転換細胞を培養し、その発現産物を回収する工程を含む、〔17〕に記載の蛋白質の製造方法。

〔21〕〔17〕に記載の蛋白質に対する抗体。

〔22〕〔21〕に記載の抗体と、〔17〕に記載の蛋白質の免疫学的な反応を観察する工程を含む、〔17〕に記載の蛋白質の免疫学的測定方法。

〔23〕配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドであって、少なくとも15塩基の長さを持つオリゴヌクレオチド。

〔24〕〔23〕に記載のオリゴヌクレオチドと、〔16〕に記載のポリヌクレオチドとのハイブリダイズを観察する工程を含む、〔16〕に記載のポリヌクレオチドの測定方法。

〔25〕下記の(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの好酸球細胞における発現強度を増加させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物からなる初期アレルギー性疾患モデル動物。

(a) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むポリヌクレオチド。

(b) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17に記載の塩基配列のいずれかを含むDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、初期のアレルギー性疾患患者の好酸球において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

〔26〕配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17のいずれかに記載の塩基配列、またはその相補配列にハイブ

10

20

30

40

50

リダイズする少なくとも15塩基の長さを有するポリヌクレオチドと、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17のいずれかに記載の塩基配列からなる遺伝子を発現する細胞からなる、アレルギー性疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングするためのキット。

[27] 「1858-05」、「1901-21」、「1913-17」、「1852-09」、「1945-03」、「1948-16」、「1833-02」、「1873-30」、「1937-03」、「1949-02」、「1956-04」、「1919-13」、「1917-03」、「1941-20」、「1930-03」、「1921-05」、「1925-08」タンパク質のアミノ酸配列からなるペプチドを認識する抗体と、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、または配列番号：17に記載の塩基配列からなる遺伝子を発現する細胞からなる、アレルギー性疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングするためのキット。

本発明は、新規なアレルギー性疾患関連遺伝子、並びに好酸球細胞におけるこれらの遺伝子の発現レベルを指標とする、初期アレルギー疾患の検査方法に関する。以下、これら17種類の遺伝子をまとめて本発明の遺伝子と記載する。本発明の遺伝子は、それぞれ配列番号：1～配列番号：17に示す塩基配列を含む。

配列番号：1～配列番号：17に示す塩基配列は、全長cDNAの部分配列である。この部分配列を含む全長cDNAは、白血球細胞のcDNAライブラリーを、配列番号：1～配列番号：17に示した塩基配列から選択された塩基配列からなるプローブでスクリーニングすることによって取得することができる。本発明の遺伝子は、好酸球で発現している。したがって、好酸球細胞や、好酸球を含む細胞集団に由来するcDNAライブラリーは、いずれも本発明の遺伝子の取得に利用することができる。更に本発明の遺伝子には、好酸球以外の細胞においても発現が確認されたものが含まれる。これらの遺伝子については、好酸球以外の細胞に由来するcDNAライブラリーを利用して、当該遺伝子を得ることもできる。たとえば1913-17、1956-04、並びに1921-05等は、好中球でも発現がみられる。あるいは、1873-30や1917-03のように好酸球以外に、好中球、B細胞、T細胞、そして単球を含む幅広い細胞において発現が見られる遺伝子もある。

また、RACE法(Frohman, M. A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 8992, 1988)によって本発明の遺伝子の配列を延長することもできる。すなわち、本発明の遺伝子由来の配列をプライマーとして用いて、白血球細胞などのmRNAを一本鎖cDNAに変換し、末端にオリゴマーを付加してからPCRを行えば、延長されたcDNAを取得することができる。

本発明における「配列番号：1～配列番号：17に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド」には、このように配列番号：1～配列番号：17に記載の本発明によるcDNAの配列情報を基に単離しうる、本発明の遺伝子の全長cDNAが含まれる。更にこのようにして取得したcDNAの塩基配列に基づいて、cDNAによってコードされるアミノ酸配列を決定することができる。

本発明は、配列番号：1～配列番号：17に示す塩基配列のいずれかを含むポリヌクレオチドに関する。本発明はまた、このポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、このポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチドに関する。本発明において、ポリヌクレオチドとは、DNAやRNAのような天然の核酸分子の他、標識を付した分子や、各種のヌクレオチド誘導体によって構成された人工的な分子をも含む。人工的なポリヌクレオチドには、ホスホロチオエート結合やペプチド結合をバックボーンとするポリヌクレオチドが含まれる。

これら本発明のポリヌクレオチドは、化学的に合成することもできるし、mRNA、cD

10

20

30

40

50

N Aライブラリー、あるいはゲノムライブラリー等の天然の核酸から単離することもできる。本発明のポリヌクレオチド分子は、それによってコードされる蛋白質の生産、本発明の遺伝子の発現を阻害するためのアンチセンス核酸、あるいはその存在をハイブリダイゼーションによって検出するためのプローブ等として有用である。

また本発明において、ある蛋白質が初期のアレルギー性疾患患者、あるいは初期のアレルギー疾患動物の好酸球において発現が増加するとき、本発明の蛋白質と機能的に同等と言う。ある蛋白質が、好酸球において発現が増加することは、採取された好酸球における当該蛋白質をコードする遺伝子の発現レベルを比較することによって確認することができる。

本発明のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチドは、配列番号：1～配列番号：17に記載の塩基配列に基づいて、ハイブリダイズやPCRなどの公知の手法によって取得することができる。たとえば、配列番号：1～配列番号：17に記載の塩基配列から選択されたいずれかの塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプローブとして用い、ストリンジェントな条件下で、白血球細胞のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、配列番号：1～配列番号：17に記載の塩基配列と同一性の高い塩基配列からなるcDNAを取得することができる。あるポリヌクレオチドがストリンジェントな条件下で配列番号：1～配列番号：17に示す塩基配列のいずれかを含むポリヌクレオチドとハイブリダイズするとき、このポリヌクレオチドがコードする蛋白質は本発明の蛋白質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。ストリンジェントな条件とは、一般的には以下のような条件を示すことができる。すなわち、4×SSC、65℃でハイブリダイゼーションさせ、0.1×SSCを用いて65℃で1時間洗浄する。ストリンジェンシーを大きく左右するハイブリダイゼーションや洗浄の温度条件は、融解温度(T<sub>m</sub>)に応じて調整することができる。T<sub>m</sub>はハイブリダイズする塩基対に占める構成塩基の割合、ハイブリダイゼーション溶液組成(塩濃度、ホルムアミドやドデシル硫酸ナトリウム濃度)によって変動する。したがって、当業者であればこれらの条件を考慮して同等のストリンジェンシーを与える条件を経験的に設定することができる。

同一性の高い塩基配列からなるcDNAによってコードされる蛋白質は、本発明における機能的に同等な蛋白質である可能性が高い。本発明において、同一性の高い塩基配列とは、一般的に70%以上、通常は80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上の同一性を示す塩基配列を言う。塩基配列の同一性は、BLASTN等の公知のアルゴリズムによって計算することができる。

あるいは「1858-05」、「1901-21」、「1913-17」、「1852-09」、「1945-03」、「1948-16」、「1833-02」、「1873-30」、「1937-03」、「1949-02」、「1956-04」、「1919-13」、「1917-03」、「1941-20」、「1930-03」、「1921-05」、「1925-08」タンパク質のアミノ酸配列に対して、たとえば90%以上、望ましくは95%以上、更に望ましくは99%以上の相同性を有するタンパク質をコードする遺伝子は、「1858-05」、「1901-21」、「1913-17」、「1852-09」、「1945-03」、「1948-16」、「1833-02」、「1873-30」、「1937-03」、「1949-02」、「1956-04」、「1919-13」、「1917-03」、「1941-20」、「1930-03」、「1921-05」、「1925-08」遺伝子と機能的に同等な遺伝子として示すことができる。

配列番号：1～配列番号：17に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、やはり白血球細胞のcDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行うことにより、同一性の高いcDNAを取得することもできる。cDNAのソースとしてヒトの細胞を用いれば、ヒトのcDNAを取得することができる。またヒト以外の、脊椎動物細胞を利用すれば、異種動物におけるカウンターパートを取得することができる。このよう

な非ヒト動物としては、マウス、ラット、イヌ、ブタ、ヤギなどの多くの実験動物を例示することができる。実験動物における本発明の遺伝子のカウンターパートは、各動物種におけるアレルギーモデル動物の作成や、アレルギーの治療薬の開発におけるマーカーとして有用である。

また、実施例において用いた配列番号：1～配列番号：17に記載の塩基配列から選択された塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとして増幅することができる遺伝子であって、初期のアレルギー性疾患患者の好酸球において有意に発現が増加する蛋白質をコードする遺伝子も、機能的に同等な遺伝子である。本発明において、配列番号：1～配列番号：17に記載の塩基配列を含む遺伝子、あるいはこれらの遺伝子と機能的に同等な遺伝子を指標遺伝子という。そして、指標遺伝子によってコードされる蛋白質を指標蛋白質という。

10

本発明はまた、配列番号：1～配列番号：17に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドであって、少なくとも15塩基の長さを持つオリゴヌクレオチドに関する。ここで「相補鎖」とは、A：T（RNAにおいてはTをUに読みかえる）、G：Cの塩基対からなる2本鎖ポリヌクレオチドの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。塩基配列の相同性は、BLAST等の公知のアルゴリズムにより決定することができる。

20

本発明のオリゴヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドの検出や合成に有用である。オリゴヌクレオチドをプローブやプライマーとして、標的ポリヌクレオチドを検出、あるいは合成する手法は公知である。たとえば、mRNAを標的ポリヌクレオチドとするノーザンブロット法は、RNAの代表的な検出方法である。mRNAを鋳型としてRT-PCRを行えば、本発明のポリヌクレオチドを合成することができる。また、その合成産物の有無や量を指標としてmRNAの有無やその発現レベルを知ることができる。あるいは、好酸球中に発現している本発明のポリヌクレオチドを、*in situ*ハイブリダイゼーションによって検出することもできる。

更に本発明のポリヌクレオチドを利用して、それがコードする蛋白質を組み換え体として製造することができる。より具体的には、配列番号：1～配列番号：17の塩基配列を含むポリヌクレオチドのコード領域を公知の発現ベクターに組み込み、適切な宿主に形質転換することによって形質転換体を得る。あるいは、前記コード領域を含むポリヌクレオチドを適切な宿主のゲノムにインテグレートすることにより、形質転換体とすることもできる。

30

得られた形質転換体を、導入された本発明のポリヌクレオチドが発現可能な条件下で培養し、発現生成物を回収することにより、本発明の蛋白質を得ることができる。発現生成物は、公知の方法によって精製蛋白質とすることができる。

加えて本発明は、本発明のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質に関する。本発明の蛋白質は、アトピー性皮膚炎等のアレルギー疾患の診断のための指標として有用である。

40

あるいは本発明の蛋白質やその断片は、本発明の蛋白質に対する抗体を作成するための免疫原として有用である。与えられた免疫原を利用して抗体を得る手法は、公知である。すなわち、蛋白質、あるいはその断片を、適切なアジュバントと混合して免疫原とし、免疫動物に接種する。免疫動物は限定されない。代表的な免疫動物としては、マウス、ラット、ウサギ、あるいはヤギ等の動物が挙げられる。抗体価の上昇を確認した後に採血し、血清を分取すれば抗血清とすることができる。あるいは、更にIgG分画を精製することにより、精製抗体を取得することもできる。抗体の精製には、硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインA結合セファロースや本発明の蛋白質をリガンドとするイムノアフィニティークロマトグラフィー等の手法を利用することができる。

更に、抗体産生細胞を細胞融合などの手法によって形質転換し、クローン化することによ

50

って、モノクローナル抗体を得ることもできる。あるいは、抗体産生細胞の遺伝子を取得し、ヒト化抗体やキメラ抗体を構築する方法も公知である。このようにして得ることができる抗体は、本発明の蛋白質を免疫学的に測定するためのツールとして有用である。本発明の蛋白質をその抗体と接触させ、両者の免疫学的な反応を観察することにより、本発明の蛋白質を免疫学的に測定することができる。本発明の免疫学的な測定には、公知の多くのアッセイフォーマットを応用することができる。たとえば、血清等に含まれる蛋白質であれば、E L I S A等の手法によって測定することができる。あるいは好酸球に発現する蛋白質を抗体によって検出するには、免疫組織学的な手法や、あるいは蛍光標識抗体を用いたF A C S等を利用することができる。

本発明において、アレルギー性疾患 ( a l l e r g i c d i s e a s e ) とはアレルギー反応の関与する疾患の総称である。より具体的には、アレルゲンが同定され、アレルゲンへの曝露と病変の発症に深い結びつきが証明され、その病変に免疫学的な機序が証明されることと定義することができる。ここで、免疫学的な機序とは、アレルゲンの刺激によって白血球細胞が免疫応答を示すことを意味する。アレルゲンとしては、ダニ抗原や花粉抗原等を例示することができる。

代表的なアレルギー性疾患には、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、花粉症、あるいは昆虫アレルギー等を示すことができる。アレルギー素因 ( a l l e r g i c d i a t h e s i s ) とは、アレルギー性疾患を持つ親から子に伝えられる遺伝的な因子である。家族性に発症するアレルギー性疾患はアトピー性疾患とも呼ばれ、その原因となる遺伝的に伝えられる因子がアトピー素因である。アトピー性皮膚炎は、アトピー性疾患のうち、特に皮膚炎症状を伴う疾患に対して与えられた総称である。

本発明の遺伝子は、健常者との比較において、いずれも軽症のアトピー性皮膚炎患者の好酸球で発現量の増加を示した。従って、本発明の遺伝子の発現レベルを指標として、アレルギー性疾患の検査を行うことができる。本発明による検査方法においては、本発明の17の遺伝子から選択されるいずれか1つ、あるいは複数の遺伝子の発現レベルを指標として測定する。なお本発明の検査方法においては、本発明の遺伝子のみならず他のアレルギー疾患の指標を組み合わせたこともできる。複数の指標に基づいて検査を行うことにより、より正確な判断を行うことができる。

本発明におけるアレルギー疾患の検査とは、たとえば以下のような検査が含まれる。すなわち、アレルギー性疾患が疑われる初期症状を示す患者における本発明の遺伝子の発現の上昇は、その患者の初期症状の原因がアレルギー性疾患であることを裏付けている。

本発明において、本発明の遺伝子の発現レベルとは、これらの遺伝子のm R N Aへの転写、並びに蛋白質への翻訳を含む。したがって本発明によるアレルギー疾患の検査方法は、前記遺伝子に対応するm R N Aの発現強度、あるいは前記遺伝子によってコードされる蛋白質の発現レベルの比較に基づいて行われる。

本発明におけるアレルギー疾患の検査における本発明の遺伝子の発現レベルの測定は、公知の遺伝子解析方法にしたがって実施することができる。具体的には、たとえばこの遺伝子にハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション技術、または本発明の遺伝子にハイブリダイズするD N Aをプライマーとした遺伝子増幅技術等を利用することができる。

本発明の検査に用いられるプローブまたはプライマーとしては、配列番号：1～配列番号：17に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを利用することができる。ここで「相補鎖」とは、A：T ( R N Aの場合はU )、G：Cの塩基対からなる2本鎖D N Aの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。塩基配列の相同性は、B L A S T等のアルゴリズムにより決定することができる。

このようなポリヌクレオチドは、本発明の蛋白質をコードするポリヌクレオチドを検出、

単離するためのプローブとして、また、本発明のポリヌクレオチドを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15 bp ~ 100 bp、好ましくは15 bp ~ 35 bpの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のポリヌクレオチドの少なくとも一部若しくは全部の配列を有し、少なくとも15 bpの鎖長のDNAが用いられる。プライマーとして用いる場合、3'側の領域は相補的である必要があるが、5'側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

なお、本発明における「ポリヌクレオチド」は、DNAあるいはRNAであることができる。これらポリヌクレオチドは、合成されたものでも天然のものでもよい。また、ハイブリダイゼーションに用いるプローブDNAは、通常、標識したものが用いられる。標識方法としては、例えば次のような方法を示すことができる。なお用語オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのうち、重合度が比較的低いものを意味している。オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドに含まれる。

- ・ DNAポリメラーゼIを用いるニックトランスレーションによる標識
- ・ ポリヌクレオチドキナーゼを用いる末端標識
- ・ クレノーフラグメントによるフィルイン末端標識 (Berger SL, Kimmel AR. (1987) Guide to Molecular Cloning Techniques, Method in Enzymology, Academic Press; Hames BD, Higgins SJ (1985) Genes Probes: A Practical Approach. IRL Press; Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- ・ RNAポリメラーゼを用いる転写による標識 (Melton DA, Krieg PA, Rebagkati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR. (1984) Nucleic Acid Res., 12, 7035 - 7056)
- ・ 放射性同位体を用いない修飾ヌクレオチドをDNAに取り込ませる方法 (Kricka LJ. (1992) Nonisotopic DNA Probing Techniques. Academic Press)

ハイブリダイゼーション技術を利用したアレルギー性疾患の検査は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション法、ドットプロット法、DNAマイクロアレイを用いた方法などを使用して行うことができる。さらには、RT-PCR法等の遺伝子増幅技術を利用することができる。RT-PCR法においては、遺伝子の増幅過程においてPCR増幅モニター法を用いることにより、本発明の遺伝子の発現について、より定量的な解析を行うことが可能である。

PCR遺伝子増幅モニター法においては、両端に互いの蛍光を打ち消し合う異なった蛍光色素で標識したプローブを用い、検出対象(DNAもしくはRNAの逆転写産物)にハイブリダイズさせる。PCR反応が進んでTaqポリメラーゼの5'-3'エクソヌクレアーゼ(exonuclease)活性により同プローブが分解されると二つの蛍光色素が離れ、蛍光が検出されるようになる。この蛍光の検出をリアルタイムに行う。検出対象についてコピー数の明らかな標準試料について同時に測定することにより、PCR増幅の直線性のあるサイクル数で目的試料中の検出対象のコピー数を決定する(Holland, P.M. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7276 - 7280; Livak, K.J. et al., 1995, PCR Methods and Applications 4(6): 357 - 362; Heid, C.A. et al., Genome Research 6: 986 - 994; Gibson, E.M.U. et al., 1996, Genome Research 6: 995 - 1001)。PCR増幅モニター法においては、例えば、ABI PRISM 7700 (PEバイオシステムズ社)を用いることができる。

また本発明のアレルギー性疾患の検査方法は、本発明の遺伝子によりコードされる蛋白質

10

20

30

40

50

を検出することにより行うこともできる。このような検査方法としては、例えば、これら遺伝子でコードされる蛋白質に結合する抗体を利用したウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、ELISA法などを利用することができる。

この検出に用いる本発明の遺伝子によってコードされる蛋白質に結合する抗体は、当業者に周知の技法を用いて得ることができる。本発明に用いる抗体は、ポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体 (Milstein C, et al., 1983, Nature 305 (5934) : 537-40) であることができる。例えば、本発明の遺伝子によってコードされる蛋白質に対するポリクローナル抗体は、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出し、この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用することができる。あるいは必要に応じてこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離することもできる。また、モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物から免疫細胞を取り出して骨髄腫細胞などと細胞融合させる。こうして得られたハイブリドーマをクローニングして、その培養物から抗体を回収しモノクローナル抗体とすることができる。

本発明の遺伝子によってコードされる蛋白質の検出には、これらの抗体を適宜標識して用いればよい。また、この抗体を標識せずに、該抗体に特異的に結合する物質、例えば、プロテインAやプロテインGを標識して間接的に検出することもできる。具体的な検出方法としては、例えば、ELISA法を挙げることができる。

抗原に用いる蛋白質もしくはその部分ペプチドは、例えばこれら遺伝子もしくはその一部を発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して、形質転換体を作成し、該形質転換体を培養して組み換え蛋白質を発現させ、発現させた組み換え蛋白質を培養体または培養上清から精製することにより得ることができる。あるいは、これらの遺伝子によってコードされるアミノ酸配列、あるいは配列番号：1～配列番号：17に基づいて得られる全長cDNAによってコードされるアミノ酸配列の部分アミノ酸配列からなるオリゴペプチドを化学的に合成し、免疫原として用いることもできる。

本発明においては、被検者の好酸球細胞を試料とする。好酸球細胞は、末梢血から公知の方法によって調製することができる。すなわち、たとえばヘパリン採血した血液を遠心分離によって分画し、白血球細胞を分離する。次に白血球細胞から、フィコールによる遠心分離等によって顆粒球細胞を分取し、更にCD16抗体を用いた好中球のディブリーション等によって好酸球細胞を分離することができる。分離された好酸球を破壊してライセートとすれば、前記蛋白質の免疫学的な測定のための試料とすることができる。あるいはこのライセートからmRNAを抽出すれば、前記遺伝子に対応するmRNAの測定のための試料とすることができる。好酸球のライセートやmRNAの抽出には、市販のキットを利用すると便利である。

あるいは、好酸球の分離を行わず、全血や、末梢血白血球集団を対象として、本発明において指標とすべき遺伝子の発現レベルを測定しても良い。この場合には、測定値の補正を行うことによって、細胞における遺伝子の発現レベルの変化を求めることができる。たとえば好酸球に特異的に発現し、かつ細胞の状態に関わらず発現レベルが大きく変動しない遺伝子(ハウスキーピング遺伝子)の発現レベルの測定値に基づいて、本発明において指標とすべき遺伝子の発現レベルの測定値を補正することができる。

また検出すべき蛋白質が分泌型の蛋白質である場合には、被検者の血液や血清などの体液試料に含まれる目的とする蛋白質の量を測定することによって、それをコードする遺伝子の発現レベルの比較が可能である。

本発明によるアレルギー性疾患の検査方法においては、軽症のアレルギー性疾患で発現の上昇するこれら遺伝子がアレルギー性疾患の初期症状の指標となる。

また本発明は、下記の(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの好酸球細胞における発現レベルを上昇させたトランスジェニック非ヒト動物からなるアレルギー疾患モデル動物に関する。

(a) 配列番号：1～配列番号：17に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド。

(b) 配列番号：1～配列番号：17に記載の塩基配列を含むDNAとストリンジェント

10

20

30

40

50

な条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、初期のアレルギー性疾患患者の好酸球において発現が増加する蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

本発明によって、前記指標遺伝子の好酸球細胞における発現レベルが、初期のアトピー性皮膚炎患者の好酸球において上昇することが明らかとなった。したがって、好酸球細胞においてこれら遺伝子、またはこれらの遺伝子と機能的に同等な遺伝子の発現レベルを人為的に増強した動物は、初期アレルギー性疾患のモデル動物として利用することができる。なお好酸球における発現レベルの上昇とは、白血球集団全体における標的遺伝子の発現レベルの上昇を含む。すなわち、前記遺伝子の発現レベルを上昇させるのは好酸球のみである場合のみならず、白血球集団全体において前記遺伝子の発現レベルが上昇している場合を含む。本発明において機能的に同等な遺伝子とは、各指標遺伝子によってコードされる蛋白質において明らかにされている活性と同様の活性を備えた蛋白質をコードする遺伝子である。機能的に同等な遺伝子の代表的なものとしては、トランスジェニック動物が本来備えている、その動物種における指標遺伝子のカウンターパートを挙げるができる。初期アレルギー性疾患において発現が増加する遺伝子は、アレルギー性疾患の病態を上流で制御している遺伝子とすることができる。言い換えれば、初期アレルギー性疾患において発動を開始する遺伝子の影響下に、下流に位置する様々な遺伝子の発現や抑制が起きることにより、アレルギーの病態が形成されると考えられる。つまり、初期アレルギー性疾患において発現が増加する遺伝子は、アレルギーの病態形成において重要な役割を果たす遺伝子と言える。したがって、この遺伝子の発現を抑制したり、あるいは活性を阻害する薬剤は、アレルギーの治療において、単にアレルギー症状を改善するのみならず、アレルギーの病態形成の本質的な原因を取り除く作用が期待できる。

以上のように、初期アレルギー性疾患において発現が増加する遺伝子には重要な意味がある。そのため、この遺伝子の発現レベルを上昇させることによって得ることができるトランスジェニック動物を初期アレルギー性疾患モデル動物として使用し、遺伝子の役割や、遺伝子を標的とする薬剤を評価することには大きな意義がある。

また本発明による初期アレルギー性疾患モデル動物は、後に述べる初期アレルギー性疾患の治療または予防のための医薬品のスクリーニングに加えて、初期アレルギー性疾患のメカニズムの解明、さらにはスクリーニングされた化合物の安全性の試験に有用である。たとえば本発明による初期アレルギー疾患モデル動物が皮膚炎を発症したり、何らかのアレルギー性疾患に関連した測定値の変化を示せば、それを回復させる作用を持った化合物を探索するスクリーニングシステムが構築できる。

本発明において、発現レベルの上昇とは、目的とする遺伝子が外来遺伝子として導入され強制発現している状態、あるいは宿主が備える遺伝子の転写と蛋白質への翻訳が増強されている状態、並びに翻訳産物である蛋白質の分解が抑制された状態のいずれかを意味する。遺伝子の発現レベルは、たとえば実施例に示すような定量的なPCRにより確認することができる。また翻訳産物であるタンパク質の活性は、正常な状態と比較することにより確認することができる。

代表的なトランスジェニック動物は、目的とする遺伝子を導入し強制発現させた動物である。この他のトランスジェニック動物には、たとえば遺伝子のコード領域に変異を導入し、その活性を増強したり、あるいは分解されにくいアミノ酸配列に改変した動物などを示すことができる。アミノ酸配列の変異には、置換、欠失、挿入、あるいは付加を示すことができる。その他、遺伝子の転写調節領域を変異させることにより、本発明の遺伝子の発現そのものを調節することもできる。

特定の遺伝子を対象として、トランスジェニック動物を得る方法は公知である。すなわち、遺伝子と卵を混合してリン酸カルシウムで処理する方法や、位相差顕微鏡下で前核期卵の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第4873191号）、胚性幹細胞（ES細胞）を使用する方法などによってトランスジェニック動物を得ることができる。その他、レトロウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵に導入する精子ベクター法等も開発されている。精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレー

10

20

30

40

50

ション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である (M. Lavitrano et al. Cell, 57, 717, 1989)。

本発明の初期アレルギー性疾患モデル動物として用いるトランスジェニック動物は、ヒト以外のあらゆる脊椎動物を利用して作成することができる。具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ミニブタ、ヤギ、ヒツジ、あるいはウシ等の脊椎動物において様々な遺伝子の導入や発現レベルを改変されたトランスジェニック動物が作り出されている。

更に本発明は、候補化合物が本発明のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法に関する。本発明において、本発明の遺伝子は、軽症のアトピー性皮膚炎患者の好酸球において有意に発現レベルが上昇している。したがって、これらの遺伝子の発現レベルに与える影響を検出する方法に基づいて、その発現レベルを低下させることができる化合物を選択することによって、アレルギー疾患の治療薬を得ることができる。本発明において遺伝子の発現レベルを低下させる化合物とは、遺伝子の転写、翻訳、蛋白質の活性発現のいずれかのステップを阻害する作用を持つ化合物である。

候補化合物が本発明のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響の検出方法は、*in vivo*で行なうことも *in vitro*で行うこともできる。*in vivo*での影響を検出するには、適当な被験動物を利用する。被験動物には、たとえばアレルギー疾患モデル動物や、前記 (a) または (b) に記載の遺伝子の好酸球細胞における発現が増強されたトランスジェニック非ヒト動物からなるアレルギー性疾患モデル動物を利用することができる。本発明に基づく *in vivo*での発現レベルに与える影響の検出は、たとえば以下のような工程にしたがって実施することができる。

(1) 被験動物に候補化合物を投与する工程、

(2) 被験動物の好酸球細胞における前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、

このようにして本発明の遺伝子の発現を増強したモデル動物に薬剤候補化合物を投与し、モデル動物の好酸球における本発明の遺伝子の発現に対する化合物の作用をモニターすることにより、本発明の遺伝子の発現レベルに与える薬剤候補化合物の影響を検出することができる。更にこの検出の結果に基づいて、本発明の遺伝子の発現レベルを低下させる薬剤候補化合物を選択すれば、薬剤候補化合物をスクリーニングすることができる。

このようなスクリーニングにより、本発明の遺伝子の発現に様々な形で関与する薬剤を選択することができる。具体的には、たとえば次のような作用点を持つ薬剤候補化合物を見出すことができる。

本発明の遺伝子の発現をもたらすシグナル伝達経路の抑制、

本発明の遺伝子の転写活性の抑制、

本発明の遺伝子の転写産物の分解の促進等、

また、*in vitro*においては、例えば、前記 (a) または (b) に記載した遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させ、これら遺伝子の発現レベルを検出する方法を利用することができる。具体的には、たとえば以下のような工程にしたがって実施することができる。

(1) 前記 (a) または (b) に記載したポリヌクレオチドを発現する細胞に候補化合物を接触させる工程

(2) 前記 (a) または (b) に記載したポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、

本発明において、工程 (1) に用いるための細胞は、これらポリヌクレオチドを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより得ることができる。利用できるベクター、および宿主細胞は、本発明の遺伝子を発現し得るものであればよい。宿主-ベクター系における宿主細胞としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等が例示でき、それぞれ利用できるベクターを適宜選択することができる。

ベクターの宿主への導入方法としては、生物学的方法、物理的方法、化学的方法などを示すことができる。生物学的方法としては、例えば、ウイルスベクターを使用する方法、特

10

20

30

40

50

異的受容体を利用する方法、細胞融合法（H V J（センダイウイルス）、ポリエチレングリコール（P E G）、電氣的細胞融合法、微少核融合法（染色体移入））が挙げられる。また、物理的方法としては、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、ジーンパーティクルガン（gene gun）を用いる方法が挙げられる。化学的方法としては、リン酸カルシウム沈殿法、リポソーム法、D E A E デキストラン法、プロトプラスト法、赤血球ゴースト法、赤血球膜ゴースト法、マイクロカプセル法が挙げられる。本発明の検出方法においては、前記（a）または（b）に記載したポリヌクレオチドを発現する細胞として、株化白血球細胞を用いることもできる。株化白血球細胞としては、E o l、Y Y - 1、H L - 6 0、T F - 1、およびA M L 1 4 . 3 D 1 0 など白血球由来の株化細胞を例示できる。白血球細胞株の中でも、好酸球に由来する細胞株は、本発明の検出方法に好適である。好酸球に由来する細胞株は以下に示すとおりである。

10

E o l

Y Y - 1

A M L 1 4 . 3 D 1 0

E o l (E o l - 1 : S a i t o H e t a l , E s t a b l i s h m e n t a n d c h a r a c t e r i z a t i o n o f a n e w h u m a n e o s i n o p h i l i c l e u k e m i a c e l l l i n e . B l o o d 6 6 , 1 2 3 3 - 1 2 4 0 , 1 9 8 5 ) は、林原研究所より入手することができる。同様にY Y - 1 ( O g a t a N e t a l , T h e a c t i v a t i o n o f t h e J A K 2 / S T A T 5 p a t h w a y i s c o m m o n l y i n v o l v e d i n s i g n a l i n g t h r o u g h t h e h u m a n I L - 5 r e c e p t o r . I n t . A r c h . A l l e r g y I m m u n o l . , S u p p l 1 , 2 4 - 2 7 , 1 9 9 7 ) は、サイトシグナル研究所より分与される。またA M L 1 4 . 3 D 1 0 ( B a u m a n n M A e t a l , T h e A M L 1 4 a n d A M L 1 4 . 3 D 1 0 c e l l l i n e s : a l o n g - o v e r d u e m o d e l f o r t h e s t u d y o f e o s i n o p h i l s a n d m o r e . S t e m C e l l s , 1 6 , 1 6 - 2 4 , 1 9 9 8 ) は、米国オハイオ州、R e s e a r c h S e r v i c e , V A M e d i c a l C e n t e r D a y t o n の P a u l C C より、商業的に入手可能である。

20

その他、未分化白血球細胞株であるH L - 6 0 クローン15 ( A T C C C R L - 1 9 6 4 ) は、酪酸存在下で1週間程度培養すれば、好酸球に分化し好酸球細胞株とすることができる。好酸球であることは、形態的に、多形核で好酸球顆粒が認められることにより判別することができる。形態的な観察は、ギムザ染色やディフクイック染色によって行われる。一般に、好酸球を含むヒト白血球細胞株は、白血病の患者サンプルから不死化した細胞をクローニングすることにより樹立することができる。したがって、当業者は、必要に応じて好酸球細胞株を公知の方法によって得ることもできる。

30

スクリーニングの方法は、まず前記株化白血球細胞に候補化合物を添加する。その後、該株化白血球細胞における前記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定し、該遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する。

なお本発明の方法において、前記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルは、これらの遺伝子がコードする蛋白質の発現レベルのみならず、対応するm R N A を検出することにより比較することもできる。m R N A によって発現レベルを比較するには、蛋白質試料の調製工程に代えて、先に述べたようなm R N A 試料の調製工程を実施する。m R N A や蛋白質の検出は、先に述べたような公知の方法によって実施することができる。

40

さらに本発明の開示に基づいて本発明の遺伝子の転写調節領域を取得し、レポーターアッセイ系を構築することができる。レポーターアッセイ系とは、転写調節領域の下流にこの転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子の発現量を指標として、該転写調節領域に作用する転写調節因子をスクリーニングするアッセイ系をいう。

すなわち本発明は、次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法で

50

あって、指標遺伝子が、「1858-05」、「1901-21」、「1913-17」、「1852-09」、「1945-03」、「1948-16」、「1833-02」、「1873-30」、「1937-03」、「1949-02」、「1956-04」、「1919-13」、「1917-03」、「1941-20」、「1930-03」、「1921-05」、「1925-08」、およびこれらの遺伝子と機能的に同等な遺伝子からなる群から選択されるいずれかの遺伝子である方法に関する。

(1) 指標遺伝子の転写調節領域と、この転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子を含むベクターを導入した細胞と候補物質を接触させる工程、

(2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、および

(3) 対照と比較してレポーター遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程  
転写調節領域としては、プロモーター、エンハンサー、さらには、通常プロモーター領域に見られるCAATボックス、TATAボックス等を例示することができる。またレポーター遺伝子としては、CAT(chloramphenicol acetyltransferase)遺伝子、ルシフェラーゼ(luciferase)遺伝子、成長ホルモン遺伝子等を利用することができる。

本発明の遺伝子の転写調節領域は、次のようにして取得することができる。すなわち、まず本発明で開示したcDNAの塩基配列に基づいて、BACライブラリー、YACライブラリー等のヒトゲノムDNAライブラリーから、PCRまたはハイブリダイゼーションを用いる方法によりスクリーニングを行い、該cDNAの配列を含むゲノムDNAクローンを得る。得られたゲノムDNAの配列を基に、本発明で開示したcDNAの転写調節領域を推定し、該転写調節領域を取得する。得られた転写調節領域を、レポーター遺伝子の上流に位置するようにクローニングしてレポーターコンストラクトを構築する。得られたレポーターコンストラクトを培養細胞株に導入してスクリーニング用の形質転換体とする。この形質転換体に候補化合物を接触させ、レポーター遺伝子の発現を検出することによって、転写調節領域に対する候補化合物の作用を評価することができる。

本発明の前記ポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法に基づいて、前記ポリヌクレオチドの発現レベルを変化させる化合物のスクリーニングを行うことができる。本発明は、次の工程を含む前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを変化させる化合物のスクリーニング方法に関する。

すなわち本発明は、*in vivo*および/または*in vitro*において、候補化合物による前記ポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出し、対照と比較して前記発現レベルを低下させる化合物を選択する工程を含む、前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを低下させる化合物のスクリーニング方法に関する。

あるいは本発明は、配列番号：1～配列番号：17に示す塩基配列のいずれかを含む遺伝子の転写調節領域を利用するレポーターアッセイによる、転写調節領域に作用する化合物のスクリーニング方法に関する。本発明によるレポーターアッセイの結果に基づいて、対象と比較してレポーター遺伝子の発現を低下させる化合物を選択することにより、配列番号：1～配列番号：17に示す塩基配列のいずれかを含む遺伝子の発現を抑制する化合物を取得することができる。

本発明による各種のスクリーニング方法に必要な、ポリヌクレオチド、抗体、細胞株、あるいはモデル動物は、予め組み合わせてキットとすることができる。より具体的には、たとえば指標遺伝子を発現する細胞と、これらの遺伝子の発現レベルを測定するための試薬とで構成される。指標遺伝子の発現レベルを測定するための試薬としては、たとえば少なくとも1つの指標遺伝子の塩基配列を含むポリヌクレオチド、若しくはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも15塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドが用いられる。あるいは、少なくとも1つの指標蛋白質のアミノ酸配列を含むペプチドを認識する抗体を試薬として用いることができる。これらのキットには、標識の検出に用いられる基質化合物、細胞の培養のための培地や容器、陽性や陰性の標準試料、更にはキットの使用方法を記載した指示書等をパッケージしておくこともできる。本発明に基づく候補化合物の本発明の遺伝子の発現レベルに与える影響を検出するためのキットは、本発明の遺伝子の

発現レベルを修飾する化合物のスクリーニング用キットとして利用することができる。これらの方法に用いる被験候補化合物としては、ステロイド誘導体等既存の化学的方法により合成された化合物標品、コンビナトリアルケミストリーにより合成された化合物標品のほか、動・植物組織の抽出物もしくは微生物培養物等の複数の化合物を含む混合物、またそれらから精製された標品などが挙げられる。

本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物は、アレルギー性疾患の治療薬として有用である。本発明の遺伝子は、初期のアレルギー性疾患患者の好酸球において発現が増加する。したがって、この遺伝子の発現を増強することができる化合物には、アトピー性皮膚炎の症状を抑える作用が期待できる。本発明のアレルギー性疾患の治療薬は、前記スクリーニング方法によって選択された化合物を有効成分として含み、生理学的に許容される担体、賦形剤、あるいは希釈剤等と混合することによって製造することができる。本発明のアレルギー性疾患の治療剤は、アレルギー症状の改善を目的として、経口、あるいは非経口的に投与することができる。

経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、乳剤、あるいは懸濁剤等の剤型を選択することができる。注射剤には、皮下注射剤、筋肉注射剤、あるいは腹腔内注射剤等を示すことができる。

また、投与すべき化合物がタンパク質からなる場合には、それをコードする遺伝子を遺伝子治療の手法を用いて生体に導入することにより、治療効果を達成することができる。治療効果をもたらすタンパク質をコードする遺伝子を生体に導入し、発現させることによって、疾患を治療する手法は公知である。

あるいはアンチセンスDNAは、適当なプロモーター配列の下流に組み込み、アンチセンスRNA発現ベクターとして投与することができる。この発現ベクターをアレルギー疾患患者の好酸球へ導入すれば、これらの遺伝子のアンチセンスを発現し、当該遺伝子の発現レベルの低下によってアレルギーの治療効果を達成することができる。好酸球細胞への発現ベクターの導入としては、*in vivo*、あるいは*ex vivo*で行う方法が公知である。

更に、本発明の指標遺伝子の発現産物である蛋白質（すなわち指標蛋白質）の活性を阻害する化合物にも、アレルギー疾患の治療効果が期待できる。たとえば、本発明の指標蛋白質を認識し、その活性を抑制する抗体は、アレルギー性疾患の治療のための薬剤として有用である。蛋白質の活性を抑制する抗体の調製方法は公知である。抗体をヒトに投与する場合には、キメラ抗体やヒト化抗体、あるいはヒト型抗体とすることにより、安全性の高い薬剤とすることができる。

投与量は、患者の年齢、性別、体重および症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分の種類などにより異なるが、通常成人一人あたり、一回につき0.1mgから500mgの範囲で、好ましくは0.5mgから20mgの範囲で投与することができる。しかし、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量よりも少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を超える投与量が必要な場合もある。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

#### [実施例1] ディファレンシャルディスプレイ解析

健常者とアトピー性皮膚炎患者の末梢血より単離した血球細胞を比較して、発現変動している新しい治療関連遺伝子あるいは診断に有用な遺伝子を見出すことを目的としてスクリーニングを行った。

#### (1) 被検者

健常者（レーン1～6）およびアトピー性皮膚炎（レーン8～29）の症状、病態、喘息の有無、ダニ特異的IgE値、好酸球数、全IgE値を表1に示す。アレルゲン非特異的（Total IgE）、ダニおよびスギ特異的IgEはEIA法により測定した。すなわち、抗ヒトIgE抗体を結合させたカップに被検血清を反応させ、血清中のアレルゲ

10

20

30

40

50

ン非特異的 I g E 抗体、またはダニ、スギ特異的 I g E 抗体を結合させた。次に、  
 - D - ガラクトシダーゼ標識抗ヒト I g E 抗体と基質液 ( 4 - メチルウンベルフェリル -  
 D - ガラクトピラノシド ) を加え、反応させて蛍光物質を生成させた。反応停止液を加えて反応を停止させ、同時測定標準 I g E の蛍光強度より抗体濃度を決定した。LDH の測定は、UV 法 ( W r o b l e w s k i - L a D u e 法 ) により、ピルビン酸と N A D H の反応による N A D H の減少速度を吸光度の減少から算出した。LDH 値の測定には、L タイプワコー LDH ( 和光純薬 ) と 7 1 7 0 型自動分析装置 ( 日立 ) を用いた。好酸球数は、E D T A 添加血液 2 m l を試料として鏡検法と自動血球分析装置 S E - 9 0 0 0 ( R F / D C インピーダンス方式、S y s m e x 製造 ) により測定した。

表 1

Lane	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	14	18	19	24	26	27	28	29
Blood	120	140	19	20	23	24	36	43	69	90	73	92	56	59	30	46	48	51	60
症状	健常人、極軽症						軽症				中症				重症				
病態							○ ○ ○ ○				○ ○ ● ●				● ● ● ● ●				
喘息							軽 軽 な 軽				な な な 軽				な な な 軽 な				
							し				し し し				し し し し				
S IgE	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
好酸球	B	B	B	B	B	A	B	C	C	C	C	C	B	C	C	C	C	B	C
T IgE	L	L	L	L	L	L	L	L	L	H	H	L	H	H	L	L	H	H	H

表中、病態の「○」は寛解期、「●」は増悪期であることを示す。特異的 I g E ( S I g E ) は抗ダニ I g E において C l a s s 0 ~ 2 を「-」、C l a s s 3 ~ 6 を「+」とした。全 I g E ( T I g E ) は 1 0 0 0 I U / m l 以下を「L o w ( L )」、1 0 0 0 I U / m l より大きい場合を「H i g h ( H )」とした。好酸球は 3 % 未満を「A」、3 ~ 7 % を「B」、7 % より大きい場合を「C」とした。

#### ( 2 ) ディファレンシャルディスプレイ解析

健常者、および患者から採取した全血に 3 % デキストラン溶液を加えて 3 0 分室温放置し、赤血球を沈降させた。上層の白血球画分を回収し、フィコール溶液 ( F i c o l l - P a q u e P L U S ; アマシャムファルマシアバイオテック ) の上に載せて 1 5 0 0 r p m 、3 0 分室温で遠心した。下層に回収された顆粒球画分を C D 1 6 抗体磁気ビーズと 4 で 3 0 分反応させ、M A C S を用いた分離でトラップさせずに溶出する細胞を好酸球として実験に用いた。

上記のように調製した好酸球を I s o g e n ( 日本ジーン ; 和光純薬 ) に溶解し、この溶液から、I s o g e n に添付されているプロトコルに従って R N A を分離した。クロロホルムを加え、攪拌遠心して水層を回収した。次にイソプロパノールを加え、攪拌遠心して沈殿の全 R N A を回収した。回収した全 R N A は、D N a s e ( 日本ジーン ; 和光純薬 ) を加えて 3 7 1 5 分反応させ、フェノール - クロロホルム抽出してエタノール沈殿で R N A を回収した。

このように調製した全 R N A を用いて蛍光ディファレンシャルディスプレイ ( F l u o r e s c e n t D i f f e r e n t i a l D i s p l a y , 「 D D 」 と略記する ) 解析を行った。D D 解析は文献 ( T . I t o ら , 1 9 9 4 , F E B S L e t t . 3 5 1 : 2 3 1 - 2 3 6 ) に記載の方法に準じて行った。まず全 R N A を逆転写し、c D N A を得た。第一次 D D - P C R 反応には 3 種のアンカープライマーの各々について全 R N A の各 0 . 2 μ g を用いて c D N A を調製した。第二次 D D - P C R 反応には、3 種のアンカープライマーの各々について R N A 0 . 4 μ g を用いて c D N A を調製した。いずれの c D N A も、0 . 4 n g / μ l R N A 相当の最終濃度に希釈し、実験に用いた。1 反応あ

10

20

30

40

50

たり 1 ng RNA 相当の cDNA を用いて DD-PCR 反応を行った。反応液の組成は表 2 の通りである。

表 2

cdNA(0.4ng/ $\mu$ l RNA 相当)	2.5 $\mu$ l
任意プライマー (2 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ l
10 $\times$ AmpliTaq PCR バッファー	1.0 $\mu$ l
2.5mM dNTP	0.8 $\mu$ l
50 $\mu$ M アンカープライマー (GT15A, GT15C, GT15G)	0.1 $\mu$ l
Gene Taq (5U/ $\mu$ l)	0.05 $\mu$ l
AmpliTaq (5U/ $\mu$ l)	0.05 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	3.0 $\mu$ l
総量	10.0 $\mu$ l

10

PCR の反応条件は、「95 3分、40 5分、72 5分」を 1 サイクル、続いて、「94 15秒、40 2分、72 1分」を 30 サイクルの後、72 5分、その後連続的に 4 にした。

使用したプライマー対はアンカープライマーである GT15A (配列番号: 18)、GT15C (配列番号: 19)、および GT15G (配列番号: 20) に対して任意プライマーをそれぞれ AG 1~110、AG 111~199、および AG 200~287 を組み合わせ、計 287 組の反応をおこなった。なお、任意プライマーとしては GC 含量 50% の 10ヌクレオチドからなるオリゴマーを設計し、合成して用いた。

20

ゲル電気泳動は、6% 変性ポリアクリルアミドゲルを作製し、2.5 $\mu$ l の試料をアプライし、40W で 210 分間泳動した。その後、日立製蛍光イメージアナライザー FM B I O I I を用いてゲル板をスキャンし、蛍光検出によって泳動画像を得た。

健常者と患者の両サンプルを並べて泳動し、各試料間で発現の変動するバンドを分離した。目視判定により選抜され、重要検定にて 0.1 以下のバンドについて配列を決定した。更に画像解析ソフト Bio-Image を用いて選抜されたバンドについても配列を決定した。各バンドにおける同配列クローンをグループ化しコンセンサス配列とした。この結果、配列決定したバンドのうち一意的に「dominant 配列」が定義できるバンドを選別した。

30

選別されたコンセンサス配列を query として GCG 上で genemb1、dbEST に対し BLAST による相同性検索を行った。ここで identity 95% 以上を「有意な相同性有り」と判断した。

このような解析の結果、患者で特異的に発現が上昇するバンドを同定した。同定された各バンドの増幅に用いたプライマーセットを表 3 に示す。任意プライマーの配列に付けた ( ) 内の番号は、配列番号である。また各バンドの塩基配列は次の配列番号に示すとおりであった。

40

「1858-05」/ 配列番号: 1

「1901-21」/ 配列番号: 101

「1913-17」/ 配列番号: 102

「1852-09」/ 配列番号: 103

「1945-03」/ 配列番号: 104

「1948-16」/ 配列番号: 6

「1833-02」/ 配列番号: 7

「1873-30」/ 配列番号: 8

「1937-03」/ 配列番号: 9

「1949-02」/ 配列番号: 10

「1956-04」/ 配列番号: 105

50

「1919-13」 / 配列番号：12  
 「1917-03」 / 配列番号：13  
 「1941-20」 / 配列番号：14  
 「1930-03」 / 配列番号：15  
 「1921-05」 / 配列番号：16  
 「1925-08」 / 配列番号：17

表3

Band ID	bp	アンカープライマー	任意プライマーの名前	任意プライマーの配列 (配列番号)
1858-05	231	GT15C	AG00140	TTGATGGACC(21)
1901-21	189	GT15G	AG00262	TATTGCCGTG(22)
1913-17	197	GT15G	AG00278	GACGGTTAGT(23)
1852-09	185	GT15A	AG00029	GGAAGAGTTG(24)
1945-03	283	GT15G	AG00264	GGAAGAGTTG(25)
1948-16	210	GT15G	AG00260	ATCCGTA CTG(26)
1833-02	293	GT15A	AG00016	TCCCTACAGA(27)
1873-30	574	GT15C	AG00161	TCATAGTCCG(28)
1937-03	527	GT15G	AG00251	AAACCCATCG(29)
1949-02	437	GT15G	AG00262	TATTGCCGTG(30)
1956-04	252	GT15G	AG00275	CAGAACTGCT(31)
1919-13	321	GT15G	AG00213	AAGGAACGGA(32)
1917-03	328	GT15G	AG00202	ATGGGAGGAA(33)
1941-20	274	GT15G	AG00265	GCTGGTTTTG(34)
1930-03	347	GT15G	AG00235	GTTTGCTTGC(35)
1921-05	784	GT15G	AG00219	CACGAGTCTA(36)
1925-08	224	GT15G	AG00220	GAGCAAGGTA(37)

10

20

30

[ 実施例 2 ] ABI7700 による発現定量

実施例 1 で同定された遺伝子の発現を、ABI7700 を用いた TaqMan 法により解析した。新たに健常者、アトピー性皮膚炎患者の軽症、中症、重症各 10 検体から好酸球を収集し、実施例 1 と同じように RNA を調製した。健常者、患者の検査値 profile を表 4 に示す。実施例 1 で同定したバンド、並びに補正用内部標準として既知遺伝子である - アクチン (actin) について発現レベルを定量した。

表4

連番	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Blood											80	109	125	130	131	164	170	197	205	215	
症状	なし										軽症										
病態	なし										○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
喘息	なし										軽	なし	なし	軽	軽	軽	なし	軽	なし	軽	
タニgE	-										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
好酸球	B	B	B	A	B	B	B	A	A	B	C	B	B	C	C	C	C	C	C	C	
全IgE	L										L	L	H	H	H	L	L	L	L	L	

連番	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Blood	101	147	162	179	196	210	218	219	226	232	96	135	146	167	184	194	211	225	227	238
症状	中症										重症									
病態	○	○	○	●	●	●	●	○	○	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
喘息	なし	なし	なし	軽	なし	軽	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	軽	なし	なし	軽	なし	なし	なし
タニgE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
好酸球	B	C	C	B	A	C	C	B	C	A	B	C	B	B	B	C	C	C	C	C
全IgE	H	L	H	H	L	H	H	L	L	L	L	H	H	L	L	H	H	H	H	H

10

健常者、アトピー性皮膚炎患者の軽症、中症、重症各10検体の検査値プロファイルを基に、各群の検査値をプロットしたのが図1（好酸球数）および図2（全IgE）である。アトピー性皮膚炎患者の好酸球数の評価ランクはB～Cとなっているが、実際の測定値と比較すると、重症者の測定値のみが突出していることが図1から明らかである。このことは、好酸球数は、軽症、あるいは中症のアトピー性皮膚炎の診断指標としては利用しにくいことを示している。

20

全IgEの測定値（図2）についても同様の傾向が見られる。すなわち全IgE値の顕著な上昇が見られるのは、重症患者であり、軽症～中症の患者においては健常者と大きな違いは見られない。したがって全IgE値も、軽症のアレルギー性疾患の指標としにくいことがわかる。

ABI 7700による測定に用いたプライマーおよびTaqManプローブは、各遺伝子の配列情報に基づいてPrimer Express（PEバイオシステムズ）により設計した。TaqManプローブの5'末端はFAM（6-carboxy-fluorescein）で、また3'末端はTAMRA（6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine）で標識されている。実験に用いたプライマー、およびTaqMan probeの塩基配列は、それぞれ表5に記載の配列番号に示すとおりである。アクチン測定用のプライマーとプローブには、TaqMan-actin Control Reagents（PEバイオシステムズ）に添付のものを用いた。測定結果を図3～図19に示す。また、平均発現量を表6にまとめた。

30

表5

ID	フォワード	リバース	probe
1858-05	3 8	3 9	4 0
1901-21	4 1	4 2	4 3
1913-17	4 4	4 5	4 6
1852-09	4 7	4 8	4 9
1945-03	5 0	5 1	5 2
1948-16	5 3	5 4	5 5
1833-02	5 6	5 7	5 8
1873-30	5 9	6 0	6 1
1937-03	6 2	6 3	6 4
1949-02	6 5	6 6	6 7
1956-04	6 8	6 9	7 0
1919-13	7 1	7 2	7 3
1917-03	7 4	7 5	7 6
1941-20	7 7	7 8	7 9
1930-03	8 0	8 1	8 2
1921-05	8 3	8 4	8 5
1925-08	8 6	8 7	8 8
$\beta$ -actin	8 9	9 0	9 1

10

20

表6

臨床サンプルでの遺伝子発現量 (AVERAGE:copy/ng(補正値))

Band ID	健常者	軽症	中症	重症
1858-05	561	2638	537	928
1901-21	36	326	41	65
1913-17	496	2515	585	1326
1852-09	165	691	182	238
1945-03	2820	7764	2747	3884
1948-16	1517	5993	2295	3692
1833-02	123	775	197	392
1873-30	553	1828	701	797
1937-03	14	354	45	87
1949-02	372	1340	538	645
1956-04	3228	17124	3862	6372
1919-13	386	1293	466	671
1917-03	26027	147863	37786	51244
1941-20	1222	2754	1191	2016
1930-03	329	1383	427	637
1921-05	365	2812	816	1474
1925-08	4385	14041	6961	6962

30

40

上記のデータを利用して、パラメトリック多重比較検定、およびノンパラメトリック多重比較検定を行った。統計解析は、The SAS SYSTEMのSAS前臨床パッケージVersion 4.0(SAS Institute Inc.)を用いて行った。結果を表7に示す。

表7から明らかのように、本発明で同定された各遺伝子はアトピー性皮膚炎(軽症)によ

50

り発現が有意に上昇している。つまり、これらの遺伝子の発現を測定することが、アトピー性皮膚炎において診断的価値をもつことを裏付けている。

表7

Band ID	パラメトリック多重比較				ノンパラメトリック多重比較			
	Dunnet	p 値	Tukey	p 値	Dunnet	p 値	Tukey	p 値
1858-05	軽症>健常	0.0003	軽症>健常	0.0005	軽症>健常	0.0052	軽症>健常	0.0097
			軽症>中症	0.001			軽症>中症	0.0449
			軽症>重症	0.0163				
1901-21	軽症>健常	0.009	軽症>健常	0.016	軽症>健常	0.0191	軽症>健常	0.0343
			軽症>中症	0.0261				
1913-17	軽症>健常	0.0019	軽症>健常	0.0035	軽症>健常	0.0212	軽症>健常	0.0378
			軽症>中症	0.0092				
1852-09	軽症>健常	0.0007	軽症>健常	0.0012	軽症>健常	0.0075	軽症>健常	0.0139
			軽症>中症	0.0033			軽症>中症	0.0243
			軽症>重症	0.0196				
1945-03	軽症>健常	0.0051	軽症>健常	0.0092	軽症>健常	0.0396	軽症>中症	0.0208
			軽症>中症	0.0134				
1948-16	軽症>健常	0.0049	軽症>健常	0.0089	軽症>健常	0.0174		
			軽症>中症	0.0342	重症>健常	0.0516		
1833-02	軽症>健常	0.0004	軽症>健常	0.0007	軽症>健常	0.01	軽症>健常	0.0182
			軽症>中症	0.0112				
1873-30	軽症>健常	0.0026	軽症>健常	0.0047	軽症>健常	0.0174	軽症>健常	0.031
			軽症>中症	0.0368				
1937-03	軽症>健常	0.0064	軽症>健常	0.0115	軽症>健常	0.0198	軽症>健常	0.0354
			軽症>中症	0.0458				
1949-02	軽症>健常	0.0007	軽症>健常	0.0013	軽症>健常	0.0065	軽症>健常	0.0119
			軽症>中症	0.0443				
1956-04	軽症>健常	0.0025	軽症>健常	0.0046	軽症>健常	0.0071	軽症>健常	0.013
			軽症>中症	0.0314				
1919-13	軽症>健常	0.0018	軽症>健常	0.0032	軽症>健常	0.0099	軽症>健常	0.0179
			軽症>中症	0.0328				
1917-03	軽症>健常	0.0001	軽症>健常	0.0003	軽症>健常	0.0029	軽症>健常	0.0054
			軽症>中症	0.0049				
			軽症>重症	0.0146				
1941-20	軽症>健常	0.0011	軽症>健常	0.0019	軽症>健常	0.0039	軽症>健常	0.0073
			軽症>中症	0.0078			軽症>中症	0.0267
1930-03	軽症>健常	0.0024	軽症>健常	0.0043	軽症>健常	0.0066	軽症>健常	0.0122
			軽症>中症	0.0436				
1921-05	軽症>健常	0.0015	軽症>健常	0.0028	軽症>健常	0.007	軽症>健常	0.0128
1925-08	軽症>健常	0.0069	軽症>健常	0.0121	軽症>健常	0.0017	軽症>健常	0.0032

[ 実施例 3 ] 各種血液細胞での本発明の遺伝子の発現

5人の健常者の末梢血から分離した細胞での各遺伝子の発現を調べた。好酸球(E)の分離は上記の通り行った。好中球(N)は好酸球を溶出させた後、CD16抗体磁気ビーズでトラップされた細胞を磁界から外して溶出、回収して調製した。一方、フィコール遠心分離で中間層に回収される単球画分を、MACS CD3抗体磁気ビーズにより溶出画分(M: monocyteとB cellの混合物)とトラップされる画分(T cell画分)に分離した。次に、溶出画分をMACS CD14抗体磁気ビーズにより、溶出画分(B cell画分)とトラップされる画分(monocyte画分)に分け、それぞれ

10

20

30

40

50

を精製T細胞、精製B細胞、そして精製単球とした。

好酸球はIsogen、好中球、T細胞、B細胞、そして単球はRNeasy (Qiagen)を用いて可溶化し、全RNA抽出、DNase処理後(方法は前述の通り)遺伝子発現解析に供した。用いたプライマー、プローブ等は上記と同一である。これらの血球細胞での平均発現量(AVERAGE: copy/ng(補正值))は表8に示す通りであった。

表8

各種血球細胞での遺伝子発現量(AVERAGE: copy/ng(補正值))

Band ID	好酸球	好中球	B細胞	T細胞	単球
1858-05	2018	571	66	42	18
1901-21	366	11	163	252	9
1913-17	2567	3954	323	548	259
1852-09	774	165	30	12	68
1945-03	4489	7576	274	347	307
1948-16	4308	14307	3053	2001	775
1833-02	346	54	18	49	9
1873-30	1447	5675	1190	1592	321
1937-03	346	3	5	5	5
1949-02	1160	114	691	817	253
1956-04	5457	2197	520	903	151
1919-13	1371	233	189	311	106
1917-03	72621	47903	11135	8707	10897
1941-20	3166	189	422	464	184
1930-03	682	155	66	106	28
1921-05	1757	1323	82	150	38
1925-08	12535	8302	883	473	1532

10

20

[実施例4] 遺伝子塩基配列の延長(1901-21)

Human Leukocyte Marathon-Ready cDNA (CLONTECH)を鋳型にMarathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH)を用いて、キット付属のAP1プライマーと1901-21に特異的な塩基配列からなるプライマー1901-21 ForでPCRを行った。増幅した断片をサブクローニングし配列決定をしたところ1901-21の塩基配列を含む約0.7 kbの塩基配列が得られた。同様に、キット付属のAP1プライマーとB1901-21特異的なプライマー1901 MRでPCRを行った。増幅した断片をサブクローニングし配列決定をしたところ1901-21の塩基配列を含む約0.5 kbの塩基配列が得られ、合計1043 bp(配列番号:2)となった。

プライマー配列

1901-21 For:AGGAGAGTAACAGTCACAGCAGTAATCA(配列番号:92)

1901 MR:CCCTGGGCTTTTGTTCCTCATCT(配列番号:93)

[実施例5] 遺伝子塩基配列の延長(1913-17)

Human Leukocyte Marathon-Ready cDNA (CLONTECH)を鋳型にMarathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH)を用いて、キット付属のAP1プライマーとB1913に特異的な塩基配列からなるプライマー1913-17 FでPCRを行った。増幅した断片をサブクローニングし配列決定をしたところ1913-17の塩基配列を含む約0.5 kbの塩基配列が得られた。同様に、キット付属のAP1プライマーと1913-17特異的な塩基

30

40

50

配列からなるプライマー 1913 - 17R で PCR を行った。増幅した断片をサブクローニングし配列決定をしたところ 1913 - 17 の塩基配列を含む約 0.4 kb の塩基配列が得られ、合計 756 bp (配列番号: 3) となった。プライマー配列

1913-17F:GGTCAGTTTCCCAACTAAGAGGAGTG (配列番号:94)

1913-17R:GGAAGTTCTGAGAAAACAGCAGGTG (配列番号:95)

[実施例6] 遺伝子塩基配列の延長 (1852 - 09)

GENETRAPPER cDNA Positive Selection System (GIBCO BRL) を用いて、1852 - 09 に特異的な塩基配列 (ACATTGGACAAGTGGCACG; 配列番号: 96) からなるオリゴヌクレオチドをプローブとし、キット添付のピオチン - 14 - dCTP と TdT によりピオチン化オリゴヌクレオチドとした。TimeSaver cDNA Synthesis Kit (Pharmacia Biotech) により作製した YY - 1 cDNA library はキット添付の Gene II 蛋白質とエクソヌクレアーゼ III により一本鎖に分解し、ピオチン化ヌクレオチドを加え標的遺伝子とハイブリダイズさせた。ここにストレプトアビジン - パラマグネティックビーズを加え、マグネットで捕捉することにより 1852 - 09 の塩基配列を含むクローンを得た。選択したクローンの持つ断片の配列決定をしたところ 1852 - 09 の塩基配列を含む 1931 bp (配列番号: 4) の塩基配列が得られた。

[実施例7] 遺伝子塩基配列の延長 (1945 - 03)

Human Leukocyte Marathon Ready cDNA を鋳型に Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH) を用いて、キット付属の AP1 プライマーと 1945 - 03 特異的な塩基配列からなるプライマー 1945 - 03 For で PCR を行った。さらに、この増幅断片を鋳型にアダプター内の塩基配列 [AP2] とプライマー 1945 - 03 For を用いて PCR を行った。増幅した断片をサブクローニングし配列決定をしたところ 1945 - 03 の塩基配列を含む約 2.2 kb の塩基配列がえられた。同様に、キット付属の AP1 プライマーと 1945 - 03 特異的なプライマー 1945 - 03 Rev で PCR を行った。さらに、この増幅断片を鋳型にアダプター内の塩基配列 [AP2] とプライマー 1945 - 03 Rev を用いて PCR を行った。増幅した断片をサブクローニングし配列決定をしたところ B1945 の塩基配列を含む 1.6 kb の塩基配列がえられ、合計 2276 bp (配列番号: 5) となった。

プライマー配列

1945-03 For:CCATGGAAAATTTGGTCTATCACC (配列番号:97)

1945-03 Rev:GCTGGAATGAATAAGAAGCTTTGC (配列番号:98)

[実施例8] 遺伝子塩基配列の延長 (1956 - 04)

1956 の DD 配列を含むプラスミドを鋳型とし、1956 - 04 に特異的な塩基配列からなるプライマー 1956 - 04 sense と 1956 - 04 antisense を用いて PCR を行った。増幅した断片を ClonCapture cDNA Selection Kit (CLONTECH) 添付のピオチン - 21 - dUTP を用いてピオチン化し、このピオチン化プローブとキット添付の RecA 蛋白質に複合体を形成させた。ピオチン化プローブ - RecA 複合体は、SMART cDNA Library Construction Kit (CLONTECH) を利用して作製した末梢血好酸球 cDNA library (二本鎖 plasmid library) の相同配列部分と相互作用させ、三本鎖の複合体を形成させた。ここにストレプトアビジンを固相化した磁気ビーズを加え、マグネットで捕捉することにより 1956 - 04 の塩基配列を含むクローンを得た。選択したクローンの持つ断片の配列決定をしたところ 1956 - 04 の塩基配列を含む 293 bp の塩基配列 (配列番号: 11) が得られた。

プライマー配列

1956-04 sense:ACAAATCAGAGGTTAAAGAGGG (配列番号: 99)

1956-04 antisense:TGATGCATTATTTAGCTCCAG (配列番号: 100)

[ 実施例 9 ] ] ヒト末梢血好酸球のサイトカイン刺激による遺伝子の発現変化  
好酸球はアレルギー性炎症における中心的な炎症細胞と考えられているので、その増殖、  
分化、局所への遊走・集積、及び活性化に関するサイトカインの遺伝子発現への影響を検  
討した。

健常者の末梢血 100 ml から分離した好酸球でのサイトカイン刺激による遺伝子発現の  
変化を調べた。好酸球の分離は上記の通りに行った。24穴シャーレ上に好酸球を  $1 \times 10^5$  / ml まで  
まいた。シャーレは、好酸球の吸着による活性化を防ぐことを目的として、予  
め 1% BSA (非動化ブロッキングバッファー) により室温で 2 時間かけてコートした。  
サイトカインとしてインターロイキン 5 (IL-5)、インターロイキン 4 (IL-4)、  
インターフェロン (IFN)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 並びにエオタキシン (eotaxin) を、各々、0.1、1、及び 10 ng/ml  
ずつシャーレの各ウェルに添加し、10% FCS を補った DMEM 中で、3 時間培養し  
た。これらのサイトカイン類は、いずれも好酸球の活性化やアレルギーの発症に関わると  
されるサイトカイン類である。

各処理を行った好酸球について、実施例 1 と同じように RNA を調製し、遺伝子発現解析  
に供した。「1858-05」遺伝子、「1901-21」遺伝子、「1913-17」  
遺伝子、「1852-09」遺伝子、「1945-03」遺伝子、「1948-16」遺  
伝子、「1833-02」遺伝子、「1873-30」遺伝子、「1949-02」遺  
伝子、「1956-04」遺伝子、「1919-13」遺伝子、「1917-13」遺  
伝子、「1941-20」遺伝子、「1930-03」遺伝子、「1921-05」遺  
伝子及び「1925-08」遺伝子について発現の解析を行った。各々、用いたプライマー、プ  
ロープ等は上記と同一である。各遺伝子について得られた結果を図 20 ~ 図 35 (い  
ずれも RNA 1 ng 当たりのコピー数を GAPDH で補正した値) に示す。

実験に用いたサイトカイン類のうち、IL-5 は好酸球を活性化し好酸球の寿命を延ばす  
。そのため IL-5 処理は、好酸球において抗アポトーシス遺伝子の bcl-2 や bax  
の発現レベルの上昇をもたらす。図 20 ~ 図 35 に示すようにこれらの遺伝子の多くも同  
様に上昇しているため、好酸球の寿命延長と相関して発現すると考えられ、アレルギーの  
病態の誘導や増悪との関連性が示唆された。

またこれらの遺伝子の多くは、IFN、IL-4、GM-CSF によっても発現が誘導  
された。これらのサイトカイン類については、好酸球における遺伝子発現に関する知見は  
これまであまりない。しかし、いずれもアレルギーの発症にとって重要な因子であること  
から、これらのサイトカインで好酸球において発現が誘導される遺伝子であるということ  
は、これらの遺伝子が、アレルギー性疾患の病態や増悪に関連している可能性を示唆する  
ものと考えられた。

IL-5 によって発現が誘導された遺伝子:

「1858-05」、「1913-17」、「1945-03」、「1948-16」、  
「1833-02」、「1873-30」、「1949-02」、「1956-04」、  
「1917-13」、「1930-03」、「1921-05」

IL-4 によって発現が誘導された遺伝子:

「1945-03」を除く全ての遺伝子で、発現の増強が観察された。

IFN- $\gamma$  によって発現が誘導された遺伝子:

「1858-05」、「1901-21」、「1852-09」、「1948-16」、  
「1833-02」、「1873-30」、「1949-02」、「1956-04」、  
「1919-13」、「1917-13」、「1930-03」、「1921-05」

GM-CSF によって発現が誘導された遺伝子:

「1945-03」

産業上の利用の可能性

10

20

30

40

50

本発明により、初期アトピー性皮膚炎患者の好酸球において発現が増加する遺伝子が提供された。好酸球の増加に先だって発現が高まる遺伝子は、アレルギー症状の、きわめて鋭敏な指標として利用することができる。好酸球の増加が見られない段階でアレルギー症状を診断することは、通常は困難である。しかし本発明によって提供された指標は、これまでの診断指標では困難な早期の診断を可能とする。早期の診断が可能となったことにより、初期アレルギー性疾患であっても、的確な治療方法を選択することができる。

好酸球の増加はアレルギー反応の重要なステップである。したがって、好酸球の増加に先だって、好酸球において発現が増加する遺伝子は、アレルギー性疾患の、特に初期の段階において重要な役割を果たしていると考えられる。したがって本発明の遺伝子の発現や活性を抑えることがアレルギー性疾患の治療戦略のターゲットとなるとともに、そのような新しい治療法におけるモニタリングのための新しい臨床診断指標としての有用性が期待できる。

10

本発明によって提供された指標遺伝子は、アレルゲンの種類に関わらず、簡便にその発現レベルを知ることができる。したがって、アレルギー反応の病態を総合的に把握することができる。

また本発明によるアレルギーの検査方法は、末梢血好酸球を試料としてその発現レベルを解析することができるので、患者に対する侵襲性が低い。しかも遺伝子発現解析に関しては、たとえばECPなどの蛋白質測定と異なって、微量サンプルによる高感度な測定が可能である。遺伝子解析技術は、年々ハイスループット化、低価格化が進行している。したがって本発明によるアレルギーの検査方法は、近い将来、ベッドサイドにおける重要な診断方法となることが期待される。この意味でこれらの病態関連遺伝子の診断的価値は高い。

20

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> GENOX RESEARCH, INC.

JAPAN AS REPRESENTED BY GENERAL DIRECTOR OF NATIONAL CHILDREN'S  
HOSPITAL

<120> Method for examination for allergosis

10

<130> G1-A0006P1

<140>

<141>

20

<150> JP 2000-314093

<151> 2000-10-13

<160> 105

<170> PatentIn Ver. 2.1

30

<210> 1

<211> 204

<212> DNA

<213> Homo sapiens

40

<400> 1

ctatgacctt ctgagtcctc ttccatctgt gtgtgtatgt aagacagaaa aagagactga 60

gagagagaga gagagacaaa gaacaggaga actacactgt ggatttgggt gatgctccag 120  
 ggaggttga acagactgtc aatgtcatgt tttgaagaga gcaaggaatt ttggggatac 180  
 tgctgtgcca gagaaaacag gtte 204

<210> 2

10

<211> 1043

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ccatcatcaa tacaatattc tgaattcatt atttcacatc etaaacaaat ctggtgatag 60  
 cctgctaggc aatcacgaat cgtgggtgcta tgtaacattt tattttgtgt tctaagccac 120  
 gaggaatcaa gataaacctc caacacagcc aggccatac tggaaagatc tgcccttgge 180  
 acacacaaca gccagcagag gtcaccttc aagtggccct cagtgggtgga aggagagcag 240  
 ttctggatgg cagttctcat ccttgtgctg gccttgtott ctgtccagca ataaagcttt 300  
 aggctttgct ttctccattt gccgtggagg agagtaacag tcacagcagt aatcaagaca 360  
 ggcgtcttgt catttaatta agcatggcat ccctaglate cataatttca ggtcattagg 420  
 taccagaca ttgttctctc cattttgcag atgaggaaac aaaagcccag ggaaatagta 480  
 tacttgcca gaaagaattt aaaaaatat tgttgagcag gctagcgtct gtgggtgcag 540  
 ttctctgat tcagtgtgtc atgccgcaa catgccagge acattcccac ctcaggcct 600  
 ttgcaactgc tgtttgcate cattggcctt tgcaattgcag gaaacactct taccaggt 660  
 accagcatgg ctcatccac cactaggctc ccatgttaa accaggcaag tctaggacaa 720  
 actaggacga gttggtatac agtagaccag taaatgaaag agcttgtgtt atggagctga 780  
 cattcttgtt agggatgctc acctggccca tctcatttaa aattgcactc ttcctcact 840  
 ggctggacga ggaaggctc tctgggatt gcttggctca gctccacatg gtcgctcact 900

20

30

40

ctcctgggag ctcatctggg cttgttctca tggcagaagc agagcagaag cgtgcaagct 960  
 tcttgggacc taggcacacc atccctaatag tgacacgatg ttgcctggag ttgaggagtg 1020  
 gagaaaaagt ctccagatct tga 1043

<210> 3

10

<211> 756

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atctgtttta aacaattatt gatttctaaa gtggcaccac ctaagttacc aaatctttat 60  
 taagaattta caatatgttc tatacgggat ggggtaccaa gtttagctca gttgctgtta 120  
 atgaagtgtc taccatgggt tagacacagt cactaggtac cagggtgtga atgccccagc 180  
 atgtggctgg ctttgagatt ttatcatctc attagagtaa aggacttgta aggggcaagg 240  
 tgaagttgcc ttttaatatg gtaagtgcaa atatcaggtt agtacaggag ccagggggag 300  
 cacaaggagg tcagtttccc agactaagag gagtggggag tatgttcagg gagggcctcc 360  
 tggaagagcc aatatccgat ctgcaggggt tatatcacct gctgttttct cagaacttcc 420  
 cattgttctg agctcattgt ttgttctctc ccaaaagaaa ttacatcagg acaatatttc 480  
 tatectgaac aaacactttt atcttctgac tcatttatgg aaggagatec tttctttgat 540  
 tatttgtgta catactttga cttgttcttc tcttgttccc aactccattt tttctgttt 600  
 cctgcccacc agcctcatat acacacacat ttgcatttaa gacctgtgaa aacaaggact 660  
 attgacttca tttttgtatc tacaacaaa gccttgaaaa tagtatgtac tctgtacata 720  
 ttcattaaat ttaatgtatt tactgcaaaa aaaaaa 756

20

30

40

<210> 4

<211> 1931

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

caattattgt acccagaaat agccacatga ettacatcct tacctccttc agatcctcgc 60  
 taaattgtca tcctctcacc catgcctttt tcctgacca gcctgtttta aattgacact 120  
 gttttcactg ctaaactctct tagcacttcc tgtctcttca ttactttttt ttttaaaatc 180  
 accatctgat acatatttta cttgagcttt gttatgggat acagttaage tactagaaac 240  
 aattaattca aagataagct taattcattg gtgcgcttca caagggtagg aatttttgcg 300  
 tgttttgttc acagtgggta atccccagea cctagaacaa tgccaggaaa aacaaccact 360  
 caataaatgc tggtttaatg aaaaagaaaa atcttaaaaa ccaagtcac catatatac 420  
 ccacaaagat aggaaagtgg gattggggaa agggatgcta tagtagtttg actttgctta 480  
 ttacaccctt ctctagttgc tgactgatca tagaattggg taaatggctt gagctgggac 540  
 aatttattgt aaatataaag cactaaggca aatataaagg attggaactt cgtactgaga 600  
 ggacctctgc ttccagccat cttgtaataa caggaactgg agttattctc tcgcetaaaa 660  
 tagcetaaca aaccgacaca cacaaaaage ccataaaaca tatgaaacaa aggcattccg 720  
 acattggaca agtggcacga gacagtgaac cctgagagaa ggaaaaaaca aatgatttgc 780  
 cccaggctgc agtgcaggaa ggcagaacce aaacacagct tatectaggt tgagatgatg 840  
 gagttaggaa ttctgggagg ctgaggcagc tagaatttga aggacagagt accagagaag 900  
 agagagttag ttacacagag agtgagctcc agagatcttc agagggtctc cctggaggct 960  
 tcagecgagt gctgattagt gcatatgcat aagagaacta cccatggatg aggaaagagg 1020  
 cactgggaag aagaaagtag ctcatataag gcagtgaaga gtgtgtcccc cccacccac 1080  
 cccaccatt cagagtggaa aaaccttcta tataagtggg attagatggt gtactcagaa 1140  
 gactaatgct tcagcgatga ggcaaaatta gccttagact agtctaactc gatcctgect 1200

10

20

30

40

aaaaaatctt aaaagtaagc cattcaagac aggtcataaa actgttttgt aaagggccag 1260  
 atggaaaata ttttaggata tgtgggcat gtagtctctg ttttaactac tcactttctgc 1320  
 ccttctagtg ttaaacagc cataaacaat ttgtaagcaa atgtatttac atgtatcaga 1380  
 atgtattcca ataaaatfff atttatagaa ataggcagtg gtccagattt ggctgtggg 1440  
 cctagtttgc agacacttgg tttgaaggat caaattgttt gaagtagctt aactgtatcc 1500  
 cagaacaaag ctcaaggata ttttaaggaaa tacaaaatat ccagcaceca ttaataaagt 1560  
 atgcaatatg tagcattcag tcagaattta ccagatgtgc agagaagcag gaaaattcaa 1620  
 cagtgaagag aaaactcaat caatagaaac agaccagaa gtgacacaca tctaataagt 1680  
 ggaggtacta aaataaatta aatagattta ataaggatat tcaaatagtt attgttacta 1740  
 tgttccatat actcaagatg gtagtggaaa gcataaggtg gttaagaaa gatggaagct 1800  
 ataaaaagac ctaaattgaa cttctagacc tctagacatt ttataaacac ctgagttgaa 1860  
 aaatacactg gataggatta aaateccaaa atacactgca tagcaattat acaaaatgag 1920  
 atactgaatg g 1931

10

20

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 2276

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

30

&lt;400&gt; 5

ctagaatcag caatgtatff atttgtttgg tgtttacgta agtcttagtg tgttttataa 60  
 ataataggag ggtttgttta aagtgggctt ttgaagatac agtgtgactt taaaagaatg 120  
 gtcttagaaa acttataaat agcctaaata tgtactgaag aacatttcat aatcacaaaa 180  
 aaagaaataa tataatctcat gaattattaa gaatttgttt tttaaataaa gtctcttttt 240  
 tgaaaaggta ttaagaagag gaattagaca aaacttgttt gaatatggtt gbaattgcag 300

40

tttactgagt tatatataaa aaageccaat tagtttaaac aaatacagta tctgggttta 360  
tggattctg agcctcgtat ttttccattg aatgtcaggg gtatattaaa atgcctccct 420  
ttatgtttct atacaaaaga ttgttctgac agtaagtta agtgattttc acaacttatt 480  
gctgtctaaa aatttccctt gacttcacat tttgttctga atatgttggg ttctttcctc 540  
caccacaca atgttgaagg caaggaagc aagagttgca aagtaataca gtgaatttga 600  
gaacctggc ttttttcaa aacaaaataa acctttatta taagattgct ttttattgat 660  
accaaaaag ggtggcactt tggcaaatgg tcagtaagtg tatgaatagc ctaattgatt 720  
tagctggaat gaataagaag ctttgcattt tgtecttgta gatagttggc tcagtaaaca 780  
ttgtgatggt gatagaccaa attttccatg gtgaaaggta aaacagaaca gcaacaaaaa 840  
actcatcaaa cttatagatc caaatatcag caattttgtg tctgtgtcaa ggtcttcaaa 900  
gaaggagcaa tgtgttaatt aggatctcat ttgaatttct atagtgaaa aataatcatg 960  
ttaacttaca taaaaccaa gagtttgaca aatgttacta tgtgaaaata ttaatagagg 1020  
agatccttgc tgagaattta aatctgcatg aaattcatag atgtgtgtag aaatttaaat 1080  
ttatcataca ctccgcagta aatgccaata aaggtggatg gcataattag gacaaagata 1140  
acagtagaag caaaataaga atttttttaa aaccttatgg atgtcacatt agtctgactc 1200  
agtctgtaac tctagttaga aatgtaaaat tttagggatt tttgggctac tgtaagaaaa 1260  
gaatctgctt tgggggtggg atgtgaggag aaagaaatgt ttgtggcaat taagatgtat 1320  
atagtatatt taagaagtac atttgcaatt ctaatcactt agttcaaagg agaaaaatat 1380  
atcatgtgta actttattta cttttaatac tattattatt attacatggt gaaaatagaa 1440  
aatcttgaaa atttctagag ggtaaaagtg ttattttctaa ttccalltagc tccttttaag 1500  
ataggaacat ttcatattag tctccctagc acagaatctg aaccataata ggcactccat 1560  
aaatgtttac tgaactaacc tgaatttttag aaatatcagg gtgcaaagca gaattatttt 1620  
tctaggcttt aaaactatac cactgctcct taccctgta cacaccttg aatctcagtt 1680  
ttgatacaaa taggttctca gttttgggtg tgaagaaaac tggttgatat ttttttttaa 1740  
tctactaaat gttggccaga gctgaaattg cctgaaaggg aacttgattt agcagaatte 1800  
cttcttttca gaaagaagga cttagactaa atttatatgaa cgggaggagc ctgtttttat 1860

ctgagatggt tgattggaaa aagaatagat aaactaaggt ggagagttga ttgaaaaaa 1920  
 ggaaaaaaga tagtcctgtc tagtggtcag tcctaacag tgtggttaa ggggagctaa 1980  
 atttcaactt tcaggggtca gctgagacaa ccacctagat tttccaagtt agttccaatt 2040  
 tcaagtacaa taatectttg acaacataga aaagaattat agttagcaaa attgcaattg 2100  
 tcacagtcaa ggtcttgttg gtaatagagg gttggggaaa aagttaaacc agcattaaat 2160  
 gaatatatatt ttaacataac aaaagttccc agaagacate cacttcaaat tcaagccata 2220  
 ttcacatg ttaaaaacct tactcttctc cctgatagtg tgaggaaaaa taaaat 2276

10

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 183

&lt;212&gt; DNA

20

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

ctgaggagat caagcagggg caggcaacag gaatectaga atggcccttt tggactaaat 60  
 tggtagttgt ggccatcgge ttcaceggag gacttttttt tatgtatggt cagtgtaaag 120  
 tgtatgtgca attgtggaag agactcaagg cctataatag agtgatctat gttcaaaact 180  
 gtc 183

30

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 259

&lt;212&gt; DNA

40

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

ggcattttac acacattggt acttgctaata tgctattcca agaatgaac aaaggaacaa 60  
 aagaaatgaa caaaagaaac attttctttg gctgagttat attttaatat tatgcatttc 120  
 agtgagaact gacattagaa gtagctatat aaaagccat catagttgta aactattggt 180  
 gtaaactata gttaaagaca ttgtccagta tgttgactgg cattcttga gtaaattcct 240  
 cctgtgattt aatacttgg 259

10

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 534

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

20

&lt;400&gt; 8

cttataaag tatgcacage acttataatct attctagaac ttggggatgg aggagatatg 60  
 tttgattaaa taatgaacca tgagagggtc taatgaaget tggccaagaa gtattttgct 120  
 cagatagttc atgctatata ttattgccat aaactccatg tggttcacag agacttaaac 180  
 cagagaatgt agtcttcttt gaaaacaagg tcttgtaaag ttgacagact ttgggttcag 240  
 cacaaatttc aaccagggaa gaagctcact acaagctgtg gatctcttgc atattccgct 300  
 ccagaaattc tgettgggtga tgagtatgat gcacctgcag tagatatttg gagtctggga 360  
 gtgatccttt tcatgttggg gtgtgggcag ccgcccttcc aagaagccaa tgacagtga 420  
 aactgacaa tgatcatgga ttgcaaatat acagtaccat cccatgtgtc taaagagtgt 480  
 aaagacctaa tcacacggat gctacagaga gatcccaaga gaagggttc tttta 534

30

40

&lt;210&gt; 9

<211> 500

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

```

tgaaaggcaa aacaaactg tcagacctgt ttcaccacat tgeaatcaat actcettgtc 60
tatacaaatt ttctgctcac cacaccaacg ttcatttgct gatcagattc tagaatatgt 120
gcacctatgt gtcagaatga agccgtggtc tctcccacac tttgaggaaa tggacatcat 180
tgctgacata cacttgatag aaaatgtag ttctagctag gtttcaaaa ctctagcaag 240
taaataaggaa tgcactgttt ttgtttgttt tttatgtttt taccattata tttggagaat 300
tttctgaagt agctcttttt ttaaacacgc tttattgagg tatagttgaa atgcaaaaaga 360
ggcacatatt taatatatac agtttaatga gtttgatgt tattggggac agctgttgtg 420
aaacttcagt tcttgtcttc tcagtttaaa agaagcaaga gacacacacg aaaggagatg 480
cagtgtagag taatttattg

```

<210> 10

<211> 410

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

```

ctaaacctca aaatataact atttacatct catttgctat ttgtttcctt gtttttagta 60
tacatctatt taaaaatgtg tttatttcag ttttaactgta gaagttttta gaacaaaagg 120
cccttggttt gttgaagaaa atgaccccat atttgagcgc gtttctacaa ctacatactc 180
cagctttagg aaaaactatt actetaaac atggtcaaat aaaggtaact aattttcatt 240

```

taaaaatgtg taagttctct atttgaaatg aattgactgt ttctgaatta aatcagttct 300  
 ccctaagta cataaaatgc aaactacat tttattccag ctaattttat tgacacctct 360  
 atcttatgcc ttccatggaa tggatatctct gactttgtct taaaaatctt 410

<210> 11

10

<211> 293

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gaactgcttt agaaggacca gaatcaacac tgaaaacaaa tcagaggtaa agaggtagg 60  
 catgagaaga aaccacagag aaggcagtgg aaaaatacaa ggcaatggaa gaaattaact 120  
 aggaactcag atgtggagag acaagttggg aatgatttgt gtactgggag atgaaaaact 180  
 aaaatgagct ggagctaaat aatgcatcaa tattttataa atatactgtt atccaaaaca 240  
 aaacaaaaca aatagcagaa gaaggaatgc aagtttttat cctttatgta aag 293

20

30

<210> 12

<211> 294

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

cattaggcac ctccaaaggg acaaaggacc aatatacctg gttggggaca ggattctgtc 60  
 atttgattat tcctgactca tgttttcatg aggtagtccc ccacctcata taaaagcctc 120

40

agtgttggt tctgacctg gtgtatgaaa agcccttgtc taaaggttac tgccttgaga 180  
 aaataataaa ggaagaagag gatagacatg aagacacttt aaagcctcct gaatagaatg 240  
 catccagaag cgaattccag gagattctgt catcatgctt gcctttcaag caaa 294

<210> 13

10

<211> 301

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

cagtaccttg gcttggctct tgacgtggac agaattaaaa aggaccaaga agaggaagaa 60  
 gaccaaggcc caccatgccc caggctcagc agggagctgc tggaggtagt agagcctgaa 120  
 gtcttgcaag actcactgga tagatggtat tcaactcett ccagttgtct tgaacagcct 180  
 gactectgcc agccctatgg aagttccttt tatgcattgg aggaaaaaca tgttggcttt 240  
 tctcttgacg tgggagaaat tgaaaagaag gggaaaggga agaaaagaag gggaagaaga 300  
 t 301

20

30

<210> 14

<211> 247

<212> DNA

<213> Homo sapiens

40

<400> 14

gcaggcctga cccctgggat aggtcagggc ggtggttctt tgggagaatt cctgcttgat 60

gagatggaag gtccaagtca atagcctcat ggtcctccca agtctgacag tctgctattc 120  
 tacacacctg tccacaggct gcagacatat aaaggtaaata gttcaggat tagaaaatat 180  
 tcaaagaatt ctcaatgttc aaaattctga aaagcaaate tatgctgaat gtgtggtggg 240  
 ggcattc 247

10

<210> 15  
 <211> 320  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 15  
 caagtagtag tggaatggga gttggtgctt gtattagttc tggtagttca atatgaacat 60  
 ctagagtata tctctaagaa caaagagttt aattctgcca tttgggctag ttctttaga 120  
 gaaatacagt gagagaatct gagatatect ctccccaaa taatttataa ttcataaggg 180  
 ggaaataaac ettacacaga acttttgcca tatagtaatg cctcacattt aacaacata 240  
 gtttttcatt cccattttta catttaatgc ttatttaaaa atctcatcaa atagttaaga 300  
 gaccagtgtc attcttattt 320

20

30

<210> 16  
 <211> 757  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

40

<400> 16

acatacaact ggTTTTgcag gtgagagtea ctttgtaaca tgtttcaaca ctttctctc 60  
 ctgataagca gtttctagtc tgaatcagga ctttaagaat atgctgtata atgtttgtac 120  
 caatacgaag caagtgtttt cctctctcac agcctttttt gtgatgatta gaaacttacc 180  
 ctctgggcca ttctctctga aattgccacc tccagaccac caatctttta aaaatgtaag 240  
 gctaattata agcgtatttt cacctacaat gtgcgtgtgc gtgtgtgcca tgtgtgcaag 300  
 tacatgaata getgtaccag gtaggagate tctcacactt ggetggacac tccagctacg 360 10  
 cgggaacaag cacctgagcg gggctctcaa aaccaaccag gattccgccc gccgacgtcc 420  
 tggctgtgac tggctttggg aagtttgact ceatgccatc ctttgettct ccaactgggtt 480  
 ctgatgaaga aaactgaatt gcgcttccac aattcagtgg caggagaggg tggacctctc 540  
 gagttcccaa gggecccctc ctgtcacctg ccccagagcc ceatgcaggg ccacactgac 600  
 ccccagggaa agctgacact agtagagtca gctgttaaag ggtaatagag gtcaaaggct 660  
 gggtagaggg tttttagttt ttgtgttttt acacacagag aaaatgagac taatcactgg 720 20  
 tttataatag atcaggagac tatcatttct ttgttc 757

<210> 17

<211> 197

<212> DNA 30

<213> Homo sapiens

<400> 17

gagttatctt tcccaccaga aagctgaaat tgctaggaga aggtccagtt ctgataagca 60  
 ccaaagccca ggctcttgca acacctctc atgtgcctga ttctacctt gtctgatac 120 40  
 catcagccag agccttctct aacacagtga tgttctctcc ttgttacctt tgcgcgccgt 180  
 cctgaaaata tccattc 197

<210> 18

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized anchor primer sequence

<400> 18

gttttttttt tttttta

17

20

<210> 19

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized anchor primer sequence

<400> 19

gttttttttt ttttttc

17

40

<210> 20

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized anchor primer sequence

<400> 20

gttttttttt ttttttg

17

20

<210> 21

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 21

ttgatggacc

10

40

<210> 22

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 22

tattgccgtg

10

20

<210> 23

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 23

gacggttagt

10

40

<210> 24

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 24

ggacttcgta

10

20

<210> 25

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 25

ggaagagttg

10

40

<210> 26

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 26

atccgtactg

10

20

<210> 27

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 27

tcctacaga

10

40

<210> 28

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 28

tcatagtccg

10

20

<210> 29

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 29

aaaccatcg

10

40

<210> 30

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 30

tattgccgtg

10

20

<210> 31

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 31

cagaactgct

10

40

<210> 32

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 32

aaggaacgga

10

20

<210> 33

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 33

atgggaggaa

10

40

<210> 34

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 34

gctggttttg

10

20

<210> 35

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 35

gtttgcttgc

10

40

<210> 36

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 36

cacgagtcta

10

20

<210> 37

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 37

gagcaaggta

10

40

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 38

tgttttctct ggcacagcag tacc

24

20

<210> 39

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 39

tccagggagg ttggaacaga ct

22

40

<210> 40

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized probe sequence

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

20

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc\_binding

<222> (32)

30

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 40

ccaaaattcc ttgctctctt caaaacatga ca

32

40

<210> 41

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

10

<400> 41

tcctagtat ccataatttc aggtca

26

20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

30

<400> 42

cctgggcttt tgtttctca

20

40

<210> 43

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized probe sequence

10

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

20

<220>

<221> misc\_binding

<222> (33)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

30

<400> 43

aggtagccag acattgttct ctccattttg cag

33

<210> 44

<211> 22

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

10

<400> 44

tttcccaact aagaggagtg gg

22

<210> 45

<211> 22

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

30

<400> 45

gatataaccc ctgcagatcg ga

22

40

<210> 46

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized probe sequence

10

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

20

<221> misc\_binding

<222> (26)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 46

30

agggagggcc tcctggaaga gccaat

26

<210> 47

<211> 20

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 47

cgacacacac aaaaagccca

20

10

<210> 48

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 48

tteactgtct cgtgccactt g

21

30

<210> 49

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized probe sequence

<220>

<221> misc\_binding

10

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc\_binding

<222> (32)

20

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 49

aaaacatatg aaacaaaggc attccgacat tg

32

30

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

synthesized primer sequence

<400> 50

ccatggaaaa ttggtctat cacc

24

10

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 51

gctggaatga ataagaagct ttgc

24

30

<210> 52

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

synthesized probe sequence

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

10

<220>

<221> misc\_binding

<222> (36)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

20

<400> 52

tcacaatggt tactgagcca actatctaca aggaca

36

<210> 53

30

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 53

gtcctccggt gaagccg

17

<210> 54

<211> 21

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

20

<400> 54

acaggaatcc tagaatggc c

21

<210> 55

30

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized probe sequence

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

10

<221> misc\_binding

<222> (25)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 55

20

tggccacaac caccaattta gtcca

25

<210> 56

<211> 28

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

40

<400> 56

atagtaccat caagcaactg gatagagt

28

<210> 57

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 57

tttgtctgtc ttgaggaatg ttcca

25

20

<210> 58

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized probe sequence

<220>

40

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc\_binding

<222> (35)

10

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 58

caacaacagc gattacatat tctcctcaag cctac

35

20

<210> 59

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 59

ggcttcttga aagggcgg

18

40

<210> 60

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 60

cagtagatat ttggagtctg ggag

24

20

<210> 61

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized probe sequence

<220>

40

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc\_binding

<222> (25)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

10

<400> 61

tgccacaca ccaacatgaa aagga

25

<210> 62

<211> 24

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

synthesized primer sequence

30

<400> 62

gcacctatgt gtcagaatga agcc

24

40

<210> 63

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

10

<400> 63

ttctatcaag tgtatgtag caatgatg

28

<210> 64

20

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized probe sequence

30

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

40

<220>

<221> misc\_binding

<222> (28)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 64

tggtctctcc cacactttga ggaaatgg

28

10

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

30

<400> 65

gggcccttgt gttgttgaag

20

<210> 66

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 66

atagtttttc ctaaagctgg agtatgtagt t

31

10

<210> 67

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized probe sequence

<220>

30

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

40

<221> misc\_binding

<222> (27)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 67

atgaccccat atttgagcgc ggttcta

27

10

<210> 68

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 68

tccattgcct tgtatTTTTT ca

22

30

<210> 69

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 69

gaaaacaaat cagaggtaaa gaggt

26

10

<210> 70

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized probe sequence

<220>

<221> misc\_binding

30

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc\_binding

40

<222> (28)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 70

tgccttctct gtggtttctt ctcatgcc

28

<210> 71

<211> 24

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

20

<400> 71

ggcagtaacc tttagacaag ggct

24

<210> 72

30

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 72

gttttcatga gtagtcccc ca

22

<210> 73

<211> 26

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized probe sequence

20

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

30

<220>

<221> misc\_binding

<222> (26)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

40

<400> 73

ccatggtcag aagccaacac tgaggc

26

<210> 74

<211> 24

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

20

<400> 74

tgcataaaag gaacttccat aggg

24

<210> 75

30

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

40

<400> 75

ggatagatgt tattcaactc cttccag

27

<210> 76

<211> 26

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized probe sequence

20

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

30

<220>

<221> misc\_binding

<222> (26)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

40

<400> 76

tggcaggagt caggctgttc aagaca

26

<210> 77

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 77

gggaggacca tgaggctatt g

21

20

<210> 78

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 78

cgggtggttcc ttgggagaa

19

40

<210> 79

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized probe sequence

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

20

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc\_binding

<222> (28)

30

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 79

cttggacctt ccattctcacc aagcagga

28

40

<210> 80

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

10

<400> 80

aaaactatgt ttgttaaag tgaggca

27

20

<210> 81

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

30

<400> 81

cctcttcccc aaataattta taattca

27

40

<210> 82

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized probe sequence

10

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

20

<220>

<221> misc\_binding

<222> (38)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

30

<400> 82

actatatacgc aaaagttctg tgtaaggttt atttcecc

38

40

<210> 83

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

10

<400> 83

cagaaccgag tggagaagca a

21

<210> 84

<211> 19

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

30

<400> 84

cgacgtcctg gctgtgact

19

40

<210> 85

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized probe sequence

10

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

20

<221> misc\_binding

<222> (27)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 85

30

atggcatgga gtcaaacttc ccaaagc

27

<210> 86

<211> 17

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 86

agcaccaaag cccaggc

17

10

<210> 87

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 87

gatggtatca ggccaaaggt aga

23

30

<210> 88

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized probe sequence

<220>

<221> misc\_binding

10

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc\_binding

<222> (26)

20

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 88

cttgcaaacac ctctcatgt gcctga

26

30

<210> 89

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

synthesized primer sequence

<400> 89

tcacccacac tgtgccatc tacga

25

10

<210> 90

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 90

cagcggaacc gctcattgcc aatgg

25

30

<210> 91

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

synthesized probe sequence

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

10

<220>

<221> misc\_binding

<222> (7)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

20

<400> 91

atgccctccc ccatgccatc ctgcgt

26

<210> 92

30

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 92

aggagagtaa cagtcacage agtaatca

28

<210> 93

<211> 24

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

20

<400> 93

ccctgggctt ttgtttcctc atct

24

<210> 94

30

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 94

ggtcagtttc ccaactaaga ggagtg

26

<210> 95

<211> 25

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

20

<400> 95

ggaagttctg agaaaacagc aggtg

25

<210> 96

30

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 96

acattggaca agtggcacg

19

<210> 97

<211> 24

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

20

<400> 97

ccatggaaaa ttigtctat cacc

24

<210> 98

30

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 98

gctggaatga ataagaagct ttgc

24

<210> 99

<211> 21

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

20

<400> 99

acaaatcaga ggtaaagagg g

21

<210> 100

30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 100

tgatgcatta tttagctcca g

21

<210> 101

<211> 162

10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 101

gaggagagta acagtcacag cagtaatcaa gacaggcgtc ttgtcattta attaagcatg 60

gcatecctag tatecataat ttcaggteat taggtacca gacattgttc tctccatttt 120

20

gcagatgagg aaacaaaagc ccagggaat agtatacttg cc 162

<210> 102

<211> 170

30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 102

tacaggagcc aggggggagc acaaggaggt cagtttccca actaagagga gtgggggagt 60

atgttcaggg agggcctcct ggaagagcca atatecgatc tgcaggggtt atatecctg 120

40

ctgttttctc agaacttccc attgttctga gctcattggt tgttctctcc 170

<210> 103

<211> 158

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 103

10

ctgagaggac ctctgcttcc agccatcttg taataacagg aactggagtt attctctcgc 60  
 ctaaaatagc ctaacaaacc gacacacaca aaaagcccat aaaacatatg aaacaaaggc 120  
 attccgacat tggacaagtg gcacgagaca gtgaaccc 158

<210> 104

20

<211> 256

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 104

30

ttgctgttct gttttacett tcaccatgga aaatttggtc taccaccatc acaatgttta 60  
 ctgagccaac tatctacaag gacaaatagc aaagcttctt attcattcca gctaaatcaa 120  
 ttaggtatt catacactta ctgaccattt gccaaagtgc cacccttttt tggtatcaat 180  
 aaaaagcaat cttataataa aggtttattt tgttttgaaa aaaagccagg gttctcaaat 240  
 tcaactgtatt actttg 256

40

<210> 105

<211> 225

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 105

```

gataacagta tatttataaa atattgatgc attatttagc tccagctcat tttagttttt 60
catctcccag tacacaaate attcccact tgtctctcca catctgagtt cctagttaat 120
ttcttcatt gccttgatt ttccactgc cttctctgtg gttctctctc atgcctacce 180
tctttacctc tgatttgttt tcagtgttga ttctggctct tetaa                225

```

10

【図面の簡単な説明】

図 1 は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における末梢血好酸球数 ( c e l l s / μ L ) の分布を示す図。

図 2 は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における全 I g E 濃度 ( U A / m L ) の分布を示す図。

20

図 3 は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における 1 8 5 8 - 0 5 遺伝子の発現量 ( c o p y / n g R N A ) の分布を示す図。

図 4 は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における 1 9 0 1 - 2 1 遺伝子の発現量 ( c o p y / n g R N A ) の分布を示す図。

図 5 は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における 1 9 1 3 - 1 7 遺伝子の発現量 ( c o p y / n g R N A ) の分布を示す図。

図 6 は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における 1 8 5 2 - 0 9 遺伝子の発現量 ( c o p y / n g R N A ) の分布を示す図。

図 7 は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における 1 9 4 5 - 0 3 遺伝子の発現量 ( c o p y / n g R N A ) の分布を示す図。

30

図 8 は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における 1 9 4 8 - 1 6 遺伝子の発現量 ( c o p y / n g R N A ) の分布を示す図。

図 9 は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における 1 8 3 3 - 0 2 遺伝子の発現量 ( c o p y / n g R N A ) の分布を示す図。

図 1 0 は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における 1 8 7 3 - 3 0 遺伝子の発現量 ( c o p y / n g R N A ) の分布を示す図。

図 1 1 は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における 1 9 3 7 - 0 3 遺伝子の発現量 ( c o p y / n g R N A ) の分布を示す図。

図 1 2 は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における 1 9 4 9 - 0 2 遺伝子の発現量 ( c o p y / n g R N A ) の分布を示す図。

40

図 1 3 は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における 1 9 5 6 - 0 4 遺伝子の発現量 ( c o p y / n g R N A ) の分布を示す図。

図 1 4 は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における 1 9 1 9 - 1 3 遺伝子の発現量 ( c o p y / n g R N A ) の分布を示す図。

図 1 5 は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における 1 9 1 7 - 0 3 遺伝子の発現量 ( c o p y / n g R N A ) の分布を示す図。

図 1 6 は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における 1 9 4 1 - 2 0 遺伝子の発現量 ( c o p y / n g R N A ) の分布を示す図。

図 1 7 は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における 1 9 3 0 - 0 3 遺伝子の発現量 ( c o p y / n g R N A ) の分布を示す図。

50

図18は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における1921-05遺伝子の発現量(copy/ng RNA)の分布を示す図。

図19は、健常者および症状別アトピー性皮膚炎患者における1925-08遺伝子の発現量(copy/ng RNA)の分布を示す図。

図20は、横軸に示した各種サイトカイン存在下で培養した、健常者の末梢血好酸球中で発現される1858-05遺伝子の発現量(copy/ng RNA、GAPDH補正值)を示す図。

図21は、図20と同じ条件下における1901-21遺伝子の発現量を示す図。

図22は、図20と同じ条件下における1913-17遺伝子の発現量を示す図。

図23は、図20と同じ条件下における1852-09遺伝子の発現量を示す図。

図24は、図20と同じ条件下における1945-03遺伝子の発現量を示す図。

図25は、図20と同じ条件下における1948-16遺伝子の発現量を示す図。

図26は、図20と同じ条件下における1833-02遺伝子の発現量を示す図。

図27は、図20と同じ条件下における1873-30遺伝子の発現量を示す図。

図28は、図20と同じ条件下における1949-02遺伝子の発現量を示す図。

図29は、図20と同じ条件下における1956-04遺伝子の発現量を示す図。

図30は、図20と同じ条件下における1919-13遺伝子の発現量を示す図。

図31は、図20と同じ条件下における1917-13遺伝子の発現量を示す図。

図32は、図20と同じ条件下における1941-20遺伝子の発現量を示す図。

図33は、図20と同じ条件下における1930-03遺伝子の発現量を示す図。

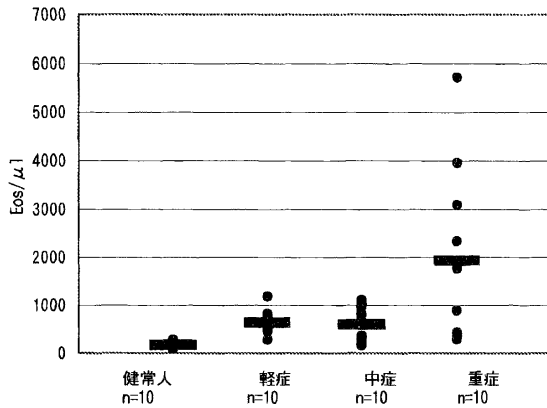
図34は、図20と同じ条件下における1921-05遺伝子の発現量を示す図。

図35は、図20と同じ条件下における1925-08遺伝子の発現量を示す図。

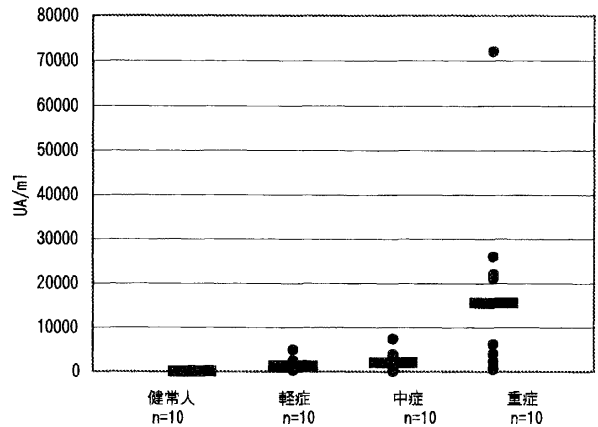
10

20

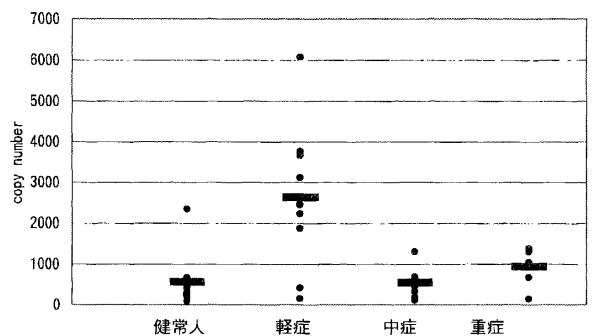
【図1】  
図1



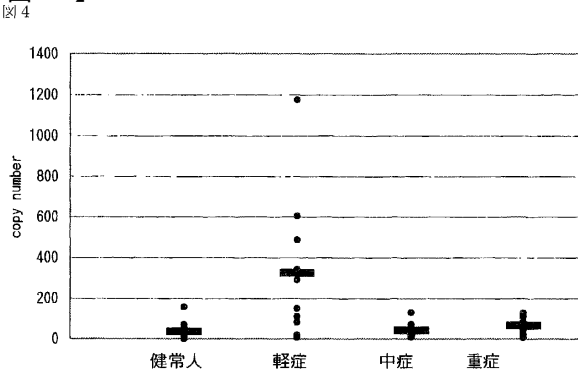
【図2】  
図2



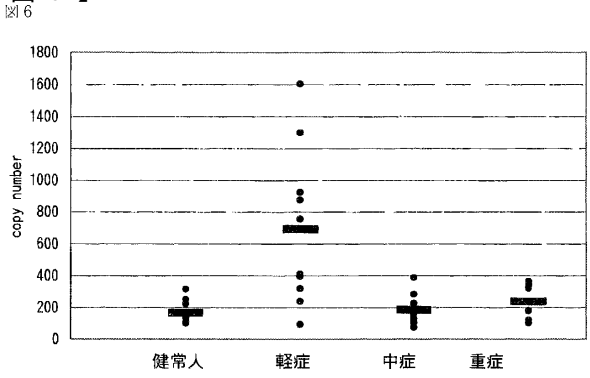
【図3】  
図3



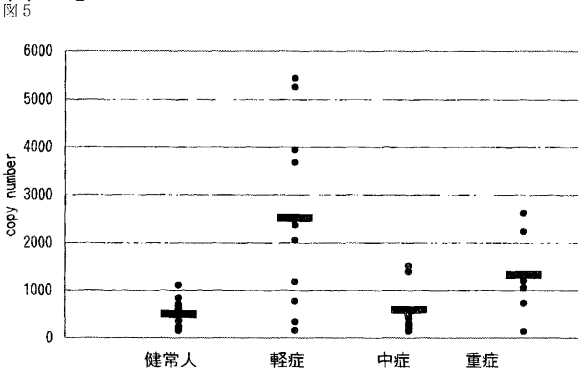
【 図 4 】



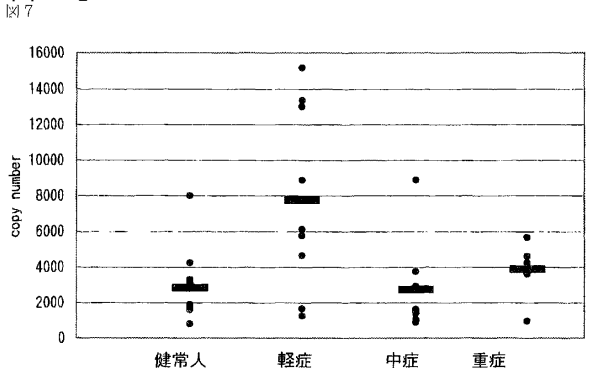
【 図 6 】



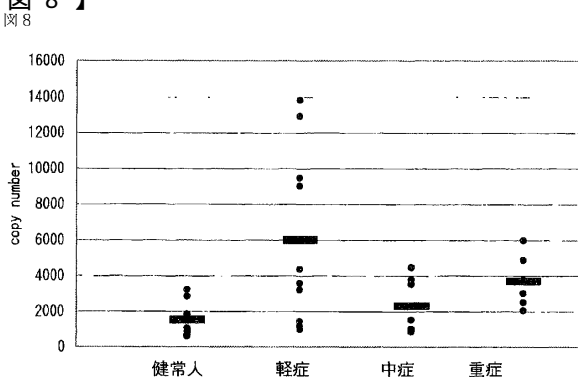
【 図 5 】



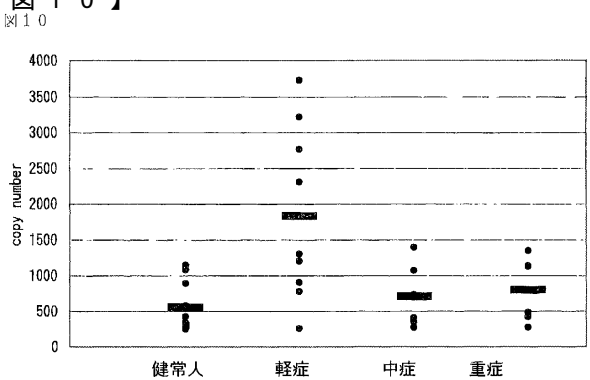
【 図 7 】



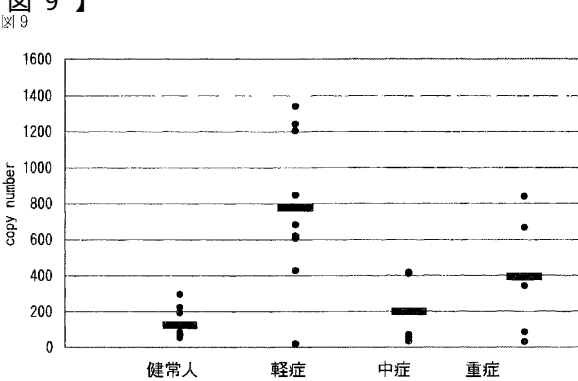
【 図 8 】



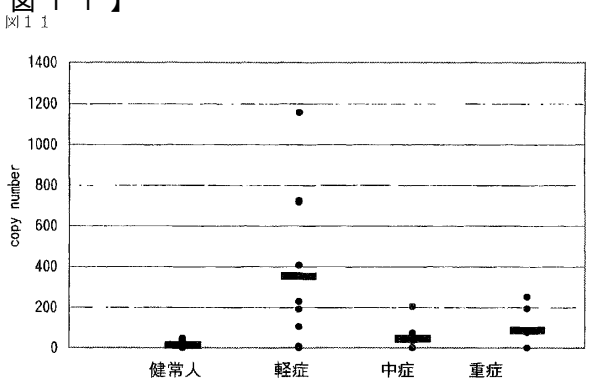
【 図 10 】



【 図 9 】

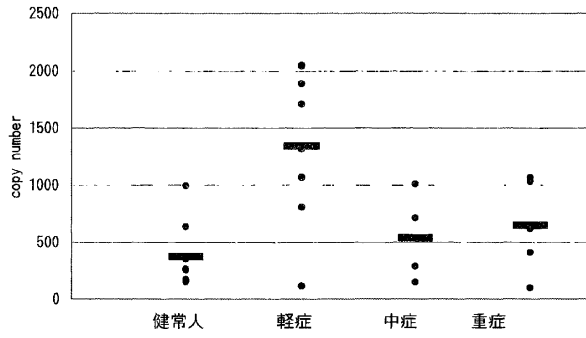


【 図 11 】



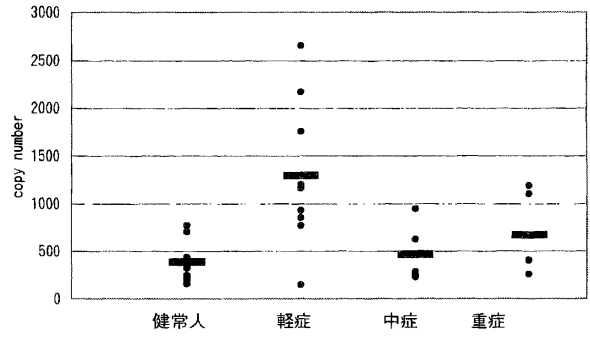
【 図 1 2 】

図 1 2



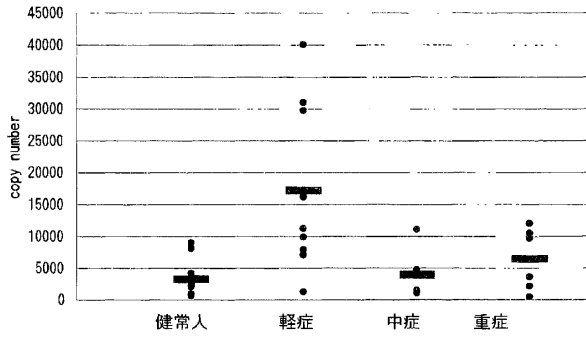
【 図 1 4 】

図 1 4



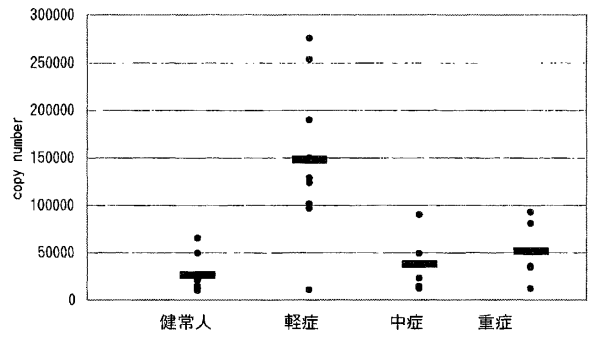
【 図 1 3 】

図 1 3



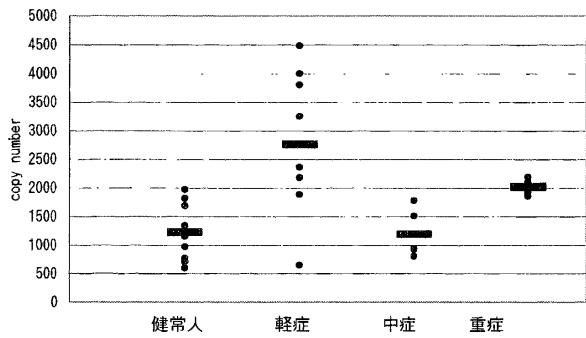
【 図 1 5 】

図 1 5



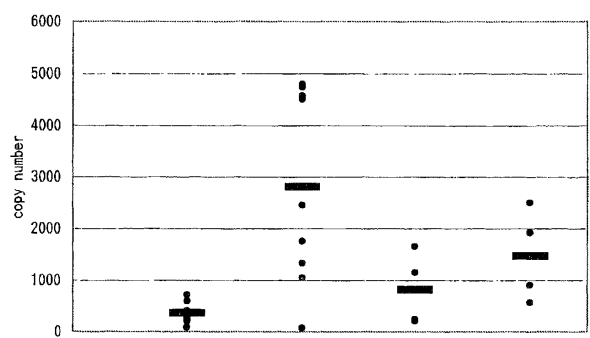
【 図 1 6 】

図 1 6



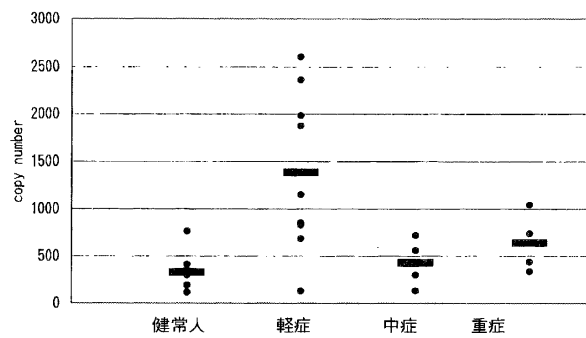
【 図 1 8 】

図 1 8



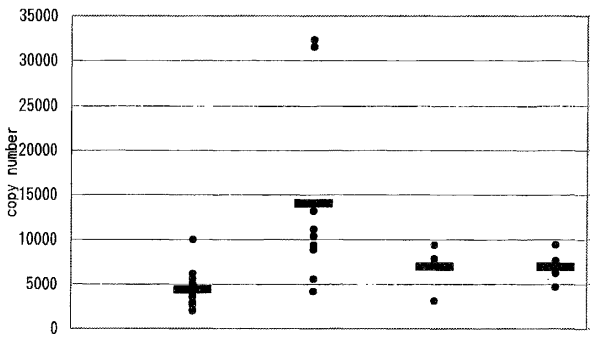
【 図 1 7 】

図 1 7



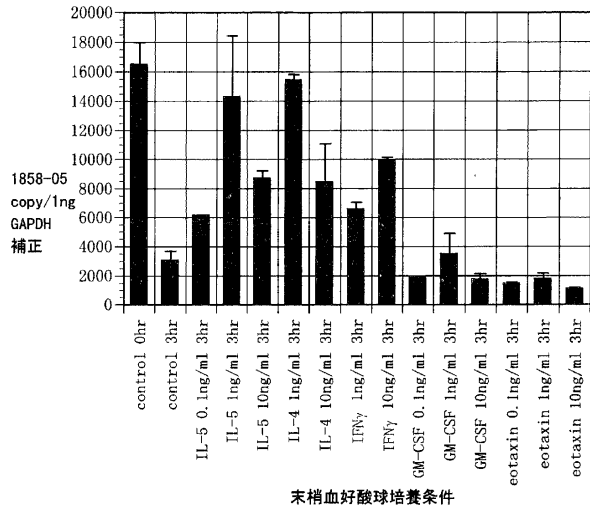
【 図 1 9 】

図 1 9



【 20 】

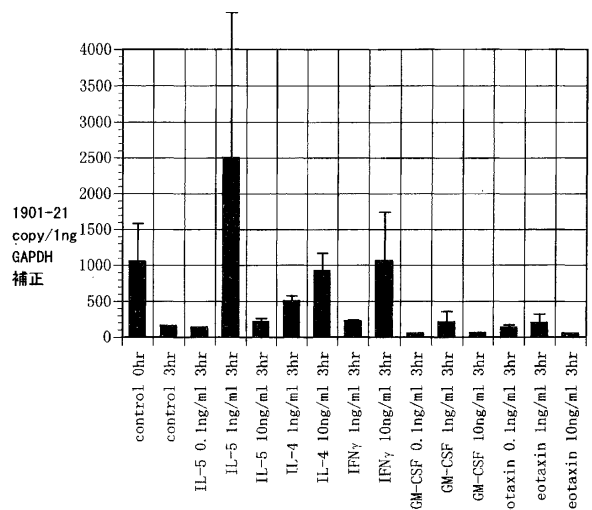
20



末梢血好酸球培養条件

【 21 】

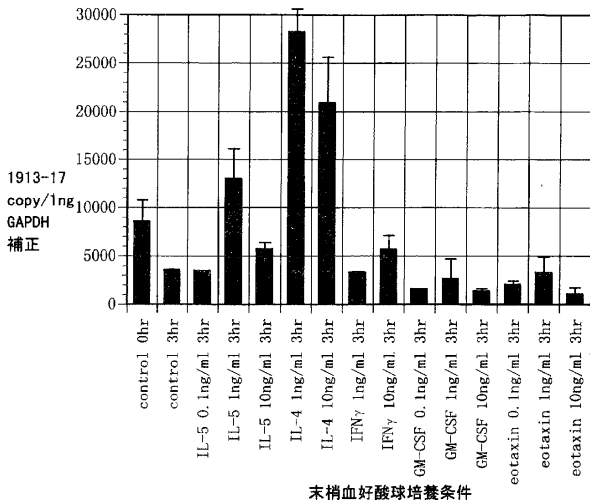
21



末梢血好酸球培養条件

【 22 】

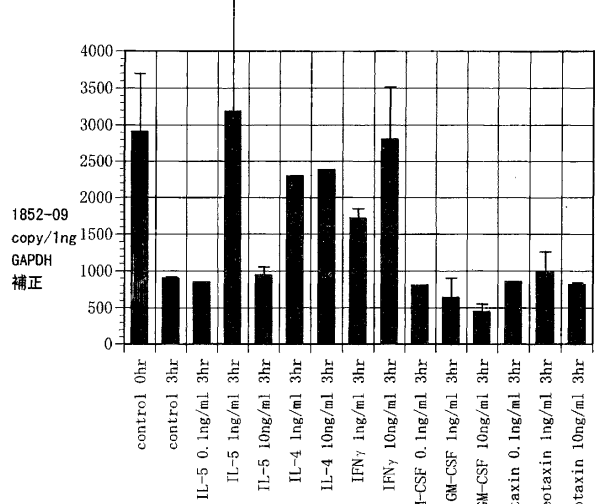
22



末梢血好酸球培養条件

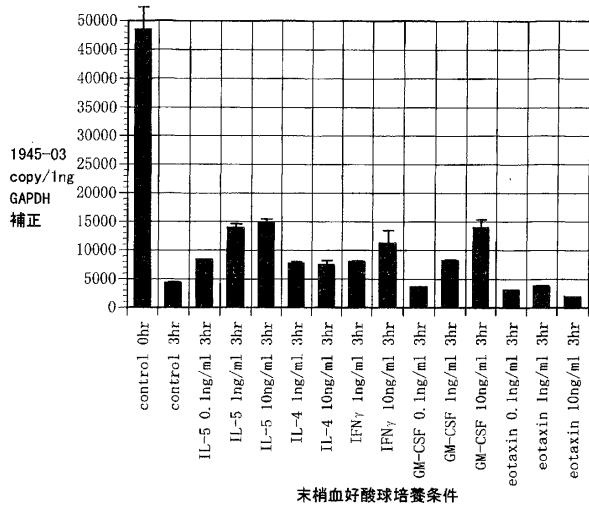
【 23 】

23

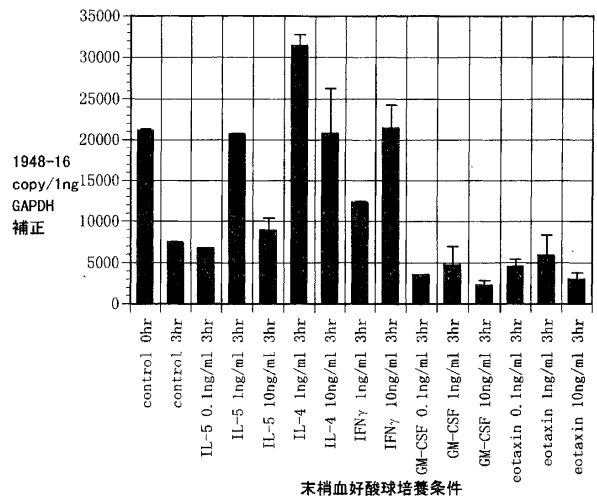


末梢血好酸球培養条件

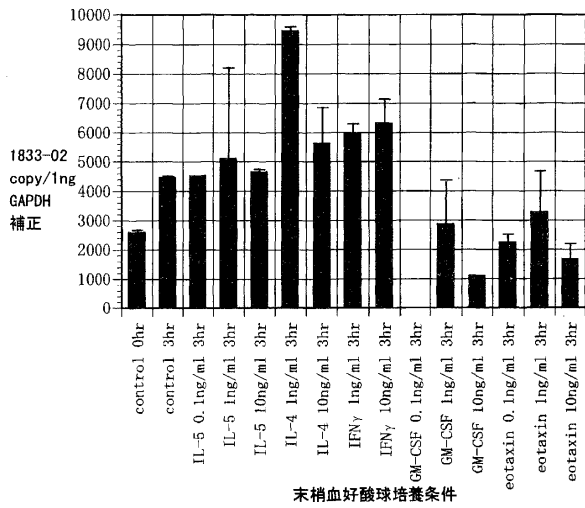
【 2 4 】  
图 2 4



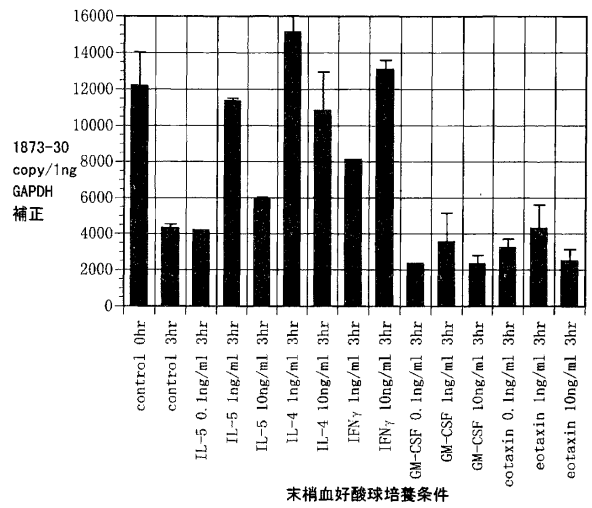
【 2 5 】  
图 2 5



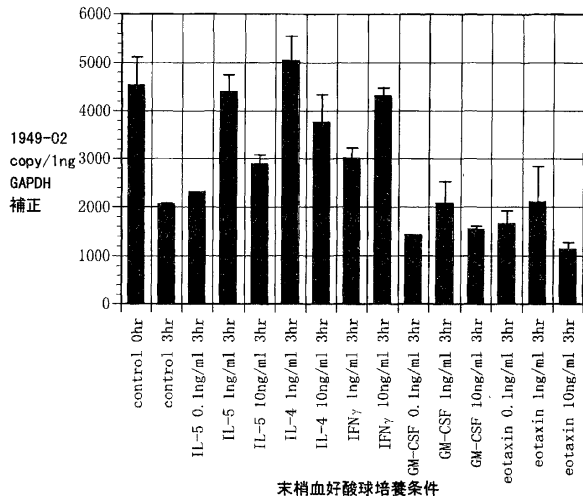
【 2 6 】  
图 2 6



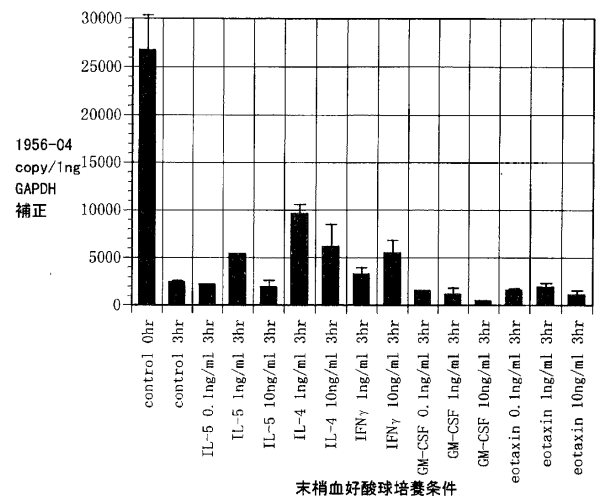
【 2 7 】  
图 2 7



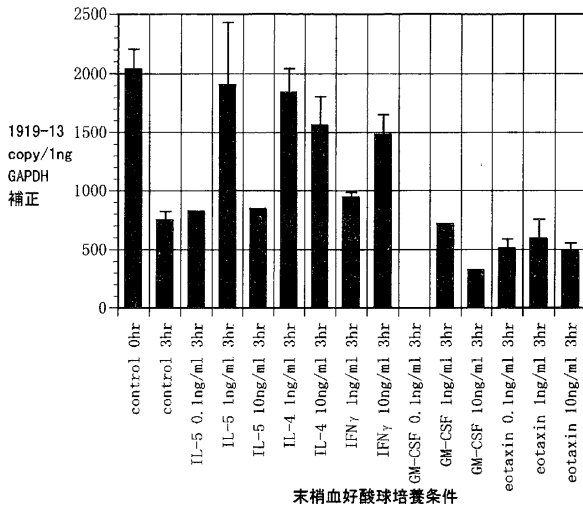
【 28 】  
图 28



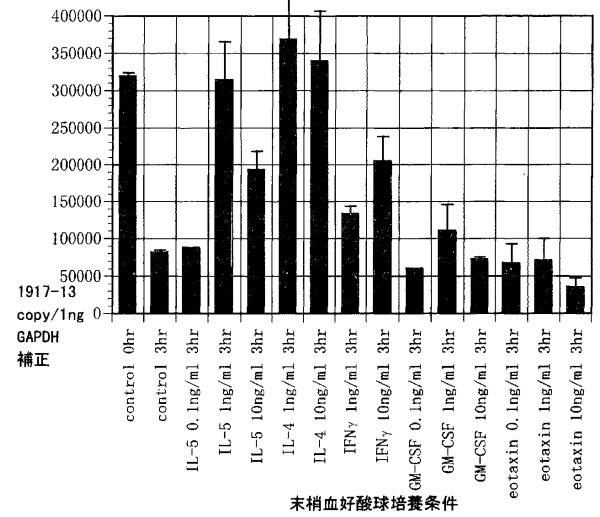
【 29 】  
图 29



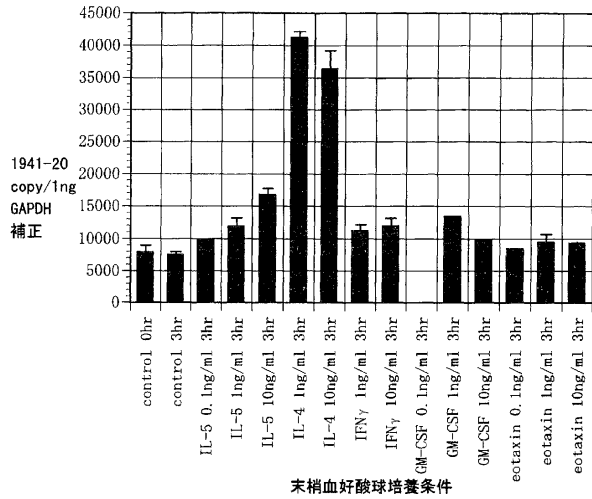
【 30 】  
图 30



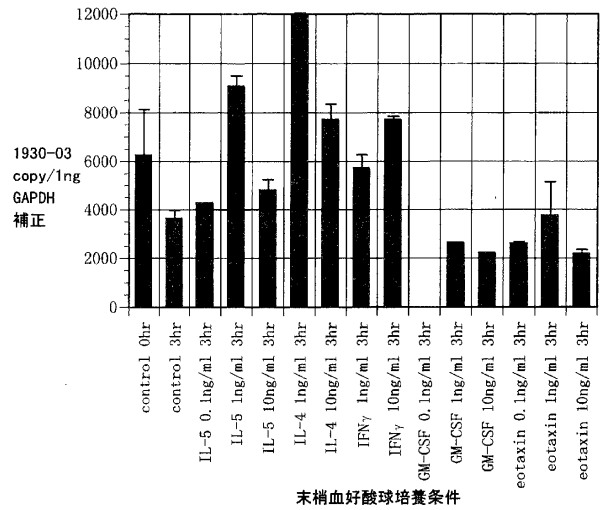
【 31 】  
图 31



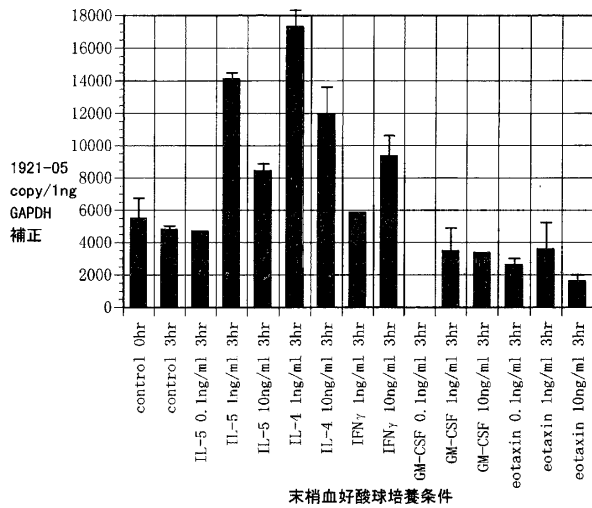
【 図 3 2 】  
図 3 2



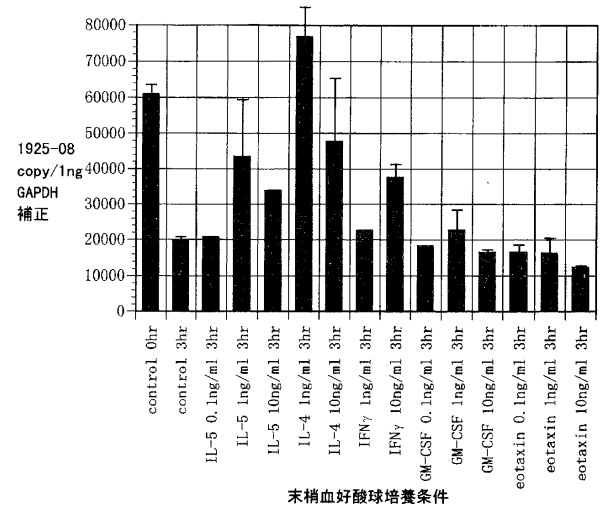
【 図 3 3 】  
図 3 3



【 図 3 4 】  
図 3 4



【 図 3 5 】  
図 3 5



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP01/08574
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. <sup>7</sup> C12N15/09, C12N15/63, C12Q1/68, C12Q1/02, G01N33/53, C12N5/10, A61K39/395, C07K14/47, C07K16/18 // C12P21/02, C12P21/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl. <sup>7</sup> C12N15/09, C12N15/63, C12Q1/68, C12Q1/02, G01N33/53, C12N5/10, A61K39/395, C07K14/47, C07K16/18 // C12P21/02, C12P21/08		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), GeneBank/EMBL/DBI/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Emmanuel Dias NETO et al., "Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags", PNAS, March 28, 2000, Vol.97, No.7, pages 3491 to 3496	1-6, 9-12, 14-27
A	EP 924297 A1 (SmithKline Beecham Corporation), 23 June, 1999 (23.06.99), & JP 11-28095 A	1-6, 9-12, 14-27
A	JP 11-32768 A (Ono Pharmaceutical Co., Ltd.), 09 February, 1999 (09.02.99), (Family: none)	1-6, 9-12, 14-27
A	WO 98/24817 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 11 June, 1998 (11.06.98), & EP 949271 A1	1-6, 9-12, 14-27
A	EP 649910 A1 (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), 26 April, 1995 (26.04.95), & JP 7-194400 A	1-6, 9-12, 14-27
<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 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 "I" 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 considered 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 18 January, 2002 (18.01.02)		Date of mailing of the international search report 29 January, 2002 (29.01.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08574

<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 7-8,13	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
These claims substantially involve methods for treatment of the human body by therapy.	
2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
<p>The inventions as set forth in claims 1 to 27 constitute groups of inventions relating to methods for examining an allergic disease by using oligonucleotides containing the base sequences represented by SEQ ID NOS:1 to 17, proteins obtained by expressing these nucleotides, antibodies against these proteins, etc. Prior to the filing of the present application, however, there had been already known genes relating to allergy concerning eosinophils and detection methods by using the same (see, namely, Japanese Patent Application No. 28095/1999, Japanese Patent Application No. 32768/1999 and International Publication No. 99/24917). Thus, it cannot be recognized that there is a technical relationship involving special technical features among the detection methods with the use of genes relating to allergy concerning eosinophils.</p> <p>Such being the case, these groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.</p>	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	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. <input checked="" type="checkbox"/>	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.:
	Claims 1 to 27 (the parts relating to SEQ ID NO:1)
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

国際調査報告		国際出願番号	PCT/JP01/08574
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. <sup>7</sup> C12N15/09, C12N15/63, C12Q1/68, C12Q1/02, G01N33/53, C12N5/10, A61K39/395, C07K14/47, C07K16/18//C12P21/02, C12P21/08			
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. <sup>7</sup> C12N15/09, C12N15/63, C12Q1/68, C12Q1/02, G01N33/53, C12N5/10, A61K39/395, C07K14/47, C07K16/18//C12P21/02, C12P21/08			
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			
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリ*	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	
A	Emmanuel Dias NETO et al., Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. PNAS, March 28 2000, Vol.97, No.7, p.3491-3496	1-6,9-12, 14-27	
A	EP 924297 A1 (スミスクリライン ビーチャム コーポレーション) 1999.06.23 & JP 11-28095 A	1-6,9-12, 14-27	
A	JP 11-32768 A (小野薬品工業株式会社) 1999.02.09 ファミリーなし	1-6,9-12, 14-27	
<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 の目的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、当業者によって当然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	18.01.02	国際調査報告の発送日	29.01.02
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区浪が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 本間 夏子	4N 9637 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP01/08574
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
A	WO 98/24817 A1 (協和醗酵工業株式会社) 1998. 6. 11 & EP 949271 A1	1-6, 9-12, 14-27
A	EP 649910 A1(住友電気工業株式会社) 1995. 4. 26 & JP 7-194400 A	1-6, 9-12, 14-27

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JPO1/08574
<p>第I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)</p> <p>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。</p>	
<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲 7-8, 13 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、 実質的に人体の治療による処置方法を含むものである。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ 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、</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 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。</p>	
<p>第II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)</p> <p>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の国際調査機関は認めた。</p> <p>請求の範囲 1-27に記載された発明は、配列番号1-17に記載の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを用いたアレルギー性疾患を検査するための方法及びスクリーンングを発現させて得た蛋白それに対する抗体等に関する発明群である。しかしながら、本願出願時好酸球細胞に関わるアレルギーに関連する遺伝子及びそれを用いた検出法は周知であり (要すれば、特開平11-28095号公報、特開平11-32768号公報、国際公開番号98/24817号参照のこと) 。よって好酸球細胞に関わるアレルギーに関連する遺伝子を用いた検出法が特別な技術的特徴を含む技術的な関係にあるとは認められない。</p> <p>よって、各発明群は、単一の一般的発明概念を形成するように関連している一群の発明であるとは認められない。</p> <p>1. <input type="checkbox"/> 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。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 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。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料の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。</p> <p>4. <input checked="" type="checkbox"/> 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。</p> <p style="padding-left: 2em;">請求の範囲 1-27 (配列番号1に係る部分)</p> <p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意</p> <p><input type="checkbox"/> 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。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。</p>	
<p>様式PCT/ISA/210 (第1ページの続き (1)) (1998年7月)</p>	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(72)発明者 橋田 亮一

神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社ジェノックス創薬  
研究所内

(72)発明者 小川 薫

神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社ジェノックス創薬  
研究所内

(72)発明者 大林 正也

東京都町田市旭町3-6-6 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

(72)発明者 長洲 毅志

茨城県つくば市東光台5-1-3 エーザイ株式会社 筑波研究所内

(72)発明者 斎藤 博久

東京都世田谷区太子堂3-35-31 国立成育医療センター研究所内 免疫アレルギー研究部内

(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)	测试过敏性疾病的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2002033069A1</a>	公开(公告)日	2004-02-26
申请号	JP2002536438	申请日	2001-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	杰弗里·诺克斯药物发现研究所 国家中心儿童健康和发展的—般		
申请(专利权)人(译)	杰弗里·诺克斯药物发现研究所有限公司 国家中心儿童健康和发展的—般		
[标]发明人	杉田雄二 橋田亮一 小川薫 大林正也 長洲毅志 斎藤博久		
发明人	杉田 雄二 橋田 亮一 小川 薫 大林 正也 長洲 毅志 斎藤 博久		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 A61K31/711 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P17/00 A61P37/08 C12Q1/6883 C12Q1/6897 C12Q2600/158		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/711 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68. A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2000314093 2000-10-13 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

差异显示方法用于寻找特异性皮炎患者嗜酸性粒细胞中差异表达的基因。结果，在轻度患者的嗜酸性粒细胞中分离到17个表达明显升高的基因。本发明人已经发现这些基因可以用于测试过敏性疾病和筛选治疗药物候选化合物。

Lane	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	14	18	19	24	26	27	28	29
Blood	120	140	19	20	23	24	36	43	69	90	73	92	56	59	30	46	48	51	60
症状	健康人、極軽症						軽症		中症		重症								
病態							○○○○		○○●●		●●●●●●								
喘息							軽軽な軽		ななな軽		ななな軽な								
							し		ししし		しししし								
S IgE	- - - - -						++++		++++		++++								
好酸球	B	B	B	B	B	A	B	C	C	C	C	C	B	C	C	C	C	B	C
T IgE	L	L	L	L	L	L	L	L	L	H	H	L	H	H	L	L	H	H	H