

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 540801

(P2002 - 540801A)

(43)公表日 平成14年12月3日(2002.12.3)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	キーワード ( 参考 )
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/57	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/57		31/7088	4 B 0 2 4
		45/00	4 B 0 6 3
		48/00	4 C 0 8 4
		A 6 1 P 11/00	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全148数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 609606(P2000 - 609606)

(86) (22) 出願日 平成12年3月31日(2000.3.31)

(85) 翻訳文提出日 平成13年10月2日(2001.10.2)

(86) 国際出願番号 PCT/US00/08492

(87) 国際公開番号 W000/60117

(87) 国際公開日 平成12年10月12日(2000.10.12)

(31) 優先権主張番号 09/286, 108

(32) 優先日 平成11年4月2日(1999.4.2)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 インタールーキン ジェネティクス インク

INTERLEUKIN GENETICS, INC.

アメリカ合衆国 02452 マサチューセッツ州 ワルサム ビーバーストリート 135

(72) 発明者 ダフ ゴードン ダブリュ

イギリス サウス ヨークシャー エス10

3ピースー シェフィールド アッシュゲートロード 18

(74) 代理人 弁理士 金久保 勉

最終頁に続く

(54) 【 発明の名称 】 間質性肺疾患の危険性の予測

(57) 【 要約 】

ある被験体が、肺線維症などの間質性肺疾患を有するか、又は発生する可能性があるかどうかを調べる新規な方法であって、 a ) 被験体から核酸試料を得るステップと、 b ) 前記試料中で、 IL-1RN(+2018)対立遺伝子、 TNF-A(-308)対立遺伝子2、又は、 IL-1RN(+2018)対立遺伝子2もしくはTNF-A(-308)対立遺伝子2に対して連鎖不均衡にある対立遺伝子を検出するステップであって、前記 IL-1RN(+2018)対立遺伝子2、 TNF-A(-308)対立遺伝子2、又は、 IL-1RN(+2018)対立遺伝子2に対して連鎖不均衡にある対立遺伝子の検出は、前記患者がILDを有する又は発生素因を有することを示す、ステップからなる被験体が間質性肺疾患を有するか又は発生素因があるかを判定する。及びそのキットや、ILDを処置する方法、新規なILD治療薬を同定するためのスクリーニングアッセイを提供する。

ヒト IL-1A遺伝子の DNA 配列 (ジェンバンク登録番号 No. X08858)

```

-1437  AGGCTCTAC  CCTAGCTGG  TGCTACACIT  ACATTCGTTA  CATCOAAGTG  TGGTATTTTC
-1377  TGTGGCTCTC  GATTAACACT  TTTAGACAC  AGGCTCTATA  CCGAGGAGTG  TAGACTGGCA
-1317  TTAATCAGA  ATAGAGATT  TGGACCTGC  AATAGACCTT  ATAGACCTTA  ACCAACCCCA
-1257  TTAATTACAA  TTAACACAGA  ACAGAGGAA  TACTTTATCC  AACTACACA  AGCTGTTTTC
-1197  CTCCGAGATC  GATGCTTTT  TGCTTTTAT  ATTTTTAAA  GATGGGGCT  TGACTATGTT
-1137  GCGCACACTG  GACTAAACT  CTGGCCCTCA  AGTATATGTC  CTGGCTGAG  CTCCGATAA
-1077  GCTGGACATA  CAGGGGATG  CCATCACCC  TAGTCAATC  CCTCATMTA  AATATACAT
-1017  GCTTTAACT  CCACTGGA  ACCAARACA  TCTATTGCT  AAGAGCTGG  TTTCTACCA
-957  CCGTAGCTG  GCTGGGACA  GGAATATTA  AAGCTAGAA  ATTCTTTAT  AATATGACC
-897  AGGCAACTC  ATTGAGGCT  CATATGAAA  AATCCATGC  TTCTTTTCC  CCAATCCCA
-837  TCCCAAACT  TAGCACTGG  TTCTGGCTA  GGCTTAGGC  ATACCTCCG  GGGTTGAC
-777  AGACTTCTT  CTAGAGAGA  CACACTTGG  GCTATCTTA  CAGAGACCA  GGCTTCTCT
-717  TGTCTCTGG  TAGAGGCTA  CTTTACGTA  ACAGGGCAG  GGTGGAGAT  TCTCTCGTA
-657  AGCTCCATCC  CTTCTATGG  AATATGTTG  ACATATTTCA  GAGAGTAG  AGATCAAGA
-597  CTCTCTGG  CTCAATACC  ACTGTCTCT  TCTTACCTT  GCCTTACCA  GGAGCTTGT
-537  ACCCAAACT  CTGGGATCT  TTTCTCTTA  ATCGAGAAA  CTTCTCTCT  CAGATAGAT
-477  GGCTCATCT  CCTCAAAAG  TTGCCAAGG  CTGCCAATA  TTCTGCAAT  TCACCCTGA
-417  GCACATCAA  CAATTCAG  CAGAACACA  CTACACTAC  TATTAGACT  ATTATATTA
-357  ATAAATCTT  CTCAAACT  AGCCCTTGA  CTGCAATTT  GAGATTTCT  CCTTCTCC
-297  TAGAACTTG  ATAACTTCC  GCGCTCCCC  TTTTCTAAG  ACTAGATGT  TGTATCTTA
-237  TAAAGCAAG  GGTGAATAA  ATGACAAA  TCAATACTT  CTGATATC  TGCACAC
-177  AATATATCA  GCTATCCAT  CTTTCCAT  TTTAGCAT  ATCGATTTA  ATGACATAG
-117  AATATATCA  ACTGAACTT  TCCCTGATA  ATCCCTCT  TTAGGAGCC  ACTTTAGCC
-57  ACCTAGCCAC  GCTACTTAA  GACATTTCA  AAGGCGAAG  AAGCTAGCT  CAGGCTTAG
4  CTCACGCA  GAGGGGAGT  CATTTCATG  GCGTTGAGT  CAGCAAGGT  ATTTCTTCA
64  CACTCTGG  TATTAAATA  TTTTCTGTT  TTTTCTTCT  CTGTGCGTT  TTTCTTAC
124  ATTGCTTCT  CTAGACTTC  AGTCTCCCT  TCTTTTCTT  GTTCCCTCT  GGTGTGGAT
184  GTGACTTGA  ATTACATCA  GATTTCAGA  AATGATCTC  TCAATTTCT  GATATGACT
244  GATTCGTTT  ACTGAGGAC  GCGAGACTA  GTTCTTAGT  AGGCGATGG  TGATATCAC
304  TGGGCTTCT  CAGTGGGG  AATCTGACT  ATGCAAAAT  ATTTGAGAA  ATTTGAAAT
364  TCCAGCTCT  GTCTCTCT  TACTCTGTG  TANGGAAAT  ACCTATCTC  TGNSGTGTT
424  TTGTACTCT  TCAACTTCT  CATTATATA  ATGCTCTTC  TGGCAATCA  TTAGSTTGG
484  CACTATAGA  ATTCACACT  AATTAACA  TTTCAAGA  ACTTACACT  CTGATAGAG
544  AGACAGTAC  ATGCAACT  ATTTCAAGG  AGCTGAGAA  TGGGAAAT  GCTGATGTG
604  GACTAATCA  TCAACAAG  TTTCAAGA  GCAACAAG  GAGGGCTCC  CCTCACAGT
664  ATCTGATTA  GAGCTGCT  GACTGATGG  TGGCTGTTT  TCTCTGTTC  AGAGTCAAG
724  ATGCAAGT  TTTGAGGCT  GTTGAAGC  CTGAGACT  GTTGAAGTA  AGATATAGA
784  TTTATCTCT  TGTATTAAT  GAGGTTTCA  AGGTAACA  GRATCACT  AGGCAATCA
844  GTGACGACA  TGGGGGAG  CCGCAGAG  TTGAGAGAT  GTGATCTAT  CTGAGTCA
904  GAGCTGCTC  AGGAGAGC  GAGAAACT  AGCTTAGG  CTTTACACT  CTGATATCA
964  TGGCGAGGA  GAGCGCAT  TTGAAAAAT  TATTTTAG  GCTCTGAG  CCTACATGA
1024  ATATCACT  CACTTAGC  ACAGCTCT  TTGAGTAC  ATGCGTAT  ATAGAAATG
1084  GTTTACTGG  TCCATCTCA  GAAACCTG  ATCTATTA  GAGACAGAA  ATGGTCCAC
1144  AGGACTGCT  GCTGTGAC  TCACTAGC  AGGAACTC  CACTGATG  TGAATAGG
1204  GTAAATGAC  ACAAAGATA  AATTCAGAA  CATATTAAC  TAACAATG  TTTCTATAT
1264  CTTAGTAAA  TACTAACCA  ACTAGGCT  TCAAAATTT  GCTGATAT  TTTACTAGT
1324  ATAAATAG  AATCTGTT  TGTGAACT  ATGAAATTA  TCTTACACT  ATAT  CTAAT
1384  TGGTAAAT  AAAAAAG  TCTCTAAA  CTTCTTCTT  CTTGAGAA  GCTTAACTT
1444  CTTCCGAAA  CTTCAATTA  AGCTCTCAA  TTTTATGAC  AAGTCAAT  TTTACAGATA
1504  AAGCAGAT  AAGCTCAA  GCTCTCTTA  ATGACTACTA  ATTCAGAT  AGTAAGAT

```

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 a) 被験体から核酸試料を得るステップと、

b) 前記試料中で、IL-1RN(+2018)対立遺伝子、TNF-A(-308)対立遺伝子2、又は、IL-1RN(+2018)対立遺伝子2もしくはTNF-1(-308)対立遺伝子2に対して連鎖不均衡にある対立遺伝子を検出するステップであって、前記IL-1RN(+2018)対立遺伝子2、TNF-A(-308)対立遺伝子2、又は、IL-1RN(+2018)対立遺伝子2に対して連鎖不均衡にある対立遺伝子の検出は、前記患者がILDを有する又は発生素因を有することを示す、ステップと

を含む、被験体が間質性肺疾患を有するか又は発生素因があるかを判定する方法

。

【請求項2】 前記間質性肺疾患が間質性肺炎である、請求項1に記載の方法

。

【請求項3】 前記間質性肺疾患が肺線維症である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記検出するステップが、

a) 対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、

b) サイズ分析、

c) 配列決定、

d) ハイブリダイゼーション、

e) 5'端ヌクレアーゼ消化、

f) 一本鎖コンホメーション多型、

g) 対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション、

h) プライマ特異的伸長法、及び

j) オリゴヌクレオチド連結アッセイ

からなる群のうちのいずれかから選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記検出するステップの前に、前記核酸試料に対して増幅ステップを行う、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 前記増幅ステップが、SEQ ID N01乃至SEQ ID N012、SEQ ID N015、16、19又は20からなる群のうちのいずれかから選択されるプライマを利用する、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 前記サイズ分析が、制限酵素による消化の前に行われる、請求項4に記載の方法。

【請求項8】 前記制限酵素による消化が、Nco I、Alu I及びMsp Iからなる群のうちのいずれかから選択される制限酵素を用いる、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 間質性肺疾患に関連する対立遺伝子を同定する方法であって、IL-1RN(+2018)対立遺伝子2又はTNF-A(-308)対立遺伝子2に対して連鎖不均衡にある対立遺伝子を同定するステップを含む、方法。

【請求項10】 被験体に間質性肺疾患が発生する易罹患性を判定するキットであって、IL-1RN(+2018)対立遺伝子、TNF-A(-308)対立遺伝子、又は、IL-1RN(+2018)対立遺伝子もしくはTNF-A(-308)対立遺伝子に対して連鎖不均衡にある対立遺伝子に、5'側又は3'側でハイブリダイズする第一プライマオリゴヌクレオチドを含む、キット。

【請求項11】 IL-1RN(+2018)対立遺伝子に対して連鎖不均衡にある前記対立遺伝子がIL-1RN(VNTR)である、請求項10に記載のキット。

【請求項12】 前記第一プライマが5'側でハイブリダイズする場合には、IL-1RN(+2018)対立遺伝子、又は、IL-1RN(+2018)対立遺伝子に対して連鎖不均衡にある対立遺伝子、に3'側でハイブリダイズし、

前記第一プライマが3'側でハイブリダイズする場合には、IL-1RN(+2018)対立遺伝子、又は、IL-1RN(+2018)対立遺伝子に対して連鎖不均衡にある対立遺伝子、に5'側でハイブリダイズする第二プライマオリゴヌクレオチドをさらに含む、請求項10に記載のキット。

【請求項13】 前記第一プライマ及び前記第二プライマが、約50から1000個の範囲の間の塩基対の領域にハイブリダイズする、請求項12に記載のキット。

【請求項14】 前記一個又は複数のプライマが、SEQ ID N01乃至SEQ ID N012、SEQ ID N015、16、19又は20からなる群のうちのいずれかから選択される、請求項10又は12に記載のキット。

【請求項15】 前記間質性肺疾患が、間質性肺炎からなる群のうちのいずれかから選択される、請求項10に記載のキット。

【請求項16】 前記間質性肺疾患が肺線維症である、請求項15に記載のキット。

【請求項17】 検出手段をさらに含む、請求項10に記載のキット。

【請求項18】 前記検出手段が、

- a) 対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、
- b) サイズ分析、
- c) 配列決定、
- d) ハイブリダイゼーション、
- e) 5'端ヌクレアーゼ消化、
- f) 一本鎖コンホメーション多型、
- g) 対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション、
- h) プライマ特異的伸長法、及び
- j) オリゴヌクレオチド連結アッセイ

からなる群のうちのいずれかから選択される、請求項17に記載のキット。

【請求項19】 増幅手段をさらに含む、請求項10に記載のキット。

【請求項20】 コントロールをさらに含む、請求項10に記載のキット。

【請求項21】 間質性肺疾患を有する個人に投与するのに適した治療薬を選択する方法であって、前記個人のIL-1又はTNF-A遺伝子型を調べることで、前記被験体がILD関連対立遺伝子を含むかどうかを判定するステップと、前記多型に対して連鎖不均衡にあるILD原因機能的変異を補償する治療薬を選択するステップとを含む、方法。

【請求項22】 前記間質性肺疾患が、間質性肺炎である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 前記間質性肺疾患が肺線維症である、請求項21に記載の方法。

【請求項24】 前記遺伝子型を調べる方法が、

- a) 対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、
- b) サイズ分析、
- c) 配列決定、

- d) ハイブリダイゼーション、
- e) 5' 端ヌクレアーゼ消化、
- f) 一本鎖コンホメーション多型、
- g) 対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション、
- h) プライマ特異的伸長法、及び
- j) オリゴヌクレオチド連結アッセイ

からなる群のうちのいずれかから選択される、請求項21に記載の方法。

【請求項25】 前記遺伝子型を調べるステップの前に、前記核酸試料に対して増幅ステップを行う、請求項21に記載の方法。

【請求項26】 前記増幅ステップが、SEQ ID N01乃至SEQ ID N012、SEQ ID N015、16、19又は20からなる群のうちのいずれかから選択されるプライマを利用する、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 前記サイズ分析が、制限酵素による消化の前に行われる、請求項24に記載の方法。

【請求項28】 前記制限酵素による消化が、Nco I、Alu I及びMsp Iからなる群のうちのいずれかから選択される制限酵素を用いる、請求項27に記載の方法。

【請求項29】 前記治療薬が、コルチコステロイド、代謝拮抗物質、細胞毒、コルヒチン、又は抗サイトカインからなる群のうちのいずれかから選択される、請求項21に記載の方法。

【請求項30】 前記治療薬が、IL-1又はTNF 活性のモジュレータからなる群のうちのいずれかから選択される、請求項21に記載の方法。

【請求項31】 前記IL-1がIL-1 である、請求項30に記載の方法。

【請求項32】 前記IL-1がIL-1 である、請求項30に記載の方法。

【請求項33】 前記IL-1がIL-1Raである、請求項30に記載の方法。

【請求項34】 前記治療薬が、タンパク質、ペプチド、ペプチドミメティック、低分子又は核酸である、請求項30に記載の方法。

【請求項35】 前記モジュレータがアゴニストである、請求項30に記載の方法。

【請求項36】 前記モジュレータがアンタゴニストである、請求項30に記載の方法。

【請求項37】 前記ILD関連対立遺伝子が、IL-1RN(+2018)対立遺伝子2、TNF-A(-308)対立遺伝子2、又は、IL-1RN(+2018)対立遺伝子2もしくはTNF-A(-308)対立遺伝子2に対して連鎖不均衡にある対立遺伝子である、請求項21に記載の方法。

【請求項38】 前記ILD原因機能的変異が、IL-1B(+6912)対立遺伝子2、IL-1b(-511)又はIL-1RN(+2018)である請求項21に記載の方法。

【請求項39】 ILD被験体を特定の用量の特定の治療薬によって処置する効果を判定する方法であって、

(a) 被験体から採取した試料中で、IL-1もしくはTNF タンパク質のレベル、量もしくは活性を、又は、IL-1もしくはTNF-A mRNAもしくはDNAのレベル、量もしくは活性を、検出するステップと、

(b) 前記特定の用量の前記特定の治療薬を被験体に投与し；被験体から採取した試料中で、IL-1又はTNF タンパク質の、あるいは、IL-1もしくはTNF-A mRNA又はDNAのレベル、量又は活性を検出するステップと、

(c) ステップ(a)で得られた相対的レベル、量又は活性を、ステップ(b)で得られたレベル、量又は活性と比較するステップとを含む、方法。

【請求項40】 前記治療薬が、コルチコステロイド、代謝拮抗物質、細胞毒、コルヒチン、又は抗サイトカインからなる群のうちのいずれかから選択される、請求項39に記載の方法。

【請求項41】 前記治療薬が、IL-1又はTNF 活性のモジュレータからなる群のうちのいずれかから選択される、請求項39に記載の方法。

【請求項42】 前記IL-1がIL-1 である、請求項41に記載の方法。

【請求項43】 前記IL-1がIL-1 である、請求項41に記載の方法。

【請求項44】 前記IL-1がIL-1Raである、請求項41に記載の方法。

【請求項45】 前記治療薬が、タンパク質、ペプチド、ペプチドミメティック、低分子又は核酸である、請求項41に記載の方法。

【請求項46】 前記モジュレータがアゴニストである、請求項41に記載の方法。

【請求項47】 前記モジュレータがアンタゴニストである、請求項41に記載の方法。

【請求項48】 間質性肺疾患を有する被験体を処置する方法であって、個人のIL-1又はTNF-A遺伝子型を調べて、ILD関連対立遺伝子の存在を判定するステップと、

多型に対して連鎖不均衡にあるILD原因変異を補償する治療薬を被験体に投与するステップとを含む、方法。

【請求項49】 前記間質性肺疾患が間質性肺炎である、請求項48に記載の方法。

【請求項50】 前記間質性肺疾患が肺線維症である、請求項48に記載の方法。

【請求項51】 前記遺伝子型を調べる方法が、

- a) 対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、
- b) サイズ分析、
- c) 配列決定、
- d) ハイブリダイゼーション、
- e) 5'端ヌクレアーゼ消化、
- f) 一本鎖コンホメーション多型、
- g) 対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション、
- h) プライマ特異的伸長法、及び
- j) オリゴヌクレオチド連結アッセイ

からなる群のうちのいずれかから選択される、請求項48に記載の方法。

【請求項52】 遺伝子型を調べる前記ステップの前に、前記核酸試料に増幅ステップを行う、請求項48に記載の方法。

【請求項53】 前記増幅ステップが、SEQ ID N01乃至SEQ ID N012、SEQ ID N015、16、19又は20からなる群のうちのいずれかから選択されるプライマを利用

する、請求項52に記載の方法。

【請求項54】 前記サイズ分析が、制限酵素による消化の前に行われる、請求項52に記載の方法。

【請求項55】 前記制限酵素による消化が、Nco I、Alu I及びMsp Iからなる群のうちのいずれかから選択される制限酵素を用いる、請求項54に記載の方法。

【請求項56】 前記治療薬が、コルチコステロイド、代謝拮抗物質、細胞毒、コルヒチン、又は抗サイトカインからなる群のうちのいずれかから選択される、請求項48に記載の方法。

【請求項57】 前記治療薬が、IL-1又はTNF 活性のモジュレータからなる群のうちのいずれかから選択される、請求項48に記載の方法。

【請求項58】 前記IL-1がIL-1 である、請求項57に記載の方法。

【請求項59】 前記IL-1がIL-1 である、請求項57に記載の方法。

【請求項60】 前記IL-1がIL-1Raである、請求項57に記載の方法。

【請求項61】 前記治療薬が、タンパク質、ペプチド、ペプチドミメティック、低分子又は核酸である、請求項57に記載の方法。

【請求項62】 前記モジュレータがアゴニストである、請求項57に記載の方法。

【請求項63】 前記モジュレータがアンタゴニストである、請求項57に記載の方法。

【請求項64】 前記ILD関連対立遺伝子が、IL-1RN(+2018)対立遺伝子2、TNF-A(-308)対立遺伝子2、又は、IL-1RN(+2018)対立遺伝子2もしくはTNF-A(-308)対立遺伝子2に対して連鎖不均衡にある対立遺伝子である、請求項48に記載の方法。

【請求項65】 前記ILD原因機能的変異が、IL-1B(+6912)対立遺伝子2、IL-1b(-511)又はIL-1RN(+2018)である、請求項48に記載の方法。

【請求項66】 ILD治療薬をスクリーニングする方法であって、

a) IL-1もしくはTNF- ポリペプチド又はこれらの生物活性断片、IL-1又はTNF- 結合相手、及び、テスト化合物を、前記IL-1又はTNF- タンパク質、及び、

前記IL-1又はTNF- 結合相手が、前記テスト化合物がなければ相互作用できるような条件下で配合するステップと、

b) 前記テスト化合物の存在下で、IL-1又はTNF- タンパク質 / IL-1又はTNF- 結合相手の複合体が形成される程度を検出するステップであって、

前記化合物の不在下に対して前記化合物の存在下でアゴニストにより形成された複合体の量の増加、又は、前記化合物の不在下に対して前記化合物の存在下でアンタゴニストにより形成された複合体の量の減少は、前記化合物がILD治療薬であることを示す、ステップと

を含む、方法。

【請求項67】 前記アゴニスト又はアンタゴニストが、タンパク質、ペプチド、ペプチドミメティック、低分子又は核酸からなる群のうちのいずれかから選択される、請求項66に記載の方法。

【請求項68】 前記核酸が、アンチセンス、リボ酵素、及び、三重鎖核酸からなる群のうちのいずれかから選択される、請求項67に記載の方法。

【請求項69】 前記化合物から薬剤組成を調製するステップをさらに含む、請求項66に記載の方法。

【請求項70】 前記IL-1がIL-1 である、請求項66に記載の方法。

【請求項71】 前記IL-1がIL-1 である、請求項66に記載の方法。

【請求項72】 前記IL-1がIL-1Raである、請求項66に記載の方法。

【請求項73】 ILD治療薬を同定する方法であって、

(a) 適した量の候補化合物を、IL-1又はTNF-A遺伝子を発現する細胞又は細胞抽出物に接触させるステップと、

(b) その結果生じるタンパク質の生物活性を調べるステップであって、

前記化合物の不在下での前記生物活性に比較したときの前記化合物の存在下での、アゴニスト生物活性の減少、又は、アンタゴニスト生物活性の減少、は、前記候補がILD治療薬であることを示す、ステップと  
を含む、方法。

【請求項74】 前記モジュレータが、IL-1 、IL-1 、又はTNF 生物活性のアンタゴニストである、請求項73に記載の方法。

【請求項75】 前記モジュレータが、IL-1Ra生物活性のアゴニストである、請求項73に記載の方法。

【請求項76】 ステップ(b)において、前記タンパク質生物活性が、IL-1又はTNF-A遺伝子の発現レベルを調べることにより調べられる、請求項73に記載の方法。

【請求項77】 前記発現レベルが、IL-1又はTNF-A遺伝子から転写されるmRNAの量を検出することにより調べられる、請求項73に記載の方法。

【請求項78】 前記発現レベルが、生成されるIL-1又はTNF-A遺伝子産物の量を検出することにより調べられる、請求項73に記載の方法。

【請求項79】 前記発現レベルが、免疫検出アッセイで抗IL-1又はTNF-A抗体を用いて調べられる、請求項73に記載の方法。

【請求項80】 前記化合物から薬剤組成を調製するステップをさらに含む、請求項73に記載の方法。

【請求項81】 前記細胞が動物内に含まれている、請求項73に記載の方法。

【請求項82】 前記動物がトランスジェニックである、請求項81に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

## 発明の背景

## 間質性肺疾患及び突発性肺線維症

間質性肺疾患（ILD）は、線維形成及び炎症を特徴とする公知及び未知の病因の両方の異常に用いられる幅広い用語である。ILDの代表的な公知の病因には、職業上の暴露（珪肺症、石綿肺、ベリリウム症、炭坑作業者の塵肺症及び硬金属じん肺症）、感染性暴露（真菌症及びウイルス後症候群）、全身性リウマチ疾患（リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、全身性硬化症、皮膚筋炎／多発性筋炎、混合型結合組織病及び強直性脊椎炎）及びその他様々な原因（薬剤誘発性肺炎、酸素毒性、放射線暴露、過敏性肺炎及びARDS後遺症）がある。未知の病因の線維性／炎症性間質性肺疾患は突発性肺線維症（IPF）と呼ばれる。

**【0002】**

IPFが初めて記述されたのは1944年、ハンマン及びリッチによってであり、このとき、現在ではIPFの一種であると考えられる症状を発症した一群の患者が紹介された（Hamman and Rich, "Acute diffuse interstitial fibrosis of the lungs," Bull. Johns Hopkins Hosp. 74:177-206, 1944）。しばらくの間、ハンマン - リッチ症候群という用語はあらゆる症例のIPFを指すのに用いられていたが、より最近の用例では、急速に進行して下降経路を辿り、しばしば急性に悪化して死に至るような症例のIPFに控えられている。今日では、この症候群は急性間質性肺炎（AIP）と呼ばれるのが普通である。過去数年、その他の名称がIPFに提案されており、その中には例えば原因不明の線維性肺胞炎、びまん性間質性肺疾患及び間質性肺線維症がある。これらの用語はIPFの同義語として医学文献中に見られるであろうが、いくつかは個々の違いがある。IPFでは二つの別個の下位カテゴリが認識されている。通常型間質性肺炎（UIP）及び剥離性間質性肺炎（DIP）である。

**【0003】**

IPFでは100,000人当たり3から5人の有病率がある。このように、未知の病因

のILDの原因としてはサルコイドーシスに次いで二番目である。この疾患には地域的なばらつきがあり、例えばアメリカ南西部においては有病率が高いことが判明している。ニューメキシコでは、全ILDのうちの約45%の原因がIPFであった。部検研究によれば、臨床上的症状がないまま、解剖学的には存在することは、IPFにはよくある。IPFの原因はもちろん、不明である。寄与する因子が明らかにされてきており、その中には有機塵への暴露、先行するウィルス疾患、及び喫煙がある。喫煙は、さらに、組織学的にはDIPに似た実体であり、線維症につながることもある肺細気管支炎を引き起こす場合がある。

#### 【0004】

IPFの症状は、典型的には、患者が医学的注意を探すようになる一、二年前に顕性となる。この疾患は通常、進行性のものであり、初期症状も時間と共に悪化する。症状が現れると、患者は静止時にも呼吸困難となる場合があり、この呼吸困難は労作時に悪化し、たんの出ない咳を伴う。全身の倦怠感及び体重減少という症状も見られることもある。個別のリウマチ学的疾患がない場合でも関節痛などのリウマチ的症状が伴うこともある。身体検査による所見には、一般に、頻呼吸、運動誘発性のチアノーゼ及び二基底性の、細かな、遅い吸気のパチパチ音が含まれる。これらのパチパチ音は胸膜下の線維形成に関連すると考えられるが、気道壁からの振動も関与しているかも知れない。呼吸困難及び身体活動の制限は、患者の身体評価の一部として定量してもよい。呼吸困難は肺のコンプライアンスの低下及び呼吸の弾性仕事量の増加が原因であると考えられる。肺高血圧症又はさらに肺性心を発症したころには、患者の肺疾患がかなり進行した状態にあることもある。患者が医学的評価を受けるころには、肺及び肺血管系の解剖学的変化は非可逆的になっている場合もある。

#### 【0005】

典型的にはIPF患者は中年であり、女性よりは幾分男性の方が多い。病因が何ら特定されない症状が突然現れたら、それはAIP又はハンマン-リッチ症候群を示している。AIP患者は比較的若年であり、小児が含まれていることもある。この疾患の予後は良くないが、生き延びる患者に全く肺残留物がないこともある。急性の発症のもう一つの症候群は器質性肺炎を伴う閉塞性細気管支炎（BOOP）

である。この疾患には、末梢気道及び隣接する肺実質の損傷が伴うが、予後は良好な傾向にある。

#### 【0006】

患者の現在の病状及び身体検査の経歴では、必ずしも、IPFをその他のILDから区別できない。残念ながら、IPFは除外診断法である。職業上の暴露を含め、過去の治療歴があると、患者のILD症状をその他の原因を特定するのに役立つかも知れない。様々な表現率を持つ常染色体優性であると考えられる家族型のIPFが解説されている (Bitterman et al., "Familial IPF: evidence of lung inflammation in unaffected family members," N. Engl. J. Med. 314:1343-1347, 1986)。症候性患者の更なる評価には検査室での検査が必要である。いくつか異なる種類の診断テストが現在可能である。肺機能テスト、X線検査、細気管支肺胞洗浄法及び肺生検である。今日までのところ、IPFの診断をはっきりと行える非侵襲的な診断様式は存在しない。

#### 【0007】

IPF患者の検査室での検査は、動脈血ガス (ABG) 及び肺機能テスト (PFT) を含め、肺機能の測定で始めることがある。IPFの場合、PFTの結果、ガス交換 (一酸化炭素の一回呼吸拡散能力 ( $D_LCO$ ) により測定される) の損失と、拘束性肺損失の両方が、肺容積の減少及び弾性反跳の増加を伴って見られる。動脈性低酸素血症がABGにみとめられ、これは換気対血流の不適合によって最もよく説明され、拡散性異常で増悪する。これらのテスト結果は、全範囲の炎症性/線維性肺障害に合致するものであり、IPFを特異的に識別するものではない。血清及び尿の生化学的検査では、その他の病因を除外する限りにおいて、IPFのワークアップでは有用性に限りがある傾向がある。

#### 【0008】

採られている放射線学的研究には、単純な胸部X線 (CXR) 及びCTスキャンがある。CXRで異常が見られた場合には、最も特徴的な所見は、当該疾患が進行するにつれ蜂の巣状に進行する可能性のある、顕著な二基底性の、網様又は細網様小結節性の浸潤巣である。しかしながら、有意な疾患を持つ患者の10%で何らCXRで異常が示されない。CTスキャンはIPFの評価においてCXRよりも優れている

と考えられる。IPFにおけるCTスキャンの診断状の精度の限界が認識されている。例えば、この疾患のびまん性パッチ形成性はCTスキャンでは見逃されることがある。さらに、CTスキャンでは初期のIPFが見逃される場合がある。ガリウムスキャン、MRI及びPETスキャンを含め、その他の技術が、IPFを診断するために採られてきたが、顕著な成功は収められていない。

#### 【0009】

細気管支肺胞洗浄法（BAL）が、細気管支肺胞樹から流体を採集するために行われており、この流体を、細胞要素、病原体及び分泌タンパク質について分析することができる。この技術には、第三又は第四次気管支に埋め込まれた可撓性の気管支鏡を通じて、生理食塩水を細気管支肺胞樹に点滴注入することが含まれる。次に、回収されたこの流体を分析する。今なおこれは、大半の権威によって、立証された臨床上の実用性を持つ診断方法というよりは検査器具としてみなされている。しかしながら、その炎症性物質の発見が、進行性の肺の炎症のその他の徴候と相関関係にありながら、この技術は標準化されていない。特定の患者については、治療に対する応答を監視したり、又は予後を予測するために連続的なBALをその後行うこともあるが、その全体的な診断上の精度は疑わしい。

#### 【0010】

IPFの診断を確定するには肺生検が必要であろう。肺生検には通常、開胸術を通じた開放術が含まれるが、それは肉眼的に罹患した区域だけでなく、その疾患の初期段階にあるかもしれないより近接な区域のサンプリングが可能だからである。しかしながら、開放肺生検の結果、11から23%に重篤な合併症が起きる。胸腔鏡技術によりこの合併症率は低減したが、それでも開放術に匹敵する診断精度をもたらす。しかしながら、これらの手法では、全身麻酔を用いた外科的介入が必要であり、その結果障害発生率も伴う。生検を行おうという決定には、患者のしばしば脆弱な臨床状態や、術後の合併症の可能性、さらにはその生検によりもたらされるであろう情報の臨床上の実用性といった点を、考慮せねばならない。確定的な診断を生むはずの生検を避けるために、経験的に患者を処置することは珍しくない。

#### 【0011】

従って、IPF、特にその最も初期の臨床段階を示す症状の評価において、臨床医の診断能力を高める技術が当業で求められている。例えば、より早期に診断が行えれば、病的変化が可逆的なうちにより早期に治療的介入を行えるであろう (Coker et al., "Pulmonary fibrosis; cytokines in the balance," *Eur. Respir. J.* 11(6): 1218-21 1998)。さらに、IPFを確定的に診断できれば、現在用いられている、時間及び経費のかかる除去プロセスを避けることができよう。このことは、この疾患が劇症経過を辿る場合がある小児集団においては特に重要であろう (Osika et al., "Idiopathic pulmonary fibrosis in infants," *Pediatr. Pulmonol.* 23(1): 49-54, 1997)。実際、IPFを発症する危険性の高い集団、環境因子及びその他の因子を発見するテストを操作すれば、それらの保護を最大にし、保健担当者に、この疾患の初期の徴候に対して注意を喚起することも可能であろう。

#### 【0012】

肺線維症はさらに、その他の肺の障害との同時罹患状態としても明らかにされている。ある研究では、成人呼吸窮迫症候群 (ARDS) 患者の肺線維症は、肺線維症のないそれらの患者の死亡率が0%なのに対し、57%の死亡率という相関関係にあることを示している。肺線維症に対して生来的により易罹患性な患者は、ARDSを特徴付けるものなど、その他の種類の肺病理により弱く、従ってこれらの患者はARDSの状態により弱い可能性がある (Martin et al., "Pulmonary fibrosis correlates with outcome in adult respiratory distress syndrome. A study in mechanically ventilated patients," *Chest* 107(1):196-200 1995)。

#### 【0013】

さらに当業においては、特定の患者が、多種の治療の副作用として肺線維症を生ずる傾向にあることが理解されている。ブレオマイシン及びアミオダロンはこの合併症を引き起こすことが知られている (Swiderski et al., "Differential expression of extracellular matrix remodeling genes in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis," *Am J. Pathol.* 152(3):821-8, 1998)。肺線維症は、広い切開及び放射線で初期の浸潤性乳癌を処置した場合に頻繁に起きる重篤な合併症である (Buettner et al., "Local production of interl

eukin-4 during radiation-induced pneumonitis and pulmonary fibrosis in rats: macrophages as a prominent source of interleukin-4," *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 17(3):315-25, 1997)。この種類の肺線維症は厳密に言えば突発性でなく、また特定の処置の不可避な結果でもない。患者の中には、それを処置様式に続いて起こしたり、また起こさなかったりする患者もいる（例えば、Van der Veen, et al., "Fatal pulmonary fibrosis complicating low dose methotrexate therapy for rheumatoid arthritis," *J. Rheumatol.* 22(9):1766-8, 1995, and Malik, et al., "Lung toxicity associated with cyclophosphamide use. Two distinct patterns," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154(6 Pt 1): 1851-6, 1996を参照されたい。放射線誘発性肺線維症への易罹患性について、いくつかの遺伝的ばらつきがマウスで解明されている（Johnston, et al., "Differences in correlation of mRNA gene expression in mice sensitive and resistant to radiation-induced pulmonary fibrosis," *Radiat. Res.* 142 (2): 197-203, 1995)。TGF-ベータは、放射線後肺線維症の発症に關与するサイトカインの一つであるが、その他のサイトカインも關与が示唆されている（Yi, et al., "Radiation-induced lung injury in vivo: expression of transforming growth factor-beta precedes fibrosis," *Inflammation* 20(4):339-52, 1996, Zhang, et al., "Cytokines and pulmonary fibrosis," *Biol Signals* 5(4):232-9, 1996, Johnston, et al., "Early and persistent alterations in the expression of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha mRNA levels in fibrosis-resistant and sensitive mice after thoracic irradiation," *Radiat. Res.* 145(6):762-7, 1996, Rubin, et al., "A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 33(1):99-109, 1995)。肺線維症の潜在的致命的副作用の危険性が高い患者を特定するテストがあれば、どの患者を特定の処置法の候補にしないかを決定する上で臨床医にとって一助となるであろう。

#### 【0014】

異なる臨床的ILD症候群を区別することは、治療薬にとっても意味がある。IPF

は50%の五年間生存率を有すると理解されている。診断方法が不適當であるため処置法のプランニングが挫折してきた (Sharma, "Idiopathic pulmonary fibrosis," *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2(5):343-6, 1996)。これらの患者は、その他のILD患者とは対照的に、コルチコステロイド、代謝拮抗剤、細胞毒、コルヒチン又はこれらの組合せを含め、より攻撃的な治療法の候補かも知れない (Entzian, et al., "anti-inflammatory and antifibrotic properties of colchicine: implications for idiopathic pulmonary fibrosis," *Lung* 175(1):41-51, 1997, Hunninghake, et al., "Approaches to the treatment of pulmonary fibrosis," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151(3 Pt 1):915-8, 1995)。さらに、抗サイトカイン治療法もIPFでの利用が提案されているが、これらの薬剤は、それらの薬理学的作用が大変複雑なため、それらを利用する前に精確な診断を行わねばならない (Coker, et al., "Anticytokine approaches in pulmonary fibrosis: bringing factors into focus," *Thorax* 52(3)294-6, 1997)。IPFのもう一つの合併症は気管支癌、最も多くの場合アデノカルシノーマである。気管支癌はIPF患者の約5から10%に起きることが知られており、同じような年齢及び性別で合わせた群の危険性と比較すると約10倍である。この危険性の高さは喫煙だけでは説明できない。IPFの診断があると、臨床医は悪性を示す最も初期の変化に注意する。

#### 【0015】

開業医の間では、開放肺生検という侵襲性は、たとえ胸腔鏡的に行ったとしても、可能であれば避けるべきであることは良く認識されている。しかしながら、現在のところ、侵襲度の低いテストは結論的でない傾向にあるために、開放肺生検が必要となっている。より多くの情報が得られる診断様式があり、等しく有用な情報が得られるものであれば、臨床医は開放生検を控えるであろう。このようなテストが開放肺生検の必要性を低減できれば、これらの脆弱な患者の直面する危険性が一つ減るであろう。

#### 【0016】

##### 遺伝子スクリーニング

ある一つの特定の組の疾患にかかる素因を早期に検出する場合は、医学的介入の

最良の機会である。遺伝学的要素のある疾患に関しては、この検出には遺伝子スクリーニングの技術が含まれる。早期の遺伝子スクリーニングによって、その異常が臨床上検出可能になる前に、監視及び早期介入を行え、患者の予後を向上させることができる。同じような徴候を持つ患者を処置しても成果がまちまちであるような場合、洗練された遺伝子スクリーニングによって、微妙な、又は、検出不能な違いを持つ個々の患者を差異化でき、より適した個別の処置を行うことができる。将来的には、早期の介入に遺伝子治療などの方法が含まれるであろうと予測できる。

#### 【0017】

遺伝性疾患をスクリーニングするための伝統的な方法は、異常な遺伝子産物（例えば鎌状赤血球貧血症）又は異常な表現型（例えば精神遅滞）の識別のいずれかに依存してきた。これらの方法では、例えばアルツハイマー病など、発現が遅く、簡単には識別できない表現型を持つ遺伝病の場合は実用性が限られている。簡単かつ安価な遺伝子スクリーニング法の開発により、現在では、その疾患が多遺伝子性起源のものでも、疾患の発生の性向を示す多型を特定することができる。分子生物学的方法によってスクリーニングすることのできる疾患の数は、多因子性障害の遺伝的基礎が解明されていくにつれ、増え続ける。

#### 【0018】

遺伝子スクリーニング（遺伝子タイピング又は分子スクリーニングとも呼ばれる）は、広い意味では、疾患状態を起こすか、又は、疾患状態を起こす変異に「連鎖」している、のいずれかである変異（又は対立遺伝子又は多型）を、ある患者が有しているかどうかを調べるテストであると定義できる。連鎖とは、ゲノム中で相互に近接した位置にあるDNA配列が一緒に受け継がれる傾向を有する現象を言う。二つの配列が、共遺伝の何らかの選択的利点のために連鎖していることがある。しかしながら、より一般的には、二つの多型配列が共遺伝するのは、減数分裂性組換え事象が二つの多型の間にある領域で起きる相対的低頻度のためである。共遺伝した多型対立遺伝子は互いに対して連鎖不均衡にあると言われるが、それはなぜなら、任意の一ヒト集団中では、それらはその集団の特定の人員中で一緒に起きるか、又は全く起きない傾向にあるからである。実際、ある染色体

領域中で多数の多型が相互に連鎖不均衡で見られる場合、それらは準安定な遺伝子「ハプロタイプ」を定義する。対照的に、二つの多型座位の間で組換え事象が起きると、それらは別個の相同染色体に別れる。二つの物理的につながった多型の間で減数分裂性組換えが十分な頻度で起きると、この二つの多型は個々に分離しているように見えることになり、これらは連鎖均衡にあると言われる。

【0019】

二つのマーカーの間の減数分裂性組換えの頻度は、染色体上でのそれらの物理的距離に比例するが、「ホット・スポット」が発生したり、染色体組換えが抑制される領域がある結果、二つのマーカーの間の物理的及び組換え距離に食い違いが起きることがある。このように、いくつかの染色体領域では、長い染色体ドメインに伸びた多数の多型座位が互いに対して連鎖不均衡にあり、従って長く伸びた遺伝子ハプロタイプを定義していることがある。さらに、このハプロタイプ内に、又はこのハプロタイプに連鎖して、疾患を起こす変異が見られる場合、このハプロタイプの一つ又は複数の多型対立遺伝子を、この疾患が発生する可能性の診断上又は予後上の指標として用いることができる。その他の点では良性の多型と、疾患を起こす多型との間のこの関係が起きるのは、疾患変異が近い過去に起こったものであり、従って、組換え事象を通じて平衡が達成されるのに十分な時間が経過していない場合である。よって、疾患を起こす突然変異的变化を含む、又はそれに連鎖したヒトハプロタイプの特定法は、疾患を起こす変異をその個人が受け継いだ可能性を予測する手段として役立つ。重要なことに、このような予後的又は診断的手法は、実際に疾患を起こす病変を特定及び分離する必要なく、利用することができる。

【0020】

ある障害と、ある多型との間にある統計学的な相関関係は、必ずしも、その多型によってその障害が直接引き起こされることを示唆するわけではない。むしろ、相関付けられた多型は、ヒト進化上の最近の過去に起きた、障害を起こす変異に連鎖した（即ち連鎖不均衡にある）良性の対立遺伝子バリエーションかも知れず、介在する染色体部分に組換え事象が起きて平衡が達成されるのに十分な時間が経過していないのかも知れない。このように、特定の疾患に関する診断的及び予後

的アッセイの目的のために、その疾患に関連した多型対立遺伝子の検出を、その多型が、その疾患の病因に直接関与しているかどうかを考慮することなく、利用することができる。さらに、良性の多型座位が、見かけ上の疾患を起こす多型座位に対して連鎖不均衡にある場合、この良性の多型座位に対して連鎖不均衡にあるさらに別の多型座位もまた、この疾患を起こす多型座位に対して連鎖不均衡にあると思われる。このように、これらその他の多型座位も、疾患を起こす多型座位を受け継いだ可能性を予測する又は診断するものであろう。実際、特定の疾患又は状態と、対応するヒトハプロタイプとの間を結ぶ線が引ければ、(一組の連鎖した多型マーカの対立遺伝子の共遺伝の典型的パターンを記述する)長く延びたヒトハプロタイプを診断目的のためのターゲットにすることができる。このように、ある個人に特定の状態の疾患が発生するかどうかは、一つ又は複数の、疾患に関連する多型対立遺伝子(又は、一つ又は複数の疾患に関連するハプロタイプ)を特徴付ければ、原因となる遺伝子変異を必ずしも決定する又は特徴付けなくとも、調べることができる。

#### 【0021】

##### IL-1遺伝子クラスターの遺伝学

IL-1遺伝子クラスターは、2番染色体の長腕(2q13)にあり、430kbの領域内に、少なくともIL-1アルファ(IL-1A)、IL-1ベータ(IL-1B)、及びIL-1受容体アンタゴニスト(IL-1RN)の遺伝子を含んでいる(Nicklin, et al., *Genomics*, 19:382-4(1994))。アゴニスト分子であるIL-1アルファ及びIL-1ベータは、有効な炎症誘発活性を有し、多くの炎症カスケードの先頭にある。これらの作用は、多くの場合IL-6及びIL-8などのその他のサイトカインの誘導を通じて、白血球の活性化及び損傷組織への動員、血管作動性物質の局所的産生、脳内の熱反応、及び、肝臓の急性期反応を引き起こす。三つのIL-1分子のすべてがタイプI及びタイプIIのIL-1受容体に結合するが、タイプI受容体だけが細胞内部にシグナルを伝達する。対照的に、タイプII受容体は細胞膜から引き剥がされ、おとり受容体として働く。従って、この受容体アンタゴニスト及びタイプII受容体は、両方ともそれらの作用において抗炎症性である。

#### 【0022】

IL-1遺伝子クラスタのうちのいくつかの対立遺伝子が、特定の疾患状態に関連があることが既に知られている。例えばIL-1RN対立遺伝子2が、冠状動脈疾患（共有されたPCT/US/98/04725及びUSSN08/813456）、骨粗鬆症（共有された米国特許第5,698,399号）、真性糖尿病のネフロパチー（Blakemore, et al. (1996) Hum. Genet. 97(3):369-74）、円形脱毛症（Cork, et al., (1995) J. Invest. Dermatol. 104(5 Supp.): 15S-16S; Cork et al. (1996) Dermatol Clin. 14:671-8）、グレーブス病（Blakemore, et al. (1995) J. Clin. Endocrinol. 80(1): 111-5）、全身性エリテマトーデス（Blakemore, et al., (1994) Arthritis Rheum. 37: 1380-85）、硬化性苔癬（Clay et al. (1994) Hum. Genet. 94:407-10）、及び潰瘍性大腸炎（Mansfield, et al. (1994) Gastroenterol. 106(3):637-42）に関係があることが分かっている。

#### 【0023】

同様に、マーカー-889のIL-1A対立遺伝子2及びマーカー+3954のIL-1B (TaqI) 対立遺伝子2も、歯周病（共有された米国特許第5,686,246号；Kornman and di Giovine (1998) Ann Periodont 3: 327-38; Hart and Kornman (1997) Periodontol 2000 14: 202-15; Newman (1997) Compend Contin Educ Dent 18:881-4; Kornman et al. (1997) J. Clin Periodontol 24: 72-77）に関連がある。さらにマーカー-889のIL-1A対立遺伝子2も、若年性慢性関節炎、特に慢性虹彩毛様体炎（McDowell, et al. (1995) Arthritis Rheum. 38:221-28）に関連があることが見つかっている。IL-1Bのマーカー+3954のIL-1B(TaqI) 対立遺伝子2はさらに、DR3/4患者の乾癬及びインシュリン依存性糖尿病に関連していることが判明している（di Giovine, et al. (1995) Cytokine 7: 606; Pociot, et al. (1992) Eur J. Clin. Invest. 22:396-402）。加えて、IL-1RN (VNTR) 対立遺伝子1は糖尿病性網膜症（共有されたUSSN09 / 037472、及びPCT/GB97/02790を参照されたい）に関連している。さらにIL-1RN (VNTR) の対立遺伝子2は、北アメリカ及びヨーロッパの白人集団の潰瘍性大腸炎に関係している（Mansfield, J. et al., (1994) Gastroenterology 106:637-42）。興味深いことに、この関係は、民族的に関係したアシュケナージユダヤ人の集団に特に強い（PCT W097/25445）。さらに、IL-1 (33221461) 及びIL-1 (44112332) ハプロタイプからの対立遺伝子が連鎖不均

衡にあることも示されている（共有されたPCT/GB98/01481を参照されたい）。このように、数多くの連鎖した対立遺伝子が、上記の疾患に関連があるとも言うことができる。

#### 【0024】

##### TNF-アルファ遺伝子 (TNFA) 座位

腫瘍壊死因子 (TNF) は、6番染色体の短腕上の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) のクラスII領域にあり、ヒト白血球抗原 (HLA)-B座位の約250キロベース (kb)、セントロメア側、そしてクラスII領域の850kb、テロメア側にある (Carroll et al. (1987) Proc Natl Acad Sci USA 84:8535-9; Dunham et al. (1987) Proc Natl Acad Sci USA 84:7237-41)。TNF- 及びリンフォトキシン- (LT-) の遺伝子は7kbの範囲にあり、直列配列で1.1kb離れており、LT- がテロメア側にある。両方とも四つのエキソンと三つのイントロンから成り、対応するmRNAの短い5'非翻訳部分と長い3'非翻訳部分とをコードしている (Nedospasov et al. (1986) Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 511:611-24; Nedwin et al. (1985) Nucleic Acids Res 13:6361-73)。最も顕著なホモロジー領域は四番目のエキソンに見られ、この四番目のエキソンは分泌LT- 及びTNF- のそれぞれ80%及び89%をコードしている (Nedwin et al. (1985) Nucleic Acids Res 13:6361-73)。

#### 【0025】

MHCは6番染色体の短腕にあるDNAの4メガベース (Mb) の部分であり (Campbell et al. (1983) Immunol Today 14:349-52)、ヒトゲノムの約0.1%を成す。それは110の遺伝子を含み、そのほとんどは免疫に関係するタンパク質をコードしていることが知られている (Trowsdale (1993) Trends Genet 9:117-22)。MHCの驚くべき特徴はクラスI及びII領域におけるこの遺伝子の多型性の高さである (Bodmer et al. (1991) Tissue Antigens 37:97-104)。例えば、HLA-Aの70個を越える対立遺伝子、及び、これら遺伝子の多型部分が、プロセッシングされた抗原がT細胞受容体に提示される裂け目をコードしている (Sinha et al. (1990) Science 248:1380-88; Nepom et al. (1991) Annu Rev Immunol 9:493-525)。

## 【0026】

もう一つの重要な特徴は、MHC全体の遺伝子の対立遺伝子間にある強い連鎖不均衡である。従って、例えばハプロタイプHLA-A1-B8-DR3-DQ2及びHLA-A2-B44-DR4-DQ8は、それらの個々の対立遺伝子頻度の産物が示すよりも高い頻度で現れる (Tiwari et al. (1985) New York:Springer-Verlag)。MHCの全体に渡る組換えは、ヒトゲノムのその他の領域のそれと大きく異ならない (Trowsdale (1993) Trends Genet 9:117-22) ため、強い連鎖不均衡の説明は明確ではないが、マラリアが風土病であるアフリカの地域に見られるように、感染物質による淘汰が原因であるかも知れない (Hill et al. (1991) Nature 352:595-600)。

## 【0027】

クラスIII領域の遺伝子も多型であることが示されている。C4の二つのアイソタイプであるC4A及びC4Bの遺伝子や、C2及び因子Bの遺伝子を含むその補体クラスは、二つのステロイド21-ヒドロキシラーゼ遺伝子に近接したこの領域のセントロメア端にある (Campbell et al. (1988) Annu Rev Immunol 6:161-95)。これらの遺伝子も高度に多型性であり、特定のMHCハロタイプに関連したいくつかの遺伝子を含む大きな欠失がある (Schneider et al. (1986) J Clin Invest 78:650-57; Braun et al. (1990) J Exp Med 171:129-40)。中央のクラスIII領域には、制限断片長多型(RFLP)を含む70kdの熱ショックタンパク質があり (Publiese et al. (1992) Diabetes 41:788-91)、テロメア端には、これもまた多型性であるTNF座位がある (以下を参照されたい)。

## 【0028】

数多くの研究により、多種のMHC対立遺伝子と、多くの通常の自己免疫疾患との間に関連があることが示唆されており、実際、自然界中で自己免疫疾患と分類される40程の疾患のうちほとんど全てが、MHC内にコードされた遺伝子の対立遺伝子に対し、易罹患性、又は、リウマチ性関節炎の場合には臨床的重篤性、での関連を示す (Sinha et al. (1990) Science 248:1380-88)。関連の強度は、全身性エリテマトーデス及び重症筋無力症での比較的弱いものから、強直性脊椎炎での大変強いものまで様々であり、この強直性脊椎炎では、HLA-B27対立遺伝子の保有率が正常の8%から患者では96%に跳ね上がる (Tiwari et al. (1

985) New York: Spring-Verlag)。加えてHLAが同一の及び非同一の同胞の研究では、ゲノムのその他の領域の遺伝的因子もこれらの疾患の多くに寄与していることが示唆されている。

#### 【0029】

しかしながら、易罹患性は、一卵性双生児における疾患のコンコダンス率が示すように、多因子性である。ある疾患が純粋に遺伝的なものであれば、100%のコンコダンス率が予測されるであろう。しかしながら、この率は、多発性硬化症の5%からリウマチ性関節炎の30%まで様々である。これらの観察は、その他の環境因子、おそらくはウイルス又は細菌によるもの、が疾患易罹患性には重要であることを示している。

#### 【0030】

TNF は主にマクロファージによって分泌される。TNF- の発現は、細菌のリポ多糖類、マイトジェン、及びウイルスによって誘導され、転写及び翻訳の両方で調節を受ける (Golffeld et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87:9769-73; Golffeld et al. (1991) J Exp Med 174:73-81; Han et al. (1990) J Exp Med 171:465-75; Han et al. (1991) J Immunol 146:1843-48)。TNFA遺伝子の調節はそのコドン配列を取り巻く5'側及び3'側のフランキング領域や、コドン・エキソン間に分散したイントロン内の配列によって媒介される。TNFA 5'側フランキング領域には約1000個の塩基対があり、その中には、三つの推定NFkB型コンセンサス配列、MHCクラスIIプロモータのYボックス、及び、ソマトスタチンプロモータのそれに似た環状アデノシン3'5'-モノホスフェート(cAMP)反応要素(CRE)を含め、転写制御に重要な要素が含まれている。このコドン配列に最も近いNFkB要素は、熱心に研究されている区域であり、シクロスポリンAによる転写抑制や、T細胞の核因子C/EBPBによる活性化に関与した要素が重複している。注目すべきことに、三番目のイントロンは、この領域内のウイルスエンハンサ配列から分岐したエンハンサ活性を有する。3'側非翻訳領域(3'UTR)は進化上保存されたTAリッチな配列を含み、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含むその他の炎症関連性遺伝子及びヒト肝細胞誘導酸化窒素シンターゼ遺伝子の3'UTRにもある。

## 【0031】

## TNFA遺伝子の転写活性化

マクロファージをLPSに暴露すると、そのマクロファージ内のTNFA遺伝子の転写速度が三倍に増加するが、これは、少なくとも部分的には、転写因子核因子kB (NF-kB) の誘導によって媒介されている(Beutler BA et al. 1986 Immunol, Coltart M., et al. 1990 Mol Cell Biol)。NF-kBはヘテロ二量体のタンパク質であり、通常は細胞質にあって、刺激シグナルが細胞表面で感知されるまではその37-kDのインヒビタ (I $\kappa$ B) に結合している。マクロファージをLPSに暴露すると、NF-kBが、プロテインキナーゼC依存性及び独立性機序によって活性化する。TNFA 5'側フランキング配列の数部分を削除した結果、kBエンハンサ配列の三つ以上の欠失により、マクロファージ中のLPS誘導遺伝子活性化が著しく弱まること示された(Shakhov et al. (1990) J Exp Med 171:35-47)。T細胞では、NF-kBの誘導はマクロファージ中でほどは、TNFA遺伝子活性化にとって重要でないかも知れない。代わりに、ポーブ氏及び共同研究者(Pope et al. (1994) J clin Invest 94: 1449-55)は、TNFAプロモータの中にC/EBPBへの特異的結合部位を同定した。ジャーカットT細胞の一過性同時トランスフェクションレポータ系では、CEBPBが過発現すると、TNFA遺伝子が活性化した。さらに、この同じ細胞株で、変異型のC/EBPBによりC/EBPB活性を遮断すると、ホルボールミリスチックアセテート(PMA)によるTNFA誘導が消失した。C/EBPBがマクロファージの活性化に重要であるかどうかはまだ不明である。

## 【0032】

従って、TNFAプロモータの多型性が、LPS及びその他のTNFA誘導刺激に対するTNFAの転写応答の、多型特異的差異を引き起こし、ひいては、類似の疾患プロセスを持つ患者間での臨床上的症状の個人差や、このようなプロセスに対する遺伝的素因の基本的な個人差を少なくとも部分的に担っている可能性がある。最近、TNFAプロモータ内、又は、TNFAプロモータ近傍の多型がヒトで解説された(Pociot F., et al 1993 Gene)

## 【0033】

## TNFA転写調節

サイトカインが初めて単離されクローンされてからすぐに行われた三つの観察では、TNF- $\alpha$  生合成が、翻訳のレベルで有意に調節されたことが示された。第一に、LPS刺激に应答して、直接計測されたTNFA転写速度は、三倍しか増加しなかったが、TNFAメッセンジャーRNA (mRNA) レベルはほぼ100倍に増加し、また実際に分泌されたTNF- $\alpha$  タンパク質は10,000倍に増加した (Beutler BA, et al. 1986 Immunol. )。第二に、TNFA mRNAは、TNF- $\alpha$  タンパク質が全く分泌されていない間の培養マクロファージ中で、特に、LPS刺激前にデキサメタゾンで予め処理したマクロファージ中で、検出可能であった。この観察は、TNFA mRNAの翻訳を抑制する機序が、刺激を受けていないマクロファージ中で活性であること、そして、この抑制が、LPSの刺激を受けて解かれたこと、を示唆した (Beutler B., et al. 1986 Science)。第三に、C3H/HeJマウスと、それらの野生型類似遺伝子型との違いは、僅かに、マウス4番染色体上に位置する「LPS遺伝子」の変異に過ぎない。これらのマウスは野生型動物にはおしなべて致命的である大量のエンドトキシンによる挑戦に耐性である。C3H/HeJマウスのマクロファージを、試験管内でLPSで刺激しても、TNF- $\alpha$  タンパク質は分泌されないが、TNFA mRNAがほぼ正常に増加したことが観察された。この発見もまた、刺激を受けない条件下でTNFA mRNAの翻訳を抑制するよう働く調節機序を示唆しており (Beutler B., et al. 1986 Science)、C3H/HeJマウスは、野生型マクロファージをLPSで刺激すると正常に起きた翻訳抑制解除に、欠陥を発現したのだと考えられる。

#### 【0034】

TNF- $\alpha$  発現の翻訳調節に関する機序は、何人かの研究者により解明されてきた。数多くのサイトカイン及び腫瘍遺伝子の3'UTRに、複数の進化上保存された領域が存在する (Caput et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:1670-74; Shaw and Kamen Shaw G., (1986) Cell 46:659-67; 及び Kruys et al. (1989) Science 245: 852-55)。これらの領域は、しばしば繰り返しの8量体のモチーフ「TTATTTAT」として見られるTAリッチな領域から成る。このような配列を含むと最初に報告された遺伝子の中にはヒト及びマウスがある。TNFAヒト及びマウスIL-1A、ヒト及びマウスGM-CSF、ヒト及びマウスインターフェロン (IFN)、ヒト及びマウスc-fos、及びその他である。ごく最近、ヒト肝細胞誘導酸化窒素シク

一ゼ遺伝子の3'UTRも、TTATTTATコンセンサス配列及びいくつかのTAリッチなフランキング配列を含むことが示された。ここまでのところ、これらの配列は二つの重要な調節上の役割を有することが示されている。一つめは、TAリッチな領域の存在により、mRNAの不安定性がもたらされ、従ってmRNAの半減期が短くなっている。さらに、GM-CSFの3'UTRをベータ-グロビンの3'UTRに置換すると、mRNAの半減期が数時間から数分に減少した。TNFA mRNAの半減期は実際にも短い、TNFA mRNAの半減期がLPS刺激後に大きく変わったことを示す決定的な証拠はない。しかしながら、TTATTTATの二番目の調節上の役割は、mRNAの翻訳効率に関するものである。試験管内ほ乳類系を用いて、レポータ・コンストラクトの3'UTRに一個のUUAUUUAU配列を含めると、タンパク質産生が90%を越えて阻害されたことが実証された (Kruys, V. et al. (1989) Science 245:852-55; Kruys et al. (1987) Proc. Natl. Acad Sci USA 84:6030-34)。さらに、このTNFAの3'UTRの存在により、TNFA mRNA の翻訳効率が600分の一に減少するが、この翻訳の阻害は、マクロファージのLPSによる刺激で克服され、TNF-タンパク質合成が急速に高まった。またさらに、TNFA 3'UTRをグロビン遺伝子の3'UTRに置換したトランスジェニック・マウスでは、TNF-生合成が調節されず、慢性的な炎症性多発性関節炎を発症した (Keffer J., et al. (1991) EMBO J 10:4025-31)。興味深いことに、ニュージーランドホワイト及びMus Spretus株のTTATTTAT配列の変異を含め、様々なマウス株の3'UTRの多型により、このTNFA遺伝子の3'UTRの多型は、動物で、及び潜在的にヒでも、TNFA媒介疾患に関連しているかも知れないことが示された (Beutler et al. 81993) Gene 129:279-83)。

#### 【0035】

ヒトでは、TNF 調節及び/又は分泌の異常が、いくつかの自己免疫状態、特に真性糖尿病及びリウマチ性関節炎の患者で解説されてきた。TNFA 3'UTRの変異が、自己免疫を持つ小児患者に存在する可能性が、最近調査された (Becker et al. (1995) Pediatr Res. 37:165-68)。若年性リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、タイプI糖尿病、非炎症性関節炎を含む、結合組織病の48人の小児患者と、4人の健康なボランティアとから血液試料を採取した。各患者から、TTATTTATモチーフを含む、190塩基対断片のTNFA 3'UTRを増幅し

、配列決定した。患者及びコントロール被験体のすべてが正常な野生型配列を示し、TTATTTATに欠失、挿入、又は置換は全くなかった。これらのデータは、この領域の変異はあまり起きず、この研究で調べた患者では全く起きていなかったことを意味している。しかしながら、3'UTRの多型が、LPSに対する応答の個人差に関係している可能性は残る。

#### 【0036】

##### TNFAの翻訳後調節

TNF- $\alpha$  が初めて合成されたのは、ヒトでは76個の追加のアミノ酸をN末端に含んだプロホルモンとしてであった。この配列は開裂した後、三量体化し、成熟した157個のアミノ酸のサブユニットが分泌する (Ceoh, et al. (1989) J Biol Chem.26: 16256-80)。26 kDの膜型のTNF- $\alpha$  もまた解説されており、これは標的細胞のマクロファージによる殺生に参加しているかも知れない (Kriegler et al. (1988) Cell.53:45-53)。マクロファージのLPS刺激後の翻訳後事象の調節変化に関する情報はない。

#### 【0037】

##### TNFA座位の多型

TNF- $\alpha$  は多種の機能を持つサイトカインである。それはいくつかの腫瘍細胞系の細胞溶解を引き起こすことができる。それは悪液質の誘導に関係していることが示唆されており、直接作用によるか、又は、インターロイキン1の分泌を刺激することにより、熱を起こす強力な発熱物質であり、特定の条件下で細胞増殖を刺激し、細胞分化を誘導することができる。MHCのクラスIII領域のTNF座位は、自己免疫及び炎症性疾患の良好な候補遺伝子クラスタでもあるが、MHC全体の連鎖不均衡度が高いために、ハプロタイプ上のどの遺伝子が疾患の病因論において重要であるかを調べるのは難しい。

#### 【0038】

LPS及びフィトヘムアグルチニンで刺激した、HLA-DR型個人から採った単核細胞の上清中のTNF- $\alpha$  の測定では、HLA-DR2が低生成率に (Bendtzen et al. (1988) Scand J Immunol 28:599-606; Moelvig et al. (1988) Scand J Immunol 27:705-16; Jacob et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87:1233-37) そしてHLA-

DR3及び-DR4が高生成率に ( Jacob et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87:1233-37; Abraham et al. (1993) Clin Exp Immunol 92:14-18 ) 相関していることが実証され、TNFA遺伝子の調節領域に多型が起きるかも知れないことが示唆された。

【 0 0 3 9 】

染色体の位置決定、生物学的効果、その慢性炎症への関与、及び、HLA-DR対立遺伝子との表現型の関連から考えると、TNF座位の多型が、感染性又は炎症性疾患の病理発生又は臨床上的症状発現に関与している可能性がある ( Sinha et al. (199) Science 248:1380-88; Jacob (1992) Immunol Today 13:122-25 ) 。 実際、腫瘍壊死因子- ( TNF- ) は、全身性エリテマトーデス ( Wilson et al. (1994) Eur J Immunol 24: 191-5 ) 、インシュリン依存性真性糖尿病 ( Cox et al. (1994) Diabetologia 37:500-3 ) 、疱疹状皮膚炎 ( Wilson (1995) J Invest Dermatol 104:856-8 ) 、小児脂肪便症 ( Mansfield et al. (1993) Gut 34:S20-23 ) 、及び重症筋無力症 ( Degli-Esposti et al. (1992) Immunogenetics 35:355-64 ) を含め、いくつかのヒトの疾患の病理発生に関係があることが示唆されてきた。TNF-A遺伝子の座位は、主要組織適合遺伝子複合体 ( MHC ) のクラスIII領域にあるため、特定のTNF多型と、特定の疾患又は障害との間の関連は、特定のMHCクラスII I I 対立遺伝子との連鎖不均衡が原因かも知れない。ハプロタイプHLA-A1-B8-DR3-DQ2は、「自己免疫ハプロタイプ」として知られ、インシュリン依存性糖尿病、グレーブズ病、重症筋無力症、SLE、疱疹状皮膚炎及び小児脂肪便症を含め、数多くの自己免疫疾患と関連づけられてきた ( Scejgaard et al. (1989) Genet Epidemiol 6:1-14; Welch et al. (1988) Dis Markers 6: 247-55; Ahmed (1993) J Exp Med 178:2067-75 ) 。 TNF プロモータの位置-308にある二対立遺伝子多型が、これらの疾患で研究されているが、それは、( a ) 高TNF 産生レベルが特定のDR3及びDR4ハプロタイプに関連づけられてきたこと ( Pociot et al . (1993) Eur Immunol 23:224-31 ) 、及び、( b ) -308にあるTNF2対立遺伝子が自己免疫ハプロタイプ上に乗っていること ( Wilson et al. 1993) J Exp Med 177 557-60 ) が示されたからである。しかしながら、上に挙げた疾患のすべてで、自己免疫ハプロタイプとの関連から独立して、疾患とTNFの関連を実証すること

は不可能であった。にもかかわらず、特定のHLA多型と関連づけられた疾患の全てが、TNFA多型との同様な関連を示すわけではない。例えば、いくつかのHLA DR B対立遺伝子と関連づけられたリウマチ性関節炎 (Salmon et al. (1993) Br J Rheumatol 32: 628-30) は、特定のTNFA多型マーカとは関連していないようである (Wilson et al. (1995) Ann Rheum Dis Ann rheum Dis 54:601-3)。従って、ヒト6番染色体のこの免疫学的に重要な領域で有用なHLAに連鎖したマーカとして役立つだけでなく、いくつかのTNF遺伝子座多型は、実際に、特定の疾患の病因論に直接貢献するかも知れない。

#### 【0040】

さらに、TNFは感染性疾患でも重要な役割を果たしているようである。ガンビアでのマラリア患者の大規模調査で、TNFA対立遺伝子2の同型接合性が、大脳マラリアが原因の死に強く関連づけられ、臨床結果との関連は、MHCのクラスI及びII領域のその他のマーカでは見いだされなかった (McGuire et al. (1994) Nature 371:508-511)。その他の感染性疾患の調査は、この観点で大変興味深いことであろう。

#### 【0041】

候補遺伝子を用いた、集団ベースの関連研究の結果は、候補遺伝子の状態の確認にとって、そして機能研究の開始点として有用である。目的遺伝子の疾患との分離を実証するための家族ベースの研究を含め、候補遺伝子領域の連鎖を確認するには、更にデータが必要である。連鎖が確認されれば、連鎖不均衡マッピングを行って、疾患と最大に関連した領域のマップを精密化することができ、例えばトランスミッション不均衡テストのために、目的の領域に広がったマイクロサテライト・マーカのパネルを用いることができる (Copeman et al. (1995) Nature Genet 9: 80-85)。

#### 【0042】

TNF遺伝子座では数多くの多型が解説されている。三つのRFLPがLT- 遺伝子で解説されている。一番目のイントロンで一個の塩基が変わった結果である、NcoI RFLP(TNFB1)の珍しい対立遺伝子が、この成熟タンパク質の位置26のバリエーションアミノ酸と、そしてHLA-A1-B8-DR3ハプロタイプとも関連していることが示

されている (Messer et al. (1991) J Exp Med 173:209-19)。TNFB1の表現型との関連は明確ではない。しかしながら、ある一つの研究が、高LT- 産生との関連はあること、そしてTNF- 産生との関連はないことを実証しており (Messer et al. (1991) J Exp Med 173:209-19)、他方で別の研究では、延長されたハプロタイプHLA-A1-B8-TNFB1-DR3-DQ2 上に見られる場合を除き、高産生と関連づけられた場合には、低TNF- 産生との関連が実証されている (Pociot et al. (1993) Eur Immunol 23:224-31)。その他二つのRFLPがLT- 遺伝子では公知である。(a) 四番目のエキソンの非翻訳領域の多型の結果生じる、珍しいEcoR1 RFLPであり、しかしその保有率(正常な個人中1%)は低いため、マーカーとしての利用には限りがある (Partanen et al. (1988) Scand J Immunol 28:313-16)。及び、(2) 一番目のイントロンの一塩基多型のため生ずるAsph1 RFLPであり、これもまた解説されており、その珍しい対立遺伝子はHLA-B7に対して連鎖不均衡にある (Ferencit et al. (1992) Eur J Immunogenet 19:425-30)。

#### 【0043】

TNF座位に延びた五つのマイクロサテライトも特徴付けられている (Udalova et al. (1993) Genomics 16:180-86) (図4)。これらには、様々なコピー数のジヌクレオチド繰り返し配列が含まれる。二つは互いに隣り合い、LT- 遺伝子の約3.5 kb上流にある。TNFAは(CA)<sub>n</sub>配列から成り、12の対立遺伝子を有する。TNFB(CT)<sub>n</sub>配列は7つの対立遺伝子を有する (Jongeneel et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:9717-21)。TNFcはLT- の一番目のイントロンにある二対立遺伝子(CT)<sub>n</sub>配列である (Nedospasov et al. (1991) J Immunol 147:1053-59)。TNFd及びTNFeはTNF- 遺伝子の8から10 kb下流にある。両方とも(CT)<sub>n</sub>配列から成り、それぞれ7つ及び3つの対立遺伝子を有する (Udalova et al. (1993) Genomics 16:180-86)。これらのマイクロサテライト、及び、LT- Nco1 RFLPをタイピングした結果、少なくとも35種の異なるTNFハプロタイプが定義され、これらのマーケットが、MHC関連疾患のこの領域の重要性の遺伝分析において大変有用なものとなっている。さらに、マイクロサテライト対立遺伝子と、延長されたMHCハプロタイプの間、連鎖不均衡が実証された (Jongeneel et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:9717-21)。驚くべきことでは

ないが、TNF- $\alpha$  産生とDR対立遺伝子との間の関連を鑑みて、いくつかはTNF- $\alpha$  産生レベルと相関関係にあることが示されている (Pociot et al. 1993) Eur J Immunol 23:224-31)。

#### 【0044】

TNF産生の調節は、転写レベル及び翻訳後レベルで起きる (Sariban et al. (1988) J. Clin Invest 81:1506-10)。5' DNA内の配列が、転写速度を制御する (Goldfeld et al. (1991) J Exp Med 174:73-81)。従って、この遺伝子のこの領域が多型について調べられ、二対立遺伝子多型が、珍しい (TNF2) 対立遺伝子中、グアニンのアデノシンへの置換に關与する転写開始部位に対して-308に発見された (Wilson et al. (1992) Hum Mol Genet 1:353)。このTNF2対立遺伝子は、HLA-A1-B8-DR3-DQ2ハプロタイプと大変強く結び付いていることが見いだされ (Wilson et al. (1993) J Exp Med 177:577-560)、このハプロタイプの、自己免疫疾患及び高いTNF- $\alpha$  産生との関連がTNF- $\alpha$  座位内の多型に關連している可能性が出てきた。二番目の多型は最近、推定Yボックスにある、TNF- $\alpha$  プロモータ領域の-238に解説され (D'Alfonso et al. (1994) Immunogenetics 39:150-54)、その珍しい対立遺伝子はHLA-B18及び-B57に対して連鎖不均衡である。

#### 【0045】

上述したように、数多くの研究により、自己免疫疾患への易罹患性におけるTNF遺伝学の重要性が調べられてきた。これらは、主に、無関係の罹患した個人の異なるコホートと、「正常な」コントロール集団との間の対立遺伝子の頻度の比較を含んでいた。この種類の研究の長所は、大規模な家族研究又は同胞-対分析に比べて、DNA採取の確立が容易なことであるが、コントロール群が罹患群に対して民俗学的に同様であることを確認し、出来る限り疾患異種性を除外するよう、個人を入念に臨床評価することが大変重要である (Lander et al. (1994) Science 265:2037-48)。これは、自己免疫疾患とのMHCの関連を調べるのに用いられている最も普通の種類の研究である。

#### 【0046】

ILD及びIPFの病理学

血流及び大気間の酸素及び二酸化炭素の交換には、肺の正常な機能が必要であ

る。肺は、複数に分岐した末端の細気管支で、多数の呼吸単位即ち小胞に分割されている。小胞は微細な呼吸細気管支を含み、この細気管支は次に、複数の肺胞から形成された肺胞嚢の集団を生じている。三つから五つの末端の細気管支の集団がそれぞれ付属の小胞を備え、肺小葉と呼ばれる。肺の構造は、ガス交換の機能には重要である。

#### 【0047】

呼吸樹のデザインは、空中粒子から末端構造を保護しながら肺胞レベルでガス交換が行えるようにすることである。呼吸樹の防御の第一線は機械的である。咳、及び、声門の閉止により、近くの呼吸樹を護る。顕微鏡レベルでは、細気管支の内側には、粘液の分泌に適合した杯細胞と混合された多列円柱上皮細胞の内張がしてある。これらの細胞は、吸い込まれた粒子物質に対する肺の防御の一部である。分泌された粘液は粒子を捕獲し、線毛は分泌物を気管気管支樹から上に向かって吸い上げて排出させる。細気管支が繰り返し分岐していることにより、遠位の肺胞への到達がより困難となっている。しかし、肺胞に到達した粒子はこれらの機械的障壁を逃れたのであり、身体の免疫系の一部である機序によって扱われねばならない。肺内の免疫機構は、ガス交換の肺胞レベルでのプロセスに影響を与えずに、病原体を消去する一助となるよう働かねばならない。

#### 【0048】

肺胞は、ガス交換のための表面積を最大にする上向き蠕動する毛管のネットワークと密接に関連している。肺胞壁又は隔膜は、毛管内皮及び呼吸上皮の両方を由来とする構造から成る。血液側から始まり、空気側に向かって動き、これらの構造には、1) 毛管内皮、2) 基底膜、及び、周囲の、血管系及び呼吸系間の間質組織、3) 肺胞上皮、4) 肺表面活性物質、がある。ガス交換は、肺胞内の酸素がその壁面を通過するときに行われ、この酸素は隣接した毛管内の赤血球で取り込まれるが、このプロセスは、溶存二酸化炭素が血流から肺胞内へと拡散するのと同様である。肺胞壁の層はこれらの二つのガス交換機能を果たすために組織されている。

#### 【0049】

肺胞上皮は、二つの主な細胞種から成る。肺胞表面の約95%を覆うタイプI

肺細胞と、タイプII肺細胞である。タイプII肺細胞は二つの重要な機能を持つ。これらの細胞は肺表面活性物質の供給源であり、それらは、肺胞上皮が損傷したときにその修復を担う。肺胞上皮に緩く付着しているか、又は、肺胞内を自由に浮遊しているのは肺胞マクロファージである。肺胞壁には多くの孔が開いており、この孔によって、固体及び液体物質が隣接した肺胞の間を容易に通過することができる。

#### 【0050】

ILDは、肺胞壁と毛管内皮区域との間の間質に罹患する状態の仲間である。ILDは、炎症及び線維形成の組合せを特徴とする。肺胞炎は、ILDに最初に起きる異常だと理解されている。リンパ球及びプラズマ細胞の浸潤物がこの疾患の経過の初期に観察される。その後、タイプI肺上皮細胞及び毛管内皮細胞の消失を伴った間質の浮腫が続く。これらのプロセスに剥離が伴う場合もある。剥離は、タイプIIの肺細胞及び肺胞マクロファージが肺胞のルーメンを満たすようになる状態であると定義されている。剥離は活発な炎症を示すものである。タイプII肺細胞は、肺の損傷がさほどひどくなく、線維形成が少ない箇所に増殖する。より重篤に損傷した箇所では、立方体様の上皮細胞及び化生性落屑性の上皮細胞が、肺胞上皮を再生する。損傷箇所が治癒するにつれ、肺胞隔膜内に線維芽細胞及びコラーゲンが蓄積する。この結果、より進行したILDの特徴である密な肺胞隔膜線維症となる。

#### 【0051】

肺胞及び肺胞壁内に浮腫流体が存在すると、気体分子が通過しなければならない膜が厚くなってガス交換が損なわれる。同様に、肺胞壁が線維症で厚くなると、同じ病理学的問題につながる。さらに、肺構造の歪みにより、肺の仕組みが損なわれて、換気効率が低くなる。これらの因子の相互作用により、ILDを示す症状が現れる。炎症、浮腫、線維形成及び構造的な破壊の様々な組合せが、様々なILDの特徴である。

#### 【0052】

IPFはILDの一つの形であると理解されている。二つの組織学的に判別可能な形のIPFがある。UIP及びDIPである。DIPは臨床上、より軽度であり、病理学的には

、肺胞間質の軽度の炎症、肺胞構造の維持、及び、肺胞空間内に多数のマクロファージが存在すること、を特徴とする。UIPでは、肺胞壁は肥厚しており、肺実質は再器質化を行っており、炎症細胞及び繊維症が顕著である。DIP及びUIPは同じ疾患プロセスの異なる段階を表す場合がある。その特徴的な変化が、同じ標本の異なる場所に見つかることがある。超微細構造の組織検査を行うと、例えば全身性リウマチ性障害に関連するILDなど、その他の病因に関連したILD状態からIPFを区別するのに役立つかも知れない。内皮細胞の膨張及び細胞内管網様構造が全身リウマチ性障害及び関連ILDの患者に見られるが、管網様構造はウィルス性肺炎の患者にも見られる。しかしながら、これらの所見は、IPF患者には観察されない。

#### 【0053】

AIPはもう一つの型のILDである。その経過は急速、進行性、しばしば致命的である傾向にある。それは通常の組織学に基づいてIPFから区別することができる。AIPに見られる組織学的変化には、肺胞内のヒアリン膜、間質隔膜の肥厚、内皮及び外皮の損傷、並びに著しいコラーゲン沈着のない細胞線維芽増殖がある。これらの変化はまた、永久的な肺の損傷がないまま多くの場合は解決してしまうことが知られている成人呼吸窮迫症候群にも見られる。しかしながら、AIPはしばしば進行して、IPFと同様、永久的な線維症の状態になる。AIPでは、タイプIの肺細胞の過形成が疾患の最初の数週間間に起きる場合が多い。肺細胞が増殖する際、潰れた肺胞は凝縮して一個の肥厚した肺胞中隔になる。タイプIの肺細胞はこれらの肺胞中隔の基板に沿って増殖し、それらをさらに肥厚させる。肺胞内滲出液もさらに肺実質を肥厚させる。AIPでは、全肺胞が、それらの壁を付着させて潰れるという特徴がある。AIPの最終的な組織学はIPFで見られるものと似ているが、それらの組織病理はこれら障害の初期の段階では異なる。

#### 【0054】

ILDの種類に関係なく、最も初期の普通の病的な症状発現は、ここでは肺胞空間及び壁部内の炎症細胞及び免疫エフェクタ細胞の蓄積であると理解されている肺胞炎である。肺内の炎症細胞及び免疫エフェクタ細胞は主にマクロファージから構成されるが、リンパ球、好中球及び好酸球も存在する。肺胞炎では、マクロ

ファージ及び好中球が大半となる。肺肺炎でリンパ球が蓄積すると二つの結果がもたらされる。それは正常な肺胞の構造を歪ませ、またそれは、実質細胞を傷付けると共に線維形成を刺激することのできる媒介物質を放出させるのである。ILDでの肺肺炎の最初の刺激は多くの形を採ることができ、その中には環境的吸入、薬剤暴露、放射線及び感染が含まれる。刺激はさらにIPFと同様、不明な場合もある。特定の化学物質、放射線及び酸素フリーラジカルの場合と同様、この刺激は肺胞上皮、毛管内皮、又はその両方に直接的な毒性作用を有することがある。しかし、この直接的な毒性の他に、主要な事象は、炎症細胞及び免疫エフェクタ細胞の動員及び活性化を含む、炎症性プロセスの順番の引き金が引かれることである。ILDにおけるこれらのプロセスの最後の段階は、炎症細胞の浸潤した結合組織の厚い帯で分離された嚢状空間に肺胞が置き換えられてしまう線維肺である。

#### 【0055】

ILDの媒介における二つの主要な細胞種は、肺胞マクロファージ及び好中球である。肺胞マクロファージ(AM)には、それらの一時的な機能として、肺胞に進入した異物の接種及び除去がある。これらは肺胞免疫系の一部である。例えば、これらはIgG又は補体が食べた粒子に貪欲に結合する。大半の肺胞マクロファージは血流中の単核細胞を由来とする。血流中の単核細胞は肺胞壁内に通過してAMになる。AMは肺胞組織内にごく普通に見られ、正常な肺実質の約2から5%を成す。対照的に、好中球(PMN)は健康な人の肺胞又は間質中にはめったに見られない。しかし、多数のPMNが、広く分岐した肺血管樹全体を循環する。これらの細胞は赤血球よりも大きいため、これらは肺胞毛管をよりゆっくりと通過する。これらは、化学誘引物質に応答して、血管内空間から間質へ容易に移動する。

#### 【0056】

炎症刺激に応答して、又は、特定のサイトカインに応答して、AMは活性化する。活性化状態では、マクロファージは数多くの酵素、サイトカイン及びその他の炎症性タンパク質を産生する。例えば、活性化AMは、食菌された生物及び免疫複合体の清掃に必須である補体成分C1q、C2、C3及びC5を分泌する。活性化マクロファージが放出する重要なサイトカインには、IL-1及びTNFがあり、その両方と

も、自己分泌作用及びパラ分泌作用を有する。TNFは自己刺激を単核細胞及びマクロファージに提供して、完全な活性化を維持させる。TNFはさらにPMNを刺激して、完全に活性化させる。活性化したPMNは、一次貪食細胞として働き、侵入生物の摂取及び殺生を担うことができる。これらの細胞は、さらに遊離酸素ラジカル及びリソソーム酵素を組織流体に放出して、病原体の細胞外での殺生を行うことができる。これらの細胞毒性産物の放出による副作用には、組織の壊死、更なる炎症及び凝固カスケードの活性化がある。補体開裂産物及びTNFの放出により、より多くのPMNが隣接する微小血管から引き寄せられる。これらのPMNが肺胞に隣接した微小血管の周囲に集まると、これらは内皮の損傷を起こし、血管透過性を高め、次いで細胞及び血清タンパクの組織空間内への滲出を引き起こすことができる。さらにAMは活性化するとIL-1を分泌する。マクロファージ由来のIL-1に反応して、内皮細胞及び線維芽細胞は更なるIL-1を分泌し、それにより炎症反応を増幅する。IL-1は内皮細胞上での付着分子の発現を誘導し、リンパ球に対して走化性である。さらにIL-1は脈管形成及び線維形成を誘導すると理解されている。

#### 【0057】

局所的な微小血管へのPMNの作用の結果、それらの透過性が増加し、肺実質への流体負荷が高まる。流体の間質への洩れには、線維形成のプロセスを起こす成分タンパク及び細胞も伴う。まずアルブミン及びグロブリンが間質内に埋め込まれ、次に、炎症箇所のAMが分泌した成長因子により、循環性線維芽細胞が組織に引き付けられる。次に、線維芽細胞が、瘢痕組織の基礎であるタンパク質であるコラーゲンを産生する。さらに、いくつかのAMが、典型的な活性化AMとは異なる方向で分化するように誘導されることもある。この代替的な分化経路の結果、主に分泌的な活性を持つAMが生じる。分泌的AMは、組織損傷の修復に役立つよう意図された成長因子を産生する。しかし、肺では、それらは、線維芽細胞の動員及びコラーゲンの産生を刺激することによって、肺線維形成に貢献してしまう。不完全に分化したAMだと考えられる、間質の間葉細胞が、線維肺に見られるタイプIコラーゲン、タイプIIIコラーゲン、フィブロネクチン及びその他のマトリックスタンパク質を合成する。これらの細胞はIPFではより多く、それらの合成

産物は変化している。それらは、IPF及び関連する状態における線維組織の間質蓄積に貢献していると考えられる。

【0058】

ILD及びIPFでの肺損傷は、AM及びPMFの両方によって生まれる。AM及びPMN間の相互作用は、それらのサイトカイン及びその他の活性物質の放出によって、遅い進行性肺線維症及びより劇症の状態の両方で、重要な役割を果たしていると考えられる。これらの細胞機序の炎症作用が線維増殖のプロセスと組み合わせることで、一般的にはILD、特にIPFの特徴である肺胞損傷及び構造上の歪みが生じる。

【0059】

マクロファージは、遊離酸素ラジカルなど、それらの活性化産物の放出によって、肺実質を直接的に損傷させる。さらに、活性化AMはPMN及びその他の炎症細胞を引き付け、活性化させる。それらは、ロイコトリエンB4などのPMNの走化性因子、フィブロネクチン、血小板由来成長因子及びインシュリン様成長因子などの線維芽細胞の成長因子、並びに炎症誘発性サイトカインを放出する。マクロファージは、IL-1ベータ及びその特異的インヒビタであるIL-1Raの両方を放出する。このIL-1ベータ/IL-1Raの比がIPF患者では増加しており、炎症誘発性環境をもたらしていると考えられている。

【0060】

PMNはいろいろな態様で肺組織を直接、損傷させる。細気管支肺胞洗浄液中のそれらの存在が、IPFの予後がよくないことと相関付けられている。PMNは、いったん活性化すると、オキシダント、コラゲナーゼなどのタンパク分解酵素、及び脂質過酸化の生成物を含む、いくつかの細胞毒性物質を放出する。呼吸酸素付加の反応生成物（スーパーオキシド、過酸化水素、水酸ラジカル及び次亜塩素酸）は、基本的に全ての細胞成分と反応してタンパク質の変性及び架橋を起こし、膜透過性を変化させ、核酸及び細胞器官に損傷を引き起こす。エラスターゼ及びメタロプロテナーゼなど、PMNの放出するタンパク分解酵素は、全ての肺間質の構成成分を消化することができる。好中球オキシダントはこれらの酵素と相乗作用的に働いて、局所的な組織損傷を高める。例えば次亜塩素酸は、好中球のエラスターゼの作用を抑制するはずのアルファ-1アンチトリプターゼなどのタンパク分

解の阻害剤を不活性化する。酸化生成物は好中球コラゲナーゼを活性化する。脂質過酸化生成物は血管透過性に変化を起こす。さらにこれらの物質は、好中球及びリンパ球にとって走化性である。このように、PMNによって制御される炎症サイクルは自己増殖的である。

#### 【0061】

##### 発明の概要

態様の一つでは、本発明は、ある患者が、IPFなどの、しかしIPFに限らず、間質性肺障害（ILD）を有するか、又は発生するかどうかを判定する新規な方法を提供する。実施例の一つでは、前記方法は、ILD関連対立遺伝子が、被験体から採取した核酸試料中に存在するかを調べるステップを含む。好適な一実施例では、前記ILD関連対立遺伝子はIL-1RN（+2018）対立遺伝子2、TNFA（-308）対立遺伝子2、あるいは代替的に、IL-1RN（+2018）対立遺伝子2又はTNFA（-308）に対して連鎖不均衡にある核酸配列である。

#### 【0062】

ILD関連対立遺伝子は、1)核酸試料と、ILD関連対立遺伝子にハイブリダイズすることのできるプローブとの間でハイブリダイゼーション反応を行う、2)ILD関連対立遺伝子の少なくとも一部分を配列決定する、又は、3)ILD関連対立遺伝子又はその断片（例えばエンドヌクレアーゼ消化により生じた断片）の電気泳動移動度を調べる、を含む様々な技術のいずれによっても検出が可能である。選択的には、対立遺伝子に対し、検出ステップの実行の前に増幅ステップを行ってもよい。好適な増幅ステップは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、ストランド・ディスプレイメント増幅法（SDA）、クローニング、及び上記の変更例（例えばRT-PCR及び対立遺伝子特異的増幅法など）から成る群のいずれかから選択される。増幅用のプライマは、（PCR増幅に必要なように）目的のマーカに隣り合うか、又は、（ASOハイブリダイゼーションのように）前記マーカに直接重なり合うように選択することができる。IL-1及びTNFA遺伝子にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマは、市販のプライマ選択プログラムを用いて容易に選択することができる。特に好適な実施例では、試料を、5'側及び/又は3'端でセンス配列又はアンチセンス配列

でILD関連対立遺伝子にハイブリダイズする一組のプライマを用いて、ハイブリダイズし、PCR増幅を行う。

#### 【0063】

別の態様では、本発明は、上記のアッセイを行うためのキットを特徴とする。前記キットには、核酸試料採取手段と、被験体がILD関連対立遺伝子を保有するかどうかを調べる手段とを含めることができる。前記キットにはさらに、陰性又は陽性のコントロール試料、あるいは標準を含めてもよい。さらに前記キットに、同一性マッチを評価するためのアルゴリズム装置を含めてもよい。前記アルゴリズム装置は、コントロールと組み合わせて用いても、又はコントロールから独立に用いてもよい。本発明のキットには、さらに、例えばDNA増幅試薬、ポリメラーゼ、核酸精製試薬、制限酵素、制限酵素バッファ、核酸サンプリング装置、デオキシヌクレオチド(dNTP)、等々、多種の更なる成分を含めてもよい。ここに説明したアッセイ及びキットを用いて得た情報(単独で、あるいは、ILDに寄与する別の遺伝子欠陥因子及び環境因子に関する情報と組み合わせて)は、症状のない患者が、ILD、又は、より一般的には、検出された対立遺伝子パターンが起こすもしくは寄与する疾患又は状態を有するもしくは発生する可能性があるかどうかを調べるのに有用である。加えて、前記情報を、単独で、又は、ILDに寄与する別の遺伝子欠陥に関する情報と組み合わせて用いることで、ILDに関連する症状の発現を妨げたり、又は、前記疾患の終末段階である非可逆的な線維症への進行を妨げたりするための、治療のカスタマイゼーションが可能となる。例えば、この情報によって、臨床医は、1)ILDの分子的基礎に対処することとなる治療薬をより効果的に処方することができ、また2)特定の被験体に対する特定の治療薬の適した用量をより良好に決定することができる。

#### 【0064】

さらに別の態様では、本発明は、被験体に対し、薬学的に有効量の本発明のILD治療薬を投与することにより、被験体のILDを処置する又はその発生を妨げる方法を特徴とする。さらに別の態様では、本発明は、ILD治療薬を特定するためにテスト化合物をスクリーニングするためのインビトロ及びインビボアッセイを提供する。一実施例では、前記スクリーニングアッセイは、適したプロモータに操

作により連結したILD原因変異にトランスフェクトした細胞をテスト化合物に接触させるステップと、前記テスト化合物の存在下及び不在下で、前記細胞中のタンパク質の発現レベルを判定するステップとを含む。好適な実施例では、前記ILD原因変異の結果、IL-1受容体アンタゴニストの産生が減少する一方、前記テスト化合物の存在下ではIL-1受容体アンタゴニスト又はTNF- $\alpha$ の産生が増加すれば、前記化合物はIL-1受容体アンタゴニスト又はTNF- $\alpha$ 活性のアゴニストであることを示す。別の実施例では、本発明は、IL-1 $\beta$ 、IL-1 $\alpha$ もしくはTNF $\alpha$ 活性のアンタゴニスト、又は、IL-1Ra活性のアゴニストを同定する上での、ヒト以外のトランスジェニック動物及びそれらの利用を特徴とする。

#### 【0065】

本発明のその他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明及び請求の範囲から明白となるであろう。

#### 【0066】

発明の詳細な説明

定義

本明細書、例及び請求項で使用されるいくつかの用語及び文言の意味を、参考のために下記に集めた。更に、これらの用語及び文言は、明細書全体に関連して理解されるべきものである。

#### 【0067】

「対立遺伝子」という用語は、被験体から得たDNAにおける複数の異なる多型部位を占める、複数の異なる配列変異型を言う。例えば、IL-1RN(VNTR)は、少なくとも5つの異なる対立遺伝子を有する。配列変異は、挿入、欠失又は置換を無制限に含む単一の又は複数の塩基変異であるかも知れないし、又は、可変数の配列の繰り返しかも知れない。ある遺伝子座における対立遺伝子変異型には、通常、その頻度と逆順に番号がつけられる。二対立遺伝子の場合の対立遺伝子は、頻度の高い方の対立遺伝子是对立遺伝子1であるが、低い方の対立遺伝子是对立遺伝子2となる。

2/2とは、同型接合対立遺伝子2/対立遺伝子2である状態を指す。

2/1とは、異型接合対立遺伝子2/対立遺伝子1である状態を指す。

## 【0068】

「対立遺伝子パターン」という用語は、1つ又はそれ以上の多型部位における1つまたは複数の対立遺伝子の種類を言う。例えば、ある対立遺伝子パターンが、1つの多型部位を占める単一の対立遺伝子から構成される場合があり、例えばIL-1RN(+2018)対立遺伝子1は、IL-1RN遺伝子座の位置+2018にIL-1RN対立遺伝子1のコピーを少なくとも1つ有する対立遺伝子パターンである。又は、ある対立遺伝子パターンが、単一の多型部位を占める同型接合状態もしくは異型接合状態から構成される場合がある。例えば、IL1-RN(VNTR)対立遺伝子2, 2は、IL-1RNのVNTRマーカを占める第2の対立遺伝子のコピーが2つ存在する、同型接合IL-RN(VNTR)対立遺伝子2状態に対応する対立遺伝子パターンである。又は、ある対立遺伝子パターンが、これらの種類の対立遺伝子が2つ以上の多型部位を占めるものから構成される場合もある。

## 【0069】

ここで使用される「抗体」という用語は、IL-1又はTNFポリペプチドに対して特異的に反応する抗体全体又はその結合断片を含めた結合物質を指すものとして意図されている。抗体を、通常の技術を用いて切断し、その断片を、抗体全体について上述したのと同様の方法でスクリーニングして利用してもよい。例えば、ある抗体をペプシンで処理することにより、F(ab)<sub>2</sub>断片を生成してもよい。生成したF(ab)<sub>2</sub>断片に、ジスルフィド架橋を還元する処理をして、Fab断片を作製してもよい。本発明の抗体は、その抗体の少なくとも1つのCDR領域により付与されるIL-1又はTNFポリペプチドとの親和性を有する、二重特異性、単鎖、キメラ及び人化分子を包含するものとして更に意図されている。

## 【0070】

「生物学的活性」又は「生物活性」又は「活性」又は「生体作用」という用語は、互換可能に使用され、ここではIL-1又はTNFポリペプチド(天然構造であるか変性構造であるかにかかわらず)により直接又は間接に行われるエフェクタ又は抗原作用、或いはその結果を意味する目的で使用される。生物学的活

性には、例えばレセプタなどの標的ペプチドへの結合が含まれる。生物活性を、ポリペプチドへの直接作用により変化させてもよい。又は、例えばポリペプチドをコードしている遺伝子の発現を変化させるなど、ポリペプチドのレベルを変化させることにより、生物活性を変化させてもよい。

【0071】

ここで使用される「生物活性断片」という用語は、全長ポリペプチドの断片を指し、この断片は、野生型ポリペプチドの活性を特異的に模倣するか又はこれに拮抗する。生物活性断片は、レセプタと相互作用可能な断片であることが望ましい。

【0072】

「異常活性」という用語は、野生型の又は天然のポリペプチドの活性と異なる、或いは健康な被験体のポリペプチドの活性と異なる活性を指す。あるポリペプチドの活性は、その本来の活性よりも強い場合、異常であると言える。又は、あるポリペプチドの活性は、その本来の活性よりも弱いかもしくは欠落している場合にも、異常であると言える。異常活性は、活性の変化であることもある。例えば、ある異常なポリペプチドが、異なる標的ペプチドと相互作用してもよい。

【0073】

「細胞」、「宿主細胞」又は「組換え宿主細胞」という用語は、ここでは互換可能に使用され、特定の被験体細胞のみならず、そのような細胞の後代又は潜在的后代も言う。突然変異又は環境上の影響により後代において何らかの改変が起こる可能性があるため、そのような後代は親細胞と実際には同一でなくてもよいが、ここで使用される用語の範疇には含まれるものとする。

【0074】

「キメラ」、「モザイク」、「キメラ哺乳類」及び同様の用語は、そのゲノム含有細胞のうち少なくとも一部にノックイン構造又はノックアウト構造を有するトランスジェニック動物を言う。

【0075】

「対照」又は「対照試料」という用語は、ここで使用する検出法に適したあらゆる試料を言う。対照試料に、ここで使用する対立遺伝子検出法の産物又は検査

対象の材料が含まれてもよい。更に、対照が、(例えばIL-1RN(+2018)対立遺伝子2又はTNFA(-308)対立遺伝子2などの)陽性対照であるか、或いは(例えば前述のマーカの対立遺伝子1などの)陰性対照であってもよい。PCR増幅法により対立遺伝子を検出した後にサイズ分画を行う場合の最終産物対照を例にとると、対照試料に適切な大きさのDNA断片が含まれてもよい。同様に、変異タンパク質の検出により対立遺伝子の検出を行う場合には、対照試料に変異タンパク質の試料が含まれてもよい。ただし、検査対象の材料が対照試料に含まれることが望ましい。例えば、対照がゲノムDNA又はIL-1遺伝子クラスタをクローニングした部分の試料であってもよい。ただし、検査対象の試料がゲノムDNAである場合は、対照試料は、ゲノムDNAを高純度に精製した試料であることが望ましい。

#### 【0076】

「遺伝子の分断」及び「標的分断」又はこれらと類似の語句は、天然のDNA配列を、細胞内におけるその遺伝子の発現がその遺伝子の野生型コピーと比較して阻害されるべく、部位特異的に分断することを言う。分断は、遺伝子の欠失、挿入又は修飾により生じてもよいし、或いは、これらの組合せにより生じてもよい。

#### 【0077】

「遺伝子タイピング」は、疾患を起こす又はその一因となる突然変異又は多型を特定するために、その疾患を引き起こす又はその一因となる遺伝子との連鎖が不平衡である突然変異又は多型(マーカ)を直接に検出することにより、またはこれに基づいて、個体のゲノムDNA(又はこれに対応する核酸)を分析することを言う。

#### 【0078】

「ハプロタイプ」という用語は、グループとして共に遺伝する一連の(連鎖不平衡な)対立遺伝子を言う。ここで使用されるハプロタイプは、統計学上有意なレベル( $P_{corr} < 0.05$ )で発生するハプロタイプを包含するものとして定義される。ここで使用される「IL-1ハプロタイプ」という語句は、IL-1遺伝子座におけるハプロタイプを指し、また、「TNFAハプロタイプ」は、TN

F A 遺伝子座におけるハプロタイプを指す。

【0079】

「間質性肺疾患 (ILD)」という用語は、既知の及び未知の病因により生じる、実質性の炎症及び線維症を特徴とする一連の肺疾患を言う。これらの状態の主な異常部位は、肺胞上皮と毛細血管内皮との間の肺胞壁内の間質組織であるが、これらの疾患における異常な変化は、間質に限定されない。この用語には、急性間質性肺炎、肺線維症、特発性肺線維症、通常型間質性肺炎、剥離性間質性肺炎、肺炎を伴う閉塞性細気管支炎、鉱物曝露性肺炎及び線維症 (珪肺症、石綿肺症、ベリリウム肺症、炭塵肺症、硬金属塵肺症)、成人呼吸窮迫症候群線維症、過敏性肺炎、薬剤に関連する肺炎、放射線曝露による肺炎、酸素曝露による肺炎、サルコイド症、グッドパスチャー症候群、特発性肺血鉄症、PIE症候群、組織球増殖症X、巨細胞性肺炎、リンパ球性間質性肺炎及び全身性リウマチ疾患の炎症/線維症発現からなるグループから選択された疾患が含まれるが、これらに限定されることはない。この用語は、その他の間質性肺疾患を包含してもよい。これらには、(例えばSLE、全身性硬化症などの)結合組織疾患に罹患している患者や、化学療法薬又は抗不整脈アミオダロンによる治療を検討されている患者などのような、組織学上IPFに類似した肺疾患に罹患する危険性のある個人；並びに、(例えば石綿又はある種の塵など)への職業被爆、外因性アレルギー性肺胞炎 - (肉芽種内に高レベルのIL-1RNが発現する)サルコイド症；慢性炎症性肺疾患；成人呼吸窮迫症候群 (ARDS、気管支肺胞洗浄試料におけるIL-1RNの濃度が低いと、ARDS患者の予後が不良となることが示されている)；肺塞栓疾患、特にあらゆる種類の反復性肺塞栓の消散；(マイコバクテリアによる)肺炎、マイコプラズマ性、細菌性、ウィルス性、原虫性、寄生虫性及びその他の、炎症反応を伴う肺炎などの感染性肺疾患；及び、肺刺激物に対する反応性が懸念される個人が含まれるが、これらに限定されることはない。

【0080】

「ILD関連対立遺伝子」は、被験体内における存在が、この被験体が間質性肺疾患に罹患しやすいことを示すような対立遺伝子を言う。ILD関連対立遺伝子の例には、IL-1RNの+2018マーカの対立遺伝子2 (Msp1部位を

有する) ; TNFAの-308マーカの対立遺伝子2 (NcoIにより切断されない)、IL-1RNのVNTRマーカの対立遺伝子2 (240bpのPCR産物) ; IL-1Aの222/223マーカの対立遺伝子4 (132移動性単位(mu)のPCR産物) ; IL-1Aのgz5/gz6マーカの対立遺伝子4 (91muのPCR産物) ; IL-1Aの-889マーカの対立遺伝子1 (NcoI部位を有する) ; IL-1Bの+3954マーカの対立遺伝子1 (2個のTaqI部位を有する) ; IL-1Bの-511マーカの対立遺伝子2 (Bsu36I部位を有する) ; gaat.p33330マーカの対立遺伝子3 (197muのPCR産物) ; 及びY31マーカの対立遺伝子3 (160muのPCR産物) ; IL-1RN遺伝子の1731マーカの対立遺伝子2 (位置1731のA) ; IL-1RN遺伝子の1812マーカの対立遺伝子2 (位置1812のA) ; IL-1RN遺伝子の1868マーカの対立遺伝子2 (位置1868のG) ; IL-1RN遺伝子の1887マーカの対立遺伝子2 (位置1887のC) ; IL-1RN遺伝子の8006マーカの対立遺伝子2 (HpaII又はMspI部位を有する)、IL-1RN遺伝子の8061マーカの対立遺伝子2 (MwoI部位を欠く) 及びIL-1RN遺伝子の9589マーカの対立遺伝子2 (SspI部位を有する)、並びに対立遺伝子2 TNF (-308) が含まれる。

#### 【0081】

「ILD原因作用性突然変異」は、被験体内において間質性肺疾患を引き起こす、またはその一因となる突然変異を言う。好適な突然変異は、IL-1複合体又はTNF-A内で発生するものである。(例えばIL-1A、IL-1B又はIL-1RNなどの) IL-1遺伝子、TNFA A遺伝子又はこれと連鎖した遺伝子座内で発生するILD原因作用性突然変異が、例えば、その遺伝子の開放読み取り枠又はスプライシングパターンを変化させる場合があり、この結果、不活性の又は低活性の遺伝子産物が形成される。例えば、IL-1A遺伝子座のイントロン6で発生する突然変異は、反復単位5から18に相当する可変数の直列反復46bp配列に対応する(Bailly, et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23:1240-45)。これらの反復配列には、転写因子への3つの潜在的結合部位: SP1部位、ウィルスエンハンサー要素及び糖

質コルチコイド反応性要素が含まれる；従って、多数の反復単位を有するIL-1Aイントロン6VNTR対立遺伝子を保有する個体は、IL-1A遺伝子の転写調節が変化しやすく、このために、炎症性サイトカインの発生による異常が発生しやすい。さらに、この多型IL-1A遺伝子座における反復数が増加すると、IL-1合成が減少するという証拠がある(Bailly et al. (1996) Mol Immunol 33:999-1006)。或いは、突然変異の結果、過剰活性遺伝子産物が生成されるのかもしれない。例えば、IL-1Bの対立遺伝子2(+6912のG)の多型は、IL-1B mRNAの3'UTR(非翻訳領域)で発生し、IL-1B mRNA及びIL-1Bタンパク質双方の定常状態レベルの、IL-1B遺伝子の対立遺伝子1(+6912のC)のこれらのレベルと比較したときの約4倍という増加に関連している。更に、IL-1B(-511)突然変異は、陰性糖質コルチコイド反応性要素へのプロモータ結合部位の近くで発生する(Zhang et al. (1997) DNA Cell Biol 16:145-52)。この要素は、デキサメタゾンによるIL-1B発現の抑制力を4倍に強化し、この陰性反応性要素を除去すると、IL-1Bプロモータの活性が2.5倍に増加する。以上のように、IL-1B(-511)多型は、サイトカイン産生及び炎症反応に直接に影響を与える可能性がある。これらの例は、IL-1A又はIL-1B遺伝子内で発生する遺伝子変異が、IL-1サイトカイン活性の発生又は調節を直接に変化させるのかもしれないことを示している。

#### 【0082】

「ILD治療薬」は、被験体における間質性肺疾患の発生を防止又は遅延、あるいはその症状を緩和するあらゆる医薬品又は(薬剤、栄養剤及び外科的手段を含む)治療的養生法を指す。ILD治療薬は、ポリペプチド、ペプチドミメティック、核酸又はその他の無機又は有機分子であってもよいが、好適には、ビタミン、ミネラル及びその他の栄養素を含めた「小さな分子」である。ILD治療薬は、例えば天然に発生するポリペプチドの効果を模倣する、強化する(作用させる)又は阻害する(拮抗する)ことにより、IL-1及び/又はTNF-ポリペプチドの、少なくとも1つの活性、例えば受容体との相互作用など、を調節で

きることが望ましい。アゴニストが、野生型タンパク質又は、例えば受容体結合活性などの少なくとも1つの野生型の生物活性を有する、野生型タンパク質の誘導体であってもよい。また、アゴニストが、ある遺伝子の発現を上方調節する、又はあるタンパク質の少なくとも1つの生物活性を向上させる化合物であってもよい。また、アゴニストが、ポリペプチドと、例えば受容体などの別の分子との相互作用を向上させる化合物であってもよい。アンタゴニストは、あるタンパク質と、例えば受容体などの別の分子との相互作用を阻害又は減少させる化合物であっても、或いは(例えばIL-1変換酵素(ICE)阻害剤などの)シグナル伝達又は翻訳後プロセッシングを遮断する薬剤であってもよい。従って、好適なアンタゴニストは、受容体への結合を阻害するか又は減少させることにより、次に受容体が活性化することを遮断する化合物である。また、アンタゴニストは、遺伝子の発現を下方調節する、又は存在するタンパク質の量を減少させる化合物であってもよい。アンタゴニストは、例えば受容体などの標的ペプチドと相互作用可能である一方でその受容体の活性化を促進しないポリペプチドの一種のような、優性陰性型のポリペプチドであってもよい。また、アンタゴニストは、優性陰性型ポリペプチドをコードする核酸、アンチセンス核酸、又は、RNAと特異的に相互作用可能なリボザイムであってもよい。さらに別のアンタゴニストは、ポリペプチドと結合してその作用を阻害する分子である。そのような分子には、例えば生物活性を持たずに受容体への結合を阻害する形の標的ペプチドなどのペプチドが含まれる。従って、このようなペプチドは、タンパク質の活性部分に結合して、その標的ペプチドとの相互作用を阻害するであろう。さらに別のアンタゴニストには、結合によりポリペプチドの生体作用を妨害すべくある分子のエピトープと特異的に相互作用する抗体が含まれる。さらに別の好適な実施例においては、アンタゴニストは、ポリペプチドと標的受容体との相互作用を阻害可能な分子などの小分子である。又は、この小分子が、受容体結合部分以外の部分と相互作用することにより、アンタゴニストとして作用してもよい。アンタゴニストは、核酸、タンパク質、糖、脂質またはこれらの組合せを含めて、いかなる種類の分子であってもよいが、治療を目的とする場合には小分子であることが望ましい。好適なILD治療薬には：(例えばプレドニソン及びメチルプレドニソンな

どの) コルチコステロイド、(例えばシトキサンなどの) シクロフォスファミド、コルヒチン、(例えばイムランなどの) アザチオプリン、メトトレキセート、ペニシラミン、シクロスポリン及びその他の(例えばクロラムブシル及び硫酸ペンクリスチンなどの) 免疫抑制剤が含まれる。

### 【0083】

「特発性肺線維症 ( I P F ) 」は、一般には、基礎原因疾患仮定が特定されないびまん性の間質炎症及び線維症を特徴とする肺疾患を言う。ここで使用されるこの用語は、呼吸困難症状が観察される散在性の症候群を指し、進行症例では、続発性肺高血圧を伴う低酸素血症及びチアノーゼが起こる。肺組織検査で、重度の肺泡毛細血管ブロックを起こす中隔線維症が観察される。肺の形態学的変化は、疾患の段階によって様々である。初期段階では、肺は、肺水腫、肺泡内浸出、ヒアリン膜、肺泡中隔単核細胞浸潤及び、肺泡腔の内側を覆う立方細胞又は円柱細胞として発生する I I 型肺細胞の過形成といった顕微鏡所見と一致して全体に硬靱である。疾患の進行に伴い、肺泡内浸出物が線維組織を形成し、線維症及び炎症が肺泡内隔膜の肥厚をもたらす。全体としては、肺は線維症領域と正常な肺硬度の領域とが交互に存在して充実している。疾患の末期段階では、肺は内側を立方上皮細胞又は円柱上皮細胞により覆われ、炎症性の線維組織により隔てられた空間で満たされる。リンパ組織の過形成及び肺動脈内膜の肥厚も観察されうる。これらの病的な変化は I P F に特異的なものではなく、むしろ多くの異なる種類の進行 I L D において観察される変化を反映しているため、I P F の診断には、これらの病的な変化の既知の原因を除外することが必要である。I P F は、様々な種類、持続期間及び強度の損傷に対する肺泡壁の常同的な炎症反応を表すものとして理解されている ( K o b z i k a n d S c h o e n , " T h e l u n g , " p p . 6 7 3 - 7 3 4 i n R o b b i n s ' P a t h o l o g i c a l B a s i s o f D i s e a s e , e d s . C o l t r a n e t a l . ( P h i l a d e l p h i a : W . B . S a u n d e r s , 1 9 9 4 ) a t 7 1 4 ) 。最初の損傷の結果、一般には肺泡炎と呼ばれる、炎症性細胞が蓄積した間質性水腫が引き起こされる。i 型膜性肺細胞は、通常このような過程を経て損傷する。次に、i i 型肺細胞が、肺泡上皮細胞内層を再形成す

べく増殖する。この領域が損傷部位を治癒しようとする試みの一部として、線維芽細胞がこの部位に入る。肺胞内隔膜及び肺胞内浸出物における線維増殖の結果、正常な肺構造が閉塞する。

#### 【0084】

ここで使用される「IL-1遺伝子クラスタ」及び「IL-1遺伝子座」という用語は、少なくともIL-1A、IL-1B及びIL-1RN遺伝子並びにその他の連鎖配列を含めた、2番染色体の2q13領域に存在するか又はこの領域近傍の全ての核酸を包含する(Nicklin et al., Genomics 19:382-84, 1994)。ここで使用される「IL-1A」、「IL-1B」及び「IL-1RN」という用語は、それぞれ、IL-1、IL-1及びIL-1受容体のアンタゴニストをコードする遺伝子を言う。IL-1A、IL-1B及びIL-1RNの遺伝子受託番号は、それぞれ、X03833、X04500及びX64532である。

「IL-1作用性突然変異」は、表現型の変化(即ち、IL-1遺伝子又はタンパク質の作用を変化させる)を引き起こすIL-1遺伝子クラスタにおける突然変異を言う。その例には: IL-1A(+4845)対立遺伝子2、IL-1B(+3954)対立遺伝子2、IL-1B(+6912)対立遺伝子2及びIL-1RN(+2018)対立遺伝子2が含まれる。

#### 【0085】

「IL-1X(Z)対立遺伝子Y」は、遺伝子XにおけるIL-1遺伝子座の多型部位で発生する、Yと指定することとする特定の対立遺伝子型を言い、ここでXはIL-1A、B又はRN或いはIL-1遺伝子座における何らかの他の遺伝子であり、またYは、前記特定のIL-1遺伝子Xの主要な読み取り開始位置をヌクレオチド+1としてこれに対応している番号を付与されたヌクレオチドZに存在するか、又はその近傍に位置する。ここでさらに使用される「IL-1X対立遺伝子(Z)」という用語は、ヌクレオチドZに存在するか又はその近傍に位置する遺伝子XにおけるIL-1多型部位の全ての対立遺伝子を指す。例えば、「IL-1RN(+2018)対立遺伝子」という用語は、マーカ+2018にある代替的な形のIL-1RN遺伝子を指す。「IL-1RN(+2018)

対立遺伝子1」は、センス鎖の位置+2018にシトシン(C)を有するIL-1RN遺伝子型を指す。Clay et al., Hum. Genet. 97:723-26, 1996。「IL-1RN(+2018)対立遺伝子2」は、正鎖の位置+2018にチミン(T)を有するIL-1RN遺伝子型を指す。ある被験体が2つの同一のIL-1RN対立遺伝子を有する場合、その被験体は同型接合体である、又は同型接合状態であると言う。ある被験体が2つの異なるIL-1RN対立遺伝子を有する場合、その被験体は異型接合体である、又は異型接合状態であると言う。「IL-1RN(+2018)対立遺伝子2,2」という用語は、同型接合IL-1RN(+2018)対立遺伝子2状態を指す。逆に、「IL-1RN(+2018)対立遺伝子1,1」という用語は、同型接合IL-1RN(+2018)対立遺伝子1状態を指す。「IL-1RN(+2018)対立遺伝子1,2」という用語は、異型接合対立遺伝子1及び2状態を指す。

#### 【0086】

ここで使用される「IL-1に関連する」という用語は、ヒト2番染色体のヒトIL-1遺伝子座(2q12-14)の遺伝子に関連する全ての遺伝子を包含することを意味する。これらには、2番染色体(2q13-14)に位置するヒトIL-1遺伝子クラスターのIL-1遺伝子が含まれ、その中には：インターロイキン-1をコードするIL-1A遺伝子、インターロイキン-1をコードするIL-1B遺伝子及びインターロイキン-1受容体のアンタゴニストをコードするIL-1RN(又はIL-1ra)遺伝子が含まれる。更に、これらのIL-1関連の遺伝子には、ヒト2番染色体(2q12)に位置するI型及びII型ヒトIL-1受容体遺伝子が含まれ、これらのマウス相同体は、マウス染色体1の位置19.5cMに位置している。インターロイキン-1、インターロイキン-1及びインターロイキン-1RNは、いずれもIL-1のI型受容体に結合するという点では関連しているが、このうちインターロイキン-1及びインターロイキン-1のみが、IL-1のI型受容体を活性化させるアゴニストのリガンドであり、一方、インターロイキン-1RNは、天然に発生するアンタゴニストのリガンドである。

## 【0087】

「IL-1」という用語が遺伝子産物又はポリペプチドに関して使用される場合、この用語は、ヒト2番染色体(2q 12-14)のインターロイキン-1遺伝子座によりコードされるすべての遺伝子産物及び他の生物種の対応する相同物又はその作用変異型を指すものとして意図されている。従って、IL-1という用語には、炎症反応を促進する、IL-1 及びIL-1 などの分泌されたポリペプチド及び、炎症反応に拮抗する、IL-1受容体アンタゴニスト及びIL-1のII型(おとり)受容体などの分泌されたポリペプチドが含まれる。

## 【0088】

「IL-1受容体」又は「IL-1R」は、IL-1遺伝子座にコードされたリガンドに結合可能であるか、又はここからの信号を伝達可能である様々な細胞膜結合タンパク質受容体を言う。この用語は、インターロイキン-1(IL-1)分子に結合可能であり、かつ、哺乳動物の細胞膜タンパクの形をとる天然の状態、IL-1から細胞へのシグナル伝達におけるある役割を果たすであろうあらゆるタンパク質に適用される。ここで使用されるこの用語には、IL-1が結合活性又はシグナル伝達活性を有する天然のタンパク質の類似体が含まれる。その例には、米国特許第4,968,607号に記載のヒト及びマウスIL-1受容体が含まれる。「IL-1核酸」という用語は、IL-1タンパク質をコードする核酸を指す。

## 【0089】

「IL-1ポリペプチド」及び「IL-1タンパク質」は、図1、2及び3に図示されたIL-1ゲノムDNA配列によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド又はその断片及びその類似体を包含し、また、アゴニスト及びアンタゴニストポリペプチドを包含するものとして意図されている。

## 【0090】

「危険性の増大」は、特定の多型対立遺伝子を持つ個体における疾患又は状態の発生の頻度が、その特定の多型対立遺伝子を持たない個体群の一員における疾患又は状態の発生の頻度と比較して、統計上高いことを言う。

## 【0091】

ここで使用される「相互作用」という用語は、タンパク質とタンパク質、タンパク質と核酸、核酸と核酸及びタンパク質と小分子又は核酸と小分子との間の天然の相互作用のような、(例えば生化学的相互作用などの)分子間の検出可能な関係又は会合を包含するものとして意図されている。

【0092】

ここでDNA又はRNAのような核酸に関して使用される「単離された」という用語は、天然の巨大分子中に存在する他のDNA又はRNAからそれぞれ単離された分子を指す。例えば、被験体IL-1ポリペプチドのうちの1つをコードする単離された核酸には、好適には、天然ではゲノムDNA内のIL-1遺伝子を直接フランキングする核酸配列が10キロベース(kb)以下含まれ、より好適にはそのような天然に発生するフランキング配列が5kb以下含まれ、最も好適にはそのような天然に発生するフランキング配列が1.5kb未満含まれる。ここで使用される単離されたという用語は、細胞物質、ウィルス性物質又は組換えDNA法による作製時の培地、或いは、化学的合成時の化学的前駆物質又はその他の化学物質を概ね含まない核酸又はペプチドも指す。更に、「単離された核酸」は、断片として天然に発生したのではなく、かつ自然状態では発見されない核酸断片を包含するものとして意図されている。ここでは「単離された」という用語は、他の細胞タンパク質から単離されたポリペプチドをも指して使用され、精製ポリペプチドと組換えポリペプチドとの双方を包含するものとして意図されている。

【0093】

「ノックイン」トランスジェニック動物は、そのゲノム中に変更遺伝子が導入された動物を指し、前記変更遺伝子は、外来のものであっても内在するものであってもよい。

【0094】

「ノックアウト」トランスジェニック動物は、ある内在遺伝子の発現が(例えばその遺伝子の少なくとも一部の削除、その遺伝子の少なくとも一部の第2の配列との置換、停止コドンの導入、重要なアミノ酸をコードしている塩基の変異、又はイントロン接合部の除去などにより)部分的に又は完全に抑制された動物を

指す。

【0095】

「ノックアウト構造」は、細胞内の内在DNA配列によりコードされるタンパク質の発現を減少させる又は抑制するために使用可能な核酸配列を指す。簡単な例では、ノックアウト構造は、そこから活性タンパク質が発現されないように重要な部分が削除された、IL-1RN遺伝子などの遺伝子からなる。或いは、多数の終止コドン天然遺伝子に付加し、そのタンパク質の終結を早めるか、又はイントロン接合部を不活性化させてもよい。典型的なノックアウト構造においては、(neo遺伝子のように)遺伝子の一部が選択可能なマーカと置換されたことにより、その遺伝子が：IL-1RN5' / neo / IL-1RN3' として表され、ここでIL-1RN5' 及びIL-1RN3' は、そのIL-1RN遺伝子の一部に対してそれぞれ上流及び下流に位置するゲノム又はcDNA配列を指し、また、neoとはネオマイシン耐性遺伝子であることを指す。別のノックアウト構造においては、フランキング位置に第2の選択可能なマーカが付加されたことにより、その遺伝子が：IL-1RN / neo / IL-1RN / TKとして表され、ここでTKは前述の構造のIL-1RN5' 又はIL-1RN3' 配列のいずれかに付加可能な、かつ適切な媒質内で選別される(即ち、陰性の選択可能なマーカである)チミジンキナーゼ遺伝子である。この二重マーカ構造により、通常TK配列を残す非相同的組換えから、フランキングTK配列を除去する相同的組換え事象を選別することが可能である。前記遺伝子の削除及び/又は置換が、エキソン、イントロン、特にイントロン接合部、及び/又はプロモータのような調節領域から行われてもよい。

【0096】

「連鎖不平衡」とは、2つの対立遺伝子が、任意の対照個体群におけるそれぞれの対立遺伝子の別個の出現頻度から予測される頻度よりも高い頻度で同時に遺伝することを言う。独立に遺伝した2つの対立遺伝子の予測される出現頻度は、第1の対立遺伝子の頻度と第2の対立遺伝子の頻度との積である。予測された頻度で同時に出現する対立遺伝子を、「連鎖平衡である」と言う。連鎖不平衡の原因は明らかでない場合が多い。ある種の対立遺伝子の組合せの自然選択によるの

かもしれないし、又は遺伝的に異質の個体群が最近混合したことによるのかもしれない。加えて、疾患遺伝子と非常に緊密に連鎖したマーカでは、疾患変異が最近起きたために、特定の染色体領域における組換え事象により平衡を得るのに十分な時間が経過していない場合、対立遺伝子（又は連鎖対立遺伝子群）と疾患遺伝子との関連が予想される。複数の対立遺伝子からなる対立遺伝子パターンについては、第1の対立遺伝子パターンを有する全ての対立遺伝子が第2の対立遺伝子パターンの対立遺伝子の少なくとも1つと連鎖不平衡である場合、第1の対立遺伝子パターンは第2の対立遺伝子パターンと連鎖不平衡である。連鎖不平衡の一例は、IL-1RN(+2018)及びIL-1RN(VNTR)多型部位の対立遺伝子間で出現する。IL-1RN(+2018)の2つの対立遺伝子は、IL-1RN(VNTR)で最も高頻度に出現する2つの対立遺伝子である対立遺伝子1及び対立遺伝子2と、100%連鎖不平衡である。

#### 【0097】

「マーカ」という用語は、個体により異なることが知られているゲノム中の配列を指す。例えば、IL-RN遺伝子は、可変数の直列繰り返し配列(VNTR)からなるマーカを有する。ここで述べられるマーカIL-1RN(+2018)を、ILD罹患性向の識別に使用してもよい。

#### 【0098】

「突然変異遺伝子」又は「突然変異」又は「作用突然変異」は、ある突然変異を持たない被験体に対して、その突然変異を持つ被験体の表現型を変化させることの可能な、遺伝子の対立遺伝子型を言う。突然変異により変化した表現型を、何らかの薬剤により補正又は補償することが可能である。被験体がこの突然変異により表現型を変化させるためには同型接合体でなければならない場合には、この突然変異は劣性であると称される。突然変異した遺伝子の複製1個のみで被験体の表現型を変化させられる場合は、この突然変異は優性であると称される。被験体が突然変異した遺伝子の複製を1個持っており、かつその表現型が、(その遺伝子に関して)同型接合体である被験体の表現型と異型接合体である被験体の表現型との中間に当たる場合には、この突然変異は共優性であると称される。

#### 【0099】

本発明の「ヒト以外の動物」には、齧歯類、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギなどの哺乳動物が含まれる。好適なヒト以外の動物は、ラット及びマウスを含めた齧歯類であり、最も好適にはマウスであるが、アフリカツメガエル属のようなトランスジェニック両生類やトランスジェニックニワトリも、例えば胚形成及び組織形成に影響を与えうる物質を理解し特定する上で、重要な役割を果たすことが可能であろう。「キメラ動物」という用語は、ここでは組換え遺伝子を持つ、又は全てではないが一部の細胞で組換え遺伝子が発現した動物を指すのに用いられる。「組織特異的キメラ動物」という用語は、組換えIL-1遺伝子のうちの1つが、ある組織のみにおいて存在し及び/又は発現し、又は破壊されていることを示す。「ヒト以外のほ乳動物」という用語は、ヒトを除く哺乳類の任意の仲間を指す。

#### 【0100】

ここで使用される「核酸」という用語は、デオキシリボ核酸(DNA)及び適切な場合にはリボ核酸(RNA)などのポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドを指す。この用語はまた、その等価物として、(例えばペプチド核酸などの)ヌクレオチド類似体及び、記載した実施例に適用可能である場合には、一本鎖(センス又はアンチセンス)及び二本鎖ポリヌクレオチドから作製されたRNA又はDNAのうちいずれかの類似体をも包含するものとして理解されるべきである。

#### 【0101】

「多型」という用語は、複数の遺伝子型又は(例えば対立遺伝子変異型などの)その一部分が共存することを言う。少なくとも2つの異なる型が存在する、即ち2つの異なるヌクレオチド配列が存在する遺伝子の一部分を、「遺伝子の多型領域」と言う。遺伝子の多型領域における特定の遺伝子配列が、対立遺伝子である。多型領域は単一のヌクレオチドであってもよく、その種類は対立遺伝子の種類により異なる。多型領域が複数のヌクレオチドの長さであってもよい。

#### 【0102】

「疾病に対する性向」及び、「疾病素質」又は疾病に対する「易罹患性」または同様の語句は、ある複数の対立遺伝子がILDに関連している、又はその前兆

となることがここで判明していることを意味する。従って、疾病に罹患した個体における対立遺伝子の頻度は、健康な個体の場合と比較して高く表されている。このことから、これらの対立遺伝子を利用して、発症前の又は罹患前の個体においても疾患を予測することが可能である。

【0103】

ここで使用される「小分子」は、分子量約5 kD未満であり、最も好適には約4 kD未満である組成物を指すことを意図されている。小分子は、核酸、ペプチド、ペプチドミメティック、糖、脂質或いはその他の有機又は無機分子であってもよい。

【0104】

ここで使用される「特異的にハイブリダイズする」又は「特異的に検出する」という用語は、核酸分子が試料核酸の少なくとも約6個の連続したヌクレオチドとハイブリダイズする能力を指す。

【0105】

「全身性リウマチ障害」は、少なくとも以下の障害を含むグループから選択された疾患を指す：全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、全身性硬化症、皮膚筋炎/多発性筋炎、混合型結合組織病、強直性脊髄炎及び血清陰性脊髄関節症。

【0106】

「転写調節配列」は、開始シグナル、エンハンサ及びプロモータなどの、これらが作用可能に連鎖しているタンパク質コード配列の転写を誘導する、又は制御するDNA配列を総称して本明細書中で使用される用語である。

【0107】

ここで使用される「導入遺伝子」という用語は、細胞内に導入された、(例えばIL-1ポリペプチドのうちの1つ又はそのアンチセンス転写産物をコードする)核酸配列を意味する。導入遺伝子は、導入されるトランスジェニック動物又は細胞とは部分的に又は全体的に異種である、即ち外生のものであってもよいし、或いは、導入されるトランスジェニック動物又は細胞の内在遺伝子と同種的であってもよいが、その動物のゲノムに挿入される際に、挿入される細胞のゲノム

を変化させるような方法で挿入されるか、又は挿入されるようデザインされている（即ち、天然の遺伝子の位置とは異なる位置に挿入されるか、又は挿入の結果ノックアウトが起こる）。また、導入遺伝子が、エピゾームの形で細胞内に存在してもよい。導入遺伝子に、1つ又はそれ以上の転写調節配列及び、選択された核酸の最適な発現に必要であると思われるイントロンなどの他の任意の核酸が含まれてもよい。

#### 【0108】

「トランスジェニック動物」は、その動物の1つ又はそれ以上の細胞が、当業者に周知の遺伝子導入技術などにより人工的に導入された異種の核酸を有する、好適にはヒト以外の哺乳類、鳥類又は両生類である任意の動物を指す。核酸は、顕微注射又は組換えウィルスへの感染などの計画的遺伝子操作により、細胞の前駆物質内に直接に又は間接に導入されることにより、細胞に導入される。遺伝子操作という用語は、組換えDNA分子の導入を指すものであり、従来 of 交雑育種や体外受精は含まれない。この分子を染色体中に組み込んでよいし、又はこの分子が染色体外でDNA複製を行ってもよい。ここに記載した典型的なトランスジェニック動物では、導入遺伝子は、IL-1又はTNFポリペプチドのいずれかの組換え型、即ち、作用型又は拮抗的阻害型を細胞に発現させる。但し、例えば後記のFLP又はCREリコンビナーゼ依存構造物のように、組換え遺伝子が無形質であるトランスジェニック動物もあり得る。更に、「トランスジェニック動物」には、1つ又はそれ以上の遺伝子の破壊が組換え及びアンチセンス法の双方を含めた人為的な方法により引き起こされる組換え動物も含まれる。この用語は、全ての子孫を包含することを意図されている。従って、初代動物及び全てのF1、F2、F3など、及びこれらの後代が含まれる。

#### 【0109】

ここで使用される「治療」という用語は、ある状態又は疾患の少なくとも1つの症状を治癒及び緩和することを包含するものとして意図されている。

#### 【0110】

「ベクター」という用語は、自身が連結された別の核酸を運搬することの可能な核酸分子を指す。好適なベクターの一種はエピゾーム、即ち染色体外複製が可

能な核酸である。好適なベクターは、自身が連結された核酸の自律的な複製及び / 又は発現の可能なベクターである。操作により連結された先の遺伝子の発現を命令できるベクターを、ここでは「発現ベクター」と言う。一般に、組換えDNA技術において使用される発現ベクターは、ベクターの形では染色体と結合しない環状二本鎖DNAループを一般に指す「プラスミド」の形を取ることが多い。プラスミドは、ベクターの最も一般的に使用される形であるので、本明細書中では、「プラスミド」と「ベクター」とは互換可能に用いられる。ただし、本発明は、同等の作用を有する、ここで後に当業者に明らかとなる発現ベクターのその他の形も包含することを意図されている。

#### 【0111】

「野生型対立遺伝子」という用語は、被験体内に2つの複製が存在すると野生型表現型が発現する対立遺伝子を指す。ある遺伝子においてあるヌクレオチドが変化しても、そのヌクレオチド変化を有するその遺伝子の複製を2つ有する被験体の表現型は変化しない場合があるため、ある特定の遺伝子には複数の異なる野生型対立遺伝子が存在しうる。

#### 【0112】

予測薬

ILD関連多型

本発明は、少なくとも部分的には、被験体における間質性肺疾患の発生に（統計上有意な程度に）関連する対立遺伝子の同定に基づく。特に、以下の例に示されるように、IL-1RN(+2018)対立遺伝子2及びTNFA(-308)対立遺伝子2は、ILDに関連することが示されている。従って、被験体においてこれらの対立遺伝子が検出されると、その被験体がILDに罹患している、又は罹患しやすいことが分かる。しかし、これらの対立遺伝子が他の対立遺伝子と連鎖不平衡であるために、そのような他の連鎖した対立遺伝子を検出することによっても、被験体がILDに罹患している、又は罹患しやすいことが示される。例えば、エキソン2(8006)(GenBank:X64532 at 8006)多型、Clay et al., Hum. Genet. 97:723-26, 1996としても称されるIL-1RN(+2018)対立遺伝子2は

、44112332ヒトハプロタイプ的一种であるIL-1RN(VNTR)対立遺伝子2と連鎖不平衡である。Cox et al., Am. J. Human Genet. 62:1180-88, 1998; 国際特許出願番号PCT/GB98/01481。更に、IL-1(44112332)炎症誘発性ハプロタイプの下記の対立遺伝子は、IL-1RN(+2018)対立遺伝子2と連鎖不平衡であることが知られている: IL-1Aの222/223マーカの対立遺伝子4(ジヌクレオチド反復多型(HUGO GDB:190869); IL-1Aのgz5/gz6マーカの対立遺伝子4(トリヌクレオチド反復多型(HUGO GDB:177384; Zuliani et al., Am. J. Hum. Genet. 46:963-69, 1990); IL-1Aの-889マーカの対立遺伝子1(一塩基変異マーカ-HUGO GDB:210902; McDowell et al., Arthritis and Rheumatism 38:221-28, 1995); IL-1Bの+3954マーカの対立遺伝子1(一塩基C/T変異; di Giovine et al., Cytokine 7:606(1995); Pociot et al. Eur J. Clin. Invest. 22:396-402, 1992); IL-1Bの-511マーカの対立遺伝子2; gaat.p33330マーカの対立遺伝子3; 及びY31マーカの対立遺伝子3。

### 【0113】

IL-1RN選択的エキソン(エキソンlic、遺伝子産物の細胞内型を産生する、GENX77090)における3つのその他の多型は、IL-1RN(+2018)対立遺伝子2と連鎖不平衡である。これらには: IL-1RNエキソンlic(1812)多型(GenBank:X77090の1812); IL-1RNエキソンlic(1868)多型(GenBank:X77090の1868); 及びIL-1RNエキソンlic(1887)多型(GenBank:X77090の1887)がある。遺伝子の交互にスプライシングされた細胞内型のプロモータの更に別の多型である、Pic(1731)多型(GenBank:X77090の1731)もまた、IL-1RN(+2018)対立遺伝子2と連鎖不平衡である。これらのIL-1RN多型遺伝子座のそれぞれに対応

する配列変化を下記に示す。

対立遺伝子 No.	エクソン2 (IL-1RNの +2018)	エクソン Lie-1 (GB: X77090の 1812)	エクソン Lie-2 (GB: X77090 の1865)	エクソン Lie-3 (GB: X77090の 1887)	Pie (GB: X77090 の1731)
1	T	G	A	G	G
2	G	A	G	C	A

Clay et al., Hum. Genet. 97:723-26, 1996。これらの多型遺伝子座のそれぞれについて、対立遺伝子2配列変異型がIL-1RN(+2018)対立遺伝子2と連鎖不平衡であることが判明している。

#### 【0114】

当業者は、上述の対立遺伝子パターンに加えて、IL-1RN(+2018)対立遺伝子2と連鎖不平衡である他の(多型及び変異を含む)対立遺伝子を容易に同定することが可能であろう。例えば、ILDに罹患していない第1の被験体グループから核酸試料を採取し、ILDに罹患している第2の被験体グループからDNAを採取してもよい。次に核酸試料を比較して、第1のグループと比較して第2のグループでより多く表れている対立遺伝子を同定してもよい。そのような対立遺伝子は、ILDと関連していることが推定される。又は、あるILD関連対立遺伝子と連鎖不平衡である対立遺伝子を、例えば大規模集団について遺伝子型を判定し、統計的分析を行って、どの対立遺伝子が予測されたよりも多く一緒に出てくるかを調べてもよい。遺伝的関係を有する個体群からなるグループを選択することが望ましい。遺伝的関係を有する個体群には、同じ人種、同じ民族、または同じ家族の出身の個体群が含まれる。対照グループと検査グループとの間の遺伝的関係の程度が高いほど、病原対立遺伝子からずっと離れて連鎖している多型対立遺伝子の予測値も大きくなる。これは、始祖個体群の染色体上で連鎖している多型を遺伝子の乗換えにより再分散させるための進化時間が、少ししか経過していないためである。従って、人種特異的、民族特異的及び家族特異的な診断遺伝子タイピングを発展させれば、例えば主な人種の分岐の後、ヒト集団が複数の明確な民族集団へと分かれた後、さらには特定の家系の近年の歴史においてなど、ヒトの進化の中でより最近になって発生した疾患対立遺伝子の検出を可能にすることができる。

## 【0115】

2つの多型マーカの間、又は1つの多型マーカと病原変異との間の連鎖不平衡は、準安定状態である。選択圧力がかけたり、原変異が時々連続して再発することがなければ、多型は最終的には染色体の組換えにより関連性を失い、この結果、ヒトの進化過程の中で連鎖平衡に至るであろう。従って、ある疾患又は状態に関して連鎖不平衡となっている多型対立遺伝子を発見する可能性は、少なくとも2つの因子の変化、即ち、多型マーカと病原変異との間の物理的距離が短いことと、連鎖している対を分離させる減数分裂世代数の少ないこととにより、高くなるであろう。後者の因子を考察して分かるのは、2つの個体がより密接な関係を有するほど、連鎖多型の含まれた共通の親染色体又は染色体領域を彼らが共有している可能性が高くなり、そして各世代で起こる減数分裂時の乗換えによってこの連鎖している対が分離する可能性が低くなるということである。この結果、2つの個体がより密接な関係を有するほど、大きく距離の開いた多型が共に遺伝する可能性が高い。従って、共通の人種、民族又は家系の関係を有する個体に関しては、より大きく離間した対立遺伝子座が、連鎖した病原突然変異の遺伝の指標としての信頼性が高いと言えよう。

## 【0116】

IL-1A、IL-1B又はIL-1RN、TNFA又はこれに関連する遺伝子などの、IL-1遺伝子座の特定の遺伝子とハイブリダイズする適切なプローブを作成してもよい。これらのゲノムDNA配列は、図1-4にそれぞれ図示されており、更に、正規のSEQ ID番号1-4にそれぞれ対応している。又は、これらのプローブに、遺伝子間配列を含めた関連する遺伝子座の他の領域を取り入れてもよい。ヒト2番染色体のIL-1領域は、塩基対400,000個にわたり、1つの一塩基多型が平均1,000塩基対ごとにあると仮定すると、遺伝子座だけでおよそ400個のSNPを有することになる。本発明で使用可能な更に別の多型は、様々な公的な入手元から入手可能である。例えば、ヒトゲノムデータベースは遺伝子間SNPを集めたもので、配列で検索可能であり、現在のところ約2,700種類が登録されている(<http://hgbase.interactive.de>)。また、マサチューセッツ工科大学が所有するヒト

多型データベース(MIT SNPデータベース(<http://www.genome.wi.mit.edu/SNP/human/index.html>))も利用できる。これらの入手元から、SNPやその他のヒト多型を入手してもよい。

#### 【0117】

例えば、これらのデータベースの何れか1つでヒトゲノムのIL-1領域を調べると、IL-1遺伝子座の遺伝子が、127.4cM(センチモルガン)でマイクロサテライトマーカAFM220ze3(GenBank Acc.No.Z17008を参照のこと)として表されるセントロメアに近い側の多型マーカ、及び、127.9cMにおけるマイクロサテライトアンカーマーカAFM087xa1(GenBank Acc.No.Z16545を参照のこと)として表される末端側の多型マーカに両側をフランクされていることが分かる。これらのヒト多型遺伝子座は、双方ともCAジヌクレオチド反復マイクロサテライト多型であり、従って、ヒト集団の中で高い異型接合性を示す。例えば、AFM220ze3の一つの対立遺伝子は、配列TGTAACCTAAGCCACCCCTT-TAGAGC(SEQ ID No.5)の5'プライマ及び配列TGGCCTCCAGAAACCTCCAA(SEQ ID No.6)の3'プライマにより、211bpのPCR増幅産物を生じる。更に、AFM087xa1の一つの対立遺伝子は、配列GCTGATATTCTGGTGGGAAA(SEQ ID No.7)の5'プライマ及び配列GGCAAGAGCAAACTCTGTC(SEQ ID No.8)の3'プライマにより、177bpのPCR増幅産物を生じる。これらのヒト2番染色体のCAジヌクレオチド反復多型の5'側及び3'側にある非反復配列に対応する同等のプライマは、当業者に明らかであろう。適切な同等プライマには、指定されたプライマの約1kb以内でハイブリダイズし、更に長さが約17bpから約27bpの間であるプライマが含まれる。非反復ヒト染色体ゲノム配列の増幅に使用するプライマの作製においては、これらのプライマの融解温度が少なくとも約50であるが、適切な融解温度は、式 $T_{melt} = [2 \times (A \text{ 又は } T \text{ の数}) + 4 \times (G \text{ 又は } C \text{ の数})]$ を用いて推定できることが大体の目安となる。

## 【0118】

これらの2つのCAジヌクレオチド反復多型の間、多数のその他のヒト多型遺伝子座が見受けられ、家族或いはその他の遺伝的関係を有するグループにおけるILD予後対立遺伝子の検出のさらなる標的となる。例えば、ナショナル・センター・フォーバイオテクノロジー・インフォメーションのウェブサイト(www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap/)には、IL-1遺伝子座領域における多型マーカが多数記載されており、これらのマーカの増幅及び分析のための適切なプライマの作製の指標となっている。

## 【0119】

従って、本発明のヌクレオチド部分を利用して、ヒト染色体2q12-13の相補配列を有する二本鎖分子を、又はその領域のcDNAを選択的に作製してもよいし、又は、DNA又はcDNAをこの領域から増幅するためのプライマを作製してもよい。この目的で適切なプローブを作成するに当たっては、多くの点について考慮する必要がある。例えば、10、15又は18ヌクレオチドからおおよそ20又はおおよそ30ヌクレオチドの長さの断片には、格別の実用性が見出されるであろう。複数の実施例においては、例えば40、50、80、90、100から完全長に至るまでのさらに長い配列がより望ましい。少なくとも約18から20ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドは、十分に特異的なハイブリダイゼーションを可能とするのに充分であり、その結果有用な分子プローブであるため、当業者に広く使用されている。さらに、使用目的によっては、標的配列に対するプローブの様々な程度の選択性を得るために、様々なハイブリダイズ条件することが望ましい場合もあろう。高い選択性を要する用途の場合は、通常、ハイブリッドを形成するのに比較的緊縮条件を利用することが望ましいであろう。例えば、温度約50 から約70 の0.02M-0.15MのNaClといった、比較的低い塩濃度及び/又は高い温度条件が挙げられる。これらのような選択的な条件下では、プローブとテンプレート又は標的鎖との間にミス対合はほとんど発生せず、発生したとしてもごくわずかであろう。

## 【0120】

対立遺伝子の検出

ヒト多型遺伝子座における特定の対立遺伝子の検出には、様々な方法を用いることができる。特定の多型対立遺伝子を検出する好適な方法は、その多型の分子的特性に部分的に左右される。例えば、一塩基多型の検出に用いる好適な方法が、VNTR多型の検出に用いる方法と異なってもよい。

#### 【0121】

大まかに言うと、特定の対立遺伝子の検出を、例えば制限断片長多型(RFLP)、核酸シーケンシング、対立遺伝子特異性オリゴヌクレオチド(ASO)ハイブリダイゼーションなどの、ハイブリダイゼーション、サイズ、又は配列に基づく核酸法により行ってもよい。一実施例においては、検出方法に、女性から採取した試料DNAにおけるILD関連対立遺伝子の存在を検出することが含まれてもよい。例えば、ILD関連対立遺伝子に対するセンス又はアンチセンス配列とハイブリダイズすることが可能なヌクレオチド配列の一領域を持つ核酸プローブを有する核酸組成物を、次のように用いてもよい：試料中の核酸をハイブリッド可能にし、プローブを試料核酸と接触させ、プローブの試料核酸とのハイブリダイゼーションを検出する。このような方法を、ゲノム又はmRNAレベルのいずれかにおける変異又は対立遺伝子の変異型の検出及び、適切な場合には、mRNA転写物レベルの測定に用いてもよい。

#### 【0122】

別の一実施例では、IL-1RN(VNTR)対立遺伝子2などの、VNTR多型におけるILD関連対立遺伝子を測定してもよい。例えば、IL-1RN(VNTR)多型部位の直列反復数を、分析対象の核酸を増幅し、その増幅産物のサイズを分析してその部位の対立遺伝子の種類を調べることにより、測定してもよい。

#### 【0123】

好適な検出方法は、ILD関連対立遺伝子と重複し、およそ5、10、20、25又は30個のヌクレオチドを突然変異又は多型領域の周囲に有するプローブを利用した、ASOハイブリダイゼーションである。本発明の好適な実施例においては、EOMに関与した他の対立遺伝子変異型と特異的にハイブリダイズすることの可能な複数のプローブを、例えば「チップ」(最高250,000個のオ

リゴヌクレオチドを支持可能である)などの固相の支持体に付着させてもよい。オリゴヌクレオチドを、リソグラフィを含めた様々な方法を用いて固形支持体に結合させてもよい。オリゴヌクレオチドを含有するこれらのチップを用いた突然変異検出分析は、「DNAプローブアレイ」とも呼ばれ、例えば Cronin et al., Human Mutation 7:244, 1996 に記載されている。一実施例においては、チップが、遺伝子の少なくとも1つの多型部位における全ての対立遺伝子変異型を含有している。次に、固相支持体を検査核酸と接触させ、特定のプローブとのハイブリダイゼーションを検出する。このように、簡易なハイブリダイゼーション試験で、1つ又はそれ以上の遺伝子の多数の対立遺伝子変異型の種類を判別することが可能である。

#### 【0124】

これらの方法に、分析の前に核酸を増幅するステップが含まれてもよい。増幅法は当業者に周知であり、クローニング、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、特定の対立遺伝子のポリメラーゼ連鎖反応(ASA)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、ネスティッドPCR、自立的配列複製(Guatelli, J.C. et al., Proc. Natl. Sci. USA 87:1874-78, 1990)、転写増幅系(Kwoh, D.Y. et al., Proc. Natl. Sci. USA 86:1173-77, 1989)及びQ-ベータレプリカーゼ(Lizardi, P.M. et al., Bio/Technology 6:1197, 1988)が含まれるが、これらに限定されることはない。

#### 【0125】

増幅産物について、サイズ分析、サイズ分析前の制限消化、反応産物中の特定の標識オリゴヌクレオチドプライマの検出、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASO)ハイブリダイゼーション、対立遺伝子特異的5'エキソヌクレアーゼ検出、シーケンシング、ハイブリダイゼーションなどを含めた様々な方法でアッセイを行ってもよい。

#### 【0126】

PCRに基づく検出手段に、多数のマーカを同時に増幅することが含まれてもよい。例えば、PCRプライマを選択して、サイズが重複していない、同時に分

析することの可能な複数のPCR産物を生成させることは、当業者に周知である。又は、それぞれに異なる標識を付けたためにそれぞれを個別に検出可能なプライマを有する複数の異なるマーカを増幅することも可能である。当然のことながら、ハイブリダイゼーションに基づく検出手段によって、一試料内の複数のPCR産物を個別に検出することが可能である。複数のマーカを同時に分析する他の方法は、当業において周知である。

#### 【0127】

単に例示的な一実施例においては、この方法に(i)患者から細胞試料を採取するステップと、(ii)(例えばゲノム、mRNAまたはその両方の)核酸を試料細胞から単離するステップと、(iii)核酸試料を、IL-1RN(+2018)対立遺伝子2又はこの対立遺伝子と連鎖不平衡である任意の核酸配列に特異的にハイブリッドする1つ又はそれ以上のプライマに、所望のマーカのハイブリダイゼーション及び増幅が起こるような条件下で接触させるステップと、(iv)増幅産物を同定するステップと、が含まれる。これらの検出方法は、存在する核酸分子の数が非常に少ない場合に、そのような分子を検出するのに特に有用である。

#### 【0128】

当該アッセイの好適な一実施例においては、制限酵素の開裂パターンの変化からIL-1RN(+2018)対立遺伝子2又はTNFA(-308)対立遺伝子2を特定する。例えば、試料及び対照DNAを単離し、(任意に)増幅し、1つ又はそれ以上の制限エンドヌクレアーゼで消化し、ゲル電気泳動法により断片長サイズを測定する。

#### 【0129】

さらに別の一実施例においては、当業において周知の様々なシーケンシング反応のいずれかを用いて、IL-1RN(+2018)対立遺伝子2またはこれと連鎖不平衡である核酸配列を直接に配列決定してもよい。シーケンシング反応の例には、Maxim及びGilbertにより開発された方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:560, 1977)又はSangerにより開発された方法(Sanger et al., Proc. Nat. Ac

ad. Sci. USA 74:5463, 1977)に基づく反応が含まれる。また、当該アッセイ(Biotechniques 19:448, 1995)を行う場合は、質量分析によるシーケンシング(例えばPCT公報WO94/16101; Cohen et al., Adv. Chromatogr. 36:127-62, 1996及びGriffin et al., Appl. Biochem. 38:147-59, 1993を参照のこと)を含めた、様々な種類の自動シーケンシング法のいずれかを利用してよいことも企図されている。いくつかの実施例においては、1個、2個又は3個のみの核酸塩基をシーケンシング反応で測定する必要があることが、当業者に明らかとなるであろう。

#### 【0130】

さらに別の実施例においては、(ヌクレアーゼ、ヒドロキシルアミン又はオスミウム酸及びピペリジン)などの開裂剤からの保護作用を利用して、RNA/RNA又はRNA/DNA又はDNA/DNAヘテロ二本鎖におけるミス対合塩基を検出してもよい(Myers et al., Science 230:1242, 1985)。概して、「ミス対合開裂」に関する方法においては、最初に、野生型対立遺伝子を含有する(標識した)RNA又はDNAを試料とハイブリダイズすることにより形成されたヘテロ二本鎖を作成する。この二本の鎖になった二本鎖を、対照鎖と試料鎖の塩基対のミス対合のために存在するであろうような、この二本鎖の一本鎖領域を開裂する物質で処理する。例えば、RNA/DNA二本鎖をRNA分解酵素で処理しても、そしてDNA/DNAハイブリッドをS1ヌクレアーゼで処理して、ミス対合領域を酵素分解してもよい。別の複数の実施例においては、ミス対合領域を分解するために、DNA/DNA二本鎖又はRNA/DNA二本鎖のいずれかを、ヒドロキシルアミン又はオスミウム酸及びピペリジンで処理してもよい。ミス対合領域を分解した後、得られた物質を変性ポリアクリルアミドゲル上でサイズ別に分離させ、変異部位を判定する(例えばCotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA; Saleeba et al., Methods Enzymol. 217:286-95, 1992を参照のこと)。好適な一実施例においては、対照DNA又はRNAを検出用に標識してもよい。

## 【0131】

さらに別の一実施例においては、ミス対合開裂反応で、二本鎖DNAにおけるミス対合塩基対を認識する1つ又はそれ以上のタンパク質（「DNAミス対合修復」酵素と呼ばれる）を使用する。例えば、E.コリのmutY酵素は、G/Aミス対合のAを開裂し、HeLa細胞のチミジンDNAグリコシラーゼは、G/Tミス対合のTを開裂する（Hsu et al., *Carcinogenesis* 15:1657-62, 1994）。一実施例によれば、IL-1RN(+2018)対立遺伝子2に基づくプローブは、検査細胞から得たcDNA又はその他のDNA産物とハイブリダイズする。デュプレックスをDNAミス対合修復酵素で処理し、開裂産物が存在する場合には、これを電気泳動プロトコルなどから検出してもよい（例えば米国特許No. 5,459,039を参照のこと）。

## 【0132】

その他の複数の実施例においては、電気泳動移動度の変化を利用して、IL-1RN(+2018)対立遺伝子2又はこれと連鎖不平衡である核酸配列が特定されるであろう。例えば、一本鎖高次構造多型(SSCP)を利用して、変異核酸と野生型核酸との電気泳動移動度の違いを検出してもよい（Orita et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2766, 1989、またCotton, *Mutat. Res.* 285:125-44, 1993;及びHayashi, *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73-79, 1992も参照のこと）。試料と対照とのIL-1RN(+2018)対立遺伝子又はこれらの対立遺伝子と連鎖不平衡である核酸配列の対立遺伝子の一本鎖DNA断片を変性させた後に、復元する。一本鎖核酸の2次構造は、配列により異なり、その結果生じる電気泳動移動度の変化により、一塩基の変化でも検出することが可能である。DNA断片を標識してもよいし、又は標識プローブで検出してもよい。2次構造が配列の変化に対するより高い感受性を有するRNA(DNAよりも望ましい)を用いることにより、アッセイの感受性を向上させてもよい。好適な一実施例においては、電気泳動移動度の変化に基づいて二本鎖ヘテロ二本鎖分子を分離させるために、当該方法でヘテロ二本鎖分析を行

う (Keen et al., Trends Genet. 7:5, 1991)

。

#### 【0133】

さらに別の一実施例においては、IL-1RN(+2018)対立遺伝子又はこれらの対立遺伝子と連鎖不平衡である核酸配列の対立遺伝子の、変性剤の勾配を有するポリアクリルアミドゲル中の動きを、変性勾配ゲル電気泳動法(DGGE)でアッセイする(Myers et al., Nature 313:495, 1985)。分析方法としてDGGEを用いる場合には、例えばPCR法で、高温で融解するGCリッチなDNA約40bpのGCクランプを加えることにより、DNAが完全に変性しないように修飾することとなる。さらなる一実施例においては、変性剤勾配の代わりに温度勾配を用いることにより、対照DNAと試料DNAとの移動度の違いを判別する(Rosenbaum及びReissner, Biophys. Chem. 265:12753, 1987)。

#### 【0134】

IL-1RN(+2018)対立遺伝子又はこれらと連鎖不平衡である核酸配列の対立遺伝子及びILDに関連するその他の対立遺伝子を検出するためのその他の方法の例には、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅又は選択的プライマ伸長が含まれるが、これらに限定されることはない。例えば、オリゴヌクレオチドプライマを、(例えば対立遺伝子変異型における)既知の突然変異又はヌクレオチド相違が中心に位置するように作成した後に、完全な対が見られた場合にのみハイブリダイゼーションが可能となるような条件下で標的DNAとハイブリダイズさせてもよい(Saiki et al., Nature 324:163, 1986); Saiki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230, 1989)。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法を用いて、オリゴヌクレオチドをPCR増幅された標的DNAとハイブリダイズさせる場合には、一回の反応毎に1つの変異又は多型領域を、又は、オリゴヌクレオチドをハイブリダイズ膜に付着させて、標識された標的DNAとハイブリダイズさせる場合には、多数の異なる変異又は多型領域を検査してもよい。

## 【0135】

又は、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術を、本発明と併せて用いてもよい。特定の増幅にプライマとして用いられるオリゴヌクレオチドの当該変異又は多型領域が、(増幅が示差的なハイブリダイゼーションに依存するように)分子の中心に位置していてもよいし(Gibbs et al., Nucleic Acid Res. 17:2437-2448, 1989)、又は、適切な条件下でミス対合を防止するか又はポリメラーゼ伸長を抑制するように、1つのプライマの3'側の末端に位置していてもよい(Prossner, Tibtech 11:238, 1993)。加えて、変異部位に新たな制限部位を導入することにより、開裂に基づく検出を行うことが望ましい(Gasparini et al., Mol. Cell Probes 6:1, 1992)。複数の実施例においては、増幅が増幅用のTaqリガーゼを用いて行われると考えられる(Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189, 1991)。このような実施例では、5'配列の3'側の末端でのみ完全な対合がある場合にのみ連結が起こるのであるため、増幅の存在又は不在を調べることにより、特定の部位における既知の突然変異の存在を検出することが可能である。

## 【0136】

別の一実施例においては、例えば米国特許No. 4,998,617及びLandegren et al., Science 241:1077-80, 1988に記載されているように、オリゴヌクレオチド連結アッセイ(OLA)を用いて対立遺伝子変異型の特定を行う。このOLAプロトコルでは、標的の一本鎖に隣接している2つの配列とハイブリダイズ可能に作成された2つのオリゴヌクレオチドを利用する。これらのオリゴヌクレオチドのうち一方を、例えばビオチン標識した分離マーカと連結させ、他方を検出可能に標識する。標的分子中に正確な相補配列が存在する場合は、これらのオリゴヌクレオチドは、これらの末端が隣接し、連結の基質をなすような方法でハイブリダイズする。こうして連結により、標識されたオリゴヌクレオチドを、アビジン又は別のビオチンリガンドを用いて修復できるようになる。Nickerson, D. A. et al. は

、PCRとOLAとの特性を併せ持つ核酸検出アッセイについて述べている(Nickerson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8923-27, 1990)。この方法では、PCRにより標的DNAを指数関数的に増幅させた後に、OLAによる検出を行う。

#### 【0137】

このOLA法に基づいて複数の方法が開発されており、そのような方法を用いてIL-1RN(+2018)対立遺伝子又はこれらの対立遺伝子と連鎖不平衡である核酸配列の対立遺伝子を検出してもよい。例えば、米国特許No. 5,593,826は、3'-アミノ基と5'-リン酸化オリゴヌクレオチドとを有するオリゴヌクレオチドを利用したOLAにより、ホスホラミデート結合を有する共役体を形成することを開示している。Tobe et al., Nucleic Acids Res. 24:3728, 1996に記載の別のOLAの例では、OLAとPCRを併用することにより、一つのマイクロタイタウェル内で2つの対立遺伝子のタイピングが可能である。対立遺伝子特異的なプライマのそれぞれを、独自のハプテン、即ちジゴキシゲニン及びフルオレセインで標識することにより、それぞれのOLA反応を、異なる酵素レポータ、アルカリホスファターゼ又はカラシペルオキシダーゼで標識されたハプテン特異的抗体を用いて検出することが可能である。この系では、高スループットのフォーマットを用いて2つの対立遺伝子を検出することが可能であり、この結果、2つの異なる色が生じることとなる。

#### 【0138】

一塩基多型の分析を容易にする複数の方法が開発されている。一実施例においては、例えば米国特許No. 4,656,127(Mundy et al.)に開示されている特殊なエキソヌクレアーゼ耐性ヌクレオチドを用いて、一塩基多型を検出することが可能である。この方法によれば、多型部位の直前の3'側にある対立遺伝子配列と相補なプライマを、特定の動物又はヒトから得た標的分子とハイブリダイズさせる。標的分子の多型部位に、この特殊なエキソヌクレアーゼ耐性ヌクレオチド誘導体と相補なヌクレオチドが含まれていると、この誘導体が前記ハイブリダイズされたプライマの末端に組み込まれる。このような組み

込みによって、プライマがエキソヌクレアーゼに対して耐性となり、このために検出が可能となる。試料のエキソヌクレアーゼ耐性ヌクレオチドの種類が周知であるので、このプライマがエキソヌクレアーゼ耐性となったことは、標的分子の多型部位に存在するヌクレオチドが、反応で使用したヌクレオチド誘導体のヌクレオチドと相補であったことを意味する。この方法は、大量の外来の配列データの測定を必要としないという利点を有する。

#### 【0139】

本発明の別の一実施例においては、溶液を用いた方法で多型部位のヌクレオチドの種類を特定する。仏国特許2,650,840;PCT出願No.WO91/02087。米国特許No.4,656,127のMundyの方法と同様に、多型部位の直前の3'にある対立遺伝子配列と相補なプライマを使用する。この方法では、多型部位のヌクレオチドと相補な場合はこのプライマの末端に組み込まれる、標識されたジデオキシヌクレオチド誘導体を用いて、この部位のヌクレオチドの種類を特定する。

#### 【0140】

遺伝子ビット分析又はGBATMとして知られている別の方法が、Goellet et al.により、PCT出願No.92/15712に記載されている。Goellet et al.の方法では、標識されたターミネータと、多型部位の3'側にある配列と相補なプライマとを組み合わせ使用して使用する。従って、組み込まれた標識付きターミネータは、評価される標識分子の多型部位に存在するヌクレオチドと相補であり、これにより判定される。Cohen et al.、仏国特許2,650,840及びPCT出願No.WO91/02087の方法とは異なり、Goellet et al.の方法は、プライマ又は標的分子を固相に固定する異種相アッセイであることが望ましい。

#### 【0141】

近年、DNAの多型部位をアッセイするための、プライマの誘導による複数のヌクレオチド組み込み法について述べられている(Komher et al., Nucleic Acids Res.17:7779-84,1989;Sokolov, Nucleic Acids Res.18:3671,1990

; Syvanen et al., *Genomics* 8:684-92, 1990; Kuppaswamy et al., *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 88:1143-47, 1991; Prezant et al., *Hum. Mutat.* 1:159-64, 1992; Ugozzoli et al., *GATA* 9:107-12, 1992; Nyren et al., *Anal. Biochem.* 208:171-75, 1993)。これらの方法は、これら全てが、標識されたデオキシヌクレオチドの組み込みに基づいて多型部位の塩基間で識別を行うという点で、GBATMと異なる。このようなフォーマットでは、シグナルは組み込まれたデオキシヌクレオチドの数に比例するので、同じヌクレオチドの帯の中に多型が出現した場合は、信号が帯の長さに比例する (Syvanen, et al., *Amer. J. Hum. Genet.* 52:46-59, 1993)。

#### 【0142】

タンパク質翻訳を本来より早く終わらせてしまう突然変異に関しては、タンパク質切断試験 (PTT) により効率的な診断が可能である (Roest et al., *Hum. Mol. Genet.* 2:1719-21, 1993; van der Luijt et al., *Genomics* 20:1-4, 1994)。PTTでは、最初にRNAを組織から単離して逆転写し、対象部分をPCR増幅する。次に、逆転写PCR産物を鋳型として、RNAポリメラーゼプロモータ及び真核生物翻訳を開始するための配列を含有するプライマを用いてネスティッドPCR増幅を行う。対象領域の増幅後、プライマに組み込まれた非反復モチーフにより、PCR産物の連続的生体外転写及び翻訳が可能となる。翻訳産物のドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、切断されたポリペプチドが観察されると、翻訳の時期走尚な終了を引き起こす突然変異の存在が示される。この技術を応用した方法では、対象となる標的領域が単一のエクソンから得られる場合は、(RNAに対して) DNAをPCR鋳型として使用する。

#### 【0143】

ダイナミック・アリアル特異的ハイブリダイゼーション (DASH) として知ら

れているさらに別の方法においては、標的配列をPCR増幅する際に、1つのプライマがビオチン標識される。ビオチン標識産物の鎖をストレプトタビジン又はアビジンで被覆したマイクロタイトのシャーレのウェルに載せ、ビオチン標識されていない鎖をアルカリで洗い流す。1つの対立遺伝子に特異的であるオリゴヌクレオチドプローブを、低温で標的とハイブリダイズさせる。この結果、二本鎖特異的挿入染料と相互作用する二重鎖DNA領域が形成される。この染料は、励起すると、存在する二本鎖DNA（プローブ-標的二重鎖）の量に比例した蛍光を発する。次に、試料を継続的に加熱しながら、蛍光の観察を続ける。蛍光が急速に減少した場合は、プローブ-標的二重鎖の変性（又は「溶解」）温度であることが示される。適切なバッファ及び染料条件下では、プローブと二重鎖との一塩基ミス対合により、溶解温度（ $T_m$ ）が容易に検出可能な程度に大幅に低下する（Howell, W. M. et al., (1999) *Nature Biotechnology* 17: ) 87 - 88。

#### 【0144】

ここに記載の診断に、いかなる種類の細胞種または組織を用いてもよい。好適な一実施例においては、DNA試料を、（例えば静脈穿刺などの）周知の技術で採取された血液や唾液などの体液から得る。又は、（例えば毛髪又は皮膚などの）乾燥試料を用いて核酸検査を行ってもよい。RNA又はタンパク質を使用する場合は、使用可能な細胞又は組織はIL-1遺伝子座の遺伝子を発現しなければならない。

#### 【0145】

核酸生成を行わなくてもよいように、生体組織検査又は切除により得た患者の（不揮発性の又は凍結した）組織部分を対象として、インシトゥーで直接に診断を行ってもよい。このようなインシトゥー法では、核酸試薬をプローブ及び/又はプライマとして使用してもよい（例えば、*Nuovo, PCR in situ Hybridization: Protocols and Applications* (Raven Press, NY, 1992)を参照のこと）。

#### 【0146】

主に1つの核酸配列の検出を目的とする方法に加えて、これらのような検出法

でプロフィールの評価を行ってもよい。例えば、示差的ディスプレイ法、ノーザン分析法及び/又はRT-PCR法を用いて、フィンガープリントプロフィールを得てもよい。

#### 【0147】

本発明の別の一実施例は、患者のILD性向を検出するためのキットに関する。このキットに、(例えばIL-1RN(+2018)対立遺伝子2又はTNFA(-308)対立遺伝子2などの)ILD関連マーカの5'側及び3'側とハイブリダイズする5'及び3'オリゴヌクレオチド、又はこのマーカと連鎖不平衡である核酸配列、又はILD関連マーカとハイブリダイズする検出オリゴヌクレオチドを含めた、1つ又はそれ以上のオリゴヌクレオチドが含まれてもよい。また、このキットに、TNFA遺伝子又はIL-1遺伝子の他の対立遺伝子において、又はその近くでハイブリダイズすることの可能な1つ又はそれ以上のオリゴヌクレオチドが含まれてもよい。PCR増幅プライマは、以降の分析に便利な大きさのPCR産物を作成するためには、25塩基対から2500塩基対分離れた、好適には100塩基対から500塩基対分離れた塩基対にハイブリダイズすべきである。

#### 【0148】

キットで使用するオリゴヌクレオチドは、例えば合成ヌクレオチド、制限断片、cDNA、合成ペプチド核酸(PNA)などのような様々な天然の及び/又は合成の組成物のうちいずれであってもよい。アッセイのキット及び方法で、標識されたオリゴヌクレオチドを使用して、アッセイでの特定を容易にしてもよい。使用可能な標識の例には、放射線標識、酵素、蛍光性化合物、ストレプトアビジン、アビジン、ビオチン、磁性成分、金属結合成分、抗原又は抗体成分などが含まれる。

#### 【0149】

又は、AmpliCard™(シェフィールド大学、イングランド州シェフィールドS10 2JF; Tarlow, et al., J. of Invest. Dermatol. 103:387-389, 1994)などのDNAサンプリング手段; Nuleon™キット、溶解バッファ、プロテナーゼ溶液な

どのDNA精製試薬；10倍反応バッファ、熱安定ポリメラーゼ、dNTPなどのPCR試薬；及び、HinfI制限酵素、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド、乾燥血液からのネスティッドPCR用の変性オリゴヌクレオチドプライマなどの対立遺伝子検出手段が、キットに選択的に含まれてもよい。

#### 【0150】

##### ゲノム薬理

特定のILD関連対立遺伝子について知ることは、それ自身で、又は同じ疾患の原因となる他の遺伝的欠陥（その特定の疾患の遺伝的プロフィール）に関する情報と組み合わせることにより、特定の疾患の治療法を個々の遺伝的プロフィールに合わせてカスタマイズすること、即ち「ゲノム薬理学」の目的を可能にする。例えば、IL-1RN(+2018)対立遺伝子2、TNF-A(-308)対立遺伝子2又は、いずれかの対立遺伝子パターンと連鎖不平衡である核酸配列を有する被験体は、ILDに罹患しているか又は罹患する可能性が高く、被験体内におけるその疾患の特定の分子的成分を対象とした特定の治療薬に対してより高い反応性を有すると考えられる。従って、その疾患に関するある個体のIL-1及び/又はTNF-Aプロフィールを、個体群のプロフィールと比較することにより、特定の患者又は患者集団（即ち、同じ遺伝的変化を有する患者のグループ）に対して安全かつ有効であると思われる薬剤の選択又は作製が可能である。

#### 【0151】

遺伝的プロフィールに基づいて最も高い臨床的效果を示すと予想される個体群を対象とすることにより、1) 商業的利益の上がない市販薬のリポジショニング；2) 患者の下位集団に特異的であり、安全上の又は薬効上の制限のために臨床的開発が継続されていない候補薬剤の救済；及び3) 候補薬剤の開発の迅速化及び低コスト化並びにより最適な薬剤標識（ILD病原変異に対する様々な薬剤用量の効果を測定することが、効果的な投与量の最適化に有用であるため）を可能にする。

#### 【0152】

特定の治療薬による個体の治療を、（例えばIL-1、IL-1、IL-1Ra又はTNAなどの）タンパク質、mRNA及び/又は転写レベルを調べ

ることにより観察してもよい。検出されたレベルにより、次にその療法を維持してもよいし、又は調節（投与量を増加又は減少）してもよい。好適な一実施例においては、ある薬剤による被験体の治療の有効性には、(i) 薬剤投与の前に、被験体から投与前試料を採取するステップと；(ii) 投与前試料のタンパク質、mRNA又はゲノムDNAのレベル又は量を検出するステップと；(iii) 1つ又はそれ以上の投与後試料を被験体から採取するステップと；(iv) 投与後試料のタンパク質、mRNA又はゲノムDNAの発現又は活性のレベルを検出するステップと；(v) 投与前試料のタンパク質、mRNA又はゲノムDNAの発現又は活性のレベルを、投与後試料の対応するタンパク質、mRNA又はゲノムDNAとそれぞれ比較するステップと；(vi) これに応じて被験体に対する薬剤投与を変化させるステップと、が含まれる。

#### 【0153】

治療薬によって遺伝子発現を増加又は減少させることが有害でないことを確認するために、治療薬の投与の前後に被験体の細胞を採取して、IL-1遺伝子又はTNF $\alpha$ 以外の遺伝子の発現レベルを検出してもよい。これを、例えば転写プロファイリング法を用いて行ってもよい。従って、生体内で治療薬に暴露した細胞から採取したmRNAと、その治療薬に暴露していない同種の細胞から採取したmRNAとを、多数の遺伝子からのDNAを含有するチップに逆転写し及びこれとハイブリダイズさせることにより、その治療薬で治療された細胞及び治療されていない細胞の遺伝子の発現を比較してもよい。

#### 【0154】

##### ILD治療薬

(例えばIL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-1受容体アンタゴニストなどの)IL-1又はTNF $\alpha$ 、又は、IL-1もしくはTNF $\alpha$ 遺伝子と連鎖不平衡である遺伝子によりコードされるタンパク質のモジュレータに、タンパク質、ペプチド、ペプチドミメティック、小分子又は核酸を含めたいかなる種類の化合物が含まれていてもよい。好適なアゴニストに、(例えばIL-1タンパク質又はTNF $\alpha$ をコードする核酸や、或いはIL-1又はTNF $\alpha$ タンパク質により上方又は下方調節される遺伝子などの)核酸、(例えばIL-1又はTNF $\alpha$ タンパ

ク質或いはこれにより上方又は下方調節されるタンパク質などの)タンパク質、又は(例えばIL-1タンパク質又はTNFの発現又は結合を調節するような)小分子が含まれる。例えばここに記載のアッセイを用いて特定可能な、好適なアンタゴニストには、(例えば一本鎖(アンチセンス)又は二本鎖(三本鎖)DNA又はRNA及びリボザイムなどの)核酸、(例えば抗体などの)タンパク質、並びにIL-1又はTNFA転写及び/又はタンパク質活性を抑制又は阻害すべく動作する小分子が含まれる。

#### 【0155】

##### 有効な投与量

これらのような化合物の毒性及び治療上有効性を、細胞培養で又は実験動物を用いて、例えばLD50(集団のうち50%にとり致死的な投与量)及びED50(集団のうち)50%にとり治療上有効な投与量)を測定するなどの標準的な薬学的方法で測定してもよい。毒性効果と治療的效果との用量比は、治療係数であり、比LD50/ED50で表される。治療係数の大きい化合物が好適である。毒性の副作用を発揮する化合物を用いてもよいが、未感染の細胞を損傷する可能性を最低限に抑えて副作用を減じるために、そのような化合物を罹患組織にターゲティングする送達系をデザインするよう、注意が必要である。

#### 【0156】

細胞培養アッセイ及び動物実験により得られたデータを用いて、ヒトに使用する投与量の範囲を決定してもよい。そのような化合物の投与量は、毒性が殆ど又は全くないED50を含む血中濃度の範囲内であることが望ましい。投与量は、用いる投与形式及び投与経路により、この範囲内で異なる。本発明の方法で用いた任意の化合物の治療上有効量を、最初に細胞培養アッセイから予想してもよい。細胞培養での測定と同様に、動物モデルにおける投与量を決定して、IC50(即ち、症状を半分の値にまで阻害する検査化合物の濃度)を含む血中血漿濃度の範囲を得てもよい。このような情報を利用して、ヒトにおける有効投与量をより正確に決定してもよい。血漿中レベルを、例えば高速液体クロマトグラフィにより測定してもよい。

#### 【0157】

## 製剤と使用

本発明に従って使用する組成物を、1つ又はそれ以上の生理学上容認可能な担体又は添加剤を用いて、従来の方法で製剤してもよい。従って、化合物及びその生理学上容認可能な塩及び溶媒化合物を、例えば注射、吸息、(経口又は経鼻)吸入、又は経口、口腔内、非経口もしくは直腸内投与などによる投与を目的として製剤してもよい。

### 【0158】

このような療法のために、本発明の化合物を、全身及び局所又は限局的投与を含む様々な投与量を目的として製剤してもよい。Remmings tonのPharamaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PAで、その方法及び製剤の概要が分かるであろう。全身投与には、筋肉内注射、静脈内注射、腹膜内注射及び皮下注射を含めた注射が好適である。注射の場合は、本発明の化合物を、好適にはハックス溶液又はリンガー溶液などの生理学上適合性のバッファである溶液として製剤してもよい。さらに、化合物を固体として製剤し、使用直前に溶解又は懸濁させてもよい。凍結乾燥させたものも含まれる。

### 【0159】

経口投与の場合は、組成物が、例えば、(化トウモロコシデンブ、ポリビニルピロリドン又はヒドロキシプロピルメチルセルロースなどの)結合剤；(例えばラクトース、微結晶セルロース又はリン酸水素カルシウムなどの)フィルタ；(例えばステアリン酸マグネシウム、タルク又はケイ酸などの)潤滑剤；(例えばジャガイモデンブ又はデンブグリコール酸ナトリウムなどの)崩壊剤；または(例えばラウリル硫酸ナトリウムなどの)湿潤剤などの薬学上容認可能な賦形剤を用いて、従来の方法で製剤された錠剤又はカプセル剤であってもよい。錠剤が、当業において周知の方法を用いて被覆されていてもよい。経口投与用の液剤は、例えば、溶液、シロップ又は懸濁液であってもよいし、又は、乾燥製品として製剤し、使用前に水又は適切な賦形剤を加えるようにしてもよい。このような液剤を、(例えばソルビトールシロップ、セルロース誘導体又は硬化食用脂などの)懸濁化剤；(例えばレシチン又はアラビアゴムなどの)乳化剤；(例え

ばationd (原語) 油、油性エステル、エチルアルコール又は分離植物油などの) 非水賦形剤; 及び (例えばメチル又はプロピル - p - ヒドロキシ安息香酸又はソルビン酸などの) 保存剤などの薬学上容認可能な添加剤を用いて、従来の方法で製剤してもよい。適切な場合には、薬剤にバッファ塩、香料、着色料及び甘味料が含まれていてもよい。

#### 【0160】

経口投与用製剤が、活性化合物の放出を調節するように適切に製剤されていてもよい。口腔内投与の場合、組成物が、従来の方法で製剤された錠剤又はトローチ剤であってもよい。吸入投与の場合は、本発明に従って使用される化合物が、加圧包装又は噴霧器からのエアロゾルスプレーとして、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、炭酸ガス又はその他の適切なガスなどの適切な噴射剤を用いて投与されると便利である。加圧エアロゾルの場合は、計量された量を噴射するために、弁を設けて投与単位を決定してもよい。例えばゼラチンなどの、吸入器又は注入器で使用するカプセル及びカートリッジを、化合物の混合粉末と、ラクトース又はデンプンなどの適切な粉末基剤とを含めて製剤してもよい。

#### 【0161】

化合物を、例えば大量注射又は持続点滴などの注射による非経口投与用に製剤してもよい。注射用の薬剤を、例えば保存剤を添加したアンプル又は多投与容器などの単位投与の形に製剤してもよい。組成物が、油性又は水性の賦形剤を加えた懸濁剤、液剤又は乳剤であってもよく、また、懸濁化剤、安定化剤又は分散剤などの薬剤が含まれていてもよい。又は、活性成分を粉末として製剤し、使用前に、例えば無菌の発熱物質を含有しない水などの適切な賦形剤を加えるようにしてもよい。

#### 【0162】

また、化合物を、例えばカカオバター又はその他のグリセリドなどの従来坐薬基剤を含有するような、坐薬又は停留浣腸剤などの直腸用組成物として製剤してもよい。

#### 【0163】

前述の薬剤に加えて、化合物をデポ製剤として製剤してもよい。このように長時間作用する製剤を、(例えば皮下又は筋肉内)移植により、あるいは筋肉内注射により投与してもよい。従って、例えば、化合物を、高分子又は疎水性材料と共に(例えば容認可能な油を加えた乳剤として)、又はイオン交換樹脂と共に、又は、例えばゆっくり溶ける塩としてなど、ゆっくり溶ける誘導剤として製剤してもよい。その他の適切な送達系には、長期にわたって薬剤の局所非観血的送達を可能にするマイクロスフェアが含まれる。この方法では、炎症や虚血を起こすことなく、例えば心臓又はその他の臓器の任意に選択された場所に冠カテーテルを介して注射することの可能な、前毛細血管の大きさのマイクロスフェアを使用する。投与された治療薬は、これらのマイクロスフェアから徐々に放出され、周囲の(例えば内皮細胞などの)組織細胞に吸収される。

#### 【0164】

全身投与を、経粘膜又は経皮手段により行ってもよい。経粘膜又は経皮投与の場合は、バリアの浸透に適した浸透剤を製剤中に使用する。このような浸透剤は当業で周知であり、例えば、経粘膜投与の場合は胆汁酸塩及びフシジン酸誘導剤を含む。さらに、浸透を容易にするために界面活性剤を使用してもよい。経粘膜投与を、鼻スプレーにより又は坐薬を用いて行ってもよい。局所投与の場合は、本発明のオリゴマーを、当業で周知の軟膏、塗剤、ゲル又はクリームとして製剤してもよい。外傷又は炎症の治癒を早めるために、洗浄液を局所的に使用してもよい。

#### 【0165】

所望の場合は、これらの組成物を、活性成分を含有する1個又はそれ以上の単位の投与形態を含んでもよい包装又はディスペンサ装置に入れてもよい。包装が、金属又は、PTP包装などのプラスチックのフォイルからなってもよい。包装又はディスペンサ装置に、投与説明書が付属していてもよい。

#### 【0166】

本発明についてさらに説明する下記の例は、本発明を限定するものと理解されるべきではない。引用された参考文献の内容は、(本出願全体を通じて引用された論文、登録特許及び公開特許出願を含めて)全て参考文献として編入したもの

である。

【0167】

本発明は、特に明記した部分を除いては、当業者が実施可能な従来の方法を用いて実施される。そのような方法については、参考文献中に詳細に説明されている。例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual, (2nd ed., Sambrook, Fritsch and Maniatis, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D.N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed., 1984); 米国特許No. 4,683,195; 米国特許No. 4,683,202; Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds., 1984); 米国特許No. 4,666,828; 米国特許No. 5,192,659; 米国特許No. 5,272,057; 及び米国特許No. 4,801,531を参照されたい。

【0168】

ILD治療法識別のためのアッセイ

ILDを引き起こすまたはそれに寄与する突然変異の同定に基づき、本発明はさらに、例えばILD治療法の識別などのための細胞に基づくまたは無細胞性アッセイを特徴とする。ある実施態様では、IL-1レセプタ、TNF $\alpha$ レセプタ、またはTNF-AもしくはIL-1遺伝子と連鎖不平衡にある遺伝子によりコード化されるたんぱく質に対するレセプタを、細胞膜の外側表面上に発現している細胞を、テスト化合物のみの存在下、またはテスト化合物及びIL-1またはその他のたんぱく質の存在下で培養し、テスト化合物とレセプタ間、またはたんぱく質（好ましくはタギングされたたんぱく質）とレセプタ間の相互作用を、例えばマイクロフィシオメータを用いることにより検出する(McConnell et al. (1992) Science 257: 1906)。レセプタと、テスト化合物またはたんぱく質のいずれか一方との相互作用は、マイクロフィシオメータにより培地の酸性化の変化として検出される。従って、

このアッセイシステムは、例えばたんぱく質-レセプタ相互作用を阻害することにより機能する分子アンタゴニストや、例えばレセプタを活性化することにより機能する分子アゴニストを同定する方法を提供する。

#### 【0169】

細胞性、または無細胞性アッセイは、IL-1もしくはTNF-A遺伝子、またはそれと連鎖不均衡の遺伝子の発現を変調し、mRNAの翻訳を変調する、またはmRNAもしくはたんぱく質の安定性を変調する化合物を同定するためにも用いることができる。したがって、ある実施態様では、IL-1、TNF-a、またはその他のたんぱく質を産生する能力のある細胞を、テスト化合物とともに培養し、細胞培地中に産生されたたんぱく質の量を測定して、テスト化合物に接触させていない細胞から産生されたものと比較する。たんぱく質と比較した化合物の特異性は、例えば一つ以上の対照遺伝子の発現を測定するなど、各種の対照分析により確認することができる。特に、このアッセイは、アンチセンス、リボザイム、及び三重化合物の有効性を判定するために用いることができる。

#### 【0170】

無細胞性アッセイは、たんぱく質と相互作用してたんぱく質活性を修飾することのできる化合物を同定するために用いることもできる。このような化合物は、例えばたんぱく質の構造を修飾し、それによりレセプタに結合する能力に作用する。好ましい実施態様では、このような化合物を同定する無細胞性アッセイは、基本的に、たんぱく質及びテスト化合物またはテスト化合物のライブラリを、結合パートナーが有るまたは無い環境下で含有する反応混合物中に存在する。テスト化合物は、例えば生物学的に不活性な標的ペプチドなどの結合パートナーの誘導体、または小分子などでもよい。

#### 【0171】

従って、本発明の例示的なスクリーニングアッセイは、たんぱく質またはその機能的フラグメントとテスト化合物またはテスト化合物のライブラリを接触させ、複合体の形成を検出する段階を含む。検出のために、分子は特異的なマーカで標識し、テスト化合物またはテスト化合物のライブラリは異なるマーカで標識することができる。テスト化合物とたんぱく質またはそのフラグメントとの相互作

用は、培養段階と洗浄段階の後、二つの標識のレベルを判定することで検出することができる。洗浄段階後に二つの標識が存在する場合、相互作用が有ることを示す。

#### 【0172】

分子間相互作用は、光学的現象である表面プラズモン共鳴(SPR)を検出するリアルタイムBIA(バイオモレキュラー・インタラクション・アナリシス、ファルマシアバイオセンサーAB社製)により同定することもできる。検出は生物特異的界面における巨大分子の重量濃度の変化に依存し、相互作用体の標識を必要としない。ある実施態様では、テスト化合物のライブラリを、例えばマイクロフロー細胞の壁を一つ形成するセンサー表面に固定する。それから、たんぱく質またはその機能的フラグメントを含有する液体を、センサー表面上に連続的に流す。シグナル記録に見られる共鳴角の変化が、相互作用が生じたことを示唆する。この技術は、例えばファルマシア社のBIA technology Handbookなどにさらに記述されている。

#### 【0173】

本発明のもう一つの例示的スクリーニングアッセイは、(a)(i)IL-1, TNF-aまたはその他のたんぱく質、(ii)適切なレセプタ、及び(iii)テスト化合物を含む反応混合物の形成；及び(b)たんぱく質とレセプタの相互作用の検出、の段階を含む。テスト化合物存在下のたんぱく質とレセプタの相互作用をテスト化合物が存在しない環境下での相互作用と比較して、統計的に有意な変化（増強または阻害）が有る場合、アンタゴニスト（阻害因子）である可能性を示唆している。このアッセイの化合物は同時に接触させることができる。また、たんぱく質をまずテスト化合物に適切な時間接触させて、次にレセプタを反応混合物に加えてもよい。化合物の有効性は、様々な濃度のテスト化合物を用いて得られたデータから用量反応曲線を作成することにより評価することができる。さらに、比較のためのベースラインを提供するために、対照アッセイを行うこともできる。

#### 【0174】

たんぱく質とレセプタ間の複合体形成は、各種技術により検出が可能である。複合体形成の変調は、例えば放射標識、蛍光標識、または酵素標識したたんぱく

質またはレセプタなどの検出可能に標識したたんぱく質を用いて、イムノアッセイ、またはクロマトグラフ検出により定量化することができる。

#### 【0175】

通常、複合体形成していない一つ以上のたんぱく質からの複合体分離を容易にし、アッセイの自動化に対応するために、たんぱく質またはレセプタのいずれかを固定することが望ましいであろう。反応物を入れるのに適切などのような容器でも、たんぱく質とレセプタを結合させることができる。例えば、マイクロタイタープレート、試験管、及びマイクロ遠心分離チューブなどである。ある実施例では、たんぱく質を基質に結合させることができる領域を設ける融合たんぱく質を提供することもできる。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合たんぱく質をグルタチオンセファロースビーズ（米国ミズーリ州、セントルイス、シグマケミカル社製）またはグルタチオン誘導マイクロタイタープレートに吸収させ、次に例えば<sup>35</sup>S標識レセプタなどのレセプタとテスト化合物をそれに結合させて、その混合物を複合体形成に資する条件下、例えば塩及びpHの生理学的条件下などで培養してもよいが、多少厳密な条件の方が好ましい。培養に続き、未結合標識を除去するためにビーズを洗浄し、基質を固定して放射線標識を直接（例えばシンチラントにビーズをおく）、またはその後複合体を解離させた後に上清中で判定する。また、複合体を、基質から解離させ、SDS-PAGEで分離し、ビーズ画分中のたんぱく質またはレセプタの濃度を追加例に記述したような標準の電気泳動技術をもちいてゲルから定量化することもできる。基質上の固定たんぱく質を固定するその他の技術を当該アッセイに用いることもできる。つまり、たんぱく質またはレセプタのいずれかを、ビオチンとストレプトアビジンの複合体を用いて固定することができる。

#### 【0176】

アゴニスト及びアンタゴニストの識別、または候補治療法の安全性及び有効性を確認するために、トランスジェニック動物も用いることができる。本発明のトランスジェニック動物は、適切な内因性プロモータの制御下、または異種プロモータの制御下でILD原因突然変異を有する非ヒト動物を含んでもよい。

#### 【0177】

トランスジェニック動物は、適切なプロモータまたはそのフラグメントの制御下で、レポータ遺伝子などの導入遺伝子を有する動物でもあってよい。これらの動物は、例えば遺伝子発現を変調することなどによりIL-1またはTNF- $\alpha$ たんぱく質の生成を変調する薬品を同定するためなどに有用である。トランスジェニック非ヒト動物を得る方法は、当業に公知である。好ましい実施態様では、ILD原因突然変異の発現は、例えば発現を望ましいパターンに制御するシス作用配列などを用いて、細胞、組織、または発達段階の特異的サブセットに限定する。本発明では、たんぱく質のこのようなモザイク発現が、多様な系列解析には不可欠であり、さらに、例えば他の点では正常な胚の中の組織の小斑の発達を、肉眼的に変化させることができるような発現レベルの効果を評価する方法を提供することもできる。このような目的のために、組織特異的制御配列及び条件制御配列を、ある空間パターン内の突然変異発現を制御するために用いる。さらに、例えば条件組み換え系、または原核性翻訳制御配列などにより、発現の一時的パターンを提供することもできる。 *in vivo*の部位特異的遺伝子操作を介して突然変異発現の制御を可能にする遺伝子技術は、当業に公知である。

#### 【0178】

本発明のトランスジェニック動物はすべて、複数の細胞内に本発明のILD原因突然変異導入遺伝子を含み、その導入遺伝子が宿主細胞の発現型を変化させる。図説的な実施例では、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系(Lakso et al. (1992) PNAS 89:6232-6236; Orban et al. (1992) PNAS 89:6861-6865)、またはサッカロマイセス・セレビシエ(O'Gorman et al. (1991) Science 251:1351-1355; PCT公報W0 92/15694)のいずれかを、*in vivo*部位特異的遺伝子組み換え系を作製するために用いることができる。Creリコンビナーゼは、loxP配列間にある介入標的配列の部位特異的組み換えを触媒する。loxP配列は、Creリコンビナーゼが結合する34塩基対ヌクレオチド反復配列で、Creリコンビナーゼ媒介遺伝子組み換えに必要である。loxP配列の配向は、Creリコンビナーゼが存在するとき(Abremski et al. (1984) J. Biol. Chem. 259:1509-1514)、介入標的配列が切除されるか反転されるかを決定し、CreリコンビナーゼはloxP配列が正方向反復として配向しているときには標的配列の切除を触媒し、loxP配列が反

対方向反復として配向しているときには標的配列の反転を触媒する。

【0179】

したがって、標的配列の遺伝子組み換えは、Creリコンビナーゼの発現に依存している。このリコンビナーゼの発現は、例えば組織特異的、発達段階特異的、誘発的または外来添加剤により抑制的に調節制御の影響を受けているプロモータ要素により調節することができる。この調節された制御により、プロモータ要素にリコンビナーゼ発現が媒介されている細胞中にのみ存在する標的配列の遺伝子組み換えが生じる。したがって、EOM原因突然変異導入遺伝子の発現活性化は、リコンビナーゼ発現の制御により調節することができる。

【0180】

ILD原因突然変異導入遺伝子の発現を調節するためにcre/loxPリコンビナーゼ系を用いるには、Creリコンビナーゼ及び被験たんぱく質の両方をコード化する導入遺伝子を有するトランスジェニック動物を作製しなければならない。Creリコンビナーゼ及びILD原因突然変異導入遺伝子の両方を有する動物は、「二重」トランスジェニック動物の作製により提供することができる。このような動物を提供する簡便な方法は、導入遺伝子をそれぞれ有する二匹のトランスジェニック動物の交配である。

【0181】

同様な条件導入遺伝子を、導入遺伝子の発現を容易にするために原核性たんぱく質を同時に発現させる必要のある原核性プロモータ配列を用いて提供することができる。例示的なプロモータ及びそれに相当するトランス作用原核性たんぱく質は、米国特許4,833,030号に記載されている。

【0182】

さらに、条件導入遺伝子の発現は、遺伝子治療様の方法により誘発され、その方法では、例えばリコンビナーゼまたは原核性たんぱく質などのトランス作用たんぱく質をコード化する遺伝子を組織に送達し、細胞型特異的な方法などで発現させる。この方法により、導入遺伝子は成体に至るまで不顕性のままであるが、トランス作用因子が導入されるとスイッチが入るようになる。

【0183】

例示的な実施態様では、本発明の「トランスジェニック非ヒト動物」は、非ヒト動物の生殖細胞系列に導入遺伝子を導入して作製する。導入遺伝子を導入するために、様々な発達段階の胚性標的細胞を用いてもよい。胚性標的細胞の発達段階に応じて異なる方法を用いる。本発明を実行するために用いる特定の系列は、どの動物のものでも、全体的に健康で、胚産出量が良好で、胚中の前核の視感度が良好で、生殖状態も良好であるものを選択する。さらに、ハプロタイプも重要な要因である。例えば、トランスジェニックマウスを作製するとき、C57BL/6またはFVB系のような系統がよく使われる（米国メイン州バーハーバー、ジャクソン・ラボラトリ社製）。好ましい系統はC57BL/6またはDBA/1のようなH-2<sup>b</sup>、H-2<sup>d</sup>またはH-2<sup>q</sup>ハプロタイプのものである。本発明を実行するために用いる系列は、それ自体がトランスジェニックでもよく、及び/またはノックアウト（すなわち、部分的または完全に抑制された一つ以上の遺伝子を有する動物から得られた）でもよい。

#### 【0184】

ある実施態様では、導入遺伝子構造体を一段階胚に導入する。接合体はマイクロ注入法に最適な標的である。マウスの場合、オス前核のサイズが直径約20マイクロメートルで、1-2 pIのDNA溶液注入の再現が可能である。遺伝子導入の標的として接合体を利用すると、ほとんどの場合初回分裂の前に注入DNAが宿主遺伝子に組み込まれるため、大きな利点になる(Brinster et al. (1985)PNAS 82:4438-4442)。その結果、トランスジェニック動物のすべての細胞は、導入遺伝子を組み込まれた状態で保有することになる。50%の生殖細胞が導入遺伝子を保有することになるため、これは仔への導入遺伝子伝達が効率的であることにも一般に反映されるだろう。

#### 【0185】

通常、受精胚は適切な培地で前核が現れるまで培養される。およそこの時点で、導入遺伝子からなるヌクレオチド配列をメスまたはオスの前核に下記のように導入する。マウスなどのある種では、オス前核が好ましい。卵核または接合体メス前核により処理する前に、接合体のオスDNA相補体に外来性遺伝物質を加えることが最も望ましい。卵核またメス前核は、おそらくオスDNAのプロタミンをヒ

ストーンに置き換えて2倍体接合体を形成するためのメスとオスのDNAの結合を容易にして、オスDNA相補体に作用する分子を放出すると考えられている。

【0186】

したがって、メス前核による作用を受ける前に、オスDNA相補体またはその他のDNA相補体に外来性遺伝物質を加えることが望ましい。例えば、オス及びメス前核を十分に引き離し、双方を細胞膜近傍に配置した時のオス前核形成直後に、初期オス前核に外来性遺伝物質を加える。また、卵子に外来性遺伝物質を有する精子を加えるか、卵子に導入遺伝子構造体を加えた直後に非凝縮精子を加えることもできる。

【0187】

導入遺伝子ヌクレオチド配列を胚に導入するには、例えばマイクロ注入法、電気穿孔法、またはリポフェクション法などの当業に公知のいかなる方法を用いてもよい。胚に導入遺伝子ヌクレオチド配列を導入後、その胚を様々な時間in vitroで培養してもよく、または代理宿主に再移植してもよく、またはそれら両方を行ってもよい。成熟までin vitro培養を行うことも本発明の範囲内である。ある通常の方法では、胚を種によって1 - 7日間in vitroで培養し、代理宿主に再移植する。

【0188】

本発明の目的のために、接合体は、完全生体に発達する能力がある二重体細胞の形成に不可欠である。一般に、接合体は、自然または人工的に一つ以上の生殖細胞のハプロイド核二個を融合させて形成した核を有する卵からなる。したがって、生殖細胞核は自然に適合性なもので、すなわち分化し機能生体に発達する能力がある生接合体でなければならない。一般に、正倍数体接合体が好ましい。異数体接合体が得られた場合、いずれかの生殖細胞から発生した生体の正倍数と比較して、染色体数は1以上には変化することはない。

【0189】

同様の生物学的考察に加えて、物理的にも、接合体の核または接合体核の一部を形成する遺伝物質に加えることができる外来性遺伝物質の量（例えば容量）が決定される。遺伝物質が除去されない場合、加えられる外来性遺伝物質の量は、

物理的に崩壊することなく吸収される量により制限される。一般に、挿入される外来性遺伝物質の容量は、約10ピコリットルを超過しない。添加の物理的効果は、接合体の生存力を物理的に破壊しない程度で、あまり大きくしてはいけない。DNA配列の数及び多様性の生物学的限界は、特定の接合体及び外来性遺伝物質の機能によって変化し、得られた接合体の外来性遺伝物質を含む遺伝物質は、接合体の分化及び機能性生体への発達を開始及び持続する生物学的能力を有していなければならない、これは当業者には容易に理解されるであろう。

#### 【0190】

接合体に加えられた導入遺伝子構造体の複製数は、外来性遺伝物質の合計添加量に依存し、遺伝的形質転換の発生を可能にする量になるだろう。理論的には、必要な複製は一つだけであるが、一つの複製が機能的であることを確実にするために、導入遺伝子構造体の複製数は例えば1,000-20,000個など、一般に数多くの複製を用いる。本発明に関しては、外来性DNAの表現型発現を増強するために、挿入した各外来性DNA配列の一つ以上の機能的複製を有することは、利点になる場合が多いであろう。

#### 【0191】

外来性遺伝物質を核の遺伝物質に加える技術は、細胞、核膜、またはその他の既存の細胞性もしくは遺伝的構造に有害でない限り、いずれも用いることができる。外来性遺伝物質は、マイクロ注入法により各遺伝物質に挿入されることが好ましい。細胞または細胞構造のマイクロ注入法は、当業に公知で使用されている。

#### 【0192】

再移植は標準方法を用いて行われる。通常、代理宿主を麻酔し、胚を卵管に挿入する。ある特定の宿主に移植する胚の数は種によって異なるが、通常はその種が自然に産出する仔の数に相当する。

#### 【0193】

代理宿主のトランスジェニック仔は、いずれかの適切な方法で導入遺伝子の存在及び/または発現をスクリーニングしてもよい。スクリーニングはサザンブロット法またはノーザンブロット法により行われることが多く、導入遺伝子の少な

くとも一部に相補的なプローブを用いる。導入遺伝子によってコード化されたたんぱく質に対する抗体を用いたウェスタンブロット法は、導入遺伝子産生物の存在をスクリーニングするための代替的、または追加的な方法として用いられる。通常、DNAは尾部の組織から調製され、サザン分析法または導入遺伝子のPCRにより分析する。また、最高度に導入遺伝子を発現すると考えられる組織または細胞について、サザン分析法またはPCRを用いて導入遺伝子の存在及び発現を検査するが、いずれの組織または細胞型もこの分析法に使用してよい。

#### 【0194】

導入遺伝子の存在を評価する代替的または追加的な方法には、酵素及び/または免疫アッセイなどの適切な生物学的アッセイ、特定のマーカまたは酵素活性の組織染色、フローサイトメトリー分析などが含まれるが、これに限定されない。血液の分析も、血中の導入遺伝子産生物の存在を検出し、血液細胞各種またはその他の血液構成因子濃度に導入遺伝子が与える影響を評価するために有用である。

#### 【0195】

トランスジェニック動物の子孫は、トランスジェニック動物を適切なパートナーと交配するか、またはトランスジェニック動物から得られた卵及び/または精子のin vitro受精により得てもよい。パートナーと交配させる場合、パートナーはトランスジェニック及び/またはノックアウトであってもなくてもよく、トランスジェニックである場合、そのパートナーは同じまたは異なる導入遺伝子、または両方を保有してよい。また、パートナーは親系統であってよい。In vitro受精を用いる場合、受精胚は代理宿主に移植されても、またin vitroで培養されても、両方でもよい。いずれかの方法を用いて、上記方法、またはその他の適切な方法を用いて、子孫を導入遺伝子の存在について評価してよい。

#### 【0196】

本発明に従って作製されたトランスジェニック動物には、外来性遺伝物質も含まれるだろう。さらに、このような実施態様では、その配列が、例えば好ましくはある種類の細胞に導入遺伝子産生物を発現させるプロモータなどの転写制御要素に結合するだろう。

## 【0197】

レトロウイルス感染も、導入遺伝子を非ヒト動物へ導入するために用いることができる。In vitroで非ヒト胚を培養し胚盤胞段階まで発達させることができる。この間に、分割細胞をレトロウイルス感染のための標的にすることができる(Jaenich, R. (1976) PNAS73:1260-1264)。分割細胞を効率的に感染させるには、酵素処理により透明帯を除去する(Manipulating the Mouse Embryo, Hogan eds. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1986)。導入遺伝子導入に用いるウイルスベクター系は、通常、導入遺伝子を保有する複製欠陥ウイルスである(Jahner et al. (1985) PNAS 82:6927-6931; Van der Putten et al. (1985) PNAS82:6148-6152)。形質移入は、ウイルス産生細胞単層上で分割細胞を培養して、簡便かつ効率的に行うことができる(Van der Putten, 同上; Stewart et al. (1987) EMBO J. 6:383-388)。また、さらに遅い段階でも感染させることができる。ウイルスまたはウイルス産生細胞を胞胚腔に注入することもできる(Jahner et al. (1982) Nature 298:623-628)。組み込みはトランスジェニック非ヒト動物を形成した細胞のサブセットにしか生じないため、初代のほとんどは導入遺伝子のモザイクになるだろう。さらに、初代は、導入遺伝子の各種レトロウイルスによる挿入を、一般に子孫に分離するゲノム中の異なる位置に有してよい。さらに、妊娠中期の胚を子宮内レトロウイルス感染させることにより、生殖細胞系列に導入遺伝子を導入することも可能である(Jahner et al. (1982) 同上)。

## 【0198】

導入遺伝子導入のための三種類目の標的細胞は、胚性幹細胞(ES)である。ES細胞はin vitroで培養した移植前胚から採取し、胚と融合させたものである(Evans et al. (1981) Nature 292:154-156; Bradley et al. (1984) Nature 309:255-258; Bossler et al. (1986)PNAS 83: 9065-9069; 及びRobertson et al. (1986) Nature 322:445-448)。導入遺伝子は、DNA形質移入またはレトロウイルス媒介形質導入により、効率的にES細胞に導入することができる。このように形質転換したES細胞は、その後、非ヒト動物の胚盤胞と組み合わせることができる。ES細胞はその後胚のコロニーを形成し、後にキメラ動物となる生殖細胞系列に寄与す

る。参考のためにJaenisch, R. (1988) Science 240:1468-1474参照。

#### 【0199】

本発明は、後述の例によりさらに具体化されるが、どのような場合にも限定するものであると解釈されてはならない。引用されたすべての参考資料の内容（本出願全体に引用された参考文献、発行済み特許、公告済み特許出願など）は、言及によりここに明確に編入することとする。本発明の実用化には、特に指示のない限り、当業に公知の従来技術を用いることとする。このような技術は文献にすべて説明されている。例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual, (2nd ed., Sambrook, Fritsch and Maniatis, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); 米国特許4,683,195号, 米国特許4,683,202号, Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds., 1984)などを参照。

#### 【0200】

##### 実施例

##### 例1：遺伝子型別法

##### DNAの調製

静脈穿刺により採血し、DNA抽出の前に-20℃で非凝固保存する。血液10ミリリットルを低張赤血球(RBC)溶解液(10 mMトリス、0.32スクロース、4 mM MgCl<sub>2</sub>、1% トリトンX-100)に加え、室温(RT)で4分間反転混合する。その後、サンプルを1300gで15分間遠心分離し、上清を吸引廃棄して、RBC溶解液をさらに30 ml細胞ペレットに加える。遠心分離後、そのペレットを白血球(WBC)溶解液2 ml (0.4 mMトリス、60 mM EDTA、0.15 M NaCl、10% SDS)に再懸濁させ、未使用の15 mlポリプロピレンチューブに移す。過塩素酸ナトリウムを最終濃度が1Mになるまで加え、そのチューブをまず室温で15分間ロータリーミキサで反転し、次に定期的に反転させながら65℃で25分間培養する。クロロホルム2 ml (-20℃で保存)を加えた後、サンプルを室温で10分間混合し、次に800 Gで3分間遠心分離する。この段階で、3001ヌクレオンシリカ懸濁液(英国スコットラブ社製)を用いて1400 Gで5分間遠心分離すると、相が非常にはっきりと分離する。得られた水性の上段

層を未使用の15mlポリプロピレンチューブに移し、冷却エタノール(-20 で保存)を加えてDNAを沈澱させた。これを、ガラス製フックに巻きつけて、500 I TEまたは滅菌水を有する1.5 mlエッペンドルフ型チューブに移す。TE中で一晩再懸濁させた後、遺伝子DNAの収量を260 nm で分光して算出する。各サンプルを100 ug/mlに希釈し、マイクロタイター容器に移して4 で保存する。原液は、将来の参考のために-20 で保存する。

#### 【0201】

##### ポリメラーゼ連鎖反応

多型部位をカバーする遺伝子の関連領域を増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマ(詳細は後述)を合成し、トリスEDTAバッファ(TE)に再懸濁し、200 uMの原液として-20 で保存する。事前に各作用溶液(水中で正及び逆をそれぞれ20 mMづつ1:1で混合したもの)を調製する。

#### 【0202】

通常、PCR反応混合物は下記のように調製される。

#### 【0203】

	原液濃度	容量	最終濃度
滅菌水		29.5ml	
10xPCRバッファ	200mMトリス-HCl(pH 8.4)	5.00ml	20mMトリス-HCl
MgCl <sub>2</sub>	50mM	1.75ml	1.75mM
dNTP	10mMずつ混合	4.00ml	0.2mMずつ
正方向プライマ	20 uM	2.5 ml	1 uM
逆方向プライマ	20 uM	2.5 ml	1 uM
Taqポリメラーゼ	5 U/ml	0.25 ml	1.25単位/50ul
界面活性剤 (ギブコ社製W-1など)	1%	2.5 ml	0.05%
テンプレート	200 ng/ml	2.00ml	2 ng/ul
最終容量		50.00 ml	

#### 【0204】

DNAテンプレートを0.2 mlのチューブまたはマイクロウェルの底に滴下する。同じ体積の水または負の対照DNAも無作為に検査する。基本混合物(テンプレート以外のすべての試薬を含む)を調製し、ウェルまたはチューブに加え、サンプルをPCR用サーモサイクラーに移す。

#### 【0205】

PCRは、使用するサーモサイクラーにより、0.5 ml チューブ、0.2 ml チューブまたはマイクロウェルを用いて行う。加熱した蓋（蒸発を防ぐため）が無い場合、鉱物油で反応混合物の蓋をする。

#### 【0206】

##### 制限酵素消化

制限酵素バッファと酵素の基本混合物を調製し、未使用マイクロウェルに適切な容量をそれぞれ入れる。油による蓋をして、またはマイクロチューブにキャップをして、酵素に適切な温度でドライブロック上で消化を行った。

#### 【0207】

制限バッファ希釈量を反応容量全体をもとにして（つまり、PCRバッファの塩濃度を無視して）計算した。好ましくないバッファ条件を補正し、確実に完全な消化を行うために、制限酵素は、推奨される濃度よりも3 - 5倍多く用いた。

#### 【0208】

##### 電気泳動

PCRサンプルのポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)は、トリスホウ酸EDTAバッファ中、一定電圧で行われた。サイズ識別の必要性に応じて、異なるPAGE条件（9 - 12%アクリルアミド、1.5 mm x 200）及び異なるDNAサイズマーカ(X174-Hae IIIまたはX174-Hinf 1) が用いられる。IL-1RN(VNTR)マーカの遺伝子型別には、2%アガロース水平ゲルを用いてもよい。

#### 【0209】

##### 例2 二つのIPF患者集団における遺伝子型別解析

これらの研究のために、二つのIPF患者集団、及び二つの同一人種対照集団を用いた。すべての患者は、高分解能CTスキャン、及び多くの場合肺生検など、非常に高い水準で表現型別された。表1, 2, 及び3に記述されているように、PCR生成物の対立遺伝子特異的制限酵素消化物により、遺伝子型別を行った。一塩基多型 (snps) の位置は、推定される翻訳開始部位に関連して示唆される。

#### 【0210】

(表1)

表1
マーカー IL-1RN(+2018) TNFA(-308)
遺伝子 IL-1RN TNFA
発露番号 X64532 X02910
位置 +2018 -308

## 【0211】

(表2)

表2
プライマ配列
IL-1RN(+2018)
5'-CTATCTGAGGAACAACCACTAGTAGC-3' SEQ ID NO. 9
5'-TAGGACATTGCACCTAGGGTTTGT-3' SEQ ID NO. 10
TNF(-308)
5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' SEQ ID NO. 11
5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3' SEQ ID NO. 12

## 【0212】

(表3)

表3
反応条件
IL-1RN(+2018)
反応バッファは20mMトリスHCl(pH8.4)、50mM KCl、1.75mM MgCl <sub>2</sub> 、0.2mM dNTPs、0.001mM プライマ、0.05% W-1(ギブコBRL)、100ng テンプレート、1.25単位 Taqポリメラーゼである。サイクリングは、[95°、1分]×1、[94°、1分; 57°、1分; 70°、2分]×35、[70°、5分]×1、4°で行う。PCR生成物の一部はAlu Iで、その他はMsp I(37°Cで一晩)で消化する。制限生成物はPAGE 9%上でサイズ別に分類される。Alu Iにより、対立遺伝子1の126+28bpフラグメントが生ずるが、対立遺伝子2(154bp)は消化されない。Msp Iは対立遺伝子2について125+29bpを生ずるが、対立遺伝子1は切断されない(154bp)。この二つの反応の結果、ホモ接合型の個人については反対した消化パターンが生じ、ヘテロ接合型の場合は同一のパターンとなる。
TNF(-308)
上記反応条件を用いるが、MgCl <sub>2</sub> は最終濃度1.5mM、PCRプライマは0.0002mMを用いる。サイクリングは[95°、1分]×1、[94°、1分; 60°、1分; 72°、1分]×35、[72°、5分]×1、4°Cである。PCR生成物はMsp I(37°Cで一晩)で消化し、PAGE 6%で電気泳動する。Msp I消化により、対立遺伝子1の87+20bpが生じるが、対立遺伝子2は切断されない(107bp)。ヘテロ接合型は107+87+29bpフラグメントを有する。

## 【0213】

結果は以下のように解析された。

## 【0214】

ボローニャ集団

イタリア、ボローニャ州のIPF患者61人からなるコホートからDNAを採取した。地元の供血者銀行から対照(n=103)を動員し、人種、年齢及び性別を一致させた。ホモ接合体(ORhom)のオッズ比(OR)をヘテロ接合体OR(ORhet)と比較して結果

を解析し、適宜、データを分類して2 x 2の表を作成し、c二乗法で検定した。OR及び95%信頼区間(95% c. i.)は、標準的な方法により計算した。表4aにデータ及び解析をまとめる。

### 【0215】

(表4)

表4 遺伝子型、イタリア人集団	
4a)	
マーカー IL-1RN(+2018) TNF(-308)	
遺伝子型 1.1 1.2 2.2 1.1 1.2 2.2	
IPF n=26 30 5 40 21 0	
対照 n=66 32 5 87 16 0	
分析 2.2+1.2 vs 1.1 2.2+1.2 vs 1.1	
c <sup>2</sup> = 7.16 7.827	
c <sup>2</sup> 。 = 0.0075 0.0058	
O.R. = 2.40 2.85	
95% ci = 1.26-4.59 1.35-6.05	
4b) 複合遺伝子型分析 IPF患者18人及び対照77人のみ分析することができた。	
複合遺伝子型陽性: IL-1RN(+2018) 2.2又は1.2かつTNFA(-308) 1.2の個人	
IPF n=12 対照 n=9	
複合遺伝子型陰性: IL-1RN(+2018) 1.1かつTNFA(-308) 1.1の個人	
IPF n=17 対照 n=59	
c <sup>2</sup> = 9.493 P=0.0021 O.R. = 4.63 95% ci = 1.67 - 12.8	

### 【0216】

希少な1RN(+2018)対立遺伝子の複製を少なくとも一つ保有する患者とIPF患者の間には強い関連があった(O.R. = 2.4, 95% c. i. = 1.26 - 4.59)。TNFA(-308)対立遺伝子を保有する患者とIPF患者の間にも関連があった(O.R. = 2.85, 95% c. i. = 1.35 - 6.05)。複合IL-1RN(+2018)/TNF(-308)遺伝子型が易罹患性に与える影響についても、IPF患者と対照の解析を行った(表4b)。両方の希少な対立遺伝子の複製を少なくとも一つ保有すると定義された複合遺伝子型の頻度を、IPF患者及び彼らに一致する対照において検定した。これら対立遺伝子の頻度を、どちらの座位にもその希少対立遺伝子を保有しないと定義された複合遺伝子型、すなわちホモ接合体IL-1RN(+2018)1.1及びTNFA(-308)1.1の頻度と比較した。表4bに示すように、この複合遺伝子型の存在はIPFの相対リスクの増加と関連していた(OR=4.63, 95% c. i. = 1.67-12.82)。

### 【0217】

ノッティンガム集団

IPF患者90人、及び年齢、性別及び生活環境が一致した対照からなるコホートからDNAを採取した。IL-1RN(+2018)及びTNFA(-308)の遺伝子型頻度を検定し

た。これらのうち、88組の遺伝子型別に成功した。結果について、条件付きロジスティック回帰分析を行った。すべての遺伝子型別及び解析は盲検化して行われた。表5a及び5bに結果を報告する。

【0218】

(表55a)

表5 遺伝子型、イギリス人集団 (ノッティンガム)

5a) IL-1RN(+2018) 対照

1.1 1.2 2.2

	1.1	36	12	1
IPF患者	1.2	18	11	0
	2.2	6	3	1

1.2対1.1, OR=1.43, 95% ci = 0.70-2.92, p=0.33  
 2.2対1.1, OR=10.76, 95% ci = 1.26-81.4, p=0.03  
 1.2+2.2対1.1, OR=1.85, 95% ci = 0.94-3.63, p=0.07

この研究では、希少対立遺伝子 IL-1RN(+2018)についてヘテロ接合型の個人の場合、IPFリスクがより高いことが判明した(OR 10.76, 95% ci 1.26-81.4)。

TNF(-308) 対照

1.1 1.2 2.2

	1.1	40	12	1
IPF例	1.2	22	9	1
	2.2	2	1	0

1.2+2.2対1.1, OR=1.85, 95% ci = 0.94-3.63, p=0.07

【0219】

この、独立集団についての二番目の研究では、IPFのリスクは、希少対立遺伝子IL-1RN(+2018)(2.2 vs. 1.1, OR 10.76, 95% c.i. 1.26-81.4, p=0.03)の存在に関連して高くなることが判明した。関連の傾向はTNF(-308) (p=0.07)についてしか実証されていないが、前に定義した複合TNF(-308)/IL-1RN(+2018)遺伝子型(表5b)の解析により、この遺伝子型を保有する患者はそれを保有していない患者に対してIPFのリスクがより高いということが確認された(OR = 8.0, 95% c. i. 1.00-64.0, p = 0.05)。

【0220】

(表55b)

5b) 複合遺伝子型分析	
両IL-1RN(+2018)及びTNF(-308)について2対立遺伝子の複製を少なくとも一つ保有する個人を、どちらも1.1ホモ接合型である者と比較した。条件の一致した症例対照組の23組のみについて分析を行うことができた。	
対照	
どちらも1.1 どちらも1.2または2.2	
IPF症例	
どちらも1.1	13 1
どちらも1.2または2.2	8 1
すなわち、9つの症例が、対照2人に対して、両方のIL-1RN(+2018)に2対立遺伝子を保有した	
OR=8.0, 95% ci., 1.00-64.0, p=0.05	

## 【0221】

これらの結果は、IL-1RN多型(+2018)及び関連するIL-1RN VNTRがIPF発症リスクを増大させることを提唱し、競合のないIL-1ベータの生物学的活性が、この症状において病態生理学的役割を果たしている可能性があることを示唆した。希少な対立遺伝子IL-1RN VNTR/IL-1RN (+2018)は、in vivo (Carter et al., 1078) 及びin vitro (Tountas et al., 1997)におけるIL-1RNたんぱく質産生量の低下に関連している。IL-1Ra量が低下すると、このサイトカインの抗炎症活性が著しく低下し、最終的にIL-1アルファ及びIL-1ベータの炎症誘発効果を増加させる効果を伴う。

## 【0222】

TNFアルファ転写のレベル増大に関連するプロモータ多型である、TNFA(-308)遺伝子バリエーションに関連する結果から、この座位(ヒト第6染色体)のIPF易罹患者への寄与が示唆される。

## 【0223】

遺伝子型別法の代替法を、以下表6-8に記述する。

## 【0224】

(表6)

表6 IL-1RN(+2018)及びTNFA(-308)のタックマンアッセイ	
IL-1RN(+2018)サイクリング ; [96°C、1分] x 1; [94°C、1分、63°C、1分、70°C 1分] x 35; [63°C、5分、70°C、5分] x 1	
プロープ1	5'-C(-FAM)AACCAACTAGTTGCTGGATACTTGCAAG(-TAMRA)-3' (SEQ ID NO. 13)
プロープ2	5'-C(-TET)AACCAACTAGTTGCCGGATACTTGCAAG(-TAMRA)-3' (SEQ ID NO. 14)
正方向	5'-AAGTTCTGGGGGACACAGGAAG-3'(SEQ ID NO. 15)
逆方向	5'-ACGGGCAAAAGTGACGTGATG-3'(SEQ ID 16)
TNF(-308)サイクリング ; [50°C、2分] x 1; [95°C、10分] x 1; [95°C、15秒、58°C、1分] x 40; [15°C、維持]	
プロープ1	5'-A(-TET)CCCCGTCCCCATGCC(-TAMRA)-3'(SEQ ID NO. 17)
プロープ2	5'-A(-FAM)ACCCCGTCCTCATGCC(-TAMRA)-3'(SEQ ID NO. 18)
正方向	5'-GGCCACTGACTGATTTGTGTGT-3'(SEQ ID NO. 19)
逆方向	5'-CAAAAGAAATGGAGCAATAGGTT-3'(SEQ ID NO. 20)

## 【0225】

## (表7)

表7 追加の方法: IL-1RN VNTR	
IL-1RN(VNTR)	
様々な数の直列型反復配列がIL-1RN遺伝子のイントロン2に存在することは、Tarlow et al. (1993) Hum Genet. 91:403-404により、様々な数 (2から6) の86bp反復配列として特徴づけられた	
遺伝子受託番号: 264532	
オリゴヌクレオチドプライマ:	
5'-CTCAGCAACACTCCTAT-3'	SEQ ID NO. 21
5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA-3'	SEQ ID NO. 22
具体的な条件	
サイクリング: [96°、1分] x 1; [94°、1分; 60°、1分; 70°、2分] x 35; [70°、5分] x 1; 4°。電気泳動は2%アガロース中、90V、30分。	
解説	
PCR生成物のサイズは反復回数の直接的な指標である: 最も発生頻度の高い対立遺伝子 (対立遺伝子1) は、412 bp生成物を産生する。フランキンギン領域が6bp伸展しているため、残りの344bpは86bpの反復が4回あることを示唆している。同様に、240bp生成物は反復2回 (対立遺伝子2)、326は反復3回 (対立遺伝子3)、498は5回 (対立遺伝子4)、584は6回 (対立遺伝子6)であることを示唆する。英国北部白人集団における、これら4種類の最も高い対立遺伝子の頻度は、0.734、0.241、0.021及び0.004である。	

## 【0226】

## (表8)

<p>表8 TNF(238)多型タイプニング</p> <p>TNFAプロモータのこの塩基バリエーションは、1993年、D'Alfonsoらにより記述された(D'Alfonso, S and Richards, PM(1994) Immunogenetics 39: 150-154)。PCRプライマの一つは、対立遺伝子1を増幅するときに<i>Aval</i>I部位を生じるように塩基が変更してある。</p> <p>遺伝子受託番号：X02910及びX02159</p> <p>オリゴヌクレオチドプライマ：</p> <p>5'-GAA.GCC.CCT.CCC.AGT.TCT.AGT.TC-3'(425/403)</p> <p>5'-CAC.TCC.CCA.TCC.TCC.CTG.GTC-3' (-236/-217)</p> <p>具体的な条件</p> <p>最終濃度2 mMのMgCl<sub>2</sub>及び0.125 uMのPCRプライマを用いる。サイクリングは[94°、1分；61°、1分；72°、1分]×35、[72°、5分]×1、4°Cで行う。各PCR反応には特異的10X制限バッファ3 ulに加えて<i>Aval</i>I 5単位を加える。インキュベーションは37°Cで一晩行う。電気泳動はPAGE12%で行う。</p> <p>解説</p> <p><i>Aval</i>Iが7bpの一定のバンドを生じ、それがいない場合には消化が不完全であることを示唆している。これに加えて、対立遺伝子1は63+49+21バンドに、対立遺伝子2は70+63に消化される。ヘテロ接合型は混合した制限パターンを有する。英国中部コーカサス白人集団における頻度は0.94及び0.06である。同様の遺伝的集団において有意水準0.05で9.0%の検出力を出すには、1.5倍増の頻度を検出する場合は1432症例を調査しなければならず、また、頻度0.18倍増の場合は149症例調査しなければならない。</p>
--

## 【0227】

## 例3 多型性と鉱山労働者の珪肺症発症率との関連性

国立労働安全災害研究所の調査官は、鉱山で労働する被験者から採取したサンプルについて、遺伝子型別研究を行った。珪肺症の診断は、培養時の肺の肉眼及び顕微的分析に基づいて行われた。対照は、培養時に珪肺症またはその他の職業性肺障害の証拠がなかった鉱山労働者である。

## 【0228】

IL-1RA対立遺伝子2と中程度疾患の間に有意な関連性が認められた(OR 2.85,  $p=0.001$ , 95%CI:1.72-4.74)。1.1対1.2または2.2。

## 【0229】

IL-1RA対立遺伝子2と重度疾患の間に有意な関連性が認められた(OR 1.76,  $p=0.018$ , 95%CI:1.10-2.81)。1.1対1.2または2.2。

## 【0230】

IL-1RA対立遺伝子2と患者の疾患の重篤度(中程度対重度)の間にぎりぎりの負の関連性が認められた(OR 0.62,  $p=0.049$ , 95%CI:0.38-1.0)。1.1対1.2または2.2。

## 【0231】

IL-1RA対立遺伝子2と疾患の間に有意な関連性が認められた(OR 2.16,  $p=0.00$

1, 95%CI:1.41-3.29)。1.1対1.2または2.2。

【0232】

IL-1RA対立遺伝子2.2と疾患の間に有意な関連性が認められた(OR 2.92, p=0.026, 95%CI:1.09-7.81)。1.1対1.2または2.2。

【0233】

IL-1A +4845

IL-1A +4845対立遺伝子と患者の疾患の重篤度の間に有意な関連性が認められた(OR 1.97, p=0.022, 95%CI:1.10-3.53)。1.1対1.2または2.2。

【0234】

IL-1B +3954

IL-1B +3954対立遺伝子2.2と中程度疾患の間に有意な関連性が認められた(OR 3.26, p=0.024, 95%CI:1.11-9.55)。1.1対1.2または2.2。

【0235】

IL-1B +3945対立遺伝子2.2と重度疾患の間に有意な関連性が認められた(OR 3.12, p=0.025, 95%CI:1.10-8.83)。1.1対1.2または2.2。

【0236】

IL-1B +3945対立遺伝子2.2と疾患の間に有意な関連性が認められた(OR 5.7, p=0.024, 95%CI:2.13-15.26)。1.1対1.2または2.2。

【0237】

TNFA(-238)

TNFA(-238)対立遺伝子2と中程度疾患の間に有意な関連性が認められた(OR 4.00, p=0.001, 95%CI:2.52-6.37)。1.1対1.2または2.2。

【0238】

TNFA(-238)対立遺伝子2と疾患の間に有意な関連性が認められた(OR 1.63, p=0.012, 95%CI:1.11-2.39)。1.1対1.2または2.2。

【0239】

IL-1RN(+2018)またはVNTRは珪肺症(すなわち肺線維症)リスクの増加に関連している。

【図面の簡単な説明】

【図1】 IL-1A(GEN X03833; SEQ ID No. 1)の核酸配列を示す。

【図2】 IL-1B(GEN X04500; SEQ ID No. 2)の核酸配列を示す。

【図3】 分泌IL-1RN(GEN X64532; SEQ ID No. 3)の核酸配列を示す。

【図4】 TNF-A(ジェンバンク受託番号X02910、X02159、SEQ ID No. 4)の核酸配列を示す。TNF-A(-308)多型の対立遺伝子型1の位置は、位置308の太字の小文字「g」で示す(対立遺伝子2はこの位置の「A」に対応する)。TNF-A(-308)多型タイピング実験で用いたプライマに相補な配列に下線を施した。TNF-A(-238)多型の対立遺伝子型1の位置は位置378の太字の小文字「g」で示す(対立遺伝子2はこの位置の「A」に対応する)。TNF-A(-238)多型タイピング実験で用いたプライマに相補な配列は、ヌクレオチド残基190から212(正方向プライマ)及び379から399(逆方向プライマ)に相当する。

【配列表】

<110> INTERLEUKIN GENETICS, INC.

<120> PREDICTION OF RISK OF INTERSTITIAL LUNG DISEASE

<130> MSA-016.25

<140> PCT/US00/08492

<141> 2000-03-31

<150> 09/286,108

<151> 1999-04-02

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 11970

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IL-1A gene

<400> 1

aagcttctac cctagtctgg tgctacactt acattgctta catccaagtg tggttatttc 60  
tgtggctcct gttataacta ttatagcacc aggtctatga ccaggagaat tagactggca 120  
ttaaatacaga ataagagatt ttgcacctgc aatagacctt atgacaccta accaacccca 180  
ttatttacia ttaaacagga acagagggaa tactttatcc aactcacaca agctgttttc 240  
ctcccagatc catgcttttt tgcgtttatt attttttaga gatgggggct tcaactatgtt 300  
gccacactg gactaaaact ctgggcctca agtgattgtc ctgcctcagc ctccctgaata 360  
gctgggacta caggggcatg ccatcacacc tagttcattt cctctattta aaatatacat 420  
ggcttaaact ccaactggga acccaaaaaca ttcatgtgct aagagtctgg tgttctacca 480  
cctgaactag gctggccaca ggaattataa aagctgagaa attctttaat aatagtaacc 540  
aggcaacatc attgaaggct catatgtaaa aatccatgcc ttcctttctc ccaatctcca 600  
ttcccaaact tagccactgg ttctggctga ggccttacgc atacctcccg gggcttgcac 660  
acaccttctt ctacagaaga cacaccttgg gcatatccta cagaagacca ggcttctctc 720  
tggctccttg tagagggcta cttfactgta acagggccag ggtggagagt tctctcctga 780  
agctccatcc cctctatagg aaatgtgttg acaatattca gaagagtaag aggatcaaga 840  
cttctttgtg ctcaaatacc actgttctct tctctaccct gccctaacca ggagcttgtc 900  
accccaaact ctgaggtgat ttatgcctta atcaagcaaa cttccctctt cagaaaagat 960  
ggctcatttt ccctcaaaag ttgccaggag ctgccaagta ttctgccaat tcaccctgga 1020  
gcacaatcaa caaattcagc cagaacacaa ctacagctac tattagaact attattatta 1080  
ataaattcct ctccaaatct agccccttga cttcggattt cacgatttct cccttctcc 1140  
tagaaacttg ataagtttcc cgcgcttccc ttttctaag actacatgtt tgtcatctta 1200  
taaagcaaag gggatgaata atgaacaaa tcaataactt ctggaatac tgcaacaac 1260  
aataatatca gctatgcat ctttactat tttagccagt atcgagtga atgaacatag 1320  
aaaaatacaa aactgaattc ttcctgtaa attcccgtt ttgacgacgc actttagacc 1380  
acgtagccac gcctacttaa gacaattaca aaaggcgaag aagactgact caggcttaag 1440  
ctgccagcca gagaggaggt catttcattg gcgtttgagt cagcaaagggt attgtcctca 1500  
catctctggc tattaagta ttttctgttg ttgttttct cttggctgt tttctctcac 1560  
attgccttct ctaaagctac agtctctcct ttcttttctt gtccctccct ggtttggtat 1620  
gtgacctaga attacagtca gatttcagaa aatgattctc tcattttgct gataaggact 1680  
gattcgtttt actgagggac ggcagaacta gtttcctatg agggcatggg tgaatacaac 1740

tgaggcttct catgggaggg aatctctact atccaaaatt attaggagaa aattgaaaat 1800  
 ttccaactct gtctctctct tacctctgtg taaggcaaat acctattct tgtggtgttt 1860  
 ttgtaacctc ttcaaacttt cattgattga atgcctgttc tggcaataca ttaggttggg 1920  
 cacataagga ataccaacat aaataaaaca ttctaaaaga agtttacgat ctaataaagg 1980  
 agacaggtac atagcaaact aattcaaagg agctagaaga tggagaaaat gctgaatgtg 2040  
 gactaagtca ttcaacaaag ttttcaggaa gcacaaagag gaggggctcc cctcacagat 2100  
 atctggatta gaggctggct gagctgatgg tggctggtgt tctctgttgc agaagtcaag 2160  
 atggccaaag ttccagacat gtttgaagac ctgaagaact gttacaggta aggaataaga 2220  
 tttatctctt gtgatttaat gagggtttca aggctcacca gaatccagct aggcataaca 2280  
 gtggccagca tgggggcagg ccggcagagg ttgtagagat gtgtactagt cctgaagtca 2340  
 gagcaggttc agagaagacc cagaaaaact aagcattcag catgttaaac tgagattaca 2400  
 ttggcagggg gaccgccatt ttagaaaaat tatttttgag gtctgctgag ccctacatga 2460  
 atatcagcat caacttagac acagcctctg ttgagatcac atgccctgat ataagaatgg 2520  
 gttttactgg tccatttctca ggaaaacttg atctcattca ggaacaggaa atggctccac 2580  
 agcaagctgg gcatgtgaac tcacatatgc aggcaaatct cactcagatg tagaagaaaag 2640  
 gtaaatgaac acaaagataa aattacggaa catattaac taacatgatg tttccattat 2700  
 ctgtagtaaa tactaacaca aactaggctg tcaaaatfff gcctggatat tttactaagt 2760  
 ataaattatg aaatctgttt tagtgaatac atgaaagtaa tgtgtaacat ataatctatt 2820  
 tggttaaaat aaaaaggaag tgcttcaaaa cttttctttt ctctaaagga gcttaacatt 2880  
 cttccctgaa cttcaattaa agctcttcaa tttgttagcc aagtccaatt tttacagata 2940  
 aagcacaggt aaagctcaaa gcctgtcttg atgactacta attccagatt agtaagatat 3000  
 gaattactct acctatgtgt atgtgtagaa gtccttaaat ttcaaagatg acagtaatgg 3060  
 ccatgtgtat gtgtgtgacc cacaactatc atggtcatta aagtacattg gccagagacc 3120  
 acatgaaata acaacaatta cattctcatc atcttatttt gacagtgaaa atgaagaaga 3180  
 cagttcctcc attgatcatc tgtctctgaa tcaggtaagc aatgactgt aattctcatg 3240  
 ggactgctat tcttacacag tggtttcttc atccaaagag aacagcaatg acttgaatct 3300  
 taaatacttt tgttttacc cacttagaga tccagagacc tgtctttcat tataagtgg 3360  
 accagctgcc tctctaaact aatagttgat gtgcattggc tttcccaga acagagcaga 3420  
 actatcccaa atccctgaga actggagtct cctggggcag gcttcatcag gatgttagtt 3480

atgccatcct gagaaagccc cgcaggccgc ttcaccaggt gtctgtctcc taacgtgatg 3540  
tgttgtggtt gtcttctctg acaccagcat cagaggtag agaaagtctc caaacatgaa 3600  
gctgagagag aggaagcaag ccagctgaaa gtgagaagtc tacagccact catcaatctg 3660  
tgttattgtg ttggagacc acaaatagac actataagta ctgcctagta tgtcttcagt 3720  
actggcttta aaagctgtcc ccaaaggagt atttctaaaa tattttgagc attgtaagc 3780  
agatTTTTaa cctcctgaga gggaactaat tggaaagcta ccactcacta caatcattgt 3840  
taacctatTT agttacaaca tctcattTTT gagcatgcaa ataaatgaaa aagtcttcct 3900  
aaaaaatca tctTTTTatc ctggaaggag gaaggaagggt gagacaaaag ggagagaggg 3960  
aggaagcct aatgaaacac cagttaccta agaccagaat ggagatcctc ctcactacct 4020  
ctgttgaata cagcacctac tgaagaact ttatttcctt gaccatgaac agcctctcag 4080  
cttctgtTTT ccttcctcac agaaatcctt ctatcatgta agctatggcc cactccatga 4140  
aggctgcatg gatcaatctg tgtctctgag tatctctgaa acctctaaaa catccaagct 4200  
taccttcaag gagagcatgg tggtagtagc aaccaacggg aaggttctga agaagagacg 4260  
gttgagtTTa agccaatcca tctctgatga tgacctggag gccatcgcca atgactcaga 4320  
ggaaggtaag gggtaagca caataatatc tttctTTTtac agTTTtaagc aagtagggac 4380  
agtagaatTT aggggaaaaat taaacgtgga gtcagaataa caagaagaca accaagcatt 4440  
agtctggtaa ctatacagag gaaaattaat ttttatcctt ctccaggagg gagaaatgag 4500  
cagtggcctg aatcgagaat acttgctcac agccattatt tcttagccat attgtaaagg 4560  
tcgtgtgact tttagccttt caggagaaag cagtaataag accacttacg agctatgttc 4620  
ctctcactact aactatgcct ccttggatcat gttacataat cttttcgtga ttcagtttcc 4680  
tctactgtaa aatggagata atcagaatcc cccactcatt ggattgttgt aaagattaag 4740  
agtctcaggc tttacagact gagctagctg ggccctcctg actgttataa agattaaatg 4800  
agtcaacatc ccctaacttc tggactagaa taatgtctgg taaaagtaa gcaccaata 4860  
aatgttagct attactatca ttattattat tattttatTT ttttttttg agatggagtc 4920  
tggctctgtc acccaggctg gagtgcagtg gcacaatctc ggctcactgc aagctctgcc 4980  
tcctgggttc atgccattct cctgcctcag cctcccaggt aagctgggaa tacaggcacc 5040  
cgccactgtt cccggctaata tttttgtatt tttagtagag acggagtTtc accgtggctt 5100  
ccatctcctc gtgatccacc caccttggcc tcccaaagtg ccgggattac aggcgtgagc 5160  
caccgcgccc ggcctattat tattattatt actactacta ctacctatat gaactactacc 5220

agcaatacta atttattaat gactggatta tgtctaaacc tcacaagaat cctaccttct 5280  
 cattttacat aaaaggaaac taagctcatt gagatagga aactgcccaa tggcatacat 5340  
 ctgtaagtgg gagagcctca aatctaattc agttctacct gagtaaaaa atcatggttt 5400  
 ctctccatc cctttactgt acaagcctcc acatgaacta taaaccaat attcctgttt 5460  
 ttaagataat acctaagcaa taacgcatgt tcacctagaa ggttttaaaa tgtaacaaaa 5520  
 tataagaaaa taaaaatcac tcatatcgtc agtgagagtt tactactgcc agcactatgg 5580  
 tatgtttcct taaaatcttt gctatacaca tacctacatg tgaacaaata tgtctaacat 5640  
 caagaccaca ctatttaca ctttatatcc agcttttctt acttagcaat gtattgagga 5700  
 cattttagag tgcccgtttt tcaccattat aagcaatgca acaatgaaca tctgtataaa 5760  
 taaatattca tttctctcac cttttatttc cttagaata attcctagaa gtagaatttc 5820  
 ccagagccat gaggatttgt gacgctattg atatgtgcca ctttgactc tctgtgacat 5880  
 atataattat ttttaatgca ttcatttttt tctcagagtg cattcgtttg aaaacataga 5940  
 cgggaaatac tggtagtctt ccttgtcagt tagaaacacc caaacaatga aaaatgaaaa 6000  
 agttgcacaa atagtctcta aaaacaatga aactattgcc tgaggaattg aagtttaaaa 6060  
 agaagcacat aagcaacaac aaggataatc ctagaaaacc agttctgctg actgggtgat 6120  
 ttcacttctc tttgcttctt catctggatt ggaatattcc taatacccc tccagaacta 6180  
 ttttccctgt ttgtactaga ctgtgtatat catctgtgtt tgtacataga cattaatctg 6240  
 cacttgtgat catggtttta gaaatcatca agcctaggtc atcacctttt agcttccctga 6300  
 gcaatgtgaa atacaacttt atgaggatca tcaaatacga attcatcctg aatgacgccc 6360  
 tcaatcaaag tataattcga gccaatgatc agtacctcac ggctgctgca ttacataatc 6420  
 tggatgaagc aggtacatta aatggcacc agacatttct gtcacctcc cctcctttca 6480  
 tttacttatt tatttatttc aatctttctg cttgcaaaaa acatacctct tcagagttct 6540  
 gggttgcaca attcttccag aatagcttga agcacagcac cccataaaa atccaagcc 6600  
 agggcagaag gttcaactaa atctggaagt tccacaagag agaagtttcc tatctttgag 6660  
 agtaaagggt tgtgcacaaa gctagctgat gtactacctc tttggttctt tcagacattc 6720  
 ttaccctcaa ttttaaaact gaggaaactg tcagacatat taaatgattt actcagattt 6780  
 acccagaagc caatgaagaa caatcactct cttttaaaaa gtctgttgat caaactcaca 6840  
 agtaacacca aaccaggaag atctttatta tctctgataa catatttgat aggcaaaacc 6900  
 tccaataagc tacaatatg gcttaaagga tgaagtttag tgtcaaaaa cttttatcac 6960

acacatccaa ttttcatggc ggacatgttt tagtttcaac agtatacata ttttcaaagg 7020  
 tccagagagg caattingca ataaacaagc aagacttttt ctgattggat gcacttcagc 7080  
 taacatgctt tcaactctac atttacaaat tttttgtgt tctatttttc tacttaatat 7140  
 tttttctgca attttcccaa tattgacatc gtgtatgtat ttgccatttt taatatcact 7200  
 agacaattca atcaggttgc tacgttggtc ccttgggttt actctaaata gcttgattgc 7260  
 aaatatcttt gtatatatta ttgttttttc tcctatcttg taatttcttt gagcacatcc 7320  
 caaagaggaa tgcctagatc aatgggcaca aataattga cagctcttat taaacattat 7380  
 tctgtaagta aaaactgaac tacttttcag tactactagc aacatagag tgatcagct 7440  
 tcctaaacc ctccatgtta ggtcattatg aacttatgat ctaacaaatt acaggttctt 7500  
 atcccactaa tgaaattata agagattcaa cacttattca gccccgaagg attcattcaa 7560  
 cgtagaaaat tctaagaaca ttaaccaagt atttacctgc ctagtgagtg tggaagacat 7620  
 tgtgaaggac acaaagatgt atagaattcc attcctgact tccaggtatt tacaccatag 7680  
 gtggggacct aactacacac acacacacac acacacacac acacacacac accatgcaca 7740  
 cacaatctac atcaacactt gatfffatac aaatacaatg aatttacttt ctttttggtt 7800  
 ctctcttca ccagtgaaat ttgacatggg tgcttataag tcatcaaagg atgatgctaa 7860  
 aattaccgtg attctaagaa tctcaaaaac tcaattgtat gtgactgcc aagatgaaga 7920  
 ccaaccagtg ctgctgaagg tcagttgtcc tttgtctcca acttaccttc atttacatct 7980  
 catatgtttg taaataagcc caataggcag acacctctaa caaggtgaca ctgtcctctt 8040  
 tccttcctac cacagcccc acctaccac cccactccca ttgattccag aggcgtgcct 8100  
 aggcaggatc tatgagaaaa tataacagag agtaagagga aaattacctt ctttcttttt 8160  
 ctttccctg cctgacctta ttcacctccc atcccagagc atccattat tccattgatc 8220  
 tttactgaca tctattatct gacctacaca atactagaca ttaggacaat gtggcctgcc 8280  
 tccaagaaac tcaataagc caactgagat cagagaggat taatcacctg ccaatgggca 8340  
 caaagcaaca agctgggagc caagtcccaa aatggggcct gctgcttcca gttcccctct 8400  
 ctctgcattg atgtcagcat ttccttcgt cccagtcctg tctccactac cactttcccc 8460  
 ctcaaacaca cacacacaca acagccttag atgttttctc cactgataag taggtgactc 8520  
 aatttgtaag tatataatcc aagaccttct attccaagt agaatttatg tgccctgcctg 8580  
 tgcttttcta cctggatcaa gtgatgtcta cagagtaggg cagtagcttc attcatgaac 8640  
 tcattcaaca agcattattc actgagagcc ttgtatffff caggcatagt gccaacagca 8700

gtgtggacag tggatcatca aagcctctag tctcatagaa cttagtcttc tggaggatat 8760  
 ggaaaacaga caacccaaac aaccaacaaa agagcaagat gctgcaaaaa aaaaaaaaaat 8820  
 gaataggggtg ctaagataga gaaaagtggg agagtgtctat ttagacaaaag tggtaaaaac 8880  
 aaagcccctt gtgagatgag agctgccgac agagggggcg ggtcatggtt gtgggttttt 8940  
 gggtaggaca ttcagaggag ggggcgggtc gtggttgtgg gtttttgggt aggacattca 9000  
 gaggaggggg cgggtcgtgg ttgtgggttt ttgggtagga cattcagagg agggggcggg 9060  
 tcgtggttgt gggtttttgg gtaggacatt cagaggaggg ggcgggtcgt gttgtgggt 9120  
 ttttgggaca ttcagaggag tctgaatgca cccaggccta caacttcaag atggtaaagg 9180  
 acagctccaa ggatcagaag aagcattctt ggaactgggg cattttgaga aggaggaaaa 9240  
 atatgcagag actagtgtct gcagagcttg catttggatt tcatttgagg tacaatgaaa 9300  
 accattaat gggtttcaca cagtgcaatg gcctgacctc acttatattt cctaaaatag 9360  
 aaaacagatc agaaggaagg caatagagaa gcagaaagtc caatgaggag gtttcacagc 9420  
 agtcatgggg gtggggtaag gaaaagaagt ggaaagaaac agacagaatt gggttatatt 9480  
 ttggagatag aaccaacaga aggaagagga gaaacaacat ttactgagaa gggaaaaagt 9540  
 aggagaggaa taggtttggg aaataaatcc tgctgacatt ggaaacccca aggaagcctc 9600  
 aaaagtatat ttacttgctt tagatttaaa agaataggaa agaagcatct caacttggaa 9660  
 ttgaaatct atttttccat aaaagtattg ttaaattcta ctactactca caagaaaagt 9720  
 acattctaaa gagtatattg aaagagttta ctgatatact taggaatttt gtgtgtatgt 9780  
 gtgtgtgtgt atgtgtgtgt gtgtgtttta ccttcaattg ttgacttaaa tactgagata 9840  
 aatgtcatct aaatgctaaa ttgatttccc aaaggtatga tttgttcact tggagatcaa 9900  
 aatgtttagg gggcttagaa tcaactgtagt gctcagattt gatgcaaaat gtcttaggcc 9960  
 tatgttgaag gcaggacaga aacaatgttt ccctcctacc tgcctggata cagtaagata 10020  
 ctagtgtcac tgacaatctt cataactaat ttagatctct ctccaatcaa ctaaggaaat 10080  
 caactcttat taatagactg ggccacacat ctactaggca tgtaataaat gcttgcctgaa 10140  
 tgaacaaatg aatgaagagc ctatagcatc atgttacagc catagtccta aagtgggtgt 10200  
 tctcatgaag gccaaatgct aaggattga gcttcagtcc tttttctaac atcttgttct 10260  
 ctaacagaat tctcttcttt tcttcatagg agatgcctga gataccctaaa accatcacag 10320  
 gtagtgagac caacctcctc ttcttctggg aaactcacgg cactaagaac tatttcacat 10380  
 cagttgcca tccaaacttg tttattgcca caagcaaga ctactgggtg tgcttggcag 10440

gggggccacc ctctatcact gactttcaga tactggaaaa ccaggcgtag gtctggagtc 10500  
 tcacttgtct cacttgtgca gtgttgacag ttcatatgta ccatgtacat gaagaagcta 10560  
 aatcctttac tgttagtcac ttgctgagca tgtactgagc cttgtaattc taaatgaatg 10620  
 ttfacactct ttgtaagagt ggaaccaaca ctaacatata atgttgttat ttaaagaaca 10680  
 ccctatattt tgcatagtac caatcatttt aattattatt cttcataaca attttaggag 10740  
 gaccagagct actgactatg gctaccaaaa agactctacc catattacag atgggcaaat 10800  
 taaggcataa gaaaactaag aaatatgcac aatagcagtt gaaacaagaa gccacagacc 10860  
 taggatttca tgatttcatt tcaactgttt gccttctgct ttaagtgc tgatgaactc 10920  
 ttaatcaaat agcataagtt tctgggacct cagttttatc attttcaaaa tggagggaat 10980  
 aatacctaag ccttcctgcc gcaacagttt tttatgctaa tcaggagggt cattttggtta 11040  
 aaatacttct cgaagccgag cctcaagatg aaggcaaagc acgaaatgtt attttttaat 11100  
 tattatttat atatgtattt ataaatata ttaagataat tataatatac tatatttatg 11160  
 ggaaccctt catcctctga gtgtgaccag gcacacctca caatagcaga cagtgttttc 11220  
 tgggataagt aagtttgatt tcattaatac agggcatttt ggtccaagtt gtgcttatcc 11280  
 catagccagg aaactctgca ttctagtact tgggagacct gtaatcatat aataaatgta 11340  
 cattaattac cttgagccag taattggtcc gatctttgac tcttttgcca ttaaacttac 11400  
 ctgggcattc ttgtttcatt caattccacc tgcaatcaag tcctacaagc taaaattaga 11460  
 tgaactcaac ttgacaacc atgagaccac tgttatcaaa actttctttt ctggaatgta 11520  
 atcaatgttt cttctagggt ctaaaaattg tgatcagacc ataatgttac attattatca 11580  
 acaatagtga ttgatagagt gttatcagtc ataactaaat aaagcttga acaaaaattct 11640  
 ctgacacata gttattcatt gccttaatca ttattttact gcatggtaat tagggacaaa 11700  
 tggtaaatgt ttacataaat aattgtattt agtgttactt tataaatca aaccaagatt 11760  
 ttatattttt ttctcctctt tgttagctgc cagtatgcat aatggcatt aagaatgata 11820  
 atatttccgg gttcacttaa agctcatatt acacatacac aaaacatgtg ttccatctt 11880  
 tatacaaaact cacacataca gagctacatt aaaacaact aataggccag gcacggtggc 11940  
 tcagacctgt aatcccagca ctttgggagg 11970

<210> 2

<211> 9721

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> n bases are A, T, C, G, other or unknown

<220>

<223> IL-1B gene

<400> 2

agaaagaaag agagagagaa agaaaagaaa gaggaaggaa ggaaggaagg aagaaagaca 60  
 ggctctgagg aaggtggcag ttcctacaac gggagaacca gtggtaatt tgcaaagtgg 120  
 atcctgtgga ggcanncaga ggagtcccct aggccacca gacagggctt ttagctatct 180  
 gcaggccaga caccaaattt caggagggct cagtgttagg aatggattat ggcttatcaa 240  
 attcacagga aactaacatg ttgaacagct ttagatttc ctgtggaaaa tataacttac 300  
 taaagatgga gttcttgtga ctgactcctg atatcaagat actgggagcc aaattaaaa 360  
 tcagaaggct gcttgagag caagtccatg aaatgctctt tttcccacag tagaacctat 420  
 ttccctcgtg tctcaaatac ttgcacagag gctcactccc ttggataatg cagagcgagc 480  
 acgatacctg gcacatacta atttgaataa aatgctgtca aattcccatt cacccattca 540  
 agcagcaaac tctatctcac ctgaatgtac atgccaggca ctgtgctaga ctggctcaa 600  
 aaagatttca gtttcttgga ggaaccagga gggcaaggtt tcaactcagt gctataagaa 660  
 gtgttacagg ctggacacgg tggctcacgc ctgtaatccc aacatttggg aggccgaggc 720  
 gggcagatca caaggtcagg agatcgagac catcctggct aacatggtga aaccctgtct 780  
 ctactaaaaa taaaaaaat tagccgggcg ttggcggcag gtgcctgtag tcccagctgc 840  
 tggggaggct gaggcaggag aatggtgtga acccgggagg cggaacttc agggggccga 900  
 gatcgtgcca ctgcactcca gcctgggcca cagagtgaga ctctgtctca aaaaaaaaaa 960  
 aaaagtgtta tgatgcagac ctgtcaaaga ggcaaaggag ggtgttccta cactccaggc 1020  
 actgttcata acctggactc tcattcattc taaaatgga gggctcccct gggcagatcc 1080  
 ctggagcagg cactttgctg gtgtctcggt taagagaaa ctgataactc ttggtattac 1140  
 caagagatag agtctcagat ggatattctt acagaacaa tattcccact tttcagagtt 1200  
 caccaaaaaa tcattttagg cagagctcat ctggcattga tctggttcat ccatgagatt 1260  
 ggctagggta acagcacctg gtcttgagg gttgtgtgag ctatctcca gggttgcccc 1320  
 aactccgtca ggagcctgaa ccctgcatac cgtatgttct ctgcccagc caagaaagg 1380

caat t t t t c t c t c a g a g g c t c c t g c a a t t g a c a g a g a g c t c c c g a g g c a g a g a a c a g c a c 1440  
 c c a a g g t a g a g a c c c a c a c c c t c a a t a c a g a c a g g g a g g c t a t t g g c c t t c a t t g t a c 1500  
 c c a t t t a t c c a t c t g t a a g t g g g a a g a t t c c t a a a c t t a a g t a c a a a g a a g t g a a t g a a g 1560  
 a a a a g t a t g t g c a t g t a t a a a t c t g t g t g t c t t c c a c t t t g t c c c a c a t a t a c t a a a t t t 1620  
 a a a c a t t c t t c t a a c g t g g g a a a t c c a g t a t t t t a a t g t g g a c a t c a a c t g c a c a a c g a 1680  
 t t g t c a g g a a a c a a t g c a t a t t t g c a t g g t g a t a c a t t t g c a a a a t g t g t c a t a g t t t g 1740  
 c t a c t c c t t g c c c t t c c a t g a a c c a g a g a a t t a t c t c a g t t t a t t a g t c c c c t c c c t a a 1800  
 g a a g c t t c c a c c a a t a c t c t t t t c c c c t t t c c t t t a a c t t g a t t g t g a a a t c a g g t a t t c 1860  
 a a c a g a g a a a t t t c t c a g c c t c c t a c t t c t g c t t t t g a a a g c t a t a a a a a c a g c g a g g g a 1920  
 g a a a c t g g c a g a t a c c a a a c c t c t t c g a g g c a c a a a g g c a c a a c a g g c t g c t c t g g g a t t c 1980  
 t c t t c a g c c a a t c t t c a t t g c t c a a g t a t g a c t t t a a t c t t c c t t a c a a c t a g g t g c t a a 2040  
 g g g a g t c t c t c t g t c t c t c t g c c t c t t t g t g t g t a t g c a t a t t c t c t c t c t c t c t c t t 2100  
 t c t t t c t c t g t c t c t c t c t c c t t c c t c t c t g c c t c c t c t c t c a g c t t t t g c a a a a a t g 2160  
 c c a g g t g t a a t a t a a t g c t t a t g a c t c g g g a a t a t t c t g g g a a t g g a t a c t g c t t a t c t 2220  
 a a c a g c t g a c a c c t a a a g g t t a g t g t c a a a g c c t c t g c t c c a g c t c t c c t a g c c a a t a c 2280  
 a t t g c t a g t t g g g g t t t g g t t a g c a a a t g c t t t t c t c t a g a c c c a a a g g a c t t c t c t t t 2340  
 c a c a c a t t c a t t c a t t t a c t c a g a g a t c a t t t c t t t g c a t g a c t g c c a t g c a c t g g a t g c 2400  
 t g a g a g a a a t c a c a c a t g a a c g t a g c c g t c a t g g g g a a g t c a c t c a t t t t c t c t t t t t a 2460  
 c a c a g g t g t c t g a a g c a g c c a t g g c a g a a g t a c c t g a g c t c g c c a g t g a a a t g a t g g c t t 2520  
 a t t a c a g g t c a g t g g a g a c g c t g a g a c c a g t a a c a t g a g c a g g t c t c c t c t t t c a a g a g t 2580  
 a g a g t g t t a t c t g t g c t t g g a g a c a g a t t t t c c c c t a a a t t g c c t c t t t c a g t g g c a a 2640  
 a c a g g g t g c c a a g t a a a t c t g a t t t a a a g a c t a c t t t c c c a t t a c a a g t c c c t c c a g c c t 2700  
 t g g g a c c t g g a g g c t a t c c a g a t g a t g t g t t g t g c a a g g g c t t c c t g c a g a g g c a a a t g g g g 2760  
 a g a a a g a t t c c a a g c c c a c a a t a c a a g g a a t c c c t t t g c a a a g t g t g g c t t g g a g g g a g 2820  
 a g g g a g a g c t c a g a t t t t a g c t g a c t c t g c t g g g c t a g a g g t a g a g t a g g c c t c a a g a t c c a a c 2880  
 a g g g a g c a c c a g g g t g c c c a c c t g c c a g g c c t a g a a t c t g c c t t c t g g a c t g t t c t g c g c 2940  
 a t a t c a c t g t g a a a c t t g c c a g g t g t t t c a g g c a g c t t t g a g a g g c a g g c t g t t t g c a g t 3000  
 t t c t t a t g a a c a g t c a a g t c t t g t a c a c a g g g a a g g a a a a t a a a c c t g t t t a g a a g a c a 3060  
 t a a t t g a g a c a t g t c c c t g t t t t a t t a c a g t g g c a a t g a g g a t g a c t t g t t c t t t g a a g 3120

ctgatggccc taaacagatg aaggtaagac tatgggttta actcccaacc caaggaaggg 3180  
 ctctaacaca gggaaagctc aaagaagggg gttctgggcc actttgatgc catggtatit 3240  
 tgttttagaa agactttaac ctcttccagt gagacacagg ctgcaccact tgctgacctg 3300  
 gccacttggg catcatatca ccacagtcac tactaacgt tgggtgtggg gggcacactt 3360  
 ggtggtgaca ggggaggagt agtgataatg ttcccatttc atagtaggaa gacaaccaag 3420  
 tcttcaacat aaatttgatt atccttttaa gagatggatt cagcctatgc caatcacttg 3480  
 agttaaacctc tgaaccaag agatgatctt gagaactaac atatgtctac cccttttgag 3540  
 tagaatagtt ttttgctacc tggggtgaag cttataaca caagacatag atgatataaa 3600  
 caaaaagatg aattgagact tgaagaaaa ccattcactt gctgtttgac cttgacaagt 3660  
 cattttaccg gctttggacc tcatctgaaa aataaagggc tgagctggat gatctctgag 3720  
 attccagcat cctgcaacct ccagttctga aatattttca gttgtagcta agggcatttg 3780  
 ggcagcaaat ggtcattttt cagactcadc cttacaaga gccatgttat attcctgctg 3840  
 tcccttctgt tttatatgat gctcagtagc cttcctaggt gccagccat cagcctagct 3900  
 aggtcagttg tgcaggttgg aggcagccac ttttctctgg ctttatttta ttccagtttg 3960  
 tgatagcctc ccctagcctc ataatccagt cctcaatctt gttaaaaaca tatttcttta 4020  
 gaagttttaa gactggcata acttcttggc tgcagctgtg ggaggagccc attggcttgt 4080  
 ctgcctggcc tttgcccccc attgcctctt ccagcagctt ggctctgctc caggcaggaa 4140  
 attctctcct gctcaacttt cttttgtgca cttacaggtc tctttaactg tctttcaagc 4200  
 ctttgaacca ttatcagcct taaggcaacc tcagtgaagc cttaatcagg agcttctctg 4260  
 aataagagga aagtggtaac atttcacaaa aagtactctc acaggatttg cagaatgcct 4320  
 atgagacagt gttatgaaaa aggaaaaaaaa agaacagtgt agaaaaattg aatacttgct 4380  
 gagtgagcat aggtgaatgg aaaatgttat ggtcatctgc atgaaaaagc aaatcatagt 4440  
 gtgacagcat tagggataca aaaagatata gagaaggtat acatgtatgg tgtaggtggg 4500  
 gcatgtacaa aaagatgaca agtagaatcg ggatttattc taaagaatag cctgtaaggt 4560  
 gtccagaagc cacattctag tcttgagtct gcctctacct gctgtgtgcc cttgagtaca 4620  
 cccttaacct ccttgagctt cagagagggg taatcttttt atttatttt atttatttt 4680  
 gttttgtttt gttttgtttt gttttatgag acagagtctc actctgttgc ccaggctgga 4740  
 gtgcagtggt acaatcttgg ctactgcat cctccacctc ctgagttcaa gcgattctcc 4800  
 ttctcagtc tctgaaatag ctaggattac aggtgcacc caccacacc agctaatttt 4860

tgtatTTTTa gtagagaagg ggtttcgcca tgttggccag gctggTTTTg aagtcctgac 4920  
 ctaaagatt catccacctc ggcttcccaa agtgctggga ttacaggcat gagccaccac 4980  
 gcctggccca gagagggatg atcttttagaa gctcgggatt ctttcaagcc ctttctcct 5040  
 ctctgagctt tctactctct gatgtcaaag catggttctt ggcaggacca cctcaccagg 5100  
 ctccctccct cgctctctcc gcagtgtctc ttccaggacc tggacctctg ccctctggat 5160  
 ggcgcatcc agctacgaat ctccgaccac cactacagca agggcttcag gcaggccgcg 5220  
 tcagttgttg tggccatgga caagctgagg aagatgctgg ttccctgccc acagaccttc 5280  
 caggagaatg acctgagcac cttctttccc ttcatctttg aagaaggtag ttagccaaga 5340  
 gcaggcagta gatctccact tgtgtcctct tggaagtcat caagccccag ccaactcaat 5400  
 tccccagag ccaaagccct ttaaaggtag aaggcccagc ggggagacaa aacaaagaag 5460  
 gctggaaacc aaagcaatca tctctttagt ggaaactatt cttaaagaag atcttgatgg 5520  
 ctactgacat ttgcaactcc ctactcttt ctcaggggcc tttcacttac attgtcacca 5580  
 gaggttcgta acctccctgt gggctagtgt tatgaccatc accattttac ctaagtagct 5640  
 ctgittgctcg gccacagtga gcagtaatag acctgaagct ggaacccatg tctaatagtg 5700  
 tcagggccag tgttcttagc caccctctc ccagcttcat ccctactggt gttgtcatca 5760  
 gactttgacc gtatatgctc aggtgtcctc caagaaatca aattttgcca cctcgccctca 5820  
 cgaggcctgc cttcttgatt ttatacctaa acaacatgtg ctccacattt cagaacctat 5880  
 ctctttcgac acatgggata acgaggctta tgtgcacgat gcacctgtac gatcactgaa 5940  
 ctgcacgctc cgggactcac agcaaaaaag ctgggtgatg tctggtccat atgaactgaa 6000  
 agctctccac ctccaggac aggatatgga gcaacaaggt aatggaaac atcctggttt 6060  
 ccctgcctgg cctcctggca gcttgctaata tctcatgtt ttaaacaag tagaaagtta 6120  
 atttaaggca aatgatcaac acaagtgaaa aaaaatatta aaaaggaata tacaaccttt 6180  
 ggtcctagaa atggcacatt tgattgcact ggccagtga tttgttaaca ggagtgtgac 6240  
 cctgagaaat tagacggctc aagcactccc aggacatgt ccaccaagt ctcttgggca 6300  
 tagtgcagtg tcaattcttc cacaatatgg ggtcatttga tggacatggc ctaactgcct 6360  
 gtgggttctc tcttctgtt gttgaggctg aaacaagagt gctggagcga taatgtgtcc 6420  
 atccccctcc ccagtcttcc ccccttggcc caacatccgt cccaccaat gccagggtgt 6480  
 tcctttagg gaaattttac cgcccagcag gaacttatat ctctccgctg taacgggcaa 6540  
 aagtttcaag tgcggtgaac ccatcattag ctgtggtgat ctgcctggca tctgtccaca 6600

gtagccaaag cctctgcaca ggagtgtggg caactaaggc tgctgacttt gaaggacagc 6660  
ctcactcagg ggaagctat ttgctctcag ccaggccaag aaaatcctgt ttctttggaa 6720  
tcgggtagta agagtgatcc cagggcctcc aattgacact gctgtgactg aggaagatca 6780  
aatgagtgt ctctctttgg agccactttc ccagctcagc ctctcctctc ccagtttctt 6840  
cccatgggct actctctgtt cctgaaacag ttctgggtgcc tgatttctgg cagaagtaca 6900  
gcttcacctc tttcctttcc ttccacattg atcaagttgt tccgctcctg tggatgggca 6960  
cattgccagc cagtgcacaca atggcttctt tccttctctc cttcagcatt taaaatgtag 7020  
accctctttc attctccgtt cctactgcta tgaggctctg agaaaccctc aggcctttga 7080  
ggggaaacc taaatcaaca aatgaccct gctattgtct gtgagaagtc aagtatcct 7140  
gtgtcttagg ccaaggaacc tctactgtggg ttcccacaga ggctaccaat tacatgtatc 7200  
ctactctcgg ggctaggggt tggggtgacc ctgcatgctg tgtccctaac cacaagacc 7260  
ccttctttct tcagtgggtt tctccatgtc cttgttaca ggagaagaaa gtaatgacaa 7320  
aatacctgtg gccttgggcc tcaaggaaaa gaatctgtac ctgtcctgcg tgttgaaga 7380  
tgataagccc actctacagc tggaggtaag tgaatgctat ggaatgaagc cttctcagc 7440  
ctcctgctac cacttattcc cagacaattc accttctccc cgccccatc cctaggaaaa 7500  
gctgggaaca ggtctatttg acaagttttg cattaatgta aataaattta acataatttt 7560  
taactgctg caaccttcaa tctgctgca gaaaattaa tcattttgcc gatgttatta 7620  
tgtcctacca tagttacaac cccaacagat tatatattgt tagggctgct ctcat ttgat 7680  
agacaccttg ggaaatagat gacttaaagg gtcccattat cacgtccact ccactcccaa 7740  
aatcaccacc actatcacct ccagctttct cagcaaaagc ttcat tcca agttgatgtc 7800  
attctaggac cataaggaaa aatacaataa aaagcccctg gaaactaggt acttcaagaa 7860  
gctctagctt aattttcacc cccccaaaa aaaaaattc tcacctacat tatgctcctc 7920  
agcatttggc actaagtttt agaaaagaag aagggtcttt ttaataatca cacagaaagt 7980  
tgggggcca gttacaactc aggagtctgg ctctgatca tgtgacctgc tcgtcagttt 8040  
cctttctggc caaccxaaag aacatctttc ccataggcat cttgtccct tgcaccaca 8100  
aaattcttct ttctctttcg ctgcagagt tagatcccaa aaattacca aagaagaaga 8160  
tgaaaagcg atttgtcttc aacaagatag aatcaataa caagctggaa tttgagtctg 8220  
cccagttccc caactggtac atcagcacct ctcaagcaga aaacatgccc gtcttctgg 8280  
gagggacca aggcggccag gatataactg acttccat gcaatttg tcttctaaa 8340

gagagctgta cccagagagt cctgtgctga atgtggactc aatccctagg gctggcagaa 8400  
aggaacaga aaggTTTTTg agtacggcta tagcctggac tttcctgttg tctacaccaa 8460  
tgcccaactg cctgccttag ggtagtgcta agaggatctc ctgtccatca gccaggacag 8520  
tcagctctct cctttcaggg ccaatcccca gcccttttgt tgagccaggc ctctctcacc 8580  
tctcctactc acttaaagcc cgcctgacag aaaccacggc cacatttggc tctaagaaac 8640  
cctctgtcat tcgctccac attctgatga gcaaccgctt ccctatttat ttatttattt 8700  
gtttgtttgt tttgattcat tggctcaatt tattcaaagg gggcaagaag tagcagtgtc 8760  
tgtaaaagag cctagTTTTt aatagctatg gaatcaattc aatttggact ggtgtgctct 8820  
ctttaaatca agtcctttta ttaagactga aaatatataa gctcagatta tttaaatggg 8880  
aatatttata aatgagcaaa taccatactg ttcaatgggt ctgaaataaa cttcactgaa 8940  
gaaaaaaaa aaagggctct tcctgatcat tgactgtctg gattgacact gacagtaagc 9000  
aacaggctg tgagagttct tgggactaag cccactcctc attgctgagt gctgcaagta 9060  
cctagaaata tccttggcca ccgaagacta tcctcctcac ccatcccctt tatttcgttg 9120  
ttcaacagaa ggatattcag tgcacatctg gaacaggatc agctgaagca ctgcagggag 9180  
tcaggactgg tagtaacagc taccatgatt tatctatcaa tgcaccaaac atctgttgag 9240  
caagcgctat gtactaggag ctgggagtac agagatgaga acagtcacaa gtccctcctc 9300  
agataggaga ggcagctagt tataagcaga acaaggtaac atgacaagta gagtaagata 9360  
gaagaacgaa gaggagtagc caggaaggag ggaggagaac gacataagaa tcaagcctaa 9420  
agggataaac agaagatttc cacacatggg ctgggccaat tgggtgtcgg ttacgcctgt 9480  
aatcccagca ctttgggtgg caggggcaga aagatcgctt gagcccagga gttcaagacc 9540  
agcctgggca acatagttag actcccatct ctacaaaaa taataaata aataaaacaa 9600  
tcagccaggc atgctggcat gcacctgtag tcctagctac ttgggaagct gacactggag 9660  
gattgcttga gccagaagt tcaagactgc agtgagctta tccgttgacc tgcaggtcga 9720  
c 9721

<210> 3

<211> 12565

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IL-1RN gene

<400> 3

gtcgacctgc aggtcaacgg atctgagagg agagtagctt ctgtagata acagttggat 60  
 tatataccat gtcctgatcc ccttcatcat ccaggagagc agaggtggc accctgatag 120  
 cagcaagcct gggggctgca gcttgggtgg tagaggtact caggggtaca gatgctcca 180  
 aacctgtcct gctgccttag ggagcttcta ataagttgat ggatttgggt aaaattaact 240  
 tggctacttg gcaggactgg gtcagtgagg accaacaaaa agaagacatc agattatacc 300  
 ctgggggttt gtatttcttg tgtttctttc tcttctttgt actaaaatat ttacccatga 360  
 ctgggaaaga gcaactggag tctttgtagc attatcttag caaaaatta caaagtttgg 420  
 aaaacaatat tgcccatatt gtgtgggtgt tcctgtgaca ctcaggattc aagtgttggc 480  
 cgaagccact aatgtgaga tgaagccatt acaaggcagt gtgcacatct gtccacccaa 540  
 gctggatgcc aacatttcac aatagtgct tgcgtgacac aatgcagtt ccaggaggcc 600  
 caaatgaaaa tgtttgtact gaaatttgtt aaagcttccc gacaaactag attatcagt 660  
 aaggattgtt ttctgcaagg gggatgaaac ttgtgggggt agccatttgg gctgaggagg 720  
 agggaggttg gagctgagaa atgtggagac aatttccctt tagaaggact gaatctccct 780  
 gcctctctgg ggtgcggcag ccagcaggat ccaatggtgt atatgtctcc ccagctcccc 840  
 attcagtgat atcatgtcag tagcttgaaa ttatccgtgg tgggagtatt atgtcatgga 900  
 aattggcaaa tggaaacttt tattggagat tcaattgta aacttttacc agcacaacac 960  
 tgccctgcct tcagagtcaa tgaccctatc caagtttaat ccatctgtcc actgtctcca 1020  
 acacgatctt tataaaacac acctgacaac attacccttt tattcagttt tttaaaagat 1080  
 aagtttccag ctcatcgggg tggctttaa ggccatttct cctctggacc tcaccaact 1140  
 tttcaaatca cttttctac ccctacctt aaatgctact caaactccag ccatcctgaa 1200  
 taataagact ttgaaaagt agattatggg ctgggcacag tggctcacac ctgtaatccc 1260  
 agcactttgg gaggccaaga tgggtggatc acctgaggtc gggagttcga gaccagcctg 1320  
 actaacatag tgaaccctg tctctactaa aaatacaaaa ttagttgggg gtggtggcac 1380  
 aagcctgtaa tcccagctac tcaggagggt gaggcagggg aattgcttga acctgggagg 1440  
 cggaggttgc ggtgagccta gattgctcca ctgcactcca gcctgggcaa caagagcgaa 1500  
 actccatctc aaaaaataa ataaataaat aaagtagatt acatcagata cctctggcct 1560  
 aggttgttta tgaccaactc tcctgctgag aataactaga aaagctagac aaaacatatt 1620

tccaaaagat ctctttggag gcatcagaga atggccaagg ctgtaaggaa ctgcctgagc 1680  
 ccagagaggt ggagcccagc actggtgccc ttactcctg gggacatgtg ctggtttcaa 1740  
 aaacttcagc tgagcttttg agcattcatg gaacttgggtg ggggagatga aatttgtacc 1800  
 ttaaactcctg cctacagga gggtcctga taatccccac ccaatttga aatctgggtc 1860  
 agccttcaca ggtactgaag ccctcctctg aatgatctca agtcctgcta gggtagaggt 1920  
 tacctgcttt tgaaaggctc ctggcctacc tgtgcagcag gagcaaaagt gaaccatctc 1980  
 aggttacaga taacaatcat ccagagcctt gaatgacctc tactgtgctt aatatatagt 2040  
 attcagcagt cagtaaaaag gatttaggca catgcaagat gacctgtgta tcaggagaaa 2100  
 ataggcaata aattgagatc cagcagggat ttgaatcatg gatttgaatc aggggcagcc 2160  
 ttcgaaagaa ctatggagaa tatactcaga tttaaaacat aagattggaa tttttggcag 2220  
 agaactaaca actgtacaaa aaaggaacca aatggaaatc ctagaactga aagatgcaat 2280  
 taaccgatgt tgagaaatag ccaacatcta ttgaacactt cccatgtgga cagctgtgct 2340  
 aaacacttta caggcatcaa cataagatgt gtccccttac agcagtgcag tgtcccctcct 2400  
 aagacatgga cagcctgggt tccctatctc tctgcttcat caaaaccct ttacgtgggg 2460  
 cttagacact cctgttgtct ctagtgtcta gtagcacagg gctcagcaca tggaaagccac 2520  
 tagatacaat ttgatgacca ggacctccga tgaaagccat gggtgctgat tgggaaggca 2580  
 ttgtctttta tgtgctatgg tcttaaagct tcatccagga agcagaactc ggggggtgct 2640  
 gaggaccag aaccgagaat aagattagtc agagatttcc tgtgggcaga aatcataagg 2700  
 acgccaactg tttgggtgag ataagacgaa accaagagtg gacttgtggc cagaagcgtg 2760  
 aggaagaggg agagagcttc ccttgtcccc tttcttctc tccctaagcc acagtgattg 2820  
 acagcccccc cgctttggag tcagagcagg cttgagactg gactgggaaa ggaggggtggg 2880  
 tcaggataca gagcaggaag gctgggagtg cagggcagga gcaaggggct ggggcattca 2940  
 ttgtgcctga tctctccac tttacctggg gtaaagaagc atatgcaaaa gccacggtgt 3000  
 gagtatttcc caagtgccag ggtcagggca tgattcatca cgtgcagcat ttcaattcaat 3060  
 ccttatagta accgatgatg tggcttctat tattagctct atcagataat gaaactgaga 3120  
 ccaagacagg ctctgcacat tgtgtggggt aatgacacag ggggattcag acctagactc 3180  
 cataactcct gccccagga ccacccccac cctcacctg tgcatgtcga caaaggacag 3240  
 actgggccac ttctcaggac acagcgggga aatgacacag agcagggagg ttccaggagc 3300  
 cccgagcgtc ttttctccag gagaatactc tctgaattca gactggggtc agagaaacat 3360

ttaccagga gccgcagtgt ggggtgggct ttttacttga aacgctgtct gaaggcagtg 3420  
 gcaggatgaa ctctccaccc taccttggca agccacttct cttctgcaat ctgtaaggac 3480  
 atgtttgaga gaattatggt cttccaattc cggagggttg aagaaagaca aataggagag 3540  
 aacctatcat agtcaggtgc tagctgcctt ctctttcaga gagtgtgaga ataaagtgat 3600  
 acacttgatt attagcaaat actttggaaa ttttaaacgc taatattcaa cacactctgg 3660  
 aagaggcaaa taagtagaca ggttcatata catcatctcc ttcagctagt cctcacaaaa 3720  
 acaaacaaat gaataaaca aattcttctt tggccctcat aggaagacac tgtttcttga 3780  
 acgtgtttca aaaaggatgg gtgactcact caaggtcaca ctgtttatga ggacagtaca 3840  
 ggaatacaga catgccattt tgccctgaaa aatccatcac ccaggagggt gacacaattt 3900  
 tgcagaaatg ttctatttcc tctgaaggat acattcttta aacctttggg aaattcattc 3960  
 atagtcttcc tcctttgaag gattactctc tggacacaaa gtgtttgatt ctgatttgtt 4020  
 ggttgaaga tgtgttggtt gagagaaaga ttctgatttg ttggttgaat atagactcat 4080  
 caagatcaac tgctgtagta gtaaataatt tgacattttg tctgtattcc tgtgctgccc 4140  
 tcacaagctg catcaccttg agtgagtcac tcatactttt ttgtttgttt ttgttttggg 4200  
 gatggagtct tactctgttg cctaggctgg agtgcggtgg cgtgatcttg gctcactgcg 4260  
 acctccatct cctgggttca agtgatcctc ctgcctcagc ctcccagagta gctgggatta 4320  
 caggcacatg ccaccatccc tgctaatttt tgcattttca gtagagacgg agttcacca 4380  
 tgttggtcag gttggtcttg aactcctgac ctgaggtgat ccgcccacct cagcctcccc 4440  
 aagtgctggg attacaggtg tgagccaccg tgcccagccc agccatcatt tttgaaacac 4500  
 gtttgagaaa tagtgtcttc ctttgagggc caaggagaca tttttttgt ttatttgttt 4560  
 gttttgtga ggactagctg aagggggtga tgtatattaa cctgcctact tatttgctc 4620  
 ttcccagagt gtgatgaata ttagggttta aagtttctga agcatttgtt aataaagccc 4680  
 ggggctggag gtcagaagac ctggatttct ctgcatactt ttgcatcag caagctgtgt 4740  
 gaccttggac agatcccttt tttgtctaaa tctttctgag tcttcttga aacaatgcca 4800  
 ggttgggaca ggatgattgc caagctcccg tccagctcta aaacactgca acgtatgctt 4860  
 ctgcaccagc actgtccatc ctgtagatca tgcagaaatt ctcttcaact ttttctacc 4920  
 cataaaatag gagcatgctt accttttcc taatgttcca ggccccgggt ctgatattg 4980  
 taagtaagga agttaatgtg taccagagcc cattatgggc cagaagtctt cctcttctt 5040  
 cctacacctg ctctctccct ccctccctcc ctctttccct tccttcttc catccattg 5100

tgaagaagac atgatcaccc tcattctgag agtgaagaga cagaggctca actaatgaaa 5160  
 tgatttgttc aaggtcacac ggggtggcaca aggcaagtgg cagaggttga atttagaccc 5220  
 attcctgtcc aaatgctgag tttatgtcat cgtcccgaga ccataacttt aaagatgtaa 5280  
 gatagtggga aaagagttga tttcaaagca cctctcagaa ggactcactt tacatcaggg 5340  
 gtcagcagac tcaggccaaa tccgggtccat tccccgcttt tgcaaagaaa gttgtagtgg 5400  
 aacacagcta ggcttattga tttatggatt gccaacgtcc ttttgtgaaa cagacagctg 5460  
 agctgagtaa tcgtggcgca caaacctaa aatatttact atctcgtcct ttacagaatg 5520  
 ttgccaatc tatggtccgg agtccaaggc tgtccatttt tcaaagaaca caaagtgaca 5580  
 tgagactgtc ccatgtgcag ggagccctat cattttatta tgaaaaaacg gcctttctgc 5640  
 tcaaatctgt tttttaaaaa gtcaacaaac agactctggg tacctgtcag gaacagtagg 5700  
 gagtttggtt tccattgtgc tcttcttccc aggaactcaa tgaaggggaa atagaaatct 5760  
 taattttggg gaaattgcac aggggaaaaa ggggagggaa tcagttacaa cactccattg 5820  
 cgacacttag tggggttgaa agtgacaaca gcaagggttt ctctttttgg aaatgcgagg 5880  
 agggatattc cgcttctcgc agtggggcag ggtggcagac gcctagcttg ggtgagtgc 5940  
 tatttcttta taaaccacaa ctctgggccc gcaatggcag tccactgctt gctgcagtca 6000  
 cagaatggaa atctgcagag gcctccgcag tcacctaac actctcctcc tcttccgtt 6060  
 ccattcagag acgatctgcc gaccctctgg gagaaaatcc agcaagatgc aagccttcag 6120  
 gtaaggctac cccaaggagg agaaggtgag ggtggatcag ctggagactg gaaacatac 6180  
 acagctgcca gggctgccag gccagagggc ctgagaactg ggtttgggct ggagaggatg 6240  
 tccattattc aagaaagagg ctgttacatg catgggcttc aggacttggt tttcaaaaata 6300  
 tcccagatgt ggatagtgcg accggagggc tgtcttactt tcccagagac tcaggaaccc 6360  
 agtgagtaat agatgcatgc caaggagtgg gactgcgatt caggcctagt tgaatgtgct 6420  
 gacagagaag cagagagggg caccaggggc acagcccga gggccagact gatatgggca 6480  
 aggcctgtct gtgctgacat gtcggagggt cccactctcc aggaccttg gtttccccgt 6540  
 ctgtgacatc tgtgacatga gagtcacgat aactccttgt gtgccttaca gggttgttgt 6600  
 gaaaattaaa tgacacagata atagcgtaac agtattccgt gcattgtaa gagcctgaaa 6660  
 accattatga ttgaaaatg gaatcggctt tgtgagacca tcactattgt aaagatgtga 6720  
 tgctgataga aatgacagga ctgcttgtgc atgccctctg cagtgtgaca ttccagcagt 6780  
 gaaatcatgt tggggtgact tctccccac tctgaccttt atgtttgtct gggccgaggc 6840

tgcaagtcgg gctctgtggg tgtatgagtg acaagtctct cccttccaga tatggggact 6900  
 gtctgcttcc ctaggttgcc tctccctgct ctgatcagct agaagctcca ggagatcctc 6960  
 ctggaggccc cagcaggtga tgtttatccc tccagactga ggctaaatct agaaactagg 7020  
 ataatcacia acaggccaat gctgccatat gcaaagcact ttggtttgcc tggccacccc 7080  
 tcgtcgagca tgtgggctct tcagagcacc tgatgaggtg ggtacagtta gccacacttc 7140  
 acaggtgaag aggtgaggca caggtcccag gtcaggctgg ccggagctct gttattacg 7200  
 tctcacagct ttgagtcctg ctctcaacca gagaggccct ttaccaagaa gaaaggattg 7260  
 ggaccagaa tcaggtcact ggctgaggta gagaggaagc cgggttgttc ccaagggtag 7320  
 ctgctcctgc aggactctga gcaggtcacc agctaattga ggaaaggctc tagggaaaga 7380  
 cccttctggt ctgagactca gagcgagtta gctgcaaggt gttccgtctc ttgaaacttc 7440  
 tacctaggtg ctatggtagc cactagtctc aggtggctat ttaaatttat acttaaatga 7500  
 atgaaaatag aagaaaattt aaaatccaga cccttggta cactatccac atttaaagag 7560  
 gtcaatagcc acatgtggtt agtggccacc ctattgggca gtgcagctac agaacatitt 7620  
 tgcatcccag aaagttcttt tggatgttgc tgctctacag catgctttgc tgaacagaa 7680  
 gtgccttccc tgggaatctc agatgggaag caagtaagga ggggagtcaa atgtgggctc 7740  
 actgctcacc agctgtgagg gttgggcctg cctcttaacc attgtcagcc tcagtcttct 7800  
 catccatgca tgccgtgggt aactaaaat actatacccc tggagagct ggatgcaaat 7860  
 ttgacaagtt ctgggggaca caggaaggtg ccaagcacia ggctgggcac atggtggctg 7920  
 tgcactacag ctgagtcctt ttccttttca gaatctggga tgtaaccag aagaccttct 7980  
 atctgaggaa caaccaacta gttgctggat acttgcaagg accaaatgtc aatttagaag 8040  
 gtgagtggtt gccaggaaag ccaatgtatc tggcatcac gtcactttgc ccgtctgtct 8100  
 gcagcagcat ggctgcctg cacaaaccct aggtgcaatg tcctaactct tgttgggtct 8160  
 ttgtattcaa gtttgaagct gggagggcct ggctactgaa gggcacatat gagggtagcc 8220  
 tgaagagggt gtggagaggt agagtctagg tcagaggtca gtcctatag gcaagtggtc 8280  
 ccagggccac agctgggaag ggcaaatacc agaaggcaag gttgaccatt cccttctca 8340  
 agtgccattt aaggctccat gttcctatgt tgttcaaacc ctaactcaat cccaaattaa 8400  
 tccaccatgt ataaggttga gctatgtctc ttattcctgg acaccatact cagccataatc 8460  
 tggccacac attaacagct ggatgacctt gaagaagctt caccactct gttcctcagc 8520  
 tttcccttca gtgggatgat atcaactgga caacaggatg tgcgattctt ttagttccag 8580

ccttccagga tgttttact cccctgtttg ttgtttagg atggtattac ctccaccttc 8640  
 ccaccttccc tatgccctgg ttctgtctcc tgtgcctcgc tctgaaagt gatgagacct 8700  
 acaattcctg tcctggtagt tctcctaag aacacactga agcacgagga agctgagatt 8760  
 ttgtttgcta catgagagca tggaggcctc ttagggagag aggaggttca gagactccta 8820  
 ggctcctggt ggagccccac tcatggcctt gttcattttc cctgcccctc agcaacactc 8880  
 ctattgacct ggagcacagg tctcctgggg aaagtgaggg aaatatggac atcacatgga 8940  
 acaacatcca ggagactcag gcctctagga gtaactgggt agtgtgcatc ctggggaaaag 9000  
 tgagggaaat atggacatca catggaacaa catccaggag actcaggcct ctaggagtaa 9060  
 ctgggtagtg tgcattcctg ggaaagtgag ggaaatatgg acatcacatg gaacaacatc 9120  
 caggagactc aggctctag gagtaactgg gtagtgtgca tcctggggaa agtgagggaa 9180  
 atatggacat cacatggaac aacatccagg agactcaggc ctctaggagt aactgggtag 9240  
 tgtgcttggg ttaatcttct atttacctgc agaccaggaa gatgagacct ctctgccctt 9300  
 ctgacctcgg gatthtagtt ttgtggggac caggggagat agaaaaatac cgggggtctc 9360  
 ttcatattg ctgcttcctc ttctattaac ctgaccctcc cctctgttct tccccagaaa 9420  
 agatagatgt ggtaccatt gagcctcatg ctctgttctt gggaatccat ggaggggaaga 9480  
 tgtgcctgtc ctgtgtcaag tctggtgatg agaccagact ccagctggag gtaaaaacat 9540  
 gctttggatc tcaaatcacc ccaaaacca gtggcttgaa acaacaaaaa ttttttctta 9600  
 tgattctgtg ggttgaccag gattagctgg gtagttctgt tccatgtggt ggaacatgct 9660  
 ggggtcactt tggaagctgc attcagcaga gtgccaggct tgcgctgggc atccaagggtg 9720  
 gtccctcatc ctccaggctc tctttccatg tgatctctca gtgtttaaga gttagtggga 9780  
 gcttccttac agcatggcgg ctgacttcca aaagggatta ttccaaaaag agcctcaaca 9840  
 tgcaggcgct tattatgact tctgcttgca tcatcctatt ggccaaagcc agtcacgtgg 9900  
 ctaagtctag cccctgtga gaggagactg cataagagtg tgaacaccag gagacacggt 9960  
 cactgggggc caccactgta accatctacc acaggacctg aatctctgtg tgctactccc 10020  
 ttgctcaagg gccccctac ccacgcagac ctgctgtctt ctagcaaagc ccatcctcag 10080  
 gacctttctc ttccaatcct tattgactca aattgattag ttggtgctcc acccagagcc 10140  
 ctgtgctcct ttatctcatg taatgttaat gggtttccca gccctgggaa aacatggctt 10200  
 tgtctcaggg gcttgctgga tgcaacctta acctcaatgt gagtggccat actgtggcac 10260  
 tgtccatcc ctccaccaggg aactgttct ggagggtgac tgctgttct gtgaggagtg 10320

gggatggcta ggacattgca tggaacacac caccacccca tcttctcaga gctcaaacc 10380  
 tgacagaaca ccagctccac aggccttggc ttctgctgat ggtgccgtgt atttaccaga 10440  
 cttagtggtc caaggccaga gtggcagatt tcccaaagtc aagggtgac agtgggacag 10500  
 cctctttgtg tctttgctgt cctaagaaac ctgggccagg ccaggcgagc tggctcacgc 10560  
 ctgtaatcc cagcactttg agaggccaag gtgggcagat cacgaggcca ggagtttgag 10620  
 accagcctgg ccaacattgg tgaaccctg tctctattaa aaatagaaaa cattagacag 10680  
 gtgtgggtgt gcatgcctgt aatcccagct actcaggagg ctgaggcagg agaatcgctt 10740  
 gaaccagga ggtggagggt gcagtgagcc gagattgtgc cactgcactc cagcctagc 10800  
 gacagagcaa gactccgtct cgggaaaatt aattaataa taaataaacc taggtcccag 10860  
 agtcccacag aatggcagac aggagcacct gggggctttt agggatggc atttcccctg 10920  
 tactaactct gggctgtcca gaggcgattt catggcgctgg agtggagagg gaggcagcac 10980  
 aggacttctt aggcctcagc tctcacctgc ccatcttttg atttccaggc agttaacatc 11040  
 actgacctga gcgagaacag aaagcaggac aagcgcttcg ccttcatccg ctgagacagt 11100  
 ggccccacca ccagttttga gtctgcccgc tgccccggtt ggttctctg cacagcgatg 11160  
 gaagctgacc agcccgtcag cctcaccaat atgcctgacg aaggcgtcat ggtcaccaaa 11220  
 ttctacttcc aggaggacga gtagtactgc ccaggcctgc ctgttccat tcttgcatgg 11280  
 caaggactgc agggactgcc agtccccctg cccagggtc cccggctatg ggggactga 11340  
 ggaccagcca ttgaggggtg gaccctcaga aggcgtcaca acaacctggt cacaggactc 11400  
 tgcttctct tcaactgacc agcctccatg ctgcctccag aatggtcttt ctaatgtgtg 11460  
 aatcagagca cagcagcccc tgacaaaagc ctttccatgt cgcctctgca ttcaggatca 11520  
 aaccccagacc acctgcccga cctgctctcc tcttgccact gcctcttctt ccttattcc 11580  
 accttccat gccctggatc catcaggcca ctgatgacc cccaaccaag tggctcccac 11640  
 accctgtttt acaaaaaaga aaagaccagt ccatgagga ggttttaag ggtttgtgga 11700  
 aatgaaaat taggatttca tgatTTTTT tttcagtcc ccgtgaagga gagcccttca 11760  
 tttggagatt atgttctttc ggggagaggc tgaggactta aaatattcct gcatttgtga 11820  
 aatgatgggtg aaagtaagtg gtagcttttc ctttctttt cttctttttt tggatgtcc 11880  
 caacttghaa aaattaaaag ttatggtact atgttagccc cataattttt ttttccctt 11940  
 taaaacactt ccataatctg gactcctctg tccaggcact gctgccagc ctccaagctc 12000  
 catctccact ccagatTTTT tacagctgcc tgagctactt tacctcctat cagaagtttc 12060

tcagctccca aggctctgag caaatgtggc tcctgggggt tctttcttcc tctgctgaag 12120  
 gaataaattg ctccttgaca ttgtagagct tctggcactt ggagacttgt atgaaagatg 12180  
 gctgtgcctc tgcctgtctc cccaccaggc tgggagctct gcagagcagg aaacatgact 12240  
 cgtatatgtc tcaggtccct gcagggccaa gcacctagcc tcgctcttgg caggactca 12300  
 gcgaatgaat gctgtatatg ttgggtgcaa agttccctac ttctgtgac ttcagctctg 12360  
 ttttacaata aatcttgaa aatgcctata ttgttgacta tgtccttggc ctgacaggc 12420  
 tttgggtata gagtgtgag gaaactgaaa gaccaatgtg tyttycttac cccagaggct 12480  
 ggcgccctggc ctcttctctg agagttcttt tcttccttca gcctcactct ccctggataa 12540  
 catgagagca aatctctctg cgggg 12565

<210> 4

<211> 3634

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> TNF-alpha gene

<400> 4

gaattccggg tgatttact cccggctgtc caggcttgtc ctgctacccc acccagcctt 60  
 tcctgaggcc tcaagcctgc caccaagccc ccagctcctt ctccccgag gacccaaaca 120  
 caggcctcag gactcaacac agcttttccc tccaaccgt tttctctccc tcaacggact 180  
 cagctttctg aagcccctcc cagttctagt tctatctttt tcctgcatcc tgtctggaag 240  
 ttagaaggaa acagaccaca gacctggtcc caaaagaaa tggaggcaat aggttttgag 300  
 gggcatgggg acggggttca gcctccaggg tcctacacac aatcagtca gtggcccaga 360  
 agacccccct cggaatcgga gcagggagga tggggagtgt gaggggtatc ctgatgctt 420  
 gtgtgtcccc aactttcaa atccccgcc cgcgatgga gaagaaaccg agacagaagg 480  
 tgcagggccc actaccgctt cctccagatg agctcatggg tttctccacc aaggaagttt 540  
 tccgctgggt gaatgattct ttccccgcc tcctctcgcc ccagggacat ataaaggcag 600  
 ttgttggcac acccagccag cagacgctcc ctcaagcagg acagcagagg accagctaag 660  
 agggagagaa gcaactacag accccccctg aaacaaccc tcagacgcca catccccctga 720

caagctgccca ggcaggttct cttcctctca catactgacc cacggcttca ccctctctcc 780  
 cctggaaagg acaccatgag cactgaaagc atgatccggg acgtggagct ggccgaggag 840  
 gcgctcccca agaagacagg ggggccccag ggctccaggc ggtgcttggt cctcagcctc 900  
 ttctccttcc tgatcgtggc aggcgccacc acgctcttct gcctgctgca ctttgagtg 960  
 atcggccccc agaggggaaga ggtgagtgcc tggccagcct tcatccactc tcccacccaa 1020  
 ggggaaatga gagacgcaag agagggagag agatgggatg ggtgaaagat gtgcgctgat 1080  
 agggagggat gagagagaaa aaaacatgga gaaagacggg gatgcagaaa gagatgtggc 1140  
 aagagatggg gaagagagag agagaaagat ggagagacag gatgtctggc acatggaagg 1200  
 tgctcactaa gtgtgtatgg agtgaatgaa tgaatgaatg aatgaacaag cagatatata 1260  
 aataagatat ggagacagat gtggggtgtg agaagagaga tgggggaaga aacaagtgat 1320  
 atgaataaag atggtgagac agaaagagcg ggaaatatga cagctaagga gagagatggg 1380  
 ggagataagg agagaagaag ataggggtgc tggcacacag aagacactca gggaaagagc 1440  
 tgittaatgc tggaaagtga atacacagat gaatggagag agaaaaccag acacctcagg 1500  
 gctaagagcg caggccagac aggcagccag ctgttctctc ttttaagggtg actccctcga 1560  
 tgittaacat tctccttctc cccaacagtt ccccagggac ctctctctaa tcagccctct 1620  
 ggcccaggca gtcagtaagt gtctccaaac ctctttccta attctgggtt tgggtttggg 1680  
 ggtagggtta gtaccggtat ggaagcagtg ggggaaattt aaagttttgg tcttggggga 1740  
 ggatggatgg aggtgaaagt aggggggtat tttctaggaa gtttaagggt ctcagctttt 1800  
 tcttttctct ctcctcttca ggatcatctt ctcgaacccc gagtgacaag cctgtagccc 1860  
 atgtttagg taagagctct gaggatgtgt cttggaactt ggagggctag gatttgggga 1920  
 ttgaagcccg gctgatggta ggcagaactt ggagacaatg tgagaaggac tcgctgagct 1980  
 caaggaagg gtggaggaac agcacaggcc ttagtgggat actcagaacg tcatggccag 2040  
 gtgggatgtg ggatgacaga cagagaggac aggaaccgga tgtggggtgg gcagagctcg 2100  
 agggccagga tgtggagagt gaaccgacat ggccacactg actctcctct ccctctctcc 2160  
 ctccctccag caaacctca agctgagggg cagctccagt ggctgaaccg ccgggccaat 2220  
 gccctcctgg ccaatggcgt ggagctgaga gataaccagc tgggtgtgcc atcagagggc 2280  
 ctgtacctca tctactcca ggtcctcttc aaggccaag gctgccctc cacccatgtg 2340  
 ctctcacc acaccatcag ccgcatcgcc gtctcctacc agaccaaggt caacctctc 2400  
 tctgcatca agagcccctg ccagagggag accccagagg gggctgaggc caagccctgg 2460

tatgagccca tctatctggg aggggtcttc cagctggaga agggtgaccg actcagcgct 2520  
 gagatcaatc ggcccgacta tctcgacttt gccgagtctg ggcaggctta ctttgggatc 2580  
 attgccctgt gaggaggacg aacatccaac cttcccaaac gcctcccctg cccaatccc 2640  
 tttattacc cctccttcag acaccctcaa cctcttctgg ctcaaaaaga gaattggggg 2700  
 cttagggctg gaaccaagc ttagaacttt aagcaacaag accaccactt cgaaacctgg 2760  
 gattcaggaa tgtgtggcct gcacagtga gtgctggcaa ccactaagaa ttcaaactgg 2820  
 ggctccaga actcactggg gcctacagct ttgatccctg acatctggaa tctggagacc 2880  
 agggagcctt tggttctggc cagaatgctg caggacttga gaagacctca cctagaaatt 2940  
 gacacaagtg gaccttaggc cttcctctct ccagatgttt ccagacttcc ttgagacacg 3000  
 gagcccagcc ctccccatgg agccagctcc ctctatttat gttgcactt gtgattatit 3060  
 attatttatt tattatttat ttatttacag atgaatgtat ttatttggga gaccggggta 3120  
 tcctggggga cccaatgtag gagctgcctt ggctcagaca tgttttccgt gaaaacggag 3180  
 ctgaacaata ggctgttccc atgtagcccc ctggcctctg tgccttcttt tgattatggt 3240  
 ttttaaataa tttatctgat taagtgtct aaacaatgct gatttggga ccaactgtca 3300  
 ctcatgtctg agcctctgct cccagggga gttgtgtctg taatcgccct actattcagt 3360  
 ggcgagaaat aaagtttgct tagaaaagaa acatggcttc cttcttggaa ttaattctgc 3420  
 atctgcctct tcttgtgggt gggaagaagc tccctaagtc ctctctccac aggcittaaag 3480  
 atccctcgga cccagtcca tccttagact cctagggccc tggagaccct acataaacia 3540  
 agcccaacag aatattcccc atccccagg aaacaagagc ctgaacctaa ttacctctcc 3600  
 ctcagggcat gggaatttcc aactctggga attc 3634

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 5

tgtacctaaag cccacccttt agagc

25

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 6

tggcctccag aaacctcaa

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 7

gctgatattc tggtaggaaa

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8

ggcaagagca aaactctgtc

20

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 9	
ctatctgagg aacaaccaac tagtagc	27
<210> 10	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: primer	
<400> 10	
taggacattg cacctagggt ttgt	24
<210> 11	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: primer	
<400> 11	
aggcaatagg ttttgagggc cat	23
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: primer	
<400> 12	
tcctccctgc tccgattccg	20
<210> 13	
<211> 29	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: probe

<400> 13

caaccaacta gttgctggat acttgcaag

29

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: probe

<400> 14

caaccaacta gttgccggat acttgcaag

29

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 15

aagttctggg ggacacagga ag

22

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 16

acgggcaaag tgacgtgatg

20

<210> 17

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: probe

<400> 17

accccgctccc catgccc

17

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: probe

<400> 18

aacccccgtcc tcatgcccc

19

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 19

ggccactgac tgatttgtgt gt

22

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 20

caaaagaaat ggaggcaata ggtt

24

<210> 21

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 21

ctcagcaaca ctctat

17

<210> 22

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 22

tcctggctcg caggtaa

17

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 23

gaagcccctc ccagttctag ttc

23

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 24

cactcccat cctccctggt c

21

【図 1】

ヒト IL-1A 遺伝子の DNA 配列 (ジェンバンク受託番号 No. X08833)

```

-1437 AAGCTTCTAC CCTAGTCTGG TGCTACACTT ACATTGCTTA CATCCAAGTG TGGTTATTTT
-1377 TGTGGCTCCT GTTATAACTA TTATAGCACC AGGTCTATGA CCAGGAGAAT TAGACTGGCA
-1317 TTAATTCAGA ATAAGAGATT TTGCACCTGC AATAGACCTT ATGACACCTA ACCAACCCCA
-1257 TTATTTACAA TTAACACAGGA ACAGAGGGAA TACTTTATCC AACTCACACA AGCTGTTTTT
-1197 CTCCCAGATC CATGCTTTT TTGCGTTTATT ATTTTITAGA GATGGGGGCT TCACATAGTT
-1137 GCCCACACTG GACTAAAACCT CTGGGCCTCA AGTGATTGTC CTGCCTCAGC CTCCTGAATA
-1077 GCTGGGACTA CAGGGGCATG CCATCACACC TAGTTCATTT CCTCTATTTA AAATATACAT
-1017 GGCTTAAACT CCAACTGGGA ACCCAAAAACA TTCATTTGCT AAGAGTCTGG TGTTCTACCA
-957 CCTGAACCTAG GCTGGCCACA GGAATTATAA AAGCTGAGAA ATTCCTTAAT AATAGTAACC
-897 AGGCAACATC ATTGAAGGCT CATATGTAAA AATCCATGCC TTCCTTTCTC CCAATCTCCA
-837 TTCCCAAACCT TAGCCACTGG TTCTGGCTGA GGCCTTACGC ATACCTCCCG GGGCTTGCAC
-777 ACACCTTCTT CTACAGAAGA CACACCTTGG GCATATCCTA CAGAAGACCA GGCTTCTCTC
-717 TGGTCCTTGG TAGAGGGCTA CTTTACTGTA ACAGGGCCAG GGTGGAGAGT TCTCTCCTGA
-657 AGCTCCATCC CCTCTATAGG AAATGTGTTG ACAATATTC AAGAGTAAG AGGATCAAGA
-597 CTTCCTTGTG CTCAAAATACC ACTGTCTCTT TCTCTACCCCT GCCCTAACCA GGAGCTTGTG
-537 ACCCCAAACT CTGAGGTGAT TTATGCCTTA ATCAAGCAAA CTCCTCTCTT CAGAAAAGAT
-477 GGCTCATTTT CCCTCAAAGG TTGCCAGGAG CTGCCAAGTA TTCTGCCAAT TCACCCCTGA
-417 GCACAATCAA CAAATTCAGC CAGAACACAA CTACAGCTAC TATTAGAATC ATTATTATTA
-357 ATAAATTCCT CTCCAAATCT AGCCCTTGA CTTCCGATTT CACGATTTCT CCCTTCTCTC
-297 TAGAACTTGG ATAAGTTTCC CGCGCTTCCC TTTTCTAAG ACTACATGTT TGTCATCTTA
-237 TAAAGCAAAG GGGTGAATAA ATGAACCAA TCAATAACTT CTGGAATATC TGCAAAACAC
-177 AATAATATCA GCTATGCCAT CTTTCACTAT TTTAGCCAGT ATCGAGTTGA ATGAACATAG
-117 AAAAAACAAA AACTGAATTC TTCCCTGTAA ATTCCTCCGTT TTGACGACGC ACTTGTAGCC
-57 ACGTAGCCAC GCCTACTTAA GACAATTACA AAAGGCGAAG AAGACTGACT CAGGCTAAG
4 CTGCCAGCCA GAGAGGGAGT CATTTCATTG GCGTTTGAAT CAGCAAAGGT ATTGTCTCTA
64 CATCTCTGGC TATTAAGATA TTTCCTGTTG TTGTTTTTCT CTTTGGCTGT TTTCTCTCAC
124 ATTGCCTTCT CTAAGGCTAC AGTCTCTCCT TTCTTTTCTT GTCCCTCCCT GGTTTGGTAT
184 GTGACCTAGA ATTACAGTCA GATTTAGAAA AATGATTCTC TCATTTTGTG GATAAGGACT
244 GATTTCGTTT ACTGAGGGAC GGCAGAACTA GTTTCCTATG AGGGCATGGG TGAATACAAC
304 TGAGGCTTCT CATGGGAGGG AATCTCTACT ATCCAAAATT ATTAGGAGAA AATTGAAAAA
364 TTCCAACCTT GTCTCTCTCT TACCTCTGTG TAAGGCAAAT ACCTTATTCT TGTGGTGT
424 TTGTAACCTC TTCAAACTTT CATTGATTGA ATGCTCTTTC TGGCAATACA TTAGGTGGG
484 CACATAAGGA ATACCAACAT AAATAAAAACA TTCTAAAAGA AGTTTACGAT CTAATAAAGG
544 AGACAGGTAC ATAGCAAACCT AATTCAAAGG AGCTAGAAGA TGGAGAAAAA GCTGAATGTG
604 GACTAAGTCA TTCAACAAAG TTTTCAGGAA GCACAAAGAG GAGGGGCTCC CCTCACAGAT
664 ATCTGGATTA GAGGCTGGCT GAGCTGATGG TGGCTGGTGT TCTCTGTTGC AGAAGTCAAG
724 ATGGCCAAAG TTCCAGACAT GTTTGAAGAC CTGAAGAACT GTTACAGGTA AGGAATAAGA
784 TTTATCTCTT GTGATTTAAT GAGGGTTTCA AGGCTCACCA GAATCCAGCT AGGCATAACA
844 GTGGCCAGCA TGGGGGCGAG CCGGCAGAGG TTGTAGAGAT GTGTACTAGT CCTGAAGTCA
904 GAGCAGGTTT AGAGAAGACC CAGAAAAACT AAGCATTGAG CATGTTAAAC TGAGATTACA
964 TTGGCAGGGA GACCGCCATT TTAGAAAAAT TATTTTGTAG GTCTGCTGAG CCCTACATGA
1024 ATATCAGCAT CAACTTAGAC ACAGCCTCTG TTGAGATCAC ATGCCCTGAT ATAAGAATGG
1084 GTTTTACTGG TCCATTCTCA GAAAAACTTG ATCTCATTCA GGAACAGGAA ATGGCTCCAC
1144 AGCAAAGCTGG GCATGTGAAC TCACATATGC AGGCAAACTC CACTCAGATG TAGAAGAAAG
1204 GTAAATGAAC ACAAAAGATA AATTACGGAA CATATTAAAC TAACATGATG TTTCCATTAT
1264 CTGTAGTAAA TACTAACACA AACTAGGCTG TCAAAATTTT GCCTGGATAT TTTACTAAGT
1324 ATAAATATG AAATCTGTTT TAGTGAATAC ATGAAAGTAA TGTGTAACAT ATAAT CTATTT
1384 TGGTTAAAAA AAAAAAGGAG TGCTTCAAAA CCTTCTTTT CTCTAAAGGA GCTTAAACATT
1444 CTTCCTGAA CTTCAATTAA AGCTCTTCAA TTTGTTAGCC AAGTCCAATT TTTACAGATA
1504 AAGCACAGGT AAAGCTCAA GCCTCTCTG ATGACTACTA ATTCAGATT AGTAAGATAT

```

【 図 1 】

```

1564 GAATTACTCT ACCTATGTGT ATGTGTAGAA GTCCTTAAAT TTCAAAGATG ACAGTAATGG
1624 CCATGTGTAT GTGTGTGACC CACAACATATC ATGGTCATTA AAGTACATTG GCCAGAGACC
1684 ACATGAAATA ACAACAATTA CATTCTCATC ATCTTATTTT GACAGTGAAG ATGAAGAAGA
1744 CAGTTCCTCC ATTGATCATC TGTCTCTGAA TCAGGTAAGC AAATGACTGT AATTCTCATG
1804 GGACTGCTAT TCTTACACAG TGGTTTCTTC ATCCAAAGAG AACAGCAATG ACTTGAATCT
1864 TAAATACTTT TGTTTTACCC TCACTAGAGA TCCAGAGACC TGCTTTCAT TATAAGTGAG
1924 ACCAGCTGCC TCTCTAAACT AATAGTTGAT GTGCATTGGC TTCTCCCGA ACAGAGCAGA
1984 ACTATCCCAA ATCCCTGAGA ACTGGAGTCT CCTGGGGCAG GCTTCATCAG GATGTTAGTT
2044 ATGCCATCCT GAGAAAGCCC CGCAGGCCGC TTCACCAGGT GTCTGTCTCC TAACCATGAA
2104 TGTTGTGGTT GTCTTCTCTG ACACCAGCAT CAGAGGTTAG AGAAAGTCTC CAAACATGAA
2164 GCTGAGAGAG AGGAAGCAAG CCAGCTGAAA GTGAGAAGTC TACAGCCACT CATCAATCTG
2224 TGTTATTGTG TTTGGAGACC ACAAAATAGAC ACTATAAGTA CTGCCATGTA TGTCTTCAGT
2284 ACTGGCTTTA AAAGCTGTCC CCAAAGGAGT ATTTCTAAAA TATTTTGAGC ATTGTTAAGC
2344 AGATTTTTAA CCTCCTGAGA GGGAACTAAT TGGAAAGCTA CCACTCACTA CAATCATTTG
2404 TAACCTATTT AGTTACAACA TCTCATTTTT GAGCATGCAA ATAAATGAAA AAGTCTTCTT
2464 AAAAAAATCA TCTTTTTATC CTGGAAGGAG GAAGGAAGGT GAGACAAAAG GGAGAGAGGG
2524 AGGGAAGCCT AATGAAACAC CAGTTACCTA AGACCAGAAT GGAGATCCTC CTCACTACCT
2584 CTGTTGAATA CAGCACCTAC TGAAGAAGT TTCATTCCCT GACCATGAAC AGCCCTCTCAG
2644 CTCTGTGTTT CCTTCCTCAC AGAAATCCTT CTATCATGTA AGCTATGGCC CACTCCATGA
2704 AGGCTGCATG GATCAATCTG TGTCTCTGAG TATCTCTGAA ACCTCTAAAA CATCCAAGCT
2764 TACCTTCAAG GAGAGCATGG TGGTAGTAGC AACCAACGGG AAGGTTCTGA AGAAGAGACG
2824 GTTGAGTTTA AGCCAATCCA TCACTGATGA TGACCTGGAG GCCATCGCCA ATGACTCAGA
2884 GGAAGGTAAG GGGTCAAGCA CAATAATATC TTTCTTTTAC AGTTTTAAGC AAGTAGGGAC
2944 AGTAGAATTT AGGGGAAAAT TAAACGTGGA GTCAGAATAA CAAGAAGACA ACCRAGCATT
3004 AGTCTGGTAA CTATACAGAG GAAAATTAAT TTTTATCCTT CTCAGGAGG GAGAAATGAG
3064 CAGTGGCCTG AATCGAGAAT ACTTGCTCAC AGCCATTATT TCTTAGCCAT ATTTGTAAGG
3124 TCGTGTGACT TTTAGCCTTT CAGGAGAAAG CAGTAATAAG ACCACTTACG AGCTATGTTT
3184 CTCTCATACT AACTATGCC TCTTGGTCAT GTTACATAAT CTTTTCGTGA TTCAGTTCAG
3244 TCTACTGTAA AATGGAGATA ATCAGAATCC CCCACTATT GGATTTGTTT AAAGATTAAG
3304 AGTCTCAGGC TTTACAGACT GAGCTAGCTG GGCCTCCTG ACTGTTATAA AGATTAATG
3364 AGTCAACATC CCCTAATCTC TGGACTAGAA TAATGTCTGG TACAAAGTAA GCACCCAATA
3424 AATGTTAGCT ATTACTATCA TTATTATTAT TATTTTATTT TTTTTTTTGG AGATGGAGTC
3484 TGGCTCTGTC ACCCAGCCTG GAGTGCAGTG GCACAATCTC GGCTCACTGC AAGCTCTGCC
3544 TCCTGGGTTT ATGCCATTCT CCTGCCTCAG CCTCCCGAGT AAGCTGGGAA TACAGGCACC
3604 CGCCACTGTT CCCGGCTAAT TTTTGTGATT TTTAGTAGAG ACGGAGTTTC ACCGTGGTCT
3664 CCATCTCCTC GTGATCCACC CACCTGGGCC TCCCAAAGTG CCGGATTAC AGGCGTGAGC
3724 CACCCGGCCC GGCCTATTAT TATTATTATT ACTACTACTA CTACCTATAT GAATACTACC
3784 AGCAATACTA ATTTATTAAT GACTGGATTA TGTCTAAACC TCACAAGAAAT CCTACCTCT
3844 CATTTTACAT AAAAGGAAAC TAAGCTCATT GAGATAGGTA AACTGCCCAA TGGCATACT
3904 CTGTAAGTGG GAGAGCCTCA AATCTAATTC AGTTCATCCT GAGTAAAAAA ATCATGGTTT
3964 CTCCTCCATC CTTTACTGT ACAAGCCTCC ACATGAACTA TAAACCCAAT ATTCTGTTTT
4024 TTAAGATAAT ACCTAAGCAA TAACGCATGT TCACCTAGAA GGTTTTAAAA TGTAACAAAA
4084 TATAAGAAAA TAAAAATCAC TCATATCGTC AGTGAGAGTT TACTACTGCC AGCACTATGG
4144 TATGTTTCTT TAAATCTTT GCTATACACA TACCTACATG TGAACAAAATA TGTCTAACAT
4204 CAAGACCACA CTATTACAA CTTTATATCC AGCTTTTCTT ACTTAGCAAT GTATTGAGGA
4264 CATTTTAGAG TGCCCGTTTT TCACCATTAT AAGCAATGCA ACAATGAACA TCTGTATAAA
4324 TAAATATTCA TTTCTCTCAC CTTTATTTT CTTAGAATAT ATTCCTAGAA GTAGAAATTC
4384 CCAGAGCCAT GAGGATTTGT GACGCTATTG ATATGTGCCA CTTTGCACCT TCTGTGACAT
4444 ATATAATTAT TTTTAATGCA TTCATTTTTT TCTCAGAGTG CATTGTTTTG AAAACATAGA
4504 CGGGAATAC TGGTAGTCTT CCTTGTCACT TAGAAACACC CAAACAATGA AAAATGAAAA
4564 AGTTGCACAA ATAGTCTCTA AAAACAATGA AACTATTGCC TGAGGAATTG AAGTTTAAAA
4624 AGAAGCACAT AAGCAACAAC AAGGATAATC CTAGAAAACC AGTTCTGCTG ACTGGGTGAT
4684 TTCACTTCTC TTTGCTTCTC CATCTGGATT GGAATATTCC TAATACCCCC TCCAGAACTA

```

【図 1】

```

4744 TTTCCCTGT TTGACTAGA CTGTGTATAT CATCTGTGTT TGTACATAGA CATTAACTCG
4804 CACTGTGAT CATGGTTTA GAAATCATCA AGCCTAGGTC ATCACCTTTT AGCTTCCTGA
4864 GCAATGTGAA ATACAACFTT ATGAGGATCA TCAAATACGA ATTCATCCTG AATGACGCC
4924 TCAATCAAAG TATAAATCGA GCCAATGATC AGTACCTCAC GGCTGCTGCA TTACATAATC
4984 TGGATGAAGC AGGTACATTA AAATGGCACC AGACATTCTC GTCATCCTCC CCTCCTTCA
5044 TTTACTTATT TATTTATFTC AATCTTCTG CTTGCAAAAA ACATACCTCT TCAGAGTCT
5104 GGGTTGCACA ATTCCTCCAG AATAGCTTGA AGCACAGCAC CCCATAAAA ATCCCAAGCC
5164 AGGGCAGAAG GTTCAACTAA ATCTGGAAGT TCCACAAGAG AGAAGTTTCC TATCTTTGAG
5224 AGTAAAGGGT TGTGCACAAA GCTAGCTGAT GTACTACCTC TTTGGTCTCT TCAGACATC
5284 TTACCCTCAA TTTTAAACT GAGGAACTG TCAGACATAT TAAATGATTT ACTCAGATTT
5344 ACCCAGAAGC CAATGAAGAA CAATCACTCT CCTTAAAAA GTCTGTTGAT CAAACTCACA
5404 AGTAACACCA AACCAGGAAG ATCTTTATTA TCTCTGATAA CATATTTGTG AGGCAAAACC
5464 TCCAATAAGC TACAAATATG GCTTAAAGGA TGAAGTTTAG TGTCCAAAAA CTTTATCAC
5524 ACACATCCAA TTTTCATGGC GGACATGTTT TAGTTTCAAC AGTATACATA TTTTCAAAGG
5584 TCCAGAGAGG CAATTTTGCA ATAAACAAGC AAGACTTTTT CTGATTGGAT GCACCTCAGC
5644 TAACATGCTT TCAACTCTAC ATTTACAAT TATTTTGTGT TCTATTTTTC TACTTAATAT
5704 TATTTCTGCA ATTTCCCAA TATTGACATC GTGTATGTAT TTGCCATTTT TAATATCACT
5764 AGACAATTA ATCAGGTTGC TAGCTTGGTC CCTTGGGTTT ACTCTAAATA GCTTGATTGC
5824 AAATATCTTT GTATATATTA TTGTTTTTTC TCCTATCTTG TAATTTCTTT GAGCAGATCC
5884 CAAAGAGGAA TGCCTAGATC AATGGGCACA AATAAATTGA CAGCTCTTAT TAAACATTA
5944 TCTGTAAGTA AAAACTGAAC TACTTTTCAG TATCACTAGC AACATATGAG TGTATCAGT
6004 TCCTAAACCC CTCCATGTTA GGTCAATTATG AACTTATGAT CTAACAAATT ACAGGGTCTT
6064 ATCCCACATA TGAAATTATA AGAGATTCAA CACTTATTCA GCCCCGAAGG ATTCATTCAA
6124 CGTAGAAAT TCTAAGAACA TTAACCAAGT ATTTACCTGC CTAGTGAGTG TGGAGACAT
6184 TGTGAAGGAC ACAAAGATGT ATAGAATTCC ATTCCTGACT TCCAGGTATT TACACCATAG
6244 GTGGGGACCT AACTACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACCATGCACA
6304 CACAATCTAC ATCAACACTT GATTTTATAC AAATACAATG AATTTACTTT CTTTTGGTT
6364 CTTCTCTTCA CCAAGTAAAT TTGACATGGG TGCTTATAAG TCATCAAAGG ATGATGCTAA
6424 AATTACCGTG ATTCCTAAGAA TCTCAAAAAC TCAATTGTAT GTGACTGCCC AAGATGAAGA
6484 CCAACCAGTG CTGCTGAAGG TCAGTTGTCC TTTGTCTCCA ACTTACCTTC ATTTACATCT
6544 CATATGTTG TAAATAAGCC CAATAGGCAG ACACCTCTAA CAAGGTGACA CTGTCCCTCT
6604 TCCTTCCTAC CACAGCCCC ACCTACCCAC CCCACTCCCA TTGATTCCAG AGGCGTGCCT
6664 AGGCAGGATC TATGAGAAAA TATAACAGAG AGTAAGAGGA AAATTACCTT CTTTCTTTT
6724 CCTTCCCTG CCTGACCTTA TTCACCTCCC ATCCCAGAGC ATCCATTTAT TCCATTGATC
6784 TTTACTGACA TCTATTATCT GACCTACACA ATACTAGACA TTAGGACAAT GTGGCCTGCC
6844 TCCAAGAAC TCAATAAGC CAACTGAGAT CAGAGAGGAT TAATCACCTG CCAATGGGCA
6904 CAAAGCAACA AGCTGGGAGC CAAGTCCCAA AATGGGGCCT GCTGCTTCCA GTTCCCTCT
6964 CTCTGCATG ATGTCAGCAT TATCCTTCGT CCCAGTCTG TCTCCACTAC CACTTTCCCC
7024 CTCAAACACA CACACACACA ACAGCCTTAG ATGTTTTCTC CACTGATAAG TAGGTGACTC
7084 AATTTGTAAG TATATAATCC AAGACCTTCT ATTCCTCAAGT AGAATTTATG TGCCTGCCTG
7144 TGCTTTTCTA CCTGGATCAA GTGATGTCTA CAGAGTAGGG CAGTAGCTTC ATTCATGAAC
7204 TCATTCAACA AGCATTATTC ACTGAGAGCC TTGFATTTT CAGGCATAGT GCCAACAGCA
7264 GTGTGGACAG TGGTGCATCA AAGCCTCTAG TCTCATAGAA CTTAGTCTTC TGGAGGATAT
7324 GGAAAACAGA CAACCCAAAC AACCAACAAA AGAGCAAAGT GCTGCAAAAA AAAAAAAAT
7384 GAATAGGGTG CTAAGATAGA GAAAAGTGGG AGAGTGCTAT TTAGACAAAG TGGTAAAAAC
7444 AAAGCCCTT GTGAGATGAG AGCTGCCGAC AGAGGGGGCG GGTCAITGGT GTGGTTTT
7504 GGGTAGGACA TTCAGAGGAG GGGCGGGTC GTGGTTGTGG GTTTTTGGGT AGGCATTCA
7564 GAGGAGGGG CGGTCTGTGG TTGTGGGTTT TTGGGTAGGA CATTGAGAGG AGGGGGGGG
7624 TCGTGGTTGT GGGTTTTGG GTAGGACATT CAGAGGAGGG GGCGGGTCTG GGTGTGGGT
7684 TTTTGGGACA TTCAGAGGAG TCTGAATGCA CCCAGGCTA CAACTTCAAG ATGGTAAAGG
7744 ACAGCTCCAA GGATCAGAAG AAGCATTCTT GGAAGTGGGG CATTTTGAGA AGGAGGAAAA
7804 ATATGCAGAG ACTAGTCTT GCAGAGCTTG CATTTGATT TCAATTTAGG TACAATGAAA
7864 ACCCATTAAT GGGTTTCA CAITGCAATG GCCTGACCTC ACTTATATT CTTAAAAATG

```

## 【図 1】

```

7924 AAAACAGATC AGAAGGAAGG CAATAGAGAA GCAGAAAAGTC CAATGAGGAG GTTTCACAGC
7984 AGTCATGGGG GTGGGGTAAG GAAAAGAAGT GGAAAGAAAC AGACAGAATT GGGTTATATT
8044 TTGGAGATAG AACCAACAGA AGGAAGAGGA GAAACACAT TTA CTGAGAA GGGAAAAAGT
8104 AGGAGAGGAA TAGGTTGGG AAATAAATCC TGCTGACATT GGAAACCCCA AGGAAGCCTC
8164 AAAAGTATAT TTACTTGCCT TAGATTAAA AGAATAGGAA AGAAGCATCT CAACTTGGAA
8224 TTTGAAATCT ATTTTCCAT AAAAGTATTG TTAATTTCTA CTCATCTCA CAAGAAAAGT
8284 ACATTCTAAA GAGTATATTG AAAGAGTTTA CTGATATACT TAGGAATTTT GTGTGTATGT
8344 GTGTGTGTGT ATGTGTGTGT GTGTGTTTAA CCTTCAATG TTGACTTAAA TACTGAGATA
8404 AATGTCATCT AAATGCTAAA TTGATTTCCC AAAGGTATGA TTTGTTCACT TGGAGATCAA
8464 AATGTTTAGG GGGCTTAGAA TCACCTGAGT GCTCAGATTG GATGCAAAAT GTCTTAGGCC
8524 TATGTTGAAG GCAGGACAGA AACAAATGTT CCCTCCTACC TGCCTGGATA CAGTAAGATA
8584 CTAGTGTCCAC TGACAATCTT CATAACTAAT TTAGATCTCT CTCCAATCAA CTAAGGAAAT
8644 CAACTCTTAT TAATAGACTG GGCCACACAT CTA CTAGGCA TGAATAAAT GCTTGTGAA
8704 TGAACAATG AATGAAGAGC CTATAGCATC ATGTTACAGC CATAGTCTTA AGTGGTGT
8764 TCTCATGAAG GCCAAATGCT AAGGGATTGA GCTTCAGTCC TTTTCTAAC ATCTTGTCT
8824 CTAACAGAAT TCTCTCTTT TCTTCATAGG AGATGCCTGA GATACCCAAA ACCATCACAG
8884 GTAGTGAGAC CAACCTCCTC TTCTCTGGG AAACCTCAGG CACTAAGAAC TATTTACAT
8944 CAGTTGCCA TCCAAACTTG TTTATTGCCA CAAAGCAAGA CTACTGGGTG TCTTGGCAG
9004 GGGGGCCACC CTCTATCACT GACTTTCAGA TACTGGAAAA CCAGGCGTAG GTCTGGAGTC
9064 TCACTTGTCT CACTTGTGCA GTGTTGACAG TTCATATGTA CCATGTACAT GAAGAAGCTA
9124 AATCCTTAC TGTTAGTCAT TTGCTGAGCA TGTACTGAGC CTGTGAATTC TAAATGAATG
9184 TTTACTCTCT TTGTAAGAGT GGAACCAACA CTAACATATA ATGTTGTTAT TTAAGAACA
9244 CCTTATATTT TGCAATAGT CAATCATTTT AATTATTATT CTTTATAACA ATTTTAGGAG
9304 GACCAGAGCT ACTGACTATG GCTACCAAAA AGACTCTACC CATATTACAG ATGGGCAAAT
9364 TAAGGCATAA GAAACTAAG AAATATGCAC AATAGCAGTT GAAACAAGAA GCCACAGACC
9424 TAGGATTTCA TGATTTTCAAT TCAACTGTTT GCCTTCTGCT TTTAAGTTGC TGATGAACCTC
9484 TTAATCAAAAT AGCATAAAGT TCTGGGACCT CAGTTTTATC ATTTTCAAAA TGGAGGGAAT
9544 AATACCTAAG CCTTCTGCC GCAACAGTTT TTTATGCTAA TCAGGGAGGT CATTTTGGTA
9604 AAATACTTCT CGAAGCCGAG CCTCAAGATG AAGGCAAAGC ACGAAATGTT ATTTTTTAAT
9664 TATTATTTAT ATATGTATTT ATAAATATAT TTAAGATAAT TATAATATAC TATATTTATG
9724 GGAACCCCTT CATCCTCTGA GTGTGACCAG GCATCCTCCA CAATAGCAGA CAGTGTTTTC
9784 TGGGATAAGT AAGTTTGATT TCATTAATAC AGGGCATTTT GGTCCAAGTT GTGCTTATCC
9844 CATAGCCAGG AAACCTCTGCA TTCTAGTACT TGGGAGACCT GTAATCATAT AATAAATGTA
9904 CATTAATTAC CTGAGCCAG TAATTGGTCC GATCTTTGAC TCTTTTGCCA TAAACTTAC
9964 CTGGGCATTCT TGTTTTCATT CAATTCCACC TGCAATCAAG TCCTACAAGC TAAATTAGA
10024 TGAACCTAAC TTTGACAACC ATGAGACCAC TGTATCAAA ACTTTCCTTT CTGGAATGTA
10084 ATCAATGTTT CTCTAGGTT CTA AAAAATG TGATCAGACC ATAATGTTAC ATTATTATCA
10144 ACAATAGTGA TTGATAGAGT GTTATCAGTC ATA ACTAAAT AAAGCTTGA CAAAAATCT
10204 CTGACACATA GTTATTCATT GCCTTAATCA TTATTTACT GCATGGTAAT TAGGGACAAA
10264 TGGTAAATGT TTACATAAAT AATTGTATTT AGTGTACTT TATAAAATCA AACCAAGATT
10324 TTATATTTTT TTCTCCTCTT TGTAGCTGC CAGTATGCAT AAATGGCATT AAGAATGATA
10384 ATATTTCCCG GTTCACTTAA AGCTCATATT ACACATACAC AAAACATGTG TTCCCATCTT
10444 TATACAACT CACACATACA GAGCTACATT AAAAACACT AATAGGCCAG GCACGGTGGC
10504 TCAGACTGT AATCCAGCA CTTTGGGAGG

```

## 【図2】

## ヒトIL-1B遺伝子のDNA配列 (ジェンバンク受託番号 No. X04500)

```

-1933 AGAAAGAAAG AGAGAGAGAA AGAAAAGAAA GAGGAAGGAA GGAAGGAAGG AAGAAAGACA
-1873 GGCTCTGAGG AAGGTGGCAG TTCCTACAAC GGGAGAACCA GTGGTTAATT TGCAAAGTGG
-1813 ATCCTGTGGA GGCANNAGGA GGAGTCCCT AGGCCACCCA GACAGGGCTT TTAGCTATCT
-1753 GCAGGCCAGA CACCAAATTT CAGGAGGGCT CAGTGTTAGG AATGGATTAT GCCTTATCAA
-1693 ATTCACAGGA AACTAACATG TTGAACAGCT TTTAGATTTT CTGTGGAAAA TATAACTTAC
-1633 TAAAGATGGA GTTCTTGTGA CTGACTCCTG ATATCAAGAT ACTGGGAGCC AAATTAAGAAA
-1573 TCAGAAGGCT GCTTGGAGAG CAAGTCCATG AAATGCTCTT TTTCCACAG TAGAACCTAT
-1513 TTCCCTCGTG TCTCAAATAC TTGCACAGAG GCTCACTCCC TTGGATAATG CAGAGCGGAGC
-1453 ACGATACCTG GCACATACTA ATTTGAATAA AATGCTGTCA AATTCCCATT CACCCATTCA
-1393 AGCAGCAAAC TCTATCTCAC CTGAATGTAC ATGCCAGGCA CTGTGCTAGA CTTGGCTCAA
-1333 AAAAGATTTCA GTTTCCTGGA GGAACCAGGA GGGCAAGGTT TCAACTCAGT GCTATAAGAA
-1273 GTGTTACAGG TGGACACCGG TGGCTCACGC CTGTAATCCC AACATTTGGG AGGCCGAGGC
-1213 GGGCAGATCA CAAGGTCAGG AGATCGAGAC CATCCTGGCT AACATGGTGA AACCTGTCTC
-1153 CTACTAAAAA TACAAAAAAT TAGCCGGGCG TTGGCGGCAG GTGCCCTGTAG TCCCAGCTCG
-1093 TGGGGAGGCT GAGGCAGGAG AATGGTGTGA ACCCGGAGG CGGAACTTGC AGGGGGCCGA
-1033 GATCGTGCCA CTGCACTCCA GCCTGGGCGA CAGAGTGAAG CTCTGTCTCA AAAAAAAGAA
-973 AAAAGTGTTA TGATGCAGAC CTGTCAAAGA GGCAAAGGAG GGTGTTCCTA CACTCCAGGC
-913 ACTGTTTATA ACCTGGACTC TCATTTCATC TACAAATGGA GGGTCCCTCT GGCAGATCC
-853 CTGGAGCAGG CACTTTGCTG GTGTCTCGGT TAAAGAGAAA CTGATAACTC TTGGTATTAC
-793 CAAGAGATAG AGTCTCAGAT GGATATTCTT ACAGAAACAA TATTTCCACT TTTCCAGATT
-733 CACCAAAAAA TCATTTTAGG CAGAGCTCAT CTGGCATTGA TCTGGTTCAT CCATGAGATT
-673 GGCTAGGGTA ACAGCACCTG GTCTTGCAGG GTTGTGTGAG CTTATCTCCA GGGTTGCCCC
-613 AACTCCGTCG GGAGCCTGAA CCCTGCATAC CGTATGTTCT CTGCCCCAGC CAAGAAAGGT
-553 CAATTTTCTC CTGAGAGGCT CCTGCAATTG ACAGAGAGCT CCCGAGGCAG AGAACAGCAC
-493 CCAAGGTAGA GACCCACACC CTCATATACG ACAGGGAGGG CTATTTGGCC TTCAATGTATC
-433 CCATTTATCC ATCTGTAAGT GGGAAAGATC CTAAACTTAA GTACAAAGAA GTGAATGAAG
-373 AAAAGTATGT GCATGTATAA ATCTGTGTGT CTTCCACTTT GTCCCACATA TACTAAATTT
-313 AAACATTCTT CTAACGTGGG AAAATCCAGT ATTTTAATGT GGACATCAAC TGCACAACGA
-253 TTGTCAGGAA AACATGTCAT ATTTGCATGG TGATACATTT GCAAAATGTG TCATAGTTTG
-193 CTACTCCTTG CCCTTCCATG AACAGAGAAA TTATCTCAGT TTATTAGTCC CCTCCCCTAA
-133 GAAGCTTCCA CCAATACTCT TTTCCCCTTT CTTTAACTTT GATTGTGAAA TCAGGTATTTC
-73 AACAGAGAAA TTTCTCAGCC TCCTACTTCT GCTTTTGAAA GCTATAAAAA CAGCGAGGGA
-13 GAACTGGCA GATACCAAAC CTCTTCGAGG CACAAGGCAC AACAGGCTGC TCTGGGATTC
48 TCTTCAGCCA ATCTTCATTG CTCAAAGTATG ACTTTAATCT TCCTTACAAC TAGGTGCTAA
108 GGGAGTCTCT CTGTCTCTCT GCCCTTTTGT GTGTATGCAT ATTCCTCTCT TCTCTCTCTT
168 TCTTCTCTG TCFTCTCTCT CCTTCTCTCT TGCCTCCTCT CTCAGCTTTT TGCAAAAATG
228 CCAGGTGTAA TATAATGCTT ATGACTCGGG AAATATTCTG GGAATGGATA CTGCTTATCT
288 AACAGCTGAC ACCCTAAAGG TTAGTGTCAA AGCCTCTGCT CCAGCTCTCC TAGCCAATAC
238 ATTGCTAGTT GGGGTTTGGT TTAGCAAATG CTTTCTCTA GACCCAAAGG ACTTCTCTTT
308 CACACATTCA TTCATTTACT CAGAGATCAT TTCTTTGCAT GACTGCCATG CACTGGATGC
468 TGAGAGAAAT CACACATGAA CGTAGCCGTC ATGGGGAAGT CACTCATTTT CTCCTTTTFA
528 CACAGGTGTC TGAAGCAGCC ATGGCAGAAG TACCTGAGCT CGCCAGTGAA ATGATGGCTT
588 ATTACAGGTC AGTGGAGACG CTGAGACCAG TAACATGAGC AGGTCTCCTC TTCAAGAGT
648 AGAGTGTIAT CTGTGCTTGG AGACCAGATT TTTCCCCTAA ATTGCCTCTT TCAGTGGCAA
708 ACAGGGTGCC AAGTAAATCT GATTTAAAGA CTACTTTCCC ATTACAAGTC CCTCCAGCCT
768 TGGGACCTGG AGGCTATCCA GATGTGTGTG TGCAAGGGCT TCTTGCAGAG GCAATAGGGG
828 AGAAAAGATT CCAAGCCAC AATACAAGGA ATCCCTTTCG AAAGTGTGGC TTGGAGGGAG
888 AGGGAGAGCT CAGATTTTAG CTGACTCTGC TGGGCTAGAG GTTAGGCCTC AAGATCCAAC
948 AGGGAGCACC AGGGTGCCCA CCTGCCAGGC CTAGAATCTG CTTTCTGGAC TGTTCTGCGC
1008 ATATCACTGT GAAACTTGCC AGGTGTITCA GGCAGCTTGG AGAGGCAGGC TGTTTGAGT

```

【図2】

1068 TTCTTATGAA CAGTCAAGTC TTGTACACAG GGAAGGAAAA ATAAACCTGT TTAGAAGACA  
1128 TAATTGAGAC ATGTCCCTGT TTTTATTACA GTGGCAATGA GGATGACTTG TTCTTTGAAG  
1188 CTGATGGCCC TAAACAGATG AAGGTAAGAC TATGGGTTTA ACTCCAACC CAAGGAAGGG  
1248 CTCTAACACA GGGAAAGCTC AAAGAAGGGA GTTCTGGGCC ACTTTGATGC CATGGTATTT  
1308 TGTTTTAGAA AGACTTTAAC CTCTCCAGT GAGACACAGG CTGCACCACT TGCTGACCTG  
1368 GCCACTTGGT CATCATATCA CCACAGTCAC TCACTAACGT TGGTGGTGGT GGCCACACTT  
1428 GGTGGTGACA GGGGAGGAGT AGTGATAATG TTCCCATTTT ATAGTAGGAA GACAACCAAG  
1488 TCTTCAACAT AAATTGATT ATCCTTTTAA GAGATGGATT CAGCCTATGC CAATCACTTG  
1548 AGTTAAACTC TGAACCAAG AGATGATCTT GAGAATAAC ATATGTCTAC CCCTTTGAG  
1608 TAGAATAGTT TTTTGCTACC TGGGGTGAAG CTTATAACAA CAAGACATAG ATGATATAAA  
1668 CAAAAAGATG AATTGAGACT TGAAGAAAA CCATTCACTT GCTGTTTGAC CTTGACAAGT  
1728 CATTTTACCC GCTTTGAGCC TCATCTGAAA AATAAAGGGC TGAGCTGGAT GATCTCTGAG  
1788 ATCCAGCAT CTGCAACCT CCAGTCTGA AATATTTTCA GTTGTAGCTA AGGGCATTG  
1848 GGCAGCAAA GGTCAATTTT CAGACTCATC CTTACAAGA GCCATGTAT ATCTCTGCTG  
1908 TCCCTTCTGT TTTATATGAT GCTCAGTAGC CTTCTAGGT GCCCAGCCAT CAGCCTAGCT  
1968 AGTFCAGTTG TGCAGGTTGG AGGCAGCCAC TTTTCTCTGG CTTTATTTTA TTCCAGTTG  
2028 TGATAGCCTC CCTAGCCTC ATATCCAGT CCTCAATCTT GTTAAAAACA TATTTCTTTA  
2088 GAAGTTTTAA GACTGGCATA ACTTCTTGGC TGCAGCTGTG GGAGGAGCCC ATTGGCTTGT  
2148 CTGCCTGGCC TTTGCCCCCC ATTGCCTCTT CCAGCAGCTT GGCTCTGCTC CAGGCAGGAA  
2208 ATCTCTCCTT GCTCAACTTT CTTTGTGCA CTTACAGGTC TCTTTAAGT TCTTCAAGC  
2268 CTTTGAACCA TTATCAGCCT TAAGGCAACC TCAGTGAAGC CTTAATACGG AGCTTCTCTG  
2328 AATAAGAGGA AAGTGGTAA CATTACAAA AAGTACTCTC ACAGGATTTG CAGAATGCCCT  
2388 ATGAGACAGT GTTATGAAA AGGAAAAAAA AGAACAGTGT AGAAAAATTG AATACTTGTCT  
2448 GAGTGAGCAT AGGTGAATGG AAAATGTTAT GGTCACTGTC ATGAAAAAGC AAATCATAGT  
2508 GTGACAGCAT TAGGGATACA AAAAGATATA GAGAAGGTAT ACATGTATGG TGTAGGTGGG  
2568 GCATGTACAA AAAGATGACA AGTAGAATCG GGATTTATTC TAAAGAATAG CCGTGAAGGT  
2628 GTCCAGAAGC CACATTTCTAG TCTTGAGTCT GCCTCACTCT GCTGTGTGCC CTTGAGTACA  
2688 CCCTTAACCT CTTGAGCTT CAGAGAGGGA TAATCTTTT ATTTTATTTT ATTTTATTTT  
2748 GTTTTGTGTT GTTTTGTGTT GTTTTATGAG ACAGAGTCTC ACTCTGTTG CAGGCTGGA  
2808 GTGCAGTGGT ACAATCTTGG CTTACTGCAT CCTCCACCTC CTGAGTTCAA GCGATTTCTC  
2868 TTCCTCAGTC TCCTGAATAG CTAGGATTAC AGGTGCACCC CACCACACC AGCTAATTTT  
2928 TGTATTTTAA GTAGAGAAGG GTTTCGCCA TGTGGCCAG GCTGGTTTGG AAGTCTGAC  
2988 CTAATGATT CATCCACCTC GGCTTCCCAA AGTGTGGGA TTACAGGCAT GAGCCACCAC  
3048 GCCTGGCCCA GAGAGGGATG ATCTTTAGAA GCTCGGGATT CTTTCAAGCC CTTTCTCTCT  
3108 CTCFGAGCTT TCTACTCTCT GATGTCAAAG CATGGTTCTT GGCAGGACCA CCTCACCAGG  
3168 CTCCCTCCCT CGCTCTCTCC GCAGTGTCTC TTCCAGGACC TGGACCTCTG CCCTCTGGAT  
3228 GCGGCGATCC AGCTACGAAT CTCGACCAC CACTACAGCA AGGGCTTCAG GCAGGCCGGG  
3288 TCAGTTGTTG TGGCCATGGA CAAGCTGAGG AAGATGCTGG TTCCCTGCCC ACAGACCTTC  
3348 CAGGAGAATG ACCTGAGCAC CTTCTTTCCC TTCATCTTGT AAGAAGGTAG TTAGCCAAGA  
3408 GCAGGCAGTA GATCTCCACT TGTGTCCTCT TGGAAATCAT CAAGCCCAG CCAACTCAAT  
3468 TCCCCAGAG CCAAAGCCCT TTAAGGTAG AAGGCCAGC GGGGAGACAA AACAAGAAG  
3528 GCTGAAAACC AAAGCAATCA TCTCTTAGT GAAAATATT CTTAAAGAAG ATCTTGATGG  
3588 CTAATGACAT TTGCAACTCC CTCACTCTT CTCAGGGGCC TTTCACTTAC ATTGTACCA  
3648 GAGTTTCGTA ACCTCCCTGT GGGCTAGTGT TATGACCATC ACCATTTTAC CTAAGTAGCT  
3708 CTGTTGCTCG GCCACAGTGA GCAGTAATAG ACCTGAAGCT GGAACCCATG TCTAATAGTG  
3768 TCAGGTCCAG TGTTCTTAGC CACCCACTC CCAGCTTCAAT CCTACTGGT GTTGTATCA  
3828 GACTTTGACC GTATATGCTC AGGTGTCTC CAAGAAATCA AATTTTGCCA CCTCGCCTCA  
3888 CGAGGCCTGC CTTCTGATT TTATACCTAA ACAACATGTG CTCCACATTT CAGAACCTAT  
3948 CTTCTTCGAC ACATGGGATA ACGAGGCTTA TGTGCACGAT GCACCTGTAC GATCACTGAA  
4008 CTGCACGCTC CGGACTCAC AGCAAAAAAG CTTGTTGATG TCTGGTCCAT ATGACTGAA  
4068 AGCTCTCCAC CTCCAGGGAC AGGATATGGA GCAACAAGGT AAATGGAAC ATCCTGGTTT  
4128 CCTGCTGGC CCTCTGGCA GCTTGTCTAAT TCTCCATGTT TTAACCAAG TAGAAAATTA  
4188 ATTTAAGCCA AATGATCAAC ACAAGTAAA AAAAATATTA AAAAGGAATA TACAACCTTT

【図 2】

4248 GGTCCTAGAA ATGGCACATT TGATTGCACT GGCCAGTGCA TTTGTTAACA GGAGTGTGAC  
4308 CCTGAGAAAT TAGACGGGCTC AAGCACTCCC AGGACCATGT CCACCCAAGT CTCTTGGGCA  
4368 TAGTGCAGTG TCAATTCTTC CACAATATGG GGTCAATTGA TGGACATGGC CTAAGTGCCT  
4428 GTGGGTTCTC TCTTCTGTFT GTTGAGGCTG AAACAAGAGT GCTGGAGCGA TAATGTGTCC  
4488 ATCCCCCTCC CCAGTCTTCC CCCCTTGCCC CAACATCCGT CCCACCAAT GCCAGGTGGT  
4548 TCCTTGTAGG GAAATTTTAC CGCCCAGCAG GAACCTATAT CTCTCCGCTG TAACGGGCAA  
4608 AAGTTTCAAG TCGGTGAAC CCATCATTAG CTGTGGTGAT CTGCTCGGCA TCGTGCCACA  
4668 FTAGCCAAAG CCTCTGCACA GGAGTGTGGG CAACTAAGGC TGCTGACTTT GAAGGACAGC  
4728 CTCACCTCAGG GGGAAAGCTAT TTGCTCTCAG CCAGGCCAAG AAAATCCTGT TTCTTTGGAA  
4788 TCGGGTAGTA AGAGTGATCC CAGGGCCTCC AATTGACACT GCTGTGACTG AGGAAAGATCA  
4848 AAATGAGTGT CTCCTTTTGG AGCCACTTTC CCAGCTCAGC CTCTCCTCTC CCAGTTCTT  
4908 CCCATGGGCT ACTCTCTGTT CCTGAAACAG TTCTGGTGCC TGATTTCTGG CAGAATFACA  
4968 GCTTCACCTC TTTCTTTTCC TTCCACATFG ATCAAGTTGT TCCGCTCCTG TGGATGGGCA  
5028 CATTGCCAGC CAGTGACACA ATGGCTTCTT TCCTTCTTTC CTTCAGCATT TAAAATGTAG  
5088 ACCCTCTTTC ATTCTCCGTT CCTACTGCTA TGAGGCTCTG AGAAACCCCTC AGGCCCTTGA  
5148 GGGGAAACCC TAAATCAACA AAATGACCCT GCTATTGTCT GTGAGAAGTC AAGTTATCCT  
5208 GTGTCTTAGG CCAAGGAACC TCACGTGGG TTCCACAGA GGCTACCAAT TACATGTATC  
5268 CTACTCTCGG GGCTAGGGGT TGGGGTGACC CTGCATGCTG TGTCCCTAAC CACAAGACCC  
5328 CCTTCTTCTC TCAGTGGTGT TCTCCATGTC CTTTGTACAA GGAGAAGAAA GTAATCAAA  
5388 AATACTCTGT GCCTTGGGCC TCAAGGAAAA GAATCTGTAC CTGCTCTGCG TGTGAAAGA  
5448 TGATAAGCCC ACTCTACAGC TGGAGGTAAG TGAATGCTAT GGAATGAAGC CCTTCTCAGC  
5508 CTCCTGCTAC CACTTATTCC CAGACAATTC ACCTTCTCCC CGCCCCATC CCTAGGAAAA  
5568 GCTGGGAACA GGTCTATTTG ACAAGTTTTC CATTAAATGTA AATAAATTTA ACATAATTTT  
5628 AACTGCGCTG CAACCTTCAA TCCTGCTGCA GAAAAATAAA TCATTTTGGC GATGTTATTA  
5688 TGTCCTACCA TAGTTACAAC CCCAACAGAT TATATATTGT TAGGGCTGCT CTCATTTGAT  
5748 AGACACCTTG GGAATAGAT GACTTAAAGG GTCCCATTTA CACGTCCACT CCACTCCCAA  
5808 AATCACCACC ACTATCACCT CCAGCTTCTC CAGCAAAAGC TTCATTTCCA AGTTGATGTC  
5868 ATTTCTAGGAC CATAAGGAAA AATACAATAA AAAGCCCCTG GAAACTAGGT ACTTCAAGAA  
5928 GCTCTAGCTT AATTTTACC CCCCAAAAA AAAAAAATTC TCACCTACAT TATGCTCCTC  
5988 AGCATTTGGC ACTAAGTTT AGAAAAGAA AGGGCTCTT TTAATAATCA CACAGAAAGT  
6048 TGGGGGCCCA GTTACAACCT AGGAGTCTGG CTCCTGATCA TGTGACCTGC TCGTCAGTTT  
6108 CCTTCTTGGC CAACCCAAAG AACATCTTTC CCATAGGCAT CTTTGTCCCT TGCCCCACAA  
6168 AAATCTTCTT TTCTCTTTCG CTGCAGAGTG TAGATCCCAA AAATTACCBA AAGAAGAAGA  
6228 TGGAAAAGCG ATTTGTCTTC AACAAAGTAG AAATCAATAA CAAGCTGGAA TTTGAGTCTG  
6288 CCCAGTTCCC CAACTGGTAC ATCAGCACCT CTCAAGCAGA AAACATGCCC GTCTTCTTGG  
6348 GAGGGACCAA AGGCGGCCAG GATATAACTG ACTTCACCAT ACTTCCCTAG GCAATTTGTG TCTTCTTAAA  
6408 GAGAGCTGTA CCCAGAGAGT CCTGTGCTGA ATGTGGACTC AATCCCTAGG GCTGGCAGAA  
6468 AGGGAACAGA AAGGTTTTTG AGTACGGCTA TAGCCTGGAC TTTCTCTGTG TCTACACCAA  
6528 TGCCCAACTG CCTGCTTAG GGTAGTGCTA AGAGGATCTC CTGTCCATCA GCCAGGACAG  
6588 TCAGCTCTCT CCTTTCAGGG CCAATCCCCA GCCCTTTTGT TGAGCCAGGC CTCTCTCACC  
6648 TCTCCTACTC ACTTAAAGCC CGCCTGACAG AAACCACGGC CACATTTGGT TCTAAGAAAC  
6708 CCTCTGTGAT TCGCTCCAC ATTCTGATGA GCAACCGCTT CCCTATTAT TATTATTAT  
6768 GTTTGTTTGT TTTGATTCAT TGGTCTAATT TATTCAAAGG GGGCAAGAG TAGCAGTGT  
6828 TGTAAGAGAG CCTAGTTTTT AATAGCTATG GAATCAATTC AATTTGGACT GGTGTGCTCT  
6888 CTTTAAATCA AGTCTTTTAA TTAAGACTGA AAATATATAA GCTCAGATTA TTTAAATGGG  
6948 AATATTTATA AATGAGCAAA TATCATACTG TTCAATGGTT CTGAAATAAA CTTCAGTAA  
7008 GAAAAAATAA AAAGGTCTC TCCTGATCAT TGAATGTCTG GATTGACACT GACAGTAAAG  
7068 AAACAGGCTG TGAGAGTCTT TGGGACTAAG CCCACTCTC ATTGCTGAGT GCTGCAAGTA  
7128 CCTAGAAATA TCCTTGCCCA CCGAAGACTA TCCTCCTCAC CCATCCCCTT TATTTCTGTG  
7188 TTCAACAGAA GGATATTCAG TGCACATCTG GAACAGGATC AGCTGAAGCA CTGCAGGGAG  
7248 TCAGGACTGG TAGTAACAGC TACCATGATT TATCTATCAA TGCACCAAAC ATCTGTTGAG  
7308 CAAGCGCTAT GTACTAGGAG CTGGGATAC AGAGATGAGA ACAGTCACAA GTCCCTCCTC  
7368 AGATAGGAGA GGCAGCTAGT TATAAGCAGA ACAAGGTAAC ATGACAAGTA GAGTAAGATA  
  
7428 GAAGAACGAA GAGGAGTAGC CAGGAAGGAG GGAGGAGAAC GACATAAGAA TCAAGCCTAA  
7488 AGGGATAAAC AGAAGATTTT CACACATGGG CTGGGCCAAT TGGGTGTCTG TTACGCCTGT  
7548 AATCCCAGCA CTTTGGGTGG CAGGGGACAG AAGATCGCTT GAGCCCAGGA GTTCAAGACC  
7608 AGCCTGGGCA ACATAGTGG ACTCCATCT CTACAAAAA TAAATAAATA AATAAACA  
7668 TCAGCCAGGC ATGCTGGCAT GCACCTGTAG TCCTAGCTAC TTGGGAAGCT GACACTGGAG  
7728 GATTGCTTGA CCCCAGAAAT TCAAGACTGC AGTGAGCTTA TCCGTTGACC TGCAGGTGCA  
7788 C

## 【図3-1】

ヒトIL-1RN遺伝子のDNA配列 (ジェンバンク受託番号 No.X64532)

-5988 GTCGACCTGC AGGTCAACGG ATCTGAGAGG AGAGTAGCTT CTTGTAGATA ACAGTTGGAT  
 -5928 TATATACCAT GTCCTGATCC CCTTCATCAT CCAGGAGAGC AGAGGTGGTC ACCCTGATAG  
 -5868 CAGCAAGCCT GGGGGCTGCA GCTTGGTGGG TAGAGGTACT CAGGGGTACA GATGTCTCCA  
 -5808 AACCTGTCTT GCTGCCTTAG GGAGCTTCTA ATAAGTTGAT GGATTTGGTT AAAATTAAC  
 -5748 TGGCTACTTG GCAGGACTGG GTCAGTGAGG ACCAACAAAA AGAAGACATC AGATTATAAC  
 -5688 CTGGGGGTTT GTATTCTTTG TGTTCCTTTC TCTTCTTTGT ACTAAAATAT TTACCCATGA  
 -5628 CTGGGAAAGA GCAACTGGAG TCTTGTAGC ATTATCTTAG CAAAAATTTA CAAAGTTTGG  
 -5568 AAAACAATAT TGCCCATATT GTGTGGTGTG TCCTGTGACA CTCAGGATTC AAGTGTGGCC  
 -5508 CGAAGCCACT AAATGTGAGA TGAAGCCATT ACAAGCAGT GTGCACATCT GTCCACCCAA  
 -5448 GCTGGGATGCC AACATTTTAC AAATAGTCTT TCGGTGACAC AAATGCAGTT CCAGGAGCC  
 -5388 CAAATGAAAA TGTTTGTACT GAAATTTGTT AAAGCTTCCC GACAAACTAG ATTTATCAGT  
 -5328 AAGGATTGTT TTCTGCAAGG GGGATGAAAC TTGTGGGGTG AGCCATTTGG GCTGAGGAGG  
 -5268 AGGGAGGTTG GAGCTGAGAA ATGTGGAGAC AATTTCCCTT TAGAAGGACT GAATCTCCCT  
 -5208 GCCTCTCTGG GGTGCGGCAG CCAGCAGGAT CCAATGGTGT ATATGTCTCC CCAGCTCCCC  
 -5148 ATTCAGTGAT ATCATGTCAG TAGCTTGAAT TTATCCGTGG TGGGAGTATT ATGTATGGA  
 -5088 AATTGGCAAA TGGAACTTTT TATTGGAGAT TCAATTGTTA AACTTTTACC AGCACACAC  
 -5028 TGCCCTGCCT TCAGAGTCAA TGACCCTATC CAAGTTTAAAT CCATCTGTCC ACTGTCTCCA  
 -4968 ACACGATCTT TATAAAACAC ACCTGACAAC ATTACCCTTT TATTCAGTTT TTTAAAAGAT  
 -4908 AAGTTTCCAG CTCATCGGGG TGGCTTTAAA GGCCATTTCT CCTCTGGACC TCACCCAACT  
 -4848 TTTCAAATCA CTTTTCCTAC CCCTACCTCT AAATGCTACT CAAACTCCAG CCATCCTGAA  
 -4788 TAATAAGACT TTTGAAAAGT AGATTATGGG CTGGGCACAG TGGCTCACAC CTGTAATCCC  
 -4728 AGCACTTTGG GAGGCCAAGA TGGGTGGATC ACCTGAGGTC GGGAGTTCGA GACCAGCCTG  
 -4668 ACTAACATAG TGAAACCCTG TCTCTACTAA AAATACAAAA TTAGTTGGGG GTGGTGGCAC  
 -4608 AAGCCTGTAA TCCAGCTAC TCAGGAGGTT GAGGCAGGGG AATTGCTTGA ACCTGGGAGG  
 -4548 CGGAGGTTGC GGTGAGCCTA GATTGCTCCA CTGCACTCCA GCCTGGGCAA CAAGAGCGAA  
 -4488 ACTCCATCTC AAAAAAATAA ATAAATAAAT AAAGTAGATT ACATCAGATA CCTCTGGCCT  
 -4428 AGGTTGTTTA TGACCAACTC TCCTGCTGAG AATAACTAGA AAAGCTAGAC AAAACATATT  
 -4368 TCCAAAAGAT CTCTTTGGAG GCATCAGAGA ATGGCCAAGG CTGTAAGGAA CTGCCTGAGC  
 -4308 CCAGAGAGGT GGAGCCCAGC ACTGGTGCCC TTTACTCCTG GGGACATGTG CTGGTTTCAA  
 -4248 AAACCTCAGC TGAGCTTTTG AGCATTCTAG GAACTTGGTG GGGGAGATGA AATTTGTACC  
 -4188 TTAAATCCTG CCTACAGGGA GGGTCCCTGA TAATCCCCAC CCAATTTGGA AATCTGGGTC  
 -4128 AGCCTTCACA GGTACTGAAG CCCTCCTCTG AATGATCTCA AGTCCTGCTA GGGTAGAGGT  
 -4068 TACCTGCTTT TGAAAGGCTC CTGGCCTACC TGTGCAGCAG GAGCAAAAGT GAACCATCTC  
 -4008 AGGGTACAGA TAACAATCAT CCAGAGCCTT GAATGACCTC TACTGTGCTT AATATATAGT  
 -3948 ATTACGAGT CAGTAAAAAG GATTTAGGCA CATGCAAGAT GACCTGTGTA TCAGGGAGAA  
 -3888 ATAGGCAATA AATTGAGATC CAGCAGGGAT TTGAATCATG GATTTGAATC AGGGGCAGCC  
 -3828 TTCGAAAGAA CTATGGAGAA TATACTCAGA TTTAAAACAT AAGATTGGAA TTTTGGCAG  
 -3768 AGAACTAACA ACTGTACAAA AAAGGAACCA AATGGAAATC CTAGAAGTGA AAGATGCAAT  
 -3708 TAACCGATGT TGAGAAATAG CCAACATCTA TTGAACACTT CCCATGTGGA CAGCTGTGCT  
 -3648 AAACACTTTA CAGGCATCAA CATAAGATGT GTCCCTTAC AGCAGTGCAG TGTCCCTCCT  
 -3588 AAGACATGGA CAGCCTGGTT TCCCTATCTC TCTGCTTCAT CAAAACCCCT TTACGTGGGG  
 -3528 CTTAGACACT CCTGTTGTCT CTAGTGTCTA GTAGCACAGG GCTCAGCACA TGGAAAGCCA  
 -3468 TAGATACAAT TTGATGACCA GGACCTCCGA TGAAAGCCAT GGGTGTGAT TGGGAAGGCA  
 -3408 TTGTCTTTTA TGTGCTATGG TCTTAAAGCT TCATCCAGGA AGCAGAACTC GGGGGTCTCT  
 -3348 GAGGACCCAG AACCGAGAAT AAGATTAGTC AGAGATTTCC TGTGGGCAGA AATCATAAGG  
 -3288 ACGCCAACATG TTTGGGTGAG ATAAGACGAA ACCAAGAGTG GACTTGTGTC CAGAAGCGTG  
 -3228 AGGAAGAGGG AGAGAGCTTC CCTTGTCCTC TTTCTTCTC TCCCTAAGCC ACAGTGATTG  
 -3168 ACAGCCCCC CGCTTTGGAG TCAGAGCAGG CTTGAGACTG GACTGGGAAA GGAGGGTGGG  
 -3108 TCAGGATACA GAGCAGGAAG GCTGGGAGTG CAGGGCAGGA GCAAGGGGCT GGGGCATTCA  
 -3048 TTGTGCCCTGA TCTCTCCAC TTTACCTGGG GTAAAGAAGC ATATGCAAAA GCCACGGTGT

## 【図3-2】

-2988	GAGTATTTCC	CAAGTGCCAG	GGTCAGGGCA	TGATTCATCA	CGTGCAGCAT	TTCATTCAAT
-2928	CCTTATAGTA	ACCGATGATG	TGGCTTCTAT	TATTAGCTCT	ATCAGATAAT	GAAACTGAGA
-2868	CCAAGACAGG	CTCTGCACAT	TGTGTGGGGT	AATGACACAG	GGGGATTGAG	ACCTAGACTC
-2808	CATAACTCCT	GCCCCAGGGA	CCACCCAC	CCTCACCTG	TGCATGTGGA	CAAAGGACAG
-2748	ACTGGGCCAC	TTCTCAGGAC	ACAGCGGGGA	AATGACACAG	AGCAGGGAGG	TTCCAGGAGC
-2688	CCCAGCGTC	TTTTCTCCAG	GAGAATACTC	TCTGAATTCA	GACTGGGGTC	AGAGAAACAT
-2628	TTACCCAGGA	GCCGCAGTGT	GGGTGGGGCT	TTTTACTTGA	AACGCTGTCT	GAAGGCAGTG
-2568	GCAGGATGAA	CTCTCCACCC	TACCTTGSCA	AGCCACTTCT	CTTCTGCAAT	CTGTAAGGAC
-2508	ATTGTTGAGA	GAATTATGGT	CTTCCAATTC	CGGAGGGTTG	AAGAAAAGACA	AATAGGAGAG
-2448	AACCTATCAT	AGTCAGGTGC	TAGCTGCCTT	CTCTTTCAGA	GAGTGTGAGA	ATAAAGTGAT
-2388	GCACTTGATT	ATTAGCAAAT	ACTTTGGAAA	TTTTAAACGC	TAATATTCAA	CACACTCTGG
-2328	AAGAGGCAAA	TAAGTAGACA	GGTTCATATA	CATCATCTCC	TTCAGCTAGT	CCTCACAAAA
-2268	ACAAACAAAT	GAATAAACAA	AATTCTTCTT	TGGCCCTCAT	AGGAAGACAC	TGTTTTCTTGA
-2208	ACGTGTTTCA	AAAAGGATGG	GTGACTCACT	CAAGGTCACA	CTGTTTATGA	GGACAGTACA
-2148	GGAATACAGA	CATGCCATTT	TGCCTGAAAA	AATCCATCAC	CCAGGGAGGT	GACACAATTT
-2088	TGCAGAAATG	TTCTATTTCC	TCTGAAGGAT	ACATTCTTTA	AACCTTTGGG	AAATTCATTC
-2028	ATAGTCTTCC	TCCTTTGAAG	GATTACTCTC	TGGACACAAA	GTGTTTGATT	CTGATTTGTT
-1968	GGTTGGAAGA	TGTGTTGGTT	GAGAGAAAGA	TTCTGATTTG	TTGGTTGAAA	ATAGACTCAT
-1908	CAAGATCAAC	TGCTGTAGTA	GTAATAATTT	TGACATTTTG	TCTGTATPCC	TGTGCTGCCC
-1848	TCACAAGCTG	CATCACCTTG	AGTGAGTCAT	TCATACTTT	TTGTTTGTPT	TTGTTTTGGA
-1788	GATGGAGTCT	TACTCTGTTG	CCTAGGCTGG	AGTGCGGTGG	CGTGATCTTG	GCTCACTGCG
-1728	ACCTCCATCT	CCTGGGTTCA	AGTGATCCCT	CTGCCTCAGC	CTCCCAGTGA	GCTGGGATTA
-1668	CAGGCACATG	CCACCATCCC	TGCTAATTTT	TGCATTTTCA	GTAGAGACGG	AGTTTCACCA
-1608	TGTTGGTCAG	GTTGGTCTTG	AACTCCTGAC	CTCAGGTGAT	CCGCCCACCT	CAGCCTCCCC
-1548	AAGTGCTGGG	ATTACAGGTG	TGAGCCACCG	TGCCCAGCCC	AGCCATCATT	TTTGAAACAC
-1488	GTTTGAGAAA	TAGTGTCTTC	CTTTGAGGGC	CAAGGAGACA	TTTTTTTTGT	TTATTTGTTT
-1428	GTTTTTGTGA	GGACTAGCTG	AAGGGGTGTA	TGTATATTA	CCTGCCTACT	TATTTGCCTC
-1368	TTCCAGAGT	GTGATGAATA	TTAGGGTTTA	AAGTTTCTGA	AGCATTTGTT	AATAAAGCCC
-1308	GGGGCTGGAG	GTCAGAAGAC	CTGGATTTCT	CTGCATACTT	TTGCCATCAG	CAAGCTGTGT
-1248	GACCTTGGAC	AGATCCCCTT	TTTGTCTAAA	TCTTCTTGAG	TCTTCTTGAA	AAACTACCA
-1188	GGTTGGGACA	GGATGATTGC	CAAGCTCCCG	TCCAGCTCTA	AAACACTGCA	ACGTATGCTT
-1128	CTGCACCAGC	ACTGTCCATC	CTGTAGATCA	TGCAGAAAT	CTCTTCAACT	TTTTCTTACC
-1068	CATAAAATAG	GAGCATGCTT	ACCTTTTTTC	TAATGTTCCA	GGCCCCGGGT	CTAGATATTG
-1008	TAAGTAAAGGA	AGTTAATGTG	TATCAGAGCC	CATTATGGGC	CAGAAGTTCT	CCTCTTCTTT
-948	CCTACACCTG	CTTCTCCCTT	CCCTCCCTCC	CTCTTTCCCT	TCCTTCTTTC	CATCCATTTG
-888	TGAAGAAGAC	ATGATCACCC	TCATTCTGAG	AGTGAAGAGA	CAGAGGCTCA	ACTAATGAAA
-828	TGATTTGTTT	AAGGTACAC	GGGTGGCACA	AGGCAAGTGG	CAGAGGTTGA	ATTTAGACCC
-768	ATTCTCTGTC	AAATGCTGAG	TTTATGTCAT	CGTCCCAGGA	CCATAACTTT	AAAGATGTAA
-708	GATAGTGGGA	AAAGAGTTGA	TTTCAAAGCA	CCTCTCAGAA	GGACTCACTT	TACATCAGGG
-648	GTCAGCAGAC	TCAGGCCAAA	TCCGGTCCAT	TCCCCGCTTT	TGCAAAGAAA	GTTGTAGTGG
-588	AACACAGCTA	GGCTTATTGA	TTTATGGATT	GCCAACGTCC	TTTTTGTGAA	CAGACAGCTG
-528	AGCTGAGTAA	TCGTGGCGCA	CAAAACCTAA	AATATTTACT	ATCTCGTCTT	TTACAGAATG
-468	TTTGCCAATC	TATGGTCCGG	AGTCCAAGGC	TGTCCATTTT	TCAAAGAACA	CAAAGTGACA
-408	TGAGACTGTC	CCATGTGCAG	GGAGCCCTAT	CATTTTATTA	TGAAAAACG	GCCTTTCTGC
-348	TCAAATCTGT	TTTTTAAAAA	GTCAACAAAC	AGACTCTGGG	TACCTGTCTG	GAACAGTAGG
-288	GAGTTTGGTT	TCCATTGTGC	TCTTCTTCCC	AGGAACTCAA	TGAAGGGGAA	ATAGAAATCT
-228	TAATTTTGGG	GAAATTGCAC	AGGGGAAAAA	GGGGAGGGAA	TCAGTTACAA	CACTCCATTT
-168	CGACACTTAG	TGGGGTTGAA	AGTGACAACA	GCAAGGGTTT	CTCTTTTGGG	AAATGCGAGG
-108	AGGGTATTTT	CGCTTCTCGC	AGTGGGGCAG	GGTGGCAGAC	GCCTAGCTTG	GGTGAGTGAC
-48	TATTTCTTTA	TAAACCACAA	CTCTGGGCC	GCAATGGCAG	TCCACTGCTT	CCTGCACTCA
13	CAGAATGGAA	ATCTGCAGAG	GCCTCCGCG	TCACCTAATC	ACTCTCTCTC	TCTTCTCTGT
73	CCATTGAGAG	ACGATCTGCC	GACCCTCTGG	GAGAAAATCC	AGCAAGATGC	AAGCCTTCAG
133	GTAAGGCTAC	CCCAAGGAGG	AGAAGGTGAG	GGTGGATCAG	CTGGAGACTG	GAAACATATC

## 【图3-3】

193 ACAGCTGCCA GGGCTGCCAG GCCAGAGGGC CTGAGAACTG GGTTTGGGCT GGAGAGGATG  
 253 TCCATTATTC AAGAAAGAGG CTGTTACATG CATGGGCTTC AGGACTTGTG TTTCAAATA  
 313 TCCCAGATGT GGATAGTGC ACCGGAGGGC TGTCTTACTT TCCCAGAGAC TCAGGAACCC  
 373 AGTGAGTAAT AGATGCATGC CAAGGAGTGG GACTGCGATT CAGGCCTAGT TGAATGTGCT  
 433 GACAGAGAAG CAGAGAGGGG CACCAGGGGC ACAGCCCGAA GGCCCAGACT GATATGGCA  
 493 AGGCCTGTCT GTGTGACAT GTCCGAGGGT CCCACTCTCC AGGGACCTTG GTTTCCCCGT  
 553 CTGTGACATC TGTGACATGA GAGTCACGAT AACTCCTTGT GTGCCTTACA GGGTTGTGT  
 613 GAAAATTTAA TGCACAGATA ATAGCGTAAC AGTATTCGGT GCATTGTAAA GAGCCTGAAA  
 673 ACCATTATGA TTTGAAAATG GAATCGGCTT TGTGAGACCA TCACTATTGT AAAGATGTGA  
 733 TGCTGATAGA AATGACAGGA CTGCTTGTGC ATGCCCTCTG CAGTGTGACA TTCCAGCAGT  
 793 GAAATCATGT TGGGGTGACT TCTCCCCAC TCTGACCTTT ATGTTTGTCT GGGCCGAGGC  
 853 TGCAAGTCGG GCTCTGTGGG TGTATGAGTG ACAAGTCTCT CCTTCCAGA TATGGGGACT  
 913 GTCTGCTTCC CTAGGTTGCC TCTCCCTGCT CTGATCAGCT AGAAGCTCCA GGAGATCCTC  
 973 CTGGAGGCCC CAGCAGGTGA TGTATATCCC TCCAGACTGA GGCTAAATCT AGAACTAGG  
 1033 ATAATCACAA ACAGGCCAAT GCTGCCATAT GCAAAGCACT TTGGTTTGCC TGGCCACCCC  
 1093 TCGTCGAGCA TGTGGGCTCT TCAGAGCACC TGATGAGGTG GGTACAGTTA GCCACACTTC  
 1153 ACAGGTGAAG AGGTGAGGCA CAGGTCCCAG GTCAGGCTGG CCGGAGCTCT GTTTATTACG  
 1213 TCTCACAGCT TTGAGTCCCT CTCTCAACCA GAGAGGCCCT TTACCAAGAA GAAAGGATG  
 1273 GGACCCAGAA TCAGGTCACT GGCTGAGGTA GAGAGGAAGC CGGGTTGTTC CCAAGGGTAG  
 1333 CTGCTCCTGC AGGACTCTGA GCAGGTCACC AGCTAATGGA GGAAAGGCTC TAGGGAAAGA  
 1393 CCCTTCTGGT CTCAGACTCA GAGCGAGTTA GCTGCAAGGT GTTCCGTCTC TTGAAACTTC  
 1453 TACCTAGGTG CTATGGTAGC CACTAGTCTC AGGTGGCTAT TTAAATTTAT ACTTAAATGA  
 1513 ATGAAAATAG AAGAAAATTT AAAATCCAGA CCCTTGGTCA CACTATCCAC ATTTAAAGAG  
 1573 GTCAATAGCC ACATGTGGTT AGTGGCCACC CTATTGGGCA GTGCAGTCA AGAACATTTT  
 1633 TGCATCCCAG AAAGTTCCTT TGGATGTTGC TGCTCTACAG CATGCTTTCG TGAACAGAA  
 1693 GTGCCTTCCC TGGGAATCTC AGATGGGAAG CAAGTAAGGA GGGGAGTCAA ATGTGGGCTC  
 1753 ACTGCTCACC AGCTGTGAGG GTTGGGCTCG CCTCTTAACC ATTGTGAGCC TCAGTCTTCT  
 1813 CATCCATGCA TGCCGTGGGT ATACTAAAAT ACTATACCCC TGGAAGAGCT GGATGCAAAAT  
 1873 TTGACAAGTT CTGGGGGACA CAGGAAGGTG CCAAGCACAA GGCTGGGCAC ATGGTGGCTG  
 1933 TGCCTACAG CTGAGTCTCT TTCCTTTTCA GAATCTGGGA TGTAAACCAG AAGACTTCTT  
 1993 ATCTGAGGAA CAACCAACTA GTTGCTGGAT ACTTGAAGG ACCAAATGTC AATTTAGAA  
 2053 GTGAGTGGTT GCCAGGAAAG CCAATGTATC TGGGCATCAC GTCACCTTTC CCGTCTGTCT  
 2113 GCAGCAGCAT GGCCTGCCTG CACAAAACCT AGGTGCAATG TCCTAATCCT TGTGGGCTCT  
 2173 TTGTATTCAA GTTTGAAGCT GGGAGGGCCT GGCTACTGAA GGGCACATAT GAGGGTAGCC  
 2233 TGAAGAGGGT GTGGAGAGGT AGAGTCTAGG TCAGAGGTCA GTGCCTATAG GCAAGTGTC  
 2293 CCAGGGCCAC AGCTGGGAAG GGCAAATACC AGAAGGCAAG GTTGACCATT CCCTTCTTCA  
 2353 AGTGCCTATT AAGGCTCCAT GTTCTATGT TGTTCAAACC CTAACCTAAT CCCAAATTA  
 2413 TCCACCATGT ATAAGTTGA GCTATGTCTC TTATTCCTGG ACACCACTACT CAGCCATATC  
 2473 TGGTCCACAC ATTAACAGCT GGATGACCTT GAAGAAGCTT CACCCACTCT GTTCTCAGC  
 2533 TTTCCCTTCA GTGGGATGAT ATCAACTGGA CAACAGGATG TGCGATFCTT TTAGTTCAG  
 2593 CCTTCCAGGA TGTTTTCACT CCCCTGTTG TTGTTGTAGG ATGGTATFAC CTCCACCTTC  
 2653 CCACCTTCCC TATGCCCTGG TTCTGTCTCC TGTGCCTCGC TCTGAAAGTG GATGAGACCT  
 2713 ACAATTCTCT TCTTGGTAGT TCTCCTAATG AACACACTGA AGCACGAGGA AGCTGAGATT  
 2773 TTTGTTGCTA CATGAGAGCA TGGAGGCCTC TTAGGGAGAG AGGAGGTTCA GAGACTCTTA  
 2833 GGCTCCTGGT GGAGCCCCAC TCATGGCCTT GTTCATTTTC CCTGCCCTC AGCAACTCTC  
 2893 CTATTGACCT GGAGCACAGG TATCCTGGGG AAAGTGAGGG AAATATGGAC ATCACATGGA  
 2953 ACAACATCCA GGAGACTCAG GCCTTAGGA GTAACCTGGT AGTGTGCATC CTGGGGAAAG  
 3013 TGAGGGAAAT ATGGACATCA CATGGAACAA CATCCAGGAG ACTCAGGCCT CTAGGAGTAA  
 3073 CTGGGTAGTG TGCACTCTGG GGAAGTGGG GGAATATGG ACATCACATG GAACAACATC  
 3133 CAGGAGACTC AGGCCTCTAG GAGTAACTGG GTAGTGTGCA TCCTGGGGAA AGTGAGGGAA  
 3193 ATATGGACAT CACATGGAAC AACATCCAGG AGACTCAGGC CTCTAGGAGT AACTGGGTAG  
 3253 TGTGCTTGGT TTAATCTTCT ATTTACCTGC AGACCAGGAA GATGAGACCT CTCTGCCCTT  
 3313 CTGACCTCGG GATTTTAGTT TTGTGGGGAC CAGGGGAGAT AGAAAAATAC CGGGGCTCTC

## 【図3-4】

3373 TTCATTATTG CTGCTTCCTC TTCTATTAAC CTGACCCTCC CCTCTGTTCT TCCCAGAAA  
 3433 AGATAGATGT GGTACCCATT GAGCCTCATG CTCTGTTCTT GGGAAATCCAT GGAGGGAAGA  
 3493 TGTGCCTGTC CTGTGTCAAG TCTGGTGATG AGACCAGACT CCAGCTGGAG GTAAAAACAT  
 3553 GCTTTGGATC TCAAATCACC CCAAAAACCA GTGGCTPGAA ACAACCAAAA TTTTCTTA  
 3613 TGATTCTGTG GGTTGACCAG GATTAGCTGG GTAGTTCTGT TCCATGTGGT GGAACATGCT  
 3673 GGGGTCACTT TGGAAGCTGC ATTCAGCAGA GTGCCAGGCT TGCCTGGGC ATCCAAGGTG  
 3733 GTCCCTCATC CTCCAGGCTC TCTTCCATG TGATCTCTCA GTGTTAAGA GTTAGTTGGA  
 3793 GCTTCCTTAC AGCATGGCGG CTGACTTCCA AAAGGGATTA TTCCAAAAG AGCCTCAACA  
 3853 TGCAGGCGCT TATTATGACT TCTGCTFGCA TCATCCTATT GGCCAAAGCC AGTCACGTGG  
 3913 CTAAGTCTAG CCCCCTGTGA GAGGAGACTG CATAAGAGTG TGAACACCAG GAGACACGGT  
 3973 CACTGGGGGC CACCACTGTA ACCATCTACC ACAGGACCTG AATCTCTGTG TGCTACTCCC  
 4033 TTGCTCAAGG GCCCCCTAC CCACGCAGAC CTGCTGTCTT CTAGCAAAGC CCATCCTCAG  
 4093 GACCTTTTCT TTCCAATCCT TAATGACTCA AATTGATTAG TTGTGCTCC ACCCAGAGCC  
 4153 CTGTGCTCCT TTATCTCATG TAATGTTAAT GGGTTTCCCA GCCCTGGGAA AACATGGCTT  
 4213 TGTCTCAGGG GCTTGCTGGA TGCAACCTTA ACCTCAATGT GAGTGGCCAT ACTGTGGCAC  
 4273 TGTCCCATCC CTCACCAGGG ACACTGTTCT GGAGGGTGAC TGCCTGTTCT GTGAGGAGTG  
 4333 GGGATGGCTA GGACATTGCA TGGAACACAC CACCACCCCA TCTTCTCAGA GCTCAAACCC  
 4393 TGACAGAACA CCAGCTCCAC AGGCCTTGGC TTCTGCTGAT GGTGCCGTGT ATTTACCAGA  
 4453 CTTAGTGGTC CAAGGCCAGA GTGGCAGATT TCCCAAAGTC AAGTGTGAC AGTGGGACAG  
 4513 CCTCTTTGTG TCTTTGCTGT CCTAAGAAAC CTGGGCCAGG CCAGGCGCAG TGGCTCACGC  
 4573 CTTGTAATCC CAGCACTTTG AGAGGCCAAG GTGGGCAGAT CACGAGGTCA GGAGTTGAG  
 4633 ACCAGCCTGG CCAACATTGG TGAAACCCCTG TCTCTATTAA AAATAGAAAA CATTAGACAG  
 4693 GTGTGGTGGT GCATGCCTGT AATCCCAGCT ACTCAGGAGG CTGAGGCAGG AGAATCGCTT  
 4753 GAACCCAGGA GGTGGAGGTT GCAGTGAGCC GAGATTGTGC CACTGCACTC CAGCCTAGGC  
 4813 GACAGAGCAA GACTCCGTCT CGGGAAAATT AATTAATAAA TAAATAAACC TAGGTCCCAG  
 4873 AGTCCCACAG AATGGCAGAG AGGAGCACCT GGGGGCTTTT AGGGTATGGC ATTTCCCCTG  
 4933 TACTAATCTT GGGCTGTCCA GAGGCGATTT CATGGCGTGG AGTGGAGAGG GAGGCAGCAC  
 4993 AGGACTTCTT AGGCCTCAGC TCTCACCTGC CCATCTTTTG ATTTCCAGGC AGTTAACATC  
 5053 ACTGACCTGA GCGAGAACAG AAAGCAGGAC AAGCGCTTCG CCTTCATCCG CTCAGACAGT  
 5113 GGCCCCACCA CCAGTTTGA GTCTGCCGCC TGCCCCGGTT GGTTCCTCTG CACAGCGATG  
 5173 GAAGCTGACC AGCCCCGTCAG CCTCACCAAT ATGCCTGACG AAGGCGTCAT GGTCAACAAA  
 5233 TTCTACTTCC AGGAGGACGA GTAGTACTGC CCAGGCCTGC CTGTTCCCAT TCTTGCATGG  
 5293 CAAGGACTGC AGGGACTGCC AGTCCCCTG CCCCAGGGCT CCCGGCTATG GGGGCACTGA  
 5353 GGACCAGCCA TTGAGGGGTG GACCCTCAGA AGGCGTCACA ACAACCTGGT CACAGGACTC  
 5413 TGCCTCCTCT TCAACTGACC AGCCTCCATG CTGCCTCCAG AATGGTCTTT CTAATGTGTG  
 5473 AATCAGAGCA CAGCAGCCCC TGCACAAAGC CCTTCCATGT CGCCTCTGCA TTCAGGATCA  
 5533 AACCCCGACC ACCTGCCCAA CCTGCTCTCC TCTTGCCACT GCCTCTTCTT CCTCATTC  
 5593 ACCTTCCCAT GCCCTGGATC CATCAGGCCA CTTGATGACC CCCAACCAAG TGGCTCCCAC  
 5653 ACCCTGTTTT ACAAAAAAGA AAAGACCAGT CCATGAGGGA GGTFTTTAAG GGTTTGTGGA  
 5713 AAATGAAAAT TAGGATTTCA TGATTTTTTT TTTTCAGTCC CCGTGAAGGA GAGCCCTTCA  
 5773 TTTGGAGATT ATGTTCTTTC GGGGAGAGGC TGAGGACTTA AAATATTCCT GCATTTGTGA  
 5833 AATGATGGTG AAAGTAAGTG GTAGCTTTTC CCTTCTTTTT CTCTTTTTTT TGTGATGTCC  
 5893 CAACTTGTA AAATAAAAG TTATGGTACT ATGTTAGCCC CATAATTTTT TTTTCTTCT  
 5953 TAAACACTT CCATAATCTG GACTCCTCTG TCCAGGCACT GCTGCCCAGC CTCCAAGCTC  
 6013 CATCTCCACT CCAGATTTTT TACAGCTGCC TGCAGTACTT TACCTCCTAT CAGAAGTTTC  
 6073 TCAGCTCCCA AGGCTCTGAG CAAATGTGGC TCCTGGGGGT TCTTTCTTCC TCTGCTGAAG  
 6133 GAATAAATG CTCCTTGACA TTGTAGAGCT TCTGGCACTT GGAGACTTGT ATGAAAGATG  
 6193 GCTGTGCTC TGCTGTCTC CCCACCAGGC TGGGAGCTCT GCAGAGCAGG AAACATGACT  
 6253 CGTATATGTC TCAGGTCCCT GCAGGGCCAA GCACCTAGCC TCGCTCTTGG CAGGTACTCA  
 6313 GCGAATGAAT GCTGTATATG TTGGGTGCAA AGTTCCTTAC TTCCTGTGAC TTCAGCTCTG  
 6373 TTTTACAATA AAATCTTGAA AATGCCTATA TTGTTGACTA TGTCTTGGC CTTGACAGGC  
 6433 TTTGGGTATA GAGTCTGAG GAAACTGAAA GACCAATGTG TYTTYCTTAC CCCAGAGGCT  
 6493 GGCGCTGGC CTCTTCTCTG AGAGTTCTTT TCTTCTTCA GCCTCACTCT CCTGATAA

## 【図3-5】

6553 CATGAGAGCA AATCTCTCTG CGGGG

## 【図4】

ヒトTNA-アルファ遺伝子のDNA配列 (ジェンバンク受託番号 Nos.X02910, X02159)

```

1 GAATTCGGG TGATTTCACT CCCGGCTGTC CAGGCTTGTC CTGCTACCCC ACCCAGCCTT
61 TCCTGAGGCC TCAAGCCTGC CACCAAGCCC CCAGCTCCTT CTCCCCGAG GACCCAAACA
121 CAGGCCTCAG GACTCAACAC AGCTTTTCCC TCCAACCCGT TTCTCTCCC TCAACGGACT
181 CAGCTTCTG AAGCCCCTCC CAGTTCTAGT TCTATCTTTT TCCTGCATCC TGTCTGGAAG
241 TTAGAAGGAA ACAGACCACA GACCTGGTCC CAAAAGAAA TGGAGCBAAT AGGTTTTGAG
301 GGGCATGgGG ACGGGGTTCG GCCTCCAGGG TCCTACACAC AAATCAGTCA GTGGCCGAGA
361 AGACCCCCCT CGGAATCGGA GCAGGGAGGA TGGGGAGTGT GAGGGGTATC CTTGATGCTT
421 GTGTGTCCCC AACTTTCCAA ATCCCCGCCC CCGCGATGGA GAAGAAACCG AGACAGAAGG
481 TGCAGGGCCC ACTACCGCTT CCTCCAGATG AGCTCATGGG TTCTCCACC AAGGAAGTTT
541 TCCGCTGGTT GAATGATCTT TTCCCCGCC TCCTCTCGCC CCAGGGACAT ATAAAGGCAG
601 TTGTTGGCAC ACCCAGCCAG CAGACGCTCC CTCAGCAAGG ACAGCAGAGG ACCAGCTAAG
661 AGGGAGAGAA GCAACTACAG ACCCCCCCTG AAAACAACCC TCAGACGCCA CATCCCCTGA
721 CAAGCTGCCA GGCAGGTCTT CTTCCTCTCA CATACTGACC CACGGCTTCA CCCTCTCTCC
781 CCTGGAAGG ACACCATGAG CACTGAAAGC ATGATCCGGG ACGTGGAGCT GGCCGAGGAG
841 GCGCTCCCCA AGAAGACAGG GGGGCCCCAG GGCTCCAGGC GGTGCTTGTT CCTCAGCCTC
901 TTCTCCTTCC TGATCGTGGC AGGCGCCACC ACGCTCTTCT GCCTGCTGCA CTTTGGAGTG
961 ATCGGCCCCC AGAGGGAAGA GGTGAGTGC TCAGCCAGCT TGCCTCACTC TCCACCCCAA
1021 GGGGAAATGA GAGACGCAAG AGAGGGAGAG AGATCGGATG GGTGAAAGAT GTGCGCTGAT
1081 AGGGAGGGAT GAGAGAGAAA AAAACATGGA GAAAGACGGG GATGCAGAAA GAGATGTGGC
1141 AAGAGATGGG GAAGAGAGAG AGAGAAAGAT GGAGAGACAG GATGTCTGGC ACATGGAAGG
1201 TGCTCACTAA GTGTGTATGG AGTGAATGAA TGAATGAATG AATGAACAAG CAGATATATA
1261 AATAAGATAT GGAGACAGAT GTGGGTGTG AGAAGAGAGA TGGGGGAAGA AACAAAGTAT
1321 ATGAATAAAG ATGGTGAAGC AGAAAGAGCG GAAATATGA CAGCTAAGGA GAGAGATGGG
1381 GGAGATAAGG AGAGAAGAAG ATAGGGTGTG TGGCACACAG AAGACACTCA GGGAAAGAGC
1441 TGTTGAATGC TGGAAGGTGA ATACACAGAT GAATGGAGAG AGAAAACCAG ACACCTCAGG
1501 GCTAAGAGCG CAGGCCAGAC AGGCAGCCAG CTGTTCCCTC TTAAGGGTG ACTCCCTCGA
1561 TGTTAACCAT TCTCCTTCTC CCAACAGTT CCCAGGGAC CTCTCTCTA TCAGCCCTCT
1621 GGCCCAGGCA GTCAGTAAGT GTCTCCAAC CTCTTCTTA ATCTGGGT TGGGTTGGG
1681 GGTAGGTTTA GTACCCGTAT GGAAGCAGTG GGGAAATTT AAAGTTTTGG TCTTGGGGGA
1741 GGATGGATGG AGGTGAAAGT AGGGGGGTAT TTTCTAGGAA GTTTAAGGGT CTCAGCTTTT
1801 TCTTTTCTCT CTCTCTTCA GGATCATCTT CTGAAACCCC GAGTGACAAG CCTGTAGCCC
1861 ATGTTGTAGG TAAGAGCTCT GAGGATGTGT CTGGAACTT GGAGGGCTAG GATTTGGGGG
1921 TTGAAGCCCG GCTGATGGTA GGCAGAACTT GGAGACAATG TGAGAAGGAC TCGCTGAGCT
1981 CAAGGGAAGG GTGGAGGAAC AGCACAGGCC TTAGTGGGAT ACTCAGAACG TCATGGCCAG
2041 GTGGGATGTG GGATGACAGA CAGAGAGGAC AGGAACCGGA TGTGGGTTGG GCAGAGCTCG
2101 AGGGCCAGGA TGTGGAGAGT GAACCGACAT GGCCCACTG ACTCTCTCT CCCTCTCTCC
2161 CTCCCTCCAG CAAACCCTCA AGCTGAGGGG CAGCTCCAGT GGCTGAACCG CCGGGCCAAT
2221 GCCCTCCTGG CCAATGGCGT GGAGCTGAGA GATAACCAGC TGGTGGTGCC ATCAGAGGGG
2281 CTGTACCTCA TCTACTCCCA GGTCCTCTTC AAGGGCCAAG GCTGCCCCCT CACCCATGTG
2341 CTCTCACC ACACCATCAG CCGCATCGCC GTCTCTTACC AGACCAAGGT CAACCTCTC
2401 TCTGCCATCA AGAGCCCTG CAGAGGGAG ACCCCAGAGG GGGCTGAGGC CAAGCCCTGG
2461 TATGAGCCCA TCTATCTGGG AGGGGTCTTC CAGCTGGAGA AGGGTGACCG ACTCAGCGCT
2521 GAGATCAATC GGCCCGACTA TCTCGACTTT GCCGAGTCTG GCAGGTCTA CTTTGGGATC
2581 ATTGCCCTGT GAGGAGGACG AACATCCAAC CTCCCAAAC GCCTCCCCTG CCCCAATCCC
2641 TTTATTACC CTTCTTCAG ACACCCTCA CCTCTTCTGG CTCAAAAAGA GAATTGGGGG
2701 CTTAGGGTGC GAACCCAAGC TTAGAACTTT AAGCAACAAG ACCACCCTT CGAAACCTGG
2761 GATTACAGAA TGTGTGGCCT GCACAGTGAA GTGCTGGCAA CCACTAAGAA TTCAAACTGG
2821 GGCCTCCAGA ACTCACTGGG GCCTACAGCT TTGATCCCTG ACATCTGGAA TCTGGAGACC
2881 AGGGAGCCTT TGGTTCGGC CAGAATGCTG CAGGACTTGA GAAGACCTCA CCTAGAAATT
2941 GACACAAGTG GACCTTAGGC CTTCCTCTCT CCAGATGTTT CCAGACTTCC TTGAGACACG
3001 GAGCCAGCC CTCCCCATGG AGCCAGTCTT CTCTATTAT GTTGCACCT GTGATTATT
3061 ATTATTAT TATTATTAT TATTATCAG ATGAATGTAT TTATTGGGA GACC GGGGTA
3121 TCCTGGGGGA CCCAATGTAG GAGCTGCCTT GGCTCAGACA TGTTTTCCGT GAAAACGGAG
3181 CTGAACAATA GGCTGTCCC ATGTAGCCCC CTGGCCTCTG TGCTTCTTT TGATTATGTT
3241 TTTTAAATA TTTATCTGAT TAAGTTGTCT AAACAATGCT GATTTGGTGA CCAACTGTCA
3301 CTCATTGCTG AGCCTCTGCT CCCAGGGGA GTTGTGTCTG TAATCGCCCT ACTATTCACT
3361 GGCAGAGAAAT AAAGTTTGCT TAGAAAAGAA ACATGGTCTC CTCTTGAA TTAATTCTGC
3421 ATCTGCCCTCT TCTTGTGGT GGGAAAGAAC TCCTAAGTC CTCTCTCCAC AGGCTTTAAG
3481 ATCCCTCGGA CCCAGTCCCA TCCTTAGACT CCTAGGGCCC TGGAGACCCT ACATAAACAA
3541 AGCCCAACAG AATATTCCCC ATCCCCAGG AAACAAGAGC CTGAACCTAA TTACCTCTCC
3601 CTCAGGGCAT GGGAAATTCC AACTCTGGGA ATTC

```

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 00/08492		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 G01N33/50 A61P11/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) MEDLINE, EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HUANG SONG-LIH ET AL: "Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic bronchitis." AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, vol. 156, no. 5, November 1997 (1997-11), pages 1436-1439, XP002180758 ISSN: 1073-449X abstract; table 3	1-82
X	MOFFATT MIRIAM F ET AL: "Tumour necrosis factor haplotypes and asthma." HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 6, no. 4, 1997, pages 551-554, XP002180759 ISSN: 0964-6906 abstract; tables 1,2	1-82
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		* * 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
* A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		* 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
* E* earlier document but published on or after the international filing date		* Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
* 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)		* &* document member of the same patent family
* 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		
Date of the actual completion of the international search 29 October 2001	Date of mailing of the international search report 08/11/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer van Klompenburg, W	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/08492
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 54359 A (DUFF GORDON ;COX ANGELA (GB); CAMP NICOLA JANE (GB); GIOVINE FRANC) 3 December 1998 (1998-12-03) page 1, line 5 - line 22 claims 1-27; figures 1,2; examples 1-8 ---	1-82
A	FRANCIS ET AL.: "Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and coronary artery disease" CIRCULATION, vol. 99, February 1999 (1999-02), pages 861-866, XP001030756 abstract; tables 2,3 ---	1-82
A	WO 97 25445 A (CEDARS SINAI MEDICAL CENTER ;UNIV VIRGINIA (US)) 17 July 1997 (1997-07-17) page 4, line 9 -page 5, line 11; claims 1-8 ---	1-82
A	WO 93 21946 A (RUSSELL DEBORAH A ;THOMPSON ROBERT C (US); SYNERGEN INC (US)) 11 November 1993 (1993-11-11) page 1, line 15 -page 5, line 5; claims 1,9 ---	1-82
P,X	WO 99 24615 A (DUFF GORDON W ;GIOVINE MARCO (GB); LIM SIMON (GB); BARNES PETER J) 20 May 1999 (1999-05-20) page 2, line 24 -page 3, line 27; claims 1-15 ---	1-20
T	WHYTE MOIRA ET AL: "Increased risk of fibrosing alveolitis associated with interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms." AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, vol. 162, no. 2 Part 1, August 2000 (2000-08), pages 755-758, XP002180760 ISSN: 1073-449X abstract tables 2,3 -----	1-20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/08492

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9854359	A	03-12-1998	AU 7539898 A	30-12-1998
			BR 9809183 A	01-08-2000
			CN 1278868 T	03-01-2001
			EP 0983385 A1	08-03-2000
			WO 9854359 A1	03-12-1998
			NO 995803 A	18-01-2000
			PL 337080 A1	31-07-2000
			US 6268142 B1	31-07-2001
			ZA 9804490 A	02-12-1998
WO 9725445	A	17-07-1997	US 5942390 A	24-08-1999
			AU 731856 B2	05-04-2001
			AU 1357697 A	01-08-1997
			CA 2242493 A1	17-07-1997
			EP 0873425 A1	28-10-1998
			WO 9725445 A1	17-07-1997
WO 9321946	A	11-11-1993	AT 188610 T	15-01-2000
			AU 4229493 A	29-11-1993
			CA 2118119 A1	11-11-1993
			DE 69327582 D1	17-02-2000
			DE 69327582 T2	03-08-2000
			DK 639079 T3	13-06-2000
			EP 0639079 A1	22-02-1995
			ES 2142341 T3	16-04-2000
			GR 3033144 T3	31-08-2000
			JP 7509223 T	12-10-1995
			PT 639079 T	28-04-2000
			WO 9321946 A1	11-11-1993
			WO 9924615	A
BR 9813950 A	26-09-2000			
EP 1029079 A2	23-08-2000			
NO 20002176 A	05-07-2000			
PL 340624 A1	12-02-2001			
TR 200001263 T2	21-12-2000			
US 6140047 A	31-10-2000			
WO 9924615 A2	20-05-1999			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 K	48/00	C 1 2 Q	1/02	
A 6 1 P	11/00		1/68	A
C 1 2 Q	1/02	G 0 1 N	33/15	Z
	1/68		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	M
	33/50		33/566	
	33/53	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/566	A 6 1 K	37/02	
(81)指定国	E P ( A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E ) , A E , A U , B R , C A , C N , C Z , H U , I L , J P , K R , M X , N O , N Z , P L , R U , S G , T R , U S , Y U , Z A			
(72)発明者	ダフ ゴードン ダブリュ イギリス サウス ヨークシャー エス10 3 ビーシー シェフィールド アッシュ ゲートロード 18			
(72)発明者	ディジオヴァイン フランシスコ サヴェ リオ イギリス エス10 3 ジーゼット シェフ ィールド ランムーア テトネイロード 3			
(72)発明者	ワイテ モリア イギリス サウス ヨークシャー エス17 3 エヌジェイ シェフィールド ドア キャヴェンディッシュアヴェニュー 19			
F タ-ム(参考)	2G045 AA25 AA40 DA12 DA13 FB02 FB03 4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 CA02 CA09 CA11 CA12 CA20 DA02 GA11 HA09 HA11 HA13 HA14 HA17 4B063 QA05 QA12 QA13 QA17 QA19 QQ42 QQ43 QQ52 QQ53 QQ79 QR08 QR14 QR32 QR35 QR40 QR42 QR56 QR62 QR72 QR80 QS16 QS25 QS33 QS34 QX02 QX10 4C084 AA02 AA13 AA17 BA03 DA13 DA25 ZA59 ZC02 4C086 AA01 AA02 DA10 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA59 ZC02			

专利名称(译)	预测间质性肺病的风险		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002540801A</a>	公开(公告)日	2002-12-03
申请号	JP2000609606	申请日	2000-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	英特利金遗传学有限公司		
申请(专利权)人(译)	白细胞介素遗传学墨		
[标]发明人	ダフゴードンダブリュ デジオヴァインフランシスコサヴェリオ ワイテモリア		
发明人	ダフ ゴードン ダブリュ デジオヴァイン フランシスコ サヴェリオ ワイテ モリア		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/57 A61K31/7088 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P11/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P11/00 C12Q1/6883 C12Q2600/156 C12Q2600/172		
FI分类号	A61K31/57 A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P11/00 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024 /AA11 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA09 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063 /QA05 4B063/QA12 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ43 4B063/QQ52 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063 /QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR80 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4B063/QX10 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA03 4C084 /DA13 4C084/DA25 4C084/ZA59 4C084/ZC02 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/DA10 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA59 4C086/ZC02		
优先权	09/286108 1999-04-02 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

确定受试者是否患有或可能发展为间质性肺病，例如肺纤维化的新方法，其包括：a) 从受试者获得核酸样品； b. 从中获得核酸样品。) 在样本中，IL-1RN (+2018) 等位基因，TNF-A (-308) 等位基因2或IL-1RN (+2018) 等位基因2或TNF-1 (-308) 等位基因2 检测关于IL-1RN (+2018) 等位基因2，TNF-A (-308) 等位基因2或IL-1RN (+2018) 的连锁不平衡中的等位基因 检测到与等位基因2的连锁不平衡中的等位基因表明患者具有或易患ILD，其中受试者患有间质性肺病或易患ILD。确定是否存在。及其试剂盒，ILD的治疗方法和用于鉴定ILD的新型治疗剂的筛选试验。