

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-509071

(P2011-509071A)

(43) 公表日 平成23年3月24日(2011.3.24)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|----------------------|-------------|
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 Z N A A | 4 B O 2 4 |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 A | 4 B O 6 3 |
| G O 1 N 33/53 (2006.01) | G O 1 N 33/53 M | 4 C O 8 4 |
| A 6 1 P 1/04 (2006.01) | A 6 1 P 1/04 | 4 C O 8 6 |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01) | A 6 1 K 45/00 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 143 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|----------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2010-536200 (P2010-536200) | (71) 出願人 | 509012625 |
| (86) (22) 出願日 | 平成20年11月26日 (2008.11.26) | | ジェネンテック, インコーポレイテッド |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成22年8月2日 (2010.8.2) | | アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2008/085045 | | サンフランシスコ ディーエヌエー |
| (87) 国際公開番号 | W02009/073565 | | ウェイ 1 |
| (87) 国際公開日 | 平成21年6月11日 (2009.6.11) | (71) 出願人 | 510150880 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/991, 203 | | ザ ユニヴァーシティ コート オブ ザ |
| (32) 優先日 | 平成19年11月29日 (2007.11.29) | | ユニヴァーシティ オブ エディンバラ |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | オブ オールド カレッジ |
| (31) 優先権主張番号 | PCT/US2008/064562 | | イギリス国 イーエイチ8 9ワイエル |
| (32) 優先日 | 平成20年5月22日 (2008.5.22) | (74) 代理人 | 100109726 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 弁理士 園田 吉隆 |
| (31) 優先権主張番号 | 61/192, 268 | (74) 代理人 | 100101199 |
| (32) 優先日 | 平成20年9月17日 (2008.9.17) | | 弁理士 小林 義教 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症性腸疾患のための遺伝子発現マーカー

(57) 【要約】

本発明は、炎症性腸疾患の病理状態に対する遺伝子発現プロファイリングの方法であって、哺乳動物被検者からの試験試料中における一又は複数の I B D マーカーのコントロールに対する発現差を決定し、試験試料中における発現差が、試験試料が得られた哺乳動物被検者における I B D を示す方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物被検者における炎症性腸疾患（IBD）の存在を診断する方法であって、上記被検者から得られた試験試料における配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、194、197、199、201、203、205、207、及び230の何れかーに示されたポリペプチドをコードする核酸の発現レベルがコントロールの発現レベルに対して高いことを決定し、上記高い発現レベルが、試験試料が得られた被検者におけるIBDの存在を示す方法。

10

【請求項 2】

哺乳動物被検者における炎症性腸疾患（IBD）の存在を診断する方法であって、上記被検者から得られた試験試料における配列番号：108、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、211、213、215、217、219、221、223、225、及び228の何れかーに示されたポリペプチドをコードする核酸の発現レベルがコントロールの発現レベルに対して低いことを決定し、上記低い発現レベルが、試験試料が得られた被検者におけるIBDの存在を示す方法。

20

【請求項 3】

上記哺乳動物被検者がヒト患者である請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

上記発現レベルのエビデンスが遺伝子発現プロファイリング法によって得られる請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

上記方法がPCRベースの方法である請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

上記発現レベルが一又は複数の参照遺伝子又はその発現産物の発現レベルに対して正規化される請求項 4 に記載の方法。

30

【請求項 7】

上記遺伝子又はその発現産物の少なくとも二の発現レベルのエビデンスを決定することを含む請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 8】

上記遺伝子又はその発現産物の少なくとも三の発現レベルのエビデンスを決定することを含む請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 9】

上記遺伝子又はその発現産物の少なくとも四の発現レベルのエビデンスを決定することを含む請求項 1 又は 2 に記載の方法。

40

【請求項 10】

上記遺伝子又はその発現産物の少なくとも五の発現レベルのエビデンスを決定することを含む請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 11】

上記IBD検出をまとめるレポートを作成する工程を更に含む請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 12】

上記IBDが潰瘍性大腸炎である請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 13】

上記IBDがクローン病である請求項 1 又は 2 に記載の方法。

50

【請求項 14】

上記 I B D が潰瘍性大腸炎及びクローン病である請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 15】

上記試験試料が結腸組織生検由来である請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 16】

上記生検が、回腸末端、上行結腸、下行結腸、及び S 状結腸からなる群から選択される組織由来である請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

上記生検が炎症結腸領域由来である請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

上記生検が非炎症結腸領域由来である請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

上記決定工程が、上記哺乳動物被検者における I B D の再発を示し、上記哺乳動物被検者が過去に I B D と診断され、該過去に診断された I B D に対して治療されている請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 20】

上記治療が手術からなる請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

上記決定工程が、上記哺乳動物被検者における上記 I B D の突然の再発を示す請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 22】

治療を必要とする哺乳動物被検者における炎症性腸疾患 (I B D) を治療する方法であって、

(a) 上記被検者から得られた試験試料における配列番号： 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、194、197、199、201、203、205、207、及び 230 の何れか一に示されたポリペプチドをコードする核酸の発現レベルがコントロールの発現レベルに対して高いことを決定する工程であって、上記高い発現レベルが、試験試料が得られた被検者における I B D の存在を示す工程と；

(b) 有効量の I B D 治療剤を上記被検者に投与する工程を含む方法。

【請求項 23】

治療を必要とする哺乳動物被検者における炎症性腸疾患 (I B D) を治療する方法であって、

(a) 上記被検者から得られた試験試料における配列番号： 108、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、211、213、215、217、219、221、223、225、及び 228 の何れか一に示されたポリペプチドをコードする核酸の発現レベルがコントロールの発現レベルに対して低いことを決定する工程であって、上記低い発現レベルが、試験試料が得られた被検者における I B D の存在を示す工程と；

(b) 有効量の I B D 治療剤を上記被検者に投与する工程を含む方法。

【請求項 24】

上記哺乳動物被検者がヒト患者である請求項 22 又は 23 に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 2 5】
上記発現レベルのエビデンスが遺伝子発現プロファイリング法によって得られる請求項 2 4 に記載の方法。
- 【請求項 2 6】
上記方法が P C R ベースの方法である請求項 2 4 に記載の方法。
- 【請求項 2 7】
上記発現レベルが一又は複数の参照遺伝子又はその発現産物の発現レベルに対して正規化される請求項 2 5 に記載の方法。
- 【請求項 2 8】
上記遺伝子又はその発現産物の少なくとも二の発現レベルのエビデンスを決定することを含む請求項 2 2 又は 2 3 に記載の方法。 10
- 【請求項 2 9】
上記遺伝子又はその発現産物の少なくとも三の発現レベルのエビデンスを決定することを含む請求項 2 2 又は 2 3 に記載の方法。
- 【請求項 3 0】
上記遺伝子又はその発現産物の少なくとも四の発現レベルのエビデンスを決定することを含む請求項 2 2 又は 2 3 に記載の方法。
- 【請求項 3 1】
上記遺伝子又はその発現産物の少なくとも五の発現レベルのエビデンスを決定することを含む請求項 2 2 又は 2 3 に記載の方法。 20
- 【請求項 3 2】
上記 I B D 検出をまとめるレポートを作成する工程を更に含む請求項 2 2 又は 2 3 に記載の方法。
- 【請求項 3 3】
上記 I B D が潰瘍性大腸炎である請求項 2 2 又は 2 3 に記載の方法。
- 【請求項 3 4】
上記 I B D がクローン病である請求項 2 2 又は 2 3 に記載の方法。
- 【請求項 3 5】
上記 I B D が潰瘍性大腸炎及びクローン病である請求項 2 2 又は 2 3 に記載の方法。
- 【請求項 3 6】
上記試験試料が結腸組織生検由来である請求項 2 2 又は 2 3 に記載の方法。 30
- 【請求項 3 7】
上記生検が、回腸末端、上行結腸、下行結腸、及び S 状結腸からなる群から選択される組織由来である請求項 3 6 に記載の方法。
- 【請求項 3 8】
上記生検が炎症結腸領域由来である請求項 3 6 に記載の方法。
- 【請求項 3 9】
上記生検が非炎症結腸領域由来である請求項 3 6 に記載の方法。
- 【請求項 4 0】
上記決定工程が、上記哺乳動物被検者における I B D の再発を示し、上記哺乳動物被検者が過去に I B D と診断され、該過去に診断された I B D に対して治療されている請求項 2 2 又は 2 3 に記載の方法。 40
- 【請求項 4 1】
上記治療が手術からなる請求項 4 0 に記載の方法。
- 【請求項 4 2】
上記決定工程が、上記哺乳動物被検者における上記 I B D の突然の再発を示す請求項 2 2 又は 2 3 に記載の方法。
- 【請求項 4 3】
上記 I B D 治療剤がアミノサリチル酸である請求項 2 2 又は 2 3 に記載の方法。
- 【請求項 4 4】 50

上記 I B D 治療剤がコルチコステロイドである請求項 2 2 又は 2 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

上記 I B D 治療剤が免疫抑制剤である請求項 2 2 又は 2 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の背景)

(関連出願とのクロスリファレンス)

この出願は、全開示を出典明示によりここに援用する 2007 年 11 月 29 日出願の米国仮出願第 60/991203 号、2008 年 9 月 17 日出願の米国仮出願第 61/192268 号、及び 2008 年 5 月 22 日出願の国際特許出願第 PCT/US08/64562 号の利益と米国特許法第 119 条第 (e) 項の優先権を主張する。

10

【0002】

(発明の分野)

本発明は、炎症性腸疾患の検出及び診断における使用を含む、炎症性腸疾患病理発生における遺伝子発現プロファイルに関する。

【0003】

(関連技術の記載)

免疫関連及び炎症疾患は、正常な生理機能では、発作又は傷害に反応して、発作又は傷害からの修復を開始し、外来生物体に対する生得的及び後天的防御を開始するのに重要な、かなり複雑で、多くの場合は多重に相互関連した生物学的経路の現れ又は結果である。疾患又は病理は、これらの正常な生理学的経路が、反応の強さに直接関連してか、異常な調節又は過度な刺激の結果として、自己に対する反応として、又はこれらの組合せとして、更なる発作又は傷害を引き起こすときに生じる。

20

これらの疾患の発生は、多くの場合、多段階経路及びしばしば多数の異なった生物学的システム/経路に関与しているが、一又は複数のこれら経路の重要な点における介在により改善又は治療効果を有し得る。治療的介在は有害なプロセス/経路の拮抗作用又は有益なプロセス/経路の刺激のいずれかにより生じる。

多くの免疫関連疾患が知られており、広範囲にわたって研究されている。このような疾患には、免疫媒介炎症疾患、非免疫媒介炎症疾患、感染疾患、免疫欠損症、異常増殖等が含まれる。

30

【0004】

炎症性腸疾患(「IBD」)という用語は、腸管(腸)に炎症を起こし、時に反復性の腹痛又は下痢を起こす原因不明の慢性炎症性障害の一群を意味する。米国における I B D の罹患率は、人口 10 万人あたり約 200 人と推定されている。I B D 患者は、潰瘍性大腸炎(「UC」)を伴うグループ、及びクローン病(「CD」)を伴うグループの、2つの主要グループに分けられる。UC 及び CD 共、慢性の再発性疾患であり、まだはっきり分かっていない環境的刺激にさらされている遺伝的に影響されやすい個人で生じる複雑な臨床的実体である。(Bonen及びCho, Gastroenterology, 2003; 124:521-536; Gaya等 Lancet, 2006;367:1271-1284)。

40

【0005】

I B D の原因は依然として不明であるが、遺伝、感染、及び免疫的感受性等の複数の要因が関係していると思われる。I B D は白人に多く、特にユダヤ系の白人に多い。症状が慢性的炎症性の性質であることにより、感染的原因の可能性に対する熱心な調査が急ぎ行われた。急性炎症を刺激する薬剤が見つかったものの、I B D に関連して慢性的炎症の原因となるものは見つかっていない。I B D が自己免疫性疾患であるという仮説は、関節炎など前述したように I B D が腸以外に症状を有すること、並びに、免疫反応を抑制することが知られている副腎性グルココルチコイド、シクロスポリン及びアザチオプリン等の治療薬により I B D にポジティブな反応が見られることが既知であることにより支持されている。加えて、胃腸管は、身体の他のどの器官よりも、連続的に食物由来のタンパク

50

質、細菌性副産物 (L P S) 等の抗原性物質の可能性に曝されている。

しばしば所定の患者がどちらの病気に罹っているのか言うのが難しいほど、U C と C D の診断基準には十分なオーバーラップがある；しかしながら、局在性のように、典型的に見られる病変のタイプは異なっている。U C は殆どは直腸に近位の結腸中に見られ、特徴的な病変は粘膜の表在性潰瘍であり；C D は腸の何処にでも見られ、胃、食道及び十二指腸にも時折関与し、病変は通常は広汎な直線状の裂溝として記述される。

【 0 0 0 6 】

I B D の現在の治療法は、通常は、抗炎症剤又は免疫抑制剤、例えばスルファサラジン、コルチコステロイド、6 - ルカプトプリン / アザチオプリン、又はシクロスポリンの投与を含み、これは通常は部分的な結果をもたらすだけである。抗炎症 / 免疫抑制療法が失敗すると、結腸切除術が最後の防御ラインである。直腸に関連しないC D に対する典型的な手術は切除術 (腸の疾患セグメントの除去) 及び造瘻術なしの吻合術 (再結合) である。小腸又は大腸の部分は取り除くことができる。C D 患者の約 3 0 % が診断後最初の年の内に手術を必要とする。次の年では、割合は一年当たり約 5 % である。不幸にも、C D は高い再発率を特徴とする；患者の約 5 % が最初の手術後、毎年二回目の手術を必要とする。

10

【 0 0 0 7 】

炎症性腸疾患の診断の精密化は、標準的な分類基準を使用して進行状態を評価することを含む。I B D において使用される分類システムは、大腸炎を軽度、中程度、又は重篤として分類する T r u e l o v e 及び W i t t s インデクス (Truelove S.C. 及び Witts, L. J. Br Med J. 1955;2:1041-1048) を含み、並びに Lennard-Jones (Lennard-Jones J.E. Sc and J Gastroenterol Suppl 1989;170:2-6) 及び単純な臨床大腸炎活性指数 (S C C A I) (Walmsley 等 Gut. 1998;43:29-32) である。これらのシステムは、毎日の便通、直腸出血、体温、心拍数、ヘモグロビン値、赤血球沈降速度、体重、ヘマトクリットスコア、及び血清アルブミン値のような変数を追跡する。

20

【 0 0 0 8 】

症例のおよそ 1 0 - 1 5 % において、潰瘍性大腸炎又はクローン病の確定診断は行うことはできず、かかる症例はしばしば「未定の大腸炎」と称される。診断を補助し得、それぞれが血液中の抗体をアッセイする二つの抗体検出試験が利用できる。抗体は「核周辺型抗好中球抗体」 (p A N C A) と「抗出芽酵母抗体」 (A S C A) である。潰瘍性大腸炎の殆どの患者は p A N C A 抗体を持っているが A S C A 抗体を持っておらず、クローン病の殆どの患者は抗体を持っているが p A N C A 抗体を持っていない。しかしながら、これらの二つの試験は、ある患者は何れの抗体も持っておらず、あるクローン病患者は pANCA 抗体のみを持っている場合があるので、難がある。臨床実務では、多数の変量の測定よりも分子マーカーに基づき I B D の存在及び / 又は進行を示しうる信頼性ある試験は、I B D の患者を同定し及び / 又は治療するために有用であろう。無仮説の連鎖・連関研究では、U C に関連している遺伝子座、特に染色体 6 上の M H C 領域 (Rioux 等 Am J Hum Genet. 2000;66:1863-1870 ; Stokkers 等 Gut. 1999; 45:395-401 ; Van Heel 等 Hum Mol Genet. 2004;13:763-770) 、染色体 1 2 上の I B D 2 遺伝子座 (Parkes 等 Am J Hum Genet. 2000;67:1605-1610 ; Satsangi 等 Nat Genet. 1996;14:199-202) 及び染色体 5 上の I B D 5 遺伝子座 (Giallourakis 等 Am J. Hum Genet. 2003;73:205-211 ; Palmieri 等 Aliment Pharmacol Ther. 2006;23:497-506 ; Russell 等 Gut. 2006;55:1114-1123 ; Waller 等 Gut. 2006;55:809-814) が同定されている。染色体 7 q 上に U C に対する連関の推定遺伝子座を同定する U K 規模の連鎖スキンの後、更なる研究で、U C の細胞性解毒に関与する A B C B 1 (M D R 1) 遺伝子の変異体を結びつけた (Satsangi 等 Nat Genet. 1996;14:199-202 ; Brant 等 Am J Hum Genet. 2003;73:1282-1292 ; Ho 等 Gastroenterology. 2005;128:288-296)

30

40

【 0 0 0 9 】

炎症性腸疾患 (I B D) において観察される慢性的小腸炎を生じる複雑な遺伝子 - 遺伝子及び遺伝子 - 環境関係の同定と理解に向けての補完的アプローチは、マイクロアレイ遺

50

伝子発現解析である。マイクロアレイは、組織及び細胞レベルでの遺伝子発現の包括的な像を明らかにし、根底にある病態生理学的過程の理解を助ける (Stoughton等 *Annu Rev Biochem.* 2005;74:53-82)。マイクロアレイ解析は最初は1997年にIBDの患者に応用され、CDの患者の手術切除中の96遺伝子の発現を、関節リウマチの患者の滑液組織と比較した (Heller等 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:2150-2155)。IBD患者からの手術標本を調べるためにマイクロアレイプラットフォームを使用する更なる研究により、疾患試料をコントロールと比較した場合に差次的に調節された多くの新規遺伝子が同定された (Dieckgraefe等 *Physiol Genomics.* 2000;4:1-11; Lawrance等 *Hum Mol Genet.* 2001;10:445-456)。

炎症性腸疾患 (IBD) において観察される慢性的小腸炎を生じる複雑な遺伝子 - 遺伝子及び遺伝子 - 環境関係の同定と理解に向けての補完的アプローチは、マイクロアレイ遺伝子発現解析である。マイクロアレイは、組織及び細胞レベルでの遺伝子発現の包括的な像を明らかにし、根底にある病態生理学的過程の理解を助ける (Stoughton等 *Annu Rev Biochem.* 2005;74:53-82)。マイクロアレイ解析は最初は1997年にIBDの患者に応用され、CDの患者の手術切除中の96遺伝子の発現を、関節リウマチの患者の滑液組織と比較した (Heller等 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:2150-2155)。IBD患者からの手術標本を調べるためにマイクロアレイプラットフォームを使用する更なる研究により、疾患試料をコントロールと比較した場合に差次的に調節された多くの新規遺伝子が同定された (Dieckgraefe等 *Physiol Genomics.* 2000;4:1-11; Lawrance等 *Hum Mol Genet.* 2001;10:445-456)。

【0010】

内視鏡で採取した粘膜生検は、重篤ではない疾患の患者を包含する大きな範囲の患者由来の組織をマイクロアレイすることを可能にした。Langmann等はマイクロアレイを使用し、結腸及び回腸末端の巨視的に非罹患の領域からの生検標本中の22283の遺伝子进行分析した (Langmann等 *Gastroenterology.* 2004;127:26-40)。細胞解毒及び生体内分解に関与した遺伝子 (プレグナンXレセプター及びMDR1) はUCの患者の大腸において有意にダウンレギュレートされたが、CDの患者からの生検中におけるこれら遺伝子の発現には差がなかった。Costelloと同僚達 (Costello等 *PLoS Med.* 2005;2:e199) は、健全なコントロール、CD及びUCの患者由来の内視鏡S状結腸生検中における33792配列の発現を調べた。新規なタンパク質を表す多くの配列が差次的に調節されており、インシリコ解析では、これらのタンパク質が疾患病理 - 転写因子、シグナル伝達分子及び細胞接着に関する推定機能を有していたことが示唆された。

【0011】

UCの患者の研究において、Okahara等 (*Aliment Pharmacol Ther.* 2005;21:1091-1097) は、非炎症生検と比較した場合、炎症生検において、遊走阻止因子関連タンパク質14 (MRP14)、増殖関連癌遺伝子ガンマ (GRO) 及び血清アミロイドA1 (SAA1) がアップレギュレートされる一方、TIMP1及びelfinがダウンレギュレートされていることを観察した。41のケモカインと21のケモカインレセプターを観察し、Puleston等は、ケモカインCXCLs 1-3及び8及びCCL20がアクティブな大腸CD及びUCにおいてアップレギュレートされていたことを証明した (*Aliment Pharmacol Ther.* 2005;21:109-120)。総括してこれらの研究は、初期のマイクロアレイプラットフォーム及び組織収集の異質性を例証している。しかしながら、これらの問題にかかわらず、多くの遺伝子の差次的発現が一貫して観察された。

【0012】

IBDの研究における上記の進歩にもかかわらず、哺乳動物においてIBDを検出することができ、この疾患を効果的に治療するための更なる診断及び治療剤に対して大なる需要が存在している。従って、本発明は、正常な組織と比較してIBD中において過剰発現されるポリヌクレオチド及びポリペプチド、及びその哺乳動物被検者におけるIBDの存在を検出又は診断し、IBDが適切なIBD治療剤で検出される被検者を続いて治療するために、ポリペプチド及びそのコード核酸を使用する方法を提供する。

10

20

30

40

50

【0013】

本発明は、潰瘍性大腸炎（UC）及びクローン病（CD）を含む炎症性腸疾患（IBD）の存在を検出し、その進行を決定する方法を提供する。

ここに開示した発明は、哺乳動物組織又は細胞試料中の一又は複数の遺伝子発現マーカーの発現を検査する方法及びアッセイを提供し、ここで、一又は複数のかかるバイオマーカーの発現が、組織又は細胞試料が採取された哺乳動物被検者がIBDに罹っている可能性が高いかどうかを予測する。本発明の様々な実施態様では、該方法及びアッセイは、表1、2、及び3に列挙されたもののような遺伝子発現マーカーの発現を検査し、発現がコントロール試料よりも高いか又は低いかを決定する。

本発明のこれらの及び更なる実施態様は当業者には明らかであろう。

10

【発明の概要】

【0014】

一態様では、本発明は、哺乳動物被検者における炎症性腸疾患（IBD）を検出又は診断する方法であって、被検者から得られた生物学的試料において、(i)表1、2、又は3から選択された一又は複数のポリペプチドをコードする一又は複数の核酸、又は(ii)表1、2、又は3から選択された一又は複数の遺伝子のRNA転写物又はその発現産物の、発現レベルが、コントロールにおける発現レベルに対して異なっていることを決定し、発現の差が、被検者がIBDである可能性が高いことを示している方法に関する。

一実施態様では、哺乳動物被検者におけるIBDを診断又は検出する方法は、被検者から得られた試験試料において、(i)表1A、2、又は3Aから選択された一又は複数のポリペプチドをコードする一又は複数の核酸；又は(ii)表1A、2、又は3Aから選択された一又は複数の遺伝子のRNA転写物又はその発現産物の発現レベルが、コントロールにおける発現レベルに対して高いことを決定することを含み、発現の高いレベルが、試験試料が得られた被検者におけるIBDの存在を示している方法に関する。

20

他の実施態様では、哺乳動物被検者におけるIBDを診断又は検出する方法は、被検者から得られた試験試料において、(i)表1B又は3Bから選択された一又は複数のポリペプチドをコードする一又は複数の核酸；又は(ii)表1B又は3Aから選択された一又は複数の遺伝子のRNA転写物又はその発現産物の発現レベルが、コントロールにおける発現レベルに対して低いことを決定することを含み、発現の低いレベルが、試験試料が得られた被検者におけるIBDの存在を示している方法に関する。

30

【0015】

一態様では、該方法は、過去においてIBDと診断され現在は寛解している哺乳動物被検者におけるIBDの突然の再発を診断又は検出することに関する。被検者はIBDに対する治療を完了していてもよいし、又はIBDの治療を現在受けていてもよい。一実施態様では、該方法は、哺乳動物被検者から得られた生物学的試料中において、(i)表1、2、又は3から選択された一又は複数のポリペプチドをコードする一又は複数の核酸；又は(ii)表1、2、又は3から選択された一又は複数の遺伝子のRNA転写物又はその発現産物の、発現レベルが、コントロールにおける発現レベルに対して異なっていることを決定することを含み、発現の差が、被検者がIBDの突然の再発の可能性が高いことを示している。あるいは、試験試料は、利用できるならば、最初のIBD診断の診断前、診断後又は診断時に得られた哺乳動物被検者の前の試験試料と比較することができる。

40

【0016】

全ての態様において、哺乳動物被検者は好ましくはヒト患者であり、例えばIBDになっているかIBDを発症するリスクがあると診断されたヒト患者である。被検者はまたIBDの治療を以前に受けたがIBDの再発のリスクがあるIBD患者である。

本発明の方法の全ての態様に対して、ここに記載の一又は複数の遺伝子（あるいはかかる遺伝子の一又は複数によって発現されるポリペプチドをコードする一又は複数の核酸）の発現レベルの決定は、例えば遺伝子発現プロファイリングによって得ることができる。遺伝子発現プロファイリングの方法は、例えば、PCRベースの方法でありうる。

【0017】

50

様々な実施態様では、診断は、例えば免疫組織化学的検査（IHC）及び／又は蛍光インサイツハイブリダイゼーションによる、（i）表1、2、又は3から選択された一又は複数のポリペプチドをコードする一又は複数の核酸；又は（ii）表1、2、又は3から選択された一又は複数の遺伝子のRNA転写物又はその発現産物の、発現レベルの定量を含む。

本発明の全態様に対して、遺伝子の発現レベルは、一又は複数の参照遺伝子、又はその発現産物の発現レベルに対して正規化されうる。

本発明の全態様に対して、該方法は、上記遺伝子の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20、又はその発現産物の発現レベルのエビデンスを決定することを更に含む。

10

【0018】

他の態様では、本発明の方法はまたその発現レベルのエビデンスに基づいてそのような遺伝子（つまり、ここに開示されたIBDマーカー）の「パネル」の使用を考える。ある実施態様では、IBDマーカーのパネルは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20のIBDマーカーを含む。該パネルは、コントロールに対してIBD中において過剰発現されるIBDマーカー、コントロールに対してIBD中において過小発現されるIBDマーカー、又はコントロールに対してIBD中において過剰発現されまた過小発現されるIBDマーカーを含む。かかるパネルは、IBDが被検者に存在しているかどうかについて決定をするために一又は複数のIBDマーカーの発現差異について哺乳動物被検者をスクリーニングするために使用することができる。

20

【0019】

一実施態様では、パネルを構成するIBDマーカーは表1、2、及び3から選択される。好ましい実施態様では、哺乳動物被検者におけるIBDの存在を診断又は検出する方法は、被検者から得られた試験試料中におけるコントロールにおける発現レベルに対するIBDマーカーのパネルからRNA転写物又はその発現産物の発現レベル差を決定することを含み、ここで、発現レベル差が、試験試料が得られた被検者におけるIBDの存在を示す。試験試料における発現差異は、ここで検討されるコントロールに対して高いか、及び／又は低い場合がある。

本発明の全態様に対して、該方法は上記予想をまとめるレポートを作成する工程を更に含む。

30

【0020】

全態様に対して、本発明の方法に従って診断され又は検出されるIBDはクローン病（CD）、潰瘍性大腸炎（UC）、又はCD及びUCの双方である。

本発明の全態様に対して、哺乳動物被検者から得られる試験試料は、結腸組織生検由来でありうる。好ましい実施態様では、生検は、回腸末端、上行結腸、下行結腸、及びS状結腸からなる群から選択される組織である。他の好ましい実施態様では、生検は炎症結腸領域又は非炎症結腸領域由来である。炎症結腸領域は急性的に炎症状態となっているか又は慢性的な炎症状態でありうる。

全態様に対して、発現レベルの決定は一回を越えて生じうる。本発明の全態様に対して、発現レベルの決定は、患者が手術前及び／又は手術後に何らかの治療を患者が受ける前になされうる。ある実施態様では、決定工程は、手術後の哺乳動物被検者におけるIBDの再発を示し、又は上記哺乳動物被検者における上記IBDの突然の再発を示している。好ましい実施態様では、IBDはクローン病である。

40

他の態様では、本発明は、IBDの存在がここに記載された方法によって検出されている哺乳動物被検者を治療する方法に関する。例えば、哺乳動物被検者から得られた試験試料がここに記載されたIBDマーカーのRNA転写物又は対応する遺伝子産物の一又は複数のコントロールに対する発現差異を示していることが決定された後、哺乳動物被検者にIBD治療剤が投与されうる。

【0021】

50

一実施態様では、治療を必要とする哺乳動物被検者においてIBDを治療する方法は、(a)上記被検者から得られた試験試料において、(i)表1、2、又は3から選択された一又は複数のポリペプチドをコードする一又は複数の核酸；又は(ii)表1、2、又は3から選択された一又は複数の遺伝子のRNA転写物又はその発現産物の、コントロールにおける発現レベルに対する発現レベル差を決定し、ここで上記発現の差が、試験試料が得られた被検者におけるIBDの存在を示し；(b)上記被検者に有効量のIBD治療剤を投与することを含む。好ましい実施態様では、IBDを治療する方法は、(a)被検者から得られた試験試料において、(i)表1A、2、又は3Aから選択された一又は複数のポリペプチドをコードする一又は複数の核酸；又は(ii)表1A、2、又は3Aから選択された一又は複数の遺伝子のRNA転写物又はその発現産物の発現レベルが、コントロールにおける発現レベルに対して高いことを決定し、ここで発現の高いレベルが、試験試料が得られた被検者におけるIBDの存在を示し；(b)上記被検者に有効量のIBD治療剤を投与することを含む。他の好ましい実施態様では、IBDの治療方法は、(a)被検者から得られた試験試料において、(i)表1B又は3Bから選択された一又は複数のポリペプチドをコードする一又は複数の核酸；又は(ii)表1B又は3Bから選択された一又は複数の遺伝子のRNA転写物又はその発現産物の発現レベルが、コントロールにおける発現レベルに対して低いことを決定することを含み、ここで発現の低いレベルが、試験試料が得られた被検者におけるIBDの存在を示す。ある好ましい実施態様では、IBD治療剤は、アミノサリチル酸、副腎皮質ステロイド、及び免疫抑制剤の一又は複数である。

10

20

【0022】

一態様では、上で検討したIBDマーカーのパネルは、哺乳動物被検者におけるIBDを治療する方法において有用である。一実施態様では、哺乳動物被検者はマーカーのパネルに対してスクリーニングされ、IBDの存在が決定された場合、IBD治療剤が上で検討されたように投与されうる。

異なった態様では、本発明は、(1)抽出バッファー/試薬及びプロトコル；(2)逆転写バッファー/試薬及びプロトコル；及び(3)qPCRバッファー/試薬及びプロトコルで本発明の方法を実施するのに適したものの一又は複数を含むキットに関する。該キットは、データ検索及び解析ソフトウェアを含みうる。

一実施態様では、発現差異がIBDを示す遺伝子はGLI1である。他の実施態様では、GLI1遺伝子はGLI1変異体である。好ましい実施態様では、GLI1変異体は実施例4に記載したようなrs2228226C G(Q1100E)である。

30

【0023】

ここで述べた全ての刊行物は、その刊行物が引用されているものに関連した方法及び/又は材料を開示し記述するために出典明示によりここに援用される。ここに引用された刊行物は本出願の出願日前の開示に対して引用している。本発明のより早い優先日又は先の日付が刊行物に先立つことができないことを発明者が自認していると思なされるべきではない。更に、実際の公開日は示されたものとは異なる場合があり、個々に立証を要する。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】目的変数なしの階層的クラスタリングによって解析されたコントロール患者からの組織学的に正常な生検を示す。

【図2】潰瘍性大腸炎患者及びコントロールにおけるデフェンシン5及び6の発現を示す。

【図3】潰瘍性大腸炎及びコントロールにおけるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)3及び7の発現を示す。

【図4】コントロール及び潰瘍性大腸炎の炎症及び非炎症S状結腸生検中におけるSAA1、IL-8、デフェンシン5、及びデフェンシン6のリアルタイムPCR発現を示す。

【図5】コントロール及び潰瘍性大腸炎の炎症及び非炎症S状結腸生検中におけるMMP

40

50

3、MMP7、S100A8、及びTLR4のリアルタイムPCR発現を示す。

【図6】潰瘍性大腸炎の患者及びコントロールの回腸末端及び結腸におけるデフェンシン5のインサイトハイブリダイゼーションを示す。

【図7】潰瘍性大腸炎の患者及びコントロールの回腸末端及び結腸におけるデフェンシン6のインサイトハイブリダイゼーションを示す。

【図8】図8A及び8Bは、ヒトDEFA6ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：1）及びヒトDEFA6ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：2）を示す。

【図9】図9A及び9Bは、ヒトDEFA5ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：3）及びヒトDEFA5ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：4）を示す。図9C及び9Dは、ヒトDEFB14ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：210）及びヒトDEFB14ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：211）を示す。

【図10】図10A及び10Bは、ヒトIL3RAポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：5）及びヒトIL3RAポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：6）を示す。

【図11】図11A及び11Bは、ヒトIL2RAポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：7）及びヒトIL2RAポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：8）を示す。

【図12】図12A及び12Bは、ヒトREG3Gポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：9）及びヒトREG3Gポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：10）を示す。

【図13】図13A及び13Bは、ヒトREG1Gポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：11）及びヒトREG1Gポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：12）を示す。

【図14A】図14Aは、ヒトKCND3ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：13）を示す。

【図14B】図14Bは、ヒトKCND3ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：14）を示す。

【図15】図15A及び15Bは、ヒトMIP-3aポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：15）及びヒトMIP-3aポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：16）を示す。

【図16】図16A及び16Bは、ヒトECGF1ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：17）及びヒトECGF1ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：18）を示す。

【図17】図17A及び17Bは、ヒトIL1Bポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：19）及びヒトIL1Bポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：20）を示す。

【図18】図18A及び18Bは、ヒトMIP2BGRO-gポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：21）及びヒトMIP2BGRO-gポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：22）を示す。

【図19】図19A及び19Bは、ヒトCXCL1ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：23）及びヒトCXCL1ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：24）を示す。

【図20A-1】図20Aは、ヒトIAP1ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：25）を示す。

【図20A-2】図20Aは、ヒトIAP1ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：25）を示す。

【図20B】図20Bは、ヒトIAP1ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：26）を示す。

【図21】図21A及び21Bは、ヒトCASP5ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：27）及びヒトCASP5ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：28）を示す。

10

20

30

40

50

示す。

【図 2 2 A - 1】図 2 2 A は、ヒト D M B T 1 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：29）を示す。

【図 2 2 A - 2】図 2 2 A は、ヒト D M B T 1 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：29）を示す。

【図 2 2 B】図 2 2 B は、ヒト D M B T 1 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：30）を示す。

【図 2 3 A - 1】図 2 2 A は、ヒト P C D H 1 7 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：31）を示す。

【図 2 3 A - 2】図 2 2 A は、ヒト P C D H 1 7 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：31）を示す。

【図 2 3 B】図 2 2 B は、ヒト P C D H 1 7 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：32）を示す。

【図 2 4】図 2 4 A 及び 2 4 B は、ヒト I F I T M 1 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：33）及びヒト I F I T M 1 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：34）を示す。

【図 2 5】図 2 5 A 及び 2 5 B は、ヒト P D Z K 1 I P 1 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：35）及びヒト P D Z K 1 I P 1 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：36）を示す。

【図 2 6 A - 1】図 2 6 A は、ヒト I R T A 2 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：37）を示す。

【図 2 6 A - 2】図 2 6 A は、ヒト I R T A 2 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：37）を示す。

【図 2 6 B】図 2 6 B は、ヒト I R T A 2 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：38）を示す。

【図 2 7 A - 1】図 2 7 A は、ヒト S L C 4 0 A 1 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：39）を示す。

【図 2 7 A - 2】図 2 7 A は、ヒト S L C 4 0 A 1 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：39）を示す。

【図 2 7 B】図 2 7 B は、ヒト S L C 4 0 A 1 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：40）を示す。

【図 2 8 A】図 2 8 A は、ヒト I G H V 4 - 4 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：41）を示す。

【図 2 8 B】図 2 8 B は、ヒト I G H V 4 - 4 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：42）を示す。

【図 2 9】図 2 9 A 及び 2 9 B は、ヒト R E G 3 G ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：43）及びヒト R E G 3 G ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：44）を示す。

【図 3 0】図 3 0 A 及び 3 0 B は、ヒト A Q P 9 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：45）及びヒト A Q P 9 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：46）を示す。

【図 3 1 A】図 3 1 A は、ヒト O L F M 4 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：47）を示す。

【図 3 1 B】図 3 1 B は、ヒト O L F M 4 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：48）を示す。

【図 3 2】図 3 2 A 及び 3 2 B は、ヒト S 1 0 0 A 9 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：49）及びヒト S 1 0 0 A 9 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：50）を示す。

【図 3 3 A】図 3 3 A は、ヒト U N C 5 C L ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：51）を示す。

10

20

30

40

50

【図 3 3 B】図 3 3 B は、ヒト U N C 5 C L ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：5 2）を示す。

【図 3 4】図 3 4 A 及び 3 4 B は、ヒト G P R 1 1 0 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：5 3）及びヒト G P R 1 1 0 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：5 4）を示す。

【図 3 5】図 3 5 A 及び 3 5 B は、ヒト H L A - G ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：5 5）及びヒト H L A - G ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：5 6）を示す。

【図 3 6 A】図 3 6 A は、ヒト T A P 1 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：5 7）を示す。

10

【図 3 6 B】図 3 6 B は、ヒト T A P 1 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：5 8）を示す。

【図 3 7 A】図 3 7 A は、ヒト M A P 3 K 8 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：5 9）を示す。

【図 3 7 B】図 3 7 B は、ヒト M A P 3 K 8 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：6 0）を示す。

【図 3 8 A - 1】図 3 8 A は、ヒト U B D | G A B B R 1 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：6 1）を示す。

【図 3 8 A - 2】図 3 8 A は、ヒト U B D | G A B B R 1 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：6 1）を示す。

20

【図 3 8 B】図 3 8 B は、ヒト U B D | G A B B R 1 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：6 2）を示す。

【図 3 9】図 3 9 A 及び 3 9 B は、ヒト D H X 5 7 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：6 3）及びヒト D H X 5 7 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：6 4）を示す。

【図 4 0】図 4 0 A 及び 4 0 B は、ヒト M A ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：6 5）及びヒト M A ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：6 6）を示す。

【図 4 1 A - 1】図 4 1 A は、ヒト I G L J C O R 1 8 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：6 6）を示す。

【図 4 1 A - 2】図 4 1 A は、ヒト I G L J C O R 1 8 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：6 6）を示す。

30

【図 4 1 B】図 4 1 B は、ヒト I G L J C O R 1 8 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：6 7）を示す。

【図 4 2】図 4 2 A 及び 4 2 B は、ヒト H L A - G ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：6 9）及びヒト H L A - G ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：7 0）を示す。

【図 4 3】図 4 3 A 及び 4 3 B は、ヒト S A A 1 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：7 1）及びヒト S A A 1 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：7 2）を示す。

【図 4 4】図 4 4 A 及び 4 4 B は、ヒト T A P 2 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：7 3）及びヒト T A P 2 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：7 4）を示す。

40

【図 4 5 A - 1】図 4 5 A は、ヒト P C A A 1 7 4 4 8 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：7 5）を示す。

【図 4 5 A - 2】図 4 5 A は、ヒト P C A A 1 7 4 4 8 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：7 5）を示す。

【図 4 5 B】図 4 5 B は、ヒト P C A A 1 7 4 4 8 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：7 6）を示す。

【図 4 6】図 4 6 A 及び 4 6 B は、ヒト L C N 2 ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：7 7）及びヒト L C N 2 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：7 8）を示す

50

。

【図47】図47A及び47Bは、ヒトZBP1ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：79）及びヒトZBP1ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：80）を示す。

。

【図48】図48A及び48Bは、ヒトTNIP3ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：81）及びヒトTNIP3ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：82）を示す。

【図49A】図49Aは、ヒトZC3H12Aポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：83）を示す。

【図49B】図49Bは、ヒトZC3H12Aポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：84）を示す。

【図50】図50A及び50Bは、ヒトCHI3L1ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：85）及びヒトCHI3L1ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：86）を示す。

【図51A】図51Aは、ヒトFCGR3Aポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：87）を示す。

【図51B】図51Bは、ヒトFCGR3Aポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：88）を示す。

【図52A-1】図52Aは、ヒトSAMD9Lポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：89）を示す。

【図52A-2】図52Aは、ヒトSAMD9Lポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：89）を示す。

【図52A-3】図52Aは、ヒトSAMD9Lポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：89）を示す。

【図52B】図52Bは、ヒトSAMD9Lポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：90）を示す。

【図53A】図53Aは、ヒトMMP9ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：91）を示す。

【図53B】図53Bは、ヒトMMP9ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：92）を示す。

【図54】図54A及び54Bは、ヒトMMP7ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：93）及びヒトMMP7ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：94）を示す。

。

【図55A】図55Aは、ヒトBFポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：95）を示す。

【図55B】図55Bは、ヒトBFポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：96）を示す。

【図56】図56A及び56Bは、ヒトS100Pポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：97）及びヒトS100Pポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：98）を示す。

【図57】図57A及び57Bは、ヒトGROポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：99）及びヒトGROポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：100）を示す。

【図58】図58A及び58Bは、ヒトINDOポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：101）及びヒトINDOポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：102）を示す。

【図59A】図59Aは、ヒトTRIM22ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：103）を示す。

【図59B】図59Bは、ヒトTRIM22ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：104）を示す。

【図60】図60A及び60Bは、ヒトSAA2ポリペプチドをコードする核酸配列（配

10

20

30

40

50

列番号：105)及びヒトSAA2ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：106)を示す。

【図61】図61A及び61Bは、ヒトNEU4ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：107)及びヒトNEU4ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：108)を示す。

【図62A-1】図62Aは、IRTA2/FCRH5ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：109)を示す。

【図62A-2】図62Aは、IRTA2/FCRH5ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：109)を示す。

【図62B】図62Bは、IRTA2/FCRH5ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：110)を示す。

【図63A-1】図63Aは、IGLJCOR18ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：111)を示す。

【図63A-2】図63Aは、IGLJCOR18ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：111)を示す。

【図63B】図63Bは、IGLJCOR18ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：112)を示す。

【図64A】図64Aは、ヒトIGHV4-4ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：113)を示す。

【図64B】図64Bは、ヒトIGHV4-4ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：114)を示す。

【図65A】図65Aは、ヒトMMP9ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：115)を示す。

【図65B】図65Bは、ヒトMMP9ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：116)を示す。

【図66】図66A及び66Bは、ヒトGROポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：117)及びヒトGROポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：118)を示す。

【図67】図67A及び67Bは、ヒトMIP2BGRO-gポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：119)及びヒトMIP2BGRO-gポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：120)を示す。

【図68】図68A及び68Bは、ヒトIL1Bポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：121)及びヒトGROポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：122)を示す。

【図69】図69A及び69Bは、ヒトIL3RAポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：123)及びヒトIL3RAポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：124)を示す。

【図70】図70A及び70Bは、ヒトCASP1ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：125)及びヒトCASP1ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：126)を示す。

【図71】図71A及び71Bは、ヒトBV8ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：127)及びヒトBV8ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：128)を示す。

【図72A-1】図72Aは、HDAC7Aポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：129)を示す。

【図72A-2】図72Aは、HDAC7Aポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：129)を示す。

【図72B】図72Bは、HDAC7Aポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：130)を示す。

【図73A】図73Aは、ヒトACVRL1ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：131)を示す。

10

20

30

40

50

号：131)を示す。

【図73B】図73Bは、ヒトACVRL1ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：132)を示す。

【図74A】図74Aは、ヒトNR4A1ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：133)を示す。

【図74B】図74Bは、ヒトNR4A1ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：134)を示す。

【図75A】図75Aは、ヒトK5Bポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：135)を示す。

【図75B】図75Bは、ヒトK5Bポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：136)を示す。

10

【図76A】図76Aは、ヒトSILVポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：137)を示す。

【図76B】図76Bは、ヒトSILVポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：138)を示す。

【図77A-1】図77Aは、IRAK3ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：139)を示す。

【図77A-2】図77Aは、IRAK3ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：139)を示す。

【図77B】図77Bは、IRAK3ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：140)を示す。

20

【図78】図78A及び78Bは、ヒトIL-4ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：141)及びヒトIL-4ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：142)を示す。

【図79A】図79Aは、ヒトIL-13ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：143)を示す。

【図79B】図79Bは、ヒトIL-13ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：144)を示す。

【図80A-1】図80Aは、RAD50ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：145)を示す。

30

【図80A-2】図80Aは、RAD50ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：145)を示す。

【図80B】図80Bは、RAD50ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：146)を示す。

【図81】図81A及び81Bは、ヒトIL-5ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：147)及びヒトIL-5ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：148)を示す。

【図82】図82A及び82Bは、ヒトIRF1ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：149)及びヒトIRF1ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：150)を示す。

40

【図83】図83A及び83Bは、ヒトPDLIM4ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：151)及びヒトPDLIM4ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：152)を示す。

【図84A】図84Aは、ヒトCSF2ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：153)を示す。

【図84B】図84Bは、ヒトCSF2ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：154)を示す。

【図85】図85A及び85Bは、ヒトIL-3ポリペプチドをコードする核酸配列(配列番号：155)及びヒトIL-3ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号：156)を示す。

50

【図86】図86A及び86Bは、ヒトMMP3ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：157）及びヒトMMP3ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：158）を示す。

【図87】図87A及び87Bは、ヒトIL-8ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：159）及びヒトIL-8ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：160）を示す。

【図88A-1】図88Aは、TLR4ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：161）を示す。

【図88A-2】図88Aは、TLR4ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：161）を示す。

【図88B】図88Bは、TLR4ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：162）を示す。

【図89】図89A及び89Bは、ヒトHLA-DRB1ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：163）及びヒトHLA-DRB1ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：164）を示す。

【図90】図90A及び90Bは、ヒトMMP19ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：165）及びヒトMMP19ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：166）を示す。

【図91】図91A及び91Bは、ヒトTIMP1ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：167）及びヒトTIMP1ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：168）を示す。

【図92】図92A及び92Bは、ヒトElfinポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：169）及びヒトElfinポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：170）を示す。

【図93】図93A及び93Bは、ヒトCXCL1ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：171）及びヒトCXCL1ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：172）を示す。

【図94】図94A及び94Bは、ヒトDFKZP586A0522ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：173）及びヒトDFKZP586A0522ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：174）を示す。

【図95A-1】図95Aは、SLC39A5ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：175）を示す。

【図95A-2】図95Aは、SLC39A5ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：175）を示す。

【図95A-3】図95Aは、SLC39A5ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：175）を示す。

【図95B】図95Bは、SLC39A5ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：176）を示す。

【図96A-1】図96Aは、GLI-1ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：177）を示す。

【図96A-2】図96Aは、GLI-1ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：177）を示す。

【図96B】図96Bは、GLI-1ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：178）を示す。

【図97A-1】図97Aは、HMGA2ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：179）を示す。

【図97A-2】図97Aは、HMGA2ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：179）を示す。

【図97B】図97Bは、HMGA2ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：180）を示す。

10

20

30

40

50

【図98A-1】図98Aは、SLC22A5ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：181）を示す。

【図98A-2】図98Aは、SLC22A5ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：181）を示す。

【図98B】図98Bは、SLC22A5ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：182）を示す。

【図99】図99A及び99Bは、ヒトSLC22A4ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：183）及びヒトSLC22A4ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：184）を示す。

【図100】図100A及び100Bは、ヒトP4HA2ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：185）及びヒトP4HA2ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：186）を示す。

【図101】図101A及び101Bは、ヒトTSLPポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：187）及びヒトTSLPポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：188）を示す。

【図102】図102A及び102Bは、ヒトチューブリン 5 / 3ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：189）及びヒトチューブリン 5 / 3ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：190）を示す。

【図103】図103Aは、ヒトチューブリン 6ポリペプチドをコードする核酸配列（配列番号：191）を、103Bは、ヒトチューブリン 6ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：192）を示す。

【図104】Mantel-Haenszel法を使用するスコットランド、ケンブリッジ及びスウェーデンにおける非同義GLI1SNP rs2228226のメタアナリシスを示す。

【図105A】Q1100EがGLI1タンパク質の保存領域を乱し、GLI1転写活性を低減させることを示す。

【図105B】Q1100EがGLI1タンパク質の保存領域を乱し、GLI1転写活性を低減させることを示す。

【図106A】健常なヒト成人結腸（HC）及び潰瘍性大腸炎（UC）におけるヘッジホッグ（HH）シグナル伝達成分の発現を示す。

【図106B】健常なヒト成人結腸（HC）及び潰瘍性大腸炎（UC）におけるヘッジホッグ（HH）シグナル伝達成分の発現を示す。

【図106C】健常なヒト成人結腸（HC）及び潰瘍性大腸炎（UC）におけるヘッジホッグ（HH）シグナル伝達成分の発現を示す。

【図107】Gli1+/-動物がDSS処置後に死亡率、重篤な臨床症状、及び重度の体重減少を示す結果を示す。

【図108A】Gli1+/-動物がDSS処置に应答してWT同腹仔よりも深刻な小腸炎を示すことを示す。

【図108B】Gli1+/-動物がDSS処置に应答してWT同腹仔よりも深刻な小腸炎を示すことを示す。

【図109】DSS処置後のGli1+/-及びWTマウスが強い炎症誘発性サイトカイン活性化を示すというサイトカイン分析を示す。

【図110】図110Aは、（A）ヒトアレステインドメイン含有5（ARRDC5）（LOC342959）をコードする核酸配列を、図110Bは、（B）ヒトARRDC5ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【図111】ヒトアタキシン3-様（ATXN3L）に対応する核酸配列を示す。

【図112A】図112Aは、（A）ヒト卵胞刺激ホルモンレセプター（FSHR）（LOC92552）をコードする核酸配列を示す。

【図112B】図112Bは、（B）ヒトFSHRポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【図113A-1】図113Aは、（A）ヒト血小板由来増殖因子レセプター、ポリペ

10

20

30

40

50

プチド (PDGFR A) をコードする核酸配列を示す。

【図 1 1 3 A - 2】図 1 1 3 A は、(A) ヒト血小板由来増殖因子レセプター、ポリペプチド (PDGFR A) をコードする核酸配列を示す。

【図 1 1 3 B】図 1 1 3 B は、(B) ヒト PDGFR A ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【図 1 1 4 A】図 1 1 4 A は、(A) ヒトトランスフォーミング増殖因子 3 (TGF B 3) をコードする核酸配列を示す。

【図 1 1 4 B】図 1 1 4 B は、(B) ヒト TGF B 3 ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【図 1 1 5 A】図 1 1 5 A は、(A) ヒトカリウムチャンネル四量体化ドメイン含有 8 (KCTD 8) をコードする核酸配列を示す。

【図 1 1 5 B】図 1 1 5 B は、(B) ヒト KCTD 8 ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【図 1 1 6 A】図 1 1 6 A は、(A) ヒトトランスグルタミナーゼ 4 (TGM 4) をコードする核酸配列を示す。

【図 1 1 6 B】図 1 1 6 B は、(B) ヒト TGM 4 ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【図 1 1 7】図 1 1 7 A は、(A) ヒト TP D 5 2 L 3 腫瘍タンパク質 D 5 2 - 様 3 (NYD - SP 2 5) をコードする核酸配列を、図 1 1 7 B は、(B) ヒト NYD - SP 2 5 ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【図 1 1 8】misc__RNA (C 3 o r f 5 3), FLJ 3 3 6 5 1 に対応する核酸配列を示す。

【図 1 1 9】染色体 1 0 上の EM X 2 逆ストランド (非タンパク質コード化) (EM X 2 O S) に対応する核酸配列を示す。

【図 1 2 0 A】図 1 2 0 A は、(A) ヒト無翅型 MMTV 組み込み部位ファミリー、メンバー 1 6 (WNT 1 6) をコードする核酸配列を示す。

【図 1 2 0 B】図 1 2 0 B は、(B) ヒト WNT 1 6 ポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【図 1 2 1 A - 1】図 1 2 1 A は、(A - B) ヒト sprouty 関連, EVH 1 ドメインドメイン含有 2 (SPRED 2) をコードする核酸配列を示す。

【図 1 2 1 A - 2】図 1 2 1 A は、(A - B) ヒト sprouty 関連, EVH 1 ドメインドメイン含有 2 (SPRED 2) をコードする核酸配列を示す。

【図 1 2 1 B】図 1 2 1 B は、(A - B) ヒト sprouty 関連, EVH 1 ドメインドメイン含有 2 (SPRED 2) をコードする核酸配列を示す。

【図 1 2 1 C】図 1 2 1 C は、(C) ヒト SPRED 2 のアミノ酸配列を示す。

【図 1 2 2】図 1 2 2 A - C は、(A - B) ヒト染色体 1 6 オープンリーディングフレーム 6 5 (C 1 6 o r f 6 5) をコードする核酸配列と (C) ヒト染色体 1 6 オープンリーディングフレーム 6 5 (C 1 6 o r f 6 5) のアミノ酸配列を示す。

【図 1 2 3】図 1 2 3 A - B は、(A) ヒト染色体 1 2 オープンリーディングフレーム 2 (C 1 2 o r f 2) をコードする核酸配列と (B) ヒト染色体 1 2 オープンリーディングフレーム 2 (C 1 2 o r f 2) のアミノ酸配列を示す。

【図 1 2 4 A - 1】図 1 2 4 A は、ヒトマルチプル PDZ ドメインタンパク質 (MPDZ) をコードする核酸配列を示す。

【図 1 2 4 A - 2】図 1 2 4 A は、ヒトマルチプル PDZ ドメインタンパク質 (MPDZ) をコードする核酸配列を示す。

【図 1 2 4 A - 3】図 1 2 4 A は、ヒトマルチプル PDZ ドメインタンパク質 (MPDZ) をコードする核酸配列を示す。

【図 1 2 4 B】図 1 2 4 B は、(B) ヒト MPDZ のアミノ酸配列を示す。

【図 1 2 5】図 1 2 5 A - B は、(A) ヒトフェニルアラニン - tRNA シンターゼ 2 (FARS 2) をコードする核酸配列と (B) ヒト FARS 2 のアミノ酸配列を示す。

【図 1 2 6】図 1 2 6 A - B は、(A) ヒトカスパーゼ 8, アポトーシス関連システイン

10

20

30

40

50

プロテアーゼ (CASP8) をコードする核酸配列と (B) ヒト CASP8 のアミノ酸配列を示す。

【図127A】図127Aは、ヒト5'-ヌクレオチダーゼ, エクト (CD73) (NT5E) をコードする核酸配列を示す。

【図127B】図127Bは、(B) ヒト NT5E のアミノ酸配列を示す。

【図128】図128はヒト奇形癌腫誘導増殖因子3 (TDGF3) に対応する核酸配列を示す。

【図129】図129A - Bは、(A) ヒトブチロフィリン-様3 (BTNL3) をコードする核酸配列と (B) ヒト BTNL3 のアミノ酸配列を示す。

【図130】図130A - Bは、(A) ヒトS100A8をコードする核酸配列と (B) ヒトS100A8のアミノ酸配列を示す。

【図131】図131A - Bは、(A) ヒトCCL20をコードする核酸配列と (B) ヒトCCL20のアミノ酸配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0025】

A. 定義

特に定義しない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語は全て、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されているのと同じ意味を有する。Singleton 等, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2版, J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994)、及びMarch, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4版, John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992)により当業者は本出願に使用した多くの用語の一般的な理解が得られる。

当業者は、本発明の実施に使用することができるであろう、ここに記載のものと同様もしくは等価な多くの方法及び材料が分かるであろう。実際、本発明は記載された方法及び材料に決して限定されるものではない。本発明の目的のために、次の用語を以下に定義する。

【0026】

「炎症性腸疾患」又は「IBD」なる用語は、潰瘍性大腸炎及びクローン病に対する集合的な用語として使用される。該二種の疾患は一般には二つの異なった実体と考えられているが、表面上皮の斑状壊死、腺性陰窩に隣接した白血球の局所性蓄積、及び増加した数の上皮内リンパ球 (IEL) 及びある種のマクロファージサブセットのようなその共通する特性は単一の疾患群としてのその治療を正当なものにする。

「クローン病」又は「CD」なる用語は、ここでは胃腸管の慢性的な炎症を含む症状を意味するために使用される。クローン関連炎症は通常は腸管を冒すが口から肛門までの至る所で発生しうる。CDは、腸管壁の全層にわたって広がり、腸間膜並びにリンパ節を含む点でUCとは異なる。該疾病はしばしば非連続的であり、つまり、腸の重篤に罹患しているセグメントが明らかに疾患がない領域から分離している。CDでは、腸壁がまた厚くなり、これが閉塞を生じ得、瘻孔及び裂溝の発生が珍しくはない。ここで使用される場合、CDは、限定するものではないが、(回腸及び大腸を冒す)回結腸炎；(回腸を冒す)回腸炎；胃十二指腸CD(胃及び十二指腸の炎症)；空回腸炎(空腸における炎症の斑状パッチ)；及びクローン(肉芽腫性)大腸炎(大腸のみを冒す)を含むCDの幾つかのタイプの一又は複数でありうる。

【0027】

「潰瘍性大腸炎」又は「UC」なる用語は、ここでは大腸及び直腸の炎症を含む症状を意味するために使用される。UCの患者では、結腸粘膜を主として含む炎症反応がある。炎症は典型的には一様で連続的であり、正常な粘膜が介在する領域はない。表面粘膜細胞並びに陰窩上皮及び粘膜下層が好中球浸潤を伴う炎症反応に参与する。最終的には、この反応は典型的には上皮損傷及び上皮細胞の消失まで進行し、多発性潰瘍、線維症、異形成及び結腸の縦方向の退縮を生じる。

「非活動的」IBDなる用語は、ここでは、個体において過去に診断されたが現在は寛

10

20

30

40

50

解している I B D を意味するために使用される。これは、個体が診断されたが治療を受けていない活動的 I B D と対照的なものである。加えて、活動的 I B D は、寛解（つまり、不活動的 I B D になる）になった過去に診断され治療された I B D の再発でありうる。かかる再発はここでは I B D の「突然の再発」とも称されうる。I B D のような活動的な自己免疫疾患を有する哺乳動物被検者は、高まった疾患活動の期間又は対応する徴候の戻りである突然の再発を被りうる。突然の再発は、深刻な感染、アレルギー反応、肉体的ストレス、情動性トラウマ、手術、又は環境因子に応答して生じうる。

【 0 0 2 8 】

「調節する」なる用語は、ここでは、遺伝子の発現、又は一又は複数のタンパク質又はタンパク質サブユニットをコードする R N A 分子又は等価な R N A 分子のレベル、又は一又は複数のタンパク質又はタンパク質サブユニットの活性が、発現、レベル又は活性がモジュレーターの不存在下で観察されたものより大きいか又は少ないように、アップレギュレートされ又はダウンレギュレートされることを意味するために使用される。

「阻害する」、「ダウンレギュレートする」、「過小発現する」及び「減少する」なる用語は、交換可能に使用され、遺伝子の発現、又は一又は複数のタンパク質又はタンパク質サブユニットをコードする R N A 分子又は等価な R N A 分子のレベル、又は一又は複数のタンパク質又はタンパク質サブユニットの活性が、一又は複数のコントロール、例えば一又は複数のポジティブ及び/又はネガティブコントロールに対して減少することを意味する。

「アップレギュレートする」又は「過剰発現する」なる用語は、遺伝子の発現、又は一又は複数のタンパク質又はタンパク質サブユニットをコードする R N A 分子又は等価な R N A 分子のレベル、又は一又は複数のタンパク質又はタンパク質サブユニットの活性が、一又は複数のコントロール、例えば一又は複数のポジティブ及び/又はネガティブコントロールに対して上昇されることを意味する。

【 0 0 2 9 】

「診断」なる用語は、ここでは、分子又は病理学的状態、疾患又は症状の同定、例えば I B D の同定を意味するために使用される。

「予後」なる用語は、ここでは、自己免疫の突然の再発及び手術後の再発を含む I B D の発生又は進行の可能性の予測を意味する。予後因子は、I B D をひとたび発症したら患者の再発率及び結果に影響を及ぼす I B D の自然経過に関連した変量である。悪い予後に関連しうる臨床的パラメータは、例えば、腹部腫瘍又は圧痛、皮疹、関節腫脹、口腔内潰瘍、及び腹鳴（腸にわたる腹鳴又は振とう音）を含む。予後因子は、異なったベースライン再発リスクを持つサブグループに患者を分類するために使用することができる。

【 0 0 3 0 】

I B D の「病理」は、患者の良好な状態を危うくさせる全ての現象を含む。I B D の病理は、主として、任意の既知の外來抗原の不在下での慢性又は急性炎症と続いての潰瘍を生じうる腸内の免疫系の異常な活性化に起因する。臨床的には、I B D は、しばしば慢性的な予測できない経過を生じる多様な徴候によって特徴付けられる。血性下痢及び腹痛はしばしば熱及び体重減少を伴う。貧血は重度の疲労のように、希ではない。関節痛から急性関節炎にわたる関節の症状並びに肝機能の異常が通常 I B D に伴う。I B D の急性の「攻撃」の間、仕事や他の正常な活動は通常不可能であり、患者はしばしば入院させられる。

これらの疾患の病因論は知られておらず、初期の病変ははっきりとは定まっていない；しかし、表面上皮の斑状壊死、腺性陰窩に隣接する白血球の局所性蓄積、及び増加した数の上皮内リンパ球及びある種のマクロファージサブセットが、特にクローン病における推定される初期の変化として記述されている。

【 0 0 3 1 】

「治療」なる用語は、目的が標的の病理症状又は疾患を防止し又は遅延させ（低減させる）ことである治癒的処置と予防又は防止的処置の双方を意味する。治療を必要とする者は、既に I B D である者並びに I B D になる傾向がある者又は I B D が防止されなければ

ならない者を含む。IBDの診断がここに開示された方法によってひとたびなされたら、治療の目標は寛解を誘導し維持することである。

【0032】

「IBD治療剤」としての使用に適した様々な薬剤は当業者に知られている。ここに記載しているように、かかる薬剤には、限定なしに、アミノサリチル酸類、副腎皮質ステロイド、及び免疫抑制剤が含まれる。

「試験試料」なる用語は、IBDになっていることが疑われ、IBDであることが知られ、又はIBDからの寛解にあることが知られている哺乳動物被検者からの試料を意味する。試験試料は、限定しないが、血液、精液、血清、尿、骨髄、粘膜、組織等を含む哺乳動物被検者における様々な供給源から由来しうる。

10

【0033】

「コントロール」又は「コントロール試料」なる用語は、ネガティブな結果が試験試料におけるポジティブな結果を相関付けるのに役立つことが期待されるネガティブコントロールを意味する。本発明に適したコントロールには、限定しないが、正常なレベルの遺伝子発現を有していることが知られている試料、IBDとなっていないことが知られている哺乳動物被検者から得られた試料、及び正常であることが知られている哺乳動物被検者から得られた試料が含まれる。コントロールはまた過去にIBDと診断され治療され現在は寛解にある被検者から得られた試料であり得；かかるコントロールは寛解にある被検者におけるIBDの再発を決定するのに有用である。また、コントロールは、試験試料に含まれる細胞と同じ由来の正常細胞を含む試料でありうる。当業者であれば本発明での使用に適した他のコントロールが分かるであろう。

20

「マイクロアレイ」は、基質上の、ハイブリダイズ可能なアレイ要素、好ましくはポリヌクレオチドプローブの秩序だった配置を意味する。

【0034】

単数又は複数で使用される場合、「ポリヌクレオチド」なる用語は、一般に任意のポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドを意味し、これは未修飾RNA又はDNA又は修飾RNA又はDNAでもよい。よって、例えば、ここで定義されるポリヌクレオチドには、限定するものではないが、一本鎖及び二本鎖DNA、一本鎖及び二本鎖領域を含むDNA、一本鎖及び二本鎖RNA、及び一本鎖及び二本鎖領域を含むRNA、一本鎖であってもよく、又はより典型的には二本鎖であっても又は一本鎖又は二本鎖領域を含んでもよいDNA及びRNAを含む混成分子が含まれる。またここで使用される「ポリヌクレオチド」なる用語はRNA又はDNA又はRNAとDNAの双方を含む三本鎖領域を意味する。そのような領域のストランドは同じ分子由来でも又は異なった分子由来でもよい。その領域は一又は複数の分子の全てを含みうるが、より典型的には幾らかの分子の領域のみを含む。三本ヘリックス領域の分子の一つがしばしばオリゴヌクレオチドである。「ポリヌクレオチド」なる用語は特にcDNAsを含む。その用語には、一又は複数の修飾塩基を含むDNA(cDNAを含む)及びRNAが含まれる。よって、安定性又は他の理由のために修飾された骨格を持つDNA又はRNAは、その用語がここで意図するところの「ポリヌクレオチド」である。更に、イノシンのような希な塩基又はトリチウム化塩基のような修飾された塩基を含むDNA又はRNAはここで定義される「ポリヌクレオチド」という用語内に含まれる。一般に、「ポリヌクレオチド」という用語は未修飾のポリヌクレオチドの全ての化学的、酵素的及び/又は代謝的に修飾された形態並びに単純細胞及び複雑細胞を含む細胞及びウイルスに特徴的なDNA及びRNAの化学的形態を包含する。

30

40

【0035】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、限定するものではないが、一本鎖デオキシリボヌクレオチド、一本鎖又は二本鎖リボヌクレオチド、RNA:DNAハイブリッド及び二本鎖DNAを含む比較的短いポリヌクレオチドを意味する。一本鎖DNAプローブオリゴヌクレオチドのようなオリゴヌクレオチドは、例えば市販されている自動オリゴヌクレオチド合成機を使用して、化学的方法によってしばしば合成される。しかしながら、オリゴ

50

ヌクレオチドは、インビトロ組換えDNA媒介法を含む様々な他の方法によって、及び細胞及び生物中でのDNAの発現によって、作製することができる。

【0036】

「差次的に発現された遺伝子」、「差次的遺伝子発現」という用語及びその同義語は、交換可能に使用され、正常な又はコントロール患者でのその発現と比較して、疾患、特にUC又はCDのようなIBDに罹患している患者においてより高いか又はより低いレベルまで発現が活性化される遺伝子を意味する。その用語はまた発現が同じ疾患の異なった段階でより高いか又はより低いレベルまで活性化される遺伝子を含む。差次的に発現された遺伝子は核酸レベル又はタンパク質レベルで活性化されるか又は阻害されるか、あるいは選択的スプライシングを受けて異なったポリペプチド産物になりうるということがまた理解される。そのような差異は、例えばmRNAレベル、ポリペプチドの表面発現、分泌又は他の分割の変化によって裏付けられうる。差次的遺伝子発現は、正常な被験者と疾患、特にIBDに罹患している患者との間で、あるいは同じ疾患の様々な段階の間で異なる、二又はそれ以上の遺伝子又はその遺伝子産物間での発現の比較、又は二又はそれ以上の遺伝子又はその遺伝子産物間での発現の比の比較、又は更には同じ遺伝子の二つの異なってプロセシングされた産物の比較を含む。差次的発現は、例えば正常細胞及び疾患細胞の間、又は異なった疾患事象又は疾患段階を被った細胞間で、遺伝子又はその発現産物における時間的又は細胞性発現パターンの定量的な差異並びに定性的な差異の双方を含む。本発明の目的に対して、「差次的遺伝子発現」は、正常な被験者と疾患の患者における、又は疾患の患者の疾患の進行の様々な段階における所与の遺伝子の発現において少なくとも約2倍、好ましくは少なくとも約4倍、より好ましくは少なくとも約6倍、最も好ましくは少なくとも約10倍の差があるときに、存在すると考えられる。

10

20

【0037】

RNA転写物に関する「過剰発現」なる用語は、mRNAの検体又は特定の参照セットにおいて検出される全ての転写物であるかもしれない、参照mRNAのレベルに対する正規化によって決定される転写物のレベルを意味するために使用される。

「遺伝子増幅」なる語句は、遺伝子又は遺伝子断片の複数コピーが特定の細胞又は細胞株中で形成されるプロセスを意味する。複製領域（増幅DNAの伸展）はしばしば「増幅産物」と称される。通常、生産されたメッセンジャーRNA（mRNA）の量、つまり遺伝子発現のレベルは、発現した特定の遺伝子から作製されたコピー数の割合でまた増加する。

30

一般に、「マーカー」又は「バイオマーカー」なる用語は、その遺伝子がモニターできる制限酵素認識部位又は遺伝子のような染色体上の同定可能な物理的位置を意味する。該マーカーは「遺伝子発現マーカー」と称される遺伝子の発現領域、又は既知のコード化機能のないDNAのあるセグメントでありうる。ここで使用される「IBDマーカー」は表1、2、及び3に列挙された遺伝子を意味する。

【0038】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニリングのための温度が高くなり、プローブが短くなると温度は低くなる。ハイブリダイゼーションは、一般的に相補鎖がその融点より低い環境で存在する場合における変性DNAの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイズ可能な配列との間の所望のホモロジーの度合いが高くなると、使用できる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をよりストリンジェントにするが、低い温度はストリンジェンシーを低下させる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーの更なる詳細及び説明は、Ausubel等、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

40

【0039】

ここに定義される「ストリンジェントな条件」又は「高いストリンジェントな条件」は、(1)洗浄のために低イオン強度及び高温度、例えば、50で0.015Mの塩化ナ

50

トリウム / 0.0015 M のクエン酸ナトリウム / 0.1 % のドデシル硫酸ナトリウムを用いる ; (2) ハイブリダイゼーションの間にホルムアミド等の変性剤、例えば、42 で 750 mM の塩化ナトリウム、75 mM クエン酸ナトリウムを含む pH 6.5 の 0.1 % ウシ血清アルブミン / 0.1 % フィコール / 0.1 % ポリビニルピロリドン / 50 mM のリン酸ナトリウムバッファーによる 50 % (v / v) ホルムアミドを用いる ; 又は (3) 0.2 × S S C (塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム)、50 % ホルムアミド中での 42 での洗浄とその後の 55 での E D T A を含む 0.1 × S S C からなる高いストリンジェンシーの洗浄を伴う、42 での 50 % ホルムアミド、5 × S S C (0.75 M の NaCl、0.075 M のクエン酸ナトリウム)、50 mM のリン酸ナトリウム (pH 6.8)、0.1 % のピロリン酸ナトリウム、5 × デンハード液、超音波処理サケ精子 DNA (50 μ g / m l)、0.1 % S D S、及び 10 % のデキストラン硫酸を用いる。

【 0 0 4 0 】

「中程度のストリンジェントな条件」は、Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Press, 1989)に記載されているようにして同定され、上述のものよりストリンジェンシーが低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件 (例えば、温度、イオン強度及び % S D S) の使用を含む。中程度のストリンジェントな条件の一例は、37 で、20 % ホルムアミド、5 × S S C (150 mM の NaCl、15 mM のクエン酸三ナトリウム)、50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.6)、5 × デンハード液、10 % デキストラン硫酸、及び 20 mg / m l の変性切断サケ精子 DNA を含む溶液での終夜にわたるインキュベーションと、それに続く 37 - 50 で 1 × S S C でのフィルターの洗浄である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかが分かるであろう。

本発明の文脈において、任意の特定の遺伝子セットに列挙された遺伝子の「少なくとも一つ」、「少なくとも二つ」、「少なくとも5つ」等の標記は、列挙された遺伝子の何れか一つ又は任意のかつ全ての組合せを意味する。

【 0 0 4 1 】

「スプライシング」及び「RNA スプライシング」なる用語は交換可能に使用され、イントロンを除去し、エキソンを結合させて、真核生物細胞の細胞質中に移動する連続したコード化配列を有する成熟 mRNA を生産する RNA プロセッシングを意味する。

理論的には、「エキソン」なる用語は、成熟 RNA 産物に提示される介在遺伝子の任意のセグメントを意味する (B. Lewin. Genes IV Cell Press, Cambridge Mass. 1990)。理論的には、「イントロン」なる用語は、転写されているがその何れかの側のエキソンと共にスプライシングすることによって転写物内から除去される DNA の任意のセグメントを意味する。作用的には、エキソン配列は参照配列番号によって定義される遺伝子の mRNA 配列で生じる。作用的には、イントロン配列は、エキソン配列によって一括されその 5' 及び 3' 境界に GT 及び AG スプライスコンセンサス配列を有する遺伝子のゲノム DNA 内の介在配列である。

【 0 0 4 2 】

「干渉 RNA」又は「低分子干渉 RNA (siRNA)」は、標的遺伝子の発現を低減させる通常は約 30 ヌクレオチド長未満の二本鎖 RNA 分子である。干渉 RNA は既知の方法を使用して同定し合成することができ (Shi Y., Trends in Genetics 19(1):9-12 (2003)、国際公開第 2003056012 号及び国際公開第 2003064621 号)、siRNA ライブラリーは例えば Dharmacon, Lafayette, Colorado から商業的に入手できる。

「天然配列」ポリペプチドは、天然に生じる又は対立遺伝子変異体を含む天然由来のポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するものである。かかる天然配列ポリペプチドは天然から単離することができ、又は組換え又は合成手段によって生産されうる。よって、天然配列ポリペプチドは、天然に生じるヒトポリペプチド、マウスポリペプチド、又は任意の他の哺乳動物種由来のポリペプチドのアミノ酸配列を有しうる。

【 0 0 4 3 】

10

20

30

40

50

ここでの「抗体」なる用語は最も広義に使用され、特にモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、及びそれらが所望の生物活性を示す限り抗体断片を包含する。本発明はここに開示されたIBDマーカーの一又は複数に対する抗体を特に考慮する。かかる抗体は「抗IBDマーカー抗体」と称されうる。

ここで使用される「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す、すなわち、その集団を構成する個々の抗体が、モノクローナル抗体の生産中に生じ得、一般には少量で存在しうる可能な変異体を除いて、同一であり、及び/又は同じエピトープに結合する。かかるモノクローナル抗体には典型的には標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体が含まれ、ここで、標的結合ポリペプチド配列は複数のポリペプチド配列から単一の標的結合ポリペプチド配列を選択することを含む方法によって得られた。

10

【0044】

ここに記載のモノクローナル抗体は、特に、重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種から由来するか、特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一か相同である一方、鎖の残りが、他の種から由来するか、他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一か相同である「キメラ」抗体、並びにそれらが所望の生物活性を示す限りはその抗体の断片を含む（米国特許第4816567号；及びMorrison等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)）。ここで興味のあるキメラ抗体は、非ヒト霊長類（例えば旧世界ザル、類人猿等）由来の可変ドメイン抗原結合配列及びヒト定常領域配列を含む「プリマタイズ」抗体、並びに「ヒト化」抗体を含む。

20

非ヒト（例えば齧歯類）抗体の「ヒト化」型とは、非ヒト免疫グロブリンから誘導された最小配列を含むキメラ抗体である。大部分では、ヒト化抗体はレシピエントの高頻度可変領域由来の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類のような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）の高頻度可変領域由来の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。

【0045】

ここでの「インタクトな抗体」は二つの抗原結合領域とFc領域を含むものである。好ましくは、インタクトな抗体は機能性Fc領域を有する。

「抗体断片」は、好ましくはその抗原結合領域を含む、インタクトな抗体の一部を含む。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFv断片；ダイアボディ；直鎖状抗体；単鎖抗体分子；及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれる。

30

【0046】

「天然抗体」は、通常、2つの同一の軽(L)鎖及び2つの同一の重(H)鎖からなる約150000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は一つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合しており、ジスルフィド結合の数は、異なった免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で変化する。また各重鎖と軽鎖は、規則的に離間した鎖間ジスルフィド架橋を有している。各重鎖は、多くの定常ドメインが続く可変ドメイン(V_H)を一端に有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(V_L)を、他端に定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。

40

【0047】

「可変」なる用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の高頻度可変領域と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、3つの高頻度可変領域により連結されたシート配置を主にとる4つのFRをそれぞれ含んでいる。各鎖の高頻度可変領域は、

50

F R 領域に近接して結合され、他の鎖の高頻度可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat等, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)を参照)。

【 0 0 4 8 】

ここで使用される場合の「高頻度可変領域」、「H V R」又は「H V」なる用語は、配列において高頻度可変であり、及び/又は構造的に定まったループを形成する抗体可変ドメインの領域を意味する。一般に、抗体は6つのH V Rを含む;つまり、V Hに3つ(H 1、H 2、H 3)、V Lに3つ(L 1、L 2、L 3)である。天然の抗体では、H 3及びL 3は6つのH V Rの最大の多様性を示し、特にH 3は抗体に微細な特異性を付与するのに独特の役割を果たすと考えられている。例えばXu等, Immunity 13:37-45 (2000); John 10 son及びWu, Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo編, Human Press, Totowa, NJ, 2003)を参照。確かに、重鎖のみからなる天然に生じるラクダ抗体は軽鎖の不存在下で機能的で安定である。例えば、Hamers-Casterman等, Nature 363:446-448 (1993)及びSheriff等, Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996)を参照。

【 0 0 4 9 】

多数の高頻度可変領域の描写が使用され、ここに包含される。カバット相補性決定領域(C D R)は配列変化に基づいており、最も一般的に使用されている(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothiaは、代わりに構造的ループの位置に 20 言及している(Chothia及びLesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。カバット番号付け法を使用して番号付けした場合Chothia C D R - H 1ループは、ループの長さに応じてH 3 2とH 3 4の間(以下参照)で変化する(これは、カバット番号付けスキームはH 3 5 A及びH 3 5 Bに挿入を置き; 3 5 Aも3 5 Bも存在しないならば、ループは3 2で終わり; 3 5 Aだけが存在するならば、ループが3 3で終わり; 3 5 Aと3 3 Bが両方とも存在するならば、ループは3 4で終わるためである)。A b M高頻度可変領域は、カバットC D RとChothia構造的ループの間の妥協を表し、Oxford MolecularのA b M抗体モデリングソフトウェアにより使用される。「接触」高頻度可変領域は、利用できる複合体結晶構造の分析に基づく。これらの高頻度可変領域のそれぞれからの残基を以下に示す。

| ループ | カバット | A b M | Chothia | 接触 |
|-----|----------|----------|----------------|-----------------------|
| L1 | L24-L34 | L24-L34 | L24-L34 | L30-L36 |
| L2 | L50-L56 | L50-L56 | L50-L56 | L46-L55 |
| L3 | L89-L97 | L89-L97 | L89-L97 | L89-L96 |
| H1 | H31-H35B | H26-H35B | H26-H32,33又は34 | H30-H35B (Kabat番号付け) |
| H1 | H31-H35 | H26-H35 | H26-H32 | H30-H35 (Chothia番号付け) |
| H2 | H50-H65 | H50-H58 | H52-H56 | H47-H58 |
| H3 | H95-H102 | H95-H102 | H95-H102 | H93-H101 |

【 0 0 5 0 】

高頻度可変領域は次の通り「伸展高頻度可変領域」を含みうる: V L中の2 4 - 3 6 又は2 4 - 3 4 (L 1)、4 6 - 5 6又は5 0 - 5 6 (L 2)及び8 9 - 9 7 (L 3)と 40 、V H中の2 6 - 3 5 B (H 1)、5 0 - 6 5、4 7 - 6 5又は4 9 - 6 5 (H 2)及び9 3 - 1 0 2、9 4 - 1 0 2又は9 5 - 1 0 2 (H 3)。これらの伸展高頻度可変領域は典型的にはカバットの定義とChothiaの定義の組合せであり、場合によっては接触の定義を使用して同定される残基を更に含んでいてもよい。これらの定義の各々に対して上掲のKabat等に従って、可変ドメイン残基を番号付けした。

抗体のパパイン消化は、「F a b」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、各々が単一の抗原結合部位と、名前が容易に結晶化するその能力を反映する残留「F c」断片を有する。ペプシン処理は、2つの抗原結合部位を持ち、抗原になお架橋できるF (a b')₂断片を生じる。

【 0 0 5 1 】

10

20

30

40

50

「Fv」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、強固な非共有結合の一つの重鎖と一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。各可変ドメインの3つの高頻度可変領域が相互作用してV_H-V_L二量体の表面に抗原結合部位を形成するのはこの構造においてである。集団的には、6つの高頻度可変領域が抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン(又は抗原に特異的な3つの高頻度可変領域だけを含んでなるFvの半分)でさえ、結合部位全体よりは低い親和性ではあるが、抗原を認識しそれに結合する能力を有している。

Fab断片は軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常ドメイン(CH1)をまた含んでいる。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に2,3の残基が付加される点でFab断片とは異なる。Fab'-SHは、ここでは、定常ドメインのシステイン残基が少なくとも一つの遊離チオール基を担持しているFab'についての標記である。F(ab')₂抗体断片は、その間にヒンジシステインを有するFab'断片対として元々は生産された。抗体断片の他の化学的カップリングもまた知られている。

【0052】

任意の脊椎動物種由来の抗体の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ()及びラムダ()と呼ばれる二つの明確に区別される型を割り当てることができる。

ここでの「Fc領域」なる用語は、天然配列Fc領域及び変異体Fc領域を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変化するかも知れないが、通常、ヒトIgG重鎖Fc領域はCys226の位置又はPro230からそのカルボキシル末端までの位置のアミノ酸残基から伸長すると定義される。Fc領域のC末端リジン(EU番号付けシステムによれば残基447)は、例えば抗体の産生又は精製中に、又は抗体の重鎖をコードする核酸を組換え的に操作することによって、取り除かれてもよい。従って、インタクトな抗体の組成物は、全てのK447残基が除去された抗体群、K447残基が除去されていない抗体群、及びK447残基を有する抗体と有さない抗体の混合を含む抗体群を含む。

【0053】

別の定義が示されていないならば、ここでは、免疫グロブリン重鎖における残基の番号付けは、出典明示によりここに明示的に援用されるKabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)におけるようなEUインデックスのものである。「カバットにおけるようなEUインデックス」はヒトIgG1 EU抗体の残基番号付けを意味する。

「天然配列Fc領域」は、天然に見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。天然配列のヒトFc領域には、天然配列のヒトIgG1 Fc領域(非A-及びA-アロタイプ);天然配列のヒトIgG2 Fc領域;天然配列のヒトIgG3 Fc領域;及び天然配列のヒトIgG4 Fc領域;並びにその自然に生じる変異体が含まれる。

【0054】

「変異体Fc領域」は、少なくとも一のアミノ酸修飾、好ましくは一又は複数のアミノ酸置換により、天然配列のFc領域とは異なるアミノ酸配列を含む。好ましくは、変異体Fc領域は、天然配列のFc領域もしくは親ポリペプチドのFc領域と比較した場合、少なくとも一のアミノ酸置換、例えば、天然配列のFc領域又は親のポリペプチドのFc領域に約1から約10のアミノ酸置換、好ましくは約1から約5のアミノ酸置換を有する。ここでの変異体Fc領域は、天然配列のFc領域及び/又は親ポリペプチドのFc領域と好ましくは少なくとも約80%の相同性を有し、最も好ましくは少なくとも約90%の相同性を、より好ましくは少なくとも約95%の相同性を有するであろう。

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、インタクトな抗体は異なる「クラス」に分類できる。インタクトな抗体の五つの主要なクラス: IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、それらの幾つかは更に「サブクラス」(アイソタイプ)、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及びIgA2に分類される。抗体

10

20

30

40

50

の異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 μ 、 γ 、 α 、 δ 、 ϵ 、 κ 、 λ 、及び μ と呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び3次元構造はよく知られている。

【0055】

「一本鎖Fv」又は「scFv」抗体断片は、抗体の V_H 及び V_L ドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、Fvポリペプチドは、scFvが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にするポリペプチドリンカーを V_H 及び V_L ドメイン間に更に含む。scFvの概説については、Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照のこと。

10

「ダイアボディ」なる用語は、二つの抗原結合部位を持ち、その断片が同一のポリペプチド鎖($V_H - V_L$)内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に結合した重鎖可変ドメイン(V_H)を含む抗体断片を指す。非常に短いために同一鎖上で二つのドメイン間での対形成を可能にするリンカーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、二つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディは、例えば欧州特許出願公開第404097号；国際公開第93/11161号；及びHudson等, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)；及びHollinger等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)に更に十分に記載されている。

【0056】

「ネイキッド抗体」は、小分子又は放射標識等の異種分子にコンジュゲートされていない抗体である。

20

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、その抗体の研究、診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様では、抗体は、(1)ローリー法で測定して95重量%抗体を越えるまで、最も好ましくは99重量%を越えるまで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端又は内部アミノ酸配列を得るのに十分なほど、あるいは、(3)クーマシーブルー又は好ましくは銀染色を用いた還元又は非還元条件下でのSDS-PAGEにより均一になるまで、精製される。単離された抗体には、抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製される。

30

【0057】

「親和性成熟」抗体とは、その変更を有しない親抗体と比較し、抗原に対する抗体の親和性に改善を生じせしめる抗体の一又は複数の高頻度可変領域における一又は複数の変更を伴っている抗体である。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対してナノモル又はピコモルさへの親和性を有する。親和性成熟抗体は、当該分野において知られている手順を使用して生産される。Marks等 *Bio/Technology*, 10:779-783(1992)は、 V_H 及び V_L ドメインシャッフリングによる親和性成熟について記載している。HVR及び/又はフレームワーク残基のランダム突然変異誘発は、Barbas等, *Proc Nat Acad. Sci, USA* 91: 3809-3813(1994)；Schier等, *Gene*, 169:147-155(1995)；Yelton等, *J. Immunol.*, 155:1994-2004(1995)；Jackson等, *J. Immunol.*, 154(7):3310-9(1995)；及びHawkins等, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896(1992)に記載されている。

40

【0058】

ここでの「アミノ酸配列変異体」抗体は、主な種抗体と異なるアミノ酸配列を有する抗体である。通常、アミノ酸配列変異体は、主な種抗体と少なくとも約70%の相同性を有し、好ましくは、それらは主な種抗体と少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%の相同性である。アミノ酸配列変異体は、主な種抗体のアミノ酸配列内の、又は主な種抗体のアミノ酸配列に隣接した、所定の位置で置換、欠失及び/又は付加を有する。ここでのアミノ酸配列変異体の例には、酸性変異体(例えば脱アミド化された抗体変異

50

体)、塩基性変異体、抗体の一又は二の軽鎖上にアミノ末端リーダー伸展(例えばVHS-)を有する抗体、抗体の一又は二の重鎖上にC末端リジン残基を有する抗体などが含まれ、重鎖及び/又は軽鎖のアミノ酸配列に対する変異体の組合せが含まれる。ここで特に興味のある抗体変異体は、抗体の一又は二の軽鎖上にアミノ末端リーダー伸展を含み、場合によっては主な種抗体に対して他のアミノ酸配列及び/又はグリコシル化の相違を更に含んでなる抗体である。

【0059】

ここでの「グリコシル化変異体」抗体は、主な種抗体に結合した一又は複数の炭水化物部分と異なる一又は複数のそれに結合した炭水化物部分を有する抗体である。ここでのグリコシル化変異体の例には、そのFc領域に接着した、G0オリゴ糖構造の代わりにG1又はG2オリゴ糖構造を有する抗体、その一又は二の軽鎖に結合した一又は二の炭水化物部分を有する抗体、抗体の一又は二の重鎖に結合した炭水化物がない抗体等、及びグリコシル化変異の組合せを有する抗体が含まれる。

抗体がFc領域を有する場合、オリゴ糖構造は、例えば残基299(残基のEu番号付けでは298)で、抗体の一又は二の重鎖に結合していてもよい。パーツマップでは、G0が主要なオリゴ糖構造で、例えばG0-F、G-1、Man5、Man6、G1-1、G1(1-6)、G1(1-3)及びG2のような他のオリゴ糖構造はパーツマップ組成物中により少量で見出される。

特に明記しない限り、ここでの「G1オリゴ糖構造」にはG-1、G1-1、G1(1-6)及びG1(1-3)構造が含まれる。

【0060】

ここでの「アミノ末端リーダー伸展」は、抗体の何れか一又は複数の重鎖又は軽鎖のアミノ末端に存在するアミノ末端リーダー配列の一又は複数のアミノ酸残基を指す。例示的なアミノ末端リーダー伸展は、抗体変異体の一方又は両方の軽鎖に存在する3つのアミノ酸残基、VHSを含むか又はこれらからなる。

「脱アミド化」抗体は、その一又は複数のアスパラギン残基が、例えばアスパラギン酸、スクシンイミド又はイソ-アスパラギン酸に誘導体化されているものである。

【0061】

B.1 発明の一般的記載

本発明の実施には、別段の記載がない限り、当業者の技量の範囲内にある分子生物学(組換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学、及び免疫学の一般的な技術を使用する。かかる技術は、例えば“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2版(Sambrook等, 1989); “Oligonucleotide Synthesis” (M. J. Gait編, 1984); “Animal Cell Culture” (R. I. Freshney編, 1987); “Methods in Enzymology” (Academic Press, Inc.); “Handbook of Experimental Immunology”, 4版(D.M. Weir及びC.C. Blackwell編, Blackwell Science Inc., 1987); “Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells” (J.M. Miller及びM.P. Calos編, 1987); “Current Protocols in Molecular Biology” (F. M. Ausubel等編, 1987); 及び“PCR: The Polymerase Chain Reaction”, (Mullis等編, 1994)のような文献に十分に説明されている。

【0062】

上で検討されたように、IBDの検出又は診断は、患者に観察される多くの変量に依存する様々な分類システムによって現在は達成されている。本発明は、IBDに関連する遺伝子の同定に基づく。従って、かかる遺伝子の発現レベルは、IBDの患者を同定するための診断マーカーとなりうる。実施例に記載されているように、IBD患者における多くの遺伝子の発現差異が観察されている。よって、本発明によれば、表1A-B、2、及び3A-Bに列挙された遺伝子はIBDで差次的に発現されるものとして同定されている。

【0063】

表1AはIBDにおいてアップレギュレートされている遺伝子リストを提供する。

表 1 A

| 遺伝子 | 適応 | 配列番号 核酸, アミノ酸 | 図 |
|--|--------|------------------|------|
| デフェンシン, α 6 (DEFA6) | CD, UC | 1, 2 | 8 |
| デフェンシン α 5 (DEFA5) | UC | 3, 4 | 9A-B |
| デフェンシン β 14 (DEFB14) | UC | 229, 230 | 9C-D |
| IL-3 レセプター, α 低親和性 (IL3RA) | CD | 5, 6 | 10 |
| IL-2 レセプター, α (IL2RA) | CD, UC | 7, 8 | 11 |
| 再生膝島誘導 3 γ (REG3G) | CD, UC | 9, 10 | 12 |
| 再生膝島誘導 1 β 膵臓 ストーンタンパク質 (REG1B) | CD, UC | 11, 12 | 13 |
| カリウム電位依存性チャネル, Shal 関連サブファミリー (KCND3) | CD, UC | 13, 14 | 14 |
| ヒトマクロファージ炎症性タンパク質 3 (MIP-3a) | CD, UC | 15, 16 | 15 |
| 内皮細胞増殖因子 1 血小板由来 (ECGF1) | CD, UC | 17, 18 | 16 |
| インターロイキン 1 β (IL1B) | CD, UC | 19, 20 | 17 |
| 増殖調節タンパク質 γ (MIP2BGRO-g) | CD, UC | 21, 22 | 18 |
| ケモカイン C-X-C モチーフリガンド 1 (CXCL1) | CD, UC | 23, 24 | 19 |
| アポトーシスタンパク質 1 阻害剤 (IAP1) | CD, UC | 25, 26 | 20 |
| カスパーゼ 5, アポトーシス関連システインプロテアーゼ (CASP5) | CD, UC | 27, 28 | 21 |
| デリートイン悪性脳腫瘍 1 (DMBT1) | CD, UC | 29, 30 | 22 |
| プロトカドヘリン 17 (PCDH17) | CD, UC | 31, 32 | 23 |
| インターフェロン誘導性タンパク質 9-27 (IFITM1) | CD, UC | 33, 34 | 24 |
| PDZK1 相互作用タンパク質 1 (PDZK1IP1) | CD, UC | 35, 36 | 25 |
| IRTA2 / FCRH5 (IRTA2) | CD | 37, 38 | 26 |
| 溶質輸送体ファミリー 40 鉄調節トランスポーター, メンバー 1 (SLC40A1) | CD, UC | 39, 40 | 27 |
| 免疫グロブリン重可変 4-4 (IGHV4-4) | CD, UC | 41, 42 | 28 |
| 再生膝島誘導 3 γ (REG3G) | CD, UC | 43, 44 | 29 |
| アクアポリン 9 (AQP9) | CD, UC | 45, 46 | 30 |
| オルファクトメジン 4 (OLFM4) | CD, UC | 47, 48 | 31 |
| S100 カルシウム結合タンパク質 A9 カルグラニユリン B (S100A9) | CD, UC | 49, 50 | 32 |
| unc-5 ホモログ C C. エレガンス様 (UNC5CL) | CD, UC | 51, 52 | 33 |
| G タンパク質共役レセプター 110 (GPR110) | CD, UC | 53, 54 | 34 |
| HLA-G 組織適合抗原, クラス I, G (HLA-G) | CD, UC | 55, 56 | 35 |
| トランスポーター 1, ATP-結合カセット, サブファミリー B MDR/TAP (TAP1) | CD, UC | 57, 58 | 36 |
| ミトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼキナーゼ 8 (MAP3K8) | CD, UC | 59, 60 | 37 |
| ユビキチン D γ -アミノ酪酸 GABA B レセプター, 1 | CD, UC | 61, 62 | 38 |

10

20

30

40

| | | | |
|---|--------|----------|-----|
| (UBD GABBR1) | | | |
| DEAH Asp-Glu-Ala-Asp/His ボックスポリペプチド 57 (DHX57) | CD, UC | 63, 64 | 39 |
| 転移関連 (MA) LY6/PLAUR ドメイン含有 5 (LYPD5) | CD, UC | 65, 66 | 40 |
| 免疫グロブリン結合-定常/OR18 (IGLJCOR18) | CD, UC | 67, 68 | 41 |
| TNF R スーパーファミリー, メンバー 6b, デコイ (TNFRSF6B) | CD, UC | 69, 70 | 42 |
| 血清アミロイド A1 (SAA1) | CD, UC | 71, 72 | 43 |
| トランスポーター 2, ATP-結合カセット, サブファミリー B MDR/TAP (TAP2) | CD, UC | 73, 74 | 44 |
| PCAA17448 | CD, UC | 75, 76 | 45 |
| リポカリン 2 オンコジーン 24p3 (LCN2) | CD, UC | 77, 78 | 46 |
| Z-D 結合タンパク質 1 (ZBP1) | CD, UC | 79, 80 | 47 |
| TNFAIP3 相互作用タンパク質 3 (TNIP3) | CD, UC | 81, 82 | 48 |
| Zn フィンガー CCCH-タイプ含有 12A (ZC3H12A) | CD, UC | 83, 84 | 49 |
| チキナーゼ 3-様 1 軟骨糖タンパク質-39 (CHI3L1) | CD, UC | 85, 86 | 50 |
| IgG Fc 断片, 低親和性 IIIa, レセプター CD16a (FCGR3A) | CD, UC | 87, 88 | 51 |
| 無菌 α モチーフドメイン含有 9-様 (SAMD9L) | CD, UC | 89, 90 | 52 |
| マトリックスメタロプロテイナーゼ 9 ゼラチナーゼ B, 92kDa ゼラチナーゼ, 92kDa タイプ IV コラゲナーゼ (MMP9) | CD | 91, 92 | 53 |
| マトリックスメタロプロテイナーゼ 7 マトリライシン, 子宮 (MMP7) | CD, UC | 93, 94 | 54 |
| B-因子プロパージン (BF) | CD, UC | 95, 96 | 55 |
| S100 カルシウム結合タンパク質 P (S100P) | CD, UC | 97, 98 | 56 |
| 増殖調節タンパク質 (GRO) | CD, UC | 99, 100 | 57 |
| インドールアミン-ピロール 2,3 ジオキシゲナーゼ INDO (INDO) | CD, UC | 101, 102 | 58 |
| 三者間モチーフ含有 22 (TRIM22) | CD, UC | 103, 104 | 59 |
| 血清アミロイド A2 (SAA2) | CD, UC | 105, 106 | 60 |
| アレクチンドメイン含有 5 (ARRDC5) (LOC342959) | CD, UC | 193, 194 | 110 |
| アタキシン 3 様 (ATXN3L) (A_24_P910246) | CD, UC | 195 | 111 |
| 卵胞刺激ホルモンレセプター (FSHR) (LOC92552) | CD, UC | 196, 197 | 112 |
| 血小板由来増殖因子レセプター, α ポリペプチド (PDGFRA) | CD, UC | 198, 199 | 113 |
| トランスフォーミング増殖因子 β 3 (TGFB3) | CD, UC | 200, 201 | 114 |
| カリウムチャンネル 四量体化ドメイン含有 8 (KCTD8) | CD, UC | 202, 203 | 115 |
| トランスグルタミナーゼ 4 (TGM4) | CD, UC | 204, 205 | 116 |
| TPD52L3 腫瘍タンパク質 D52 様 3 (NYD-SP25) | CD, UC | 206, 207 | 117 |

10

20

30

40

| | | | |
|---|--------|----------|------|
| misc_RNA (C3orf53) (FLJ33651) | CD, UC | 208 | 118 |
| 染色体 10 の EMX2 逆ストランド (非タンパク質コード) (EMX2OS) | CD, UC | 209 | 119A |
| S100A8 | UC | 231, 232 | 130 |
| CCL20 | UC | 233, 234 | 131 |

【 0 0 6 4 】

表 1 B は I B D においてダウンレギュレートされている遺伝子リストを提供する。

10

| 遺伝子 | 適応 | 配列番号 核酸, アミノ酸 | 図 |
|---|--------|------------------|-----|
| シアリダーゼ 4 (NEU4) | CD, UC | 107, 108 | 61 |
| 無翅タイプ MMTV 組込み部位ファミリー, メンバー 16 (WNT16) | CD, UC | 210, 211 | 120 |
| スプラウティ関連, EVH1 ドメイン含有 2 (SPRED2) | CD, UC | 212, 213 | 121 |
| 染色体 16 オープンリーディングフレーム 65 (C16orf65) (MGC50721) | CD, UC | 214, 215 | 122 |
| 染色体 12 オープンリーディングフレーム 2 (C12orf2) | CD, UC | 216, 217 | 123 |
| 多重 PDZ ドメインタンパク質 (MPDZ) | CD, UC | 218, 219 | 124 |
| フェニルアラニン-tRNA シンテターゼ 2 (FARS2) | CD, UC | 220, 221 | 125 |
| カスパーゼ 8, アポトーシス関連システイン プロテアーゼ (CASP8) | CD, UC | 222, 223 | 126 |
| 5'-ヌクレオチダーゼ, エクト (CD73)(NT5E) | CD, UC | 224, 225 | 127 |
| テラトカルシノーマ由来増殖因子 3 (TDGF3) | CD, UC | 226 | 128 |
| ブチロフィリン様 3 (BTNL3) | CD, UC | 227, 228 | 129 |

20

30

【 0 0 6 5 】

表 2 は I B D においてアップレギュレートされている遺伝子リストを提供する。これらの遺伝子は遺伝子の免疫応答インシリコ (I R I S) コレクションから同定された(その全体を出典明示によりここに援用するAbbas, A.等Genes and Immunity, 6:319-331 (2005))。

表 2

| 遺伝子 | 適応 | 配列番号 核酸, アミノ酸 | 図 |
|---|--------|------------------|----|
| 免疫グロブリンドメイン IRTA2/FCRH5 | CD, UC | 109, 110 | 62 |
| 免疫グロブリン λ 結合-定常/OR18 (IGLJCOR18) | CD, UC | 111, 112 | 63 |
| 免疫グロブリン重可変 4-4 (IGHV4-4) | CD, UC | 113, 114 | 64 |
| マトリックスメタロプロテイナーゼ 9 ゼラチナーゼ B, 92kDa ゼラチナーゼ, 92kDa タイプ IV コラゲナーゼ (MMP9) | CD, UC | 115, 116 | 65 |
| 増殖調節タンパク質 (GRO) | CD, UC | 117, 118 | 66 |
| 増殖調節タンパク質 γ (MIP2BGRO-g) | CD, UC | 119, 120 | 67 |
| インターロイキン 1, β (IL1B) | CD, UC | 121, 122 | 68 |
| IL-3 レセプター, α 低親和性 (IL3RA) | CD, UC | 123, 124 | 69 |
| カスパーゼ 1, アポトーシス関連システインプロテアーゼインターロイキン 1, β , コンバターゼ (CASP1) | CD, UC | 125, 126 | 70 |
| Bv8 タンパク質 (BV8) | CD, UC | 127, 128 | 71 |

10

20

【 0 0 6 6 】

表 3 A は I B D においてアップレギュレートされており、実施例 2 に記載した実験に基づいて同定された遺伝子リストを提供する。幾つかの例では、遺伝子の遺伝子座 / 染色体が与えられている。

30

表 3 A

| 遺伝子 | 適応 | 遺伝子座／染色体(知られている場合) | 配列番号 核酸, アミノ酸 | 図 |
|----------|----|--------------------|------------------|----|
| HDAC7A | UC | IBD2/12 | 129, 130 | 72 |
| ACVRL1 | UC | IBD2/12 | 131, 132 | 73 |
| NR4A1 | UC | IBD2/12 | 133, 134 | 74 |
| K5B | UC | IBD2/12 | 135, 136 | 75 |
| SILV | UC | IBD2/12 | 137, 138 | 76 |
| IRAK3 | UC | IBD2/12 | 139, 140 | 77 |
| IL-4 | UC | IBD5/5 | 141, 142 | 78 |
| IL-13 | UC | IBD5/5 | 143, 144 | 79 |
| RAD50 | UC | IBD5/5 | 145, 146 | 80 |
| IL-5 | UC | IBD5/5 | 147, 148 | 81 |
| IRF1 | UC | IBD5/5 | 149, 150 | 82 |
| PDLIM4 | UC | IBD5/5 | 151, 152 | 83 |
| CSF2 | UC | IBD5/5 | 153, 154 | 84 |
| IL-3 | UC | IBD5/5 | 155, 156 | 85 |
| MMP3 | UC | | 157, 158 | 86 |
| IL-8 | UC | | 159, 160 | 87 |
| TLR4 | UC | | 161, 162 | 88 |
| HLA-DRB1 | UC | | 163, 164 | 89 |
| MMP19 | UC | | 165, 166 | 90 |
| TIMP1 | UC | | 167, 168 | 91 |
| Elfin | UC | | 169, 170 | 92 |
| CXCL1 | UC | | 171, 172 | 93 |

10

20

30

【 0 0 6 7 】

表 3 B は I B D においてダウンレギュレートされており、実施例 2 に記載した実験に基づいて同定された遺伝子リストを提供する。幾つかの例では、遺伝子の遺伝子座／染色体が与えられている。

表 3 B

| 遺伝子 | 適応 | 遺伝子座／染色体 | 配列番号 核酸, アミ ノ酸 | 図 |
|-------------------------------|----|----------|----------------------|-----|
| DFKZP586A0522 | UC | IBD2/12 | 173, 174 | 94 |
| SLC39A5 | UC | IBD2/12 | 175, 176 | 95 |
| GLI-1 | UC | IBD2/12 | 177, 178 | 96 |
| HMGA2 | UC | IBD2/12 | 179, 180 | 97 |
| SLC22A5 | UC | IBD5/5 | 181, 182 | 98 |
| SLC22A4 | UC | IBD5/5 | 183, 184 | 99 |
| P4HA2 | UC | IBD5/5 | 185, 186 | 100 |
| TSLP | UC | | 187, 188 | 101 |
| チューブリン α 5/ α 3 | UC | | 189, 190 | 102 |
| チューブリン α 6 | UC | | 191, 192 | 103 |

10

【 0 0 6 8 】

a . 発明のバイオマーカー

20

本発明は表 1 A、1 B、2、3 A、及び 3 B に列挙された I B D に対する数多くの遺伝子発現マーカー又はバイオマーカーを提供する。本発明の一実施態様では、バイオマーカーは（ここに記載の）マーカーパネルでの使用に適している。かかるパネルは、表 1 A からの一又は複数のマーカー；表 1 B からの一又は複数のマーカー；表 2 からのマーカー；表 3 A からの一又は複数のマーカー；及び表 3 B からの一又は複数のマーカーを含みうる。加えて、本発明はまた表 1 A、1 B、2、3 A、及び 3 B の二以上から選択されたマーカーのパネルを考慮する。例えば、パネルは、表 1 A からの一又は複数のマーカーと表 1 B からの一又は複数のマーカー；又は表 1 A からの一又は複数のマーカーと表 2 からのマーカー；又は表 1 B からの一又は複数のマーカーと表 2 からのマーカー；又は表 1 A からの一又は複数のマーカーと表 3 A からの一又は複数のマーカー等々を含むかもしれない。当業者であれば、ここに記載のパネルで使用するのに適した表 1 - 3 からのバイオマーカーの様々な組合せが分かるであろう。

30

【 0 0 6 9 】

本発明の一実施態様では、マイクロアレイ解析によって同定される I B D マーカーの好ましいセットは、I B D においてアップレギュレートされるマーカーを含む。好ましくは、アップレギュレートされるマーカーのセットは、表 1 A における D E F A 5（配列番号：3 - 4）、D E F A 6（配列番号：1 - 2）、T N I P 3（配列番号：8 1 - 8 2）、R E G 3 -（配列番号：9 - 1 0）、M M P 7（配列番号：9 3 - 9 4）、及び S A A 1（配列番号：7 1 - 7 2）；及び表 3 A における I L - 8（配列番号：1 5 9 - 1 6 0）、K e r a t i n 5 B（K 5 B）（配列番号：1 3 5 - 1 3 6）、S L C 2 2 A 4（配列番号：1 8 3 - 1 8 4）、S L C 2 2 A 5（配列番号：1 8 1 - 1 8 2）、M M P 3（配列番号：1 5 7 - 1 5 8）、及び M M P 1 9（配列番号：1 6 5 - 1 6 6）を含む。好ましいダウンレギュレートされるマーカーは、表 3 B 中の G L I - 1（配列番号：1 7 5 - 1 7 6）である。ここに記載のバイオマーカーのパネルは、これらのマーカーの一つ、二以上、又は全てを含む。あるいは、マーカーセットは、表 1 A からの表示マーカーの 1、2、3、4、5、6、及び / 又は表 3 A からの表示マーカーの 1、2、3、4、5、6 及び / 又は表 3 B の表示マーカーの 1 又は 2 を含む。

40

【 0 0 7 0 】

上に提供されたリストのメンバーは、単一のマーカーとして又は任意の組合せで、本発明の予後及び診断アッセイに使用するのに好ましい。本発明の I B D マーカーは差次的に

50

発現された遺伝子又は遺伝子の領域である。哺乳動物被検者からの試験試料中のコントロールに対する一又は複数のマーカーの発現のレベル差は、以下に更に詳細に記載する方法の一又は複数によって検出されるRNA転写物又は発現産物のレベルから決定することができる。

正常細胞及びIBDの哺乳動物被検者からの細胞におけるRNA転写物の発現差異のエビデンスに基づいて、本発明はIBDのための遺伝子マーカーを提供する。本発明によってもたらされるIBDマーカーと関連した情報によって、医師はより賢明な処置の決定をなし、個々の患者の必要性に対してIBDの治療をあつらえ、それによって治療の恩恵を最大にし、有意な恩恵を提供せず毒性の副作用による深刻な危険性をしばしばもたらす不要な治療に患者を暴露することを最小にする。

10

【0071】

多重分析物遺伝子発現試験は、幾つかの関連する生理プロセス又は成分細胞性特性の各々に関与する一又は複数の遺伝子の発現レベルを測定することができる。ある例では、試験の予測力と従ってその有用性は、個々の遺伝子の発現値よりも結果に高度に相関するスコアを計算するために個々の遺伝子に対して得られた発現値を使用することによって改善できる。例えば、エストロゲン受容体陽性でリンパ節陰性の乳癌の再発の可能性を予測する定量スコア（再発スコア）の計算は米国特許出願公開第20050048542号に記載されている。そのような再発スコアを計算するために使用される等式は再発スコアの予測値を最大にするために遺伝子をグループ化する場合がある。遺伝子のグループ化は、上で検討されたような生理機能又は成分細胞性特性へのその寄与の知識に少なくとも部分的に基づいて実施されうる。グループの形成はまた様々な発現値の再発スコアに対する寄与の数学的重み付けを容易にしうる。生理学的プロセス又は成分細胞性特性を表す遺伝子群の重み付けは、IBDの病理及び臨床的結果に対するそのプロセス又は特性の寄与を反映しうる。従って、重要な態様では、本発明はまた併せて個々の遺伝子又は同定された遺伝子のランダムな組合せよりも更に信頼性があり強力な結果の予測指標であるここで同定される遺伝子の特定の群を提供する。

20

【0072】

また、再発スコアの決定に基づいて、再発スコアの特定の値で患者をサブグループに分割するよう選択することができ、ここで、与えられた範囲に値を有する全ての患者を特定のリスクグループに属するものとして分類できる。よって、選択される値がそれぞれより大なる又は小なるリスクを持つ患者のサブグループを定めるであろう。

30

IBDの発症又は進行の予測における遺伝子マーカーの有用性はそのマーカーに独特なものでなくともよい。特定の試験マーカーと非常に類似した発現パターンを有する代替マーカーを試験マーカーに置換するか又は試験マーカーに加えて使用することができ、試験の全体的な予測上の有用性に影響は殆どない。二つの遺伝子の非常に類似した発現パターンは、特定のプロセスにあり、及び/又は共通の調節コントロール下にある双方の遺伝子の関連から生じうる。本発明は、本発明の方法でのそのような代替遺伝子又は遺伝子セットの使用を含み、また考える。

IBDの発症及び/又は進行を予測する本発明によって提供されるマーカー及び関連情報はまたIBDの患者の治療のための薬剤化合物の効能を試験する臨床試験に含める患者をスクリーニングする際に有用性を有している。

40

【0073】

IBDの存在、発症及び/又は進行を予測する本発明によって提供されるマーカー及び関連情報は、IBD治療が適切かどうかを決定するための基準として有用である。例えば、試験の結果が、IBDマーカーがコントロール試料に対して個体からの試験試料で差次的に発現されることを示している場合、IBD治療が適切でありうる。個体は、IBDであることが知られていない個体、IBDであることが知られている個体、IBDであると過去に診断されIBDの治療を受けている個体、又はIBDであると過去に診断されIBDに立ち向かうために手術をした個体でありうる。また、本発明はIBDを治療する方法を考える。以下に記載のように、本発明の診断方法は、一又は複数のIBDマーカーの発

50

現差異がコントロールに対して観察された試験試料を提供した哺乳動物被検者にIBD治療剤を投与する工程を更に含む。かかる治療方法はよって(a)哺乳動物被検者におけるIBDの存在を決定し、(b)哺乳動物被検者にIBD治療剤を投与することを含む。

他の実施態様では、IBDマーカー及び関連する情報は、遺伝子の転写物又はその発現産物のレベル又は活性を調節する試薬を設計し又は製造するために使用される。上記試薬には、限定しないが、アンチセンスRNA、低分子阻害性RNA(s i RNA)、リボザイム、モノクローナル又はポリクローナル抗体が含まれる。更なる実施態様では、上記遺伝子又はその転写物、又はより特定的には上記転写物の発現産物は薬剤化合物を同定する(スクリーニング)アッセイにおいて使用され、ここで、上記薬剤化合物はIBDを治療するための薬剤の開発において使用される。

本発明の様々な実施態様では、以下に記載される様々な技術的アプローチ法が、開示された遺伝子の発現レベルの決定に利用できる。特定の実施態様では、各遺伝子の発現レベルは、エキソン、イントロン、タンパク質エピトープ及びタンパク質活性を含む遺伝子の発現産物の様々な特徴に関して決定される。他の実施態様では、遺伝子の発現レベルは、遺伝子の構造の解析から、例えば遺伝子のプロモーターのメチル化パターンの解析から推量される。

【0074】

b. 発明の診断方法

本発明はIBDマーカーの発現差異に基づき哺乳動物被検者におけるIBDを検出又は診断する方法を提供する。一実施態様では、該方法は上で検討されたIBDマーカーのパネルの使用を含む。パネルは表1-3から選択される一又は複数のIBDマーカーを含む。

ある実施態様では、IBDマーカーのパネルは、少なくとも1のIBDマーカー、少なくとも2のIBDマーカー、少なくとも3のIBDマーカー、少なくとも4のIBDマーカー、少なくとも5のIBDマーカー、少なくとも6のIBDマーカー、少なくとも7のIBDマーカー、少なくとも8のIBDマーカー、少なくとも9のIBDマーカー、少なくとも10のIBDマーカー、少なくとも11のIBDマーカー、少なくとも12のIBDマーカー、少なくとも13のIBDマーカー、少なくとも14のIBDマーカー、少なくとも15のIBDマーカー、少なくとも16のIBDマーカー、少なくとも17のIBDマーカー、少なくとも18のIBDマーカー、少なくとも19のIBDマーカー、又は少なくとも20のIBDマーカーを含むであろう。一実施態様では、パネルは5の増分でマーカーを含む。他の実施態様では、パネルは10の増分でマーカーを含む。該パネルは、コントロールに対してIBDにおいて過剰発現されるIBDマーカー、コントロールに対してIBDにおいて過小発現されるIBDマーカー、又はコントロールに対してIBDにおいて過剰発現及び過小発現の双方が生じるIBDマーカーを含む。好ましい実施態様では、該パネルは、CDにおいてアップレギュレートされた一又は複数のマーカーと、CDにおいてダウンレギュレートされた一又は複数のマーカーを含む。他の好ましい実施態様では、該パネルは、UCにおいてアップレギュレートされた一又は複数のマーカーと、UCにおいてダウンレギュレートされた一又は複数のマーカーを含む。

【0075】

他の実施態様では、本発明のパネルは、コントロールに対して活動的IBDにおいて過剰発現されるIBDマーカー、コントロールに対して活動的IBDにおいて過小発現されるIBDマーカー、又はコントロールに対して活動的IBDにおいて過剰発現及び過小発現の双方が生じるIBDマーカーを含む。他の実施態様では、本発明のパネルは、本発明のパネルは、コントロールに対して非活動的IBDにおいて過剰発現されるIBDマーカー、コントロールに対して非活動的IBDにおいて過小発現されるIBDマーカー、又はコントロールに対して非活動的IBDにおいて過剰発現及び過小発現の双方が生じるIBDマーカーを含む。好ましい実施態様では、活動的IBDはCDである。他の好ましい実施態様では、非活動的IBDはCDである。

好ましい実施態様では、哺乳動物被検者においてIBDの存在を診断又は検出する方法は、被検者から得られた試験試料中のIBDマーカーのパネルからのRNA転写物又はその発現産物の、コントロールにおける発現レベルに対する発現レベル差を決定することを含み、ここで、発現レベルの差が、試験試料が得られた被検者におけるIBDの存在を示している。試験試料中の発現差異は、ここで検討されたようにコントロールに対して高い及び/又は低いものでありうる。

【0076】

コントロールに対して、患者から得られた生物学的試料中の上記リストに提供された遺伝子の一又は複数の発現又は活性の差が患者におけるIBDの存在を示している。コントロールは、例えば、IBD患者においてアップレギュレート（又はダウンレギュレート）されることが知られている同じ細胞中に存在する遺伝子（ポジティブコントロール）でありうる。あるいは、又は加えて、コントロールは、同じ細胞型の正常細胞中の同じ遺伝子（ネガティブコントロール）の発現レベルでありうる。発現レベルは、例えばグリセルアルデヒド-3-ホスフェート-デヒドロゲナーゼ（GAPDH）及び/又は α -アクチンのようなハウスキーピング遺伝子の発現レベルに、あるいは試験された試料中の全ての遺伝子の発現レベルに正規化することがまたできる。一実施態様では、上述の遺伝子の一又は複数の発現は、それが例えば同じ型の他の試料と比較して中央値以上ならばポジティブな発現と見なされる。中央値発現レベルは遺伝子発現の測定と本質的に同時に決定することができるか、又はこれまでのようにして決定されうる。これら及び他の方法は当該分野でよく知られており、当業者には明らかである。

IBD患者を同定するための方法がここに提供される。この患者集団のうち、IBDの患者は、患者から得られた細胞を含む生物学的試料中における遺伝子、対応するRNA分子又はコード化タンパク質の一又は複数の発現レベルを決定することによって同定することができる。生物学的試料は、例えばここに記載された組織生検でありうる。

【0077】

本発明の方法は、IBD診断アッセイ及びイメージング方法に関する。一実施態様では、アッセイは、ここに記載された抗体を使用して実施される。本発明はまたタンパク質の検出及び定量のために有用な様々な免疫学的アッセイを提供する。これらのアッセイは、限定しないが、様々なタイプのラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、酵素結合免疫蛍光アッセイ（ELIFA）等を含む当該分野でよく知られた様々な免疫学的アッセイ様式で実施される。また、限定しないが、標識された抗体を使用する放射シンチグラフィイメージング法を含むここに記載された分子の発現によって特徴付けられるIBDを検出可能な免疫学的なイメージング法がまた本発明によって提供される。かかるアッセイは、ここに記載された一又は複数の分子の発現によって特徴付けられるIBDの検出、モニター、診断及び予後に臨床的に有用である。

本発明の他の態様は、ここに記載された分子を発現する細胞を同定するための方法に関する。ここに記載の分子の発現プロファイルは、それをIBDに対する診断マーカーにする。従って、分子の発現の状態は、疾患の進行段階の罹患率、進行速度、及び/又は活動的IBD又は非活動的IBDにおける徴候の突然で深刻な発症、つまり突然の再発を含む様々な因子を予測するのに有用な情報を提供する。

【0078】

一実施態様では、本発明はIBDを検出する方法を提供する。哺乳動物被検者からの試験試料と既知の正常な哺乳動物からのコントロール試料がそれぞれ抗IBDマーカー抗体又はその断片に接触させられる。IBDマーカーの発現レベルが測定され、コントロール試料に対する試験試料中の発現レベルの差が、試験試料が得られた哺乳動物被検者におけるIBDを示すものである。ある実施態様では、試験試料中におけるIBDマーカー発現のレベルは、コントロールにおける発現のレベルよりも高いことが決定され、高い発現レベルが、試験試料が得られた被検者におけるIBDの存在を示す。他の実施態様では、試験試料中におけるIBDマーカー発現のレベルは、コントロールにおける発現のレベルよりも低いことが決定され、低い発現レベルが、試験試料が得られた被検者におけるIBD

の存在を示す。

他の実施態様では、本発明の方法によって検出されるIBDは、哺乳動物被検者におけるIBDの再発又は突然の再発である。

【0079】

好ましい実施態様では、該方法は、薬剤療法又は外科手術ようなIBDの治療を受けたIBDと過去に決定された哺乳動物被検者においてIBDの突然の再発又はIBDの再発を検出するために用いられる。IBDの最初の検出後に、更なる試験試料を、IBDとなっていることが見出された哺乳動物被検者から得てもよい。更なる試料は、最初の試料が取られた後、数時間後、数日後、数週間後、又は数ヶ月後に得ることができる。当業者であれば、第二、第三、第四、第五、第六等の試験試料を含みうるかかる更なる試料を得るために適切なスケジュールは分かるであろう。最初の試験試料と更なる試料（及び代わりにここに記載されたコントロール試料）が抗IBDマーカー抗体と接触させられる。IBDマーカーの発現レベルを測定し、最初の試験試料と比較した更なる試験試料中の発現レベルの差が、試験試料が得られた哺乳動物被検者におけるIBDの突然の再発又は再発を示すものである。

10

【0080】

一態様では、本発明の方法は決定工程に関する。一実施態様では、決定工程は、コントロールに対しての試験試料中の一又は複数のIBDマーカーの発現レベルを測定することを含む。典型的には、ここに記載されたように、IBDマーカーの発現レベルの測定は、ここに記載された技術の一又は複数を実施することにより、コントロールに対してIBDマーカーの発現差異について試験試料を分析することを含む。試験試料とコントロールから得られた発現レベルデータを、発現レベル差について比較する。他の実施態様では、決定工程は、試験試料が得られた被検者にIBDが存在しているかどうかを評価するための試験試料及びコントロール発現データの検査を更に含む。

20

ある実施態様では、決定工程は、(i)試験試料及びコントロールにおけるIBDマーカーの発現レベル差を測定し；及び/又は(ii)試験試料及びコントロールにおけるIBDマーカーの発現レベル差の測定から得られるデータを分析する目的で、適切なプロセッサによって実行されるソフトウェアプログラムの使用を含む。適切なソフトウェア及びプロセッサはよく知られており、商業的に入手できる。該プログラムは、有形媒体、例えばCD-ROM、フロッピーディスク、ハードドライブ、DVD、又はプロセッサに伴うメモリーに保存したソフトウェアで具体化できるが、当業者ならば、プログラム全体又はその一部をプロセッサ以外の装置で実行し、及び/又はよく知られた形でファームウェア及び/又は専用のハードウェアで具現化できることを直ぐに理解するであろう。

30

【0081】

決定工程後、測定結果、所見、診断、予想及び/又は推奨治療が典型的には記録され、例えば技師、医師及び/又は患者に伝えられる。ある実施態様では、コンピュータを使用して、患者及び/又は担当医師のような関係者にそのような情報を伝える。ある実施態様では、結果又は診断が伝えられる国又は管轄区域とは異なる国又は管轄区域で、アッセイが実施され又はアッセイ結果が解析される。

40

好ましい実施態様では、ここでのIBDマーカーの一又は複数をもつ被検者において測定されたここに開示された一又は複数のIBDマーカーの発現レベルに基づく診断、予測及び/又は推奨治療は、アッセイが完了し、診断及び/又は予測が作成された後に出来るだけ早く被検者に伝えられうる。結果及び/又は関連情報は、被検者を治療する医師によって被検者に伝えられうる。あるいは、結果は、書面、伝達の電子形態、例えば電子メール、又は電話を含む任意の伝達手段によって被検者に直接伝えることができる。伝達は、電子メール通信の場合におけるように、コンピュータの使用により容易にすることができる。ある実施態様では、診断試験の結果及び/又は導かれた結論及び/又は試験に基づく治療の推奨を含む伝達を作成され、テレコミュニケーションの熟練した技術者にはよく知られているコンピュータハードウェア及びソフトウェアの組合せを使用して被検者に自

50

動的に配信されうる。ヘルスケア向けのコミュニケーションシステムの一例は米国特許第6283761号に記載されている；しかしながら、本発明はこの特定のコミュニケーションシステムを利用する方法に限られるものではない。本発明の方法のある実施態様では、試料のアッセイ、疾患の診断、及びアッセイ結果又は診断の伝達を含む方法工程の全て又は一部が異なった（例えば外国の）管轄区域で実施されうる。

【0082】

本発明は、限定しないが、上行結腸組織、下行結腸組織、S状結腸組織、及び回腸末端組織を含む胃腸管に関連した組織におけるIBDマーカーの発現差異と血清、精液、骨、前立腺、尿、細胞調製物等のような他の生物学的試料における発現も検出するためのアッセイを提供する。IBDマーカーの発現差異を検出するための方法はまたよく知られており、例えば免疫沈降、免疫組織化学分析、ウェスタンブロット分析、分子結合アッセイ、ELISA、ELIFA等を含む。例えば、生物学的試料中のIBDマーカーの発現差異を検出する方法は、最初に試料を抗IBDマーカー抗体、そのIBDマーカー反応性断片、又は抗IBDマーカー抗体の抗原結合領域を含む組換えタンパク質に接触させ；ついで試料中のIBDマーカータンパク質の結合を検出することを含む。

本発明の様々な実施態様では、限定しないが、RT-PCR、マイクロアレイ、遺伝子発現の連続解析(SAGE)及びMassively Parallel Signature Sequencing(MPSS)による遺伝子発現解析(以下に詳細に検討する)を含む様々な技術的アプローチが、開示された遺伝子の発現レベルの決定に利用できる。特定の実施態様では、各遺伝子の発現レベルは、エキソン、イントロン、タンパク質エピトープ及びタンパク質活性を含む遺伝子の発現産物の様々な特徴に関連して決定れうる。他の実施態様では、遺伝子の発現レベルは、遺伝子の構造解析から、例えば遺伝子プロモータのメチル化パターンの解析から推定されうる。

【0083】

c. 発明の治療方法

本発明は、ここに記載の診断方法によって哺乳動物被検者におけるIBDの存在を検出し、ついで該哺乳動物被検者にIBD治療剤を投与することを含む治療を必要とする被検者においてIBDを治療する方法を提供する。当業者であれば、本発明での使用に適しているであろう様々なIBD治療剤を把握できる(その全体を出典明示によりここに援用するSt Clair Jones, Hospital Pharmacist, May 2006, Vol. 13; pages 161-166を参照)。本発明は治療を必要とする被検者に一又は複数のIBD治療剤が投与されるIBDの治療方法を考慮する。一実施態様では、IBD治療剤は、アミノサリチル酸、副腎皮質ステロイド、及び免疫抑制剤の一又は複数である。好ましい実施態様では、アミノサリチル酸は、スルファサラジン、オルサラジン、メサラミン、バルサラジド、及びアサコールの一つである。他の好ましい実施態様では、例えばスルファサラジンとオルサラジンの組合せのような複数のアミノサリチル酸類が同時投与される。他の好ましい実施態様では、副腎皮質ステロイドは、ブデソニド、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、6-メルカプトプリン(6-MP)、アザチオプリン、メトトレキセート、及びシクロスポリンでありうる。他の好ましい実施態様では、IBD治療剤は抗生物質、例えばシプロフロキサシン及び/又はメトロニダゾール；又は抗体ベースの薬剤、例えばインフリキシマブ(レミケード(登録商標))でありうる。

【0084】

患者が典型的に治療される毒性が最小のIBD治療剤はアミノサリチル酸類である。典型的には一日4回投与されるスルファサラジン(アザルフィジン)は、スルファピリジンにアゾ結合によって結合されるアミノサリチル酸(5-ASA)の活性分子からなる。結腸中の嫌気性菌がアゾ結合を分裂させて活性な5-ASAを放出する。しかしながら、少なくとも20%の患者は、可逆性精子異常、胃腸障害又はスルファ成分に対するアレルギー反応のような顕著な副作用が伴うため、スルファピリジンに耐えることができない。これらの副作用はオルサラジンを摂る患者では低減される。しかしながら、スルファサラジンもオルサラジンも何れも小腸炎症の治療に効果的ではない。小腸に放出される5-ASA

の他の製剤（例えばメサラミン及びアサコール）が開発されている。通常は、5 - A S A 治療法が十分な効能を示すのに6 - 8週かかる。5 - A S A 治療法に应答しない患者又はより重篤な疾患を持つ患者には、副腎皮質ステロイド類が処方される。しかしながら、これは、短期の治療法であり、維持療法として使用することはできない。臨床的寛解が副腎皮質ステロイドを用いて2 - 4週内で達成されるが、副作用が顕著であり、クッシングゴールドフェース(Cushing goldface)、顔ひげ、深刻な気分変動及び不眠を含む。スルファサラジン及び5-アミノサリチル酸調製物への应答はC Dでは乏しく、初期の潰瘍性大腸炎ではまずまずから中程度で、重篤なU Cでは乏しい。これらの薬剤が失敗した場合、強力な免疫抑制剤、例えばシクロスポリン、プレドニゾン、6 - メルカプトプリン又はアザチオプリン（肝臓において6 - メルカプトプリンに転換）が典型的には試される。C Dの患者に対しては、副腎皮質ステロイド類及び他の免疫抑制剤の使用は、この疾患にありふれた瘻孔及び膿瘍に由来する腹部内敗血症の高いリスクのため、注意深くモニターされなければならない。およそ25%のI B D患者が疾患の過程で手術（結腸切除術）を必要とする。

10

【0085】

I B Dの治療は、限定しないが、腸切除術、吻合術、結腸切除術、直腸結腸切除術、及び造瘻術、又はその任意の組合せを含む外科手技を含みうる。

薬学的医薬及び手術に加えて、栄養療法のようなI B Dに対する非常套的な治療法もまた試みられている。例えば、Flexical（登録商標）という半成分的処方物が、ステロイドのプレドニゾンと同じ効果を有することが示されている。Sanderson等、Arch. Dis. Child. 51:123-7 (1987)。しかしながら、半成分的処方物は比較的高価であり、通常は好まれず、その使用は制限されている。タンパク質全体を導入する栄養療法はまたI B Dの症状を軽減するために試みられてきた。Giafer等、Lancet 335:816-9 (1990)。米国特許第5461033号には、牛乳から単離された酸性カゼイン及びTGF - 2の使用が開示されている。Beattie等、Aliment. Pharmacol. Ther. 8:1-6 (1994)には、I B Dの子供の幼児期の処方にカゼインを使用する方法が開示されている。米国特許第5952295号には、I B Dの治療用の腸溶性製剤にカゼインを使用する方法が開示されている。しかしながら、栄養療法は、非毒性ではあるが対症療法に過ぎず、疾患の根源にある原因を治療することはできない。

20

【0086】

本発明は、例えばインビトロ、エキソピボ及びインピボ治療法を含むI B D治療方法を考慮している。本発明は、増加した及び/又は減少したI B Dマーカーの発現のようなここに開示された一又は複数のI B Dマーカーの発現を伴う被検者においてI B D疾患状態を検出した際に、治療を必要とする被検者におけるI B Dを治療するための有用な方法を提供する。好ましい一実施態様では、該方法は、(a)該被検者から得られた試験試料において、(i)表1、2、又は3から選択された一又は複数のポリペプチドをコードする一又は複数の核酸；又は(ii)表1、2、又は3に列挙された一又は複数の遺伝子のRNA転写物又はその発現産物の、発現レベルが、コントロールにおける発現レベルに対して高い、及び/又は低いことを決定し、上記発現の高い及び/又は低いレベルが、試験試料が得られた被検者におけるI B Dの存在を示しており；(b)上記被検者に有効量のI B D治療剤を投与することを含む。決定工程(a)は多重I B Dマーカーの発現の測定を含みうる。

30

40

【0087】

該治療方法はI B Dを検出し、かかる治療を必要とする被検者に有効量のI B D治療剤を投与することを含む。ある実施態様では、I B D疾患状態には、一又は複数のI B Dマーカーの発現の増加及び/又は減少が伴う。

一態様では、本発明は、I B Dを治療又は予防するための方法を提供し、該方法は、被検者におけるI B Dの存在を検出し、被検者に有効量のI B D治療剤を投与することを含む。ここで検討されるようにアミノサリチル酸類、副腎皮質ステロイド類、及び免疫抑制剤を含む任意の適切なI B D治療剤を治療方法において使用することができる。

50

【0088】

ここでの方法の何れにおいても、ここで検討された単一のIBD治療剤と共に、被検者又は患者に、治療を必要とする被検者の症状を治療することができる他の活性剤である有効量の第二の医薬（ここでの単一のIBD治療剤が第一の医薬である）を投与することができる。例えば、アミノサリチル酸は、副腎皮質ステロイド、免疫抑制剤、又は他のアミノサリチル酸と同時投与されうる。かかる第二医薬のタイプは、IBDのタイプ、その重篤度、患者の状態及び年齢、用いた第一医薬のタイプと用量等を含む様々な因子に依存する。

第一医薬と第二医薬を使用するかかる治療は、併用投与（二以上の薬剤が同じ又は別個の製剤に含まれる）、及び第一医薬の投与が第二医薬の投与の前、及び/又は次に生じうる別個の投与を含む。一般に、かかる第二医薬は、第一医薬が投与された後、48時間以内に、又は24時間以内に、又は12時間以内に、又は第一医薬後3 - 12時間以内に投与され得、あるいは、好ましくは約1から2日、約2から3日、約3から4日、約4から5日、約5から6日、又は6から7日である予め選択された時間にわたって投与されうる。

10

【0089】

第一及び第二医薬は、同時に、連続的に、又は第一及び第二医薬を交互に、又は他の治療法で応答性がない場合に投与することができる。よって、第二医薬の併用投与は、別個の製剤又は単一の薬学的製剤を使用する同時投与（同時的投与）と、好ましくは双方の（又は全ての）医薬が同時にその生物学的活性を作用させる間には時間間隔がある何れかの順の連続投与を含む。これらの第二医薬は全て第一医薬と互いに又はそれら自体と併用されて使用され得、よって、ここで使用される「第二医薬」という表現はそれが第一医薬とは別の唯一の医薬であることは意味していない。従って、第二医薬は一つの医薬である必要はなく、一を越えるかかる医薬を構成し又は含みうる。ここで記載するこれら第二医薬は、一般に第一医薬と同じ投薬量及び投与経路で、又は第一医薬の投薬量のおよそ1から99%で使用される。かかる第二医薬が仮に使用される場合、好ましくは、それらによって引き起こされる副作用を除去し又は減少させるため、第一医薬が存在していない場合よりも低い量で、特に第一医薬での初期投薬量を越えた続く投薬量で使用される。

20

【0090】

本発明の方法がIBDを治療又は予防するために一又は複数のIBD治療剤を投与することを含む場合、IBDを治療又は予防するためにまた実施される外科手技と投与工程を結合することが特に望ましい場合がある。本発明によって考えられるIBD外科手技は、限定しないが、腸切除術、吻合術、結腸切除術、直腸結腸切除術、及び造瘻術、又はその任意の組合せを含む。例えば、ここに記載されたIBD治療剤は、例えばIBDの治療における治療スキームにおいて結腸切除術と組み合わせることができる。かかる併用療法は、IBD治療剤の投与が外科手技の前、及び/又は後に生じうる別個の投与を含む。

30

一又は複数のIBD治療剤の組合せ、又は一又は複数の治療剤とここに記載の外科手技の組合せでの治療は、好ましくはIBDの徴候又は症状の改善を生じる。例えば、かかる治療法は、IBDの病理の重篤性の減少によって裏付けられるように、IBD治療剤治療計画と外科手技を受ける被検者に改善を生じうる。

40

【0091】

IBD治療剤は、非経口、皮下、腹腔内、肺内、及び鼻腔内を含む任意の適切な手段によって投与され、局所治療が望まれるならば、病巣内投与される。非経口注入は、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与を含む。投薬は、投与が短期か慢性的かどうかによって部分的に依存して、任意の適した経路、例えば静脈内又は皮下注射のような注射によってなされうる。

本発明の方法に従って投与されるIBD治療剤は、良好な医療実務に一致した態様で製剤され、用量決定され、投与される。この点において考慮される因子には、治療されている特定の疾患、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与ス

50

ケジュール、及び医療実務者に知られている他の因子が含まれる。第一医薬はその必要はないが、場合によってはここに記載された一又は複数の更なる医薬（例えば第二、第三、第四等の医薬）と共に製剤化される。かかる更なる医薬の有効量は、製剤中に存在する第一医薬の量、疾患又は治療のタイプ、及び上で検討した他の因子に依存する。これらは一般にこれまで使用したのと同じ投薬量及び投薬経路で使用され、又はこれまで用いられた投薬量のおよそ1から99%で用いられる。

【0092】

I B Dの予防又は治療のために、（単独で又は他の薬剤との併用で使用される場合）I B D治療剤の適切な投薬量は、治療される疾患のタイプ、I B D治療剤のタイプ、疾患の重篤度及び経過、I B D治療剤が予防目的で投与されるか治療目的で投与されるか、患者の臨床病歴及びI B D治療剤に対する応答性、及び担当医師の裁量に依存する。I B D治療剤は一度に又は一連の治療にわたって適切に患者に投与される。疾患のタイプ及び重症度に応じて、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 15 \text{mg} / \text{kg}$ （例えば $0.1 \text{mg} / \text{kg} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ ）のI B D治療剤が、例えば一又は複数の分割投与でも又は連続注入でも、患者投与の初期候補用量である。ある典型的な1日投薬量は、上記の要因に応じて、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ 以上の範囲であるかもしれない。症状に応じて、数日間以上にわたる繰り返し投与は、疾患症状の所望の抑制が得られるまで持続される。I B D治療剤の例示的な一投薬量は、約 $0.05 \text{mg} / \text{kg}$ から約 $10 \text{mg} / \text{kg}$ の範囲であろう。よって、約 $0.5 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $2.0 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $4.0 \text{mg} / \text{kg}$ 又は $10 \text{mg} / \text{kg}$ （又は任意のその組合せ）を患者に投与することができる。このような用量は、間欠的、例えば毎週又は3週ごとに投与されうる（例えば患者に約2から約20、例えば約6用量のI B D治療剤が投与されるように）。初期のより高い負荷投与量の後、一又は複数のより低い用量が投与されうる。例示的用量療法は、約 $4 \text{mg} / \text{kg}$ の初期負荷投与量の後、約 $2 \text{mg} / \text{kg}$ のI B D治療剤の毎週の維持用量を投与することを含む。しかしながら、他の投与計画も有用であり得る。この治療法の進行は、常套的な技術及びアッセイによって容易にモニターされる。

【0093】

B. 2. 遺伝子発現プロファイリング

一般に、遺伝子発現プロファイリングの方法は、二つの大きなグループに分けることができる：ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション解析に基づく方法と、生化学的検出又はポリヌクレオチドの配列決定に基づく他の方法である。試料中のmRNA発現を定量化するために当該分野で最も広く用いられている方法には、ノーザンプロット及びインサイツハイブリダイゼーション（Parker及びBarnes, *Methods in Molecular Biology* 106: 247-283(1999)；RNAse保護アッセイ（Hod, *Biotechniques* 13: 852-854(1992)；及び逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）（Weis等, *Trends in Genetics* 8: 263-264(1992)）が含まれる。あるいは、DNA二重鎖、RNA二重鎖、及びDNA-RNAハイブリッド二重鎖又はDNA-タンパク質二重鎖を含む特定の二重鎖を認識できる抗体を用いてもよい。mRNA又はタンパク質の発現を決定するための様々な方法には、限定されないが、遺伝子発現プロファイリング、定量的リアルタイムPCR（qRT-PCR）を含むポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、例えばアフィメトリックス・ジーンチップ技術を用いるなど、製造者のプロトコルに従って市販の装置によって実施することができるマイクロアレイ解析、連続遺伝子発現解析（SAGE）（Velculescu等, *Science* 270:484-487 (1995)；及びVelculescu等, *Cell* 88:243-51 (1997)）、MassARRAY, Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS)による遺伝子発現解析（Brenner等, *Nature Biotechnology* 18:630-634 (2000)）、プロテオミクス、免疫組織化学的検査（IHC）等が含まれる。好ましくは、mRNAが定量される。かかるmRNA解析は、好ましくはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の技術を使用して、又はマイクロアレイ解析によって実施される。PCRが用いられる場合、PCRの好ましい形態は定量的リアルタイムPCR（qRT-PCR）である。

【0094】

a. 逆転写PCR (RT-PCR)

上に列挙した技術のうち、最も感度が良く最も柔軟性がある定量法はRT-PCRであり、これは、正常及び試験試料中の異なった試料集団におけるmRNAレベルを比較し、遺伝子発現のパターンを特徴付けし、密接に関連したmRNA間を識別し、RNA構造を解析するために使用することができる。

第一工程は標的試料からのmRNAの単離である。出発材料は典型的には結腸組織生検から単離された全RNAである。よって、RNAは、限定されないが、回腸末端、上行結腸、下行結腸、及びS状結腸を含む様々な組織から単離することができる。また、生検が得られる結腸組織は、炎症及び/又は非炎症結腸領域由来でありうる。

【0095】

一実施態様では、mRNAは、左結腸又は右結腸から得られた生検である上で定義された生検から得られる。ここで使用される場合、「左結腸」はS状結腸及び直腸S状結腸を意味し、「右結腸」は盲腸を意味する。

mRNA抽出に関する一般的方法は当該分野で良く知られており、Ausubel等、Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons (1997)を含む分子生物学の標準的教科書に開示されている。特に、RNAの単離は、Qiagen等の商業的製造者の精製キット、バッファーセット及びプロテアーゼを、製造者の指示書に従って使用することで実施することができる。組織試料からの全RNAは、RNASTat-60 (Tel-Test)を使用して単離できる。生検から調製したRNAは、例えば、塩化セシウム密度勾配遠心分離によって単離できる。

【0096】

RNAはPCRのテンプレートとならないので、RT-PCRによる遺伝子発現プロファイリングの最初のステップはRNAテンプレートのcDNAへの逆転写と、それに続くPCR反応でのその指数関数的な増幅である。2つの最も広く用いられている逆転写酵素はトリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素 (AMV-RT) 及びモロニー Maus 白血球ウイルス逆転写酵素 (MMLV-RT) である。逆転写段階は、典型的には、発現プロファイリングの環境及び目的に依存し、特異的プライマー、ランダムヘキサマー、又はオリゴdTプライマーを使用してプライムされる。例えば、製造者指示書に従い、GeneAmp RNA PCRキット (Perkin Elmer, CA, USA) を使用して抽出RNAを逆転写することができる。誘導したcDNAは、ついで、後のPCR反応のテンプレートとして使用できる。

PCR工程では、様々な熱安定性DNA依存性DNAポリメラーゼを使用することができるが、典型的には、5'-3'ヌクレアーゼ活性を有するが3'-5'ブルーフリーディングエンドヌクレアーゼ活性を欠くTaq DNAポリメラーゼを用いる。よって、TaqMan (登録商標) PCRでは、典型的には、Taq又はTthポリメラーゼの5'-ヌクレアーゼ活性を用いて、その標的アンプリコンに結合したハイブリダイゼーションプローブを加水分解するが、5'ヌクレアーゼ活性と同等の任意の酵素を用いることができる。PCR反応にとって典型的なアンプリコンを生成するために2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用する。三番目のオリゴヌクレオチド、又はプローブを、2つのPCRプライマーの間に位置するヌクレオチド配列を検出するために設計する。該プローブは、Taq DNAポリメラーゼ酵素によって伸長せず、レポーター蛍光色素及び消光蛍光色素で標識される。このレポーター色素のどんなレーザー誘導放射も、プローブ上でこの2つの色素が近接して位置している場合には、消光色素によって消光する。増幅反応の間、Taq DNAポリメラーゼ酵素は、テンプレートに依存する形でプローブを切断する。生じたプローブ断片は溶液中で解離し、放出されたレポーター色素からのシグナルは、二番目のフルオロフォアの消光効果とは無関係である。新しい分子が合成される度にレポーター色素の1分子が遊離させられ、消光しないレポーター色素の検出がデータの定量的な解釈の基礎を提供する。

【0097】

TaqMan (登録商標) RT-PCRは、例えば、ABI PRIZM 7700 (商

10

20

30

40

50

品名) Sequence Detection System (商品名) (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)、又は Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) 等の商業的に入手可能な装置を使用しておこなうことができる。好ましい実施態様では、5'ヌクレアーゼ手法は、ABI PRIZM 7700 (商品名) Sequence Detection System (商品名) 等のリアルタイム定量PCR装置ですすめられる。該システムは、サーモサイクラー、レーザー、電荷結合素子(CCD)、カメラ及びコンピューターからなる。該システムでは、サーモサイクラー上の96-ウェルフォーマットで試料を増幅する。増幅の間、96ウェル全てに関する光ファイバーケーブルを通してレーザー励起した蛍光シグナルがリアルタイムで収集され、CCDカメラで検出される。該システムは、装置を作動し、データを分析するソフトウェアを含む。

10

【0098】

5'-ヌクレアーゼアッセイのデータは、Ct又は閾値サイクルとして最初に表される。上で検討したように、蛍光値は毎サイクルの間に記録され、増幅反応においてそのポイントまでに増幅した産物の量を表す。蛍光シグナルが統計的に有意であるとして最初に記録されたポイントが閾値サイクル(Ct)である。

エラー及び試料と試料間の変化による効果を最小限にするために、通常は内部標準を使用してRT-PCRを実施する。理想的な内部標準は、異なる組織間では一定のレベルで発現し、実験上の処理によって影響を受けない。遺伝子発現のパターンを正規化するために最も頻繁に使用されているRNAは、ハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド-3-リン酸-デヒドロゲナーゼ(GAPDH)及びβ-アクチンのmRNAである。

20

【0099】

RT-PCR技術のより最近の変形例は、二重標識蛍光発生プローブ(つまり、TaqMan(登録商標)プローブ)によってPCR産物の蓄積を測定するリアルタイム定量的PCRである。リアルタイムPCRは、各標的配列に対する内部競合体が正規化のために使用される定量的競合PCRと、試料内に含まれる正規化遺伝子、又はRT-PCRのためのハウスキーピング遺伝子を使用する定量的比較PCRの双方に匹敵する。更なる詳細については、例えばHeld等、Genome Research 6:986-994 (1996)を参照のこと。

【0100】

本発明の一態様によれば、増幅される遺伝子中に存在するイントロン配列に基づいてPCRプライマー及びプローブが設計される。この実施態様では、プライマー/プローブ設計の第一工程は遺伝子内のイントロン配列の描写である。これは、公に入手可能なソフトウェア、例えばKent, W.J., Genome Res. 12(4):656-64 (2002)によって開発されたDNABLASTソフトウェア、あるいはその変形形を含むBLASTソフトウェアによって行うことができる。PCRプライマー及びプローブ設計の十分に確立された方法が次の工程として続く。

30

非特異的シグナルを避けるために、プライマーとプローブを設計する場合、イントロン内において反復配列をマスクすることが重要である。これは、反復エレメントのライブラリーに対してDNA配列をスクリーニングし、反復エレメントがマスクされる問い合わせ配列を返すベラー医科大学からオンラインで入手可能なRepeatMaskerプログラムを使用して容易に達成することができる。ついで、マスクされたイントロン配列を使用し、例えばPrimer Express (Applied Biosystems); MGBアッセイ-パイ-デザイン (Applied Biosystems); プライマー3 (Steve Rozen及びHelen J. Skaletsky (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S編 Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386)のような任意の商業的に又は他の好適に入手できるプライマー/プローブ設計パッケージを使用して、プライマー及びプローブ配列を設計することができる。

40

【0101】

PCRプライマー設計で考慮される最も重要な因子は、プライマー長、融解温度(Tm

50

)、及びG/C含有量、特異性、相補的プライマー配列、及び3'末端配列を含む。一般に、最適なPCRプライマーは、一般に17-30塩基長であり、約20-80%、例えば約50-60%のG+C塩基を含む。50から80の間、例えば約50から70のTmが典型的には好ましい。

PCRプライマー及びプローブ設計のための更なる指針については、その開示全体が典明示によりここに明示的に援用される例えばDieffenbach, C.W.等, "General Concepts for PCR Primer Design" in: PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995, pp. 133-155; Innis 及びGelfand, "Optimization of PCRs" in: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, CRC Press, London, 1994, pp. 5-11; 及びPlasterer, T.N. Primerselect: Primer and probe design. Methods Mol. Biol. 70:520-527 (1997)を参照のこと。

10

【0102】

更なるPCRベース技術は、例えば、ディファレンシャルディスプレイ(Liang及びPardue, Science 257:967-971 (1992)); 増幅断片長多型(iAFLP)(Kawamoto等, Genome Res. 12:1305-1312 (1999)); Bead Array(登録商標)技術(Illumina, San Diego, CA; Oliphant等, Discovery of Markers for Disease (Supplement to Biotechniques), June 2002; Ferguson等, Analytical Chemistry 72:5618 (2000)); 遺伝子発現のための迅速なアッセイで市販のLuminex 100 LabMAPシステム及び多重カラーコードマイクロスフィアを使用する遺伝子発現の検出のためのBeads Array(BADGE)(Luminex Corp., Austin, TX)(Yang等, Genome Res. 11:1888-1898 (2001)); 及び高適用範囲の発現プロファイリング(HICEP)解析(Fukumura等, Nucl. Acids. Res. 31(16) e94 (2003))を含む。

20

【0103】

b. マイクロアレイ

ディファレンシャル遺伝子発現も、マイクロアレイ技術を用いて同定し、又は確かめることができる。よって、IBD関連遺伝子の発現プロファイルを、マイクロアレイ技術を使用して新鮮組織又はパラフィン包埋組織の何れかで測定することができる。この方法では、興味あるポリヌクレオチド配列(cDNA及びオリゴヌクレオチドを含む)をマイクロチップ基板上にプレートし、整列させる。ついで、この整列させた配列を、興味ある細胞又は組織からの特異的DNAプローブでハイブリダイズする。丁度RT-PCR法のように、mRNAのソースは、典型的にはIBDの患者から得られた細胞由来の生検組織又は細胞株、及び対応する正常な組織又は細胞株からの全RNAである。よって、様々な結腸組織又は結腸組織由来細胞株からRNAを単離することができる。

30

【0104】

マイクロアレイ技術の特定の実施態様では、cDNAクローンのPCR増幅挿入部分を高密度アレイの基板へ塗布する。好ましくは、少なくとも10000のヌクレオチド配列を基板へ塗布する。それぞれ10000エレメントがマイクロチップ上に固定化された、マイクロアレイ遺伝子は、ストリンジентな条件下でのハイブリダイゼーションに適している。蛍光標識cDNAプローブは、興味ある組織から抽出したRNAの逆転写によって蛍光ヌクレオチドを取り込むことで作製できる。チップへ塗布した標識cDNAプローブは、アレイ上の各スポットのDNAと特異性をもってハイブリダイズする。非特異的に結合したプローブを除くためにストリンジентに洗浄した後、チップを共焦点レーザー顕微鏡によって又はCCDカメラのような他の検出法によってスキャンする。各整列したエレメントのハイブリダイゼーションの定量化によって、対応するmRNA発生量の評価が可能となる。二色蛍光によって、2つのソースのRNAから作製した別々の標識cDNAプローブを2つ1組でアレイへハイブリダイズする。従って、各特定の遺伝子に対応する2つのソースからの転写物の相対発生量が、同時に決定される。小型化したハイブリダイゼーションのスケールによって、非常に多くの遺伝子に関する発現パターンの簡便で迅速な評価が可能となる。このような方法が、細胞当たり少しのコピーが発現する希な転写物の検出するため、また発現レベルにおける少なくともおよそ2倍の違いを再現可能に検

40

50

出するために必要とされる感度を有していることが示されている (Sчена等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(20): 106-49(1996))。マイクロアレイ解析は、製造者のプロトコルに従って、例えば Affymetrix GenChip 技術、又は Incyte のマイクロアレイ技術、又は Agilent の全ヒトゲノムマイクロアレイ技術を使用することによって、市販の装置によって実施することができる。

【0105】

c. 遺伝子発現連続解析 (SAGE)

遺伝子発現連続解析 (SAGE) は、各転写物に対して個々のハイブリダイゼーションプローブを提供することを要せず、多数の遺伝子転写物の同時の定量解析を可能にせしめる方法である。まず、タグが各転写物内の独特の位置から得られるとの前提で、転写物をユニークに同定するのに十分な情報を含む短い配列タグ (約 10 - 14 bp) が生成される。ついで、多くの転写物を互いに結合させて長い連続の分子を形成し、これを配列決定して、複数タグの同一性を同時に明らかにすることができる。転写物の任意の集団の発現パターンは、個々のタグの存在量を決定し、各タグに対応する遺伝子を同定することによって定量的に評価することができる。更なる詳細については、例えば Velculescu 等, Science 270:484-487 (1995); 及び Velculescu 等, Cell 88:243-51 (1997) を参照のこと。

10

【0106】

d. Mass ARRAY 技術

RNA の単離及び逆転写の後に、Sequenom 社 (San Diego, CA) によって開発された Mass ARRAY ベースの遺伝子発現プロファイリング法では、得られた cDNA に、単一の塩基を除く全ての位置で標的 cDNA 領域に一致し内部標準となる合成 DNA 分子 (競合体) が添加される。cDNA / 競合体混合物を PCR 増幅し、これに PCR 後エピアルカリホスファターゼ (SAP) 酵素処理を施し、残りのヌクレオチドの脱リン酸化を生じせしめる。アルカリホスファターゼの不活化後、競合体及び cDNA からの PCR 産物にプライマー伸長を施し、これが競合体及び cDNA 駆動 PCR 産物の区別される質量シグナルを生成する。精製後、これらの産物をチップアレイ上に分配し、これを、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS) での解析に必要なコンポーネントと共に前負荷する。ついで、反応物中に存在する cDNA を、生成された質量スペクトルにおけるピーク面積の比を解析することによって定量する。更なる詳細については、例えば Ding 及び Cantor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3059-3064 (2003) を参照のこと。

20

30

【0107】

e. Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS) による遺伝子発現解析

Brenner 等, Nature Biotechnology 18:630-634 (2000) によって記載されたこの方法は、非ゲルベースのサイン配列決定を、別個の 5 mm 径のマイクロビーズでの何百万のテンプレートのインビトロクローニングと組み合わせる配列決定アプローチである。まず、DNA テンプレートのマイクロビーズライブラリーがインビトロクローニングによって構築される。これに、高密度 (典型的には 3×10^6 マイクロビーズ / cm^2 より多い) でのフローセル中のテンプレート含有マイクロビーズの平面状アレイのアセンブリが続く。各マイクロビーズ上のクローン化テンプレートの遊離端を、DNA 断片分離を必要としない蛍光ベースのサイン配列決定法を使用して、同時に分析する。この方法は、酵母 cDNA ライブラリーから何十万ものサイン配列を単一の操作で同時にかつ精確に提供することが示されている。

40

【0108】

mRNA 単離、精製、プライマー伸長及び増幅を含む RNA 源として固定したパラフィン包埋組織を使用する遺伝子発現をプロファイリングするための代表的なプロトコルの工程は、様々な刊行されたジャーナル記事 (例えば、Godfrey 等 J. Molec. Diagnostics 2: 84-91 (2000); Specht 等, Am. J. Pathol. 158: 419-29 (2001)) に与えられている。簡単に述べると、代表的な方法は、パラフィン包埋組織試料の約 10 ミリグラム厚の切片を

50

切り取ることで始まる。ついで、mRNAが抽出され、タンパク質とDNAが取り除かれる。mRNA抽出に関する一般的な方法は当該分野でよく知られており、Ausubel等, Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons (1997)を含む分子生物学の標準的な教科書に開示されている。パラフィン包埋組織からのRNA抽出法は、例えば、Rupp及びLocker, Lab Invest. 56:A67 (1987)、及びDe Andres等, BioTechniques 18:420-44 (1995)に開示されている。特に、RNAの単離は、Qiagen等の商業的製造者の精製キット、バッファセット及びプロテアーゼを、製造者の指示書に従って使用することで実施することができる。例えば、培養している細胞からの全RNAは、Qiagen RNeasyミニカラムを使用して単離することができる。他の市販のRNA単離キットは、MasterPure Complete DNA及びRNA精製キット(EPICENTRE, Madison, WI)、及びパラフィンブロックRNA単離キット(Ambion, Inc.)を含む。組織試料からの全RNAは、RNA Stat-60(Tel-Test)を使用して単離できる。組織から調製したRNAは、例えば、塩化セシウム密度勾配遠心分離によって単離できる。RNA濃度の分析後、必要ならば、RNA修復及び/又は増幅工程を含めることができ、RNAは、PCRの前に、遺伝子特異的プロモーターを使用して逆転写される。好ましくは、各標的配列に対する内部競合体が正規化のために使用される定量的競合PCRと、試料内に含まれる正規化遺伝子、又はRT-PCRのためのハウスキーピング遺伝子を使用する定量的比較PCRの双方に匹敵するリアルタイムPCRが使用される。

10

更なる詳細については、例えば“PCR: The Polymerase Chain Reaction”, Mullis等編, 1994; 及びHeld等, Genome Research 6:986-994 (1996)を参照のこと。最後に、データを解析して、検査した試料中に同定された特徴的な遺伝子発現パターンに基づいて患者が利用できる最善の治療選択肢を同定する。

20

【0109】

f. 免疫組織化学

免疫組織化学法はまた本発明のIBDマーカーの発現レベルを検出するのに適している。よって、抗体又は抗血清、好ましくはポリクローナル抗血清、最も好ましくは各マーカーに特異的なモノクローナル抗体が発現の検出に使用される。抗体は、例えば、放射標識、蛍光標識、ハプテン標識、例えばビオチンを用いて抗体自体の直接的標識によって、又は西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼのような酵素によって、検出することができる。あるいは、未標識一次抗体が、抗血清、ポリクローナル抗血清又は一次抗体に特異的なモノクローナル抗体を含む、標識二次抗体との関連で使用される。免疫組織化学プロトコル及びキットは当該分野でよく知られており、商業的に入手可能である。

30

発現レベルはまた例えば様々なタイプのイムノアッセイ又はプロテオミクス技術を使用して、タンパク質レベルで決定することができる。

【0110】

イムノアッセイでは、標的診断タンパク質マーカーは、マーカーに特異的に結合する抗体を使用して検出される。抗体は典型的には検出可能な部分で標識される。一般に次の範疇に分類できる数多くの標識が利用できる：

放射性同位体、例えば、³⁵S、¹⁴C、¹²⁵I、³H及び¹³¹I。抗体は、例えばCurrent Protocols in Immunology, 1及び2巻, Coligen等編, (1991) Wiley-Interscience, New York, Pubs.に記載された技術を用いて放射性同位体で標識され、放射能はシンチレーションカウンターを使用して測定できる。

40

蛍光標識、例えば希土類キレート(ユーロピウムキレート)又はフルオレセインとその誘導体、ローダミンとその誘導体、ダンシル、リサミン(Lissamine)、フィコエリトリン及びテキサスレッドが利用できる。蛍光標識は、例えば上掲のCurrent Protocols in Immunologyに開示された技術を用いて抗体にコンジュゲートさせることができる。蛍光は蛍光光度計によって定量できる。

【0111】

様々な酵素-基質標識が利用でき、米国特許第4275149号は、これらの幾つかの

50

概説を提供している。酵素は一般に様々な技術を用いて測定可能な色素原基質の化学変換を触媒する。例えば、酵素は基質における色変化を触媒し、それは分光学的に測定可能である。あるいは、酵素は基質の蛍光又は化学発光を変化させうる。蛍光変化を定量する技術は上述した。化学発光基質は化学反応によって電子的に励起され、ついで（例えば化学発光計を用いて）測定されうる光を放出するか、又は蛍光受容体にエネルギーを供与する。酵素標識の例には、ルシフェラーゼ（例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ；米国特許第4737456号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸塩デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRPO）等のペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソザイム、糖類オキシダーゼ（例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ）、ヘテロ環オキシダーゼ（ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ等）、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼ等が含まれる。酵素を抗体に結合させる技術は、O'Sullivan等（1981）Methods for Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (J. Langone及びH. Van Vunakis編), Academic press, New York, 73: 147-166に記載されている。

10

【0112】

酵素-基質の組み合わせの例は、例えば以下を含む：西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRPO）と基質としての過酸化水素で、過酸化水素が染料前駆物質（例えば、オルトフェニレンジアミン（OPD）又は3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩（TMB））を酸化する；アルカリホスファターゼ（AP）と色素原基質としてのパラ-ニトロフェニルホスフェート；及び α -D-ガラクトシダーゼ（ α -D-Gal）と色素原基質（例えば、p-ニトロフェニル- α -D-ガラクトシダーゼ）又は蛍光原基質4-メチルウンベリフェリル- α -D-ガラクトシダーゼ。

20

数多くの他の酵素-基質の組み合わせが当業者には利用可能である。これらの一般的な概説は、米国特許第4275149号及び第4318980号を参照のこと。

【0113】

標識は抗体に間接的に結合される場合もある。当業者であれば、これを達成するための様々な技術を知っているであろう。例えば、抗体をビオチンに結合させ、上述した3つの広い範疇の標識の何れかをアビジンに結合させるか、又はその逆が可能である。ビオチンはアビジンに選択的に結合し、よってこの間接的な方式で抗体に標識をコンジュゲートさせることができる。あるいは、抗体との標識の間接的な結合を達成するために、抗体に小さなハプテン（例えばジゴキシン）をコンジュゲートさせ、上述の異なるタイプの標識を抗ハプテン抗体（例えば抗ジゴキシン抗体）にコンジュゲートさせる。よって、抗体との標識の間接的なコンジュゲートを達成できる。

30

イムノアッセイ技術の他の型では、抗体は標識される必要はなく、その存在が、抗体に結合する標識抗体を用いて検出されうる。

よって、ここでの診断イムノアッセイは、例えば競合結合アッセイ、直接及び間接サンドウィッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイを含む任意のアッセイ形式でありうる。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987)。

40

【0114】

競合結合アッセイは、限られた量の抗体との結合について試験試料分析物と競合する標識標準物質の能力に依存する。試験試料中の抗原の量は抗体に結合するようになる標準物質の量に反比例する。結合するようになる標準物質の量の決定を容易にするために、抗体は一般に競合の前又は後に不溶化され、抗体に結合する標準物質と分析物が未結合のままの標準物質と分析物から簡便に分離されうる。

サンドウィッチアッセイは、それぞれが検出されるタンパク質の異なった免疫原性部分又はエピトープに結合可能である二つの抗体の使用を含む。サンドウィッチアッセイでは、試験試料分析物に、固形担体に固定された第一抗体が結合し、その後、第二抗体が分析

50

物に結合し、よって不溶性の3部分複合体を形成する。例えば米国特許第4376110号を参照のこと。第二抗体自体は検出可能な部分で標識され(直接的サンドウィッチアッセイ)、又は検出可能な部分で標識される抗免疫グロブリン抗体を使用して測定されうる(間接的サンドウィッチアッセイ)。例えば、サンドウィッチアッセイの一つのタイプは、検出可能な部分が酵素であるELISAアッセイである。

【0115】

g. プロテオミクス

「プロテオーム」なる用語は、ある時点での試料(例えば組織、生物、又は細胞培養物)中に存在するタンパク質の全体として定義される。プロテオミクスは、とりわけ、試料中のタンパク質発現の網羅的变化の研究を含む(「発現プロテオミクス」とも称される)。プロテオミクスは典型的には次の工程を含む：(1)2-Dゲル電気泳動(2-D PAGE)による試料中の個々のタンパク質の分離；(2)例えば質量スペクトル又はN末端配列決定によるゲルから回収された個々のタンパク質の同定、及び(3)バイオインフォマティクスを使用するデータ解析。プロテオミクス法は、遺伝子発現プロファイリングの他の方法に対する貴重な補充手段であり、単独で又は他の方法と組み合わせて、本発明のマーカの産物を検出するために使用することができる。

10

【0116】

h. 逆転写の5'-マルチプレックス遺伝子特異的プライミング

RT-PCRは第一工程として試験RNA集団の逆転写を必要とする。逆転写のために最も一般的に使用されるプライマーはオリゴ-dTであり、これはRNAがインタクトな場合に良好に機能する。しかしながら、このプライマーは、RNAが高度に断片化されている場合は効果的ではないであろう。

20

本発明は、58と60の間に最適なTmを有し大ざっぱに20塩基長である遺伝子特異的プライマーの使用を含む。これらのプライマーはまたPCR-DNA増幅を駆動する逆方向プライマーとなる。

代替アプローチ法は、cDNA合成のためのプライマーとしてランダムヘキサマーを使用することに基づいている。しかしながら、我々は、多重の遺伝子特異的プライマーの使用方法がランダムヘキサマーを使用する既知のアプローチ法よりも優れていることを実験的に証明した。

30

【0117】

i. プロモーターメチル化分析

RNA転写物(遺伝子発現解析)又はそのタンパク質翻訳産物の多くの定量方法をここで検討する。遺伝子の発現レベルは、例えば遺伝子プロモーター及び他の調節エレメントのメチル化状態及びヒストンのアセチル化状態のようなクロマチン構造に関する情報から推測することもできる。

特に、プロモーターのメチル化状態はそのプロモーターによって調節される遺伝子の発現レベルに影響を及ぼす。特定の遺伝子プロモーターの異常なメチル化は、例えば腫瘍抑制因子遺伝子のサイレンシングのような発現調節に関係していた。よって、遺伝子のプロモーターのメチル化状態の検査はRNAレベルの直接の定量の代替として利用することができる。

40

メチル化特異的PCR(Herman J.G.等(1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 93, 9821-9826.)及び亜硫酸水素DNA配列決定(Frommer M.等(1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 89, 1827-1831.)を含む特定のDNAエレメントのメチル化状態を測定するための幾つかのアプローチ法が案出されている。更に最近では、マイクロアレイベースの技術がプロモーターメチル化状態を特徴付けるために使用されている(Chen C.M. (2003) Methylation target array for rapid analysis of CpG island hypermethylation in multiple tissue genomes. Am. J. Pathol. 163, 37-45.)。

【0118】

50

j . 遺伝子の同時発現

本発明の更なる態様は遺伝子発現クラスターの同定である。遺伝子発現クラスターは、ピアソン相関係数に基づく相関の対解析(Pearson K.及びLee A. (1902) Biometrika 2, 3 57)を含む当該分野で知られている統計解析法を使用する発現データの解析によって同定することができる。

一実施態様では、ここで同定された発現クラスターは、左結腸でアップレギュレートされた遺伝子を含む(図1)。

他の実施態様では、ここで同定された発現クラスターは、右結腸でアップレギュレートされた遺伝子を含む(図1)。

他の一実施態様では、ここで同定された発現クラスターは、回腸末端でアップレギュレートされた遺伝子を含む(図1)。

他の実施態様では、ここで同定された発現クラスターは、IBD 2 遺伝子座(表7)又はIBD 5 遺伝子座(表8)に遺伝子を含む。

ある実施態様では、ここで同定された発現クラスターは、免疫応答下で分類された遺伝子を含む。

他の実施態様では、ここで同定された発現クラスターは、創傷への応答下で分類される遺伝子を含む。

【0119】

k . イントロンベースのPCRプライマー及びプローブの設計

本発明の一態様によれば、増幅される遺伝子中に存在するイントロン配列に基づいてPCRプライマー及びプローブが設計される。従って、プライマー/プローブ設計の第一工程は遺伝子内のイントロン配列の描写である。これは、公に入手可能なソフトウェア、例えばKent, W.J., Genome Res. 12(4):656-64 (2002)によって開発されたDNA BLASTソフトウェア、あるいはその変形形を含むBLASTソフトウェアによって行うことができる。PCRプライマー及びプローブ設計の十分に確立された方法が次の工程として続く。

非特異的シグナルを避けるために、プライマーとプローブを設計する場合、イントロン内において反復配列をマスクすることが重要である。これは、反復エレメントのライブラリーに対してDNA配列をスクリーニングし、反復エレメントがマスクされる問い合わせ配列を返すペイラー医科大学からオンラインで入手可能なRepeat Maskerプログラムを使用して容易に達成することができる。ついで、マスクされたイントロン配列を使用し、例えばPrimer Express (Applied Biosystems); MGBアッセイ - パイ - デザイン (Applied Biosystems); プライマー3 (Steve Rozen及びHelen J. Skaltsky (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S編 Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386)のような任意の商業的に又は他の好適に入手できるプライマー/プローブ設計パッケージを使用して、プライマー及びプローブ配列を設計することができる。

【0120】

PCRプライマー設計で考慮される最も重要な因子は、プライマー長、融解温度(T_m)、及びG/C含有量、特異性、相補的プライマー配列、及び3'末端配列を含む。一般に、最適なPCRプライマーは、一般に17 - 30塩基長であり、約20 - 80%、例えば約50 - 60%のG + C塩基を含む。50から80の間、例えば約50から70の T_m が典型的には好ましい。

PCRプライマー及びプローブ設計のための更なる指針については、その開示全体が典明示によりここに明示的に援用される例えばDieffenbach, C.W.等, "General Concepts for PCR Primer Design" in: PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995, pp. 133-155; Innis 及びGelfand, "Optimization of PCRs" in: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, CRC Press, London, 1994, pp. 5-11; 及びPlasterer, T.N. Primerselect: Primer and probe design

10

20

30

40

50

n. Methods Mol. Biol. 70:520-527 (1997)を参照のこと。

【0121】

l. IBD遺伝子セット、アッセイした遺伝子サブ配列、及び遺伝子発現データの臨床的利用

本発明の重要な態様は、結腸組織によるある種の遺伝子の測定した発現を使用して、診断情報を提供することである。この目的のために、アッセイされたRNAの量の差と使用されたRNAの質の変動の双方について修正する(標準化する)ことが必要である。従って、該アッセイは、よく知られたハウスキーピング遺伝子、例えばGAPFDH及びCyp1を含むある種の基準化遺伝子の発現を典型的には測定し取り込む。あるいは、基準化はアッセイされた遺伝子の全て又はその大きなサブセットの平均又は中央値シグナル(Ct)に基づくことができる(包括的正規化アプローチ)。遺伝子毎のベースで、患者の結腸組織mRNAの測定された基準化量が、適切な組織参照セットに見出される量と比較される。この参照セット中の組織の数(N)は、異なった参照セットが(全体として)本質的に同じように挙動するようにするためには十分に多くしなければならない。この条件が満たされる場合、特定のセットに存在する個々の結腸組織の同一性はアッセイされる遺伝子の相対量に有意な影響は持たないであろう。通常、組織参照セットは少なくとも約30、好ましくは少なくとも約40の異なったIBD組織検体からなる。別の記載がなされない限り、各mRNA/試験組織/患者の正規化発現レベルは、参照セットにおいて測定された発現レベルの割合として表される。より詳細には、IBD試料の十分に多い数(例えば40)の参照セットが、各mRNA種の正規化レベルの分布を生じる。分析される特定の試料において測定されるレベルはこの範囲内のあるパーセンタイルになり、これは当該分野でよく知られた方法によって決定することができる。以下、別段の記載がない場合は、遺伝子の発現レベルに対する参照は、これは常に明示的に述べるとは限らないが、参照セットに対して正規化された発現を想定する。

【0122】

m. 抗体の産生

本発明は抗IBDマーカー抗体を更に提供する。例示的な抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性、及びヘテロコンジュゲート抗体が含まれる。ここで検討したように、抗体はIBDの診断方法において、ある場合にはIBDの治療方法において使用されうる。

【0123】

(1) ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連する抗原とアジュバントを複数回皮下(sc)又は腹腔内(ip)注射することにより動物に産生されうる。免疫化される種において免疫原性であるタンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリプシンインヒビターに関連抗原を、二官能性又は誘導体形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基によるコンジュゲーション)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基による)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、SOC12、又はRとR1が異なったアルキル基であるR1N=C=NRによりコンジュゲートさせることが有用でありうる。

動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート100µg又は5µg(それぞれウサギ又はマウスの場合)を完全フロイントアジュバント3容量と併せ、この溶液を複数部位に皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導体に対して免疫化する。1か月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の1/5ないし1/10のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追加免疫する。7ないし14日後に動物を採血し、抗体価について血清を検定する。動物は、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。好ましくは、動物は、同じ抗原のコンジュゲートであるが、異なったタンパク質にコンジュゲートさせた、及び/又は異なった架橋剤によってコンジュゲートさせたコンジュゲートで追加免疫する。コンジュゲートはまたタンパク融合として組換え細胞培養中で調製することもできる。また、ミョウバンのよう

な凝集化剤が、免疫反応の増強のために好適に使用される。

【0124】

(2) モノクローナル抗体

ここでのモノクローナル抗体を作製するための様々な方法が当該分野で利用できる。例えば、モノクローナル抗体は、Kohler等、Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法を用いて作製でき、又は組換えDNA法(米国特許第4816567号)によって作製することができる。

ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスターを上記したようにして免疫し、免疫化に用いられるタンパク質と特異的に結合する抗体を生産するか又は生産することのできるリンパ球を導き出す。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。次に、リンパ球を、ポリエチレングリコールのような適当な融剤を用いてミエローマ細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

10

【0125】

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親のミエローマ細胞の増殖又は生存を阻害する一又は複数の物質を含みうる適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親のミエローマ細胞が酵素ヒポキサンチングアニジンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRRT)を欠失しているならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT欠損細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含むであろう(HAT培地)。

20

好ましい骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの生産を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性である細胞である。これらの中でも、好ましい骨髄腫株化細胞には、マウス骨髄腫系、例えば、ソーク・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、San Diego, California USAから入手し得るMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍、及びアメリカン・タイプ・カルチュア・コレクション、Rockville, Maryland USAから入手し得るSP-2又はX63-Ag8-653細胞から誘導されたものが含まれる。ヒト骨髄腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髄腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために記載されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); 及びBrodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

30

【0126】

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定する。

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson等, Anal. Biochem., 107:220 (1980)のスキッチャード分析法によって測定することができる。

所望の特異性、親和性、及び/又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が確定された後、該クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地には、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地が含まれる。加えて、該ハイブリドーマ細胞は、動物において腹水腫瘍としてインビボで増殖させることができる。

40

【0127】

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーのような常套的な免疫グロブリン精製法により、培地、腹水、又は血清から好適に分離される。

モノクローナル抗体をコードしているDNAは、常法を用いて(例えば、マウスの重鎖及び軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用

50

いることにより)即座に単離され配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたならば、DNAを発現ベクター中に入れ、ついでこれを、そうしないと抗体タンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルC O S細胞、チャニーズハムスター卵巣(C H O)細胞、又はミエローマ細胞のような宿主細胞中にトランスフェクトし、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成を達成することができる。抗体をコードするDNAの細菌中での組換え発現に関する概説論文には、Sker ra等, Curr. Opin. in Immunol., 5:256-262(1993)及びPlueckthum, Immunol. Revs., 130:151-188(1992)がある。

【0128】

更なる実施態様では、モノクローナル抗体又は抗体断片は、McCafferty等, Nature, 348:552-554 (1990)に記載された技術を使用して産生される抗体ファージライブラリーから単離することができる。Clackson等, Nature, 352:624-628 (1991)及び Marks等, J.Mol. Biol., 222:581-597 (1991)は、ファージライブラリーを使用したマウス及びヒト抗体の単離を記述している。続く刊行物は、鎖混合による高親和性(n M範囲)のヒト抗体の生産(Marks等, Bio/Technology, 10:779-783(1992))、並びに非常に大きなファージライブラリーを構築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビボ組換え(Waterhouse等, Nuc.Acids.Res., 21:2265-2266(1993))を記述している。従って、これらの技術はモノクローナル抗体の分離に対する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別法である。

DNAはまた、例えばヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード化配列を、相同的マウス配列に代えて置換することにより(米国特許第4816567号; Morrison等, Proc.Nat. Acad.Sci., USA, 81:6851(1984))、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部又は一部を共有結合させることで修飾できる。

典型的には、このような非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常ドメインに置換され、又は抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインに置換されて、抗原に対する特異性を有する一つの抗原結合部位と異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体を作り出す。

【0129】

(3) ヒト化抗体

非ヒト抗体をヒト化する方法の例は当該分野で記載されている。好ましくは、ヒト化抗体は非ヒト由来のものに導入した一又は複数のアミノ酸残基を有する。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と呼ばれる(Jones等, Nature, 321:522-525 (1986)、Riechmann等, Nature, 332:323-327 (1988)、Verhoeyen等, Science, 239:1534-1536(1988))。ヒト化は、本質的には、ウィンター及び共同研究者(Jones等, Nature, 321:522-525 (1986)、Riechmann等, Nature, 332:323-327 (1988)、Verhoeyen等, Science, 239:1534-1536 (1988))の方法に従って、高頻度可変領域配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施されうる。従って、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体である(米国特許第4816567号)。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかの高頻度可変領域残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。IBDを治療するために使用されるヒト化抗体の例は、操作されたマウス-ヒトキメラモノクローナル抗体であるインフリキシマブ(レミケード(登録商標))である。抗体はサイトカインTNF- α に結合し、そのレセプターへの結合を防止して炎症反応を惹起し維持する。インフリキシマブはCDとUCの双方を治療するために使用される。

【0130】

抗原性を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方の可変ドメインの選択が非常に重要である。いわゆる「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものとは最も近いヒト配列をヒト化抗体のヒトフレームワーク領

10

20

30

40

50

域(F R)として受け入れる(Sims等, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia等, J. Mol. Biol., 196:901(1987))。他の方法では、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークを幾つかの異なるヒト化抗体に使用できる(Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta等, J. Immunol., 151:2623(1993))。

【0131】

抗体を、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが更に重要である。この目標を達成するべく、好ましい方法では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは入手可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原と結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性を高めるといった、望ましい抗体特徴が得られるように、F R残基をコンセンサス及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、高頻度可変領域残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

ヒト化抗体の様々な形態が考えられる。例えば、ヒト化抗体は、抗体断片、例えばFab、場合によっては免疫コンジュゲートを作成するために一又は複数の細胞傷害剤とコンジュゲートされたものであってもよい。あるいは、ヒト化抗体又は、親和性成熟抗体は、インタクトな抗体、例えばインタクトなIgG1抗体であってもよい。

【0132】

(4) ヒト抗体

ヒト化の代わりにヒト抗体を産生することができる。例えば、内在性の免疫グロブリン産生がない状態で、ヒト抗体の全レパートリーを免疫化することで産生することのできるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが現在では可能である。例えば、キメラ及び生殖系列突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域(JH)遺伝子の同型接合欠損が内因性抗体産生を完全に阻害することが記載されている。このような生殖系列突然変異体マウスにおけるヒト生殖系列イムノグロブリン遺伝子列の移入は、抗原投与時にヒト抗体の産生をもたらす。例としてJakobovits等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits等, Nature 362:255-258 (1993); Bruggermann等, Year in Immunol., 7:33 (1993); 米国特許第5591669号、第5589369号及び第5545807号を参照。あるいは、ファージディスプレイ技術(McCafferty等, Nature 348:552-553(1990))を、非免疫化ドナーからの免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を産出させるために使用することができる。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子は、繊維状バクテリオファージ、例えばM13またはfdの大きい又は小さいコートタンパク質遺伝子の何れかにインフレームでクローニングし、ファージ粒子の表面上に機能的抗体断片としてディスプレイさせる。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択により、これらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択がなされる。よって、ファージはB細胞の特性の幾つかを模倣している。ファージディスプレイは多様な形式で行うことができる; 例えばJohnson, Kevin S. 及びChiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)を参照のこと。V-遺伝子セグメントの幾つかの供給源がファージディスプレイのために使用可能である。Clackson等, Nature, 352:624-628(1991)は、免疫化されたマウス脾臓から得られたV遺伝子の小ランダムコンビナトリアルライブラリーからの抗オキサゾロン抗体の異なった配列を単離した。非免疫化ヒトドナーからのV遺伝子のレパートリーを構成可能で、抗原(自己抗原を含む)とは異なる配列の抗体を、Marks等, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)、又はGriffith等, EMBO J. 12:725-734(1993)に記載の技術に従って単離することができる。また、米国特許第5565332号及び同5573905号を参照のこと。

上で検討したように、ヒト抗体はまたインビトロ活性化B細胞により産生されうる(米国特許第5567610号及び同第5229275号を参照)。

【0133】

(5) 抗体断片

一又は複数の抗原結合領域を含む抗体断片を生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、インタクトな抗体のタンパク分解性消化を介して誘導されていた(例えば、Morimoto等, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)及びBrennan等, *Science*, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる。例えば、抗体断片は上記した抗体ファージライブラリーから単離することができる。あるいは、F(ab')₂-SH断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合してF(ab')₂断片を形成することができる(Carterら, *Bio/Technology* 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、F(ab')₂断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。抗体断片の産生のための他の技術は熟練した実務者に明らかであろう。他の実施態様では、選択抗体は一本鎖Fv断片(scFv)である。国際公開第93/16185号;米国特許第5571894号;及び米国特許第5587458号を参照のこと。また、抗体断片は、例えば米国特許第5641870号に記載されているような直鎖状抗体であってもよい。このような直鎖状抗体断片は単一特異性又は二重特異性であってもよい。

10

【0134】

(6) 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。例示的二重特異性抗体はIBDマーカートンパク質の2つの異なるエピトープに結合しうる。二重特異性抗体はIBDマーカートンパク質を発現する細胞に薬剤を局在化させるために使用することもできる。

20

これらの抗体はIBDマーカートン結合アームと薬剤(例えば、アミノサリチル酸)に結合するアームを有している。二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体断片(例えばF(ab')₂二重特異性抗体)として調製することができる。

二重特異性抗体を作製する方法は当該分野において知られている。完全長二重特異性抗体の伝統的な産生は2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで2つの鎖は異なる特異性を持っている(Millstein等, *Nature*, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は10個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が国際公開第93/08829号及びTrauneker等, *EMBO J.* 10:3655-3659(1991)に開示されている。

30

【0135】

異なったアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、CH₂及びCH₃領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH₁)を、融合の少なくとも一つに存在させることが好ましい。免疫グロブリン重鎖の融合体と、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。これにより、コンストラクトに使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が特に重要性を持たないときは、2又は3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

40

このアプローチ法の一実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブ

50

リン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にし
か免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所
望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易に
することが分かった。このアプローチ法は、国際公開第94/04690号に開示されて
いる。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSuresh等, *Methods in E*
nzymology, 121:210 (1986)を参照されたい。

【0136】

米国特許第5731168号に開示された他のアプローチ法によれば、一对の抗体分子
間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーの割合を最大にするこ
とができる。好適な界面は抗体定常ドメインの C_H3 ドメインの少なくとも一部を含む。
この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな
側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似
のサイズの相補的「キャピティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン
又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより
、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させる
メカニズムが提供される。

【0137】

二重特異性抗体は架橋又は「ヘテロコンジュゲート」抗体を含む。例えば、ヘテロコンジ
ュゲートの一方の抗体がアビジンと結合し、他方はビオチンと結合しうる。このような抗
体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせること(米国特許第
4676980号)及びHIV感染の治療(国際公開第91/00360号、国際公開第9
2/00373号及び欧州特許出願公開第03089号)への用途が提案されている。ヘ
テロコンジュゲート抗体は任意の簡便な架橋方法によって作製できる。適切な架橋剤は当
該分野において周知であり、多くの架橋法と共に米国特許第4676980号に記されて
いる。

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化
学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等, *Science*, 229:81
(1985)はインタクトな抗体をタンパク分解性に切断して $F(a b')$ 断片を
産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウム
の存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルヒド形成を防止する。
産生された $F a b'$ 断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。 F
 $a b'$ -TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元により $F a b'$ -チオ
ールに再転換し、他の $F a b'$ -TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成
する。生産された二重特異性抗体は酵素の選択的固定化のための薬剤として使用すること
ができる。

【0138】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な方法もまた記
述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産されている。
Kostelny等, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)。Fos及びJunタンパク質から
のロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体の $F a b'$ 部分に結
合させた。抗体ホモダイマーはヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、ついで再酸化
させて抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して
使用することができる。Hollinger等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)
により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作製する別のメカニズム
を提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするのに十分に短い
リンカーにより軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)を結合してなる。
従って、一つの断片の V_H 及び V_L ドメインは他の断片の相補的 V_L 及び V_H ドメインと
強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖 $F v(s F v)$ ダイマー
を使用する他の二重特異性抗体断片の製造方策もまた報告されている。Gruber等, *J. Immu*
nol., 152:5368 (1994)を参照のこと。

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt等 J.Immunol. 147:60(1991)。

【0139】

(7) 他のアミノ酸配列の修飾

ここに記載された抗体のアミノ酸配列の修飾を考える。例えば、抗体の結合親和性及び/又は生物学的特性を向上することができれば望ましい。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体の核酸に適切なヌクレオチド変化を導入して、又はペプチド合成により調製されうる。そのような修飾は、抗体のアミノ酸配列内の残基の、例えば、欠失型、及び/又は挿入及び/又は置換を含む。最終構成物が所望する特徴を有していれば、欠失、挿入及び置換をどのように組合せてもよい。アミノ酸変化は、またグリコシル化部位の数又は位置を変化させるなど、抗体の翻訳後プロセスを変更してもよい。

突然変異誘発に好ましい位置である抗体のある種の残基又は領域の同定に有益な方法は、Cunningham及びWells Science, 244:1081-1085 (1989)に記載されているように「アラニンスキニング突然変異誘発」と呼ばれる。ここで、標的残基又は残基の組が同定され(例えば、arg、asp、his、lys、及びgluなどの荷電した残基)、中性の又は負に荷電したアミノ酸(最も好ましくはアラニン又はポリアラニン)で置換され、アミノ酸の抗原との相互作用に影響を与える。ついで、置換に対する機能的感受性を示しているそれらアミノ酸位置を、置換の部位において、又は置換の部位のために、更なる又は他の変異体を導入することにより精製する。このように、アミノ酸配列変異体を導入する部位は予め決定されるが、突然変異自体の性質は予め決定される必要はない。例えば、与えられた部位における突然変異のパフォーマンスを分析するために、標的コドン又は領域においてalaスキニング又はランダム突然変異誘発を実施し、発現した免疫グロブリンを所望の活性についてスクリーニングする。

【0140】

アミノ酸配列挿入には、1残基から100以上の残基を有するポリペプチドまでの長さに亘るアミノ末端融合及び/又はカルボキシ末端融合、並びに単一又は複数アミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例には、N末端メチオニル残基を持つ抗体又は細胞傷害性ポリペプチドに融合させた抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体には、抗体の血清半減期を増加させるポリペプチド又は(例えばADEPTのための)酵素への抗体のN末端又はC末端の融合が含まれる。

【0141】

他の型の変異体はアミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、異なる残基によって置換された抗体分子に少なくとも一つのアミノ酸残基を有する。置換突然変異について最も興味ある部位は高度可変領域を含むが、FR改変も考慮される。保存的置換は、「好ましい置換」と題して表1に示す。これらの置換により生物学的活性に変化が生じる場合、次表に「例示的置換」と題した又はアミノ酸の分類を参照して以下に更に記載するような、より実質的な変化を導入し、生成物をスクリーニングしてもよい。

【0142】

10

20

30

| 元の残基 | 例示的置換 | 好ましい置換 |
|---------|---------------------------------|--------|
| Ala (A) | val; leu; ile | Val |
| Arg (R) | lys; gln; asn | Lys |
| Asn (N) | gln; his; lys; arg | Gln |
| Asp (D) | Glu | Glu |
| Cys (C) | Ser | Ser |
| Gln (Q) | Asn | Asn |
| Glu (E) | Asp | Asp |
| Gly (G) | pro; ala | Ala |
| His (H) | asn; gln; lys; arg | Arg |
| Ile (I) | leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン | Leu |
| Leu (L) | ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe | Ile |
| Lys (K) | arg; gln; asn | Arg |
| Met (M) | leu; phe; ile | Leu |
| Phe (F) | leu; val; ile; ala; tyr | Leu |
| Pro (P) | Ala | Ala |
| Ser (S) | Thr | Thr |
| Thr (T) | ser | Ser |
| Trp (W) | tyr; phe | Tyr |
| Tyr (Y) | trp; phe; thr; ser | Phe |
| Val (V) | ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン | Leu |

10

20

【 0 1 4 3 】

30

抗体の生物学的性質における実質的な修飾は、(a) 置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b) 標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は(c) 側鎖の嵩に影響を及ぼす置換を選択することにより達成される。アミノ酸は、その側鎖の特性の類似性に従ってグループ化することができる(A. L. Lehninger, in Biochemistry, 2版, pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)) : 無極性 : A l a (A) , V a l (V) , L e u (L) , I l e (I) , P r o (P) , P h e (F) , T r p (W) , M e t (M) ; 無電荷極性 : G l y (G) , S e r (S) , T h r (T) , C y s (C) , T y r (Y) , A s n (N) , G l n (Q) ; 酸性 : A s p (D) , G l u (E) ; 及び塩基性 : L y s (K) , A r g (R) , H i s (H) 。

【 0 1 4 4 】

40

別法では、天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいて群に分けることができる : 疎水性 : ノルロイシン、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e ; 中性の親水性 : C y s、S e r、T h r、A s n、G l n ; 酸性 : A s p、G l u ; 塩基性 : H i s、L y s、A r g ; 鎖配向に影響する残基 : G l y、P r o ; 及び芳香族 : T r p、T y r、P h e 。

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。

【 0 1 4 5 】

抗体の適切な高次構造を維持するために関与しない任意のシステイン残基も、一般的には、セリンと置換して、分子の酸化的安定性を改善して、異常な架橋を防いでもよい。逆

50

に、システイン結合を抗体に付加して、その安定性を改善してもよい(特に抗体がFv断片などの抗体断片である場合)。

ある好ましい型の置換変異体は、親抗体(例えばヒト化又はヒト抗体)の一又は複数の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的に、更なる発展のために選択され、得られた変異体は、それらが作製された親抗体と比較して向上した生物学的特性を有している。そのような置換変異体を作製する簡便な方法は、ファージディスプレイを使用する親和性突然変異である。簡潔に言えば、幾つかの高頻度可変領域部位(例えば6-7部位)を突然変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このように生成された多価抗体は、繊維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたM13の遺伝子産物への融合物としてディスプレイされる。ファージディスプレイ変異体は、ついで、ここに開示されるようなそれらの生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングされる。修飾のための候補となる高頻度可変領域部位を同定するために、アラニンスクランニング突然変異誘発を実施し、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。別法として、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体と抗原の接点を特定するのが有利である場合もある。このような接触残基及び隣接残基は、ここに述べた技術に従う置換の候補である。そのような変異体が生成されると、変異体のパネルにここに記載するようなスクリーニングを施し、一又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択することができる。

10

【0146】

二以上(好ましくは4の)機能的抗原結合部位を有する操作された抗体もまた考えられる(Miller等の米国特許出願公開第2002/0004587A1号)。

20

抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は当該分野で知られている様々な方法により調製される。これらの方法は、天然源からの単離(天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合)又はオリゴヌクレオチド媒介性(又は部位特異的)突然変異による調製、PCR突然変異誘発、及び前もって調製された変異体又は抗体の非変異型のカセット変異導入法を含むが、これらに限定されない。

【0147】

B.3 発明のキット

本発明の方法で使用するための材料は、良く知られた手順に従って生産されるキットの調製に適している。よって、本発明は、IBDに対する開示された遺伝子の発現を定量するための遺伝子特異的又は遺伝子選択的プローブ及び/又はプライマーを含みうる薬剤を含むキットを提供する。このようなキットは、場合によっては、試料、特にパラフィン包埋組織試料からRNAを抽出するための試薬、及び/又はRNA増幅のための試薬を含みうる。加えて、キットは、本発明の方法での使用に関する記載又はラベル又は指示書と共に試薬を含んでいてもよい。該キットは、例えば、それぞれ、前もって製造されたマイクロアレイ、バッファー、適切なヌクレオチド三リン酸(例えばdATP、dCTP、dGTP及びdTTP;又はrATP、rCTP、rGTP及びUTP)、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、及び本発明の一又は複数のプローブ及びプライマー(例えばRMAポリメラーゼと反応性のプロモーターに結合した適切な長さのポリ(T)又はランダムプライマー)を含む該方法で利用される(典型的には濃縮形態の)様々な試薬の一又は複数と共に、(方法の自動化された実施に使用するのに適したマイクロタイタープレートを含む)容器を含みうる。

30

40

【0148】

B.4 発明のレポート

この発明の方法は、商業的な診断目的に対して実施される場合、選択された遺伝子の一又は複数の正規化された発現レベルのレポート又はまとめを一般に作成する。この発明の方法及びレポートは、データベース中にレポートを保存することを更に含みうる。あるいは、該方法は、被検者のためにデータベース中に記録を更に作成し、記録にデータを追加することができる。一実施態様では、レポートは紙のレポートであり、他の実施態様では、レポートは聴覚性レポートであり、他の実施態様では、レポートは電子的レポートで

50

ある。レポートは医師及び/又は患者に提供されることが考えられる。レポートの受領は、データ及びレポートを含むサーバーコンピュータにネットワーク接続を樹立し、サーバーコンピュータからデータ及びレポートを要求することを更に含む。

本発明によって提供される方法はまた全体を又は部分的に自動化することもできる。

【0149】

本発明の全ての態様は、開示された遺伝子に加えて、及び/又はその代わりに、例えば高いピアソン相関係数によって裏付けられているように、開示された遺伝子と同時発現される限られた数の更なる遺伝子が予後又は予想試験に含められるようにまた実施することができる。

【0150】

本発明を記載したが、本発明は、例示のために提供され、発明を限定するものでは決してない次の実施例を参照すると、より容易に理解されるであろう。

【実施例】

【0151】

実施例1 - マイクロアレイ解析

臨床的に、IBDは、しばしば慢性的な予測できない経過を生じる多様な徴候によって特徴付けられる。血性下痢及び腹痛はしばしば熱及び体重減少を伴う。貧血は重度の疲労のように一般的である。関節痛から急性関節炎にわたる関節の症状並びに肝機能の異常が通常IBDに伴う。IBDの患者はまた一般の集団と比較して結腸癌のリスクが高い。IBDの急性の「攻撃」の間、仕事や他の正常な活動は通常不可能であり、患者はしばしば入院させられる。

【0152】

IBDの原因は依然として不明であるが、遺伝、感染、及び免疫的感受性等の複数の要因が関係している。IBDは白人、特にユダヤ系の白人系においては更に一般的である。症状が慢性的炎症性の性質であることにより、感染的原因の可能性に対する熱心な調査が急ぎ行われた。急性炎症を刺激する物質は見つかったものの、IBDに関連して慢性的炎症の原因となるものは見つかっていない。IBDが自己免疫性疾患であるという仮説は、関節炎などのようにこれまでに述べられたIBDの腸外出現と、免疫反応を抑制することが知られている副腎性グルココルチコイド、シクロスポリン及びアザチオプリン等の治療薬を用いた治療によるIBDに対する既知のポジティブな反応により支持されている。加えて、胃腸管は、身体他のどの器官よりも、食物由来のタンパク質、細菌性副産物(LPS)等の潜在的な抗原性物質に連続的に曝されている。IBDのサブタイプはUCとCDである。

【0153】

CDは、炎症が腸管壁の全層にわたって広がり、腸間膜並びにリンパ節を含む点でUCとは異なる。CDは口から肛門まで消化管の至る所で発生しうる。該疾病はしばしば非連続的であり、つまり、腸の重篤に罹患しているセグメントが明らかに疾患がない領域とは離れている。CDでは、腸壁がまた厚くなり、これが閉塞に至るおそれがある。更に、瘻孔及び裂溝は珍しくはない。

【0154】

UC及びCDの双方とも、罹患領域を示す内視鏡検査により、典型的には診断される。しかしながら、マイクロアレイ技術の使用は、UCの分子病理学に光明を投じるものである。2000年に公開された研究では、8人のUC患者を分析するためにマイクロアレイ技術が使用されている。(Dieckgraefeら, *Physiol. Genomics* 2000; 4:1-11)。6500の遺伝子がこの研究で分析され、結果として、以前よりUC病変形成に関係している遺伝子、すなわちIL-1、IL-1RA及びIL-8の発現が増加していることが確認された。粘膜生検を少量切り取る能力を組み合わせた内視鏡診断により、研究者が、マイクロアレイ解析を使用してUCを更に診断することが可能となり、研究者が、正常な組織に対して罹患領域を分析し、様々な程度の重症度を有するより広い範囲の患者からの組織を分析することが可能となる。大腸及び回腸末端の肉眼では罹患していない領域の生検を、マイ

10

20

30

40

50

クロアレイ解析した。(Langmanら, Gastroent. 2004; 127:26-40)。Langmanは22283の遺伝子を分析し、細胞解毒に関与している遺伝子、例えばプレグナンXレセプター及びMDR1が、UCの患者の結腸において有意にダウンレギュレートされたが、CDの患者におけるこれら遺伝子の発現に変化はなかった。

【0155】

しばしば何千もの遺伝子配列を含む核酸マイクロアレイは、その正常な対応物と比較して、病変組織において差次的に発現した遺伝子を同定するのに有用である。核酸マイクロアレイを使用し、試験用及びコントロール組織試料からの試験及びコントロールmRNA試料を逆転写させ、標識してcDNAプローブを作製する。次に、cDNAを、固体担体に固定された核酸のアレイにハイブリダイズさせる。アレイの各メンバーの配列と位置が分かるようにアレイを設定する。例えば、ある疾患状態で発現することが知られている遺伝子の選択物が固体担体上に整列されうる。特定のアレイメンバーとの標識プローブのハイブリダイゼーションは、プローブが派生した試料がその遺伝子を発現することを示す。試験用(例えば病変組織)試料からのプローブのハイブリダイゼーションシグナルが、コントロール、正常組織の試料からのプローブのハイブリダイゼーションシグナルよりも大きいならば、病変組織で過剰発現した遺伝子又は遺伝子群が同定される。この結果から示唆されることは、病変組織において過剰発現したタンパク質は、病状の存在についての診断マーカーとしてのみでなく、病状の処置の治療標的としても有用であることである。

10

【0156】

核酸のハイブリダイゼーション及びマイクロアレイ技術の方法は、当該分野でよく知られてる。一例において、ハイブリダイゼーション用の核酸の特定の調製、及びプローブ、スライド、及びハイブリダイゼーション条件は、ここに出典明示により援用される2001年3月30日に出願されたPCT特許出願第PCT/US01/10482号に詳述されている。

20

【0157】

マイクロアレイ解析を、正常な腸組織と比較して、CDにおいて過剰発現している遺伝子を見出すのに使用した。この研究では、CDを患っている67人の患者と、大腸内視鏡検査を受けた31人のコントロール患者を採用した。患者の病状を単純な臨床大腸炎活性指数(SCCAI)(Walmsley等 Gut. 1998;43:29-32)を使用し、大腸内視鏡の時間で評価した。組織学的炎症を示さない静止状態の病気は、SCCAIが2又はそれ未満のものであると定義した。組織学的に急性又は慢性の炎症を有する活性な病気は、SCCAIが2より大であると定義した。CDそれ自体の重症度は、Leonard-Jonesの判断基準により決定した(Lennard-Jones Scand. J. Gastroent. 1989; 170:2-6)。分子レベルで、CDの炎症経路を分析するために、CD患者からは、十分な表現型の生検が提供され、よって治療介入のための、新規の候補遺伝子及び潜在的経路を同定した。対にした生検を、各解剖学的位置から取り出した。

30

【0158】

全ての生検を、RNA単離の準備ができるまで-70で保存した。生検を600µlのRLTバッファー(+BME)中でホモジナイズし、製造者のガイドラインに従い、オンカラムDNアーゼ処理と共にQiagenTM Rneasy Mini columns (Qiagen)を使用して、RNAを単離した。RNAの単離後、製造者のガイドラインに従いRiboGreenTM (Molecular Probes)を使用してRNAを定量し、完全性をアガロースゲルでチェックした。適切な量のRNAをマイクロアレイ解析用に標識し、試料を、私有のGenentechマイクロアレイ及びAffymetricsTM マイクロアレイで操作した。その発現が正常な腸に対してUC組織でアップレギュレートされていた遺伝子を比較し、同じ患者からのCD組織と正常な腸からの生検をマッチさせた。この実験の結果、表1A、1及び2A(上に提供)に示される核酸が、正常な組織と比較して、CD及び/又はUC組織において差次的に発現されていることが示された。

40

【0159】

表1A-1Bに列挙された遺伝子は、最小で1.5倍の発現差を示し、また許容可能な

50

程度のプローブハイブリダイゼーション強度が観察された。表 2 に列挙された遺伝子は、約 0.65 の最小群内ピアソン相関を有することが見出され、遺伝子発現の 3 倍のアップレギュレーションが観察された。

【0160】

より詳細には、表 1 A 及び 2 に列挙された配列番号は、C D 及び / 又は U C において有意にアップレギュレートされ / 過剰発現したポリヌクレオチド及びそれらのコードされたポリペプチドを表す。

表 1 B に列挙された配列番号は、C D 及び / 又は U C において有意にダウンレギュレートされ / 過小発現したポリヌクレオチド及びそれらのコードされたポリペプチドを表す。

表 3 A に列挙された配列番号は、U C において有意にアップレギュレートされ / 過剰発現したポリヌクレオチド及びそのコードされたポリペプチドを表す。

表 3 B に列挙された配列番号は、U C において有意にダウンレギュレートされ / 過小発現したポリヌクレオチド及びそれらのコードされたポリペプチドを表す。

【0161】

実施例 2 : マイクロアレイ解析による潰瘍性大腸炎における明確な腸遺伝子発現プロファイルの特徴付け

マイクロアレイ解析により、細胞レベルでの遺伝子発現の包括的画像が可能になった。この研究の目的は、潰瘍性大腸炎 (U C) を患っている患者及びコントロールの差次的腸遺伝子発現を研究することである。

【0162】

方法 : 67 人の U C 及び 31 人のコントロール患者 - 内 23 人は正常で 8 人は炎症性の非炎症性腸疾患の患者で研究した。対となった内視鏡生検を、RNA 抽出及び組織診断用に、5 つの特異的な解剖学的部位から取り出した。41058 の発現配列タグを、Agilent プラットフォームを使用し、215 の生検で分析した。結果の確認を、リアルタイム PCT 及び免疫組織化学的検査により行った。結果 : 健全なコントロール生検において、クラスター分析では、右と左の結腸との間の遺伝子発現において差異が見られた。 ($\chi^2 = 25.1$, $p < 0.0001$)。まず、発生遺伝子 HOXA13 ($p = 2.3 \times 10^{-16}$)、HOXB13 ($p < 1 \times 10^{-45}$)、GLI1 ($p = 4.0 \times 10^{-24}$)、及び GLI3 ($p = 2.1 \times 10^{-28}$) が主にこの分離を駆動した。全ての U C 生検及びコントロール生検を比較したところ、143 の配列では U C 生検において > 1.5 の倍率変化があり ($0.01 > p > 10^{-45}$)、54 の配列では < -1.5 の倍率変化があった ($0.01 > p > 10^{-20}$)。U C 遺伝子において差次的にアップレギュレートされるものには、SAA1 ($p < 10^{-45}$) デフェンシン、DEFA5 及び 6 (それぞれ $p = 0.00003$ 及び $p = 6.95 \times 10^{-7}$)、MMP3 ($p = 5.6 \times 10^{-10}$) 及び MMP7 ($p = 2.3 \times 10^{-7}$) が含まれる。増加した DEFA5 及び 6 発現を、免疫組織化学的検査及びインサイツハイブリダイゼーションにより、パネート細胞異形成に対して、更に特徴付けした。IBD2 及び IBD5 遺伝子座、及び ABC トランスポーター遺伝子のサブ分析により、U C 生検における差次的に調節された多くの遺伝子が明らかになった。結論 : これらのデータは、新規の多くの遺伝子ファミリー、並びに U C 病変形成において実証された候補遺伝子に関連しており、潜在的な治療標的の特徴付けが可能となり得る。

【0163】

本研究の目的は、マイクロアレイ遺伝子発現解析を使用し、U C を患っている患者及びコントロールの内視鏡粘膜生検におけるゲノムにわたる発現を研究することである。先の矛盾を解決し、更に U C における炎症経路を描写するために、過去の研究よりも大幅に多くの患者及び生検を含めた。

【0164】

材料及び方法

患者及びコントロール。U C を患っている 67 人の患者と 31 人のコントロール患者で、大腸内視鏡検査を受けた者を採用した。それぞれのデモグラフィックを表 4 に示す。

表 4

| | UC |
|-----------------------------|-------|
| 患者数 | 67 |
| 男性/女性 | 33/34 |
| 診断時の年齢中央値(歳) | 37 |
| 追跡調査期間中央値(年) | 7.8 |
| 疾患グループ | |
| 新しい診断(1) | 8 |
| 無活動疾患(2) | 41 |
| 活動期疾患(3) | 18 |
| 内視鏡検査時の疾患の程度 | |
| 直腸炎 | 15 |
| 左側結腸炎 | 27 |
| 広範囲の結腸炎 | 25 |
| 現在も喫煙 | 6 |
| I B Dの家族病歴 | 5 |
| 5 ASA 治療 | 40 |
| 副腎皮質ステロイド療法 | 10 |
| 免疫抑制療法 (AZA, 6MP, MTX, MMF) | 11 |

10

【 0 1 6 5 】

20

UCを患っている67人の患者と31人のコントロール患者で、大腸内視鏡検査を受けた者を採用した(表4)。全てのUC患者をエジンバラのWestern General Hospitalの診療所で看護し、UCの診断をLennard-Jonesの判断基準を順守した(Lennard-Jones JE. Scand J Gastroenterol Suppl 1989;170:2-6)。表現型データを問診及び症例記録問診により収集し、該データは、デモグラフィック、診断日、病気の位置、病気性状、進行度、腸外徴候、外科手術、現在の投薬、喫煙歴、関節症状、家系及び民族性からなる。内視鏡検査時に、単純な臨床大腸炎活性指数(SCCAI)を使用し、患者の症状を評価した(Walmsley等 Gut. 1998;43:29-32)。

【 0 1 6 6 】

30

大腸内視鏡検査をそれらの指数提示の時間で実施し、経口/IV治療の24時間未満であるならば、患者を、UCの「新規の診断」と記録した。静止状態の病気を、SCCAIが2又はそれ未満のものであると定義し、炎症を示さない又は軽度の慢性の炎症を示す組織診断及び急性の疾患を、SCCAIが2を越えるものであると定義し、急性又は慢性の炎症を示す組織診断も同様とした。

【 0 1 6 7 】

40

コントロールの11人は男性であり、20人は女性で、内視鏡検査時に年齢中位数は43であった。コントロールの6人は大腸癌スクリーニング用の通常の大腸内視鏡検査を受け、9人のコントロールは過敏性腸症候群と一致した症状を示し、通常の大腸鏡検査研究を受け、7人の患者は他の徴候についての大腸内視鏡検査を受け、組織学的に正常な生検を得た。8人のコントロール患者は、異常な炎症性大腸生検(1人は偽膜性大腸炎、1人は憩室炎、1人はアメーバ症、2人は顕微鏡的大腸炎、1人はエオシン好性浸潤、2人は散在性リンパ凝集(scattered lymphoid aggregates)及び胃腸炎の病歴)を患っている。全ての患者から書面によるインフォームドコンセプトを得た。Lothian Local Research Ethics Committeeが研究プロトコルを承認した: REC 04/S1103/22。

【 0 1 6 8 】

生検収集。解剖学的部位を、熟練した施術者、Scope GuideTMを使用しての内視鏡の挿入距離及び内視鏡配置により確認した。対となった生検を各解剖学的部位から取り出した。一方の生検を組織学的検査に送り、他方を、RNA抽出用に液体窒素で簡易冷凍した(snap frozen)。熟練した胃腸病理学者により、各生検を、炎症の証拠がないもの、慢性の炎症及び優位の慢性炎症性細胞浸潤の症候のある生検、又は単純に急性炎症及び急性炎症

50

性細胞浸潤を有するものに、組織学的に等級分けした。139の対になったUC生検と76の対になったコントロール生検を収集した。解剖学的部位からの、UC患者及びコントロールにおける対になった生検の数を表5に示す。

表5

| | UC (n=67) | コントロール (n=31) |
|---------|-----------|---------------|
| 対の生検の総数 | 139 | 76 |
| 回腸末端 | 4 | 6 |
| 上行結腸 | 33 | 17 |
| 下行結腸 | 35 | 23 |
| S状結腸生検 | 57 | 27 |
| 解析から外す | 10 | 3 |

10

【0169】

RNA単離。重量中位数5.5mgを有する、0.2mgと16.5mgの間の生検を計量した。製造者の使用説明書に従い動物組織プロトコルからマイクロトータルRNA単離を使用し、各生検から全RNAを抽出した(Qiagen, Valencia, CA)。1µlの全RNAの純度及び完全性を評価するために、Pico LabChip試薬(Agilent Technologies, Palo Alto, CA)を使用するAgilentテクノロジーズ2100バイオアナライザーを用い、各試料を評価した。

20

【0170】

マイクロアレイ解析。1µgの全RNAを、低RNAインプット蛍光線形増幅プロトコル(Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification protocol)(Agilent Technologies, Palo Alto, CA)を使用して増幅させた。T7 RNAポリメラーゼの一回の線形増幅を実施し、cRNAにシアニン-3及びシアニン-5標識を導入した。RNaseaseミニキット(RNeasy Mini Kit)(Qiagen, Valencia, CA)を使用し、cRNAを精製した。ナノドロップ(NanoDrop)ND-1000分光光度計(NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware)を使用し、1µlのcRNAを定量した。

【0171】

シアニン-3で標識化された750ngのユニバーサル・ヒューマン・リファレンス(Universal Human Reference)(Stratagene, La Jolla, CA)のcRNA、及びシアニン-5で標識化750ngの試験用試料のcRNAを60で30分断片化し、Agilent・ホール・ヒューマン・ゲノム・マイクロアレイ(Agilent Whole Human Genome microarrays)(Agilent technologies, Palo Alto, CA)に充填した。一定に回転させつつ、60で18時間、試料をハイブリダイズさせた。マイクロアレイを洗浄し、乾燥させ、製造者のプロトコル(Agilent technologies, Palo Alto, CA)に従い、Agilentスキャナーにおいてスキャンした。マイクロアレイの画像フィルムを、Agilent特徴抽出ソフトウェア第7.5版(Agilent's Feature Extraction software version 7.5)(Agilent Technologies, Palo Alto, CA)を使用して分析した。各試料に対する対数強度の分布をプロットし、異常値試料(すなわち、平均から2以上の標準偏差のもの)を分析から除外した。これらの基準を使用し、10のUC試料と3のコントロール試料を異常値とした。

30

40

【0172】

リアルタイムPCR。リアルタイムPCR分析の確認を、8つの遺伝子 - SAA1、IL8、DEFA5、DEFA6、MMP3、MMP7、S100A8及びTLR4で実施した。10の正常な組織を有する健常なコントロールS状結腸生検、9の静止状態のUCS字結腸生検、及び急性(6生検)又は慢性(5生検)炎症性細胞浸潤を有する11のUCS字結腸生検を選択し、SAA1及びIL-8の発現の範囲を表すために階層化した後の異なる疾病群を表す。

【0173】

RT-PCR分析の前に、メッセージ(Message)AmpTM I I a RNA増幅キットプロトコル(Ambion technologies, Austin, TX)を使用し、RNA増幅サイクルを実施した

50

。ついで、ストラタジーンモデルM X 4 0 0 0 (La Jolla, Ca, USA)を使用し、5 0 n g のRNAにおいて、逆転写PCRを実施した。T a q M a nプライマー及びプローブを室内で製造した(Genentech Inc, South San Francisco, CA)。順方向プローブ、逆方向プローブ、及びT a q M a nプローブの配列は以下の通りである -

S A A 1、順方向 - agcgtgccagagagaata、逆方向 - ggaagtgattggggctcttg、T a q - cttggccatggtgcggagg、[配列番号：2 3 5]

I L - 8、順方向 - actcccagtcttgtcattgc、逆方向 - caagtttcaaccagcaagaa、T a q - gttggtagtgctgtgttgaattacgg、[配列番号：2 3 6]

D E F A 5、順方向 - gctacccgtgagtccctct、逆方向 - tcttgcactgctttggtttc、T a q - t g t g t g a a a t c a g t g g c c g c c t、[配列番号：2 3 7]

D E F A 6、順方向 - agagctttgggctcaacaag、逆方向 - atgacagtgcagggtcccata、T a q - cacttgccattgcagaaggtcctg、[配列番号：2 3 8]

M M P 3、順方向 - aagggaaacttgagcgtgaat、逆方向 - gagtgccttccccttctcttg、T a q - g g c a t t c a a a t g g g c t g c t g c、[配列番号：2 3 9]

M M P 7、順方向 - cacttcgatgaggatgaacg、逆方向 - gtcccatacccaagaatgg、T a q - c t g g a c g g a t g g t a g c a g t c t a g g g a、[配列番号：2 4 0]

S 1 0 0 A 8、順方向 - ttgaccgagctggagaaag、逆方向 - tcaggtcatccctgtagacg、T a q - t c c c t g a t a a a g g g a a t t t c c a t g c [配列番号：2 4 1]及び

T L R 4、順方向 - agagccgctgggtatcttt、逆方向 - ccttctgcaggacaatgaag、T a q - t g g c a g t t t c t g a g c a g t c g t g c [配列番号：2 4 2]。

【0 1 7 4】

PCR条件は、4 8 で3 0分、9 5 で1 0分保持、続いて、3 0秒9 5 での溶解、及び1分6 0 でのアニール/展伸の4 0サイクルからなる。生成物の絶対的定量をR P L 1 9に対して標準化することにより算出した。結果をS A S及びJ M Pソフトウェア(SAS, North Carolina)を使用して分析した。

【0 1 7 5】

デフェンシン 5のインサイトハイブリダイゼーション

n t 5 5 - 3 7 2のNM__0 2 1 0 1 0(上方-5 ' catccccttgctgcccattct [配列番号：2 4 3]及び下位-5 ' gaccttgaactgaatcttgc [配列番号：2 4 4])からスパンニングするD E F A 5の3 1 8 b pフラグメントを増幅するために、PCRプライマーを設計した。プライマーには、増幅生成物から、それぞれセンス又はアンチセンスプローブのインビトロ転写を可能にする2 7-ヌクレオチドT 7又はT 3 RNAポリメラーゼ開始部位が含まれる。内視鏡生検を1 0%の中性緩衝ホルマリンにおいて固定し、パラフィン包埋した。5 μ m厚の切片を脱パラフィンし、1 0 μ g / m lのプロテイナーゼKにおいて、3 7 で4 5分脱タンパクし、先に記載したようにして、インサイトハイブリダイゼーション用に更にプロセッシングした。(Jubb等 Methods Mol Biol. 2006;326:255-264)。^{3 3}P-U T P標識化されたセンス及びアンチセンスプローブを、5 5 で一晩、切片に対してハイブリダイズさせた。ハイブリダイズされていないプローブを、3 7 で3 0分、2 0 μ g / m lのRNAアーゼAにおいてインキュベートし、続いて0 . 1 x S S Cにおいて5 5 で2時間、高圧縮洗浄し、グレイデッドエタノールを通して脱水することにより除去した。スライドをNTB核トラックエマルジョン(Eastman Kodak)に浸漬し、4 で4週間、乾燥剤を収容した密封のプラスチックスライドボックスにおいて暴露し、ヘマトキシリン及びエオシンで発色及び対比染色した。

【0 1 7 6】

ウサギ抗ヒトリゾチーム及びウサギ抗ヒトデフェンシン についての免疫組織化学

ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片を、内在性ペルオキシダーゼ活性をクエンチし(KPL, Gathersburg, MD)、アビジン及びビオチンでブロックする(Vector, Burlingame, CA)前に再水和させた。3%のBSAとPBSに1 0%の正常なヤギ血清が入ったもので、切片を3 0分ブロックした。ついで組織切片を、室温で6 0分一次抗体と、3 0分ビオチン化された二次抗体と共にインキュベートし、A B C試薬(Vector, Burling

10

20

30

40

50

ame, CA)において30分、続いて金属強化(metal enhanced) D A B (Pierce, Rockford, IL)において5分、インキュベートした。ついで、切片をメイヤーのヘマトキシリンで対比染色した。使用した一次抗体は、 $5.0 \mu\text{g/ml}$ のウサギ抗ヒトリゾチーム(Dako, Carpinteria, CA)、及び $5.0 \mu\text{g/ml}$ のウサギ抗ヒト D E F A 6 (Alpha Diagnostics, San Antonio, TX)であった。使用した二次抗体は、 $7.5 \mu\text{g/ml}$ のビオチン化したヤギ抗ウサギ I g G (Vector, Burlingame, CA)であった。D E F A 6 染色には、99で20分の、標的回収高 p H (Target Retrieval High pH) (Dako, Carpinteria, CA)を用いた前処置が必要であり、リゾチーム染色には前処理の必要がなかった。全ての他の工程を室温で実施した。

【0177】

データ解析。マイクロアレイデータをロゼッタ・レゾルバ・ソフトウェア(Rosetta Resolver software) (Rosetta Inpharmatics, Seattle)を使用して解析した。マイクロアレイデータの統計的有意性を、スチューデントアンペア t 検定により決定した。 $p < 0.01$ 及び大なり小なり1.5の倍率変化が、統計的有意であると考えられる。倍率変化のデータをロゼッタ・レゾルバ・ソフトウェアを使用して算出した。インジェニユイティー (Ingenuity) ソフトウェア (Ingenuity Systems, Mountain View, CA) を使用し、ジーンオントロジーを分析した。マンホイットニーのU検定を使用し、リアルタイムPCRデータを分析した。 $p < 0.05$ を有意とみなした。

【0178】

結果

健常な大腸及び回腸末端における遺伝子発現での解剖学的部位の影響。コントロール患者からの56の組織学的に正常な生検を、教師なしの階層的クラスタリングにより分析した。デンドログラムの片側では、25/25の生検が左結腸(下行結腸又はS状結腸)からのものであり、デンドログラムの反対側では、20/31の生検が上行結腸($\chi^2 = 25.1$, $p < 0.0001$) (図1)からのものであるという、解剖学的部位による明確な分離が観察された。6/6の回腸末端生検を、一緒にクラスタ化した。個々の患者からの生検は、一緒にクラスタ化しなかった。観察されたクラスタ化の原因である、右及び左の結腸との間の差次的発現を促進させる遺伝子は、GI管の発生学的発達に優位に関与しており - H O X A 1 3 (F C + 4.93, $p = 2.3 \times 10^{-16}$)、H O X B 1 3 (F C + 16.96, $p < 1 \times 10^{-45}$)、G L I 1 (F C + 2.2, $p = 4.0 \times 10^{-24}$)、及び G L I 3 (F C + 2.3, $p = 2.1 \times 10^{-28}$) は、全て左結腸でアップレギュレートしていた。

【0179】

UC及びコントロール生検における発現の分析。

教師なしの階層的クラスタリングを使用しても、UC患者及びコントロール患者からの生検の間に差異を見出すことはできなかった。更に、生体の炎症状態に基づくクラスタリングは観察されなかった。観察された唯一のクラスタリングは、回腸末端からの生検であり、ここでUC及びコントロール生検は共にクラスタ化していた。全てのUC生検(129)及びコントロール生検(73)を比較し、UC生検において、143の配列では1.5以上の倍率変化があり($0.01 > p > 10^{-45}$)、54の配列では1.5未満の倍率変化があった($0.01 > p > 10^{-20}$) (データを示さず)。

【0180】

血清アミロイド A 1 (S A A 1) は、最もアップレギュレートされた遺伝子であった(倍率変化(F C) + 8.19, $p < 10^{-45}$)。他の顕著にアップレギュレートした遺伝子は、S 1 0 0 A 8 (F C + 3.50, $p = 2.3 \times 10^{-17}$)、S 1 0 0 A 9 (F C + 3.06, $p = 4.1 \times 10^{-13}$)、デフェンシン、5 (D E F A 5) (F C + 3.25, $p = 0.00003$)、6 (D E F A 6) (F C + 2.18, $p = 6.95 \times 10^{-7}$) 及びマトリックスメタロプロテイナーゼ MMP 3 (F C + 2.17, $p = 5.6 \times 10^{-10}$) 及び MMP 7 (F C + 2.29, $p = 2.3 \times 10^{-7}$) であった。

【0181】

正常な患者と比較した場合、UC患者で差次的に発現したことが見出された遺伝子の列挙を、上述した表1 A、1 B及び2 Aに見出すことができる。

一以上の実験にわたる多くの候補遺伝子の差次的遺伝子発現を表6に示す。表6には、倍率変化及びp値が、4つの異なる実験において、多くの異なる遺伝子で示されていることが表されている。各実験で分析された生検の数を括弧内に示す。一以上の実験をまたがって、発現における有意の一貫した変化が、この表の関心ある遺伝子で観察された。

表 6

| 解析した遺伝子 | 全 UC (129 生検) 対 コントロール (73 生検) 倍率変化 | p 値 | 非炎症 UC S 状結腸 (22) 対 非炎症 コントロール S 状結腸 (18) 倍率変化 | p 値 | 炎症 UC S 状結腸 (35) 対 炎症 コントロール S 状結腸 (8) 倍率変化 | p 値 | 炎症 UC S 状結腸 (35) 対 非炎症 UC (22) 倍率変化 | p 値 |
|----------|-------------------------------------|-----------------------|--|-----------------------|---|------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| SAA1 | +8.19 | <10 ⁻⁴⁵ | +2.0 | 0.00024 | +17.5 | 2.9x10 ⁻²¹ | +16.51 | <10 ⁻⁴⁵ |
| Def α 5 | +3.25 | 0.00003 | +1.02 | 0.89 | +7.27 | 6.3x10 ⁻³⁰ | +8.44 | <10 ⁻⁴⁵ |
| Def α 6 | +2.18 | 6.95x10 ⁻⁷ | -1.09 | 0.34 | +4.41 | 9.7x10 ⁻⁹ | +6.72 | 4.16x10 ⁻¹⁹ |
| S100A8 | +3.50 | 2.3x10 ⁻¹⁷ | +1.21 | 0.19 | +9.75 | 2.4x10 ⁻²⁴ | +6.84 | 1.16x10 ⁻¹⁹ |
| S100A9 | +3.06 | 4.1x10 ⁻¹³ | +1.05 | 0.16 | +7.53 | 6.4x10 ⁻¹² | +7.11 | 1.96x10 ⁻³² |
| MMP3 | +2.17 | 5.6x10 ⁻¹⁰ | -1.55 | 0.0088 | +11.0 | 1.22x10 ⁻³⁷ | +8.15 | 2.32x10 ⁻³⁵ |
| MMP7 | +2.29 | 2.3x10 ⁻⁷ | +1.16 | 0.080 | +7.31 | 4.9x10 ⁻²⁴ | +5.53 | 1.01x10 ⁻²³ |
| IL8 | +2.05 | 4.2x10 ⁻¹¹ | +1.10 | 0.26 | +6.36 | 9.27x10 ⁻¹⁷ | +7.24 | 8.42x10 ⁻¹⁹ |
| TLR4 | +1.34 | 4.5x10 ⁻⁷ | +1.15 | 0.18 | +1.50 | 0.0044 | +1.54 | 0.00073 |
| TNIP3 | +8.02 | 1.1x10 ⁻¹⁷ | -1.30 | 0.20 | +7.53 | 2.93x10 ⁻¹³ | +10.5 | 1x10 ⁻³⁸ |
| CCL20 | +1.30 | 0.00011 | +1.25 | 0.020 | +1.79 | 0.00002 | +2.36 | 4.68x10 ⁻¹¹ |
| ABCBI | -1.32 | 0.00091 | +1.10 | 0.40 | -1.82 | 5.6x10 ⁻⁶ | -1.92 | 9.0x10 ⁻¹⁰ |
| HLA-DRB1 | +1.03 | 0.88 | -3.0 | 0.0010 | +3.30 | 0.033 | +2.67 | 0.0011 |
| TSLP | -1.12 | 0.31 | -2.73 | 2.7x10 ⁻¹⁰ | -1.15 | 0.61 | +1.23 | 0.092 |

10

20

30

40

50

【 0 1 8 2 】

差次的に発現した遺伝子の優位性を示す、UCとコントロール生検との間で差次的に発現した遺伝子に関するジーンオンロジー分析は、生体系であると考えられる場合に、免疫反応(免疫反応下で分類された全679遺伝子の48遺伝子、 $p = 2.1 \times 10^{-9}$)

、OR 2.61、CI 1.85-3.56)及び創傷に対する反応(創傷に対する反応下で分類された全359遺伝子の30遺伝子、 $p = 6.42 \times 10^{-9}$ 、OR 3.14、CI 2.09-4.53)に關与していた。

【0183】

静止状態のUCを患っている患者のS状結腸生検及び非炎症性のコントロール生検における発現の分析。急性炎症シグナルを有さない生検における発現を比較し、解剖学的変異の影響を除外するために、UCを患っている患者からの炎症の組織学的証拠を有さないS状結腸の22の生検を、18の組織学的に正常なコントロールS状結腸生検と比較した。102の配列では、1.5以上の倍率変化があり($0.01 > p > 4.77 \times 10^{-13}$)、84の配列では、1.5未満の倍率変化があった($0.01 > p > 1.8 \times 10^{-21}$) (データを示さず)。

10

【0184】

アップレギュレートされた遺伝子には、デフェンシン 14 (FC + 2.11、 $p = 0.00002$)及びSAA1 (FC + 2.01、 $p = 0.00024$)が含まれる。ダウンレギュレートされた関心ある遺伝子には、HLA-DRB1 (FC - 3.0、 $p = 0.0010$)及びTSLP (FC - 2.73、 $p = 2.7 \times 10^{-10}$)が含まれる(表6)。

【0185】

活性UCを患っている患者のS状結腸生検及び炎症性のコントロール生検における発現の分析。UCを患っている患者からの、35の組織学的炎症S状結腸生検の発現を、8の組織学的炎症性のコントロールS状結腸生検と比較した。UC生検におけるより重度の炎症を表す、急性炎症反応に關与する多くの遺伝子が、コントロール生検に対してUC生検においてアップレギュレートしていた - SAA1 (FC + 17.5、 $p = 2.9 \times 10^{-21}$)、MMP3 (FC + 11.0、 $p = 1.22 \times 10^{-37}$)、MMP7 (FC + 7.31、 $p = 4.9 \times 10^{-24}$)及びIL-8 (FC + 6.36、 $p = 9.27 \times 10^{-17}$) (表6)。全体で623の配列では、1.5以上の倍率変化があり、509の配列では、1.5未満の倍率変化があった($p < 0.01$) (データを示さず)。

20

【0186】

炎症性対非炎症性のUC S状結腸生検。発現シグナルを、35の組織学的炎症、及び22の炎症S状結腸UC生検との間で比較した場合、炎症生検において、700の配列では、1.5以上の倍率変化があり($0.01 > p > 1 \times 10^{-45}$)、518の配列では、1.5未満の倍率変化があった($0.01 > p > 1 \times 10^{-45}$) (データを示さず)。

30

【0187】

顕著にアップレギュレートした遺伝子には、SAA1 (FC + 16.51、 $p = < 10^{-45}$)、TNFAIP3相互作用プロテイン3 (TNIP3) (FC + 10.5、 $p = 1 \times 10^{-38}$)、DEFA5 (FC + 8.44、 $p = < 10^{-45}$)、DEFA6 (FC + 6.72、 $p = 4.16 \times 10^{-19}$)、及び再生膵島誘導3ガンマ (REG3) (FC + 6.99、 $p = < 10^{-45}$)が含まれる。

【0188】

特定の遺伝子ファミリー - デフェンシン5及び6の分析。

関心ある多くの遺伝子の発現を、解剖学的部位及びUC試料における炎症度合いを考慮して、更に分析した。DEFA5及びDEFA6を分析すると、正常なコントロール及び非炎症UC生検における発現は、異なる解剖学的部位をまたがって類似しており、回腸末端に高度な発現が存在し、生検位置が結腸の更に遠位となるにつれて発現が低下した(図2)。

40

【0189】

図2において、各アレイ試料の発現をAgilentユニバーサル参照に対してプロットした。各内視鏡生検を、患者の状態、生検炎症状態、及び解剖学的部位によって分けた。各解剖学的部位についての平均発現レベルを青でリンクさせる。デフェンシン5(パネルA)及び6(B)(DEFA5及びDEFA6)の高発現レベルが、コントロールの回腸末端と非炎症UC試料において見られる。これら2つのグループにおける発現は、生検が

50

回収される結腸がより遠位のときに低減した。急性及び慢性の炎症UC試料において、また炎症コントロール試料においてより小さな程度で、上行、下行及びS状結腸にわたってDEF A 5及びDEF A 6発現に際だった増加があった - S状結腸の炎症対非炎症UC試料で、DEF A 5について($FC + 8.44$ 、 $p = < 10^{-4.5}$)、DEF A 6について($FC + 6.72$ 、 $p = 4.16 \times 10^{-1.9}$)。

急性及び慢性の炎症UC生検においては、上行、下行及びS状結腸にわたって、DEF A 5及びDEF A 6発現に際だったアップレギュレートがあった(表6)。

【0190】

マトリックスメタロプロテイナーゼ3及び7。

非炎症のUS生検と比較した場合、急性及び慢性的に炎症したUC生検においてはMMP 3及びMMP 7の発現増加が観察された - S状結腸の炎症対非炎症UC試料MMP 3($FC + 8.15$ 、 $p = 2.3 \times 10^{-3.5}$)及びMMP 7($FC + 5.53$ 、 $p = 1.0 \times 10^{-2.3}$)(図3)。

図3において、各アレイ試料の発現をAgilentユニバーサル参照に対してプロットする。各内視鏡生検を、患者の状態、生検炎症状態、及び解剖学的部位によって分ける。各解剖学的部位についての平均発現レベルを青で結びつける。非炎症のUC生検と比較した場合、急性及び慢性的に炎症したUC生検においてはMMP 3(パネルA)及びMMP 7(B)の発現増加が観察された - S状結腸の炎症対非炎症UC試料MMP 3($FC + 8.15$ 、 $p = 2.3 \times 10^{-3.5}$)及びMMP 7($FC + 5.53$ 、 $p = 1.0 \times 10^{-2.3}$)。炎症及び非炎症のコントロール試料を分析した場合と比較して、炎症コントロール生検におけるMMP 3及びMMP 7の発現レベルの低下が観察された(それぞれ、 $FC - 1.62$ 、 $p = 0.012$ 及び $FC - 2.0$ 、 $p = 0.0002$)。

【0191】

ATP結合カセット(ABC)トランスポーターファミリー及び生体異物転写レギュレーター。この遺伝子ファミリーを更に研究するために、48の転写遺伝子及びそれらの鍵となるメディエーター(PXR、FXR、LXR及びCAR)を表すプローブからの発現パターンを分析した。これらの遺伝子を全てのUC及びコントロール生検で比較した場合、7つの遺伝子は、コントロール試料と比較して、UC試料においてかなりダウンレギュレートしていることが見出された - ABCA1($p = 0.01$)、ABCA8($p = 0.0064$)、ABCB1($p = 0.0091$)、ABCC6($p = 0.0050$)、ABCB7($p = 0.0068$)、ABCF1($p = 0.0005$)及びABCF2($p < 0.00001$)。ABCB2を表す唯一のプローブは、UCにおいて有意にアップレギュレートした($p = 0.0048$)。

【0192】

多くのABC遺伝子が、正常な患者と比較して、IBD患者ではダウンレギュレートしていることが見出された(データを示さず)。ABCB1発現において観察された変化は、主としてS状結腸における非炎症のUC生検と比較した場合にかなりダウンレギュレートしている炎症UC生検により促進されることが明らかとなった($FC - 1.82$ 、 $p = 5.6 \times 10^{-6}$)(表6)。興味があることに、UCとコントロールとの間のPXRの発現における差異は、疾患位置及び活性を含む任意の分析で観察されなかった。

【0193】

RTPCR分析。マイクロアレイ発現結果に関連した8の遺伝子の場合、正常な組織を有する10の健常なコントロールS状結腸生検、9の静止状態のUCS状結腸生検、及び急性(6生検)又は慢性(5生検)の炎症性細胞浸潤を有する11のUCS状結腸生検を使用した、確認のリアルタイムPCR分析を開始した。正常なコントロールS状結腸生検及び非炎症UCS状結腸生検(それぞれ、 $p = 0.041$ 及び $p = 0.044$)と比較して、炎症UCS状結腸生検におけるSAA1の発現増加が観察された。また、コントロールS状結腸生検($p = 0.031$)と比較した場合、炎症UCS状結腸生検において、IL-8発現の上昇が確認され、非炎症UC生検($p = 0.089$)と比較した場合、炎症UCS状結腸生検において、IL-8発現が高まる傾向が観察された(図4)。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 4 】

図 4 は、正常な組織を有する 10 の健常なコントロール S 字結腸生検、9 の静止状態の UC S 字結腸生検、及び急性又は慢性の炎症性細胞浸潤を有する 11 の UC S 字結腸生検における発現を比較する、リアルタイム PCR 発現データを示す。S A A 1 (A)、I L - 8 (B)、デフェンシン 5 (C) 及びデフェンシン (D) の発現を、コントロール、及び炎症及び非炎症の UC 生検の間で比較した。標準誤差バーを各グラフにおいて緑で例示する。

【 0 1 9 5 】

非炎症 UC S 字結腸生検(それぞれ、 $p = 0.0008$ 及び $p = 0.0005$) 及びコントロール S 状結腸生検(それぞれ、 $p = 0.0002$ 及び $p = 0.0001$) と比較した場合、炎症 UC S 字結腸生検において、D E F A 5 及び D E F A 6 の発現増加が観察された(図 4)。また、非炎症 UC S 字結腸生検と比較した場合、炎症 UC S 字結腸生検における発現増加は、M M P 7、($p = 0.0005$)、S 1 0 0 A 8、($p = 0.0029$) 及び T L R 4、($p = 0.019$) を試験した際に観察された(図 5)。

10

【 0 1 9 6 】

図 5 には、正常な組織を有する 10 の健常なコントロール S 字結腸生検、9 の静止状態の UC S 字結腸生検、及び急性又は慢性の炎症性細胞浸潤を有する 11 の UC S 字結腸生検における発現を比較する、リアルタイム PCR 発現データを示す。M M P 3 (A)、M M P 7 (B)、S 1 0 0 A 8 (C) 及び T L R 4 (D) の発現を、種々の患者間で比較した。標準誤差バーを各グラフにおいて緑で例示する。M M P 3 発現における有意な変化は、炎症、非炎症 UC S 字結腸生検及びコントロール S 状結腸生検を分析した際には観察されなかった。

20

【 0 1 9 7 】

インサイトハイブリダイゼーション及び免疫組織化学。

UC を患っている患者の結腸における、過剰の D E F A 5 & 6 発現の細胞局在化を更に研究するために、インサイトハイブリダイゼーション及び免疫組織化学的検査を、UC を患っている患者及びコントロール生検のコホートで試みた(図 6 及び 7)。

図 6 は、パネート細胞位置と一致する基底陰窩における強ハイブリダイゼーションを示す D E F A 5 に対する、回腸末端生検のインサイトハイブリダイゼーションを示す。上部パネル回腸末端(T I)において、アンチセンスプローブは、パネート細胞位置と一致する基底陰窩における強ハイブリダイゼーションを示す。下部パネル回腸末端(T I)においては、センスコントロールプローブでは、何も有意なハイブリダイゼーションは観察されなかった。パネル A は、非炎症コントロール患者の S 状結腸生検を示す。パネル B、C 及び D は、パネート細胞異形成と一致して、UC S 状結腸生検の基底陰窩領域における、強い多巢性ハイブリダイゼーションを示す。S 状結腸からの UC 生検においては、これらの生検の基底陰窩領域に多巢性ハイブリダイゼーションが観察され、これはパネート細胞異形成と一致した。このことは、非炎症コントロール生検には観察されなかった。

30

【 0 1 9 8 】

図 7 は、D E F A 6 に対する、回腸末端生検のインサイトハイブリダイゼーションを示す。パネル A において、回腸末端免疫組織化学的検査は、パネート細胞位置と一致する基底陰窩におけるポジティブ染色を示す。パネル B 及び C では、非炎症コントロール患者において、有意な染色が観察されなかった。パネル D、E 及び F においては、パネート細胞異形成と一致する、S 状結腸 UC 生検の基底陰窩領域において、強い、多巢性染色が示された。D E F A 6 についての免疫組織化学では、S 状結腸 UC 生検において、染色がパネート細胞異形成と一致するこれらの生検の基底陰窩領域で観察されたことが確認された。再度、非炎症コントロール生検では、このことは観察されなかった(図 7)。

40

【 0 1 9 9 】

I B D 2 遺伝子座内の遺伝子の発現。I B D 2 遺伝子座を定めるマーカーを使用し、染色体 12 におけるこの遺伝子座内で発現した配列タグ、又は 5 2 6 A g i l e n t プローブを表す遺伝子を同定した。12 のプローブが、急性及び慢性の炎症 UC S 字結腸生検の発

50

現を非炎症UCS字結腸生検と比較した場合に、 $p < 0.01$ で1.5の倍率変化より多いか少ない発現であった(図7)。

表7

| Agilent プローブ | 遺伝子記号 | UC S状結腸炎症 (35 生検) 対 非炎症 (25) 倍率 | p 値 |
|--------------|---------------|------------------------------------|------------------------|
| A_23_P98876 | SLC39A5 | -1.52855 | 1.36×10^{-7} |
| A_24_P647146 | HDAC7A | 1.53876 | 3.15×10^{-16} |
| A_24_P941773 | DKFZP586A0522 | -2.27306 | 2.31×10^{-11} |
| A_24_P945113 | ACVRL1 | 1.57956 | 6.33×10^{-9} |
| A_23_P128230 | NR4A1 | 1.81844 | 0.00005 |
| A_23_P331098 | K5B | 2.3845 | 0.0004 |
| A_24_P246636 | A_24_P246636 | -1.69754 | 7.06×10^{-8} |
| A_23_P2233 | SILV | 1.51557 | 9.07×10^{-9} |
| A_23_P105251 | GLI | -1.54447 | 7.73×10^{-9} |
| A_32_P3783 | HMGA2 | -1.94107 | 2.37×10^{-9} |
| A_23_P162300 | IRAK3 | 1.7382 | 3.11×10^{-15} |
| A_32_P83256 | IRAKM | 1.70847 | 4.56×10^{-10} |

10

【0200】

IBD2 遺伝子座内に位置する526の発現プローブを分析し、炎症UCS字結腸生検を非炎症UCS字結腸生検と比較した場合に、有意に差次的に調節される12のプローブが同定された。

20

表3A(上掲)には、正常な患者と比較した場合、IBD患者においてアップレギュレートしたことが見出された、染色体12上のIBD2 遺伝子座からの遺伝子を列挙する。

表3B(上掲)には、正常な患者と比較した場合、IBD患者においてダウンレギュレートしたことが見出された、染色体12上のIBD2 遺伝子座からの遺伝子を列挙する。

【0201】

炎症UCS字結腸試料において差次的に調節される関心ある候補遺伝子には、keratin 5B(FC+2.38、 $p = 0.0004$)、MMP19(FC+1.95、 $p = 0.0084$)、GLI1(FC-1.54、 $p = 7.3 \times 10^{-9}$)、インターロイキン-1レセプター関連キナーゼ3(FC+1.74、 $p = 3.1 \times 10^{-15}$)及びインターロイキン-1レセプター関連キナーゼM(FC+1.71、 $p = 0.0014$)が含まれる。

30

【0202】

急性炎症シグナルを除去し、非炎症UCS字結腸生検及び非炎症コントロールS字結腸生検を比較した場合、1.5より多いか少ない倍率変化を有する配列はなかった。しかしながら、顕著にダウンレギュレートした遺伝子は、チューブリン5(FC-1.32、 $p = 9.0 \times 10^{-6}$)及びチューブリン6(FC-1.45、 $p = 1.2 \times 10^{-5}$)を含み、該分子は腸の障壁完全性及び微小管細胞骨格に関与している。

【0203】

IBD5 遺伝子座内の遺伝子の発現。IBD5 遺伝子座内にAgilentプローブを表す11の遺伝子を同定し、健常なコントロール、非炎症及び炎症のUC生検において比較した(表8)。表8は、それらのS字結腸生検生検において観察された炎症の度合いにより階層化された、コントロール及びUCを患っている患者を比較する、IBD5 遺伝子座内の遺伝子の発現における倍率変化を示す。非炎症UCS字結腸生検と比較した場合、有機のカチオントランスポーターSL22A4及びSLC22A5の有意のダウンレギュレートが観察された。

40

表 8

| 解析した遺伝子 | 全 UC (129) 対 コントロール (73) 倍率変化 | p 値 | 炎症 S 状結腸 (35) 対 非炎症 S 状結腸 (22) (UC) 倍率変化 | p 値 | 非炎症 UC S 状結腸 (22) 対 非炎症コントロール S 状結腸 (18) 倍率変化 | p 値 |
|---------|-------------------------------|-----------------------|--|-----------------------|---|-------|
| IL4 | +1.00 | 0.96 | +1.06 | 0.62 | +1.14 | 0.40 |
| IL13 | +1.12 | 0.057 | -1.02 | 0.82 | 1.00 | 0.98 |
| RAD50 | +1.02 | 0.20 | -1.20 | 3.5×10^{-6} | +1.08 | 0.062 |
| IL5 | +1.09 | 0.037 | +1.10 | 0.17 | +1.04 | 0.53 |
| IRF1 | +1.10 | 0.35 | +1.12 | 2.9×10^{-6} | -1.01 | 0.62 |
| SLC22A5 | -1.26 | 3.37×10^{-6} | -1.50 | 2.2×10^{-6} | +1.02 | 0.75 |
| SLC22A4 | -1.18 | 0.11 | -1.79 | 1.53×10^{-9} | +1.22 | 0.63 |
| PDLIM4 | +1.10 | 0.0056 | +1.14 | 0.00039 | +1.01 | 0.78 |
| P4HA2 | -1.05 | 0.13 | 1.00 | 0.98 | -1.05 | 0.28 |
| CSF2 | +1.10 | 0.056 | +1.19 | 0.052 | -1.04 | 0.63 |
| IL3 | -1.01 | 0.39 | +1.02 | 0.67 | +1.01 | 0.75 |

10

20

30

40

【 0 2 0 4 】

表 3 A (上掲)には、アップレギュレートが見出された、染色体 5 上の I B D 5 遺伝子座からの遺伝子を列挙する。

IRF1 及び PDLIM4 の発現を炎症及び非炎症の UC S 状結腸生検、(それぞれ、FC + 1.12、 $p = 2.9 \times 10^{-6}$ 及び FC + 1.14、 $p = 0.00039$) で比較した場合、有意ではないが、発現において一致した折り畳み増加が観察された。

【 0 2 0 5 】

表 3 B (上掲)には、正常な患者と比較した場合、IBD 患者においてダウンレギュレー

50

トしたことが見出された、染色体5上のIBD5遺伝子座からの遺伝子を列挙する。炎症UCS字結腸生検を非炎症UCS字結腸生検(FC-1.50、 $p = 2.2 \times 10^{-6}$)と比較した場合、SLC22A5(OCTN2)は、コントロール(FC-1.26、 $p = 3.37 \times 10^{-6}$)と比較して、UC生検においてダウンレギュレートしていた。また非炎症UCS字結腸生検(FC-1.79、 $p = 1.5 \times 10^{-9}$)と比較して、SLC22A4(OCTN1)の発現は、炎症UCS字結腸生検においてダウンレギュレートしていたが、全てのUC生検をコントロールと比較すると、何の変化も観察されなかった(FC-1.18、 $p = 0.11$)。

【0206】

遺伝子発現及び疾患活動性。内視鏡検査を受け、新たに診断されたUC患者からのS字結腸生検(8生検)と、確立されている活性UCを患っている患者からのS字結腸生検(18生検)とを比較した。新たに診断されたUCS字結腸生検において、861配列は、1.5以上の倍率変化及び $p < 0.01$ にアップレギュレートされており、373配列は、1.5未満の倍率変化及び $p < 0.01$ にダウンレギュレートしていた(データは示さず)。

新たに診断された患者において、最もアップレギュレートした3つの遺伝子はSelectin E(FC+10.95、 $p = 1.8 \times 10^{-6}$)、CCL19(FC+7.42、 $p = 4.7 \times 10^{-15}$)及びIL-8(FC+7.32、 $p = 2.9 \times 10^{-7}$)であり、ダウンレギュレートした遺伝子はS100P(FC-6.4、 $p = 2.0 \times 10^{-9}$)を含む。

【0207】

2以上の単純な臨床大腸炎活性指数(SCCAI)を有するUC患者からのS字結腸(27生検)を、2以下のSCCAIを有するUC患者からのS状結腸生検(30生検)と比較した。813の配列がアップレギュレートし、444の配列がダウンレギュレートした。最もアップレギュレートした遺伝子は、急性炎症反応に關与するもので、IL-8(FC+8.86、 $p = 4.4 \times 10^{-12}$)、MMP3(FC+6.5、 $p = 3.2 \times 10^{-19}$)、MMP7(FC+5.3、 $p = 3.4 \times 10^{-21}$)及びDEFA6(FC+4.5、 $p = 2.7 \times 10^{-12}$)であった。ダウンレギュレートした遺伝子には、UGT2B15(FC-4.5、 $p = 0.0013$)、UGT2B17(FC-2.8、 $p = 0.0059$)及びUGT2B10(FC-2.2、 $p = 0.0038$)、細胞解毒及び排出に關与するUGTファミリーの全てのメンバーが含まれる。

【0208】

表3A(上掲)には、正常な患者と比較して、UC患者においてアップレギュレートが觀察された本研究で同定された更なる遺伝子が列挙される一方、表3B(上掲)には、正常な患者と比較して、UC患者においてダウンレギュレートが觀察された、本研究で同定された更なる遺伝子が列挙されている。

【0209】

検討

本研究は、正常なコントロールと、UCを患っている患者、並びに他の原因の大腸炎症を患っている患者における、腸の遺伝子発現を比較して報告した最も正確なマイクロアレイ解析を表す。右及び左結腸で興味深い差異を有する健常な結腸における遺伝子発現の解剖学的パターンの重要な情報が、本データにより提供される。更に、UCにおける調節不全の遺伝子発現の特徴についての強力な証拠が提供され、これら全てのデータが、正常な生理学的ホメオスタシスにおける遺伝子発現、及びUCの病理過程に、価値ある見識を提供する。

【0210】

このデータセットの長所は、実施した研究規模、疾患表現型の細心の評定、各生検に対する解剖学的部位の実証性、及び試料をプールするための交絡的影響の回避性にある。よって、過去の研究を妨害していたバックグラウンド変動のかなりの量を除去することができる(Marshall E. Science 2004;306:630-631; Ioannidis JP. Lancet 2005;365:454-455)。

10

20

30

40

50

更に、本研究は、非特異的な急性炎症のサインの強度の潜在的に重要な交絡的影響に対処している。コントロールとUCを患っている患者からの静止状態の生検を比較し、これらの分析から、UCの病原において価値ある病識を得ることができた。また更に、本研究により、新たに診断された疾患を患っている患者の割合へのアクセスが提供され、遺伝子発現における処置に関連した変化が克服された。我々の研究の更なる長所は、リアルタイムPCR分析が、関心ある候補遺伝子の一つではなく全ての発現における有意な変化を常に確認でき、データの解釈に関連して、信頼性がかなり増加しているという事実にある。

これは、健常な成人の結腸に沿った多くの遺伝子の発現における勾配を示す最初のマイクロアレイ研究である。これらの結果は、盲腸、横行結腸、下行結腸及びS状結腸からの生検を比較した場合に、発現パターンに何の有意な差異は観察されなかったコストロ及び共同研究者からのデータ(Costello CM, 等PLoS Med 2005;2:e199)とは対照的である。これらのデータセットにおいて観察された差異は、コストロがコントロール及び疾患患者で研究したのに対し、非炎症コントロール試料でのみ見られる我々の分析により説明され得る。

10

20

30

40

50

【0211】

発生経路に關与する遺伝子 - H O Xファミリー及びヘッジホッグシグナル伝達経路が、健常な結腸の解剖学的長さに沿って、最も差次的に調節されることが明らかとなった。H O X A 1 3は、尾腸の発生において重要な役割を担っていることが示されており、遺伝子における変異により、泌尿生殖器奇形に至り(De Santaら, Development. 2002; 129; 551-561)、興味深いことに、H O X B 1 3発現が遠位左結腸からの結腸直腸腫瘍においてダウンレギュレートされることが示されている(Jung 等 Br J Cancer. 2005;92:2233-2239)。

【0212】

また、ヘッジホッグシグナル伝達経路は、ヒトの胃腸管系の正常な成長及び発育にとって重要であり、この経路に關与する遺伝子における変異のため、腸に影響を及ぼす多くの先天性疾患である。(Lees 等 Gastroenterology. 2005;129:1696-1710) G L I - 1はヘッジホッグシグナル伝達経路の主要なエフェクター分子の一つであり、G L I - 1遺伝子はI B D 2遺伝子座内の、UCに関連していることが以前から示されている領域に領域に存在している。(Parkes 等 Am J Hum Genet. 2000;67:1605-1610; Satsangi等, Nat. Genet. 1996;14:199-202)また本研究からのデータにより、G L I - 1が、UCを患っている患者からの非炎症生検と比較して、炎症UC生検においてダウンレギュレートしていることが示唆される。我々のユニットからの近年のデータでは、UCとG L I - 1遺伝子の変異との間の強い関連性が示されている。

【0213】

V a r n a t及び共同研究者により公開された更に最近のデータでは、P P A R が、インド人のヘッジホッグ、ヘッジホッグシグナル伝達経路における他の主要なエフェクター分子の発現をダウンレギュレートすることにより、パネート細胞分化を負に調節することが示唆されている(Varnat 等 Gastroenterology. 2006;131:538-553)。我々のデータでは、コントロール及びUCを患っている患者からの非炎症生検と比較して、炎症UCを患っている患者の結腸において、デフェンシン5及び6のアップレギュレートが見られ、免疫組織化学的検査及びインサイトハイブリダイゼーションでは、このことが、パネート細胞異形成によりかなり媒介されることが示されている。UCを患っている患者において、ヘッジホッグシグナル伝達経路における未だ不確定の欠陥により、パネート細胞分化の未調節、パネート細胞異形成、デフェンシン5及び6発現の増加、及び粘膜炎症に至ると推測されることは興味深い。

【0214】

実際、本研究で最も刺激的な観察は、UCを患っている患者におけるデフェンシン5及び6のアップレギュレートを示すデータである。デフェンシン5及び6は自然免疫反応の一部である、小さなカチオン性タンパク質であり、グラム陽性及びグラム陰性菌に対して強力な抗菌性を有する。(Ouellette AJ. Springer Semin Immunopathol. 2005;27:

133-146)それらは、健常な結腸では、回腸末端にかなり限定され、粘膜に放出される、パネート細胞にプロ分子として保存され、トリプシンにより、活性な抗菌ペプチドに切断される。(Ghosh等. *Nat Immunol.* 2002;3:583-590)

【0215】

我々のデータセットにおいて、高レベルのデフェンシン発現は、UCを患っている患者、及び非炎症コントロールの回腸末端生検において観察された。コントロール患者及び静止状態のUCを患っている患者における発現レベルは、生検が回収された位置が、結腸-上行結腸、下行結腸及びS状結腸において更に遠位になる場合に低下した。しかしながら、炎症UC生検においては、デフェンシン5及び6の双方での発現増加が、生検を行った各解剖学的部位で観察された。Lawrance及び共同研究者は、デフェンシン5及び6が、コントロールと比較して、UCを患っている患者においてアップレギュレートしていることを言及している(Lawrance等 *Hum Mol Genet.* 2001;10:445-456)が、RNAは外科的切除から抽出され、これらの検体の解剖学的位置についての詳細は与えられていない。

10

【0216】

回腸末端においてCDを患っている患者でのデフェンシン5及び6の発現を試験する最近のデータでは、発現レベルが、コントロールの回腸末端組織と比較した場合、炎症の度合いに関係なく低下し、これはCDに観察される回腸末端表現型に原因があると示唆される。(Wehkamp等 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:18129-18134)我々のデータセットにおけるデフェンシン5及び6発現増加の観察が、病因に関連した一次的現象であるろうとなかろうと、又はそれが、細菌浸潤に対して、以前から損傷を受けていた上皮表面を保護する二次的現象であるろうとなかろうと、疾患感受性に関連し、これらのペプチドの機能を変化させるこれらの遺伝子内の重要な変異について探すことにより解決され得る。

20

【0217】

我々の結果の全てではないが多くの結果が、IBDにおける2つの重量なマイクロアレイ論文と広く一致したことは、興味あることである。Lawrance及び共同研究者からのデータ(Lawrance等 *Hum Mol Genet.* 2001;10:445-456)と一致して、我々は、UCにおいて、S100A8及びA9、及びデフェンシン5及び6がアップレギュレートしていることを示す。しかしながら、本研究とLawranceの研究において、IBD2遺伝子座において差次的に発現したプローブでは、重複は観察されなかった。Dieckgraefe及び共同研究者(Dieckgraefe等. *Physiol Genomics.* 2000;4:1-11)は、我々のデータと一致して、多くのMMP遺伝子のアップレギュレートを観察しており、REGファミリーの興味あるメンバーが、おそらくパネート細胞異形成の結果として、UCを患っている患者の結腸においてアップレギュレートしていることを示した。

30

【0218】

我々のデータセットにおけるABC B1のダウンレギュレートは、非常に興味のあることであり、Langman、Dieckgraefe及びLawrance及び共同研究者からの初期のマイクロアレイデータと一致している。(Dieckgraefe等. *Physiol Genomics.* 2000;4:1-11; Lawrance等 *Hum Mol Genet.* 2001;10:445-456; Langmann等 *Gastroenterology.* 2004;127:26-40)これに加えて、我々は、ABC B1における発現が、UCでのS状結腸で最も低い遺伝子発現を有する減少勾配を示すことを観察している。このパターンの発現は、おそらくUCにおけるP-糖タンパク質(ABC B1の遺伝子産物)の機能損失に関連した仮説と一致し、UCの臨床症状と一致する。現在のデータは、近年の遺伝的及び動物機能のデータで強調されているように、UCの病因におけるABC B1の重要性を例証している。(Moodie等 *Glucocorticoid access and action in the rat colon: expression and regulation of multidrug resistance 1a gene (mdr1a), glucocorticoid receptor (GR), mineralocorticoid receptor (MR) and 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11BHDS2).* 197版. 2003)。

40

【0219】

50

A B C B 1 は、P-糖タンパク質 170、腸の障壁防御及び異物代謝に關与する排出表皮トランスポーターをコードする。それは、A B C B 1 との相同性を共有しているタンパク質の全クラスを分析すると、A B C トランスポーターの 48 の遺伝子のうち 6 (12.5%) が、U C においてはかなり調節不全であることと関連しており、U C の病因における、このクラスのタンパク質の重要な役割が示唆される。

【0220】

L a n g m a n n により作製されたデータに対して、我々は、転写レギュレータープレグナン-Xレセプターの発現において、何の変化も観察しなかった。これらの負のデータは、ハプロタイプタギングアプローチを使用し、エディンバラの I B D 集団で実施した遺伝子研究と一致し、A B C B 1 遺伝子と U C トン及び愛大には関連性がある (Ho 等 Hum Mol Genet. 2006;15:797-805) が、プレグナン-Xレセプターと U C との間に関連性はない (Ho GT 等 Gut. 2006;55:1676-1677)。研究設定の側面は、我々の分析が生検の炎症状態及び解剖学的部位を考慮する場合、我々のデータと L a n g m a n n 及び共同研究者とのデータとの間に観察される差異を説明するものである。我々のデータセットにおいて、我々は試料をプールせず、よって多数のマイクロアレイを実施したのに対し、L a n g m a n n 及び共同研究者は回腸末端及び結腸生検をプールしたもので、方法におけるこの差異が異なる結果の主な原因であり得る。

10

【0221】

マトリックスメタロプロテイナーゼ (M M P) は、形態形成及び組織リモデリング中、余分な細胞マトリックス成分の分解に關与している最終段階のエフェクター分子である、23 を越える亜鉛依存性酵素のファミリーを含む。(Brinckerhoff 等 Nat Rev Mol Cell Biol. 2002;3:207-214) 我々のデータと一致して、I B D を患っている患者における以前の研究では、非炎症生検及びコントロール生検と比較した場合、炎症生検において、M M P 3 の際だった発現増加が示されている。(Heuschkel 等 Gut. 2000;47:57-62; von LB 等 Gut. 2000;47:63-73) また、M M P 3 - / - マウスについてのデータには、細菌のクリアランス遅延、M M P 7 における代償性増加、及び固有層への C D 4 + T リンパ球補充の低減が示されている。(Li 等 J Immunol. 2004;173:5171-5179) 更に、近年のデータには、結腸細胞系において用量依存性好中球補充を引き起こす C X C L 7 によって媒介される M M P 3 の炎症誘発効果が示されている。(Kruidenier 等 Gastroenterology. 2006;130:127-136)

20

【0222】

我々のデータセットにおいて、我々は、我々の非炎症コントロールと比較して、我々の炎症コントロールにおける M M P 3 の発現が低下していることを観察しており、U C において M M P 3 及び M M P 7 発現で観察された変化が、疾患に特異的であることが示唆される。ドイツ人集団における 5 A 変異体の伝達不均衡試験により、C D には関係するが、U C には関係しないことが示され、イギリス人集団に置き換えられるものではなかった。(Pender 等 J Med Genet. 2004;41:e112)

30

【0223】

また我々は、このデータセットを使用し、特に I B D 2 及び I B D 5 における全ゲノム分析により、関連した感受性遺伝子座に対する遺伝子マッピングの相対発現を分析する。本データは、遺伝子の同定、繊細マッピング研究の相補結果、及び現在進行中の全ゲノムケースでのコントロール研究に使用されるであろう。この点で、2000年に全ゲノムスクニングにより最初に発見された、多くの魅力ある候補遺伝子を含むサイトカインクラスターをスパンする I B D 5 遺伝子座に關連した我々のデータを再検討することは、非常に興味のあることである。(Rioux 等 Am J Hum Genet. 2000;66:1863-1870; Ma 等 Inflamm Bowel Dis. 1999;5:271-278) I B D 5 結合の間隔をスパンするタイトな結合不平衡が、以前の遺伝子研究を制限しており、これらはこの領域内の感受性遺伝子を同定するために十分な力がなかった。(Waller 等, Gut. 2006;55:809-814; Fisher 等 Hum Mutat. 2006;27:778-785; Noble 等 Gastroenterology. 2005;129:1854-1864)

40

【0224】

有機カチオントランスポーター S L C 2 2 A 5 (O C T N 2) をコードする位置的な候補

50

遺伝子のダウンレギュレーションが、UC生検をコントロール生検と比較した場合に、SLC22A4(OCTN1)及びSLC22A5の双方で観察され、ダウンレギュレーションは非炎症S字結腸生検と比較して、炎症UCS字結腸生検でも観察された。これらの刺激的データにより、これらの遺伝子の発現低下が、結局のところ、UCの病原に關与している可能性が示唆され、よって、これらのデータはこれらの遺伝子における関心を維持している。Peltekova及び共同研究者は、これらの遺伝子における2つの変異体-SLC22A4(1672C T)及びSLC22A5変異体(-207G C)が、CDに対する疾患感受性に寄与していることを示唆している(Peltekova等 Nat Genet. 2004;36:471-475)が、この研究において、これらの変異についての遺伝子型が同定された少数の患者で発現を比較した場合、野生型とTCホモ接合体患者との間には、発現に何の変化も観察されなかった(データを示さず)。また、双方がIBD5におけるもっともらしい候補であるIRF-1及びPDLIM4の発現は調節不全であり、現在のところ、この遺伝子座に關連する不正確さが強調されている。IBD2遺伝子座内においては、一連の調節不全遺伝子が本データセットで同定され、GLIのみが詳述された変異分析にかけられる。

【0225】

結論として、これらのデータは、UC及びコントロールの患者の回腸末端及び結腸の全ゲノムの発現を正確に特徴付けしている。本研究は、健常な結腸における遺伝子発現の領域差に新たな見識を提供するものであり、UCにおける過去の研究をかなり拡大する。これらのデータは、小腸炎の多くの重要なレギュレーター、特にデフェンシンファミリー、ヘッジホッグシグナル伝達分子、及びマトリックスメタロプロテイナーゼを同定する。

【0226】

実施例3 - 免疫組織化学検査

IBD生検中におけるDefA6の発現

デフェンシン6は、通常、小腸陰窩上皮においてパネート細胞により発現し、結腸上皮細胞では発現しない。我々は、Agilentマイクロアレイを使用し、潰瘍性大腸炎及びクローン病患者において、また生検溶菌液でのtaqmanで、RNAレベルでDefA6の発現が増加することを観察した。この実験は、DefA6タンパク質発現の増加がホルマリン固定された結腸生検において見られるかどうかを評価するものである。

予期したように、我々の実験は、炎症の組織的証拠のない非IBDコントロール患者からの結腸生検において、DefA6の染色がなかったことを示す。また我々は、顕微鏡的大腸炎と診断された非IBDコントロール患者も評価した。その患者において、DefA6はS状結腸陰窩上皮細胞に存在していた。

【0227】

潰瘍性大腸炎患者において、21人の患者では、S状結腸、下行結腸、横行結腸、又は直腸の陰窩上皮細胞で、散在化及びクラスター化したDefA6が染色された。21人の陽性患者の20人には、彼らの生検組織に慢性又は慢性-活動的炎症の組織学的証拠が見られた。残った患者には、主として急性(好中球の)炎症があった。結腸に陽性のDefA6染色がある患者は非炎症生検を有さなかった。

18人の潰瘍性大腸炎患者では、結腸上皮にDefA6染色の証拠がなかった。これらの患者の多く(10)に、生検組織に炎症の組織学的証拠はなかった。残った患者の6人には、主として好中球炎症(急性炎症)があり、2人には慢性/慢性-活動的炎症があった。

【0228】

要約すると、潰瘍性大腸炎におけるDefA6発現は、生検に観察される局所的炎症状態と關連していると思われる。非炎症生検のいずれも、DefA6染色されなかった。更に、慢性又は慢性-活動的炎症を患っている患者は、急性炎症を患っている患者より、より陽性DefA6染色となるとと思われる。

【0229】

実験設計：炎症状態のスコアリングは、炎症細胞型の優位性に基づいた：好中球優位 = 急性炎症；好中球及び単核炎症細胞 = 慢性活性；及び単核炎症細胞優位 = 慢性。

表9は組織学的所見を示す。DefA6の発現は「-」、「+」又は「++」で示し、

10

20

30

40

50

対応する炎症スコアを幾つかの場合に提供する。

表 9

| 患者 | HP # | 組織 | DefA6 | 炎症状態 |
|-----|----------|------|-------|-------------|
| 115 | HP-19891 | S状結腸 | + | 微小な結腸炎 |
| 119 | HP-19893 | 下行結腸 | - | |
| 122 | HP-19898 | S状結腸 | - | |
| 124 | HP-19899 | S状結腸 | - | |
| 125 | HP-19900 | S状結腸 | NA | これは回腸末端部である |
| 125 | HP-19901 | S状結腸 | - | |
| 130 | HP-19905 | 直腸 | - | |
| 131 | HP-19906 | S状結腸 | - | |
| 135 | HP-19908 | S状結腸 | - | |
| 136 | HP-19909 | S状結腸 | - | |
| 222 | HP-19912 | 直腸 | + | 慢性活動期 |
| 223 | HP-19914 | S状結腸 | + | 慢性 |
| 224 | HP-19916 | S状結腸 | + | 微小慢性活動期 |
| 225 | HP-19919 | S状結腸 | - | 炎症無し |
| 226 | HP-19920 | 下行結腸 | - | 炎症無し |
| 227 | HP-19922 | S状結腸 | + | 微小慢性活動期 |
| 230 | HP-19924 | S状結腸 | - | 炎症無し |
| 230 | HP-19925 | 直腸 | - | 炎症無し |
| 231 | HP-19926 | 下行結腸 | - | 急性炎症 |
| 233 | HP-19927 | S状結腸 | - | 炎症無し |
| 234 | HP-19928 | 下行結腸 | - | 微小慢性活動期 HP |
| 235 | HP-19929 | 直腸 | - | 急性炎症 |
| 238 | HP-19930 | S状結腸 | + | 慢性活動期 |
| 239 | HP-19932 | 直腸 | + | 微小慢性 |
| 240 | HP-19933 | 直腸 | - | 微小急性 |
| 241 | HP-19934 | 直腸 | - | 炎症無し |
| 244 | HP-19935 | S状結腸 | - | 炎症無し |
| 246 | HP-19936 | S状結腸 | + | 微小慢性 |
| 247 | HP-19937 | 直腸 | + | 微小慢性 |
| 248 | HP-19938 | 直腸 | + | 微小慢性 |
| 249 | HP-19939 | 直腸 | + | 慢性活動期 |
| 250 | HP-19940 | S状結腸 | + | 慢性活動期 |
| 251 | HP-19941 | 直腸 | + | 慢性活動期 |
| 253 | HP-19942 | S状結腸 | + | 慢性活動期 |
| 255 | HP-19943 | S状結腸 | NA | 断片化部分 |
| 256 | HP-19944 | S状結腸 | + | 慢性活動期 |
| 257 | HP-19947 | 直腸 | ++ | 慢性活動期 |
| 258 | HP-19948 | 直腸 | + | 慢性 |
| 259 | HP-19949 | S状結腸 | ++ | 慢性活動期 |
| 260 | HP-19950 | S状結腸 | + | 慢性活動期 |
| 261 | HP-19951 | S状結腸 | - | 穏やか急性 |
| 262 | HP-19952 | S状結腸 | - | 急性炎症 |
| 262 | HP-19953 | 直腸 | - | 炎症無し |
| 263 | HP-19954 | 直腸 | - | 炎症無し |
| 265 | HP-19955 | S状結腸 | + | 慢性活動期 |
| 266 | HP-19956 | 直腸 | + | 急性炎症 |
| 267 | HP-19957 | 横行結腸 | ++ | 慢性活動期 |
| 270 | HP-19958 | 直腸 | - | 慢性活動期 |
| 245 | HP-19965 | S状結腸 | - | 炎症無し |
| 245 | HP-19966 | 直腸 | - | 急性炎症 |

10

20

30

40

【 0 2 3 0 】

実施例 4 - 生殖系列 G L I 1 変異の分析

潰瘍性大腸炎 (UC) 及びクローン病 (CD) は、かなりの罹患率を有する高有病率の多遺伝子性慢性炎症性腸疾患 (IBD) である。ヘッジホッグ (HH) シグナル伝達経路は、胃腸管発育、ホメオスタシス、及び悪性腫瘍において、生命維持の役割を担っている。我々は

50

、IBDを患っている患者における、GLI1 (IBD2 結合領域、12q13)での生殖系列変異を同定した。このIBD-関連変異体は、還元型機能を有するGLI1タンパク質をコードするため、還元GLI1活性を有するマウスが化学的に誘発された大腸炎に対して感受性である。遺伝子ワイドのハプロタイプ-タギングアプローチを使用し、生殖系列GLI1変異を、全体で5000人以上の、IBD患者、及び北ヨーロッパ(スコットランド、イングランド及びスウェーデン)の健常なコントロールの3つの独立した集団で試験した。対数尤度分析において、スコットランド及びイングランドでは、GLI1はIBD、主としてUCと関連していた($p < 0.0001$)。GLI1のエクソン12(Q1100E)における非同義SNP(rs2228226C/G)は、1.194(C.I = 1.09 - 1.31、 $p = 0.0002$)のプールされたオッズ比を有し、強く関与していた。GLI1変異体を、ルシフェラーゼアッセイにおける転写活性について、インビトロで試験した。Q1100Eは、GLI1のC末端近傍の保存モチーフ内に入り；変異GLI1タンパク質は、インビトロで還元トランス活性化機能を示した。相補的な発現研究において、我々は、GLI1、PTCH及びHHIPを含む、結腸HH反応が、UCを患っている患者においてダウンレギュレートしていることを言及する。最後に、GLI1+/-マウスを、DSS-誘発性大腸炎に対する感受性について試験した。臨床反応、組織検査及び炎症サイトカインの発現を記録した。GLI1+/-マウスでは、野生型と比較して、かなりの罹患率及び死亡率を有する重度の小腸炎を急速に発症した。局所骨髄細胞はHHシグナルの直接標的であることが示され、サイトカイン発現研究により、このモデルにおけるIL-12、IL-17及びIL-23の強いアップレギュレートが明らかとなった。GLI1を介したHHシグナル伝達は、急性炎症誘発に対する腸反応の適切な調製にとって必要である。還元GLI1機能はIBD病変形成の素因になりやすく、新規の治療手段が提案される。

【0231】

潰瘍性大腸炎(UC; MIM191390)及びクローン病(CD; MIM266600)は、高い有病率(北ヨーロッパ及び北アメリカで、100000人当たり200-400ケース[Loftus EV, Jr. (2004) *Gastroenterology* 126: 1504-1517])を有する、慢性で再発性の炎症性腸疾患(IBD)であり、かなりの罹患率に関連している。正確な病原メカニズムは理解されていないが、幾つかの系統の証拠が、腸内細菌に反応する、最も重要な調節不全宿主に関連している[Xavier RJ, Podolsky DK (2007) *Nature* 448: 427-434]。疫学データ、詳細な分子研究、及びゲノム-ワイド関連研究は、UC及びCDが感受性遺伝子座を共有する多遺伝子性疾患に関連していることを強く示唆している(IL-23R、IL-12B、及びNKX2.3 [Wellcome Trust Case Control Consortium (2007) *Nature* 447: 661-678; Duerr等(2006) *Science* 314: 1461-1463; Parkes等(2007) *Nat Genet* Jul;39(7):830-2. Epub 2007 Jun 6])が、他では異なり：NOD2、ATG16L1及びIRGMは特異的CD遺伝子であり；ECM1遺伝子座はUCに関連している[Parkes等(2007) *Nat Genet* Jul;39(7):830-2. Epub 2007 Jun 6; Fisher等(2008). *Nat Genet* 40(6):710-2. Epub 2008 Apr 27; Hampe等(2007) *Nat Genet* 39: 207-211; Hugot等(2001). *Nature* 411: 599-603; Ogura Y等(2001). *Nature* 411: 603-606]。染色体12q13上のIBD2遺伝子座(OMIM 601458)は、最初、UC及びCD患者の双方に関連しているUKゲノム-ワイドスキャン(D12S83でのピークLODスコア5.47) [Satsangi等(1996). *Nat Genet* 14: 199-202]において同定された。最近の研究では、IBD2がUC、特に広範囲の疾患、おそらくCD感受性において、更に少ない方法で寄与している[Achkar等(2006). *Am J Gastroenterol* 101: 572-580; Parkes M等(2000) *Am J Hum Genet* 67: 1605-1610]。IBD2遺伝子座にマッピングする強力な候補遺伝子はGLI1であり、分泌ヘッジホッグ(HH)シグナルを変換する3つの関連GLI転写因子の一つである。HHシグナル伝達は腸発育、ホメオスタシス及び悪性腫瘍の鍵となるものであるが、IBDにおいては、入念に研究されていない[Lees等(2005) *Gastroenterology* 129: 1696-1710]。腸の発育において、音(SHH)及びインディアンヘッジホッグ(IHH)は、上皮から間葉性反応パッチ(mesenchymal receptor patched)(PTCH)にバラク

リンシグナルを提供する。P T C Hは、膜タンパク質平滑化(membrane protein smoothened)(S M O)及びジンクフィンガー転写因子G L I 1、G L I 2及びG L I 3を介して、組織パターン及び細胞運命を直接コントロールする[Madison等(2005) Development 132: 279-289]。慢性損傷、炎症及び修復はI B Dの重要な側面であり、よって、H H経路は筋肉[Pola等(2003) Circulation 108: 479-485]、肝臓[Jung等(2008) Gastroenterology 134: 1532-1543; Omenetti等(2008) Gut May;134(5):1532-43. Epub 2008 Feb 14.]、及び肺[Stewart等(2003) J Pathol 199: 488-495; Watkins等(2003) Nature 422: 313-317]を含む、幾つかの他の組織におけるこれらのプロセスに中心的に関与していることが妥当である。実際、H Hシグナル伝達は、S H HがTリンパ球発生[EI Andaloussi等(2006). Nat Immunol 7: 418-426]、成人のヒトC D 4 + T細胞活性化[Lowrey等(2002) J Immunol 169: 1869-1875; Stewart等(2002). J Immunol 169: 5451-5457]、及び脾臓における骨髄細胞の変異[Varas等, (2008) J Leukoc Biol Jun;83(6):1476-83. Epub 2008 Mar 11]にとって重要であるため、免疫反応では中心的な役割を担っている。またH H経路の成分の調節不全は、バレット食道、慢性胃炎及びI B D[Nielsen等, (2004) Lab Invest 84: 1631-1642]を含む、腸の炎症疾患において留意されている。大腸鏡検査の生検のマイクロアレイ遺伝子発現解析を使用し、近年、我々は、G L I 1が非炎症試料と比較して、炎症U Cにおける腸粘膜でダウンレギュレートしていることを示した[Noble等(2008) Gut. Oct; 57(10):1398-405. Epub 2008 Jun 3]。G L I 1及びI B D感受性の間の可能性のある関連性を更に探究するために、我々は、遺伝子-ワイドハプロタイプ-タギングアプローチを使用し、北ヨーロッパの幾つかの集団において、G L I 1遺伝子座におけるハプロタイプ変異を試験した。我々は、G L I 1のC末端領域において、非同義S N Pに強く関与している、I B Dとの有意の関連性を同定した。G L I 1転写活性化において、インビトロで50%低減を示す関連変異体の機能分析により、機能的変異体が、病気の危険性を増加させ得ることが証明された。これらの知見は、機能的G L I 1タンパク質の投与量を減らすことが大腸炎症において重要な役割を担うかもしれないという仮説に、我々を導いた。このことを直接試験するために、我々は、デキストラン硫酸ナトリウム(D S S)を、G L I 1 + / - マウス及びそれらの野生型(W T)及びそれらの同腹仔に投与し、急性小腸炎を誘発させた。G L I 1 + / - マウスには、重度の大腸炎が急速に発症し、機能的G L I 1活性が、マウス及び人間における炎症性刺激に対する反応にとって極めて重要であることが示唆される。

10

20

30

【 0 2 3 2 】

被験者及び試料。表10には、スコットランド人及びケンブリッジのI B D集団における、詳細なデモグラフィック及び表現型データが提供される。(H C - 健常なコントロール; C D - クロウン病; U C - 潰瘍性大腸炎; I C - 未定の大腸炎。

表 10

| | スコットランドパネル | ケンブリッジパネル |
|----------------------------|---|---|
| 総数 | 2183 (1374 HC; 474 UC; 335 CD) | 2337 (589 HC; 928 UC; 737 CD; 83 IC) |
| 性別 – 男性% | HC 48.7%; UC 52.0%; CD 39.6% | HC 45.0%; UC 52.6%; CD 37.0% |
| 診断時の年齢中央値/ 採用 – 歳 (IQR) | HC 50.0 (43.0-55.0) UC 34.1 (25.2-49.9) CD 27.8 (20.8-41.1) | HC 60.0 (53.0-69.0) UC 36.7 (26.84-50.35) CD 26.1 (20.3-37.2) |
| CD位置 | | |
| 回腸末端 (L1) | 38.4% | 31.8% |
| 結腸 (L2) | 36.5% | 36.5% |
| 回腸結腸 (L3) | 25.1% | 31.7% |
| UC位置 | | |
| 直腸炎 (E1) | 17.3% | 14.8% |
| 左側結腸炎 (E2) | 40.5% | 34.1% |
| 広範囲の結腸炎 (E3) | 42.2% | 51.1% |
| CD 5年性状 | | |
| 炎症 (B1) | 64.8% | 52.3% |
| 狭窄 (B2) | 14.8% | 35.2% |
| 穿通 (B3) | 20.3% | 12.5% |
| 肛門周囲包含 (p) | 17.4% | 24.4% |
| CD手術 | CD 59.3% UC 18.5% | CD 52.0% UC 11.8% |
| CD診断時の喫煙 | 有り 40.7% 無し 47.4% 元喫煙 11.9% | 有り 41.8% 無し 45.0% 元喫煙 13.2% |
| UC診断時の喫煙 | 有り 19.0% 無し 49.5% 元喫煙 31.5% | 有り 12.1% |

10

20

30

40

50

【 0 2 3 3 】

遺伝子型同定：スコットランド及びスウェーデン：ゲノムDNAを、過去に記載されたような修正塩析技術、及び核子キットを使用し、血液試料から抽出した。対立遺伝子識別のために、Taqmanシステムを使用して遺伝子型を誘導し；アッセイは、イルミナプラットフォームにおいて遺伝子型を同定する、SNP rs10783819、rs3809114、rs507562、rs542278、rs730560、rs1669296、rs775322を除き、Taqman SNP遺伝子型同定アッセイ(7900HT sequence detection system; Applied Biosystems)として、Applied Biosystemsから入手可能である。各Taqmanアッセイの正確性を、100%一致を有する5%の場合では分析を繰り返すことによりチェックした。コントロール集団における遺伝子型分布は、全ての

SNPについて、ハーディ-ワインベルグ平衡($p > 0.01$)と一致した。Taqmanにより誘導できなかった4つのtSNPについては、遺伝子型は直接配列化することにより得た。ケンブリッジ：核子キットを使用して、DNAを抽出した。CDの症例及びコントロールの遺伝子型同定を、ABI7900HT分析器(Applied Biosystems)を使用する、Taqman二対立遺伝子識別システムを用いて実施した。UC症例の遺伝子型同定を、1536SNP Golden Gate bead array(Illumina)を使用して実施した。プラットフォーム間の一致は、それぞれ100%及び97.9%の一致率を有するSNPs rs2228224及びrs2228226については、92のUC症例の遺伝子型を同定することにより評価し、プラットフォーム間の系統的バイアスの証拠はなかった。症例及びコントロール集団における遺伝子型同定は、全てのSNPについて、ハーディ-ワインベルグ平衡($p > 0.01$)と一致した。

10

【0234】

マイクロアレイ及びQPCRによる遺伝子発現。患者のコホートを、67のUCを患っている患者、53のCD患者及び31の健常なコントロール(HC)からなるマイクロアレイ研究に使用した。デモグラフィクスについては、マイクロアレイデータセット及びQPCR方法の生成[Noble等(2008) Gut. Oct;57(10):1398-405. Epub 2008 Jun 3を参照]。

【0235】

DSS誘発性大腸炎の導入及び組織学的分析。混合ケージ(C57BL/6 バックグラウンド)において、野生型GLI1+/+ lacZ又は野生型同腹仔コントロールの2~4のグループに、飲み水に入った3%DSSを、4-6日間投与した。消費されるDSSの量は、WTとGLI1+/-動物の間で有意な差はなかった(データを示さず)。GLI1+/-動物は、それらのWT同腹仔よりも体重が重くなる傾向にあった(GLI1+/-動物の平均=28g、WT動物については24g)。よって、DSS処理して体重を適合させたWT C57BL/6動物(n=4)を、GLI1+/-動物及びWT同腹仔と共に試験した。WT同腹仔と体重適合させたC57BL/6の間には、何の差異もないことが証明された。全ての動物を下痢、血便及び体重減少について、毎日モニターした。臨床スコアリングは次の通りである：0=症状なし、1=下痢、2=血便、4=重度の直腸出血及び不動といった病的状態/死亡。組織診断について、同じ動物の等しい長さ及び位置の大腸組織のセグメントを、4%のパラホルムアルデヒドにおいて一晚固定し、脱水し、パラフィンで浸潤させ、5µmに切断した。スライドをヘマトキシリン/エオシンで染色し、組織源をかくして、胃腸の病理学者(HA)により、組織学的にスコアリングした。

20

30

【0236】

タンパク質変異原性及びルシフェラーゼアッセイ。イメージクローン#3531657から、GLI1E1100を増幅させ、pCMVTag2bにクローン化した。製造者のプロトコルに従い、クイックチェンジ(QuikChange)II部位特異的変異原性キット(Stratagene)を使用し、点変異を誘発させることにより、GLI1 Q1100を得た。8xGli-ルシフェラーゼ、m8xGli-ルシフェラーゼ(変異したGli部位)及びGli2Nをコードするプラスミドは、Andrzej・Dlugosz博士からの贈り物である。293T細胞を12ウェルプレートに植え付け、0.7µg/ウェルの転写因子、0.4µg/ウェルのレセプタープラスミド、及び2ng/ウェルのpRL-TK Renilla(Promega)を用いて形質移入させ、製造者のプロトコルに従い、ドゥラ(Dur)-ルシフェラーゼレポーターキット(Promega)を使用し、形質移入の36時間後に、ルシフェラーゼ発現について試験した。ホタルのルシフェラーゼ発現を、ウミシイタケに対して十分に標準化させ、倍率変化を8xGli-ルシフェラーゼ 形質移入単独と比較することにより算出した。

40

【0237】

サイトカイン発現QPCR全結腸mRNAを、トリゾールを使用して収集し、RNイージーミニキット(Qiagen)を使用して、DNAアーゼ消化で、RNAを浄化した。iScript cDNA合成キット(Biorad)を使用して、cDNAを合成し、SybrGreen QPCRを、Biorad iCycler機で実施した。発現レベルをGAPDHに対

50

して標準化し、スチューデント t 検定を使用し、統計的分析を実施した。

【0238】

統計的分析。t SNP のハプロタイプ頻度を、期待値最大化アルゴリズムを使用して推測し、これらを、ハプロタイプ頻度が、EH 及び PM プログラマーに実施される場合に、各ケースとコントロールとで異なるかどうかを試験するために使用した。n - 1 の自由度の χ^2 分布(ここでは、n = 可能なハプロタイプの数)を有する試験統計値 $2 * (\ln(L \text{ ケース}) + \ln(L \text{ コントロール}) - \ln(L \text{ ケース} / L \text{ コントロール}))$ を算出し、データを 10000 回並び替えることにより、経験的 p 値を得た。ハプロビュー(Haploview)プログラム v 3.2 (www.hapmap.org) を使用することにより、ハプロタイプを試験した。適切であるならば、与えられ両側 p 値と 95% 信頼区間(C.I.) で提示されたオッズ比(OR)を用いて、個々の SNP 分析を、 χ^2 又はフィッシャー直接検定を使用して実施した。SNP rs2228226 のメタアナリシスは、固定効果モデル(R-software package)を使用するマンテル-ヘンツェル法を用いて実施した。偽陽性報告の確率の算出法の詳細を、補足的方法に提供する。発現プロファイルをマンホイットニーの U 検定及びクラスカル-ワリス検定を使用して分析し、全てのデータセットの非パラメータ分布を推測した(GraphPad Prism 4, GraphPad Software Inc.)。

10

【0239】

結果

GLI1 における遺伝子全体の変異は、IBD と関連しており、スコットランド人の集団では、非同義 SNP (rs2228226) に起因していた。

20

4 つのマルチマーカータギングシングルヌクレオチド多形性(tSNPs; $r^2 = 0.8$) を同定し(rs3817474、rs2228225、rs2228224、及び rs2228226)、頻度 > 1% のハプロタイプで検出される GLI1 のハプロタイプ変異を記述した。我々は、474 の UC 及び 335 の CD 症例、及び 1364 の十分に適合させた健常なコントロールからなるスコットランド人の IBD 集団における、これら 4 つの tSNP の遺伝子型同定を実施した(表 10)。ついで、我々は、GLI1 及び IBD 感受性の関連性を試験するために、モデル-フリー分析を使用した。スコットランド人の集団において、我々は、IBD ($p < 0.0001$) と UC ($p < 0.0001$) との間の極めて有意な関連性、及び境界有意性 ($p = 0.03$) の CD との関連性を示した。ハプロビューにおける個々の推定ハプロタイプ頻度の分析において、3 つの共通したハプロタイプが記述された(データを示さず)。我々は、この影響を、166 の CD 及び 170 の UC 患者において、フェーズ II ハップマップ(HapMap)データから選択される付加的な 7 つのハプロタイプタギング SNP の遺伝子型を同定することにより、GLI1 遺伝子が制限され、隣接ブロックにタグ化されることを確認した。このことは、隣接遺伝子に伸長しない GLI1 スパニングハプロタイプブロックの存在により確認された(INHBE 及び ARHGA P9) (データを示さず)。

30

【0240】

表 11 は、スコットランド人、イングランド人、スウェーデン人の健常なコントロール(HC)、及び炎症性腸疾患(IBD)、クローン病(CD)及び潰瘍性大腸炎(UC)における、GLI1 非同義 SNP rs2228226 (tSNP 4) に対する小さな対立遺伝子頻度を示す。

40

表11

| | HC | | IBD | | | UC | | | CD | | |
|-------------|------|------|------|------|-------------------------------|-----|------|----------------------------------|-----|------|-------------------------------|
| | N | % | N | % | p 値 OR (C.I.) | N | % | p 値 OR (C.I.) | N | % | p 値 OR (C.I.) |
| スコット ランド | 1374 | 30.3 | 884 | 34.8 | 0.0026 1.23 (1.07-1.40) | 474 | 33.9 | 0.042 1.19 (1.01- 1.39) | 335 | 36.1 | 0.0053 1.30 (1.08-1.55) |
| ケンブリ ッジ | 589 | 26.4 | 1737 | 29.6 | 0.042 1.17 (1.0-136) | 928 | 30.8 | 0.017 1.21 (1.03- 1.42) | 737 | 27.9 | 0.40 1.08 (0.90-1.28) |
| スウェー デン | 281 | 30.6 | 493 | 35 | 0.27 1.14 (0.90-1.45) | 288 | 34.4 | 0.43 1.11 (0.90- 1.45) | 205 | 35.9 | 0.24 1.19 (0.90-1.58) |

10

【0241】

IBD対HC、UC対HC、及びCD対HCのこれら3つの集団において、2分析についてのオッズ比及び両側p値を付与する。これらのデータのメタアナリシスを図1に提示する。3つ全ての集団における推定ハプロタイプの頻度、及びスコットランド人の集団についての、全遺伝子型データを補足資料(補足表1及び2)に詳述する。

ハプロタイプ検定及び対数尤度分析における関連性は、GLI1のエキソン12における非同義SNP(rs2228226C>G;tSNP4)に大きく起因している。rs2228226は、IBD(対立遺伝子頻度OR=1.23、C.I.1.07-1.40、p=0.0026;ホモ接合体OR=1.56、C.I.1.15-2.11、p=0.0047)、CD(対立遺伝子頻度OR=1.30、C.I.1.08-1.55、p=0.0053、ホモ接合体OR=1.79、C.I.1.21-2.65、p=0.0048)及びUC(対立遺伝子頻度OR=1.19、C.I.1.01-1.39、p=0.04)と関連している(表11及びデータを示さず)。これらのデータでは、ヘテロ接合体患者よりも、ホモ接合体の方が、より大きなオッズ比を有する、対立遺伝子特異性用量反応であることが示唆される。直接配列化することによるGLI1コード領域の変異スクリーニングでは、新規のSNPの同定に失敗した。dbSNP及びIBDからの7つの付加的なGLI1変異の間に関連性はなかった(データを示さず)。

20

30

【0242】

2つの独立した北ヨーロッパ人のIBDにおけるGLI1関連性の再現及びメタアナリシス。ついで、我々は、他の集団におけるこれらの発見を再現することを探究した。ケンブリッジ、イングランドからの大きなIBDパネル(n=928UC、737CD、83の未定の大腸炎及び589のHC)において、GLI1との関連性を、IBD(p=0.009)及びUC(p<0.0001)における対数尤度分析により再現した。この集団において、rs2228226はIBD(OR1.17、C.I.1.00-1.36、p=0.042)及びUC(OR1.21、C.I.1.03-1.42、p=0.017)とは関連しているが、CDとは関連していない(表11)。スコットランドの場合、tSNPs1-3との関連性はない(データを示さず)。より小さなスウェーデン人のコホート(n=700)において、IBD(OR1.14、C.I.0.90-1.45)とrs2228226との関連性に、有意な傾向はなかった(表11)。

40

【0243】

図104は、スコットランド、イングランド及びスウェーデンにおけるIBD症例及び健全なコントロールでの固定効果モデルを用いたマンテル-ヘンツェル法を使用し、rs2228226(OR1.194、C.I.1.089-1.309、p=0.0002)との関連性を確認するメタアナリシスを示す。メタアナリシスは、マンテル-ヘンツェル法(n=5352個人)を使用する、スコットランド、ケンブリッジ及びスウェーデンにおける、非同義GLI1SNP rs2228226(tSNP4)のものである。3つのコホート(p=0.825)の間のrs2228226による不均一性の証拠は存在しなかった

50

。遺伝的関連性の研究における偽陽性発見の公開に伴う現問題を認識すると、我々は、G L I 1 S N P r s 2 2 2 8 2 2 6 のメタアナリシスに見出される病気の危険性との関連は、Wacholder等(2004) J Natl Cancer Inst 96: 434-442に記載されているような、偽陽性報告の確率(F P R P)を適合させることによる、本物の(偽陽性よりむしろ)関連性を表す、という可能性を推定した。これにより、これらの所見が少なくとも92%(F P R P < 0 . 0 8)の真の所見となるという推定確率が付与される。この方法は、真の陽性を意味するとは思えない統計的に有意な発見の過剰解釈を回避できるように設計されているが、我々の研究では、これらのデータの我々の解釈を明らかに支持するものであった。

【0244】

r s 2 2 2 8 2 2 6 によりコードされるG L I 1 変異体は、インビトロでのG L I 反応性転写の活性化において、機能的に欠損しており、r s 2 2 2 8 2 2 6 C G は、グルタミンからグルタミン酸(Q 1 1 0 0 E)への変化をコードするG L I 1 のエキソン12におけるミスセンス変異である。

10

【0245】

図105は、Q 1 1 0 0 E がG L I 1 タンパク質の保存領域を乱し、G L I 1 転写活性を低減させることを示す。A) G l i 1 タンパク質における既知の機能ドメインの保存。先に記載したS u f u 結合、D N A 結合、及びトランス活性化ドメイン[Yoon等(1998) J Biol Chem 273: 3496-3501; 27 Kinzler等(1988) Nature 332:371-374; Kogerman等(1999) Nat Cell Biol 1: 312-319]を模式的に示す。各ドメインのアミノ酸保存は、ドメインの下のパールのシェーディングにより、また数値的に表される。赤いボックスは、G L I 1 タンパク質の安定性を調節することが知られている領域を示す[Huntzicker等(2006) Gene s Dev 20: 276-281]。Q 1 1 0 0 E を含む保存さRたC末端ドメインは、既知のトランス活性化ドメインに隣接している。B) 哺乳動物G l i 1 タンパク質のC末端のアラインメント。この領域(A A 1 0 8 0 - 1 1 0 6)は、哺乳動物系統に高度に保存されている。C、D) G L I 1 Q 1 1 0 0 及びE 1 1 0 0 は、2 9 3 T S A 細胞において、類似した細胞局在性を有する。E) G L I 1 E 1 1 0 0 は、G L I 1 Q 1 1 0 0 と比較して、8 x G l i -ルシフェラーゼレポーターの活性化促進に欠損がある。G l i N は8 x G l i -ルシフェラーゼの強力なアクチベーターであり、G L I 1 活性化の正のコントロールとして供給される。8 x G l i -ルシフェラーゼコンストラクトは、唯一の変異G l i 結合部位を含み、負のコントロールとして供給される。データは、2つの異なるプラスミド調製物(N = 1 8)を使用して実施された6つの3組の実験から示す。

20

30

【0246】

変異は、認識されたトランス活性化ドメイン近傍の、哺乳動物G L I 1 タンパク質のC末端で、十分に保存されたモチーフ内に入る(図105 a)[Yoon等(1998) J Biol Chem 273: 3496-3501]。Q 1 1 0 0 残基は試験した全ての動物においてそれ自体が100%保存されている(図105 b)。Q 1 1 0 0 E 変異の機能的結論を評価するために、我々は、G L I 1 Q 1 1 0 0 又は変異体G L I 1 E 1 1 0 0 のいずれかを、2 9 3 T 細胞に形質移入させた。発現レベル又は細胞局在性における差異は、これらのG L I 1 変異体の間では検出されず; 双方のタンパク質は、形質移入細胞の核において、容易に検出された(図105 c-d)。我々は更に、十分に定義されたG L I 1 レポーター 8 x G l i -ルシフェラーゼを活性化させる各変異体の能力を評価した[Saitsu等(2005) Dev Dyn 232: 282-292]。我々は、G L I 1 転写活性についてのポジティブコントロールとして、8 x G l i -ルシフェラーゼの非常に強力なアクチベーターであるG i l 2 N を利用した[Roessler等(2005) Hum Mol 遺伝子t 14: 2181-2188]。双方のG L I 1 変異体は、ベースラインの上の8 x G l i -ルシフェラーゼを活性化させるが、W T G L I 1 Q 1 1 0 0 は、変異体G L I 1 E 1 1 0 0 よりも転写アクチベーターとして2倍以上有効であった。

40

【0247】

ヘッジホッグ経路活性は、大腸炎症においては調節不全である。我々は先に、G L I 1 発現は、ヒトにおいて、近位の結腸と比較して、更に遠位にあることを報告している[Noble等(2008) Gut. Oct;57(10):1398-405. Epub 2008 Jun 3]。

50

【0248】

図106は、健常なヒト成人結腸(HC)及び潰瘍性大腸炎(UC)におけるヘッジホッグ(HH)シグナル伝達成分の発現を示す。A)パッチ(PTCH)、ヘッジホッグ-相互作用タンパク質(HHIP)、及びGLI1のmRNAレベルは、健常な成人結腸、上行結腸(AC)から下行結腸(DC)及びS状結腸(SC)の長さに沿って増加している。B)管腔表面で末期的に分化している腸細胞におけるHHタンパク質発現は、近位と比較して、遠位結腸においての方がより大きい。C)非炎症HCと比較して、UCにおける、インディアンヘッジホッグ(IHH)、PTCH、GLI1、及びHHIPのmRNAレベルの定量分析。健常な結腸(a-d)の長さに沿って同定された勾配について説明するために、SCのみからのデータを示す。QPCRデータは、この遺伝子がAgilentマイクロアレイチップ上に存在しない場合に、IHHについて定義される。病気の検体は非炎症(N-I)及び炎症(I)組織に下位範疇化される。非IBD炎症、又はHCと比較してUC又はCDのいずれかにおいて、DHH、PTCH2、GLI2、GLI3、SUFU又はDISP1のレベルに、何の変化もなかった(データを示さず)。SHH mRNAの分析により、炎症細胞における公知のSHHの発現と一致し、炎症に関連して発現レベルに穏やかな増加が示された(データを示さず) [Lowrey等(2002) J Immunol 169: 1869-1875]。

10

【0249】

個々のデータポイントを、各データセットについての中央値を表す水平線と共にプロットする。付与されたp値は、AC、DC及びSCにおけるレベルと比較するラスカル-ワリス検定、及びマンホイットニーのU検定(U S対HC(N-I))から得る。

20

【0250】

このマイクロアレイデータセットの拡張コンピュータ解析により、HHタンパク質と共に、PTCH及びHHIPのmRNA転写物が、この発現勾配に酷似していることが示された(図106 a-b)。GLI1、PTCH及びHHIPは、その発現レベルが経路活性を予期している、経路反応エレメントである。GLI1($p = 0.0003$)、PTCH($p = 0.002$)、及びHHIP($p = 0.0003$)は、同じ位置からのHCと比較して、炎症UCにおいて低下した(図106 c)。IHHは炎症に関係なく、UCにおいて低下した($p = 0.02$)。GLI1発現は、炎症状態に関係なく、HC($p = 0.004$)よりCDにおいて低下し(データを示さず)、またスコットランドでは、GLI1変異が付与される注目されるべき発見が、CDと関連していた。PTCHは、非炎症CD及びHC($p = 0.007$)と比較して、炎症CDにおいて低下していた。GLI1及びPTCHは、双方とも、HCに対して、非IBD炎症において低下していた(データを示さず)。これらのデータは、大腸炎症の領域における、GLI1、PTCH、及びHHIPを含むHH経路活性の全体的なダウンレギュレーションを示す。

30

【0251】

GLI1 + / - 動物は、3%のDSS処理により誘発される小腸炎に応じた死亡率及び上昇した罹患率を示す。GLI1 1100E変異体のインビトロ分析により、WT GLI1と比較して、トランス活性化機能における50%欠損が示され、我々の遺伝子分析では、対立遺伝子特異性用量反応が示され、GLI1機能において中程度低下すると、腸の炎症疾患に罹りやすくするには十分であることが示唆された。特異的な試験のこの仮説に対し、我々は、GLI1 + / - マウス [Park等(2000) Development 127: 1593-1605]、及びそれらのWT同腹仔を、3%のDSSで6日間処理し、急性小腸炎を誘発させた。DSS処理により、GLI1 + / - 動物は、素早く、重度の影響を受けた。

40

【0252】

図107は、DSS処置後に、GLI1 + / - 動物が死亡率、重篤な臨床症状、及び重度の体重減少を示す結果を示す。A)WT動物は6日の処理期間を超えて、100%生存している(N = 14)。ほぼ50%のGLI1 + / - 動物(4 - / 9)が3%のDSS処理により6日間で死亡する。B)GLI1 + / - 動物は、3%のDSSでの処理の4又は6日後、WT動物よりも際だって重度の兆候を示す。1 = 下痢、2 = 血便、4 = 重度の出血/死亡。それぞれの点は個々の動物を表し、実線は、各コホートにおける平均観察値を示

50

す。C) G L I 1 + / - 動物 (N = 9) は、それらの同腹仔 (N = 10) よりも迅速に、体重が減少する。* = p < 0.05。

【0253】

6日後、4/9が死亡し、生存した3匹は、かなりの直腸出血を有する重度の罹患率を示し、ほとんど不動となる(図107a)。対して、WT動物(N = 14)は死亡せず、全てが可動であり、処理の5及び6日後、罹患率の低下がみられた。G L I 1 + / - 動物は血性下痢を発症し、4日までにかなりの体重減少があったが、WT動物は臨床的サインを発していないか、又は6日目まで測定できる程の体重減少はなかった(図107b-c)。

【0254】

G L I 1 + / - 動物は、D S S 処理に応じて、WT同腹仔よりも重度の結腸の病気を発症する。割れ話E R は、D S S 4 処理の4及び6日後の、G L I 1 + / - 及びWT動物から結腸組織を取り出し、試験した。G L I 1 + / - 動物は、WTよりも素早く、重度の組織病変を発症した。

10

【0255】

図108は、G l i 1 + / - 動物がD S S 処置に回答してWT同腹仔よりも深刻な小腸炎を示すことを示す。A) WT動物(N = 4)は軽度の大腸炎症を示すが、D S S 処理の4日以内に、実質的表皮又は潰瘍性の炎症を発症しない。B) G L I 1 + / - 動物(N = 4)は、D S S 処理の4日以内に、かなりの炎症性浸潤、上皮損傷、及び潰瘍を発症する。C-D) G L I 1 + / - 動物は、3%のD S S 処理に応じて、長時間のうちに、それらの結腸粘膜(N = 9)に重度の上皮損傷を有する深在性の小腸炎を発症する。E) D S S 処理の6日後の、結腸損傷の盲検的組織学的スコアリング。中結腸及び遠位の下行結腸からの組織の標準的な長さを、各動物でスコアリングする。G L I 1 + / - 動物(N = 6)は、WT動物(N = 6)より、全体的に炎症性の病巣及びより長い病巣(10+陰窩ユニットに影響を及ぼす)を有する。各点は、個々の動物で観察された病巣の数を表し；実線は各コホートの平均観察値を示す。赤い点は、サイトカイン発現について分析した動物を示す。F) 常在性の粘膜骨髄細胞は、H h スクリーニング伝達に直接反応し、G L I 1 + / - 動物の恒常性結腸にL a c Z を発現する。矢印は、L a c Z - 正電荷原子核を有する細胞及びC d 1 1 b 膜を示す。

20

【0256】

4日後、WT結腸は、幾つかの破壊性病変を除き、炎症性変化の証拠を示し(図108a)、一方、広範囲にわたる炎症性浸潤及び破壊性結腸潰瘍は、G L I 1 + / - マウスで顕著である(図108b)。6日後、生存しているG L I 1 + / - 動物の炎症は際だって酷くなっていた。炎症性病変の数(図108e)、大きさ及び感染度(図108c-e)は、G L I 1 + / - 動物よりもかなり大であった。共に、これらの結果には、単一のG i l 1 対立遺伝子が損なわれると、重度の腸の炎症及び明らかな臨床的兆候により表されるような、D S S 処理に対する感受度が増すことが示された。

30

【0257】

腸の骨髄細胞は、H H シグナルに直接反応する。我々は、H H シグナル伝達がマウスの腸及び結腸における、独占的パラクリンであることを示している[Madison等(2005) Development 132: 279-28914]。ここで、我々は、H h 反応性細胞を容易に可視化できる、G L I 1 + / - l a c Z 動物を利用し、G i l 1 がマウスにおいて炎症細胞を発現することを確認した[Park等(2000) Development 127: 1593-1605]。安静にした成人の結腸において、固有層常在性C D 1 1 b ポジティブ骨髄細胞ではL a c Z が発現し、よってH h シグナルに直接反応していた(図108e)。

40

G L I 1 + / - 動物では、I L - 2 3 p 1 9 及び炎症誘発性サイトカインの発現が増加している。

【0258】

図109は、D S S 処置後のG l i 1 + / - 及びWTマウスが強い炎症誘発性サイトカイン活性化を示すというサイトカイン分析を示す。A) 3%のD S S 処理の6日後の、WT及びG L I 1 + / - 動物(N = 4)におけるサイトカイン発現。G A P D H に対して標準

50

化されたサイトカイン発現を、GLI1+/ - マウスについてはY軸、WT動物についてはX軸にプロットする。統計的に有意な方式で変化した遺伝子発現レベルを、星で示す。ドットで打たれた斜めのトレンドラインは、WTとGLI1+/ - マウスとの間で同一の発現レベルを示す。B)表は、WTコントロール(* = p < 0.05)と比較した、GLI1+/ - 動物における、平均サイトカイン発現、標準偏差、及び倍率変化を示す。幾つかの炎症誘発性サイトカインは、GLI1+/ - 動物ではアップレギュレートされたが、抗炎症性サイトカインは大部分は変化しなかった。

【0259】

DSSの6日後に取り出された全結腸組織についてのサイトカイン発現のQPCR試験は、組織学的及び臨床的データを確認する；GLI1+/ - 動物はWTと比較して非常に有意な炎症性を示した(図109)。我々は、GLI1+/ - 動物において、驚くことではないが、DSS誘発性大腸炎におけるTH1細胞の突起、及びこれらの動物における重度の炎症を付与する、INFを含むTH1サイトカインの強力な発現を検出した。我々は、GLI1+/ - 及びWT動物の間のIL-10及びTGFにおいて有意な差異を検出せず、抗炎症性サイトカインのダウンレギュレートが、このモデルにおける炎症増加の一次的メカニズムではないことが示唆された。GLI1+/ - 動物において最も高度に発現したサイトカインは、TH17リンパ球の分化を促進することが知られており、IBDを含む、幾つかの系で炎症の鍵となるメディエーターのIL-23p19である[Hue等(2006) J Exp Med 203: 2473-2483; Yen等(2006) J Clin Invest 116: 1310-1316]。また、IL-12及びIL-17、IL-23に密接に関連したサイトカインはGLI1+/ - 動物においてアップレギュレートしていた。これらのデータは、近年、IL-23経路が、ヒト[Duerr等(2006) Science 314: 1461-1463]及びマウス[Yen等(2006) J Clin Invest 116: 1310-1316]の双方においてIBD病変形成に強力に関与付けられたため、特に重要である。我々のデータは、GLI1用量又は機能の低下が見られる強力な炎症とこの鍵となる炎症経路との間の潜在的関連性を提供する。

【0260】

検討

ここに提示されるデータは、無傷のHHシグナル伝達が、炎症性攻撃に応じて、哺乳動物の腸において重要であり、GLI1の機能低下が、IBD病変形成に関与しているという、第1の証拠を提供する。我々は、HHシグナル伝達経路が、ヒトの大腸炎症でダウンレギュレートしていることを確認した。また我々は、UC/IBDに高度に関連した、特異的GLI1変異体を同定し、変異体タンパク質は、インビトロにおいて、転写アクチベーターとして機能的に不十分であることが示されている。最後に、我々は、マウスGli1における50%低減により、IL-23経路の有意なアップレギュレートと、DSSに対する腸の炎症反応が高まることを示した。これらの発見のみが治療介入に対して可能性のあるIBD病変形成の理解に、明確に関与しているものではなく、それらは、腸炎症のけるGLI1とHHシグナル伝達についての機能的役割の第1の明確な記載である。我々が検出したGLI1遺伝子における遺伝的変異は、オッズ比1.19を有し、5000人以上の個人のメタアナリシスにより確認されたrs2228226についての発見と共に、スコットランド及びイングランドの双方において、IBD及びUCと関連している。CDにおける影響についての証拠が近年の研究で示されているが、優位な影響は、明らかにUCに関連している。この関連性における指針は、CD、結腸直腸癌Tenesa等(2008) Nat Genet 40: 631-637]、及びセリアック病[Hunt等(2008) Nat Genet 40: 395-402]を含む、複雑な病気の遺伝学の近年の多くの研究に記述されたエフェクトサイズと完全に一致している。獲得した有意性レベルは、遺伝子-中心体研究についての、 $p < 10^{-4} - 10^{-6}$ という提案された基準を満たしている[Burton等(2007) Nat Genet 39: 1329-1337; Thomas等(2004) J Natl Cancer Inst 96: 421-423]。研究された3つの北ヨーロッパ人の集団では、以前から、他のIBD感受性遺伝子/NOD2及びIBD5を含む遺伝子座[Gaya等(2006) Lancet 367: 1271-1284]の類似した寄与が示されている。このSNPに対する少ない対立遺伝子頻度は、スコットランド及びスウェーデンでは非常に類似している(

30.3%と30.6%)が、スコットランドとケンブリッジ(30.3%と26.4%)との間では3.9%異なっている。この差異は維持されており、近年のWTCCC研究[Wellcome Trust Case Control Consortium (2007) Nature 447: 661-678]における、集団階層化について分析された多くのSNPについて言及されている。我々の再配列化の取り組みにより、IBDに関連した唯一のコード化変異体として、rs2228226が同定されたが、ハプロタイプ分析及び対数尤度分析では、他の生殖系列変異体がIBDの危険性に寄与しているかもしれないという可能性が上昇した。これらは、形式的に - 特にイントロン変異体、長期にわたるプロモーター効果及び/又はコピー数の変動の役割を研究するのに必要である。ここで、NOD2 [Hugot等(2001). Nature 411: 599-603; Ogura Y等(2001). Nature 411: 603-606]を含む幾つかの複雑な疾患の遺伝子は、病気の危険性を付与する多数の独立した変異を有し、幾つかの疾患はコード化配列内に原因となる変異を有さず(例えば、IRGM in CD [Parkes等 Am J Hum Genet. 2000;67:1605-16105])、同義SNPは機能的影響に関連している [Kimchi-Sarfaty等(2007) Science 315: 525-528]。rs2228226 C Gは、グルタミンからグルタミン酸(Q1100E)への変化をコードする。我々のインビトロデータには、適切に合成及び局在化しても、GLI1 1100EがWT GLI1と比較して副次的転写アクチベーターであることが示されている。Q1100E変異により、GLI1の公知のトランス活性化領域に直接隣接する保存領域において、かなりの荷電変化が引き起こされ;この変化がトランス活性化活性を直接修飾し、トランス活性化ドメインの構造を破壊し、又はタンパク質の安定化に影響を及ぼし [Huntzicker等(2006) 遺伝子s Dev 20: 276-281]、活性を低下させる可能性がある。また、我々のデータから、GLI1の活性又は量が低減すると、強力な表現型が生成されることが示唆される。Gli1のWTレベルの50%のみを有しているGLI1+/-動物は、中程度の刺激に反応して、素早く重度の炎症を発症する。Gli1の機能低下についての表現型の記述 [Park等(2000) Development 127: 1593-1605]である、我々の知識に対するこれらのデータは、Hh反応の全補体が、炎症疾患からの保護において、鍵となる役割を担っていることを示している。更に我々のインビトロデータには、GLI1 E1100が幾つかのGli反応を活性化可能であることが示されており、ホメオスタシス条件下で、GLI1 E1100が適切に機能可能であることが示唆される。しかしながら、GLI1+/-動物における状況と類似して、炎症性ストレスの条件下では、GLI1 E1100は、WT GLI1の50%しか機能できない。これらの系における炎症に対する傾向により、炎症細胞内のHHシグナル伝達が直接低下するか、又はストローマ標的細胞におけるHHシグナルの低下による影響を表すかどうかにかかわらず、上皮層の完全性に影響を与えるシグナルが放出されることは、未だ明らかではない。この問題への取り組みは、未来の研究の鍵となる手段となるであろう。我々は、HH経路が骨髄標的細胞へのシグナル伝達を介して、自然免疫反応を直接修飾し得ることを示した。この発見は、脾臓における骨髄細胞変異におけるHHシグナル伝達にとっての重要な役割を示す近年のデータと一致している [Varas等, (2008) J Leukoc Biol Jun;83(6):1476-83. Epub 2008 Mar 1123]。興味あることに、骨髄細胞集団は、IL-23/IL-17経路におけるかなりの衝撃を介して、腸の炎症環境を差次的に修飾することができる [Denning等(2007) Nat Immunol 8: 1086-1094]。共に、GLI1+/-動物におけるDSS処理後のIL-23の増加及び自然免疫集団による、HHの直接的反応を示す我々の発見は、粘膜骨髄細胞における免疫寛容誘発性表現型を、通常は促進させることが示唆され;HHシグナル伝達の低下が、これらの細胞における、炎症反応を代わりに誘発させ得る。

【0261】

結論として、我々は、IBDにおける発生シグナル伝達経路の変化した発現をここで初めて証明し、研究の新規な方向性を開いた。更に、我々は、IBD2遺伝子として、GLI1に關与する証拠を用い、これらの効果が、部分的に遺伝的に決定され、低下した転写活性を有する特異的な変異体が同定されることを示す。Gli1の機能的関連性は、大腸炎の樹立されたマウスモデルにおいてGli1濃度の50%低下に直面して発生する重篤の腸炎症により証明される。併せて、これらのデータは、炎症性刺激に対する腸粘膜の保

10

20

30

40

50

護反応における強力なHH経路活性化の重要性について、強く主張する。これらの知見は、UCの病変形成に対して、また潜在的には慢性炎症の他の形態について重要な関連性を有している[Lees等(2006) Gastroenterology 131: 1657-1658]。

【0262】

実施例5 - 全血試料からのIBD発現プロファイル

ヒト内視鏡結腸生検からのゲノムワイド発現プロファイルを開始し、IBDにおける細胞レベルでの病原性炎症経路の精査を補助した(Noble CL等. Gut, 2008 Jun 3. [Epub ahead of print])。全血のゲノムワイド発現プロファイルは、従来からの内視鏡技術を補完するもので、IBD-クローン病(CD)及び潰瘍性大腸炎(UC)の診断を補助する。この研究の目的は、IBD-CD、UC及びコントロール(HC)を患っている患者を識別するために、全血の遺伝子発現プロファイルを研究することである。

10

【0263】

患者。UC 21、CD 19、及びコントロール(HC) 10を研究した。UC患者の2人は新たに診断されており、15人は静止状態の疾患であり、4人は活性化した疾患であった。CDにおいて、新たに診断され1人、静止状態の11人、活性化した疾患の7人の患者を研究した。

【0264】

方法。41058発現配列タグ(33296遺伝子と表す)を、Agilentプラットフォームを使用し、50の全血試料において分析した。動物組織のプロトコルからのマイクロ全RNA単離を使用し、血液から全RNAを抽出した(Qiagen, Valencia, CA)。T7 RNAポリメラーゼの線形増幅を1回実施し、cRNAにシアニン-3及びシアニン-5標識を導入した。試料を60℃で18時間、定常領域とハイブリダイズさせた。マイクロアレイを洗浄し、乾燥させ、製造者のプロトコルに従い、Agilentスキャナーにかけてスキャンした。マイクロアレイの画像フィルムを、Agilentの特徴抽出ソフトウェア第7.5版を使用して分析した。Stratageneユニバーサルヒト参照を使用し、遺伝子を標準化させた。

20

【0265】

全てのIBD及びHC患者、及び発現において $>$ 又は $<$ 1.5の倍率変化を有するプローブを用いるクラスター分析を使用すると、HC患者は、デンドログラム1/21対9/29の一方に、更に広がっていた($p = 0.02$ 又は 1.8)(データを示さず)。CD及びUC試料の分布に、何の差異も観察されなかった。全てのIBD試料をCTT及び比較した場合、493の配列が、1.5以上の倍率変化($1.7 \times 10^{-4} < p < 0.01$)を有し、595の配列が1.5未満の倍率変化($4.0 \times 10^{-4} < p < 0.01$)を有していた。CD及びUCを比較した場合、293の配列が1.5以上の倍率変化($5.4 \times 10^{-2} < p < 0.01$)の倍率変化を有し、301の配列が1.5未満の倍率変化($5.2 \times 10^{-1} < p < 0.01$)を有していた。

30

【0266】

アップレギュレートされまたダウンレギュレートされた遺伝子配列の10のパネルを使用することにより、我々は、 $> 90\%$ の感度でコントロールからIBD試料を予測することができた。以下の表12には、コントロールと比較してIBDにおいて差次的に調節された20の遺伝子を列挙する。

40

表 1 2

| 配列名 | 配列コード | 倍率変化 | P 値 |
|-----------------------|--------------|----------|----------|
| LOC342959 (AARDC5) | A_32_P30271 | 4.92527 | 8.62E-18 |
| A_24_P910246 (ATXN3L) | A_24_P910246 | 2.92405 | 1.41E-07 |
| LOC92552 (FSHR) | A_23_P361744 | 2.78494 | 4.12E-13 |
| PDGFRA | A_23_P332536 | 2.7178 | 0.00004 |
| TGFB3 | A_24_P373096 | 2.67234 | 5.89E-09 |
| KCTD8 | A_23_P94902 | 2.65574 | 0.00005 |
| TGM4 | A_23_P41241 | 2.64262 | 0.0005 |
| NYD-SP25 | A_24_P309216 | 2.62905 | 7.76E-15 |
| FLJ33651 | A_24_P306032 | 2.62873 | 0.0034 |
| EMX2OS | A_24_P892472 | 2.55683 | 0.00029 |
| WNT16 | A_23_P134601 | -2.96773 | 3.46E-10 |
| SPRED2 | A_24_P315535 | -2.97751 | 3.12E-16 |
| MGC50721 (C16orf65) | A_23_P412508 | -3.06148 | 0.0088 |
| C12orf2 | A_24_P78556 | -3.17916 | 0.0129 |
| MPDZ | A_23_P396328 | -3.19437 | 1.87E-40 |
| FARS2 | A_24_P456422 | -3.35391 | 0.00097 |
| CASP8 | A_24_P157087 | -3.41412 | 3.90E-09 |
| NT5E | A_24_P316430 | -3.63046 | 0 |
| TDGF3 | A_24_P179646 | -3.71928 | 7.31E-23 |
| BTNL3 | A_23_P158297 | -5.22514 | 2.09E-12 |

10

20

30

全血ゲノムワイド発現の特徴により、IBDを患っている患者とコントロールとの間の
 区別化に対する出発点が提供され、これが、IBDの診断の素晴らしい診断の証拠が提供
 され得る。

【図 1】

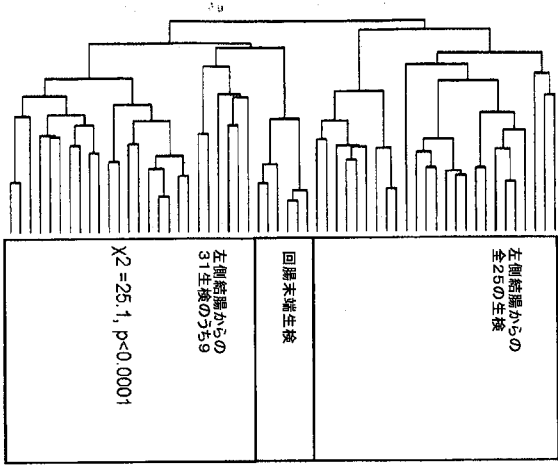


図1: 生徒採択位置を示す異常なコントロール生徒の教師なしの階層的クラスター形成

【図 2】

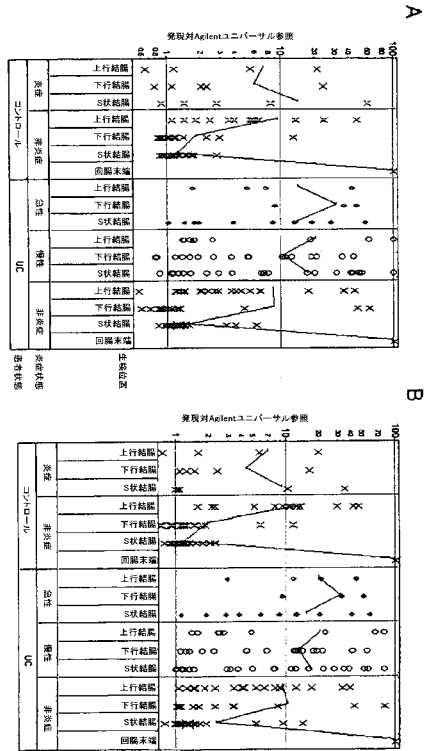


図2: 潰瘍性結腸炎患者及びコントロールにおけるチフェンシオンα5及び6の発現

【図 3】

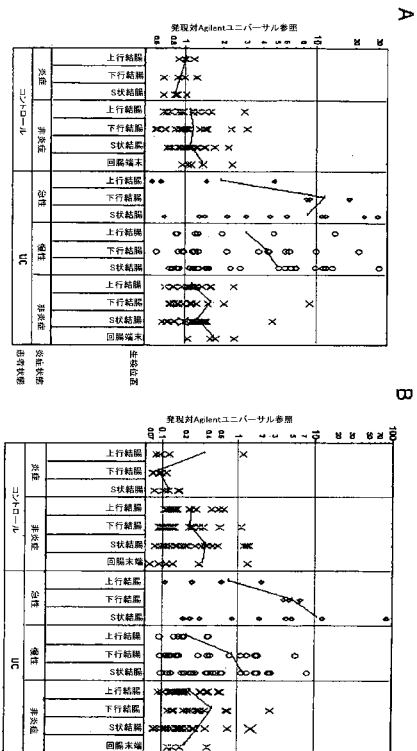


図3: 潰瘍性結腸炎患者及びコントロールにおけるマリンソンヌタクロチンA (MMP3) 3及び7の発現

【図 4】

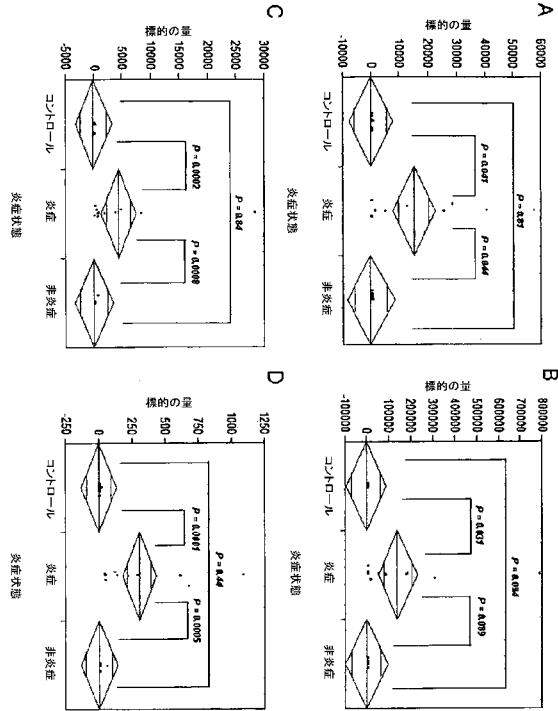


図4: コントロール及び潰瘍性結腸炎の炎症及び非炎症S状結腸炎における SAA1IL-8チフェンシオンα5及び6のリアルタイムPCR発現

【 5 】

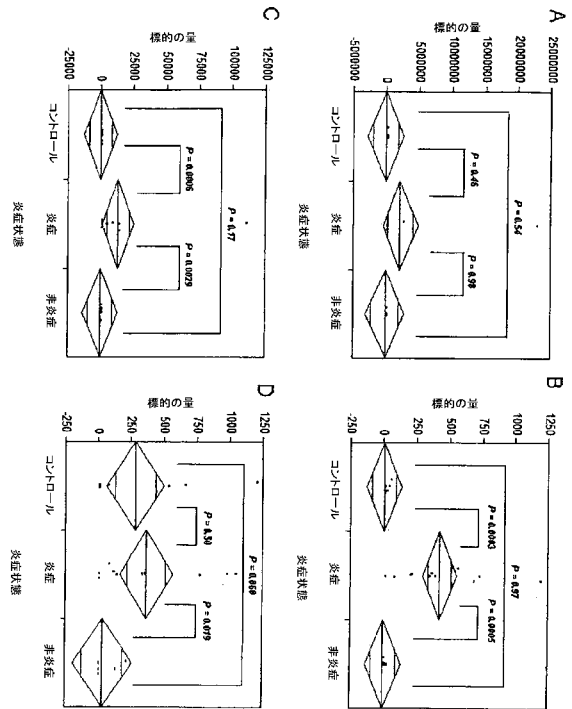


図5: コントロール及び潰瘍性結腸炎の炎症及び非炎症S状結腸生検におけるMMP3,MMP7,S100A9及びTLR4のリアルタイムPCR発現

【 6 】

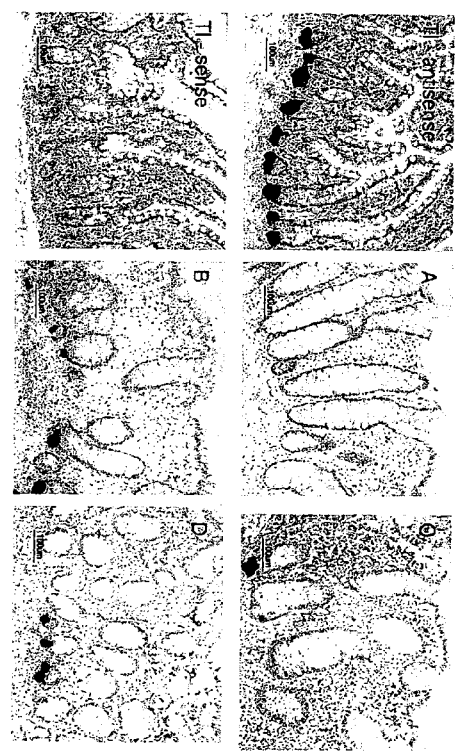


図6: 潰瘍性結腸炎の患者及びコントロールの回腸末端及び結腸におけるアクチンフィラメントの終末端の電子顕微鏡像

【 7 】

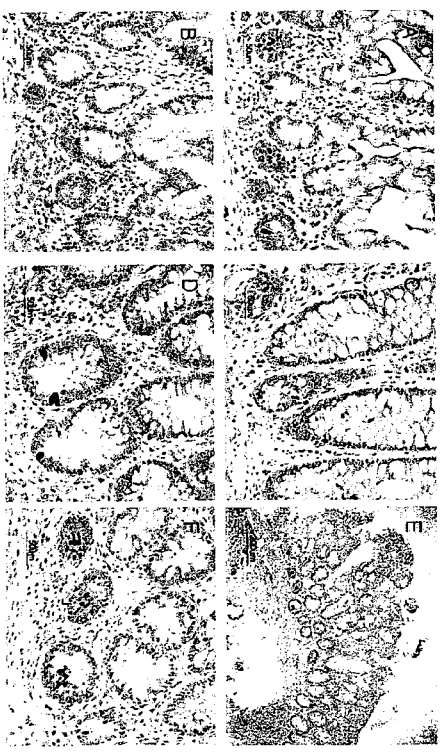


図7: 潰瘍性結腸炎の患者及びコントロールの回腸末端及び結腸におけるα6の免疫組織化学検査

【 8 】

```

1 acactctgtg tctgtctc tcctctcag cgaacctag catgagaacc ctaccacc
61 tcaetgtg tctctctg gccctccag ccaagctga gccactcca gctggatg
121 atccactga gccaanaagct tatgagctg atgcccagg gcaagcggg gcaaatgacc
181 aggaacttg cctctctt gcagagatg caagctcag tcttagact ttggctcaa
241 caagacttt catctgcat tgcagaggt cctgtatc aacagaat tctatctaa
301 cctgcactg catggfati aaccagat tctgtcct ctgagagat gaaacagaga
361 gaatatatt caatctac ttatgacct agaaggaac tgcctgtgt cccatacatt
421 gccctcaact tgttcttc atccaata aagctcttc agcaaaaaa aaan

```

A

```

MRTLTLTAVLLVALQAKAEPLQAEEDPLQAKAYEADAQEQRGANDQDFAVSFAEDASSL
RALGSTRFTCHCRRSCYSTEYSVGTCTVMGINHRFCCL

```

B

【 9 】

```

1 atatecctc ctgctctcc tcttgnggt gaccctgct atgagacca tgcactcct
61 tgcctgcat cctctgttg cctgcagg ccaagctgag tcactccag aaagactga
121 tggagctca acccagagc agtctggag agcaaccag gactctgta tctctctc
181 agaaatgca cctctctg ttgactctc aggtctcag gcaagacca cctctctg
241 cagaaccag cctgtgata cctgtgag cctctcag atgtgtaa tcaatgctg
301 cctctcaga cctctctg cctgagctc ctgtagaga accaagag tgaagctc
361 agttcaagt cctgaaaaa gaanaacatt ttactctgt tactctgtg ctcttaaat
421 tctctctcc aaataaagt tcaagcatt

```

A

```

MRTIAILAAILLVALQAQAESLQERADEATTQKQSGEDNQDLAISFAGNLSAI.RTSGSQARA
TCYCRTGRCAITRESL.SGVCSIGSRYLRLCCR

```

B

```

1 atgagactt ttactatc cacttttg tgnatgta cctcaactc accagacc
61 tgcctctga tgaactgta tctgtctcc aaagctcag gctctgtaa agagactgt
121 cttgagctg aaagaacatt agcatatgt tctctccca gaanaatg ctgcaatgag
181 aaatgtatg aaagatgta taigtgta

```

C

```

MRIFYLLHFLCYVTFILPATCTLVNADRCTKRYGRCKRDCLSEKQIDICLSLPRKICCTEKLYE
EDDMF

```

D

【 図 1 0 】

1 gtcggttca tggcttcca gctgttacc ctgataacc agcccttgg agtgaatggt
 61 atctcttcca gctctacc ctctctctc ctgacttct atggatctg agttctggg
 121 gttgagacc agtcttggg tttatctgg ctactctgg gttctctacc tgccttct
 181 ctctgggga agtcttctc agtctctcc gttatctatc agtctctacc tttatctct
 241 accctctga tctctctac tggaccacc aagcttctt ctctctcca gctcttctg
 301 ctctcttca gtaggacct ctctctctg tctctctgg gcttctcca tggcttct
 361 tttctctcc ctctctctc tgcctctcc ctctctctc caagcttgg agtctctca
 421 ctctctctc agtctctca gttctctca ctctctctc gttctctctc gttctctca
 481 caagcttct agtctctcc agtctctca agtctctcc tctctctc ctctctctc
 541 caagcttct tggcttctc gttctctca ctctctctc gttctctca ctctctctc
 601 agtctctca ctctctctc ctctctctc ctctctctc gttctctca gttctctca
 661 gttctctca gttctctca ctctctctc ctctctctc gttctctca gttctctca
 721 gttctctca gttctctca ctctctctc ctctctctc gttctctca gttctctca
 781 gttctctca gttctctca ctctctctc ctctctctc gttctctca gttctctca
 841 gttctctca gttctctca ctctctctc ctctctctc gttctctca gttctctca
 901 gttctctca gttctctca ctctctctc ctctctctc gttctctca gttctctca
 961 gttctctca gttctctca ctctctctc ctctctctc gttctctca gttctctca
 1021 gttctctca gttctctca ctctctctc ctctctctc gttctctca gttctctca
 1081 gttctctca gttctctca ctctctctc ctctctctc gttctctca gttctctca
 1141 gttctctca gttctctca ctctctctc ctctctctc gttctctca gttctctca
 1201 gttctctca gttctctca ctctctctc ctctctctc gttctctca gttctctca
 1261 gttctctca gttctctca ctctctctc ctctctctc gttctctca gttctctca
 1321 gttctctca gttctctca ctctctctc ctctctctc gttctctca gttctctca
 1381 gttctctca gttctctca ctctctctc ctctctctc gttctctca gttctctca
 1441 gttctctca gttctctca ctctctctc ctctctctc gttctctca gttctctca
 1501 gttctctca gttctctca ctctctctc ctctctctc gttctctca gttctctca
 1561 gttctctca gttctctca ctctctctc ctctctctc gttctctca gttctctca
 1621 gttctctca gttctctca ctctctctc ctctctctc gttctctca gttctctca
 1681 gttctctca gttctctca ctctctctc ctctctctc gttctctca gttctctca

A

MLVLLWI.TLLLIJALPCLLQTKEDPNPPII.NRMKAKAQLT.WDLNRNVT.DIECVKADAYSMP
 AVNNSYCFQGAISLCEVTN.YTVRVANPFPST.VLFPNSGKWP.AGAENLTC.WHDVDFLSCS
 WAVGPGAPADVQYD.VLNVANRRKQYFEL.HYKTDAGTRIG.CRFDDISLSSGSQSHLVR
 GRSAAFGIPCTDKFV.VFSQJEL.FPPNRAKCNK.TISFMHWKMRSH.FNRKFRYELQIKRMQ
 PVITEQV.RDRTSFQLN.PGTYVQV.IKAREVYV.FELSAWST.PQRFECQDEEGANTRA.WRTSLI
 ALGTL.LALVCVVICR.RYI.VMQLR.PPRIPHM.KDPIQSFQNDK.LVV.EAGKAGLECLVTEV
 QVVQKT

B

【 図 1 1 】

1 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 61 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 121 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 181 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 241 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 301 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 361 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 421 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 481 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 541 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 601 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 661 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 721 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 781 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 841 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 901 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 961 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1021 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1081 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1141 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1201 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1261 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1321 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1381 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1441 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1501 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1561 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1621 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1681 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca

A

MDSYLLMWGLLTFM.VPGCQAE.LCDDPPPE.PHATFKAMAYKE.GTMLNCECKRGRFRKIKSG
 SLYMLCTGNSSHSW.DNQCCTSSA.TRNTRTK.VQVTPPEEQKERT.FMQSPMQV.DQASLQ
 GHCR.PPPWENAEATERI.YHFVVGVM.VYVYVQVYRAL.HRGAESVCKMTHGKTR.WTQPOL
 ICTGEMETOS.PGEEKPQASPEGR.PESETSLV.TTTDFQIQ.TMAATMETIS.FTEYQVAVAGC
 VFLLSVLLSGL.IWQRQRKSRRTI

B

【 図 1 2 】

1 aatctctca atctctctc agtctctca tctctctc ctctctctc ctctctctc
 61 atctctctc ctctctctc gctctctca tctctctc tctctctc tctctctc
 121 ctctctctc tctctctc agtctctca agtctctca ctctctctc gttctctca
 181 ctctctctc ctctctctc tctctctc tctctctc tctctctc tctctctc
 241 tctctctc agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 301 tctctctc gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 361 tctctctc gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 421 gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 481 tctctctc gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 541 tctctctc gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 601 gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 661 ctctctctc gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 721 ctctctctc ctctctctc tctctctc tctctctc tctctctc tctctctc
 781 tctctctc tctctctc tctctctc tctctctc tctctctc tctctctc

A

MLPMPALPSVSWMLLSCLMLL.SQVQGFEPQRELPSARIRCPKGSKA.VGSHCYALFSPKSWT
 DADLACQKRPSGNL.VSLVSGAEGSFVSSLVKSIGN.SYSYV.WIGLHDPTQGTPEPNEGGEWESS
 SDVMNYFAWERNPST.ISSPGHCLSRSTAFLRWKDYNCNVR.LPYVCKFTD

B

【 図 1 3 】

1 aagctctca agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 61 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 121 ctctctctc gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 181 atctctctc gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 241 ctctctctc gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 301 tctctctc gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 361 gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 421 gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 481 gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 541 gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 601 gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 661 gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 721 gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca

A

MAQNTSFFMLISSLMLFSL.SQGSQSTL.PNPKRISCEPTNAYRSYCYF.NEDPEFWVDALY
 CQNMNSGNL.VSLV.TAQEGAFV.ASLIKSS2DDSNV.WIGL.HDPKKNRR.WHSSGSLVYSKYW
 DTGSPSANAG.CASL.TSCSGFKK.WK.DESCEKFSFVCKFKN

B

【 図 1 4 A 】

1 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 61 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 121 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 181 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 241 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 301 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 361 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 421 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 481 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 541 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 601 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 661 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 721 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 781 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 841 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 901 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 961 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1021 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1081 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1141 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1201 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1261 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1321 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1381 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1441 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1501 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1561 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1621 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca
 1681 agtctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca gttctctca

【 図 1 4 B 】

MAAGVAA.WLPI.ARAAA.IGW.MPV.ANCP.MPLA.PADKN.KRQDEL.VLVN.SGRR.FQWRTTLER
 YPD.TLLGSTEKE.FFFNED.KYF.FDPRD.PEVR.FCVL.NFY.TGK.LHY.PRY.ECISA.YDDELAFYGI
 L.PLIDGDCY.EEY.KDRK.RENA.ERL.MDD.NDSENN.EQMS.PSL.FRQTM.WRAFENPH.TLRLALVF
 YVYTGFFIAV.SVITNV.VE.VPCTGV.PGSKL.PCGER.VSVA.FCLD.TACV.MI.FVEYLLR.LFAA
 PSRYR.FR.VS.MIHD.VA.IM.PY.YIGL.VM.TN.NED.VS.GAF.VL.RV.RV.RIFK.FSR.HSQGLR.LILGY
 TLK.SACSEL.GL.FL.SLI.M.HI.FAT.VM.FY.A.EK.GSSA.SK.FT.SIPA.SF.WY.TV.M.TL.GY.GDM.VPK
 TICASL.FIGS.I.SL.SG.VI.VA.LP.VP.VI.VS.NF.SR.IY.HQ.NQRAD.KRRA.QK.RARL.IR.VAKT.GSSNA
 L.HF.KR.NGL.NE.LE.TGT.PEE.HMG.KT.TS.LIES.QH.HILL.HCLEK.TL.GL.SY.VL.DDPL.I.SV.RTS
 TIK.NHE.IDEQ.MFEQ.CM.ESS.MO.NY.PSTR.SPL.SSH.PGL.TT.CS.RRSK.KT.HL.PNSL.PA.TRL
 RSMQ.ELS.THI.HQ.SEQ.PSL.TT.RSSL.NL.KADD.GLR.PNCK.TS.QITTA.HIS.PP.PAL.TPEG.ESR.PPFA
 SP.GP.NTI.SIAS.NV.KV.SAL

【 1 5 】

1 caccceaaa gaacggggc ctenaacly agcagatg ttcttgagc tanaaacat
 61 gctgtacc angagttg ccggctggc ttgagfka gctgctac tccacttg
 121 ccggcaata gaagcaaaa gaaattga ctgctgtt agatacaag accytatt
 181 tccctaaa ttatttgg gctcaacg gctctggc aaagaagt gtcacata
 241 tgcatacc tncacnea agaaaagt tctgttgc gcaataca acagactg
 301 agtaaat atgttctc tectagaa aaagctca acatgtaa acgttggc
 361 ttctgat gaaattgac angcccaag acagaaga accctggc gtttggct
 421 tncatgca catcatgag gttttgag ttactaat tggctcac tggactgc
 481 caataaga agttatca tatgtaca tagtttct ttttaaga tcaactaa
 541 gttaacgt atttatgt atttatgt ctgagttc tggtttgc tatttaac
 601 taatttca taagtatt tggtttgc caagatla taattatt ggggggnt
 661 aagattat ggactttt gcaagcaaa gactattt taaaanaa aittacaat
 721 ctttgta ttgttttg tctcaaat tgtttaa gcaataaa atagaana
 781 caataaa acaaat

A

MCCTKLLLAALMSVLLHLCEGESEASNFDCCLGYTDRIHPKIVGFTRQLANEGCDINAI
 FHTKLLKLVCANPKQTWVKYVIRLLSKVKNM

B

【 1 6 】

1 gaagcagaa agggccaca tgggtctg gaggctgc gggcggcg gggatgca
 61 gcaacgag ttgtttcc caagtaga gatacaaa caggtctg gacccgtaag
 121 cggccccc ccgctatg gctggagc ccggctgg ccctggcg ccacccgg
 181 ccggccgc catcgctg cactaggg gccccggc caatacaag ctggccca
 241 acaggctc cgcctgat gaccctgc gggcggcg ccccgctc accctggc
 301 cggctccc caagcaga agcagttg gcccggcc agccactg gtcggctc
 361 gcaagact gggggatc gacggccc cggctccc cactatgc cggccggc
 421 gctcagcc ctctctat ccggctcg gcaattct ccgagca gggggaa
 481 cgaagccc ccggctct cagcaaaa ttgctccg aaactgat gtcggctc
 541 aacggcag ccagagcc gggcctata cggctccc gctctggc cggcctca
 601 tcaaaaat ctccgcca actgtcca tcaagccc ccagggct cggcttct
 661 tggagact cagaagcc ccggccct ggcctata gctgtagt ccagggct
 721 acaattcc ggcgccag ttacagtc tggcggcc ttgctccc caagcaaa
 781 ctgaaacc agggcccg gctcaaac tggatgca ccgaaacc cggcttga
 841 gtttggat ccggcctg gactacct cccctggt gaccagcc gacaactg
 901 ccggcggc gggcggcc caccgtgt tcttaagt ctggagtc gcaaaaaa
 96: aaaaaaaa

A

MGSDA WYGLWRPHRPRGPIAAHYGGIGPKYKLPNTGYALHDFSRPRAFFTGARFPTQ
 TICGPGPHLVPARMTVRGTDGAPAYSIYGRPRRSAPFLTGPGRYFPERAGNATYSPARHT
 IAPRNWGVQAEQQSPGPAAYTVPSLLGPRVIGKVSAPTCSIYGRRAAGSFFEDLSKTPGPCAY
 QVYSPGVYKSRAPQFTILARTSLPQDNTKPGPAAYNVQDHRKPRGWSFGIRHSDYLAPLV
 DADN

B

【 1 8 】

1 caccagccc gggcggcg cactctcg ccagcttc cgtctctc acagccca
 61 gaccctcg ctgagccc tggccggc tctctctc gcccacca gcaatccc
 121 gctctgca gttgacgc tgcctctg ctgtagcc gctggcgg gcaagcag
 181 agctctcg gcaactga tgcctgca gttgag accctggc gaattccc
 241 caagaacc caagttga actgagtc cccggccc caatgccc aaaccgag
 301 catagcca ctcaagaig agggaaag ttgctaat ccgctccc ccatgtaa
 361 gaaatcgc gaaagatg tgaatgta caatcacc taccagag gggagaaa
 421 gctcactg gctgtctc gaaggagg cctcttat aggaagaa gaggaaag
 481 agcaagat gcaagaca ccggatgt gcaaaigc ttgggcat gctaggaa
 541 agctctat ttattatt ttctaatg ttgagatt ctatgaa atttagt
 601 taataat: aaggtatg ttactctc ctgactct tcaatata ttactct
 661 ttgaatgc accccaag ttgtctac ttgattca ttattga attatga
 721 ttcaaatg ttccctg attttgaa tattcttg gactgca catgcaac
 781 actgtatg agctggcg atcaagca aggccaat gcaatgt gaagcagg
 841 gaattgat gcaatctg ttgtaact tttagatg actgactg tattatga
 901 aatattca cagttgag tcaacttc ttatgtaa acttaaga cttaaatg
 961 ctatctcc ctggactt ttatgctt ctgttagc atactgct gttatggt
 1021 agtttacc ttgttctg ttagaaca gggcttaat taatggt ttatgaa
 1081 atataaat aaagacta tg

A

MARAALSAAPSNRLLRVALLLLLVAAGRRAAGASVATELRCQCLQTLQGHKPKNIQSVNV
 KSPGPHCAQTEVIATLKNRKAICNPASPIVKKIEKMLNSDKSN

B

【 1 7 】

1 accaaacc ttgagacc aagcacaac aggtctct gggattct teagcaac
 61 ttactgct aagttgca agcagccc gcaagatc ctgagctg caatgag
 121 atagctat acagggca ttgagatg ttgtcttg aagctatg ccttaaac
 181 atagctgt cctcaaga ctgagctc tgccttgg atgctgat cctgctca
 241 atccgacc accactacg caagctgc agcagccc cctgagtt tggctgag
 301 gacaatga ggaatgct gttctctg cccagctc tccagaga agcctgag
 361 acccttcc ctctctt tgaagaga ctatctct tgcacatg ggaacag
 421 gcttatgc actgagcc tgcagata ctgaagca cgcctgga ccaagca
 481 aaagctgg ttgctctg tccatgca ctgaagcc tccctcca ggcagagat
 541 atgagcac aagttgct ctctatgc ttgtaca gagaagaa taatgcaaa
 601 atacttgg cctggctc caagaaag aatctacc tgcctgct gttgaagat
 661 gataacca ctctacag gggagttg gatccaaa ataccaaa gaagatgt
 721 gaaagcat ttgcttca caagatga atcaata agctgaat tggcttgc
 781 cagttccc actgtaac cagctctc caagaaa acatgccc ctctgaga
 841 gggaccag gggcagg gatactgac ttaccatg aattgttc ttcaaga
 901 gggctgac ccgagacc ttgtatg ttgagca tccctgag tggcagaa
 961 gaaagaaa gttttgag tccctata cctgactc tctgtgct taaccaag
 1021 ccaactgc ttcttagc ttgttagg aggtactc tctctacc cagcagct
 1081 agctctcc tttaggac aatccagc ccttttgg agccagct ctctacc
 1141 tctactac ttaagccc cctgagca accagcca cactgttc taagaacc
 1201 ttgtctcc tctactac ttgatgac aaccctcc ctattatt attattg
 1261 ttgttctt tctactac tcaattat tcaagggg caagaatg cagttgct
 1321 aaagagct agttttaa agctgaga tcaatcaa ttgactgt gctctct
 1381 taataagt ctttaata agctgaaa tataagct cagatatt aatgggag
 1441 attataat gagaatat cactgctc atgttctg aataactc cactgag

A

MAEVPALASEMAYVYSGNEDLFFEADGPKQMKCSFDLPLDCCGIORISDHYSKGF
 RQAASVVVAMDKLRKMLVPCQTFQENLSTTFPHFEEPIFDTWDEAYVHDAVPSLN
 CLRDSQKSLVMSGPYELKALHLQGDMEQVYVMSFVQGEESNDKIPVALGLKEKLN
 LSVLKKDDKFTLQDLQKPNYFKKMEKRFVFNKIEINKLFESAQFPNWIYISTQAEINP
 VFLGGTKGGQDITDFIMQVSS

B

【 1 9 】

1 caccagccc gggcggcg cactctcg ccagcttc cgtctctc acagccca
 61 gaccctcg ctgagccc tggccggc tctctctc gcccacca gcaatccc
 121 gctctgca gttgacgc tgcctctg ctgtagcc gctggcgg gcaagcag
 181 agctctcg gcaactga tgcctgca gttgag accctggc gaattccc
 241 caagaacc caagttga actgagtc cccggccc caatgccc aaaccgag
 301 catagcca ctcaagaig agggaaag ttgctaat ccgctccc ccatgtaa
 361 gaaatcgc gaaagatg tgaatgta caatcacc taccagag gggagaaa
 421 gctcactg gctgtctc gaaggagg cctcttat aggaagaa gaggaaag
 481 agcaagat gcaagaca ccggatgt gcaaaigc ttgggcat gctaggaa
 541 agctctat ttattatt ttctaatg ttgagatt ctatgaa atttagt
 601 taataat: aaggtatg ttactctc ctgactct tcaatata ttactct
 661 ttgaatgc accccaag ttgtctac ttgattca ttattga attatga
 721 ttcaaatg ttccctg attttgaa tattcttg gactgca catgcaac
 781 actgtatg agctggcg atcaagca aggccaat gcaatgt gaagcagg
 841 gaattgat gcaatctg ttgtaact tttagatg actgactg tattatga
 901 aatattca cagttgag tcaacttc ttatgtaa acttaaga cttaaatg
 961 ctatctcc ctggactt ttatgctt ctgttagc atactgct gttatggt
 1021 agtttacc ttgttctg ttagaaca gggcttaat taatggt ttatgaa
 1081 atataaat aaagacta tg

A

MARAALSAAPSNRLLRVALLLLLVAAGRRAAGASVATELRCQCLQTLQGHKPKNIQSVNV
 KSPGPHCAQTEVIATLKNRKAICNPASPIVKKIEKMLNSDKSN

B

【 図 2 4 】

1 aanaacaggg aanaaganaa taagaacaa taacacacac taagaacagc aanaagacag
 61 ggaagaggg taacacagc caacagca caacagca caacagca caacagca caacagca
 121 caacagaaa caacacac taacacac taacacac taacacac taacacac taacacac
 181 aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 241 aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 301 aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 361 aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 421 aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 481 aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 541 aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 601 aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 661 aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 721 aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc

A

MHKEEHEVAVLGAAPPSTLPRSTVNIHSEFVPHVWVSLNFTLFLWCCGLFAFAVSVKRS
 DRKMVGDVDTQAQVASTAKLNIWALILGMLTITGIFILLVFGSVTVYHIMLQIQEKRGY

B

【 図 2 5 】

1 gagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 61 gagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 121 gagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 181 gagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 241 gagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 301 gagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 361 gagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 421 gagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 481 gagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 541 gagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 601 gagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 661 gagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 721 gagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 781 gagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 841 gagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc

A

MSALSLILGLLTAVPPASCQQQLGNLQVWMOGLIAVAVFLVLAIAFAVNHFWCQBEPEPA
 IIMILTVGNKADGVLVGTDRYSSMAASFSSSEHENAENVPFEFGKVRSTPM

B

【 図 2 6 A - 2 】

2881 tgaacacagc taacacac taacacac taacacac taacacac taacacac
 2941 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 3001 aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 3061 tgaacacagc taacacac taacacac taacacac taacacac taacacac
 3121 aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 3181 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 3241 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 3301 tgaacacagc taacacac taacacac taacacac taacacac taacacac
 3361 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 3421 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 3481 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 3541 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 3601 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 3661 tgaacacagc taacacac taacacac taacacac taacacac taacacac
 3721 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 3781 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 3841 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 3901 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 3961 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 4021 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 4081 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 4141 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 4201 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 4261 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 4321 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 4381 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 4441 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 4501 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 4561 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 4621 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 4681 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 4741 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 4801 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 4861 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 4921 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 4981 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 5041 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 5101 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 5161 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 5221 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 5281 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 5341 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc

A (Continued)

【 図 2 6 A - 1 】

1 aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 61 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 121 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 181 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 241 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 301 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 361 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 421 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 481 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 541 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 601 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 661 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 721 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 781 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 841 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 901 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 961 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 1021 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 1081 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 1141 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 1201 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 1261 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 1321 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 1381 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 1441 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 1501 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 1561 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 1621 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 1681 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 1741 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 1801 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 1861 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 1921 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 1981 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 2041 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 2101 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 2161 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 2221 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 2281 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 2341 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 2401 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 2461 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 2521 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 2581 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 2641 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 2701 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 2761 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc
 2821 ggaacacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc aagaacagc

A

【 図 2 6 B 】

MLLWVILLVLPVSGQFARTPRPIIFLQPPWTTVFOGERVTLTCKCFRFYSPOKTKWYHRYLG
 KEILRETPDNILVEQSEYRCAOQGPLSPVILDFSSASLILQLPVFEGDSVILRCRKA
 EVTLNNTYKNDNLVLAFLNKRDFHHPHACKLDNGAYRGTGYKESCCPSSNIVJKVQVQFP
 TRPVLRASSQFISGNPVTLCTFQLSLFRSDVPLRFRFDDQTLGLGWSLSPNFQITAMWSK
 DSGFYWCKAATMPYVSDSPRSWQVQIPASHPVLTLSPEKALNFEQTKVTLHCETOEDSLR
 TLYRFYHEGVPLRHKSVRCEGASISFLTTEENSGNYCTADNGLGAKPSKAVLSVTVPSVH
 PLYNLSSPEDIIFEGAKVTLHCEAQRGLPILYQFHHEGAALERRSANAGGVAISFSLTAHS
 GNYVCTADNFGPQRSKAVLSVTVPSVHPVLTLSSEALTFEGAVTLHCEVQRGSPQILY
 QFYHEDMPLWSSVPSVGRVVSFSLTEGHSNGNYCTADNFGPQRSVVSFVTVPSVSRPIL
 TLRVPRQAQVVDLLEHCEAPRGSPHLYMYFYHEDVTLQSSAPSGGEASFNLSLTABHSGN
 YSCEANGLVAQIHSDTILSVVPSRPIITRAPRAQAVVDLLEHCEALRGSSPILYWFYH
 EDVTLCKISAPSGGASFNLSLTHEHSGVYSCADNGLAQRSEMMVTLVAVVPSRPIVTLRA
 PGTIIAVVDLLEHCEALRGSPHLYRFHEDVTLGNRSSPSGGASNLNSLTHEHSGVYSCA
 DNGLAQRSEVTVLTYITLTAHSGPFTGVAGDLSIAGLAAGALLYLWLSRKAQRKSPAS
 DPARKSPSDSDSQEPTVHNPVAVWELQPVYTNANPRGENVVSVEVRIQEKKHAVASDRPIL
 RNKSGPIIYSEVKVASTVPSGSLFLASSAPHR

【 27A - 1 】

1 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
12 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
16 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
18 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
241 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
241 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
361 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
421 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
481 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
541 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
601 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
661 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
721 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
781 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
841 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
901 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
961 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
1021 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
1081 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
1141 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
1201 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
1261 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
1321 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
1381 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
1441 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
1501 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
1561 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
1621 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
1681 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
1741 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
1801 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
1861 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
1921 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
1981 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
2041 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
2101 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
2161 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
2221 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
2281 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
2341 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
2401 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
2461 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
2521 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
2581 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
2641 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
2701 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
2761 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
3061 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg

A

【 27A - 2 】

2821 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
2881 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
2941 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
3001 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
3121 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
3181 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
3241 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
3301 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
3361 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg
3421 eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg eeggeceeg

A (Continued)

【 27B 】

M1RAGDHNRRQRCGSLADYLSAKFLYLLGHSLTWSGDRMWHFVSVFLVYGNLSLL
TAYYGLVAVGSVLVLAIGDWDKNARIKVAQTSLVVQVNSVILGILMMVFLHKHELL
TMVHGWVLTSCYILHITIANIANLSTATAITQRDWDVVVAGEDRSKLANMNAIRRIDOLTN
ILAPMAVQIMTFGSPVIGCGFISGWNLSVMCEVYVLLWVYQKTPALAVKAGLKEEETEL
KOLNLHKDTEPKLEGTMLMGVKSNIHEIJEHOEPTCASQMAEFPFRTRFDGWSYVYQPV
FLACMGIAFLYMTVLGFDCTTGYAYTQGLSCSHLSILMGASAITGIMGTAVFTWLRKRCGL
VKTGLISGLAQSLCLCVHSVFMQSPDLSDVSPFEDIRSRFCGSIPTPKAPEITTEYMSNGSN
SANIVPETSPEVPIHSVLLPAGVIAARIGLWSPDLTYTOLQENVIESERHIGNVQNSMNYLL
DLHFIMVILANPEAFGLVLSVSVFAMGIIHMYFRFAQNTLNKLFACGPDKEVRKNEQ
ANTSVM

【 28A 】

GCTCTAGAACA TAGTGGATCCCCGGCTGCGAGGAATTCCTAAAGAAGCCCTGGGAGC
A
CAGCTCATACCACTGGACTGGACCTGGAGGTTCTCTTTTGTGGTGGCAGCAGTACAGGT
GTCCAGTCCCAGGTGCAAGCTGGTGCAGCTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCTGGGTCTCT
G
GTGAAGGCTCTCCGCAAGGCTCTGGAGGCCACTTCAGCAGTATGCTATCAGCTGGGTG
CGACAGGCCCTGGACAAAGGCTTGGAGTGGATGGGAGGATCATCCCTATCTTTGGTAC
A
GCAAACCTACGCACAGAAAGTCCAGGGCAGAGTCAAGTATACCGGGACGAATCCACGAG
A
ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGC
G
AAAACCGGATCCCTGGGCCGTATAGCAGTGGCTGGTACCCGAACTCGGACTACTACTA
C
TACCGGTATGGAGCTGCTGGGCCAAGGGACACGGTCAACCGTCTCCTCAGGGAGTGCATC
C
GCCCAACCCCTTTCCCCCTGCTCTCTGTGAGAAATCCCGTGGATACGAGCAGCGGTG
CCGCTTGGCTGCTCGCAGCAGGACTTCTTCCCGACTCCATCACTTCTCCCTGGAAATAC
AAGAACAACCTCTGACATCAGCAGACCCCGGGCTTCCCACTCACTCTGAGAGGGGGCA
G
TACGCAGCCACCTCAGAGGTGCTGTGCTTCCAAGGACGCTATGACGGGCACAGACGA
A
CAGCTGGTGTGCAAGTCCAGCCACCCAGCCGCAACAAGAAAGAAAGAAAGTGCCTTCC
A
GTGATTTGCTGAGTGCCTCCCAAACTGACCGTCTCTGCTCCACCCCGGACCGCTTCTC
GGCAACCCCGCAGCAAGTCCAAGCTCATCTGCCAGCCACCGGGTTTCACTCCCGCGCA
G
ATTCAAGGTGCTGCTGCTGCGGAGGGGAAAGCAGGTGGGGTCTGGCGTACACCGGACCA
G
GTGACGGTGTAGGCCAAAGATGCTGGGCCACAGCTCAAGAGGTGACCGAGCACACTGAC
C
ATCAAAGAGAGCGACTGGCTGACCGAGGACATGTTTACCCTGCGCGGTGGATCACAGGG
C
CTGACCTTCCAGCAAAAGTGGTCTCCATGCTGTCTCCCGGATCAAGCAAGCAGCCATCCGG
GTCTTCCGCAATCCCCATCTCTTCCAGCATCTTCTTCCAGCAAGTCAACCAAGTTGAC
TCCCTGTGACAGACTGACCACTTGAACAGCTTGAACAGCTTCTGACCCCGGCAAAAT
GGCGAAGCTGTAAAACCCACACCAACATCTCCGAGAGCCACCCCAATGCCACTTTCAG
C
GCCGTGGTGTAGGCCACGATCTGCGAGGATGACTGAAATCCCGGGAGAGGTTACCGT
C
ACCGTGACCCACACAGACTGCCCTCGCCACTGAAGCAGACCACTCTCCCGGCCAAGGG
G
GTGGCCCTGCACAGGCCGATGCTACTTGTGTCACAGCCGCGGAGCAGCTGAACCTG
CGGAGTGCGCCACCACTACGTTGCTGTGACGGGCTTCTCTCCCGGGACGCTTCTGCT
CAGTGGATGCAGAGGGGCGAGCCCTTGTCCCGGAGAAAGTATGTTGACAGCCGCCCAAT
G
CCTGAGCCACAGGCCAGCCGCTACTTGCACACAGCACTCTGACCGTGTCCGAAGA
G
CAATGGAAACAGGGGGAGCACTACACTGCTGGTGGGCCATGAGGCCCTGCCAACAG
G
GTCACCGAGAGGACCCGTGACAACTGTCACCGAGGGGAGGTGAGCGCCGACAGGAGG
G
TTTGAGAACCTGTGGCCACCCGCTCCACCTTCACTGCTCTCTCTCTGAGCCTTCT
TACAGTACCACCTGACCTTGTTCGAAAGTGAATGATCCCAACAGAAAGACATCCGAGA
C
CAGAGAGGAACTCAAAGGGGCGCTGCTCCGGTCTGGGGTCTGCGCTGCGGTGGC
T
GTGTCAGCTGTTCTCTTCCCGCCCGCTCCAGTGTGTGCTCTCACAGCCGCTTCT
TCTGACCGCGCAGGGGCTGCTGCTGTCAGAGCCACGAGGTGGGCTTACCCCAACTG
T
TTGCTGTGATACGCTTGTGCTCCGAAATAAATATGCACATTTTATCCATG

A

【 28B 】

MWDVWRFVYVAAATGVQSOVLVQSGAEVKKPKCSVSKVCKASGGTFSSY AISWVROAP
GGGLEWGGIIPFGTANYAQKQGRVITADBESTAYAMELSSLRSBETA VYCAKTCILGP
YSSGWPNDSY YYYGMDVWGGQTTVIVSSCSASAPILPLVSCNSPSTSSVAVGCLAQD
FLPDSITFSWKYKNSDISSTRGFPVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMOGQTDHIVCKVQHPN
GNKEKNVPLVPIAELPKVSVFVPPRDGFNGNPRSKKLIQATGFSRQIOVSLVREGQV
SGVTTDQVQAEKESGFTTYKYVSLTILKESDWSQSMFTCRVDRHRLTFQQAASMMCV
QDTRVAFVAFPPSFASIFLTKSTKLCLYDLYDSTVTSWTRONGEAVKTHNTISESHPNRF
SANGVEASICEDDWSNGERFCTVTHTDLPSPKQTSRPKGVALHRPVDVLLPPAREQLNRE
SATITCLVTGFSPADVFVQWQORQDLPSPKVKYTSAPMPPEQAPGRVFAHSILTVSEEWNT
GETYTCVVAHEALPNRVTERTYDKSTEGEVSADGEPENLWATASTFVLLSFLYSTTVTL
FKVK

【 29 】

1 cccctcga gctcttca hnaaaacct agcttctg gctcgcgaa agctcagc
61 atctccag agctccag gggccacag agtgaaga accagagga gtagatag
121 tgggtctc cccgagcc acactctc tggtagcc atpccct caagctcag
181 acactctc gctccacg gctccgca gtagctc gtagctct tctcctca
241 tctctcgt tctctcga agtgaaga cccagaga ctgctcct caagctca
301 gctcccaa agctccag gctctctg cccctcga tctctct tctcctca
361 acactctc agctcag gctctcgt agagccgc ctgagaaa ctgctctc
421 tctcctcgt gctcagga tctctcgt cctctcgt gaggagct agtcaagct
481 atctcact ctgagtag cctcagcc caacagag ctgagcct gtagagag
541 gtagagag gtagagct gtagagag atctctgc atggagaaa atctcctca
601 caactcaa cctggccc atggagcc tctcagag ctgagagct ctgagagag
661 agatataa ctgtagca agtctcct atctcga gctcagag tctcagag
721 agagagag ctgtagca tctcagag gctcagag gctcagag ctgtagag
781 atctcagag gtagagag tctcagag atctcagag gctcagag ctgtagag
841 ctctctct tctctct tctcctca tctcagag tctcagag tctcagag
901 gtagagag agatataa taagaagt actctcag taanaaa

B

MLPMA LPSVSWMLLCLILLCOVQGEETQKELPSRISCPKSKAYGSPCYALFLSPKSWMD
ADLACOKRPSGLVSVI SGALGFSVSSLVRSINSYSYIWIGLHDPITGQSEPDGGWESSD
VMNYFAWEKNPSTILNPGHCGLSRSTGFLKWKDYNCDAKLPVCKFKD

【 3 0 】

naacnaatg gcaatctct tttctact ctgaaaaa acaacagag aaaaagac ctgagaata aggtatga ttaactgc
 agacaaaag ggaatggt tgggactt ggttctag tgcagact aacaatag cagaacag gaaatgag ttccacaga
 agacatata gcaacagct ctatgaaa cggcaatg acatgtag actttaca gacatcca gaaatgag agcaatgc
 naaagctca tttactg gctgtag tggagctca acaatgag ttgtagaga acaagagc ctatgag cccaatgag
 cagcttag agcagaaa ggaatgag ttgagaga gactgctt gaaagagc ttgtagaga aacatcct tggatctg
 gacatcct tctatggt cctgaggt tggatgta ccaatgct tccatgaga gaaatgag gaaatgag cactcaat
 gttgattt cactgagtt tgcagagc atgtagag ctgaggtt cctgaggt cactcaatc cagctgct ttgagaga
 tgccttg gacagaaa algttcaat tgcatttt algtagag cagctgag tggagctgc aacgtctt
 gcaatctt atgagact tctctt gctgtgga aactgctt cctgagaga atgcaacag cactcaat ttgcaaac
 cagctcct atctactt ggcagcattgagat agctgagc cactcaat cctcaata tctcttgc cactgag
 tccagaaat tggagctcc cagagctca gacatgct cctgagct cctgattt gcaatgct cctctgag actgagat
 gctgagca tgaacagc tgcagact agctcagag tttaactg ctgagagc tggagctg naactgag agctgagac
 aactgctt ggaatgct agctgctt tggatgag ctgagctt agctcact tctgctg tcaatgaa ccaatcct
 gacatgct cactgtaa gacagaaa tgcagaga aacagaaa atgcaact agctcaata tgcagagca tgcagct
 tggatgca gctgaggt gctctctc agaaatgag cactgag tctgctt tgaagctg aggtgaaat ccaatgct
 tgcctgag cactgagca cactgag
 gaaagctc tgcagagag ttgagaaa atgcaact ctcaatc ctcaatc ccaacccc ccaacccc agaaatgag tgcctg
 ctgaaagc cctctctc gctgctca tcaatc gctgaggt ctgaggtt agcaatc aactgagct ctgagaga
 gctcaggt agttgctca gctgacta ctgtagaa tgcctcct aacatcct tctcagct ctgagagat tcaatgca
 gtaacaaa aacatcaat tgaagaaa aactgagtt tccatca ttaatgaa ttgagagct atgctgctca gctcagct
 cctctgag tactgatt gataaata tgcattct caactgct gctgagga gcaagagat gcaatgca gcaacagag
 gcaatgct tgcctgag aactgagc agcaatgag aattgagaa gcaacagat atttatga gaaatctt atgagata
 tctctgct tctgctt tggagagca caatgatt tgcctgct agtatata aactcaat aactgctca cctgagct
 gaaataca tcaatgct tttatgct aatgattt tcaatgct cactgaga acaagatg gcaatgct atcaatgct
 gctgctct attttca aactgctca gaaacaaa ctgagctca ctgagctg gctgagca atctgagc tggagctt
 ccaaaagat atctctat tggctaac aactcaac gactcaac aactcaat taaatca ctatgag ctgagagag
 caatgctca atgctctt ttcaatga acaacaaa tctgagga gataagta gttgctag agctcactg aatgtagt
 tttatgag cactctca ccttcaag
 gctcagag tgcctgaga tctgcaat atctctg ctgagcaga gtagagct cactgctag aatgtagca cctgagca
 aatgctt cacttga atacaag cctcagct tgcctgct ccaacata ctgctgag atgagaaa gctgagca
 ttaatca atctctt gcaagaaa atagagaa gctcctct ccaagcag ctgctgct gcaatgct gactgct
 ctgagcaga ccaacata ccaatgag atctctg atctctg ccaacata ctgctgag atgagaaa gctgagca
 agatcctca tgcagaaa gcaacagag atgctca tcaaggtt cactgagct caatgctca aacagcag aatcctaaa
 gctgaggt tcccaatg ctgctgag atacagaa agcaatgaa aatgtagaa tttctgaa gctgctt ctcaatca
 ttgagcagc gaaatggt tctgctt gaaatgct gaaatgct tttatgaa aatgtagt gaaatgct gaaatgaa aat

A

MQPEGAEGKSKFQRLVLSKSLAKETLSEFLGTFILVJGCGCYAQAILSRGRFGVITINVG
 SMAVAMAIYVAGVSGGHINPAVSLAMCLFRMKWFKLPYVGAOFLGAVGAATVFGIY
 YDGLMSFAGGKLLVGENAIAHFATYPAFYLSLANAFADQVATMILILVIFVIFDSRNLGAP
 ROLFPIAGLLIIVASSLGLNSGCMNPARLDSPKLTALAGWGFVFRAGNFWIPVVPVGL
 VGVAVGGLIYLVIEIHPPEPDSVFKTEQSEDDPEKVELSVIM

B

【 3 1 A 】

1 ahaggeccg gctctact tctctagc ctctgctt tctctgca agctcaggg
 61 gattggggc atggggacc tcaatctc agcccgct tcaatctt ccaatggtt
 121 gactcagct ccaatctag ccaatctc agcccgct ccaatctt ccaatggtt
 181 gactcagct gctctgct ccaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 241 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 301 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 361 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 421 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 481 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 541 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 601 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 661 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 721 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 781 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 841 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 901 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 961 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 1021 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 1081 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 1141 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 1201 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 1261 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 1321 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 1381 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 1441 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 1501 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 1561 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 1621 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 1681 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 1741 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 1801 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 1861 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 1921 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 1981 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 2041 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 2101 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 2161 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 2221 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 2281 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 2341 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 2401 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 2461 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 2521 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 2581 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 2641 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 2701 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 2761 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt
 2821 gactcagct gctctgct tcaatctt tcaatctc agcccgct gaaatggtt

【 3 1 B 】

MRPGLSFLALLLFFLGAAGDLDVGPPIPSGPFSSPGVDSVSSSSSSKSGSSSRSLGSGGS
 VQLFSNFSGVDDRGTCCQSVSLPDITFPVDRVERLEFTHVLSQKFEKLSKRVREYVQLIS
 VYKLLNLTVRIDIMKDTISYTELDFELIKVEVKEMLVIQLKESFGSSEIVDQLVEIERN
 MTLVLEKLELTDKNVLAIRREIVALKTKLKECEASKDQNTPVVHPMPGSCGGHGVNYS
 KFSVYQLNWRGFSYLYGAWGRDYSQHPNKGLYVWAPLNDGRLLEYRYLNTDLDLILY
 INARELRITYGQSGVYVYNNMVMYVNTGNIARVNLNTNTIATVQTLPNAAVYNNRFSYA
 NVAWQIDFAVDENGLWVIYSTEASTGNMVISKLNDDTLQVNLWYTKQYKPSANAFMV
 CQVLYATRMNTRTEEIFYYDTNIGKEGKLDIVMHKMQEKVQSYNINPFQDKLYVYNDG
 YLLNYDLSVLQKPKQ

【 3 3 A 】

1 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 61 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 121 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 181 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 241 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 301 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 361 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 421 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 481 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 541 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 601 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 661 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 721 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 781 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 841 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 901 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 961 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 1021 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 1081 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 1141 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 1201 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 1261 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 1321 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 1381 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 1441 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 1501 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 1561 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 1621 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 1681 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 1741 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 1801 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 1861 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 1921 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 1981 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 2041 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 2101 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 2161 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 2221 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 2281 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 2341 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 2401 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 2461 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 2521 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 2581 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 2641 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 2701 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 2761 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 2821 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct

【 3 2 】

1 aacatctg tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 61 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 121 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 181 aacttctc agaaagaga ataaagaga aacttctc gcaatgctc tgcctgctc
 241 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 301 aacttctc tccacagga agatcagga gcaatgctc agctgagc gcaatgct
 361 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 421 ccaatgctc agctgagc gcaatgctc agctgagc agctgagc gcaatgct
 481 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct
 541 gcaatgctc tgcctgctc agctgagc agctgagc agctgagc gcaatgct

A

MTCKMSQLERNIETINTHOYSVKLGHIDTLNQGEFKELVRKLDQNLFKKENKNEKIEIHM
 EDLDTNADKQLSFEFIMLMARLWASHEKMHGDEGPHHHKPLGEGTP

B

【 3 3 B 】

MCPQESSFQPSQFLLVGVVPAVLLLAQCLRWHPCRRLGACWTLNGOEEPPVSOPTPQLEN
 EVSRQH.PATLPEMVAFYQELHTPTQGGTMVRQLMHKLLVFSAREVDHRGGCLMLQDTGIS
 LLIPPGAVAVGRQERVSLJLWVLDLSAPLSQAGQLVSPVACGPHGASFLKPCITLTKFHCAE

QPSHARTYSSTNTLLDAK.VWRPLGRPGAHSRDECRJHLSHFLSYTCVLEAPVGREARKWLQ
 IAWFCSPLVPGOSHQLRRIYFLNNTPCALQWALINEQPHGGRLRPGOLFDFNGARGDQCLK
 LTYISEGWENVDSSQQLVPHLJHWHGKCPFRSFCFRKAADENEDCSAL.TNEIIVTMHIFQD
 GLETKYMEILRFQASEEESWAAPPVSPPPNCRLLPELFEQLRMLLEPNSITGNDWRGLASH
 LGLCGMKIRFLSCQRSPAAAILLEFEQNGSLQELHYLMTVMERLDCASAIQNYLSCTHGGSP
 GPERGGARDNQGLELDEKL

【 3 4 】

I atigtgat gatcagtag cctgtgtca tgcagtag ctctgttgc tcaatctgt
 61 atctcttt tccaacagc alaagaatgt atgagccac aagatctgt aagaagggc
 121 tccctgatg tctgatgtag agagatatt caccagcac agatctgtca cccagctgt
 181 gctgttctt cccagcaaaa tgaatgtgt agtctgtgt ccaattctt tctctctt
 241 ccttctgagc caccgttct tctgtgtga aatgtgtgt atcaaaaa aaaaagaact
 301 ccttctgat aagaataaac atctgtgccc agtcagaaa tctgtgtgt tctctgtgt
 361 gacatata gattcaagc agaaagaaga ttgagaat tctgtgtgt tctgtgtgt
 421 tccatata tggctcagc gctctattat aattcaaga gcaaaagata ccaagaact
 481 caucagctt aatgagctc tgcagtagc ctggaagc agctacact ggttctct
 541 cctgtctt gatccagca actctctct tcaacagc gggagctct caagctgtga
 601 atgtctct acaacacta cccagaggtt caattctt gagaacaaa agatttggg
 661 cacttcaaa ataatgaaa gtttcaaaa tgcattctt aattctct ctctatata
 721 tccaaatg gcaatgaaa ttgaattca acttaaaaa gcatagaaa gaattcaagg
 781 tttagatct gttcagtag ccaatttgc aatgtctct ttgtgtcca agttgtgtg
 841 caatgtct atcagtagc actcaaccc tgaacactt gctctcagg tcaagaagt
 901 tccctctt cagctctca agatgtgga attaagtaga cctctcaaa cctcagata
 961 actttttt tattttat agagcagag ttcaatctg ttgcacac tggctcaaa
 1021 cctgtact caggtctct gctgtctgc cccccaagc tctgtgtgt acaagctga
 1081 gcccaact ctgtctcag accttaata ttgaagaac tctcaaac tgtgtctag
 1141 tgaatgac tacaacaaa tagcagtag gcaagaact gaagaagc agagatcat
 1201 gttgacagc gatgagaaa agtagaggt gggatagag gttcaggtt ctctcaggt
 1261 gttattct cttcagcac tacagagat atgtatctc ataatgga gccagagtg
 1321 gttcttga ttgatctt tgcacagc aactatgta caatctgt caaacccag
 1381 tagtctgt ttacagaaa taagaataa ttatgaaa taanaaaaa aaaaaa

A

MKVGVLWLSFFTFDGHGGFLKNDGKTKKELIVNKKHLGPVEYQLLQVTVRDSKFK
 RDLRNFLLKLPPLLWSHGLRIRKATTTDCNSLNGVLOCTCEDSYWFPSPCLDPONCYLH
 TAGALPSCCHLNLNLSOVNFCERIKWGTFKINRFTNDLLNSSAISYKYANGIEQLKKA
 ERIQFESVQVTFRMSLSPKLECGNTI

B

【 3 6 A 】

I gttgtgtga ttgaataa ttgcagcac gctctctcc agatctca gactgatt
 61 caucagct tccaacata tctgtgtgc gcaattgt gaatgagc ttatctgt
 121 agcagagc cctgtctat tctcttcc ccaatgag tgaatctc gacagtag
 181 gacagctt ttctgtgac ttctgtgag cccctctct gctctccc ccagcctca
 241 gttgagagc cctgtgtgt acccagatg tctgtgtca cccagcagc gaaagctca
 301 atctctctc atctgtgag agtctctag ttctgtgag ttctgtgag ttctgtgag
 361 cctgtgtgt cctgtctct cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt
 421 ttctgtca cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt
 481 cccagcctt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt
 541 gttgagagc cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt
 601 cccagcctt gttgtgtgt ttgaatcct ttgtgtgtc actgtgtgt gctgtgtgt
 661 gactgtct gttgtgtgt ttgaatcct ttgtgtgtc actgtgtgt gctgtgtgt
 721 gttgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt
 781 cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt
 841 ttgaataa ttgcagcac gctctctcc agatctca gactgatt
 901 ttgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt
 961 gctgtgtgt ttgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt
 1021 cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt
 1081 atcaacac cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt
 1141 tctgtgtgt gactgtgt ttcaacaa cccagcagc ttatctctg tctgtgtgt
 1201 cagagcag cctgtgtgt agtctctc ttgtgtgaa tctgtgtgt tctgtgtgt
 1261 actgtgtgt agcctgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt
 1321 tctgtgtgt gactgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt
 1381 gctgtgtgt ttgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt cctgtgtgt

【 3 5 】

A'TGGTCTCATGGCCGCCGAACCTCTCTCTGCTCTCAGGGGCCCTGGCCCTGACC
 CAGACTGGGGCCGCTCCACTCCATGAGGATTTTCTACACCACCATGTCCGGCCCGCCG
 CGCCGGGAGCCCGCTTCACTCCGTCGGCTACGTTGGACCATACCGAGTTCGTCGGGTT
 CAGACGAGCCCGGAGCCAGAGGATGGAGCCGCGCCGCTGGATGGAGCGGGAGG
 GG
 CCGGAGTATTGGGACCGGAACACAGATCTGCAAGGCCAGGCACAGACTGACAGC
 AG
 AACCTCGGATCGGCTCCGCTACTACAACAGAGCGAGGGCGGTTCACACACTGCA
 G
 GTGATGATGCTGCGACGTGGGCCCGAGCGGGCTTCTCCCGGGGATGACACAGCA
 C
 GCCTACGACAGCAAGGATACATCGCTCTGACAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCGC
 G
 GACATGGCAGCTCAGATCAACCAAGCCGAAGTGGAGGCGGCCCTCAAGCGGAGCAGCT
 G
 AGAGCCTACCTGGAGGCGAGTTCGTGGAGTGGCTCCGAGATACCTGGAGAACGGAA
 G
 GAGAGCTGCGAGCGCGCGGCCACCCCAAGACACATAGCCACCACCCCTATCTCTGA
 C
 CATCAGCCACCCTGAGGCTGGCGCCCTGGCTTCTACCTCGGAGATACACTGACC
 TGGACCGGGATGGGAGAGCAGCACCACAGCGGACTCATGGAGACCAGGCTCTG
 AG
 GGGATGGAACCTTCCACGAAGTGGGCCGCTGTGTGGTGGCTTCTGGAGAGGACAGAG
 A
 T
 ACACCTGCCATGTGACAGCATGAGGCTGCGCAGAGCCCTCACCTGAGATGGAGCCA
 C
 TTTCCACGCCACCATCCCATCGTGGCATCGTGTCTGGCTGGTCTACTTGTAGCTG
 TGGTCACTGGAGCTGTGGTGGCTGTGTAATGTGGAGGAAAGAGCTCAGATAGAAAA
 G
 GAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCAAGCGCGCAACAGTCCACAGGCTCTGATGTCTCTC
 A
 CGCGTGAAGTGTGA

A

MYLMAPIRLLLLLGSALALJOTWARSHSMRYFYTTMSRPRGRGEPRISSVGYVDDTQFVRFD
 SDAASQRMPEPRAPWMEEREGPEYWRNFTQCKAQAQTEREMRJAIRYVNSQEGGSHMGOV
 MYGCDVPGDFRGRYEQHAYDSKDYIALNEDLRSWTAADMAAQTKRWEAARQAEQL
 RAYLEGEFVWLRRLYENKGTQLRQADPPKTHMTHPISDFEATIRCWALGFYPAEITLW
 QRDEQDQTHRSSWRPLQGMPSRGRLLWCLLERSRDPAMCSMRVQSPSP

B

【 3 6 B 】

MAELLASAGSACSWDFPRAPSPFPFAASRGLGGTFRFRHRAESRPRORDRDRGVRVPM
 SSRCPAPRCRCLPGAALWLGIVLILLADWVLLRRTALRIFSLVPTALPLIRVWAVGLSR
 WAVLWLAGCGLVLRATVGSKSENAGQWLAALKPLAAALGLALPLALFRELISWGAPOS

ADSTRLLHWSHIFTAVFVYAAALAAALWHKLGSLVWPGQGGSGNPNRRII.CGLGET
 RRLSLFLVLYVSSLGEMAIPTFRLTWI.LQDGSADFTFRNI.TLMSL.TIASAVLEFVDDGI
 YNNTMGHVHSHLQGEVFGAVI.RQETFEFFQKQQTGNIMSRVTE.DTSLSDLSNSLFLWYL
 VRGLCLLGMILWGSVLT.MVTLITLPL.LL.PK.VGK.WYQLLE.VQVRESLAKSSQVAIEA.S
 AMPTVRSFANEQEAQK.FREKLOEIKTL.NQKEAVAYVNSWTT.SISGMLLVKGLYIGQLV
 TSGAVSSGNI.VTFVLYQMOTQAVEVLSI.YPRVQKAVGSSEK.IFVLDRT.PRCPPSGLLPT
 HLECLVQFQDVSFAYPNRPDVLVQLGTLFRPGEV.TALVPGNSGKSTVAALLQNLQYPTG
 GQLLUGKPLPQYEHRYLHRQVA.VAVGQEPVQVFRQENI.AYGL.TQK.PMFEITAAAVKSG
 AHSPISQLPQGYDTEV.DEAGSQLSGGQRQAVALARALIRKPCVLLDDATSALDANSQLOVE
 QLLYESPFRYSRVLLITQHL.SLVQADHILFLEGGAIREGGTHQLMEKKOCY.WAMVQAPA
 DAPE

【 3 7 A 】

1 cggagccca pggggcaat pggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
61 hccagccg gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
121 agaaagga agaaagga agaaagga agaaagga agaaagga agaaagga agaaagga
131 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
241 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
301 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
361 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
421 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
481 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
541 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
601 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
661 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
721 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
781 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
841 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
901 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
961 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1021 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1081 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1141 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1201 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1261 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1321 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1381 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1441 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1501 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1561 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1621 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1681 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1741 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1801 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1861 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1921 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1981 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2041 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2101 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2161 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2221 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2281 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2341 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2401 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2461 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2521 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2581 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2641 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2701 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2761 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2821 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2881 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2941 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
3001 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
3061 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc

【 3 8 A - 1 】

1 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
61 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
121 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
181 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
241 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
301 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
361 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
421 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
481 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
541 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
601 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
661 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
721 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
781 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
841 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
901 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
961 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1021 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1081 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1141 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1201 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1261 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1321 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1381 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1441 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1501 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1561 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1621 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1681 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1741 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1801 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1861 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1921 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1981 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2041 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2101 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2161 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2221 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2281 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2341 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2401 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2461 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2521 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2581 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2641 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2701 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2761 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2821 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2881 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
2941 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
3001 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc

【 3 7 B 】

MEYMTSGDNKEEJDLIKHLVSDVIDIMENLYASEEPAVYFVPSLMTMCOQDSNQDERSKS
LLSQEQVPLWSSVRYGTVDLLAFANHSINTAKIFVYQGRQESGILNMMVITPONGRQVDS
DVIJIPWKLTYRNGSDIPRGAFGKVIY:AQDKTKRMAKCLLPVDQFKPSDVEIQACRHE
NIAELYGAVLWGFTVHLFMEAEGGSLVBLKLESCGPMREFEHWYTKHVLKGI.DFI.HSKXVI
HHDKPSNIVFMTKAVLVDGFLSQVMTEDVYFPKDLRGTBIYMSPEVILCRGHSTKADIYSL
GATLIHMOTGTPPVWVRYPRSAVPSYLVIIHKQAPLEIADDCSPGMRLEIASLERPNPHR
RAADLLKHFAINPPREDQPRCQSLDSALI.FRKRLLSRKLLELPENIADSSCTGSTEESMLKR
QRSYIDILGALAGVFNLRGPPPTLEYG

【 3 8 A - 2 】

3061 cggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
3121 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
3181 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
3241 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
3301 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
3361 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
3421 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
3481 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
3541 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
3601 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
3661 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
3721 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
3781 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
3841 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
3901 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
3961 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
4021 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
4081 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
4141 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
4201 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
4261 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
4321 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
4381 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
4441 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc

A (Continued)

【 3 8 B 】

MLLLLLLAF.LRPPGAGGAQT'PNAISEGQHHPWVEGGIRYGLTRDQVKAINFLPVYDIEF
YVCRGEBEVGPKVAKCLANGSWTDMDTIPSRVKSYSYI.TIENKGFVLTGGDLPALDGA
YRDFRCDDPHFLVSSSISICQWQSTPKPKICQVNRTPHSERARVYKALFPMISGWPQQA
COPAVEALMEDVNSRRDIL.PDYELKLIHHSKCDPQQAATKYLYELLVNDPKIILMPCSSVS
ILVAEARMWNLVLSYVSSPALSNRORPFTT'PHSATLHNPTRVVKLFEKWGWKIAITQ
QTTFVFTSTL.DDL.EERVYK.EAGIEITFSDPAPVYKLNKRDARIVGLFYETEARVCFE
VYKERLFGKGYVWFLGWIYADNWFRIYDPSINCTVDEMTAEVGHITTEVYMLNPANTRIS
NMTSQEFVKLTKRLRKHPEETCGQEAAPLA.DAIWALALALNKTSGGGRSVRLIEDFNY
NNQITTDQIYRAMNSSSFGVSGIYVFDASGRMAWTLEQLQGGVYKIGIYDSTKDDL
WSKTDK WIGGSPDADTLVKT'FRFLSKLFSVSVLSLGLVLA.VVLSFNINSHRYIQNS
OPNLNLTAVGCSLALAAVFLPLDGDYHIGRNQFPVQARLWLLGLGFSI.GYGSMTFTKIW
WVHTVTKKEKKEWRK'TL'EPWKLYAYVGLVGMVLA.WQIVDPLHRTIETFAKEPK
EDIDVSL.POLEHCSSRKMNT'WLGIFYGKGLLLGLIFLAYETKSVSTKINDHRAVGMAYI
NVAVLCLITAPV.TM.LSSQQAFAFASIAIVFSSYITLVVLPFKMRLLRITRGEQSEAOQT
MKTGSSTANNKEKSRLLLEKINRELEKIAHEKEEVSSELRLHQLQSRQQLRSRHPPTPEPSSG
LFRGPPPPDRLSCDGSVHLLYK

【 3 9 】

1 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
61 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
121 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
181 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
241 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
301 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
361 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
421 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
481 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
541 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
601 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
661 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
721 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
781 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
841 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
901 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
961 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1021 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1081 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1141 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1201 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1261 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1321 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1381 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1441 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1501 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1561 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1621 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1681 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1741 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1801 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc
1861 gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc gggggggc

A

MTSENQEKVALLRDLQEQDADAGSERGLSGEEDDEPDCNDRYWPAGQEPVLPVLDLP
LEYAGLAVSEVPYVPEFTVSPFAVQLSRVGIN'FERQAVLRMCDGDVGSALH.II.TQCFSET
FORMKISEAVNOISLDECMERQEEAFALKSICGK'JIBIKQINAVWTIGLELVYTSRFSK
PKESTKNVQNSLEIKTYLJKQKCFKSKCNKIEV'PNOQVJRWEDSVDDSHLAIEDASLY
ELIERSKDKHYVQAPL'ATVYSTNENLACLRHHSFLYDKAL'TAETSERPVYLSLITLLEE
SEIWKLTNTTHKYSDFPNVLPVPSKTRINPACHCT'VIPNSFVNSQIPEVKAESSESESD
DGPAPVIVNESVNLK.KIKSKRYDWOAKSHENKICKORFMKQVLSHSM

B

【 4 0 】

1 ahtaaggaga accagccagg cagaacata cagcgggagg agctgtccca ggggcccag
 61 ctacagatg gcaatggagg lccacagat ccttctctc lgccttctt gggctgcat
 121 agctctgaca gggcccag cctcagag ctacagctt gacacact acftgggccc
 181 cttgtatc agggccatga agctgcccag cctctctgt cctatgagt cgtttgagc
 241 atctctgt ctgacacag ggtatcgc gcctgggccc ctgtctgaga aggtctgct
 301 gaccaggct cctggggag agacagatc gaaagggag g-gctggcgc cagactact
 361 agtctggcgc ggtctctaca ctacaaag caagctctac ctatgactc atgctgct
 421 ccccaactg agcaaacac ccaagcccgc gacgtctag agcagctagt gctctgctg
 481 tatagctgc caccagatg actgctgat aggggggccc cagcagttcc agtctaca
 541 ggaacagcc gectctccc agggcaatg cagatgaca gttgcaatt tctagctcc
 601 tglctatcc agaacctgc accgcccct ctgacacc gaggcagca ccaagccctg
 661 gaccagctc gacctcagg gctctctg tggggggctc ctctgaaa ggaalccat
 721 gaccagctc ctacagatg ctgacacc caccctccc cagcactac agtctctg
 781 cctgctctc ctactctcc tctgtggg gctctgaca tagaccccc cctcagagt
 841 ctggggcag agctctaca cctactct gctctcag cctctctac atgctctat
 901 ggaatgag gtaaaaga gaftgactc cctgctctc tggctctca tctctccc
 961 cctgtgccc cacaactgg ccaacagtc tggagaacc tgcacacat caccagctc
 1021 cccagggag gcaaaagag cagctctgc cctgttag agcaactc atcagactg
 1081 taccctag agcaacagc aggcacagc caccctatc cagctctc tgtctctc
 1141 ctccagccc tctcagctc ctagggaga gctatacat gttgcttca ttgtctat
 1201 ctatgagc ccaataaga gttgctca acagtatga ggcagctc tggactgag
 1261 ctctatgt taatacca gctcaccat tctgctgca gacacatga ccggttact
 1321 taagcagg cctgagata agctctatg gttcaaac cagctctc atcagactg
 1381 cagagcact gggtagta cttaagcag gctctgagc taagctcat ggttcaat
 1441 cccagctca ccatcagc tgcagagct gttggtggt taactgact cctgtgcca
 1501 atattctc acctataag tggagtgaa aataactct ataactgag aagactat
 1561 tcaagtagt tgcagtagg atcaacagc atgaactct agtactggg acaagcagt
 1621 gcccaggtt aaatggca ctgtctaca gctcagtc acagctaac aaactgag
 1681 gcaaaagcc ttgttggc ttgtatct agttagatg gattcagga ccagatccc
 1741 agcccaagc actgtagc aaactctc ccaataca ttggttcca ttactctc
 1801 agaaatacc acaggaaca gttcagagc gtaaaact ccaatgata aagctagc
 1861 agactctc gaggatc accctgagc aaactctc agtctctc agtctctc
 1921 aaagaaga gggagagc cctctatg agggagaca gctctgaca agtctgag
 1981 gagaagag cacaagag cagagact tctatgag cagacact tcaatcgc
 2041 atgaacta tagagtag cctatgag agtctgag tgcagatg tcaactgt
 2101 ctccacag ctttgcga ctgactct ccaactgca agttagaga caaaagag
 2161 aagttcgc caaaaanaa aaaaa

A

MKLPSISPIECFEAILSLDGYRPFVTLVRKGCWTGPAGOTQSNADALPPDYVVRGCTT
 DKCNAHMLTHDALPNLSQAPDPPTLSCAECYACIGVHQDDCAIGRSRRVQCHQDQIAFCFG
 NGRMTVGNFSPVYRTRHPRCTTEGSTPWTAI DLQSCCGEYLNRKMSQTPFTSASATT
 PPRALQVLLLPVLLVGLSLA

B

【 4 1 A - 1 】

GGCACGAGGCCAGCCTAGAAGTCGGCGGTGTTCCTTCCTGCTGATCAGCACTGAACA
 AGAGGACTGCCAATGGAGTTGGGCTGAGCTGGTTCCTCGTGTCTTTAAGAGGT
 GTCCAGTGCAGCGCAGTGGTGGAGTCTGGGGAGGGCTGGTCCAGCCCGGAGCTC
 CTGAGAATCTTCTGTGACGCTCTGGTTTACAGTTGACGAATATGCGATGCATGGTTC
 CCGCAGGCTCCAGCAAGGGCTGGAGTGGTGGCAGTTTTCATATGATGAAAGTGA
 T
 AAATAATATGACGCTCCGTGAAGGGTTCGATTCACATCTCCAGAGCAACTCCAAAGAAC
 ACGTTGTCTCTGCAAAATGAACAGCTGAGAGTTGAGGACACGGCTGTTCATCTGTGGC
 AAAGAATCAGAAGCCCTGATCAGCAACAGCTGGTTCTTCAACCAACTTTGACTCTGGGGC
 CGGGCACCCCTGGTCAACCTCTCCACGCTTCCACCAAGGGCCCATGGTCTCCCGCTG
 CACCCCTCTCCAAAGAGCCTCTGGGGCACACGGCCCTGGCTGCTGTCAAGGA
 C
 TACTTCCCGCAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCCCTGACCAAGCGCGTGA
 C
 ACCTTCCCGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTACTCCCTCAGCAGCGTGTGACCGTG
 CCCTCCAGCAGTTGGGCCACCAAGCCTACATCTGCAACGTGAATCAAGCCAGCA
 C
 ACCAAGTGGCAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACACACATGCCAAC
 G
 TGCCAGCAGCTGAACTCTGGGGGGACCGTCACTTCTCTCCCCCAAAACCCAAAG
 GACACCTCAATGATCCCGGACCCCTGAGTCAACATGGCTGGTGGACGTGACGCCAC
 GAGACCTCAGGTCAGTCAACTGTGACGTGGACGGCTGGAGGTGCATAATGCCAA
 G
 ACAAGCCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTTCAGCTCTCACCT
 C
 CTGACCAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCCAAAAGCCCT
 C
 CAGGCCCATCGAAAAACCTCTCCAAAGCAAGGGCAGCCCGAGAACACAGCT
 G
 TACCCCTGCCCTTCCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGCTCAAGCTTACCTGTCTG
 GTCAAAGGCTTCTATCCACGGCAGATCGCCGTGGAGTGGAGAACATGGGCACCGCGA
 G
 AACCACTACAAGCAGCCGCTCCCGTCTGGACTCCGACGGCTCTCTCTCTCTACAG
 AAGCTCACCGTGGACAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAAGCTTCTCATGCTCCGTGAT
 G
 CATGAGGCTCTGCACAACACTACACCGCAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGAGCTGCA
 CTGGAGGAGAGCTGTGGCGAGGCGCAAGGAGCGGGAGCTGGACGGCTGTGGACGACA
 C
 ACCATCTTCTACACACTCTCTGTAAAGCTGTGCTACAGTCCACCGTCACTTCTC
 AAGGTGAAGTGTATCTCTCTCTGGTGGTGGACCTGAAGCAGACCTACCTCCCGACTAC
 AGGAACAATGATCGGACAGGGGGCTTAGGGCCACCTCTCGGGCTGTCCAGCCCGCT
 G
 A
 ACCCCACACACAGCCTATGGCCATGCTAGCCACACCCAGGCCAACCTGCCCCCG
 C
 CTTACCCCTTCAACCCCATGGCTCTCTGGCTCGAGTGGCTCTGACCTGACACA
 CTTGACACCCCGCTTTCAGACCCCTGTGCAATGACAGCTTCCAGCAGCTCCGCTGTCT
 TGGTCAATGACGGGCACTGGGGCCAGTGTCTCCCTCAGCAGGACATCTTGGCTCCGG
 ACCCAAGGTGCTCACAAAAGGAGGACGACGGGTATCCCAAGCCCGCCACCCAGGC
 G
 GAGGTGGCTTGGAGCCAACCCCGTCCACGCAAGCTCTCTGACACAGCGTGTGTTC
 AGATGGTGGTGGACATCAGCCCAAGTGAAGGAACACAGACCACTAGCCCT
 G

【 4 1 A - 2 】

TTGGGAGGCTTCCGAGAGCTGCGAAGGCTCACTCAGACGGCTTCTTCCAGCCCGCA
 G
 CCAGGCAGCTTCAATTCGGGACTCCCGTGAATCTTCACTGAGGAATGAGTGTGTT
 TGAATTTCAAGCAAGAACCTGCTCTTGGCTCCGIGGAAACAGTCTGGTGGCCAGCACA
 CCCCTTGGTGGCTGCCACACTCTGATTTCTGGGTGGAACITGGACCCGAGGACAG
 CCAGCCCAAGAGTCCCACTGGGAGAGAGGGGCCAGGCCAGAACCTGCCACTTCC
 C
 ACCCACTCCAGTCCACAGATCACTCAGAGAAGACCTGGCCATGTGGCCCTTCAG
 G
 AGCCCCACAGTCAAGGGTGAAGATAGCCCAAGGAAGGGCTGGGCACTGCCAGACA
 GG
 CTTCCACAGAAAGGCTGTGACCAAGTCCAGCGGGCAAGACTCAGCCTTGGTGGGGC
 C
 TGAGGACAGAGGAGGCCAGGACATCGGGAGAGAGGTGGAGGGACACCCGGCAGAGC
 CA

A

CGAGCGTGGACACAGCCAGAACTCACTACAGAGGCTGGCGTCCAGTCCCGGTCACGTG
 C
 AGCAGGAACAAGCAGCCACTCTGGGGCCACAGTGGAGAGGCAAGACGACAAAGAGG
 GT
 GCGCGTGTCTTGGCAAGCGGGGCTGCTGGCCACGAGTGTGGACAGAGGCCCCACG
 C
 TCTGCTGCCCCCACTACGCCGTTCUGTACTGTCTACGAGAATCCGCAACAGCAAGGG
 A
 GACTCGAGCGGGAGTGCAGCCAGCCCTGCCTCGCCGTACAGGAGGACTCCCGGCTC
 A
 CTGAAAGGAGTGCACCAATTCAGCTTJGGTAGCTTTTCTTCTTTTAAATTTTCTA
 AAGCTCAATATGTTCTTTGATGTTTCTTTTGTGATGACAAATAAATCTCTTTTAAAT
 CTGTGAAAAAATAAATAAATAA

A (Continued)

【 4 1 B 】

MEFGLSVVFLVALLRGVQCAQLVESGGVVPQSSRLSCAASGRFNSYGMHVVRQAP
 KGLEWVAVFSYDESDKYVAASVGRFTSRDNSKNTLSLQJMSLRVEDTAVVYCAKDK
 PNYNSWFLNFDSWGRCTLYTVSSASTKGFVPLAASSSTGGTAALGCLVKDYPPFPV
 IYVNSGALTSGVHFTFAYLQSSLSLSSVTVPSSSLGCTFYCNVNIKPSNFKYDKKVP
 KSCDKTHTCCPCAPPELLGGPSVFLPKPKDITLMSRTPETVYVYDVSHEIDPFIKTNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVKSLKALPAIETKISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNOVSLCLVKLGFPYSDIAVEVESNQPENNYKTPPVLDSGSE
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSYVMEALHNYTKQSLSLPELQLESCAEADQDELDELW
 TITITITLFLSLVCYSATVTFKVKWIFSSVVDLKTIPDRYRNMIGQA

A

【 4 2 】

1 cccagagg gcccggggc aaagaagtg gctgtggt caggcagc aggtctctt
 61 gctcagct agccagctc tccctctc agcaagac atgggggc tggagggcc
 121 agctctgt cctctctc tgggttgc gctctctc cctctctc tctctctc
 181 agcggagtg gcnagaaac caacttacc ctggcggc cagcagcagc ggggggctt
 241 ggtgtgccc cagctctcc cagcagctt tctcagtc cctctctc tctctctc
 301 cagcagctt gcccagctc cagcagca ctacagag tctgagat actgagagc
 361 ctctctctc tgcagctc tctcagag cctgagagc gggcagagc gctcagcagc
 421 caccacaa cctctctc tctcagag cagctctc gctcagct gctctctc
 481 ggaagcgc tctctctc ctgagctgc cgtgtgccc ccagctctc cagcagca
 541 cagcagctc cagcagctc cccagctc cctctctc agcagctc gctcagca
 601 gctcagctc cagcagctc ggggggct ggggggct cctcagctc cagcagctc
 661 cctcagctc cagcagctc cagcagctc tctcagctc cctcagctc cagcagctc
 721 agctcagctc tctcagctc cctcagctc cctcagctc tccagctc tccagctc
 781 gggctcag cctctctc agccctga ggcagagc gctcagctc cagcagca
 841 ggcagctc ggcagctc agctagctc gctcagctc cctcagctc tctcagctc
 901 cagcagctc ggcagctc tctcagctc ggcagctc cctcagctc ggcagctc
 961 gctcagctc agctcagctc ggcagctc cctcagctc tctcagctc cctcagctc
 1021 tctcagctc cctcagctc cctcagctc cctcagctc cctcagctc cctcagctc
 1081 atgagctc taagctc tttataaa gctttttc aaaa

A

MRALEGPGLSLLLCLVLA LPA LLLPVPVAVRGAETPTYPWRDAETGERLVCAQC
 PPGTFVQRPC
 RRDSPITTCGPPRRHYTFWNYLERCRYVNLVCGREERACATHNACRCRTGFFA
 HFCLFHASCPPGAVIAPGTPSQTCQCPGPTFASASSSSQCPHNRNCTALGLALNVP
 SHDLTSCITGFPSTRVFGAECEERAVIDVYAFQDJSIKRLORLQALEAFEGWGP
 PRAGRA
 ALQIKLRRRLTELLGAQDGLLVRLQLARVARMPLGERSVREFLPVH

B

【 4 3 】

1 agctcagta taatagcag caccctctc ctggcagca ggaacccca gctcagctc
 61 agcagatc aggtggag caccacagc agtatttt aaactact ctgtcttc
 121 tttcaaca agttatct tctttaa aaaaatgt atctgggc atacagct
 181 accattcga agttcttca tctctctc ctgagagc accagagc tctcaggg
 241 cctgttct tctctctc tctgggtt cagcagca agctctctt ctgtctg
 301 cagagctt gattggctc gggcagctc gggagctc ctgacatc gagaagcga
 361 tctacagc tcaacaact actctcgc tgggggac talgaltgc ccaaaaggg
 421 accctgggtt gctctgctc cagagatc gctcagctc agagatca tccagatc
 481 ctggagct gctcagctc actcctgc tctcagctc gctcagctc gggagctc
 541 tggagagc ccaactct tctcagctc tctcagctc gctcagctc gggagctc
 601 tctcagctc tctcagctc tctcagctc gctcagctc gctcagctc gggagctc
 661 agaggtca cactgctc ttaataaa ctaagaat ggaatg gaaact

A

MKLLTGLVFCSLVGLVSSRSFSLGAEFDGARDMWRAYSMDREANYIGSDKYFHARGNYD
 AAKRFGGAWAAEVIDARENIQRFTGHGAEDSLDAQANEWORSGRDPNHRFAGLPEKY

B

【 図 4 4 】

1 caaaagctgg gttgtagct cctactact gttgtagcag aagataggc tcatgaacg
 61 aaccagagc ctgagctct tcatgattt caactctgt tttctctacc caactctgg
 121 gcaactcag aagctctca tcaatgtag ctatgtgac tgcnaacaa caactctgt
 181 caacacnlt acgcacaga tggagctcc agtctgagc tctgtatgac ctacagagc
 241 gaccactlt tctcttca ctctccag acaactcgg tgcctctgt gctccgatt
 301 gctgactgg ctacagaca ggaagatgc tctcctatt tatttaca agatctgg
 361 gattgata tccagaaat agacacaaa ctgatgga naatccctgt gtcagagag
 421 ttctactg ctgaagttt cagctgaag cccatgag ttgcaagcc caactctg
 481 gctgtttg ttatgattt ctctctccc agctgacag tgaactgca gcaacttc
 541 gtcctctgg aagatttgg gctactttt gctctagct tcatgactt cagctcag
 601 gctcttctt aactaaact caacacaga cctctgaca ttctctctt catttgact
 661 caagaattg accctctac agcaattgc tattggtag cccagatgc actgctctca
 721 gatctctgg agaatctct gttgtagcgt gctctctgg tggatgctt ggcctctac
 781 gttgagatg ttctctca ctactctgg agctctgtt caattgtctg attctctag
 841 accagattt gttccagca gctctgcca tcaaacnag gttgtctgag attctctca
 901 tctctctag gactctctt ttgtatgaa gttgtctg gttctctct gttgtctg
 961 ttgtatttc caactctgg atctctgt cctctctgt gcaactcag gttctctag
 1021 tttctctctt atcaacaa cactctctc cccacacag cattaactt cactctca
 1081 aaaaaaana aaaaaaana

A

MGEHQNGAALLQMLPLWLLPWSVAPEAPTPMVPDDLQNHFTLHTVYQDGSVPSVLS
 EAYDEDQLFFDFSNTRVPLPEFAWAQEQGAPAILFDKFECEWMIQIQPKLDGKIPVS
 RGFPIAEVFTLKLPEFGKPNLVCFVSNLFPPLTYNWHQHSVPYEGFPTFVAVDGLSQA
 FSYLNFTEPSPDFSCIVTHEIDRYTAIAVWVRNALPSDLELVCGVAFLGVLGIHVGVLII
 YFRKPCSGD

B

【 図 4 5 A - 1 】

1 gcaagctgca gctgcaagc tgaagcggc acccgcacc gggctctgg ggggcaagg
 61 gaccagctc cagagactc ctatgggga gttctgacc ctgctgctc gactctctc
 121 gctgtctgg gggggcggg gactcggag gggagaaa ggaagagag gaaagagag
 181 cctctgttt agaaagaaa tctctgccc tcaagtagc ggcctctgc ctccggctc
 241 tggacttat tgcctctgag tctcagagg gactctgag gctcagagg ctgacagc
 301 ctgtctctg gctgtctga accctgacc accctgacc ctgtctctg gactctctc
 361 agagagctg actctctctg atctctctc ctactctca cctctctca tggtagg
 421 accctctc agatagacc gttgagcag tgaagactt tctctgctt ctgtctctg
 481 cctctctca gttgagcc cggagactt tcactgca cctcagagg ctactctg
 541 agttctcag ctgctctgg gctctctc agagagacc agagagacc gctcagctg
 601 tctctctctt gttctctgag gactctgg agctgacc tgcctctctt gactctctt
 661 cctctctctt gttctctgag gactctgg agctgacc tgcctctctt gactctctt
 721 gctctctgca actctctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 781 gactctctg ctgagctccc tgcctctc tgcctctctg gactctctc gactctctc
 841 gactctctg ctgagctccc gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 901 cctctctgca gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 961 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 1021 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 1081 ctgagctca caagctctg ctgagctccc gactctgg gactctgg gactctgg
 1141 ctgagctca caagctctg ctgagctccc gactctgg gactctgg gactctgg
 1201 accctctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 1261 actctctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 1321 ctgagctca caagctctg ctgagctccc gactctgg gactctgg gactctgg
 1381 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 1441 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 1501 accctctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 1561 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 1621 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 1681 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 1741 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 1801 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 1861 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 1921 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 1981 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 2041 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 2101 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 2161 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 2221 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 2281 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 2341 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 2401 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 2461 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 2521 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 2581 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 2641 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 2701 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 2761 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 2821 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 2881 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg
 2941 gactctctg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg gactctgg

A

【 図 4 5 A - 2 】

3001 gaaagctg gctgagcca gagaagcag cttgacagg gcaagctcag cactgagc
 3061 gcaagctgg gacctcagc gacctcagc agagctctc gctcagcag cagcagcag
 3121 agagcagc gacctcagc gacctcagc agagctctc gctcagcag cagcagcag
 3181 tgcacagca gctgagcag ctgagcagc agctcagc gctcagcag tccagcagc
 3241 agacctcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 3301 gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 3361 tgcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 3421 agacctcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 3481 agatctcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 3541 agacctcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 3601 gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 3661 agacctcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 3721 gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 3781 tgcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 3841 gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 3901 gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 3961 cctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 4021 cctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 4081 cctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 4141 gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 4201 agacctcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 4261 gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 4321 cctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 4381 agacctcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 4441 agacctcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 4501 gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 4561 agacctcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 4621 gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 4681 cctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 4741 gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 4801 gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 4861 gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 4921 aaaaaa

A (Continued)

【 図 4 5 B 】

MGGKGPLRDFISGLATWALGLAGLVGEAEDESEGFEEFEPPLWLEKFRFLRSDGALL
 LRVLGHAPSSRRGPRMLRGLDGPAAWVWVNLHLWGRLDYFQELQLLISPPDLQTLG
 HDPLSEAEVQLEQVLRILLGASVCEHLEIRHIGQLSLEVQELEAAAIQEVTPCAGVVL
 ALSGDPDFLEAPALEMISRSIMGLTSLKARERDLGALRLELLERELPLRPEAPRAPE
 GPSHHLALQANAKQLRRLRQLEEFKAEILLDSQAEVQLEAEIRLRQEAQALSQAAR
 AELYREAEALRERARGLRQLRLELRKRERLQAAEAYKSLQEEELVSLGVLEASKALLBQ
 LEAARECARLHETORENLLRRLRGLAEHLELDSIRHOVDQLEENVLELELQKSLPEPPG
 FGEAPLAGAAPSLQDEVREAEAGRLRLERENRRLRGLLVQGGQHPHLEAPREDPVL
 PVLEAPTPVAFDHSQGLVOKARDGGPQALDAPALDSVLEFASAECPQAPDSDPQEAES
 PLQAAMDPQASDWSIQESGSPVEIQSPHAKGRSSIQSPASVAPPGQGTIKIAPQLLQGE
 TEGREAPQGLVPEAWGLRQEGREIKHIGPSPSPVLEQEQGPMQLDLATQOAEAREHDD
 LECTVROPAPWQKQKQKSEGLLEWQHPQGLSAGVABEALREVAQLRKAELALCD
 LFLDAQKLEAONTFAARIKSEIQAQRRAFAEAHFAEAERQARLKEAVEAAGQLES
 ASQERAEALVEALAAGRRQWEREGSRLRAQSEAEERMVQLESERQHLLEAEERERREK
 EALQALEKAVVRKGLGARLHLELQRELAALEROERFREKESQHVQGLQRLEALELQ
 AAATKEEALMELKTRALQLEELFQJLRQAGLGLPKKRAEQLVETQVRLIEVRSNAML
 VAEKAAQGLQHLQGLQSLQRAQELLLQSQRAQEHSSRLQAEKSVLEIQGQELHRKLE
 VLEEVRAARQSQEETRRQQQALLRDLKALQORRQAELEGLLVRHLDKANMRALEL
 AHRELQGRHEQLQARASVYAEVALLAERERLMDQHRQRLEELRLQSEHDAQMLL
 LAELSRERGELQGRGELRGLRLELLELRLELMQSQRLERNOQLDLSACRLITQOQTL
 LRSQEEENRQLAEVQALSRENLELERSLDRHLHREOREYLDQNLARREKQKLVKI
 MDYRVLEVPVLPRTKGSWLADVKRLMRPRRGGPPGGLRGLGADGAGSTSLGPPPETE
 LPSGREADGTGSPSPAPMIRKQSSCLRDELAGQRRKLSRFPVGRSSSPSTGPRQRF
 QRHFGPLGAPVSHSKGPGVWENSAETLQHEHTDANREGPEVQEPKRLTPSLSQ

【 図 4 6 】

1 actgcaacc tctctctca cctctcag gctcagcag cactcagc gctctctc
 61 cctctctca atactctc ttgctctct gttctctgg ctgctctgt tggagctct
 121 gctcagcag gctcagcag cctctctca cctctctca gctcagcag gctcagcag
 181 cctctctca gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 241 gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 301 gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 361 gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 421 cactcagc gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 481 cctctctca gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 541 cctctctca gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 601 caactctg gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 661 gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 721 cctctctca cctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag
 781 gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag gctcagcag

A

MPLGLLWGLALLGALHAQADSTSDIIPAPPLSKVPLQNFQDNQFQKVVYVWVGLAGNAI
 LREDKDPKMYATIVELKEDKSYNVTSLVFRKXCDYWRITFVPGQPGFTLGNKISYPLG
 TSVLYRVVSTYNQHAMVFKKVSQNRQYFKITLYGRKTLTSEIKENFIFKSKSLGPNHII
 VFPVMDQCIDG

B

【 4 7 】

1 gclgacnci gcccagiga agclgaccc ccccccig tggcltga gclgacnaa
 61 gcccagcgc cggccaccc agagcccca gctccagc agcccaccc cllagccag
 121 cagclgacaa gclgacac cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac
 181 gcccagcgc cllgacac cllgacac agcccaccc gcaacaaag cllgacac
 241 gclgacaa gclgacac cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac
 301 cagclgacaa cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac
 361 agcccaccc cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac
 421 gclgacac cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac
 481 gclgacac cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac
 541 ccccagcgc cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac
 601 gaaagaaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 661 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 721 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 781 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 841 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 901 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 961 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1021 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1081 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1141 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1201 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1261 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1321 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1381 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1441 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1501 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1561 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1621 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1681 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1741 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1801 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1861 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1921 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1981 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 2041 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 2101 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 2161 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 2221 aaaa

A

MAQAPADPGRBGLHLEQRILQVLTGAVSPVKAQLVKECPAKRELQVLYRMKELKYSVLT
 SPATWELGGTDPCECPALALSSPAERQJHAAITPTEPGQFQSQREEDYRFLKNDGQOR
 ALVIAQALGMRTAKVYVQDLYRMRSHLLMDQFOSKAWTTTVEFDSJRAKKSASHYQHNPI
 NMIQCNQPNWSIANSIAIQHGHNTIOTVSRDEGSAQPRHLLPSMAGPDSSTWGLTDPVW
 GPQDIIIMERSILRRVQLQGHSMEMRLHGVPSVSGAHPHPPSPVVSATAAGPESFEARIPSPGTH
 PEGEAAQRHMKSCFLEDAITGNSKNMSISFGVAGPVGSGEPEGEDAGRPAIDTQSR
 HFRPDIGQIPITPSHSLTPKLEITMLGNRSHKAAEGSHYVDEASHGESSWGGGI

B

【 4 8 】

1 gclgacnci gcccagiga agclgaccc ccccccig tggcltga gclgacnaa
 61 gcccagcgc cggccaccc agagcccca gctccagc agcccaccc cllagccag
 121 cagclgacaa gclgacac cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac
 181 gcccagcgc cllgacac cllgacac agcccaccc gcaacaaag cllgacac
 241 gclgacaa gclgacac cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac
 301 cagclgacaa cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac
 361 agcccaccc cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac
 421 gclgacac cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac
 481 gclgacac cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac
 541 ccccagcgc cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac cllgacac
 601 gaaagaaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 661 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 721 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 781 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 841 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 901 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 961 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1021 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1081 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1141 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1201 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1261 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1321 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1381 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1441 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1501 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1561 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1621 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1681 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1741 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1801 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1861 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1921 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 1981 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 2041 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 2101 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 2161 gaaataaag aagaaataa acitaaag gaaataa cllgacac cllgacac
 2221 aaaa

A

MAHFVQGTSRMIAEESSTHEKCEAPSTRKMLNMSLEQKIRCLEKORKELLEVNQQWQQF
 RSMKFLYRKYVAELTKLDAARERFSTRKOPHQQRKDRDRQDRDRDLTRDLRQREK
 EKERNEELHELKEENKLLKGNLTKMKEHEHYEIKRLKALQDNLNKSFSFEDLCKRS
 RVEFCEHEMRTEMEVLKQOQVQIYEDFKFKRSDRDRLNQKLELOQINETSQRLNLSOI
 KACQMEKLEKQLKQMYCPPCCNGLVFHLQDPVWVPTGPGAVQKQREHPDCCQWYALQD
 LPDVQHKANGLSSVKKVHP

B

【 4 9 A 】

1 aglgecacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 61 ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 121 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 181 ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 241 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 301 agcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 361 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 421 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 481 ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 541 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 601 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 661 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 721 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 781 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 841 agcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 901 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 961 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1021 ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1081 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1141 ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1201 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1261 agcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1321 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1381 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1441 agcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1501 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1561 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1621 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1681 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1741 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1801 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1861 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1921 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1981 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 2041 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 2101 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 2161 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 2221 aaaa

【 5 0 】

1 ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 61 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 121 ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 181 agcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 241 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 301 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 361 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 421 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 481 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 541 ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 601 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 661 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 721 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 781 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 841 ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 901 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 961 agcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1021 ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1081 ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1141 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1201 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1261 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1321 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1381 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1441 ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1501 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1561 ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1621 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1681 acccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1741 gcltccacc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1801 ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc ccccagcgc gcltccacc
 1861 aaaaaa

A

MGYKASOTGFVVLVLLQCCSAAYKLYCYTWSQYREGDSCFPDALDRFLCTHIIYFANIS
 NDHIDTWEVNDVTLVYGLMLNLRNPNLKLTLVSGVWVFGSQRFSKIASNTQSRRTFKVSP
 PFLRTHGFDGLDLAWLYPGRDRKHFTLLIKEMKAEFKAEQPKQLLSAALSAAGKVTID
 SSYDAKISQHTDFISIMTYDFHGAWRGTGHSPLFRQGDASPSRFSNTDYAVGVYMLRLG
 APASKLVGHGTFGRSTFLASSETFGVGAIPISGPIRFRFTKAGFLAYEICDFLRGATVHRLG
 QQVPAITKGNQWVGYDDQESVSKVQYKLRDLAGAMWALDLDFQGSFQDRLRFL
 TNAIKDALAT

B

【 4 9 B 】

MSGPCGKPVLEASPTMSLWFEEDSHSRQGTFRPQOELAAEEASALELQMKVDFFRKLYSS
 TEIHSVQKILGVQADTNTVIGFVKHGTATERERQTSPPDPCQLPLVPRGGGTPKAPNIEPPI
 PEEKEGSDLRPVVIGDSNVAMSHGNKEVFCRIGILLAVNWFLEGRHDTITVFPVSRVKEQP
 RPDVPTDQHILRELEKILVFTPSRVRGGRVVCYDRFIVKLYESDGIYVSNIDYTRDQJ
 GERQWKRIFIDERLLMYSFVNDKFPMPDDPLGRHGPSIDNFKKPLTLERHKQPCPYGRK
 TYGIKCRFFHPERPSCPQRSVADELARANALLSPRAPSCKDNGRRPSSOSSSLLTESEQSLD
 GKLLGAQASPGSROEQLTQIYAPSGRSLAPSGSGSFGPTDWLPTQLDLSLVSQDCLDSGI
 GSELESQMSLWGVKGGPGEPPFPFRAPYIGYSPYGSLLPATAAFSAFGRAMGAGFVSPAD
 YPPAPFPFRFVYSYPIYPPYVQLQEPVQSPGAGRSVWGRAGSLAKEQASVYTKLCCGVF
 PPHVLEAVMGRFPQLLDQQLAAELIYSKSHFSE

【 5 1 A 】

I gattictigt gigticttag nigcttagc acagictit gaggagita agggagaga
61 cccaccacc tgcctccag gctctictt tccagict gictictgt ggggctctt
121 tccagactt cagictictga agctagita agtticaga aaagaaait gggggctga
181 agagattgt gggggctgt ggggaagctt gttactcc tctictctg tctgttctt
241 tcccttagc tctagait ctttgatgc ttgctacc cagttctga tctgtctga
301 gttctctc tccagictc tgcctictt agttctgt gggatctga ctgagactt
361 tccaaagct gttgctctc tggagctca aggticaga gttctctga agttctgtt
421 gactictgtc tggagictc tctctctcc tggagactt tccagactt gttctctga
481 tggagctc tctcagctc aggtctctc tctctctc tggagctca cagttctga
541 cagtagag tccagictc agcaaacct tccagictc aggtctctc tggagctga
601 agctactc gttgctctt tctcagctc tctctctc tggagctca cagttctga
661 tctcagctc aggtctctc tggagactt tctcagctc tctcagctc tctcagctc
721 gttgctca gttgagactt tctcagctc tctcagctc tctcagctc
781 tccagactc aggtctctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
841 agagactc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
901 tccagactc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
961 agagactt tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
1021 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
1081 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
1141 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
1201 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
1261 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
1321 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
1381 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
1441 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
1501 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
1561 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
1621 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
1681 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
1741 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
1801 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
1861 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
1921 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
1981 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
2041 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
2101 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
2161 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
2221 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
2281 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
2341 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
2401 tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc

【 5 1 B 】

MGGGGERLFTSSLVGLVPLGLRISLVTCPLQCGIMWQLLPTALLLVASAGMRTEDLPA
VFLFEPQWYRVLKDSVTLKCOQAYSPEDNSTQWFHNSLISQASSYFIDAA TVDSDGSEYR
CQFNLSTHSDVQVLEHVGWLIJLQAPRWVFKEDPHLRCHSWKNTALHKVTVLONCKGRK
YFHHSDFYIPKATLKDQSYTFCRGLFGSKNVSSETVNTITQGLAVSTISSFFPGYQVSECLV
MVLFLAVDYLQVFSVKTNRISSTKDKWKDKHFKWKDKDQDK

【 5 2 A - 1 】

I naigtctag tctgagaga acagagact tcaactita agtctctag ttttaana
61 gttacttcc tctctctc tctcagctc cagagagga atgagagcc aaagtctca
121 agtctctt tcaactit gataanaac gttactit tcaagaaat cctctctt
181 cagagagga ctgctctt aaactitca agagagacc cagctaaag aagtctctc
241 tctcagctc agagagact tctgagaga agttctctc cttgagaga agagagact
301 cccagagag gttgagaggt aaactitca aggtctctc tctcagctc tctcagctc
361 aaagtctct cctcagaga aaactitctc tggagagag cctcagctc tctcagctc
421 tctcagctc gaaagtctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc tctcagctc
481 atcagctca gttgagactt gttgagagag cttctctc atctcagga agagagag
541 aggtctctc caggtctga tctgctctc gttgagag cttgagaga tttgagag
601 accaccata gttgctctc cactctctc gttgagactt gttgagaga taaagtctc
661 tctcagctc tttgagag tttgagag tttgagag tttgagag tttgagag
721 cttcagagga aggtctctc tttgagag tttgagag tttgagag tttgagag
781 tctcagctc aggtctctc gaaactctc tttgagag tttcagctc aggtctctc
841 tctcagctc tttgagag tttgagag tttgagag tttgagag tttgagag
901 tctcagctc cactctctc aggtctctc tttgagag tttcagctc tctcagctc
961 aggtctctc cagagctga cttgagaga tttcagaga aggtctctc tttcagaga
1021 tctcagctc aaactctc gttgagact tttgagag tttcagctc tttcagctc
1081 tctcagctc tctcagctc aggtctctc aggtctctc aggtctctc aggtctctc
1141 gttgagag cactctctc cttcagctc gttgagag gttgagag gttgagag
1201 aggtctctc tttgagaga tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
1261 cagagctc gttgagag gttgagag aggtctctc aggtctctc aggtctctc
1321 tctcagctc aggtctctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
1381 tttcagctc gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
1441 gttgagag tctcagctc gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
1501 gttcagctc gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
1561 aggtctctc aggtctctc tttcagctc aggtctctc tttcagctc tttcagctc
1621 tttcagctc gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
1681 gttcagctc aggtctctc cactctctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
1741 gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
1801 gttcagctc aggtctctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
1861 cactctctc aggtctctc gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
1921 cttcagctc aggtctctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
1981 gttcagctc cttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
2041 tttcagctc gttgagag cactctctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
2101 tttcagctc aaactctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
2161 gttgagag aaactctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
2221 tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
2281 tttcagctc gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
2341 aaactctc gttgagag tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
2401 tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc

【 5 2 A - 2 】

2821 aaactctc aggtctctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
2881 cctcagctc cactctctc aaactctc gttgagag gttgagag gttgagag
2941 aaactctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
3001 aaactctc aggtctctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
3061 tttcagctc aggtctctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
3121 gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
3181 aggtctctc cttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
3241 tttcagctc gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
3301 gttgagag tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
3361 gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
3421 tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
3481 gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
3541 gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
3601 cttcagctc cttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
3661 aaactctc cactctctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
3721 tttcagctc gttgagag cctcagctc aggtctctc gttgagag gttgagag
3781 gttgagag tttcagctc cttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
3841 gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
3901 tttcagctc aaactctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
3961 cctcagctc gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
4021 tttcagctc gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
4081 gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
4141 gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
4201 cttcagctc aaactctc gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
4261 aggtctctc aaactctc gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
4321 tttcagctc cttcagctc gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
4381 tttcagctc aggtctctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
4441 gttgagag tttcagctc cactctctc tttcagctc tttcagctc tttcagctc
4501 aggtctctc tttcagctc cctcagctc gttgagag gttgagag gttgagag
4561 aaactctc tttcagctc gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
4621 gttgagag aaactctc gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
4681 tttcagctc gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
4741 gttgagag cactctctc cctcagctc cctcagctc cctcagctc
4801 tttcagctc gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
4861 cttcagctc aaactctc aaactctc aaactctc gttgagag gttgagag
4921 gttgagag cctcagctc cctcagctc gttgagag gttgagag gttgagag
4981 cctcagctc aaactctc cactctctc gttgagag gttgagag gttgagag
5041 gttcagctc aaactctc aaactctc aaactctc gttgagag gttgagag
5101 aggtctctc tttcagctc aaactctc aaactctc cttcagctc
5161 aaactctc gttgagag tttcagctc gttgagag gttgagag gttgagag
5221 gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
5281 cctcagctc gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
5341 cactctctc gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
5401 cctcagctc tttcagctc cctcagctc gttgagag gttgagag gttgagag
5461 gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
5521 gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag
5581 aaactctc tttcagctc gttgagag gttgagag gttgagag gttgagag

A (continued)

【 5 2 B 】

MSKOVSLPEMIKDWTKHEHKKWVWYEDLNKINQYQOILLSEVTLGLVJELTKDILVEMGLP
WGPALLIKRYSNKLNSKSPESDNDHPGOLDNSKPSKTEHQKNPKHTKKEEENSMSNSDIDP
REIKDQKESILMKNENLDEVANAKHKKKGLKPEQULCMYFPDQFDSHRYEYHVLQPE
ETGALNLIDPIHEFKLNTNETATEVDIKMKFNSVFRFASACMSNRSTGPHFQVKKPHGE
VYGVTSKAAFIIDHFNVMIKYFEESINEAKCIRCFRFEVLVQNNTPSDFRIVEYDITPKHS
ICNDKRYFYOJMOICKDKIWKQONLSLFRFGASSRDILANSQRDVFKAQNLKLSLVA
RKEAEEYGMKAMKKESEGLKVLKLLIGNRDLSDNSYDWWYLVITNKHPIHQLHDLFKEI
KWFVLEDFPESMINGVYKAYKESRVANLHFPNOYEDKTNMWEKISTLNLVQQPSWIFCN
GRSOLKSETYKPLEPHLWQERASEVRKLIIFLTDENIMTRGKFLVVFLLSSVESPDPDIET
FWAFYQALKRGMENMLCISVNSHYQRWKLJLQTKMKMDEBLTNSHSITLNIHVNSTLKLK
KFSQLDOENRKRKLEALRDRFAGLLEVLNPKYDATTMSRIVNEYAFLLQNSKMPMTN
EKONSILANILSCLPKNSKLIQPLTLKQRLVEQVGLSHQYPPFPFLACLFLFENQKLD
QDSKLEKYVSSLNRSFRQYKMRCKRSQITDFYLGKRLGNSIVHKAKIEQYFDKAQNTN
SLVHSGDVKWKNVEKDLRLRLTGOAEGKLSVSEYTGIEKIPVSYSGPLRSRNERVST
YLGFSIEGLAYDIEVI

A (Continued)

【 5 3 A 】

1 agacacccct gcccaccca tgaacccctc gaaacccctc gtcctctcgc tccctctcgc
 61 gggctctcgc ttctctcc ccagacagcc cagctccacc ctctctctc tccctctcgc
 121 ctgagacacc aatctaccgc acagccctc gaaagagaa taccctacc gctatgctta
 181 cactctcgc gaaagctc gtagagagc gaaatctcgc gggctctcgc tctctctc
 241 ccaagagaa ctctctcgc ccagacagcc tgaacccctc gtcctctcgc tccctctcgc
 301 ggaacaccca cggctctcgc tccagacct ggcacatc caacctctc agggacacct
 361 caagctctcgc caacaccca taccctctc gaaacaccca taccctctcgc tccctctcgc
 421 gggctctcgc gaaacaccca tccctctcgc ctctctcgc tgaacaccca tccctctcgc
 481 caacaccca ggcctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc
 541 gaaacaccca ggcctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc
 601 tccctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 661 ggcctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 721 ctctctcgc ggcctctcgc tccctctcgc caacaccca tccctctcgc tccctctcgc
 781 ctctctcgc ggcctctcgc tccctctcgc caacaccca tccctctcgc tccctctcgc
 841 gaaacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 901 ccaagaccca tccctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc
 961 ggcctctcgc ccaacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc
 1021 ctctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1081 gaaacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1141 tccctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1201 tccctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1261 gaaacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1321 ggcctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1381 caacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1441 tccctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1501 ggcctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1561 tccctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1621 caagctctcgc gaaacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc
 1681 ctctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1741 gctctctcgc tccctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc
 1801 ggcctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1861 gaaacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1921 ggcctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1981 cccctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 2041 ccaagaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 2101 ggcctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 2161 ggcctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 2221 caacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 2281 ctctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 2341 aa

【 5 4 】

1 accaaacaa ccaagctcc aagaaacat gctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 61 tgcctctcgc tgcctctcgc tgcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 121 ggcctctcgc tgcctctcgc tgcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 181 tgcctctcgc tgcctctcgc tgcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 241 tgcctctcgc tgcctctcgc tgcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 301 tgcctctcgc tgcctctcgc tgcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 361 tgcctctcgc tgcctctcgc tgcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 421 tgcctctcgc tgcctctcgc tgcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 481 tgcctctcgc tgcctctcgc tgcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 541 tgcctctcgc tgcctctcgc tgcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 601 tgcctctcgc tgcctctcgc tgcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 661 tgcctctcgc tgcctctcgc tgcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 721 tgcctctcgc tgcctctcgc tgcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 781 tgcctctcgc tgcctctcgc tgcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 841 tgcctctcgc tgcctctcgc tgcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 901 tgcctctcgc tgcctctcgc tgcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 961 tgcctctcgc tgcctctcgc tgcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 1021 tgcctctcgc tgcctctcgc tgcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 1081 tgcctctcgc tgcctctcgc tgcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 1141 aaaaaa

MRLTVLCAVLLPGSLALPLQPEAGGMSLQWBEAQDYLRKRYLYDSEKNSANLEAKLKE
 MQKFFGLPITGMINSRVLHMQKPRCGVPDVAEYSLFPNSPKWTSKVVVTVRIVSYTRDLPHIT
 VDLVSKALNVMGKELPLIFRKYVWGTADIMIGFARGAGHDSYFPDGPNTLAHAFAPG
 LGDAIHDFEDERWTDGSSLGINFLYAATHLGHSLGMGHSSDFNAVMYPTYGNDQPQNFKL
 SQDDIKGIQYLRKSRNRK

【 5 3 B 】

MSI.WQPLVVLVI.VGCCFAAPRQRQSTLVLPFGDLRTNLTDRQLAEELYRYGYRVAEMR
 GESKSLGALLLLQKQLSLPETGELDSATLKAAMRTPRCQVPLDGRFQTFEGDLKWHHNNITY
 WQNYSEDLPRAVIDDFAFAFALWSAFTPLTFTRVYSRDADI.VIQFGVAEHDGVPFDGKD
 GLLAHAFPPGQIGQDAHFDDDELWSLGGV.VV.PTRFGNADGAAACHFPFIFEGRSYACTTD
 GRSDGLPWCSTTANYDTRDFCFPSRLRYTDGNADGKPCQPFIFQGGYSACTIDGRSD
 GYRWCAITANYDRDKLFGFCPTAIDSTVMGNSAGELCVFPFLGKEYSITCSREGRQDR
 LWCAITSNFSDSKWKGFCPDQGYSLFLVAHEFHGHALGLDHSVPEALMYPMYRIFTEGPL
 HKDDVNGIRHLVGRPEPEPRPTTTTTPQPTAFTVCTGPTVHPSEPTAGPIGPPSAGPTCP
 FTAGPSTATTVPSPDCAENYFIDAIENQLVFLFKDGYWRFSEGRGRSPPGFLIADK
 WPAALPKLDSVFLKLFIFGQVWVYTGASVIGPRRLDKLGLGADVAVQVYTGALRSQ
 RGKMLLFSGRKLRWFDVKQVYDIPRSASEVDRMFPVPLDTHDVFYRKAAYFCQDRFYW
 RVSSRELNQYDQVYVYTYDILQCPED

【 5 5 A 】

1 tggatctcgc cggaaagctc atggctctcgc gaaacaccca tccctctcgc ggcctctcgc
 61 caacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 121 ctctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 181 caacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 241 caacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 301 caacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 361 aggcctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 421 ctctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 481 gaaacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 541 caacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 601 tggatctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 661 caacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 721 caacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 781 caacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 841 tggaaagctc ggcctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 901 caacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 961 ctctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1021 tggatctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1081 ctctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1141 gaaacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1201 tggatctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1261 caacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1321 gaaacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1381 ctctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1441 cccctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1501 ctctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1561 gaaacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1621 caacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1681 gaaacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1741 aagacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1801 acatctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1861 ggcctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1921 gaaacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1981 tggaaagctc ggcctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 2041 agctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 2101 acagacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 2161 ctctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 2221 ctctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 2281 caacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 2341 aggcctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc

【 5 6 】

1 tggatctcgc tggaaagctc ccaagctcc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 61 cccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 121 caacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 181 caagacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 241 gaaacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 301 gaaacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 361 tggaaagctc ggcctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 421 cccctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 481 cccctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc

MTELETAMGMIDVFSRYSQSEGSTQTLTKGFLKVLMEKELPGFQSGKDKDAVDKLLKDL
 DANGDAQVDFSEFVFAVATSACHYFKAQGLK

【 5 5 B 】

MGSNLSPOLCLMPFLGLLGGVTTTPWSLARPOGSCSLEGVEIKGGSFRLQEQALFVCP
 SGFYYPQTRTCRSTGWSLTKTQDKTVRKAECRAIHCPRHDFENGEYWRPSYVNVSD
 EISFHCYDGYTLRGSANRTOCVNQRVSGQFAICDNGAGVCSNPGPIGTRKVGSGYRLEDSV
 TYHCSRGLTLRGSQRRTCOEGSMTFSCQDSFMYDTPQVFAEFLSSLTETIEGVDAED
 GHGPEQQRKRVLDPSGMMNVLV.DGSDSASNFQAKKLVNLIKVAISYGVKPRYGL
 VYATYPKIWKVSEADSNADWVTKOLNENYFDHLLKSGTNFKKALQAVYMSMSPPDD
 VPPEGVNRTRHVILMTDGLHNMGGDPTVIDEIRDLLYGRDRKNPREYLDVYVFGVSLP
 VNQVNNALASKKDNEQHVFKVKDMENLEDVYQIMIDESQLSLCGMVVEHRKGTDYHK
 QPWQAISVIRPSKNGHESCMGAVVSEYFVLTAAHICFTVDDKREHSIKVSVGGKRDLEIEVVL
 FHPNYNNGKKEAGIPFVYDVALIKKLNKLYGQTRIPCLPCTEGTTRLRPLPTTTTQOQ
 KEELLPAQDIKALFVSEKLLTRKEYYKNGDKKGCSEKRDQAQYAPYDKVLDISEVVTFRP
 LCTGGVSPYALHTRCTGGVSLP.VHRSRFRQGVISWGVVDVCKNQKROKQVPAHARDF
 HINLQVLPWLKELQDELDGL

【 5 7 】

1 caagacaccca tccctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 61 ggcctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 121 ggcctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 181 ggcctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 241 caagacaccca tccctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 301 caagacaccca tccctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc ggcctctcgc
 361 gaaacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 421 ggcctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 481 gaaacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 541 ggcctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 601 caacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 661 tggaaagctc ggcctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 721 tggaaagctc ggcctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 781 tggaaagctc ggcctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 841 gaaacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 901 gaaacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 961 caacaccca tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1021 agtctctcgc tccctctcgc gaaacaccca tccctctcgc tccctctcgc tccctctcgc
 1081 atataaaat aaagacaccca tgg

MARAALSAAPSNRLLRVAJL.LLLVAAGRRAAGASVATELRQCQLT.LQGHPIKNIQSVNS
 KSPQPHCAQTEVIATLKNRKAACLPASPIVKKIEKMLNSDKSN

【 5 8 】

1 aaitteac igccocitg aiaacitg gicacitg gicagocga ctataraag
 61 atgetciga aaitteacg iccctgaggg gcccagagc agacacag aagaatgga
 121 caegetcag aiaacitg gacacacag aagaatgga aiaatgga aagaatgga
 181 iticctcig caaacitca ggaacitca cctgittt aiaatgagc gaitgac
 241 gcaaacac igcctgacg caaagatg gcccagc ggaagagat igagocitg
 301 aiaatgca gctgacga teacacag cacaagcic agccctgic acitgacit
 361 gggagcga iccagcagc aiaatgga gcccagcic algagatg cctgaaagc
 421 itcccagga aiaatgctg icctcctg caatctca aiaatgga acitgacit
 481 nrmgitt atgacacig icctgagca aiaatgga aiaatgga acitgacit
 541 ctgacatg agacacig cctgctg icctcctg aiaatgga aiaatgga
 601 icctcctg icctcctg ggaacitca ggaacitg icctcctg aiaatgga
 661 acitgacit agcagcga aiaatgga gcccagcic iccagagc gctgagga
 721 atagctct gctgagga agcctcaca gctgacit aiaatgga icctcctg
 781 ccaaacat itccagctg icctcctg aiaatgga gctgagga caacccagc
 841 ctacacag gctgagga ggaagcic ggaagcic caaacatg iccagagc
 901 agcagcag caaacatg icctcctg icctcctg icctcctg caaacatg
 961 gctgagga gacacitg icctcctg ggaacitca ggaacitg icctcctg
 1021 caaacatg icctcctg aiaatgga aiaatgga icctcctg aiaatgga
 1081 aiaatgga icctcctg ggaacitg ggaacitg icctcctg aiaatgga
 1141 ggaacitg aiaatgga aiaatgga icctcctg icctcctg caaacatg
 1201 caaacatg aiaatgga aiaatgga icctcctg icctcctg caaacatg
 1261 gctgagga aiaatgga aiaatgga icctcctg icctcctg caaacatg
 1321 gctgagga aiaatgga aiaatgga icctcctg icctcctg caaacatg
 1381 gctgagga aiaatgga aiaatgga icctcctg icctcctg caaacatg
 1441 aiaatgga aiaatgga aiaatgga icctcctg icctcctg caaacatg
 1501 gctgagga aiaatgga aiaatgga icctcctg icctcctg caaacatg
 1561 aiaatgga aiaatgga aiaatgga icctcctg icctcctg caaacatg

A

MAHAMENSWTISKYHIDEVGFALPNQENLPDFYNDWMIKHLPLJESQGLRVERKEL
 NMLSIDHLTDIKSQRLLRVLGCTIMAYWKGJGDRKVIKRNIAVPYQSKLLEPPII
 VYADCVLANWKKKDPNPLIYENMDVIFSRDGDCKSGFFVSLVLEIAAIAKVIPTVFK
 AMQMOERDITLLKALLEIASCLKALQVFIHQHDPVNPKAFVSLRIVLWKGKPNQSLDGLV
 YEGPWDFKFAAGSAGOSVFCDFVLLGIQTAGGHAQFLQDMRRYMPAHRNFLCS
 LESNPSVRFVLLSKDAGLREAYDACVKLVLVSLRYSIHLQVTKYLIIPASQPKENITSEDP
 KLEAKGTGGTDLNMLFKTVRSTIKESLKEG

B

【 6 0 】

1 gggctcaga laaatgag ccaacitg cctgagcga ggaacitg gctgacit
 61 agcagcag agcagcag cacaacag agcagcag aiaatgga icctcctg
 121 iccagcag agcagcag icctcctg aiaatgga aiaatgga aiaatgga
 181 aiaatgga agcagcag icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 241 cctgagcag icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 301 ggaacitg gctgagcag icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 361 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 421 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 481 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 541 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 601 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 661 agcagcag aiaatgga aiaatgga aiaatgga aiaatgga aiaatgga

A

MKLLTGLVFCSLVIGVSSRSPFLGAEFDGARDMWRAYSMDREANYIGSKDYFHARGNYD
 AAKRPGGAAWAEVSDARENQIRFGHGAEDSLADQANFWRGSKDPNHRPAGLPEKY

B

【 5 9 A 】

1 cagagcag icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 61 aiaatgga icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 121 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 181 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 241 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 301 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 361 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 421 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 481 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 541 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 601 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 661 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 721 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 781 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 841 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 901 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 961 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 1021 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 1081 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 1141 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 1201 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 1261 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 1321 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 1381 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 1441 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 1501 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 1561 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg

A

【 5 9 B 】

MDFSVKVDIEKVTCPICLLELLEPLSLDCCGSHSCQACTIAIKESVHSRGESSPCVQTRFPQG
 NLRFNRLANIVERVKEVKMSPOEQGQRVDCEHHGKKLQIFCKEDGKVICVWVCELSQEHQG
 HTRFRINEVVKICEQELQVALQRJIKFDQAEKLEDDIQRORTA WKNYIQIEROKILKGFNEM
 VIDLNEEQRELQKLEBEQVYVLDNLAAATDQLVQRQDASTLISDLQRRLGSSVEMLQD
 RVDMKRSSEWTLKPKPSVSKKLSVFRVPLDSGMLQVLKELTDVQYVWVDMNPGSAT
 SNVAISVDQRQVTVR TCTFKNNSNPDFSAFGVFCQYSSGKYVWEVDVSGKIAWILGVMS
 KISSLNKRKSSGAFDPSPVNSYKYSRYRPOYCYWYIGLQNTCEYNA FEDSSSDPKVLLFMS
 AVPPCRIGVFLDYEAGVSPFNVTNHGALYKFGCRFRPAVYFVFNWCVLVPMTVCPSS

【 6 1 】

1 icctcctg ccaacitg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 61 gggctcaga icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 121 ccaacitg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 181 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 241 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 301 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 361 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 421 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 481 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 541 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 601 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 661 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 721 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 781 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 841 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 901 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 961 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 1021 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 1081 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 1141 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 1201 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 1261 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 1321 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 1381 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg
 1441 icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg icctcctg

A

MMSMLGGLQYFRVILJLLALTLILLAGFLHSDLELDTPLFGQAEQPPVNTIMFLKTHKT
 ASSTVLNLIYFAETHNLSVALPGSRVILGYPWFLARAYEGVGSORFNIMCNHLRNL
 QVKVMPNDTFYSILRNPVQLFESSFYKYVAFRGAAPSLDAFLSPRTFYNDSRHLRNV
 YAKNNMWFDFGPDNAQCEEGYVRARAEVERFRILVIAEHLDESLLVLRRLRWALDDV
 YAFRLNRSRARSVALSPETREARARSWALDWRLEYHFNRTLWQRLAELGPRRLRGEVER
 LRAARRLACLQDGGALKNHTQIRDPRLRPYQSGKADILGYNLPLDNLQTLVQCRLV
 MPELOYMARLYALQFPEPLKNIPFLGA

B

【 6 2 A - 1 】

AATTCACATAATGCAATTCCTGCTTTTGGAGACACAGCTTCTCAGATGTGCTCCITGGAG
C1GGTGTGACAGTCTGACTGTGAAGTCAAGTCCAAACCTGTTTGGAAATGAGGAAAC
TTCTCTTTTGAATCAGCCCTTGGTGTCCAGGCTTTCATGCTGCTGGGTGATATTAC
TGGTCTGCTGCTGCTGAGTGGACAGTTCGAAGGACACCCAGGCCCAATATTTTCTCC
AGCTTCCATGGACCACAGCTTCCAAGGAGAGAGTGCCTCACTTGCAGGGAAATTC
GCTTCTACTCACACAGAAACAAATGGTACCATCGGTACTCCGGAAAGAAATACTA
A
GAGAAACCCACAGAAATACTTGGAGTTCAGGAACTTGGAGAGTACAGATGCCAGGCC
C
AGGGTCCCTCTCAGTACGCCCTGTGCACTTGGATTTTCTTACAGCTTCGCTGATCTGC
AAGCTCCACTTTCGTGTGTAAGGAGACCTGTGGTCTGAGTCCCGGCAAGAGCCG
AAGTAAACACTGAATAAATACTTTTACAAGAATAAATGTCTGGCATTCCTTAATAAAA
GAACCTGACTTCCATAATCTCTCATGATGCTCAAGGACAAATGGTGCATATCGCTGACTG
GATATAAGGAAAGTGTTCGCTGTTTCTTCCAAACAGTCAAAAATCCAAAGTCCAAAGGC
CATTTACACGTCAGTGTGAGAGCCAGCTTCTTCCAGCCATCAGCGGGAACCCAGTGA
CCTTACACTGTGAGACCAAGCTTCTCTAGAGAGGTGAGATGTCCTCCGCTCGGTTCGCT
TCTTACAGATGACCAACCTTGGATTTAGGCTGGAGTCTCTCCCGAAATTCAGATTA
TGCCATGTGGAGTAAAGATTACGGTCTTACTGTGTAAAGGACGACAAATGCCCTAC
A
CGGTCAATATGACAGCCCGAGATCTGGATACAGGTGGACATCCCTGCACTTCACTCTG
TCTCACTCAGCCCTGAAGAAAGCTTGAATTTTGGAGGAAACAAAGGTGACACTTCACT
GTAAACCCAGGAAGATTTCTTGGCACTTGTACAGCTTTTATCATGAGGGTGTCCCCC
TGAGGCACAAAGTCAAGTCCCTGTAAGGGGAGGACATCCATCAGCTTCTACCTGACTACA
G
AGAATTCAGGAACTACTACTGCACAGCTGACAAATGGCTTTCGCGCCAAAGCCAGTAAG
G
CTGTGAGCCCTCAGTCACTGTCCCGTGTCTACTCTGCTCAACCTCAGCTCTCTGT
AGGACCTGATTTTAAAGGGAGCCAGGTGACACTTCACTGTGAAAGCCAGAGAGGTTCA
C
TCCCATCTGTCACAGTTTCAATCATAGGATGCTGCCCTGGAGCGTAAAGTCCGCAACT
CTCCAGGAGGAGTGGCCATCAGCTTCTCTGACTGCAGAGCATTCAGGAACTACTACT
GCACAGCTGCAATGGCTTGGCCCAAGCGCAAGTAAAGCGGTGAGCCCTTCCATCACTG
TCCCTGTCTCATCTGCTCCCTACCCCTCAGCTCTGCTGAGGCCCTGACTTTTGAAGG
CCACTGTGACACTTCACTGTGAGTCCAGAGAGGTTCCCAACAAATCTTATACCACTTTT
ATCATGAGGACATGCCCCTGTGGAGAGCTTCAACACCTCTGTGGGAAGAGTGTCTTCA
GCTTCTCTGACTGAAAGGACATTCAGGAAATTAATCTGACAGCTGACAAATGGCTTGT
TCCCCAGCCAGTGAAGTGGTGAAGCTTTTGTGACTGTTTCCAGTGTCTCGCCCTTCC
TCACTCAGGGTTCAGGAGCCAGGCTGTGGTGGGGGAGCTGTGGAGCTTCACTGTG
AGGCCCCAGAGGCTTCCCAACTCTGTACTGGTTTTATCATGAGGATGTCAACCTGG
GGAGCAGCTCAGCCCCCTGTGGAGGAGAAAGCTTCTTCAACTCTCTGACTGCAGAAC
ATTTCCGAAACTACTCATGTGAGGCAACAATGGCTTGTGGCCAGCAGTGCACACA
A
TATCACTCAGTGTATAGTTCAGATATCTGCTCCATCTCACTTCAAGGGCTCCCAAGG
CCAGGCTGTGGTGGGGAGCTGTGGAGCTTCACTGTGAGGCTGAGAGCCCTCCCA
CAATCTGTACTGGTTTTATCATGAAGATGTACCCCTGGTAAAGTATCAGCCCTCTG
GAGGAGGGCCCTCTCAACTCTCTGACTACAGAAACATCTGGAATCTACTCAGCAGAC
AGGCAGACAATGGTCCGAGGGCCAGCCGAGTGAAGTGTGACTGAAAGTTCAGATTC
C
CGGTGTCTGCGCCGCTTCACTTCAAGGGCTCCCGGGACCAATGCTGCGGTGGGGGACC
TCTGAGCTTCACTGTGAGGCTTGAAGGCTTCCCTGTGATCTGCTGATCTGATCTTTC
ATGAGATGTCACCTTGAAGAAATGAGTGTCTCCCTCTGGAGGAGGCTTCAAACTCT
CTTCACTGACAGGACTCTGGAACTACTCTGTGAGCCGACAAATGGCTTCCCGGGCC
AGGCAGTGCAGAGTGTACACTTTATATACAGGGCTGACCCGGAACAAGATGGCCCT
T
TTGCCACAGGAGTCCCGGGGGCTGTCTGAGTATAGCAGGCTTGTCTGCGGGGCACTG
C

A

【 6 2 B 】

MLLWVILVLPVPSQFARTPRPIJLPQPPWTVFQGERVTLCKGRFYSYQKTKWYHR
YLKREILRETPDNILEVQSGEYRCQAQSPVLSPPVHLDFSSALILQAPLSVFEGDSVY
LRCRAKAEVTLNNTYKNDNVLAFNLKRTHDFHPIHACLKNDGAYRCTGYKESCCPVSSNT
VKIQVQEPFRPVLRASSFOPIGNPVLTCSTQLSLERSDVPVLRFRFRDDQTLGLGWS
LSPNFQITAMWSKDSGFYCKAAMTPHVSISDPSRWSIQVQIPASHVPLTSLPEKALNFE
GTKVTLHCEFTQEDSLRLLRYFYHEGVPLRHKSVRCRGRASISFSLTTENSQNYCTADNG
LGAKPSKAVSLVTVPVSHVPLNLSPEDLIFEGAKVTLHCEAQRGLPILYQFHEDAA
LERRSANSAGGVAISFLTAHESGNYCTADNDFGPRQSKAVSLVTVPVSHVPLTSSA
EALTFEGATVTLHCEVQRQSPQLYFYHEDMPLWSSSTPSVGRVFSFSLTEHSGNYY
CTADNDFGPRQSEVSLVTVPVSRPILTRVPRQAQVVDLLELHCEAPRSPPILYWF
YHEDVTLGSSSAPSGEASFNLSTLAEHSGNYSCEANGLVAQHSDDISLIVVPSRPI
LTRAPRAQAQVVDLLELHCEALRSGSPILYFYHEDVTLGKISAFSGGASPNLSLTFE
HSGIYSCEADNGPEAQRSEMVLKVAVPVSRPVLTRAPGTHAAVGDLELHCEALRSGP
LILYRFFHEDVTLGNRSPSGGASNLSTLAEHSGNYSCEADNGLGARSETVTLYITQL
TANRSGPFTGAVAGLLSIAGLAAGALLLYCWLSRKAQRKPAQSPDPSDDSQEPTYH
NVPWAEELQPVYIYANPRGENVYVSEVRIQKQKHVAVADPRHLRKNKSPHIIYSEKVA
STPVSGSLFLASSAPHR

【 6 2 A - 2 】

TGCTCTACTGCTGGCTCTCGAGAAAAGCAGGGAGAAAGCCCTGCTCTGACCCCGCCAGG
A
GCCCTCCAGACTCGGACTCCCAAGAGCCCACTTACAAATGTACCAGCCTGGGAAGAG
C
TGCAACCAGGTGTACTAAATGCAAACTCTAGAGGAGAAATGTGGTTTACTCAGAAGTA
C
GGATATCCAAAGGAAAGAAACATGACAGTGGCTTCTGACCCCAAGGATCTCAGGAA
A
AGGGTTCCTCATCTACTCTGAAATTAAGGTGGGCTCAACCCCGTTCCTGGATTCCT
GTGTTTGGCTTCTCAGCTCTCAGATGAGTCCACAGTCTTCCAACTGCTGTTTC
AGCTCTGACCCCAAGGTTCCCTTGGGGGAGAGCAGATTAAGTGGGAAGATTTA
G
GCTGCCAGACCAATCTACTGCTGCTTGTTCATCATGTCTCTCAATCTCAGTCTGACCA
GAAATGACGCCCCCTGCTGGATGTGACAGTTCCTTCCAGTTTAAAGCCCTGACAGGTT
TTTTAACTCAGTGGCAAGGTGTCTCCCACTGCAAGCCGACCAATCTCTGCAATGCTTA
GTGGGCTTCAAGTGTGAATGCTTCTGACTCTGCTCTCAACACCCCAAGAGGGG
GTCTTACCACAAAGGGGAGAGTGGGCTTCAAGGAGTGGCGGCTGCCCTAACAGCTC
A
GGTGTCTCTAAACTCCGACACAGAGTTCCTGCTTGGTGGAAATGCAATTCATTAATGTC
ACGCTTGGTGGGCTACTGCACTGTGCTGCAAAATGGGACAGCACACAGCTGTGCA
A
TGGGACATGTGATGGGTCTCCCAACGGGGGCTGCAATTCACACTCTCCACTGTCTCA
ACTCTAAGGTCCGCACTTGCACCAAGGTAATCTCTCTGCTCATGTGTCAGTGTCTCA
CCTGCCCAAGTAAAGTGGCTTTCATACCAAGTCCCAAGTCTTCCCACTCAACAGAA
TAAACCCAGCAAGTCAAGGCCAGGAGCCAGGGGTGACAGCAAGACACTACTGAGTAA
AC
AGGAGGTGCTCAATTAATTTGACTGACTGACTGAATGAATGAATGAATGAGGAAGA
A
ACTGTGGTAAATCAAACCTGGCAATAAAATCCAGTGCATCTCCATGAGAAATCCGGAGGTA
T
TCTGGCTTCCCTAAGAAACAACCGAAGAGAGGAGCTGGATGAGAAACGTTTCAAGCA
A
GAGGAAGGCTTCTCACACTTTCATGTGCTTGGATCACTCAGGATCTCTGTAATAA
GAGTCTGCTGATGCTGGTGTGTGACAGCTGAGACTGCTTCAATGCTTCAATGCTTCCAG
GGATCTGATGCTGCGCCCTGGCACTGCACTTCCATGATGTAAGCCCTAATGCTT
CAGCAGAGGCCATGGAGAGGAAATGTGTGGCTTGTGCTGCCAGGGCCAACTCGGTT
C
ACACGGATCTGCTGCTCCCTGGCCAGCTTGTGGCAACAGCACCAGCTGCTGTTGCT
GAGAGAGCTTCTTCTGTGACATGTTGGCTTTCACAGCCACCTCGGAAGCCGGAAGT
AGCTGCCACTATTTGTTTCCCACTCAGCCCTCACAATTTCCCAAGAAAGGGTGA
TGTATAAACCAGGACCTTCCATTCAGAGTGTGTTCCCACTTCTGAGCAATGGGATG
TCTGTGCTGCTTTATGATATCCATCAACTTATCTGTAATCTTCTCCAGTGGATTT
GTACAGTGAAGCTTTTAAAGCCCAAGGCTTTCATGCTTCAAGTCTTCCAGGCTTCC
ACTCTTCTCACTGAAAGCCTGGCTTTCATGCTTCAAGTCTTCCAGGCTTCCCAAG
AGACAGGCTGACTTGTGCTCCCAACTTCAAGGAGAAACAGCAGACCTGACAGAG
G
AGCTGTATGAGCCCAAGTGCAGCTTGCAGAGGCAAGGCTGGAGGCAATTTGTCATCA
C
TACAGATGCAACTAAATAGACGTGGAGCAAGGAAATGCAATCCCAAGGAGCCGCT
T
TTTTAGGCTGAGTGAAGTCAAGAGGACAGCAGCAAGCAATAGGCTCAGGATTAAGA
A
AAAAAATCTGCTCAGATTTGTTTGGAGTGCATACCAACAAAGGCTCAGCCCTTCA
CAGTTTCTGAGAAAGTGGAGGCCAGGCTCAAAAGAGAAATTAAGATTTCAATITGG
AGAGTAAAGTACCCCACTCCAGAAATGATAAATGTCACAGTGGCAGAAACAACTCCACCC
T
AAITGGGTGGAGCCCTCCAGTGTGTGAGGCTGAGTGTAAACAAAGGGCTTATTTCT
TCTCAAGTAAAGGGGAACTCTGCTTGGGCTGGGCAATAAGTTTTCTGCTTTCAGAC
GCAACATGAAATATGGCTTCTTGGGCTTGAAGTGTGCTGCAATGAGCAGAAAGAA
TATGCTATGGATCTCTGGATCTCCAGCTTGCAGCTGAGCAGTGTGAGTATGTCAG
CCTCTACAGTCAAGAGCTAATCTAATTAATAACCAATCTTCTGTAAA
A (Continued)

【 6 3 A - 1 】

GGCAGGAGCCAGCACTAGAAGTGGCGGTGTTTCTTTCGGTGAACAGCACTGAACA
C
AGAGGACTCGCCATGGAGTGTGGGCTGAGCTGGGTTTCTCTGCTTITTAAGAGGT
GTCCAGTGTACAGGCGCACTGTGGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCCGGAGGCTC
C
TGCAGACTCTCTGTGACGCTTGGTTTTCAGGTTACAGCAATTAAGGATGCACTGGCT
CGCCAGGCTCCAGCAAGGGGCTGGAGTGGGTTTTCATATGATGAAAGTGA
T
AAATATTTATGACGCTCCGTGAAGGGTGGATTTACCATCTCCAGAGCAACTCCAAAG
ACTGTGCTCTGCAATGAAACAGCTGAGAGTGGAGGACCAATAAGTTTTCTGCTTTCAG
AAGATCAGAAAGCCCTGGTACAGCAACAGCTGTTTCAACCAACTTGGACTCTGGGG
CGGGGACCCCTGCTCAGCTCTCTCAGCTCCCAAGGCCCAATGGGCTTCCCTCCG
GCACCTCTTCAAGAGCAACTCTGGGGGCAAGGCGCTTGGGCTGCTGTGCAAGGA
C
TACTTCCCGAACCCGCTGACGGTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAAGCGGCTGCA
C
ACTTCCCGGCTGCTTACAGTCTCAGGACTTACTCTTCCAGCAGCGTGGTACGGCTG
CCTCCAGAGCTTGGGCAACCCAGACTTCACTTGCACAGTGAATTCACCAAGCCAGCA
C
ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTGTGACAAACTCACACATGCCACC
G
TGCCACCACTGAACTCTGGGGGACCGTCACTGCTTCTTCCCGCAAAACCCAAAG
GACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGCAATGCGTGGTGGAGCTGAGCTGAGCCAC
GAAGACCTGAGGTCAGTTCACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCTAATAGCCAA
G
ACAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTACGCTCTCACCGT
C
CTGCACAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCACAGCTTCCACAAAGCCCT
C
CCAGCCCCATCGAAGAAACACTTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGGAGAACCAAGGT
G
TACACCTTCCCGCACTCCCGGATGAGCTGAGCAAGAAACAGGCTGACTGCTGCTGCTG
GTCAAAAGGCTTCTTCCAGGCACTGCGCTGGAGTGGAGGAGCAATGGGCAAGCCGGA
A
AAACAATCAAGACCAAGCTCCGCTGCTGACTCCGACGGCTCTCTTCTCTCAGAC
AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAAGTGGCAGAGGGAAGCTTCTTCACTGCTGGTGTG
G
CATGAGGCTTGCACAACTACTACAGCAGAAAGGCTCTCTCTGCTCCGAGGCTGCA
TGTGGAGAGAGCTGTGGGAGGCGAGGAGCGGGGAGCTGGACGGCTGTGGAGGACCA
T
ACCATTTCAACACACTTCTCTGTTAAGGCTGTGGTACAGTCCAGCTGACTGCTGCTG
AAGGTGAAGTGTGATCTCTCTGCTGGTGGAGCTTCAAGCAGCACTATCACTCCGACTAC
AGGAACAATGACGGCAGGGGGCTGAGGCCACCTCTGCGGGTGTCCAGGGGCGCC
A
GACCCCAACACAGCACTGGGCACTGCTGAGCCACCCAGGCTGACACTGCCCCCG
A
CCTCACCCCTCAACCCCAAGGCTCTGCTGCTGCGAGTTCGCTTGAACCTGACACACA
CCTGACAGGCCCCCTTCCAGACCTGTGCAATGACAGTCTACCCAGACCTCCGCTGCT
TGGTGCATGAGGGCAGTGGGGGACGCTGCTCCCTCAGCAGGACATCTTGGCTCCGG
ACCCAAAGGTGCTCACAACAAAGGAGGAGTACCGGTATCCCAAGGCCCAACCAAGGC
A
GGAGCTGGGCTGGAGGCAACCCGCTCCAGCCAGCTCTGAAACAGGCGGTGGTTTCC
AGATGGTGTGGAGCACTACCCGCAAGGAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCTT
G

A

【 6 3 A - 2 】

T'TGGGGAGGCTTCCGAGAGCTGCGAAGGCTCACTCAGACGCCCTTCCCTCCAGCCGCGCA
G
CCAGCCAGCCTCCATTCCGGGCACTCCCGTGAACCTCTGACATGAGGAATGAGGTTGTTT
TGAITTCAGCAAGAAAGACGCTGCTCTGCTCTGGGAAACAGTCTCGGTGCCAGCACCA
CCCTTGGCTGCTGCCACACTGCTGGAATCTCGGGTGGAACTGGACCCGCAAGGACAG
CCAGCCCAAGAGTCCGCACTGGGGAGAGAAGGGCCAGCCAGGACACTGCCACCTCC
C
ACCCACTCCAGTCCACCGAGATCACTCAGAGAAGAGCCTGGGCCATGTGGCCGCTGCAG
G
AGCCCCACAGTGCAGGGTGAAGTAGCCCAAGGAAGGGCTGGGCACTGCCCCAGACA
GG
CCCTCCAGAGAAAGGCTGTGAGCAGGTCACAGGCGGGCAAGACTCAGCCTTGGTGGGGC
C
TGAGGACAGAGGAGGCCAGGACATCGGGGAGAGAGGTGGAGGGACACCCGGAGAGC
CA

A

GGAGCGTGACACAGCCAGAACTCATACAGAGGCTGGCGTCCAGTCCCGGGTACGTTG
C
AGCAGGAACAAGCAGCCACTCTGGGGGCCACAGTGGAGAGGCAAGACGACAAAGAGG
GT
GCCCGTGTCTTGGCAAGCGGGGCTGCTGGCCACAGTGTGGACAGAGGCCCCACG
C
TCTGCTGCCCCATCAGCCGCTTCCGTAOACTGTCAACCGAGAATCCGACAGAGGAAGG
A
GACTCGAGCGGAGTGGCCAGCGCTGCTCGGGCGTCAGGGAGGACTCCCGGGCTC
A
CTCCAGAGGAGTGGCCACATTTACGCTTGGTACTTGTCTCTCTTTTAAATTTTCTA
AAGCTCATAATGTCTTGTGATGTTCTTTTGTGATGACAAATAAATATCTTTTAAGT
CTTGTAAAAAALAAAAAAAAA

A (Continued)

【 6 3 B 】

MEFGLSWVFLVALLRGVCCOALVESGGGVVQSSLLRLSCAASGFRFSNYGMHVVRRQAP
KGLLEWVAVFSYDESDKYAAASVKGRTTISRDNKNTLSLQMSLRVEDTAVYCAKDDK
PWYNSWFLTNFDSWGRGLTVISSSASTKRSVPLAPSSKSTSGGTAALGLLKVDFVPEV
IVSWNSGALTSVGHTEPAVLQSSGLYSLSSVVTVSSLLGDTQTYICNVNHPKSNKVDKVEP
KSCDKTHTPCPAPELLGGFSPVLPFPKPKDTLMISRTPVYICVYVDVSHDEPVEKFNWYVD
GVEVHNAKTPREEQVNSYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSP
FLYSKLTIVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYITQKSLSLPELQLEESCAEAQDGLDGLW
TITITIFLFLLSVCSATVTFKVKWIFSSVVDLQKTIIDYRNMIQOGA

【 6 4 B 】

MDWTWRFLFVVAATGVQSQVQLVQSGAEVKKPQSSVKVSKASGDTSSYAIWVRQAP
GGLEWMMGGIIPFTANYAQKFGGRVITADESTIAYMELSSLRSEDTAIVYCAKCTGI
LGPYSSGVWPNSDYYYGMDVWGGQTTVYSSGSAFPTLPLVSCENSPDTSYAVGC
LAQDFLPDSITFSWKYKNSDISSTRGFSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVQMGTDEHVVC
KVQHPNGNEKNVPLVIAELPKVSVFVPRDFGNPRSKSLKICQATGFSRQIQVS
WLREGKQVGSVITDQVQAEAKRSGPITYKYSTLTIKESDWLSQSMFTRVDIRGLTFQ
QNASSMVCVPDQDFAIRVFAIPFASFILTKSTLCLVLDLTYDSVVISWTRQNGEAV
KHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSEGRFTCTVTHDPLSPKQTSRPKGVALLH
RPDYVLLPAREQLNLRESAATITLCTVGFSPADVQVMQRPQLSPEKYVTSAPMPEQ
APGRYFAHSILTVSEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERTVDKSTEGEVSADDEGHENL
WATASTFIVLFLLSFYSTTVLTKFKV

【 6 4 A 】

GCTTAGAACTAGTGAATCCCGGGCTGAGGAATTTCTTAAAGAAGCCCTGGGAGC
A
CAGCTCATACCATGGACTGGACCTGGAGTTCTCTTTTGGTGGCAGGACTACAGT
GTCCAGTCCAGGTGCACTGGTGGAGTCTGGGGTCAAGGAAAGCTGGGCTCTC
G
GTGAAGGTTCTTCCAGAGGCTTCTGGAGGCACCTTACAGGACTTCTTACGCTGGGT
CGCAGGCCCCGGACAAAGGGCTTGTGAGTGGTGGAGGATCACTCCATCTTTGGTAC
G
GCAAACTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTACAGATTACCCGGACGAAATCCACAG
C
ACGCCTACAIGGAGCTGAGCAGCTGAGATCTGAGGACACCGCGGTGTATTAAGTGGC
A
AAAACCGGATCTCTGGGGCGTATAGCAGTGGCTGGTACCCGAACTCGGACTACTACTA
C
TAGCGTATGGAGCTGCGGGCCAGGGACACCGTACCGTCTCTCAGGGAGTGCAATC
G
GCCCAACCCCTTTCCCTCTGCTCTCTGTGAGAAATCCCCGTGGATACGAGCAGCGTG
GCCCTTGGCTGCTGCGACAGGACTCTCTCCGACTCCATCACTTCTCTGGAAATAC
AAGAACAATCTGAGATCAGCAGCAGCCGGGCTTCCCACTCAGTCTGAGAGGGGCGAA
G
TACGCAGCCACTCAGAGTGTGCTGCTGCTTCCAAGGACGTCATGACGGGCACAGAGA
A
CACGTGGTGTGCAAAAGTCCAGCACCCCAACGGCAACAAGAAAGAAAGCTGCTCTTCC
A
GTGATTTGCTGAGTGTCTCCCAAAGTGGAGGCTTCTGTCGCCACCCCGGACGGTCTTCC
GGCAACCCCGCAGCAAGTCCAAAGCTCATCTGCCAGGCCAGCGGTTTACGTCGCCGCA
G
ATTACAGTGTCTCTGGCTGCGCGAGGGGAAACAGCTGGGGTCTGGCGTCAACCAGGACA
G
GTGACGGTGTGAGGCAAAAGAGTCTGGGCCACGACCTACAAGGTGACCAAGCAGACTGAC
C
ATCAAAGAGAGGACTGGCTCAGCCAGGACATGTTCACTGCCCGGTGGATCAGAGGG
C
CTGACCTTCCAGAGAAATGGCTCTTCAITGTTGTCGCCGTAAGACACAGAGCCATCCGG
GTCTTCCGCAATCCCCCAATCTCTTGGCCAGCATCTCTCAGCAAGTCCACCAAGITGAC
TGCCTGGTACAGACTGACCACTATGACAGCGGTACCACTCTCTGGACCCGCAAGAAAT
GGCAAGCTGTGAAACCCACACCAACTCTCCGAGAGCCACCCCAATGCCACTTTCAG
C
GCCGTGGGTGAGGCCAGCATCTGCGAGGATGACTGAAATCCCGGGAGAGGTTCAAGCTG
C
ACCGTGACCCACACAGACTGCCCTCGCCACTGAAGCAGCACTCTCCCGGCCAAAGGG
G
GTGCGCTGACACAGGCCGATGTACTTGTGCTGCCACCCAGCCGGGAGCAGTGAACCTG
CGGACTCGCCACCAATCAGTGGCTGGTGGAGCGGCTCTCTCCCGGACGCTCTTGGT
CAGTGGATGTCAGAGGGGGCAGCCCTTGTCCCGGACAGAAATGATGACAGCCGGCCAAAT
C
CCTGAGCCCGAGCCCGAGCCCGGTACTTCCGCAAGCAGCATCTGACCGTGTCCGAAAG
G
GAATGGAACACAGGGGGAGACTACACCTGCTGTGTTGCCATGAGGCCCTGCCCAACAG
G
GTACCCGAGAGGACCGTGGACAAGTCCACCGAGGGGGAGTGGCCCGCCAGCAGGAGG
GC
TTTGAGAACCTGTGGGCCACCGCTCCACCTTATCATGCTCTCTCTCTGAGCCTCTTC
TACAGTACCACCGTCACTTGTTCAGGTGAAATGATCCCAAGCAGAAAGACATCGGAGA
C
CAGAGAGGAACTCAAAGGGGCGCTGCTCCGGTCTGGGGTCTGGCTGCTGCTGGCTGGC
T
GTTGGCAGTGTCTCTCTCCCGCCCGGCTCCAGTGTGTGCTCTCACACAGGCTTCTC
TCTCCACCGGACAGGGCTGCTGCTGCTGACAGCCAGAGGTGGCTTACCCACACTG
C
TTTGTGTGTATACGCTTGTGCGCTGAAATAAATATGACATTTTATCCATG

【 6 5 A 】

1 agaacctct gccctaccu igagctctg gaagccctg gtcctctg tctgtgtgt
61 gggctgtgct ttgtctccg ccagacagcg ccagctacc ctgtgtct tccctgaga
121 ccagagacc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
181 cactctggt gcagagctg gggagagtc gaaactctt gggctctgc tctgtctct
241 ccagagacc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
301 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
361 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
421 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
481 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
541 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
601 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
661 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
721 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
781 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
841 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
901 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
961 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
1021 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
1081 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
1141 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
1201 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
1261 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
1321 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
1381 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
1441 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
1501 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
1561 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
1621 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
1681 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
1741 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
1801 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
1861 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
1921 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
1981 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
2041 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
2101 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
2161 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
2221 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
2281 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta
2341 ggcagagcc aactctacc agagcagct ggcagagag taccttacc gattgtgta

【 6 5 B 】

MSLWQPLVLLVLCGCPAQRQSTLVLFGDILNINLDRQLAEYLRYRYTRVADM
R
GKSLGPAILLKQKQSLPFTGHDSTALAKMRTRBCQVPLDGRGFTGDBLKWHHNITY
WIONYSEDLPRAVIDDFAFAFALWSAVPLTFRVYSRDAIDVYQFVAEHGDCYRFDK
D
GLLAHAPPPGPIQGDHAFDDDELWSLKGVVVPTFRFNADGAACHFPIFEGRSYACTTD
GRSDGLPWCSITAYNDTDRDFGCPSPRLYQDGNADGKPCQPFPIFGQSSYACTTDGR
SD
GYRWCAITANVDRDKLFCFPTADSTVMGGNSAGELCVFPFTFLQKEYSTCTSEGRGDGR
LWCATITNFSDSKKWFQCPDQYSLFLVAHEFGHALGHDHSSVPEALMYPMYRFTGPE
L
HKDDVNGIRHLVGRPEPEFRPPTTTTPOFTAPPTVCPPTGPTVPSERPTAGPTGPSAG
PT
PTAGPSTATTPLSPVDDACNVNFDIAIEJGNQLYLFKDGKYYRFSRGRSPQPFLLADK
W
PALPRKLDVFEERLSKLLFFSGRQVWYVYIGASVLPGRRLDKLGLGADVAVTGLRSG
R
GKMLRFSGRRLWRFDVKAQMDVRSASEVDRMFGVPLDTHIDVQYREKAYFCQDRFYW
R
VYSSRSELNQVDQGVYVYDILQCPED

【 6 6 】

I
 100cagagccc gggccgaggg euectctcag ccagctctc egeictctc acagcgcca
 61 gaaccgctg etgagccca lggcccgcc lgcctctcc gcccceccn gcaateccg
 71 gctctcgca gggccacgc lgcctctcct colggtagcc gcccggcgg gcccagcgg
 81 agcctcctg gcccctgac lgcctctcga gctctgag accctcagg gaattcaacc
 241 caggaacac caagctgca acgtagagc cccaggtccc cactgccc aaaccgaagt
 301 catagccaca ctcaagag lggcgaagc lgcctctcct cagctctccc ccagctga
 361 gaattctac gaaagctgc lgcctctcga cunccctac tgcagcaga gggagagaa
 421 gctctctgt gctctctct gaagagccc cgcctctat aggaacagaa gaggagagc
 481 agacacgc cagagggcca cctgattgt gctctctag ttgagctc gcttagaga
 541 agctctctat ttatttatt atcaatagt ttgaagat ctatgntt atttggctg
 601 taanaattt aaaggtatga ttaactctac ctgcacatg tccattata ttcattctt
 661 ttgaatgc aaccccaagt tagtcaatc lggattcata tttaattga agtagaatg
 721 ttccaatg tctccatgc attatgitta tattctgag gaccctgca calgcagcc
 781 actgctatg aggtggcgg atccaagca atggccaatg agatcattg gaggccaagg
 841 gaattgatg gcaatctgt ttgtaactg tttagatgaa lgtcngtgt taitatgta
 901 aatgattca cagctctgtg tcaacttcc tcaatgta acntaagaa ctanaatgt
 961 ctcaatccc ctggacatc ttngctctt ctgttaagc atagcctct gtttaaggt
 1021 agttacag lgtctctgc ttgagacaa gggcctaat taitgatgt tcaatgaga
 1081 atataaat aaagcaata tgg

A

MARAALSAAPNPRLLRVALLLLLLVAAGRRAAGASVATELRCQLQLQGHKPNQISVNV
 KSPGPHCAQTEVIATLKNRGAACLP/ASPVHKIIEKMLNSDKSN

B

【 6 7 】

CTATAGAAGAGCTATGACGTGCGATGCGACGCGTACGTAAGCTCGGAAATCGGCTCGAGG
 C
 TTTCTGACACAGCTTCCCGACGCGTCTGCTGAGCCCAATGGCCACGCCACGCTCTCCGCC
 GCCCCAGCAATCCCGGCTCTCTGGGGTGGCGCTGCTGCTCTCTCTCTGGTGGCCGCC
 AGCCGGCGCGCAGCAGGAGGCGTCCGTTGCTACTGAACTGCGCTGCGCTGCTGCTGACAC
 A
 CTGCGAGGGAATTCACCTCAAGAACATCCAAAGTGTGAATGTTAGTCCCCGGACCCCA
 C
 TGGCCCAAAACCGAAGTCAATGACCACTCAAGAATGGGAAAGAAAGCTGTCTCAACCC
 C
 GCATCCCCATGTTGTCAGAAATCATCGAAAAGATACTGAAACAGGGGACCAACCTG
 A
 CAGGAGAGAAGTAAAGAACTTATCAGCGTATCATTTGACACTTCTCGAGGGTGGTCCCT
 C
 CCCTTACCAGAGCTGAAAATGAAAAGAGAACAGCAGCTTTCTAGGGCAGCTGGAAG
 G
 ACTTAATGTGTTGACTATTTCTACGAGGGTCTACTTATTTAATGATTTATTTTGA
 AGCTGTATTTTAAATTTTACATGCTGTATTTTAAAGATGAGTGTGTTTCAATCAAAC
 ATAGCTCAGTCTGATTAATTAATTCGAATGATGGTGTAAATGTTGCTATTAAACTA
 ATATTTAGTGGGAGACCATAATGTGTCAGCCACCTTGATAAATGACAGGGTGGGAACT
 G
 GAGGGTGGGGGATGAAATGCAAGCAATTAGTGGATCACTGTATTAGGTAAGGGAATGT
 A
 TGTACACATCTATTTTTTACTTTTTTTTTAAAAAAGATGACAGTGTGTATTTATTC
 AAATTAATCACTATATGTTTCAACATTTTTTACTGTAAGTGTTCCTTAGACATTTTAT
 GTCTGCTGTGAGGGCAATAAGCTGTGTTTATGTCATTCTGACGCTTCTCTTCC
 TTGGAAAAGAGAAATTTATCAATCTACTTACTATTTGATAAATGACATGATAATAAAGT
 TTATGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG

A

MAHALSAAPNPRLLRVALLLLLLVAASRRRAAGASVVTLELRCQLQLQGHKPNQISVNV
 RSPGPHCAQTEVIATLKNRGAACLP/ASPVHKIIEKMLNSDKSN

B

【 6 8 】

I
 1 accaaactc ttgagagca aagggcaaa aggtctgtc gggattctc tcaagcaac
 61 ttcaattc aatgttga agcagccatg gcaagactg ctgactctg cagttgaatg
 121 atgcttatt acagtgca ttgagatgac ttgcttgg aagctgatg cctcaaacg
 181 atgagctg cctccagg caagcagcc lgcctctcct atggcgcat ccagctaga
 241 atctcgaac acaactacg caagctctc agcagggccg ctctctgtgt tttctctctg
 301 gacaagtga ggaagatgt gttctctgc ccaagcctc tccagagaa tgcctgagc
 361 acctcttcc cctctctt ttgagagaa ctatctctc tgcacatg gtagaacag
 421 gcttatgtc acgatccc tgcagatca ctgaactca cgcctcggga ctacagcaa
 481 aaaaactgg tgaatctgg tccatgaa ctgaactca tccactcca gggacagat
 541 atggagcaac aatggctgt ctctatgct ttgtaacaa gagaagaaag taatgaaa
 601 atactctgg cctgggctc caagaaaag aatctgacc tgcctctgpt gttgaagat
 661 gataagcca ctctacgt ttgagatgta gttcccaaa atcccaaa gagaagatg
 721 gaaaagcgt ttgcttca caagatgaa atcaatca agctgagt ttgactgccc
 781 caatccca actgtatca cagcaactc caagcagaa acatgcccct ctctcagaa
 841 ggaaccaaa gggccagaa ttatctgac ttcaacta caattgtct tccaaagaa
 901 gactgtacc cagagatcc tgtctgaat gttgctca tccctagcc ttgcaagaa
 961 gaaacagaa gttttgag taccctata cctgagatc tccctgttc taccaaatg
 1021 cccaactcc tgcctagg tagcttaag agtatctc tccctcagc caggacatg
 1081 agctctccc tttagagcc atcccaagc cctttgttg agccagcct ctctacctc
 1141 tctactcac tttagagcc cctgacagaa aaccggcca caattgttc taagaaccc
 1201 tctctacc gctcccaac tctatgagc aaccgctcc ctatttatt attattgt
 1261 ttgttgtt tctctagg tctattat tcaagggcg caggaagag cagctctgt
 1321 aaaaagctc agttttaa atgctgcaa tcaatcaat ttgactggt gctctctct
 1381 taattcaat ccttataa agactgaaa tttatagct cagattatt aaaggaat
 1441 attataat gaggnaat cactctctc aatgtcttc aataaact cactgag

A

MAEVPALASEMAYYSGNEDDLFEADGPKQMKCSFDQLDCLPLDGGIQLRISDIHYSKGF
 RQAASVVAAMDKLRKMLVPCPTQFOENDLSTFFPFIEEPIFFDWDNEAYVHDAPVRSLN
 CTRLRSQQKSLVMSGPELKALHLQGDMEQVVFMSFVQCEESNDKIPVALGLKEKNLY
 LSCVLDKDKPILQLESVDPKNYPKKMEKRFVFNKIEENKLFESAQFPNVYISTSQENMP
 VFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS

B

【 6 9 】

I
 1 gtcagttca lggtagaa gctgtgacc ccagatccc agcccgtgg agagaaggg
 61 gctctgaca gcccaccc ccccactg ccagatctt atgggtctg agttcagg
 121 gggggccc agctgggtg tataaacag ctcaatggg gactacaac ttgattct
 181 ctggggaa agctcttcc agccacag ggaagatcc agaaatcc taggatcag
 241 acaccoga tctctcaac tgaacacg aagctgtt ctccaca gacattgt
 301 ctcaama gaggacct ctgctctg ttccggagt gcttccga lggctctc
 361 tggctcag ctgctctg ttgcctctg ctgctctg caaacgaag aagatccaa
 421 ccccaatc agcaacta gagaagc agagctag cagttgact ggaactaa
 481 cagaatgt accgatcc agtctgaa agcagcag tttctctc cggatgaa
 541 caatgctat tgcagttg gacaaatc ctatgtaa atgacact acacctgc
 601 agtgcacac caactatc caagctgac cctctctc gaaacatg gaaactct
 661 gcaagctgc gagaatgta cctgtgat tcaagctg gattctga gctcagctg
 721 ggcagtagc cagagagcc cgcggagct ccagctac ctgactga acgttccaa
 781 cagctcaca cagtaggt gttctact caaacagat gctcagaa cagctctg
 841 gttctctc gatgactc ctgactc cagctctc caagctct caactctc
 901 gggggcag agcagact tccatccc ctgacagat aagttgtg tcttca
 961 gattgata taactcac ccaactgac tgcagatgt aatagacac attcttar
 1021 gcactgaa atgagaatc attcaatg caattgag taagctc agatacaaa
 1081 gaaatgag ctgtaata caagcaggt cagagacag aactcttc agctactaa
 1141 tctgtagc tcaactac aataagag cggagaga gtagatct tcttagcc
 1201 ctgggccc cccagcgt tcaagtag cagagtag ggcagaca cagctctg
 1261 gctagctc ctgctgag cctggagac gctctgag ctgctctg tctgtag
 1321 ctgcaagag tctgtag tgcagact ctctccc atctcaaa tgaagacc
 1381 cagctgac agctcaaa agcaactg gttctctg gaggcagaa aagccagct
 1441 gggagatg ctgctagc agtcaaggt ctgcaaaa actgagat gggctcag
 1501 gctggggg ctgctcct atctctgg cgggagag cgcctgaca gactgtcag
 1561 tgaactgc cagcagcc agaatgac atctctag gttggggc atggagatg
 1621 cctgtaat ttgctgaa gctcagaa agaaacag aactgtgt gttattca
 1681 tgaagatg atttttt tttaacca aaaaaaaa aaaaa

A

MVLLWLTLLIJAIPCLLQTKEDPNPPIINLRMKAQAQQLTWDLNKRVNVDIECVKADADYSMP
 AVNNSYCFQAIISLCEVTNYTVRVAANPFTWILFPENSQKPAWAGAEMLTCWHWDVFLSCL
 WYVGGPAPDQYDLVNVANRQOYELCHYKIDAQKTRIGCFDDISLSSGSSSHLVR
 GRSAAGFICTDKFVVSQIQLTPPNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNKFRVYELQKRMQ
 PVITEQVDRISFQLNPGTYTVQIKARERYEFLSAWSTPQRFCEQDEGANTRAWRITSLLI
 ALGTLALVCVFCRRYLVQMLFRPHMKDPIDGDFQNDKLVVWEAGKAGLECLVTEV
 QVVQKT

B

【 77 A - 1 】

GCCTGTCCAGGGCGTGCAGGGACCTGGACTCCCGCTCTCCCGGGGCTCGGGCAGCCG
ACCCAIGGCGGGGAACCTGGGGCCCGCGCGCGCTGTCGGCGCACACCGTCTGCTGTCG
ACCTGCGCCCGGCTGCTGGGAGACTCTGGCGTGTTCGGACACCTGCGAGCGGGCGG
TGGCGTGGCCCGGCTGGCAGAGAGACTTCAAGCAGCTGCTGGATGTTCGTCATAITG
AAAAGATGTAGACCAAGTAAAGCTGGAACAGAGAAATFACITTTGGTCTGGCGACAG
AAAAACAGGACCTCGGTGACCTTTACAGCTCTCCAGGACATGGGACACATCGTGGAG
TATTCATTTAAITACAAACTAGGACAGTGTAGTCCCTACAGAGAAGAGTATCAGCA
AGGIGGATITCCAAAATATATTTTCAAGGAAACAGCCATGTCACCGTGGATATGTTCT
TATTCCTGAACATAATGAAAAGGAGTACTGCTTAAATCTTCCAICAGCTTCAAAAAT
CATAGAAGGAATAGAAAATTTCCACAAAGACTTCTAATTTGGAGAAGGAGAGATTTTU
AGGTAACAGACTGGAGATTCAAAACCTAACAGATGCTGCAAAATATTTAAACAGGAG
AAAAAATGACGTTAGAAAGCAATGGAAAGGTTTATTTGAGCTTGAAGTTTACTA
CTGTTTCATCACCAACACTAGAGTGTGGCTGCTATTTTACAGAGACAGGAAAGTTC
TGCTGATTTTCCATACATGAGAAATGGAACACTTTTTCAGAGATGTCAGTGTGATG
GACAGGGCCACCTCTTGGCACAITTCGAATCGGTATATTAATAGGAATAITCCAAAGCC
ATTCACCTACCTGACCAACCTTCAACCAATGCTGGTCACTGCTGGCAGTATATCAAGTGA
AACATCCTTTGGATGATACAGTTTCAACCCAACTAACTGATTTTGGCAGTGGCAGCTTC
GGCCCACTGAAACATCAGAGTGTACCAATAAATGACCAGCAGCAGCAATGAAAT
CTGTGGTACATGCCAGAGAGTACATCAGCAGCGGGAAACTTCCATTAACAGAGATG
CTACAGCTTTGGAAITGTAAATAITGGAAGTGTAAACAGGATGTAGATGATGTTAGATG
TCCAAAACATATCCAGCTGGGGATCTCTTATAGAGAAITGATGGAAGAGAGGCGCTGG
ATTCATGCTCTCAITTCAGATAAGAAATGACCTCCCTGCCCTGCAAAATTTCTTGGCAA
GCTCTTGTGTTGGCAGCGGGTGTGCTGCAACCGCGGCAAAAGTAAAGCAATCAATGGA
TGAAGTTTAAATACCTTTGAAAGTGTGACCACTGATTTGATTTGCTGGAAGTCCCTCC
ACATCAATAAGTCTTCAAGTGTCTCTCTCTAATTCCTGGAGAAATGTAACCAAGTATTC
CAGTGAAGATGTGAAAAGCCAGAAATACAAITTTACTACCTTCTGATGAAAGCCCTGAGG
ATGACAGATGACTGACAGAACTCTTTGAAATGACGCACTGCTGAGGATTTATGTTCTG
AGCTTGGCAAAAAGCCAGAGAGCAAGAGAAATGAGAAAGCTTGCACAAATGGCCAGTT
CTTCTGTGAAGAAAGTGTGTTCCCAAGATATAGTTCATCCAGGACTTAAAGGCTCT
ATAAGTAAATATAGTCTCTTCTCAGAGCTCCAGGGCACTTCTTGCAGGAGCAGGCCA
TGGGAGGAGCTGTCTCCCAAATTTCTGGGATGAATGAAACAGTACAAAAGAA
ATAAATCTACCAAGATAAAGAAAAAGCAAT

A

【 77 A - 2 】

ATTGATAGGCACCTGAGCATAGGTATGACCTTGGGAAGACATTTGGCTCCATTAAGCAAT
GCCAAGAGATGATCAATAGTGAAGTTGGGATGTCAGATAAACAATCTGGATAATTTCC
ATTTCTTTTTCCAAACCTCTAAACAGAGTGCCTTAAAAAATTTGTTTAACTCAGGATAAT
GTCTCATGACCAAACTCAGCTCAATAGAGCCTTCAAAAATTTCTTAAAGTCAATGGTT
CTGACTTCAGCCAAAACAACAACTCAAAACCTACCAAAAAGGAGCTGGATGTAAATGTC
CTCTCACTCTCTAGTGTGAGTCTCAGAGCCTTCACTGCAAGAACTTCAAGTTG
ATTCCATCGTTGGTTAGCTTCTTGCACGGGTTGAGGAAATG

A (continued)

【 79 A 】

AAGCCACCCAGCCTATGCATCCGCTCTCAATCCCTCTCTGTTGGCAGTGGGCTCATGG
CGCTTTGTTGACACCGTCAATGCTCTCACTTGCCTTGGCGGCTTGCCTCCCGAGCCG
TGTGCTCCCTCTACAGCCCTCAGGAGCTCAATGAGGAGCTGGTCAACATACCCAGAA
CCGAAGGCTCCGCTTCTGCAATGGCAGCAATGATGGAAGCAATCAACCTGACAGCTGGCA
TGTACTGTGACGCTCGAAATCCCTGATCAACGCTGACGGCTGCACTGCAAGAGAA
CCAGAGGATGCTGAGCGGATTTGCCCGCAACAGTCTCAGCTGGCGAGTTTCCAGCT
TGCATGCTGGAGACACCAAAATCTGAGGTGGCCAGTTTGTAAAGCAGCTGCTCTTACAT
TAAAGAACTTTTCCGAGGAGCGGTGCAACTGAAACTGAAAGCATCAATTAATTTGCA
GAGCAGGACCTGATTTGAAATGACAGATKCAATTTCTTTCTGATGTCAAAATTTGTC
TTGGGTAGGGCGGAAAGGAGGTTAGGAGCGGTAATAATCTTACCTTACCTTACAGCT
TGTGCTGCGCTCTCTGCTGCTGAGCAGCTCAGCTTCCCTTCCCAAGGCTCAGCTGT
GTGGGCTCTCTGCTGAGGCGCTGAGCTCGGTGGACCCAGGATGACATGTCCTTACA
CCCTCCCTGCTGCTGAGCAGCTGATGCAATACAGTGGGTGCGCCCTTCCAGACA
TGTGGTGGGACAGGACCCACTTCAACAGCAGGCACTGAGGCGAGCAGCAGCTCAGGCA
CACTTCTTGTGCTTATTTATTTATTTGTTGTTTAAATGAGTGTGTTGTCACCGTTG
GGATTTGGGAAGACTGTGGCTGTGCGACTTGGAGCCAAGGCTTCAAGACAGCTCAGGCT
CCGACACTAAAGCAGTGGACCCAGGACTCCCTGGTAAATAAGTACTGTGACAGAAAT
TCTGTACTCACTGGGCTGCTGGGCTCTGGAGCTCACTCCGAGCAGCGGCTCAGGAGAG
GGCAGCAAGACCGCTCTGCTGCTGCAAGCAGCAGCAGGCTCAGCAGCAAGCAATG
TATGTTTCTCTGATTTAAATATTTAAATGATGTTAGCAAGAGTAAATATAGAAAGG
GTACTTGAACCTGGGGAGGGGAGCAATGAAACAGTTGTTCACTTCACTCAAACTG
AGCCAGAAAATAAGTTGTTGACAGAT

【 79 B 】

MALLLTVIALTCLGGFASPPVPPSTALRELEJEI.VNITQNKAPLCNGSMVWSINLTAGMY
CAALESINVSQSAIEKTRMLSGCFPHKVSAGQFSSLLHVRDTKIEVAQFVXDLHLHLKLF
REGRFN

【 77 B 】

MDLRVQRPPVEPPPEPTLLALQRPQRLHHHLFLAGLQQRSVPEMRLSMDTMMPELVQVGO
EQELRQLLHKDKSKRSAVASSVVKQKLAEVILKQQAALERTVHPNSGIPYRITLEPLETEGA
TRMSLSPFLPVPSPSPDPPEHFLRKTVSEPNLKRYPKPKSLERKRNPLRKESAPSLRRRP
AETLGDSSPSSSTPASGSSPNDEHGNPPLGSEALGQRLRLQETSVPFALLPTVLLPATLL
GLPAPARADSRRTHPTLGRGPHLSPHPTPLFHGLEPEAGGTLPSRLQMLLLDPSGSHALP
LTVPLGLPLPFFAQSIMTTERLSSGSLHWPLSRTSREPLPSPAATAPPQPMQRLLEQKTKTV
QYKRSKXPSKRLRQPSAEDLETGGGCPQVVDJGLEHREHGGQPEARGPAPLQHPHQ
VLLWEOQLRAGRLRPGSTGDTLLPLAQGHRLRPAOSSPAAPSLSAPEASQAARVLSSE
TPARTLPTTGLYDSVMLKHQCSGDNRSRIPEHAGRIOSVWRLQERLQJASQCTITWNEHLS
LEELQSVHSRHLVLLYGTNPLRSLKLDNGLKLLAQRMYVMLPCGGGVGVDTDITWNEHLS
SNAARVAAGSVDLAFKVASRELKNGFAVVRPPHADIHSTAMGCFRFSVAIACRQLQO
QSKAKILVDVWHHNGQTOFTYODPSVLYISLHRHDDGNFFPGSVADEVGAGSGEGFN
VNVAWAGGLDPPMGDPEYLAARFVVMPIAFRFPDLVYSAGFDAAEHGPAGGYHVSNA
KCFYMTQQLMNLAGGAVLALLEGHDLTALCDASEACVAAI.GNVRDPLSEEGWQKPN
NLAIRLSAVIRVHSKYWGCMQRLASCPDSVVRVPGADKEVEAVTALASLVGILAEDRP
SEQLVEEIEPMNL

MAGNCGARELLSAHTLLFDLPPALLGELCAVLSDCDGLGWRGLAERLSSWLDVRHIEKY
VDQKSGTRELHWSWAKNKTIGDILQVLQEMQHRAIHLITNYGAVLSPSSEYQEGFP
NILFKETANVYVDNVLPEHNEKVLKSSISFQNIIEGTNRNFKDFLIEGIEFVRYVEIQNTLF
YAVKLFQEKMKQCKKHWRKLELVLHHLHLELAAAYFTEFKCLFVPMRNTLFL
DRLOCGVDTAPLPHIRIGILIGISKAHYLHNVRQSVICGSSISSANILLDPQKPLDFAMA
HFRSHLHOSCTINMSSSKHLWYMPBEYRQGLSIKDTYYSFVIMVLLTGRVRLDPP
KHILRDLKELMEKRLGDLCSFLDKVPPCPNRSKFLCLAGCAATRAKLRPSMDVPL
NLETSOASLYFAEDPFLSKSFKPSPLFLENVPSIPVFEDESQNNLPSDBGLRIDRMTQCT
PFCSSQVFMVLSLDDKPKSKRNEACMFSSCEESWPKVYVPSQDLRPNVYNDPSSGAPG
HSCRSPVSESSCSFVDEYQYKKE

Figure 7B

【 78 】

CTGATAAATAATGCTCACAATGCTACTGCAAAATCGACAACCTAATATGGGCTCACC
TCCAACTGCTTCCCGCTCTGTTCTCTCTGCTAGCAITGICCGGCAACTTTTCCACGGAG
ACAGATGGCGATATACCTTACAGGAGATCAACAAACCTTTGAACAGCCTCAGAGAGAG
AAGACTCTGTGACCCGAGTUGACCGTAAACAGACATCTTTGCTGCTCCAGAACACAACT
GGAAGGAAACCTTCTGCAAGGCTGCGACTGCTGCTCCGCGCACTTACAGCCACCAATGA
GAAGCACTGCTGCAAGGCTGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
TCCGATTCCTGAAAGCGCTCCACAGCAAACTTGGGCTGGGCGCTTGAATCCCTGTC
CTGTGAAGGAAGCCACACAGAGTACGTTGAAAACTTCTTGGAAAGCTTGAAGAGCTAA
ATGAGAGAGAAATATCAAAAGTGTCCAGCTGAATTTAAATTTATGAGTGTTTGATGAG
CTTATTTTTTAAGATTTTATATAITTAATTAACICTACATAAAATAAAGTATATATAAGAAT
CAA

A

MGI.TSQI.LPPLFLLACAGNFVHGKCDITLQEIHKTLNSL.TEOKTCTELTVTDIFAAKSNIT
EKETFCRAATVLRQFYSHIEKDRCLGATQEQFHRHKQLRFLKRI.DRNI.WGI.AGLNSCPV
KEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCS

B

【 80 A - 1 】

TGGGAGTTTGGAAATAGAGGACAAAGATAAGCACGCCAGAAATGCTCATCTTTCCGTC
CGGACATGTTTGCAAAGATGAGCAATTCGGCGGTCGGGAGTTTGGAAATAGAGGACAA
AGATAAGCAAAATTAACACTTCTCAGCGCCCCITACAATTTGGTGGACCCAAATGGGG
GGGAAAGAGCGACATCAATGAAITGCTTAAATAATATTTGACTGAGGAGATTTCCCTCTGG
AACCAAGAGAAATACATTTGTACAGATTCOCAGATCGGTTGCTCAAGAAACAGATGTGAGG
CCGAGATTCGCTGCAATTTGCTGATTCGAATGAGAGAACTTGAAGGAGCTTGAATCCCTG
TGGTGTGATCAAGAAAGCAAAAGCAGCAATTTAAACACTTCTTGGAAAGCTTAAAGAGCT
AGAACAAAGCATGTTGAAAGGTCAGCTGAGCTCAAGTGTGCGAGAAATGACCCGAA
AATGATCAGTCTCTTGGGGTTTCCAGGCTGTGCTAAATAAIGTCACTTGTGCTACAA
GAAGATCTAATTTGGCTTTAAGTGGGGAAGAGGCTTGAAGCAAAAGTTGATGAGAT
TITTTICAGCAACAAGATACATTAAGCCCTAGAAACACTTCCGCGAGGTACGTCAGACAC
AAAGCTCAGAAAGTGAAGAAATCAAAATGGAACATAAAATCTGAAAGCAATATAAGGA
AGGAAATTTGCAAACTCTAGAGAAATGAACTTGAATGAAAGTGAAGCAATCTTCAA
ATGAGCAATAATCTCTTAAATAATGAAACTTGAACATGAAATTAAGGCTTGGATAGC
CGAAAGAGCAAAATGGAGAAAGATTAATAGTGAATGGAGAGAAATGGAAGAAAGGTTT
TTCAGGACATGATGCAACTAAATGACTTATATCAATCCACAGAACCCAGAAACAGTAAAG
GAGAAAGAAAGAAATTTGTAGCTCTCATGTTGAGCTCGAAACATAATTAAGAAAT
CTAGGCTTCTCAATCAGAAATAACAGACTGCTTTGAAAGGCTGCTTACAGCTGC
AACAGATCCGCTATCAAGAAATATCCGAGCTAGAGATCAATTAATCAGTCTTTGGCA
CACAGCTAGAATTTGATGCTTTGAGCGTGGACCTTCAAGTAAAAGACAGATTAATAAT
TTTCCAAACTTGTGAGAGAGAGACAAAGAGGGAAGCAAAAACCTCCCAACCACTGAT
GAATGACTTTGAGAAAGAGACTTGAACAAACAGATGATGATGAGATAAGAGAT
GAATAAACTGGACTGGGAGAAATAATGAGTTAAATCAGAAATCTCAAGTAAGAAGC
AGAAATGAGTGAATAATCTGAAAGTATGAAATACAGCAAGTGGAAAGGATCTTCCAGCAGG
ATTTCTGAACTGGACCGAGGCTCAATAAACTGAAAGCTGAGTTAAGCAAGCTGAGAA
AAACAGCAATGTAGAAACCTTAAATAATGAAAGTAAATAGTCTCAAAATGAAAAGCA
GACTGACAGCAGGACCTCGTAAACTTGCAGGAGATGGAGAGCTTAAACCATCATC
MACACACTCCCAAAATGGAGATGCTGACCAAGACAAAGCTGACAAAGATGAACAA
ATGAGAAATAATAATCTGAGCAGAGTATGAACTCACTGCTGCTGAGATTTTCC
AACAAACAGCTTGAAGACTGCTACATGATCAATCAAAAGAAATTAACAGCAG
GGACAGACTGCCAAATGAAACAAGAACTAGCTTCACTGAGCAGAAATAAATCATATA
AAATAATGAACTGAAAGAAAGGAGAGGAGTGTGCTGCTTACGAAAGACAGCTGTTT
GATGTTTGTGAGCCAGGATTTGAAAGTGAATTTAGCAGGCTTAAAGAGGAAATTTGA
AAATCATCAAAACAGCGAGCCTGCTGGCTGGAGCCACAGCAAGTTACTCCAGACT
TACTCAGTAAACAGCAAAACAGTCAATGTTGCCCTTGTGACAGAGTATTTTCAAG
CAGAGGCTGATTAACAAGAGCCTCAGTGAATTTGAGTCTAACTGGCATGCTGCTCAG
ATAAAGTCAAGTCAACAGATCAGAGCTAAAATAAGGAAAGGCGGCTGATGAAAT
GCTGGACTTGGCCCTTGGGCAAGCAATAATGATTTGAAAGGAGAAATTAACAG
AATTAAGAAACAACACTGCAAGATGCAATAGAGACTACAGCCGCTTAAAGACGCAATA
GAAAGCAAGAAACACTTGGTCAATAATGCTTGAAGAGAAAGTGGCAAGT

A

【 80A - 2】

ATGCCTGACAGATGTTACAAATTATGGAGAGTTCAGATGGAACTTAAAGATGTTGAAA
GAAAATTCACACAAACAGCAGCTAAGCTCAAGGAATAGACTTAGAATCGAACCTGTCGAA
CAAGTCAACCCAGGAGAAACAGGAAACAGCACAAAGTTAGACACAGTTCTAGTAAGAT
TGAATGAACTGTAAGCTTATACAGAGCCAGCAGGAACAGATCAACACTTAAAGAAAGTA
CAACAAATGAGCTAAATCTGCAAGAACTTCAATATCCACTAAATTTGCAAGCTGCTGAC
AACTGGAGGAGCAGACTGGGAAATTTCCACTGAAGTTCACTTCTTTGACAGAGAGATA
AAGGATGCTAAAGGACAGGTAAGCCCTTTGGAAACAACTATGGAAAAGTTCCAGCAAGA
AAAAGAACTAATCAACAAACAAAATAACAAGCAACAAATAGCACAGGATAAATGCT
AATGATATTAAGAGAAAGGTTAAAATA"TCAT"TGCTATATGAAAGACATGAGAAATCA
TATTCAGATGGGAAAGACGACTATAGAACAAAAGAAACTGAACCTAATAAAGATAA
TAGCTCAACTAAGTGAAATGCGAAGAAACAAAGAAAGATAAATGAAAGATAAGAGAT
CTTGAGACAGATAATTTATACACAGAGATACAAGAAAGGTTGGCTACAAGATAACCTTA
TATTAAGAAAAGAAATGAGGAACTAAAAGAAAGTTGAAAGAAAGGAAACAACTAT
GAAGGAAATGGTCAATATGGAGGTTTTCGAAA"TGAAAAGTGAACATCAGAAGTTGGAAG
AGAACATAGACAAATAAAAAGAAATCAATAATTTGGCATACGGCCAGACAAAAGTTAT
GAAGAAAGAAATTTATTTTACGAAAGAACTTGGAGAACCAAGAAATTTCCGAGATGCTGA
GGAAAAGTATAGAGAAATGATGATTTGATGAGCAACAGAACTTCTGAAACAGGATGCTG
TGCATATTTATTAAGACTCTTGACCAAGCAATATGAAATTTACACAGATGAAAGATGG
AAGAAATCAATAAAATTTACCTGACCTGTTGGGCAAGTACCTATCGTGGCAAGATATTT
GAATACATAGAAAATGCGCTGATGTCGCGATGAAATGATACAGCTTCTGATAAAGAGCC
GAATTAATACTACCGAGTGGTATGCTGAAGGGAGACAGCCTTGGATATGCGAGGAC
GATCGAGTGGTGGCAAAAGGATATAGCTCACTCATCTATTCGCTGGCCCTGGCTGAA
CGTTCTGCTCAACTGTGGCATATGCTTGGATGAGCCAAACAACTTGTGACCGAG
AAAACATGAACTCTTGGCAGTCTGCTGTTGAGATAAATAAAGTCCGCTACAGCAGCG
TAACTTCCAGCTTCTGGTAACTCATGATGAAAGATTTTGGAGCTTTTAGGAGCTTCT
TGAATAITGGGAGAAATTTACAGGATTAATAAAGAACTATGATCAGTCTCAGAGATTTG
TGAATGCAAGTGTAGCTTCCCTGGGATGAAATGTTCA"TA"AAAATAATCAAGAATTAATA
CCCATAGAAATGTTGGTCTGCAAGAAAGTATTAATAAGAACTTATTTCTCATCAACT
TAGTCAATAAGAAAATAATATTTCTTCAAGGAAAAAAAATAAAAA

A (continued)

【 80B】

MLIFSVDMPFAKMSILGVRSGIEDKDKQIITFFSPLTILVGPNGAGKTHIECLKYICTGDFPPG
TKNFTVHDPKVAQETDVRARQIRLQFRDNGVJELAVQSRMVTQKSKTEFKTLEGVITRTK
HGEKVSLSKCAIEDREMISSLGVSKAVLNVIFCHOEDSNWPLSEKALQKQFDEIFSATRYI
KALETLRQVRQTOGQKVEEYQMBLKYLQYKKEKAEIRDQITSKAEQLTSSKJEVKSYLEN
DPLKNRLKEIHNLSKIMKLDNEIKALDSRKKQMEKDNSELEKMEKVFQGTDEQLNDLYI
NHQRTVREKERKLVDRHRELEKLNESRLNQESELLVEQGRLOLQADRHOEHIRARDLSJ
QNLATQILFDGFERGPISEIRQIKNPHKLVRERQEGEAKTANQLMNDFAEKETLKQKQIDEIR
DKTGLGRHIEKSEILSKKQNELKNVYELQQLGEGSSDRILELQELKAEKRELSKAEKNSV
ETLKMVISLQNEKADLDRTELKRLDQEMEQLNHHTTTRITQMEMLTKDKADKDRQKRIKSR
HSDILTSLLYIPNKKLELWHLHSKSKENQIRJRLAKLNLKELASSEQKNHNHNLERKBE
QLSSYEDKLFVDCQSDFSDRLRLEIEKSKRQALCATAVVSQFTQLIDENQKQCPV
CQRVFOEAELEQAIIDLQSKRLRAPPDKLSTETLKKKRRDEMLGLAPMROSIIDKEKE
IPELRNKLQNVNRDQRLKNDIEQOETLGTIMPEESAKVCLTDVIMERFQMLKDVVERKI
AQOAAKLOGIDLRTVQVNOEKQEKQHLDTVSSKIELNRKIQDQEQEIOHLKSTNLELK
NKLQISTNLRQRQLEEQVSTELVSTEQSLYREIKDAKEQVSPLETLEKFOQEKELKKNKT
SNKIAQDKLNDIKKVKNIHGYMKDIENHIGQDKDDYMKQKTELKNIQVIAQLSECEKHKKEI
NEDMLMRQDIDTQKIQERWLDNLTLRKRNEELKEVEEKGQHLKEMQMVQVLMQKSE
HQLKENIDNKRNHNLALGRQKVEEIEIHFKEKELREPFQRFDAFFKYREMMIVMRTTELVN
KDLDIYKTLDQAIMKFSHSMMEIINKIRDLWRSTYRGQDIEYIEIRSDADENVSASDKRRN
YRFRVYMLKGDALDMRGRCSAGQKVLASLIRLALATFFCI.NCGHAI.DEPITN.DRENIES
LAHALVEIKSRQQKRNQLLVIHDEDFVELLGRSEYVEKPYRIKKNIDQCEIVKCSVSSLGF
NVH

【 82】

CGAGCCCGCCGACCCGAGCCACCCGAGCCGTCGCGAGTCCACGGCCGGCCGTCGGCC
GGCGCCTTAAAGAACAGGCAACCTTCCCTCTTCCCTCGGAGTCGGCCTCC
GGCGCCTCACTGCAAGCCCTTGGCTGCGCGGGAACCTTCGCGCGGACCAACCGAATCG
CTCTCGCAGCAGAGCCAACTGCCCACACTCGGATGCGCATAGAGCCCTGGCTAGAGA
CTGAGATTAATCCAACTAATCCCGGGCTCATCTGGATTAATAAAGAGGAGATGATCT
TCCAGATCCCAAGGAGCTTGCACAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCA
TTGTTCCGAGAGTGGCCATTTCCACAGCCGATCAACAAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCA
TCCCAAGCAGTGGAAAGCCAACTTTGCTGTCGCAATGAACTCCCTCCGCAAGATGAGAG
GGTGAAGAGCAGGAGCAGGAAAGCCGACCTTCCGAGTACCGGATGAGGATGCTTCC
CACCTCCACAGAACTAGAGAAAGAAAGAAAGTCCGAGTCCAGCCGATGAGTCCAA
GAGCAAGCCCAAGGAGGAACTGACTGACCACTGCGCAATGTCIGTACAGCAGCACT
TCAGCAGCTCCACTCGCTCATGACCAACAGCAGTACACAGTTCCAGGCTACATGCAAG
ACTTGGAGGTGGAGCAGCCCTGACTCAGCACTGCGCAATGTCIGTACAGCAGCACT
TCCCGGACTGGCACATCCAGTGGAAAGTGTGGCGGACAGCAGCAGTGTGATCTGACAAT
TCCAGGTGTACCCCTCCACTCCACTGAAAGCTACAACAGATGAGGATGAGGAAAGGG
AAATACCTGAGGACATCATGAACTTGGAGCAGTCCGAGTGGCAGCCAAACAAAGT
GGATGGAAAGGGTACTACTCAATGAACTTGGAGTCCAGCCACCTCTGTCTATGGAG
ACTTATGCTTAAAGAGAGAGCCAGAAATTGACAGCCAGGGGGGATAFTGGGTGAGT
CTACAGCGTCTGCTCAGAGCTGGAAGAACTGGATGCCACCTGCTGGAGCAGCCTCTGCT
ACCCAGIUCGTTGGCTCCCACTCCAGGCCATTCCTGTGACCCGTCGAGAGCCCTGTG
GCCCTCTTATCTCTAGGCAAGCAGGACCTGGCATAIGTGGATATGGTCAAGAGAA
GCTGGAATCTGTGGCCCTTCCCTGCGGAGATGAGGTTCTGAGACCAAGTATGACAGT
CAGGACTTGGACAGGATCACTGTCTGGCTTTTCTCTGAGCCCAAGCTGGCTGGAGAG
GTGCTGCTGTCACTGGCTTCCCTAGGGGAAACAGCAAGTACCCCAAGAAAGCATA
AGCCAAATCCAGGCTGGCTTGCATCGAAAGGAAATTCGACTAAATGAAATCTGTTCC
AAAGAACTACCCCTTTTCACTGAGCCCTGGGAGCTTCCAAAGCCAGTGAATGTGAA
GAAACTCCCTCTCTTCRCAMNSLPDIEVEKQDSRKNSSAVRYRMLPPLTKNQRKR
KSKSSRDAKSKAKRKSJGSSPDFTDSSLSST.PDDHSSYVPGYMODLEVEQLTQLSSE
AVSSTLPDWHIPVEVYVSDTSLYFNVSFPMPSSTEA"TTDFEFGKLPEDIMKLE"SEWQPI
NVDGKGYLLNEPQVPTSVYVDFSCKEEPEIDSPGGDGLSLQRVFDLKNMDATWLDLSLT
PVRLPSIQAIPCAP

A

MPHTRMRMRPWLQMSQNFJLWINKEMHFIQIPWKAIAKHGVNDINKDAFLFRSVAHIT
GRYKAGEKEPDKTWKSNFRCAAMNSLPDIEVEKQDSRKNSSAVRYRMLPPLTKNQRKR
KSKSSRDAKSKAKRKSJGSSPDFTDSSLSST.PDDHSSYVPGYMODLEVEQLTQLSSE
AVSSTLPDWHIPVEVYVSDTSLYFNVSFPMPSSTEA"TTDFEFGKLPEDIMKLE"SEWQPI
NVDGKGYLLNEPQVPTSVYVDFSCKEEPEIDSPGGDGLSLQRVFDLKNMDATWLDLSLT
PVRLPSIQAIPCAP

B

【 81】

ATGCCTTTCTTTGCCAAGGCCAACGCGAAGCCTTCAGAGCCATGAGGATGCTTCTG
A1TTGAGTTTGGTACGCTTGGAGCTGCTACGCTGTATGCCATCCCAAGAAAATCCCA
CAAGTGTGATTTGGTGAAGAGAGACCTTGGCTGCTTCTTACTCACTCAACTCTGCTGATG
CCAATGAGACTCTGAGGATTTCTGTTCTGTACATAAAAATCAACCAACTGCTGATGAA
AAATCTTCCAGGAAATGCGCACATGGAGAGTCAAACTGTGCAAGGGGGTACTGTGGAA
AGACTTTCAAAAACTGTCTTATAAAGAAATACATTTGACCGCCAAAATAAAGAGTGT
TGGAGAAAGAACGCGGAGATAAACCAATTCCTGACTACCTCAAGAGTTTCTGTG
TAATGAACACCGAGTGGATAATAGAAAGT"IGAGAC"IAAATGCTTTTTCAGGCCAAAG
ATTTTGGAGGAGAGGACATTTTACTGCAGTGAAGATACGGCCAAAGAAAGATCAGGC
CTTAATTTTCAATAATAATTAACITCAGAGGGAAAGTAAAATA"TTTCAGGCAACTGACAC
TTTGGCAAGCAATAAAATTTCTTAAAATAATATTTTCAAGATTCAGAATCATGAAGATTT
TTCTCCAGGCAAAATGATATCTTTTCTTAAATTAACITAACTCTGTAAGAAATGTCF
GTTAATTAATGATTTTATGAAATGGTTAAGAAATTTGTAATAATTAATTTAATGAT
TATGTTGTCTTAAATAAACAATAATGACCAACTCTT

A

MRMLLHL.SLLALGAAYVYVPIPEPTSAIVKEL.LALLSHR.LL.IANETLRIPVPHKHN
QLCTEEIFQIGTLESQTVQGGTVERI.FKNLSLKKYIDGGKXKCGEERRRVNQFDLYLQ
EFLGVMTNEWIEHS

B

【 83】

TACAGTCCGGCTCAGGCTCGGCTCGGCTCCAGCCCGGATGCCCAATTCGTGACCC
TGGCGGGCTTCCGCTTGGCTTCCGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGG
TACCAITTCACGGTCCATGCTGCGAGCAAGGCTGCAATGGCTGGCTTGGCTTGGCTTGG
ACCTGATCCAGGCCAATAAGTGGAGAGCAGAGGCTTGAAGCAGACTGGAGGACAG
AACCCGATCAAGGGCTGCCAGCATCACTCACTGCTGTTGAGAGGCTGAGGGGAG
GAGCTGGCCAGTGGCCCTGATGACAGCAAGCCCTCAGGCAACAGGATCCACATCGAT
CTGAGATCCAGGAGCCGAGCCAAACACAGCCAGCCGCTTCCGAGCCAGCTGAGG
CCGAGATGGCAGACCAAGCTGGATCTCAATATGAGCAACCCCTCGCTTCCAGT
CTTCAAAATGGCAGCAGCGAGCCCTCCCTGAGCCAGCCAGGATGAGCAAGCTGATGTC
TCCACCCCGCAGGCTGACCCAGCAGGCTCCCGCGGAGCCGCGGATGAGGATGAGG
ACCTTGGCTCGGAGGTGTACAGGATGCTGGGAGCCAGCCAGCCGCTTCCGCGGAG
CCCAAGCAGTACAGGCTCTTCCCTACTTGCAGGAGCATCTAGAGCCCGGAGGGGGG
GGAATGGCCCGGCTGTCGCGCCCTCCGAACTCAAGCCALUCCAGCAAGCTGGCGG
CTCCGCTGAGCCGCTTCCAGGCTGCGCCGAGTGCAGCCGCTGGCCGACCGGATCTGTG
CGCCACTCTCAAGCCAGCCGAGCAAGGCTTACTCTTCCGAGGAGGCTCTACTGTGA
CTGGGCTGAACTCAAGCAGCTGGTACTCTTCTCCGAGGAGGCTCTACTGTGA
GAGCCAGCCCAAGCCGCGGTAAGCCCGCCGAGGCTTCCAGCTGCTGGCGGTGATCC
CCAAAGTCAAGTGGAACTCTGCTGAGTGGGACCTTACTGCTGAGAACTAAGAGATGAGG
TCCCTGCTGGCCGGTGAATAATGTTTACCTCTGCTCCCTTATAAAGCTTCTTCTCC
ACCTTGAACCTGTCACCTGGCTGCCACCTCTGGGAGCCATGCAATGGCTCCGAGT
ACAGTACTATCTGTTAGTGGCCAGGCAIGTLCIAGGCTTGGTGGAGTGTGAGGAGG
ACGGTACCATGCTGCTGAAAGGGGCCACAGCCTGTTGGAAGGCAAGCTGAATCAC
AAGCGGCCAGCTTAGTAAACGAAAGTGGAGTGGATGCTGCTGGCGGCGGAGCA
CAGGAGGTATGACTGGTGGGTCAGGGAAGGCTTACTGCTGAGAACTAAGAGATGAGG
GAGGCACAACTTGCACCGGGGAACTGTGTGTGCAAAAGTGTAGCTGGGGCGAGAAA
GGCTCTGTGGCCCTTCCAGCTGCGCACTAGCCGCTTGGGGTGTGGTGGGGTGTGGCAG
CTCAGGAGCAGTCCCTGCTTGGAGAGGTTATGAGTGTGGAGATCACCGGGCCGCT
CGGGCCGCTGCACTTCTGTCCAGGTTTCTTCTGGCAATTTCTGTCCAGTTTCTTCCAC
CCACGAGCACTTATTTCTTCCGAGCCCTTCTTCCCTCTCTTCAAGCTTCTTCCAC
GGGGCCGCTTAAATTTCCAGACAGAGCCAGAAAGGAGTTTGAAGAAAGAAAGAAC
TGTGCCAGGGCAGCTTGGCCCTCCAGGCTGACCTCTGCTTCTTAAAGTCTTCCACCC
TCTCAGAGTCCGGCTTTCACCCCTCTCTCAGATCCGGCGTGTACTGCTGGTGTGT
TTGCTTGGGCTTTCATGCCCCGGTGCACACATCTGCTGTGTAATTTTGGCTTCACTC
CGAGGATGTGCTAGACTCCGGTGGCTGGATACCTCTAGT"TTACTGTCCGGG
AGAAAGAACTGACTCGTTTTA"ITTAGTGCTA"ITTAGGAGCCAGAGATAACTTCA"IT
GTGCTGTTTCAATTTGTGCTATCCGAAATCAAAAAGCTGTTA"ICAAITCACATTCA
TCAITCAGCACGAGACCAATTTCTTGTGCTCTGCGAGCTCAGGATAATTTGTTCTTTT
TCAITTTTGGCAGTCTGTAAGTAAAATGTCATATGGCTTGTGTTTAA

A

MPHSVTLRGPSPWFLVGRDRFSAPLTSRIVHAGSKAALALCPGLDQIANGESTELMHL
EAQRIRKGGHDLTSLVSRPEGRSWSAPDSSAQAHRHIDPEIDQDGPSTSRRSRPGTGP
DRPSLQSPYQPPRFPVPHNGSSEALPQMISLHVSPPSADPARLPSRDRCDRLDSEV
YRMI.REAPBPVAEKPQSGSFRYLQML.EAGGGGDDWPGGPRNLKPTASKLGPLSGLQ
LPECTCGHIGVTIVKARDKLYHPECFMCSDCGLNLKORGYFELDERLYCESHAKARVKPP
EYDVAAYVPAKVELV

B

【 8 4 A 】

AGGAAAGGCTAAAGTTCTGAGGAGTGTGGCTGACAGGCTGCTGCTTTGGCCACTGT
GGCTGTGACGCACTCTGACACCCGCGGCTGGCCAGCCCAAGCAAGCCCTGGGAGC
ATGTGAATGCAATCCAGAGCCGCGGCTGCTGAACTGAGTAGAGACACTGCTGCT
GAGATGAATGAAACAGTAGAAGCTCTGAGAAATGTTGACCTCCAGAGGCGGACCTG
CTACAGACCCGCTGAGCTGTACAGAGGCTCGGGGCGAGCTCCACCAAGCTCA
AGGGCCCTTGACCACTGATGGCCAGCCACTACAAGCAGCAGCTCCCTCCACCCGGGAA
ACTTCTGTGCAATCCAGACTATACCTTTTGAAGTTTCAAGAGAACCTGAAAGGACTTT
CTGCTGTGCACTCCCTTTGACTGCTGGGAGCCAGTCCAGGAGTGAAGCCGCGGAGATGAG
GCTGGCCACAGCCGGGAGCTGCTCTCTATGAAACAAGAGCTAGAACTCAGATGCTG
ATCTTGGAGGGACCAAGGGCTGGCCACAGCAATGGTGGAGTGGCTGGAGCTGGCTCT
GGCCACACTGACCTGATACAGGCAAGCTGGCAAGAAATGGGAAATTTTATCTGACAG
AAATCAGTAATTTTATATTTAIAITTTTAAATATTTATTTAATTTAATTTAAGTTC
ATAITTCATATTTAACAAGTGTTCACCGTAATAATTTAATTTAAAAATGCTTCTAC
TTA

【 8 4 B 】

MWLQSLLLGTVACSSIPARSPSPSTQPWHEVNIQEARLLNLSDTAEMNETVIEVSEM
FDLQEPFLQRLLELYKQGLRSLTKLQPLTMMASHYKQHPPTTSCAIQTTFESFKEN
LKDFLLVIPFDCEWEPVQE

【 8 5 】

CCCGGGTGTGGCCACTTGTCTGCTGCACATATAGGCGGGAGTGTGTGCCAATCTTT
CAGAGCCCAAGCAAGGACCAAGCAAGAGCAGAGTGGCTCTGCGATCCAAACATGAGC
CGCTCCCGCTCCCTGCTGCTGCTCAACTCTGCTGCTCCCGGACTCAAGCTCCATG
ACCCAGACAACTGCTGTAAGACAAGCTGGTGTAACTGCTCAACATGATGGAATTT
ATAACACACTTAAAGCAGCCACTTGGCTTTGCTGGACTTCAACAACCTCAATGGGGA
GACCAAGACATTTGATGGAATAAATACCTTCCAGAGCCAACTGGAGGCTTCAACAG
GGCTGTCAAGAGTTACAGAACGATCAGCAATTTAGAGGACTTCTAAAAATTTCTCTCG
ATGCTGCCCCGCGCCAGCCGACCCAGCCGACATCCAAATCCATAACAAGACGGTGT
ACTGGAAATGAAATCCGGAGAACTGACGTTCTATCTGAAAACCTTGAAGTGGCAG
GCTCAACAGACGACTTGAAGCTCGGACTTTTGGTCCAACTGCAAGCTGCTGCTGCTG
GGCTTCTCAACAGAGCTCGGGGACTCAAAAACAGCAGAACTTCTGAAACCTCTGG
GCTATCTCTCACACATTTCCAGGACAGAAAGCTTTCACCTTTCTGGCGGCTCAGATGA
ATGTTAATTAATCTAAATTTCTGAAATGTCAGGCTCCCTTTGGCTTGTGGCTGCTGCTG
TCAATTTTATCCAACTGACGACTATTTATTTGATGATGATGATTTATTTATTTATTTGCTG
GAGTGTGAACTGTATTTATTTGACAGAGGAGCCATGCTGCTGCTGCTGCTGCAAAAACCT
CAGAGTGGGGTGGGAGCAATGCTCAATTTGACTCGAGTTTAACTGGTCTGCTGAGGAT
GTGTGAGAAATAACTAGACTCTGAGCA

MSRLPVLILLQLLVRFLQAPMOTQTLKTSVWVNCNMDEIHTLQKPLPLLDFFNLNGED
QDILMENNLRPNLEAFNRVAVKSLQNASAFESLKNLPLCLPLATAAPTRIPHIHKDGDWNEFR
RKLTFYKLTENAAQQTTLSLAIF

【 8 7 】

GAAGAACCACCGGAAAGGAAACCACTCTCACTGTGTGTAACAACACTTCCAGCTGGCCG
TGGCTCTCTGGCCAGCCFICTGATTTCTGCAAGCTCTGTGTAAGAGTGCAGTTTGGCAA
GAGTGCIAAAGAAGCTTAGATGTCAGCAGCAATAAGACATACTCCAAACCTTCCACCCCAA
ATTTAACAAGAAGCTGAGAGTGTAGAGGTGGACCACTGCCCCAACACAGAAATTA
TTGTAALAGCTTCTGATTTGGAAGAGGCTCTGTCTGGACCCCAAGGAAACTGGGTGCA
AGGGTGTGGGAAAGTTTGAAGAGGGCTGAGAAATCAATAAAAATAATTTCTCTGCTG
GTATCCAAGAACTAGTGAAGTGGCAAGCTTCAAGCAAACTCACTTCAACACTTCA
TGATTTGTGGGCTGTTGTTAGGTTGGCAGATGCAATACAAGATTTCCGGTAAATTT
GAAATTCAGTAAACAAATGAAATGTTTTTCAATGTACCATGAAATTCAGAGAACTACTTA
TATGTAAGATTAATTTAATTTGAATCTACAAAACAAACAAATAATTTTAAATATAAGG
ATTTTCTAGATAITGGACGGGAGAAATAGCAAAATAGCAAAATTTGAGGCCAAGGGCCAA
GAGAATATCCGAATTTAAATTCAGGAAATTTGAATGGGTTTGCTAGAAATGTGATTTTGAA
GCATCAGATAAAAATGATGGGCAATAAATTTTCCCAATAAGTCAAATTTAGCTGGAAA
TCCTGGATTTTTTGTGTTAAATTTGGCAACCTTAGTCTGCTAGCCAGGATCCCAAGTCC
TTGTTCCACTGTGCTTGTGTTCTTCTTATTTCTAAGTGGAAAGATTTAGCCAGCATC
TTACCTCACAGTGTGTTGTGAGGACATGTGGAAAGCACTTTAAGTGTTTTCTATCAACA
TAAATTAATTTCAAGTGTAACTTAATTAACCTATTTAATTTATGATTTAATTTAAGCATCA
AAATTTGTGCAACAAATTTGGAAAATGAGAATGAACTATGATTTGAATAGTTATAAA
GATGTTAAGTAAATTTAATTTTATGATATTAATGATGTTTATGATATAAATTTCA
ATCAGGGTTTTAGATTAACAACAACAACAATGGGTACCCAGTTAAATTTCAATTCAG
ATATAACAACAATAATTTTATGATTAAGTACATATTTGTTATCTGAAATTTAAATGAA
CTAACAAATCCFAGTTTGAATCTCCAGCTTGTCAATTTGCCAGCTGTGTGGTAGTGTG
TTGAAATACGGAAATAAGAGTGAAGCAATTAACAACAGCCAAACCTCCACAGTCAATAT
AGTAAATTTCTGCTGGTTGAACTTGTGTTATTTGACAAATAGATTTCTTAATATTAAT
TAAATGACHTCATTTTTTAAATACAAAGGCTTATTTTTAACTTTAAGATGTGTTTTAATG
CTTCCAAATTTTTTACTGCTTCTGATTTGTAATGGAAATATAAAGTAAATATGAAACAT
TTAAAAATATAATTTGTGCAAGGATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATA
AAAA

MISKLAVALLAFLISAALCEGAVLPRSAKELRCQCIKTYKPFHPKIKELRVIESGPHCANT
EIVKLSDRGLCLDPKENVWVQRVVEKFLKRAENS

【 8 6 】

ACAAGGAGGCGAGCAAGACAGCAAGCCATAGAGACAACATAGAGCTAAGTAAAGCCAG
TGGAAATGAAAGAGTTCCTCAATCTACTGCTGTGGTGGGAGTTCCTGACGCTATC
CATTTGGATGGAGCTGCAAGGGGTGAGGACACCCAGCTGAACTTTCAGAAATATCA
GAAAACACTACTACGACTCAAAAAGATGTGAAACAGTGTAGGAGAAGGACAGTGG
TCCITGTTGTTAAAAAATCCGAGAAATGCAAGATTTCCCTGGATTTGGAGTTCAGGGGA
AGCTGGACTCCGCACTCTGGAGGTGATGGCCAGCCAGGTTGGAGTCTGCTGATGTTG
GTCACTTTCAGAACCTTTCCTGGCAATCCCGAAGTGGGAAAGAAACCCACTCATAGGA
TTGTGAATTAAGACAGATTTGCCAAAAGATCTGTTGATTTCTGCTGTTGAGAAAGCTC
TGAAGTCTGGGAAGAGGTGACTCCACTACATTTICACAGGCTGTAAGAGGACAGGCT
GATATAATGATCTCTTTGCAATGAGAAATGAGGACTTTTACCTTTTATGGAGCT
GGAAATGTTTTGGCCATGGCTATGCCCTGGCCAGGATTAATGGAGATGCCACTTT
GATGATGATGAACAATGCAACAAAGGATACAAACAGGACCAATTTATTTCTGCTGCTGCT
CATGAAAATGGCCACFCCCTGGGCTCTTTCACTCAGCCAACTGAAAGCTTTGATGTAC
CCACTTCACTCACTCAACAGACCTGACTGGTTCGGCTGCTCAAGATGATATAAAT
GGCAATCACTCCCTCTATGGACCTCCCTGACTCCCTGAGACCCCTTGTATCCCAAG
GCACTGCTCCCTCAGAACCTGGGACGCCAGCAACTGTGATCTGCTTTGCTTTGAT
GCTGTGACACTGTGAGGGGAGAAATCTGATCTTTAAAGACAGGCACTTTTGGCGCAA
ATCCCTCAGGAAGCTTGAACCTGAAATGCAATTTGATCTTCTGATTTGGCCATCTCTCT
TCAGCGGTGATGGCCATATGAAAGTACTGACAGAGGACTCGTTTTCTATTTTTAAAGGA
AATCAATCTGGCCATCAGAGGAAATGAGGACTGAGCTGATCCCAAGAGGCACTCA
CACCTAGTTCCTCCCAACCGTGGAGAAATGATGATGACGCACTTTCTGATAAGGAAA
GAACAAACATATTTCTTGTAGAGGCAAAATCTGGAGATTTGATGAGAAGAGAAAT
CCATGGAGCCAGGCTTTCCCAAGCAAAATGCTGAGGACTTTCCAGGATTTGACTCAAG
ATGATGCTGTTTTTGAAGAAATTTGGGTTCTTTTATTTCTTGGATTTTCAAGITGG
AGTTTGACCCAAATGCAAGAAAGTACACACACTTTGAAAGATTAACAGCTGGCTTAA
TGTGAAAGAGATATGAGAAGGCAAAATGGGCACTTTAAATGAAGTAAATAATTTCT
CACTAAGTCTCTGAAATGAAATGTTCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CACTCAAGGAACTTGGAGGTGAAATCTGATCTTTGGCGGATTTTTTATGTTATACAGG
GCATCAAAATGGGCTGCTGCTGACTGCTGCACTTTGACATAGAGTGAATTTCCCAAGA
GAAGGGAAAGCACTGCTGTTGCAACAGCAAGTGCATGATGCTGTAGACTATTTGCTT
TTAATAAAGACGATTTGCTGATGTTTT

MKSLPILL.LL.CVAVCSA.YPLDGAARGEDTSMNLVQKYLENYDLKDKVQFYVRRKDSGPV
YKIREMOKFLGLEVTGKLDSDTLEVMRPRCGVDVDFHRTTFRPIKWRKTHLTYRIVNYT
PDLPKDAVDSAVEKALKVWEVPLTSLRSLYEGEADIMHSLVREHSDYFPDGPNCVLAHA
YAPFGINGDAHFDDDEQWTKDITCTNLFLVAABHISGLIFHSANTELMEPLYHSLD.LD
TRFLRSODDINGIQLYGPDPSPETPLVPTPEPPGPTANCDPALSFDAVYTLRGLIIFKDR
HFWRKSLRKLPELHLISSFWPSLPSGVDAAYEVJTSKLDVFIKGNQFVAIRGNEVRAEYPRG
IHTLGPPTVYRVIDAASDKENKNTYFVDEKTVRDFEKRNSMPEGFPKQIADFPDIDSKIDA
VFEFFCFYFVTGSSQLEFDPNAKVVHTLKSNSWLNC

【 8 8 A - 1 】

CCCTCACTCCCTTTAGCCAGAACTGCTTTGAATACCAATTTGCTGTGGGCGGCTCGAG
GAAGAGAAGACACCCAGTGCCTCAGAACTGCTGGGTGAGACGGTGTAGGAGCCACCC
ATTCAGAGGCCACTGCTGCTCAGAAAGCAAGTGGAGATGATGCCAGGATGATGTTCTGTC
CTCGCCCTGGCTGGCACTTGTATCCAGCAATGGCTTCTCTGCTGGTGGAGCCAGA
AACCTGGGAGCCCTGCTGGAGACTTGGCCCTAAACCCACACAGAGGCTGGCAATGAAA
CCGACAGCTTTCAGACTCCGAGCCCTCAGCCCTTACCCCTGATTTCAATGCAAGGACTGAA
ATGCTGCGCTTTTATCAGGAGGTTGTTCTTCAATTTACTTATCAATGCAAGGACTGAA
TTCCTGAGGCAATTTAGCAGCTATAGCTTCTTTCAGTTCAGGCAATGCAAGGCTGCTG
TTTATCCAGGTGTGAAATCCAGACAAATGAAAGTGGGATATCAGAGCCCTAAGCCACT
TCTCICACCTTAAATTTGACAGGAAACCCCACTCAGAGTTTACGCTGGGAGCTTTTCTG
GACTACAAGTTTACAGAAAGCTGGTGGCTGGAGACAAATCTAGCACTCTCAGAGAAC
TTCCCAATGGACACTCACAACCTTTGAAAGAACTTAAATGGGCTCAGCAACTCTAATCCAA
TCTTTCAATTTACTGAGTATTTTCTAATCTGACCAATCTAGGACACTTGGACCTTTCCA
GCAACAAGATTTCAAGTATTTATTTGACAGACTTACGCTTCTACTAATTTGACCTTAC
TCAATCTCTCTTAGACCTGCTGCTGACCCCTAAGACTTATCCAAACAGGTTGCAATTTAA
AGAATTTAGCTTCTAAGCTGACTTTAAGAAATAATTTGATAGTTTAAATTTGAAATGAA
AACPTGATTTCAAGGTTGGCTGTTTAAAGGCACTGTTTGGTCTGCTGGAGATTTAG
AAATGAGGAAACTGGAAAGTTGACAAATCTGCTCTAGAGGACTGTGCAATTTGAA
CCATTTGAAAGATTTCCGATAGCACTACTAGACTACTAGGCTGATTTAATGACTTAT
TAAATTTGTGAAATGCTTCTTCAATTTCCCTGGTGGTGTGACTTATGAAAGGGTAAAG
GACTTTTCTTATAATTTCCGATGGCAATATGAAATAGTTAGTAACTTAAATTTGGACAGT
TCCCACTTGAACCTCAACTCTCTCAAAAAGGCTTACTTTCACTTCCAAAGAGGTTGGA
ATGCTTTTTTCAAGAAATGATCTCAAGGCTTGAATTTTCTAGATGAAATTTGGCTT
GAGTTTCAAGGTTGCTTCTCAAAAGTATTTGGGCAACACCCGCTAAGATTTAAG
TCTGAGCTCAAATGGTGTATTTACCATGACTTCAAACTTTGGGCTTAGAACCACTAGA
ACACTGCTGATTTCCAGCAATTTCAATTTGAAACAAATGAGTGTGCTTCAATTTCTATC
ACTCAGAAACCTCAATTTACTTGGACTTTTCACTACTACACAGAGGCTTCTCAATGGC
ATCTTCAAAATGGCTTGGCTGCTGCAAGTCTTGAAGTCTTGAAGATTTGGCTTCCAGGAA
ACCTTCTTCCAGATACTTTCACAGAGCTCAAGAACTTGGACTTCTGAGCTTCTGCTG

MISKLAVALLAFLISAALCEGAVLPRSAKELRCQCIKTYKPFHPKIKELRVIESGPHCANT
EIVKLSDRGLCLDPKENVWVQRVVEKFLKRAENS

【 88A - 2 】

AACTGGAGCAGTGTCTCCAAACGACATTAACACTCTCCAGCTTTCAGGCTAAATA
TGAGCCACAACAACCTCTTTCATTTGGAAACGTTTCCCTTATAAGCTGTGAACTCCCTCCA
GGTTCTTGATACAGCTTCAATACACATAAATGACCTTCCAAAACAGCAACTACAGCAITTT
TCCAAGTAGCTAGCTTCTTAAATCTTACTCAGAATGACTTTGGCTTGACTTGTGAACAC
CAGAGTTTCTCGAATGGATCAAGGACAGAGGACGCTTTGGTGGAAAGTTGAACGAAT
GGAATGTGCAACACTTTCAGATAAGCAGGCGATGCTCTGCTGAGTTTGAATAATCACTG
TCAGATGAAATAAGCACTATTGTGTGTGCTGCTCAGTGTGCTTGTAGATATCTGTGT
AGCAGTTCTGGCTATAAGTTCTATTTTCACTCATGCTCTTCTGCTGGCTGCATAAAGAT
GTAAGAGGTGAAACATCTATGATGCCCTTTGTTATCTACTCAAGCCAGGATGAGGACTGG
GTAAGGAATGAGCTAGTAAAGAAATTTAGAAGAAGGGGTGCTCCATTTCACTCTGCTT
CACTACAGAGACTTTATCCGGTGTGGCCATTTGCTGCCAATCATCATCAAGAGGTTTC
CATAAAAGCCGAAAGGTTGATTTGTGGTGTGCTCCAGCACTTCACTCAGAGCCGCTGGT
ATCTTTGAAATGAGATTTGCTCAGAGCTGGCAGTTTCTGAGCAGTCTGTGGTATCATC
TTCATTTGCTCAGAAAGGTTGGAGAAAGCCTGCTCAGGAGCAGAGTTGAGACTGTACCG
CCTTCTCAGCAGGAAACACTTACCTGGAAGTGGGAGGACAGTGTCTGGGGCCGACATCTT
CTGGAGCAGTCAAGAAAGGCCCTGCTGATTTGTTAAATCAATGGAATCCAGAAAGGACAG
TGGGTACAGGATGCAATTTGGCAGGAGGCAACATCTATCTGGAAGGAGGAAAAATAAAACC
TCTGAGGCAATTTCTGCCCAGCTGGGTCACACACTTTGTCAGTTAATAAGTATTAATG
CTGCCAGATGTGAGCTTATGCTAAGGTGAGATAATCCATGCTGCACTAGATAATGCA
GGCTGCTAATCTCAAGGAACTTCCAGTCCAGAGGGAATAAATGCTAGACTTAAATACAG
AGCTTCTCAGGTGGCATTTCACCAACTCAGTCAAGGAACCCATGACAAAGAAGTCA
TTTCAACTCTTACCTCAAGTGAATAAAGACAGAGAAACAGAAAGAGACATTTGTT
CTTTTCTGAGCTTTTGAATGAAATTTGATTTGATTTAGCCATCATAAAACCATTTG
GTAGTTTGTAGTGAAGCTGGGTGTTCACTTTTCTTTTGTGATGAAATCAAAATTTAAATCT
ACTTGATGACTGCAATGTCAAGGGGCTCCTGATGCAAGATGCCCTTCCATTTTAACT
TGCTCCTTACAGAGGTTAAAGTCTAGTGCTAATTTCTAAGGAAACCTGATTTAAACAT
GCTCACAACCACTCTTGGCACTTTCGAGCATTTTCTAATTTTAACTAATCAACCCCTGATA
TATTTTTTATTTTATATAACGAGTTTCAATTTTTCAGCTTTCGCTATAAGCTAATATCA
AAATAAGGTTGTTTAAAGCCTGCTTCAAAATATCCATATAACCACTAATTTTCAAGGAAG
TATGGAAGAAGTACACTCTGCTACTTTGCTACTGATGCTTCCAAAGGTTATGCTCTACTA
ACTAATGACTCTCATGAAAGCAGCAATGAAATAATTTGTTTAAAGGGGCACTTTTAA
ACGGAAAGAAAATTTCCGCTTCTGTCTTATCATGGACAATTTGGCTAGAGGCAGGA
AGGAATGGGATGACCTCAGGAGCTCACCTTTTCTGATTTCCAGAAACATATGGCTGAT
AAACCCGGGGTACCTCATGAAATGAGTTGAGCAGAAAGTTTATTTTTCAGAAACAGT
GATGTTGATGAGACCTGCAATCTTTTAGGGAGACACAGATGGCTGGGATCCCTCCCT
GTACCTTCTCACTGCCAGGAGAACTA

A (continued)

【 88B 】

MELNFKYKIPDNLPPSTKLNLDLSPNPLKHLGYSYFSPFPLQVLDLRSCEIQTIEDGAYQSLHLS
LTLITGNPQSI-AI-GAPFSLSSQLKLVAVTEINLASLNFPIGHLKTLKELNVAHNLIQSLFLEPY
FNLNLEHLDLSSNKJOSYCTDLRVLHQMPLLNLS-DL-SLNPMMFIQOPGAFKIRLHKLTLR
NFDLSLNMWKTCKGLAGLEPHRLVLGEPHNEGNLEKFDKLBOLCNLTIEEFLAYI.DDY
LDDHIDLNCLTNVSSFLVSYTIERVKKDCSSYFNFGWHLELVNCKFQFPFLKLSKRLTFTS
NKGGMFSEVDLPSLEFLDLRNLNLSLQVLSNMSHNFSSLDTPPKCLNSLQVLDY
LEHLDFQHSNLKOMSEFVFLSLRNLVYLDISHHTIRVAFNFIJNGLSSEVLKMAHNSFQENY
LPIDFTELRLNLFLLDQQLQLPFLAFNLSLQVLSNMSHNFSSLDTPPKCLNSLQVLDY
SLNHIMTSKKQELQHFSSLFLNLTQNDFACTCEHQSLQVFLWKDORQLLVEVERMECATS
DKQMPVLSLNTICQMNKTIHGVSVLVSVVVAVLYVYFHLMLLGGCIKYGRGENIYD
QFVIVYSQDEDWVRNELVKNLEGGVPPFQLCLHYDRFIPGVAJAA-NIIEGHFKSRKVIYVVS
QHFIQSRWCFIYEIAQIWFQSSRAGIIFVLQVKEKTLRQQVELYRLLSRNTYLEWEDSVL
GRHIFWRRLKALLDGRSWNPFVGTGCVNQWETS

B

【 91 】

CCGGGTGACTACTACTACTAAAATCCGGCCCGGTCGACCCGCCCTTGGCTTCCG
ACTGATGGTGGGTGGATGAGTAAATGCAATCCAGGAAGCCGAGGCTTGGTTTCCGCA
CCCGCTGCCACCCCGCCCTTAGCGTGGACATTTACTCTTACGGCTCAGGCCCTGCCCG
CATCGCCGAGATCCAGCCGCCAGAGAGACACAGAGAAACCAACCAAGCCCGCTTTGA
GCCCTGGCTTCTGGCACTCTGTGTGTGTGTGTGATAGCCCCAGCAGGGCTTGCAC
CTGTGTCCACCCAGCCAGAGCGGCTTCTGCAATTCGCACTGCTGATCAGGGCCAA
GTYGTGGGACACCAAGCTCAACAGACCCTTATACCAAGCTTATGAGATCAAGA
TGACCAAGATGATAAGGCTTCAAGCTTAGGGATGCGCGTGAATCCGGTGTGGT
ACACCCCGCCATGGAGAGTGTCTGGCAATACTTCCAGAGGTCCACAAACCCAGCAG
GATTTCTCAATGCTGGAAACATGCAAGATGGAATCTTGCATCTCACTACTGCAAGTTT
GTGGCTCCCTTGAACAGCCITGAGCTTACCTCAGCCCGGGGCTTCAACAGCACTTACT
GTGGCTGTGAGGAATGCAAGTGTTCCTCTGTTTATCCATCCCTGCAAACTCGAGAGT
GGCACTATTGCTTGTGGACCGCAGCTCCTCAAGGCTGTGAAGAGGCTTCCAGTCC
CGTCACTTGGCTGCTTCCGGGAGCCAGGGCTGTGCACTGCGAGTCCCTGGCTCC
CAGATAGCCTGAACTCCCTGCCGAGTGGAGACTGAAAGCTGCAAGTGTCCACCTGTTC
CCACTCCATCTTTCTCCGGCAAAATAAAGAGTTACCAACCCAGCA

A

MAPPEPLASGILLLLWLIAPSRACCTPPHPHAFNCNSDLVIRAKFVGTPEVNTQTLVRYEIK
MTKMYKGFQALGDAADRIVFVTPAMESYCFYHRSNHRSEFLIAGKLDGLHITTCFSVA
PWNSL.SI.AQRRTGFTYTVGCCCECTFVPCLSIFCKLQSGTHCLWTDQLLQSGEKGQSRHLA
CLPREPGLCTWQSLRSQIA

【 89 】

FAGTTCICCTGAGTGAAGCTTGCCTGCTTCTCTGGCCCTTGGCTGTCTCTGTCTCCAG
CATGGTGTGTCTGAAGCTTCCCTGGAGCTTCCCTGCAATGACAGCCCTGACAGTGAACCTGAT
GGCTGTGAGCTTCCCACTGCTTGGCTGGGGAGCACCAGCCAGCTTCTTGTGGCACT
TAACTTTGAAATGCTATTTCTAATGGGACGGAGCGGTGCTGTCTGGTGAAGATGCAAT
CTATAACCAAGAGGAGTCCGTGCCCTTCCAGCAGCCAGCTGGGGAGTCCGGGGGTGA
CGGAGCTTGGGGCGGCTGATGCGGAGTCTGGAACAGCCAGCAAGGACCTTCCGGAGCAG
AGCCGGCCCGGTGGACACTTGCAGACACAACCTACCGGGTGGTGTAGAGCTTCAAG
AGTGAAGCCGGGAGTIGAGCCTAAGGTGACTGTATCTCTCAAGACCCAGCCCTGACT
AGCACCACAACCTTCTGCTGCTGTGAGTGGTTTCTATCCAGCCAGCATTGAAGTCA
GGTGTTCGGAAAGCCCGAGGAAAGAGAGGAGTGGGGTGGTCCACAGCCCTGATCCAG
AATGGAGATTTGGACCTTCCAGACCTTGGTGAAGTGGTGAACAGTTCCTGGAGTGGAGA
GGTTTACACTTCCAAAGTGGAGACCAAAAGTGTGACAGAGCCCTTCCACAGTGAATGGA
GAGCAGCTCTGAAITGTCACAGAGCAAGATGCTGAGTGAAGTCCGGGGCTTGTGCTGT
GGCTGCTTCTTTCGGGGCCGGCTGTCTACTACTGAGGAATCAGAACACCATTAAGAAAG
CTTCTGCCAGCTTTCAGAAATGAAAGCTTTCTGCTTGGCACTTATTTCCAAACAAAG
GAGGGCTTTCTCAGGACTGGTGTCTACTCTGCTGCGCAACAGCAAAATGCTCTCTT
GTGGCTTCTCAGCTTCCCTTGGCTGAGTCCGCAAGTGTGATGACAGCTTCCCTCCTC
TTCACCTTTTGTCTCCCTTGGCTAAAGCTGATAGAGTCCGCTCCGCTGCACTGTACTCAC
TGTACGAAACACATTAACATTTAAATGTTTCTCAAGATGGAGTT

A

MYVCLPFGSCMTALTVTLMLVLSPLALAGDRPRFLWQLKPECHFFNTERVRLLECIYNI
QFESVRFDSVDVEYRAVTELRPDAEYWNYSQKLDLQORRAAVDTYGRHNYGVGESFTVQR
RVFVKYTVYPSKTOPLQHIINLLVCSVSGFYPGSIEVWFRNQGEEKAGVYVSTGLIQNDWTF
QTLMLLETVPBSGVEYTCQVEHPSVPLTVEWRKRSSESQSKMLSGVGFVLGLLFLGAGL
VYFRNKQHSLOQPTGFLS

B

【 90 】

ACGTCACTGTCTTGAAGCAGCAGTACCTGGGAAAGTGGAGGAGGAGAAATGAGAGGCA
GGAAAGGGNGCTGGAGACACAGCTGAGCCGTGAAATGAGAGTGGCCATGCCGTGGTCA
CATGACTCTTCCGGCTGGTCCACCAATTTGCTACTGTTGGCTTATTTAGCAGGG
TCTCTGCTAGGCTGACCTTGGGTGGCCGAGCCCTGCTGCTTGTGAGCTATCATCCA
ACCACTTCAAGCTTGGGTGCCAGCTGGGGGGCTGGTGGGGCTGGCTGGGAGCC
TCTCAGACTTGGTGGCCAGCTTCAACAGTTCAGGCAACCAACCTGCTGGTGTCTG
CAGTGTGTGGCTGTGTGACTACTTCTGGAGGGCTGGCACTGGGGAGTTGGCTGG
GCCAAAGCTCTGCAGACTTCCAGCTTGGCTTCTCTGCTGATATAGCTGGGTCTTACT
GGGATCTGGCCAGCTTGGGGGGCTTGGAGCCCTGGCCAGTGGAAAGCTCGTGGCTG
AGCAACATGGAGCCAGCCTAATGGGGTCTTCTGCTGCTTCCAGATGATAAAGGAA
ACATACTCCCTCCCTGGGAGCAGAGGCTCAATGGAGGGAGGAGCAACATGGGAGCA
GTGAAATAAATGGATTAATAACTG

A

MLVHCYGLLLTGLLGLTLGAGALLASEPIYQPPSAWYPAGGLVGLALLGALLFLWRPFFT
VLGTLGLSVAFLVACVDFLEGLALSGWLQRLQLPALPSLC

B

【 92 】

GCCCGCCCGCCCGCTTCTTCCGACAGCTGCCGGGGTGGCCCTGCAAGCTTCCCG
GGCTCTGCCCCGTGTGCCCCGGGGTGTGCTGCCCCGCAAGCCGCGCAATGCAACCCA
GCAGATAGACTTCCAGCCCGCCGGGGCTTGGGGCTTCCCGCTGGTGGCCGCAAGGACT
TCCAGCAGCTTCCGCAATTTCCGGGTACTCTGGAAGCAAGCCGGCTTACTGCTAATT
TATGATGGAGATGTAATACAGCCATTTGATGGGAAATACTAGCAATAITGACAC
TTGGAAGCTCAGAAAGAAATCAAGGCTGACAGACAAGTACTACTCTACTGTAGCCAG
ATCTGAACATAAAGTCTGGTCTCTTCTGTTGACCGGAGGAAAGGCGTCACTCATACA
AGTGAATTTAGCCCTTCAACCCAGGAGGCTGCTGACATAGGAAGCCGCCAACCGA
AGTGCATGCCCTTACCGCTTCCGCTGCTCAGCAGCTACTGGAGGCTCATCAGAAAC
CACTACAACACCCAGCTGGCTTACTCTTCTGAAAATAICTCAACTTCAAGATGCC
CTGAGTCAAAAGACTGTGCCAGCCGGGGTGGAGCGCAAGCAGAGCCCTTAGACATGC
TACGCTCAACAGCAGCTTGTACTGACAAAGAAATGCAAGTTTCAAGATGCTCAGGA
GAAACAGGAGTTAATGAGCCCGGAAACAGCTCCAGCTTCTTGGTTTGGAGGAAAT
CTTGGAGTCTGAAGAAAGAGGGATCCCAACAAGCCCTCAGGATTCAGAAAGTGTAAAG
CTCTGTACTAAAGTGGCTGCTGATTTGAAATGCTCAGAAAGTTCCTATGTTGACA
AATGTGGCACTGGATTTGTTGGTGTGTTGTGAGAGCTGGCGACCGTCAACCCACCCCTG
AGTGTATGTGTGCACTGCTGTGGCAACACTGTAACAACAGAAAGGCCATTTCTTGTGG
AGCAICAAATCTACTGTGAGAAAGCATECCCGGAGGAGGCAACACCCAGGAGGTTAT
GAAGTGGTCACTGTGTTCCCAAGIAGGAGCAGCAATCTGACCACTGTCTCCAGCAGCG
CTGTGCTGAGGCTTCTTCTCAGTGTCTGGCCCTCTCTCTCAAGATTTCTCTGCTA
CTTTGGTTTCCCTGCTGTGAAACATTTAGGCTCCCTCCCTGCTTGGTAAATGACTC
ACACAGCTGTGGATGCGCCGCTTTTACAATAAGCAAAACTGTTTGTTCAGTGTGAC
CTTGTGACCAACACTGTGCTCCCTACCCCGCCAGCTTCTTCTGCTGATTTGCAATGAC
CCAAATTTGAACCAATAAATAAAGCTGTCTGACACTGATTTTGTATTCATATAA
ATGATAGACTACAAAAA

A

MTTQIDLQGPWPWFRLVGGKDFEQPLAISRVTPGSKAALANLCIDVITAIDGENTSNMTH
LEAQRNKGCTDNLTLVARSEIKVWSPVTEBGRKHPYKMNLIASEPQVLEHIGSAHNSA
MPFTASPASSTTARVITNOYNNPAGLYSSEINSNFNALLESKATAAGVEANRSLDHAQPPSL
VIDKESEYKMLQEQELNEPPKOSTSFLVLEILESEKGDPNKPSGFRSVKAPVTYKVAASI
GNAQKLPMDCKGTVGVFVFLKDRHRHPECYVCTDGTNLKQKHFFVEDQIYCEKHA
RERVTPPEYEVVTVFVK

B

【 図 9 3 】

1 cacagagccc gggceggg cactctcg ccagctctc cgetctctc aegcegeca
 61 gacccectg ctgagcccn lggceggc lgcctctc gcegeccca gcaateccc
 121 gctctgga gggcaegc lgcctctg cclggtggc gggceggc gggcagag
 181 aggtctggt gccacga lggctgca gggctgac acccgagg gaattcaac
 241 caagacac caaagtgga acggaaglc cccgagcc oactgccc aaactcaggt
 301 catagcca ctcagtagt ggggaagc lgcctctc cctgctctc ccaagttaa
 361 gaaatctc gaaagtagt ggaagtagt caatctca ctcgagag gaaagtagt
 421 gctctctgt gctctctc gaagagcc cgcctctt agaacagaa gaaagtagt
 481 agacacagct gcaagagcca cclggtgtt gcaatggt ttgagctc gctagagaa
 541 agctctctt tttattt atcaatgt ttgaagat clatgtat attagggt
 601 ttaantatt aaggtatga ttaactac ctgcaactg tctattala tcaatctt
 661 ttuaatgt aaccceaggt lgttcaact tggctctt ttaattga aggtagaag
 721 tttcaatgt tttccagc atattgata tatttttag gaccgcca caigccagc
 781 actgtatgt aggtctggt atcaagcaa atgccaagt agatctgtt gaagccaggt
 841 gaaatgagt gcaactgtt ttgtaact ttatgtag ttgactgt tattatga
 901 gaaatgca caggtgtgt tcaacatc tcatgtga actatgaa ctuaaagt
 961 caaatctc ctgtgact ttatgctt ctatgagc ataatgctt gttatggt
 1021 agttctagc tgtctctc ttgacaaa gggctctat tattgtgt tcaatgaa
 1081 atataantt aaagcaactc tgc

A

MARAALSAAPNPRLLRVALLLLLLVAAGRRAGASVATELR.CQCLQLQGIHPKNIQSVNV
 KSPGPHCAQTEVIATLKNRGRKACLNPAHPVHKIKELMLNSDKSN

B

【 図 9 4 】

TGCAATFAAGGAGTGGGTCTAAGTGTGATCTGTTTTTCCCTTCTGAGCAATGGA
 GCTTACCATTTTATCCIGAGACTGGCCATTTACATCTCGACATTTCCCTTGTACCTGCTG
 AACTTCTGGGCTTGGGAGCTGGATATGCAAAAAATGGTTCCCTACTCTGTTGAGG
 TTACTGTGATATACAAAGCAAGATGGCAAGCAAGAGCCGGAGCTTCTAGTAACTT
 GCAGGAGTTGGGGCCCTCCGGAAACTTCCCTGTTGGAAGTGGCTGTGGCACGG
 GGCCCACTTCAAGTTTACCCACTGGTGGAGGGTGACCTGTATGACCCCAACCCCA
 ACTTTGAGAAAGTTTTGATCAAGAGCATTTGAGAGAACCCGACCTCAGTTTGGAGCT
 TTGTGTAGCTGCGGGGAGAACATGCCACAGGTGGCTGATGCTCTGTGGATGTTGGT
 GTGTGCACCTGGTGTCTGTCTGTGAAGAACCAGGAGCCGATTTCCGGGAGGTGTGC
 AGAGTGTGAGACCCGGAGGGGCTTTCTATTTCAAGGACATTTGGCAGCTGAGTGTCCG
 ACTTGGAAITACTTCTGGCAACAAGCTCTGGATCTGGCTGGACCTTCTTTTATGGGT
 GCACCTTACCAGAGAGAGCTGGAAGGCCCTGGAGGGGCGACCTTCTTAAGCTGAAG
 CTGCATCAATCCAGCCCACTGTCTGGAGTGGTGGUUCUICATATCTATGGATAT
 GCTGTGAAATAGTGTGAGCTGGCATTAGAGCTGAAATGGCTCAAAGAAATTTAAGCTT
 CAGTTTTACATTTAAATTTGCTAAGTGGGAGAGAGAAACCTTTTTTTGGGGGGCTTT
 TTTTGGTTTTGTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCAGGAAATCTTGAACCGAAGCC
 GAAGTTGACGTGAACCGAGATCATGCCATTGTACTTACCTGGTGAAGAGCAAG
 ACTCCCTTCAAAAAAAG
 TCACTGTGTGCTAGGCCGGTCTGAACCTCTGGGCTCAAGTGAITTCACCACTTGACCT
 TCCTAAATTTGGGATTAACAGGTGTGAGACAGTGCACCTGGCCCAAAATAGCTCAAGT
 CTGAAAAAACAATCTGAATCTATTTGTATTTTAGCTGCTGCTGGCTTCCAGAAAT
 AACATCAAGGTTGCCACCTAGTCTGCCAGCTTTATGCTTTTATCCAGTATTTCA
 CCAAAGTTGTTTCTGCAATCCAGTCTCAAGTCTTAAGATAAAGATGTACTTGAAG
 TTAGTATATCCATAAAACTATTTGAGGTGTTAAGTTCTTGGGTTCAATTTCCITAAAT
 CTTTGTGATAATTTGAGTGTGTAGCAATGAAAAGTACTATAATAGGAAAAACCTTGA
 AATAATAGGATGCTAGTGAAGGCCCTAACAATCAAGCAATCTGTGATCTGTAAA
 GAAATAAATAATTTTTGGATTAICTTATCTAATTCACCCCTGTGGAAGATGATTTCT
 GTCTTTGCAACTATGGAAGCTGTGAAAATCATCAACAGTGCCTGAAAGCGAGTGT
 AGGTGGTGTAGAGGGTTAATAATTTTCTGCAAATGTTTGTAGGAATTTAATAAATGTAG
 TATAATTTGTAGATGATTTGTGAAAAGTACTATTTAATAATCAAAATCAACCAATAAT
 CACATTTGTGTTAGGACAAAA

A

MELTIFILRLAIYITFPLIYLLNFLGLWSWICKWFFPYFLVRFVYVNEQMSKRELFSNLQF
 FAPSGKLSLLEVGCGTGANFKYPPGCRVCTIDPNPFKFLIKSIAENRHLQFERFVVAAGE
 NMHFGVADGSDVYVCTLVLSKVNQRILREVCRVLRPGGFYFMEHVAECSTWNYFQW
 QVLDPAWHLLFDGCNLTRESWKAIFRASFSLKLOHQIAPLSWELVRPHIYGAVK

B

【 図 9 5 A - 1 】

GTCCTCTGCTATCAGGTAATGCCAAGCTCAACCCCTGGACCAGTCAACCCCGATCAGACT
 TTGCTTGCCTGATTTATGGCCAGGTCAGACATCAAGAGAGAGGCCAGATCTTGTTCCT
 CCCCCCGCAGGGCTTCCCTTCTTGTGCAATGATCCCTAGAGCTTGGCTCTTCTCT
 TCTTGGGTGAGAAACTGTCAAGAACAAGTTTATTTCCATGCATGCCATCTGGGCTGGCA
 CTGATCTGCTTTTTCCCCCTCTCCCAAGTTTGGGACACCTGGGTCCAACTTCCCAAG
 GAATATGGGGATGGGGTGGAGATGAAGTTTGTCTAGACTGAAGGTAGTGGGT
 GGAAGTACATGAGGGAAAGGGCTAAAATGGTACTAAATGGTGTAAAGGATAGGTTGAAAT
 ATTAAGAGGAAAAAGACTTAGGCCAGGTCTCTCTTAGCCATGTGGCTTTCCCAAGGCAAG
 AGGGTGGCCCTGCTACTCCAGGGGGCCACGAGAGACTGACTTITGATTCCTTACCCGAGA
 GACCAAGTAAACATTAAGCTCTCTTCTTATGTGAGCCITACACACTGGCCACCCCTGTA
 CCCCCCAAGGCAAGGTGGGTAGGAGGGGGTGTGATGTCAATCTACCTCTTATGTGA
 CGTGGCCCTCGATCCACTGGACACTGGAGGCTAAGCTGGATTCCTCTTCTCTGACT
 CAGGAAGTGCCTAACGTCACAGCAAGGCTAAATAGGGAGCTGAGGCCACAGTCTCTCA
 TGAATGTTGGGGAGAATAGGAGCGACAACCTGAGCCCTAAGCTATTTCCCTTACCAA
 TGAIGGGTCCCAAGTGAATCAGCTGCTGGCCGCTTCTGTGTGGTGGCTTGGCT
 GGGTAGGGGCTCAGTCCCAACCTGGGCCCTGCTGAGCAGGAGCAAGAACCTTACCTG
 GCCACCTGTTTTGGCTGTACGGCCGAGAATGGGACCTGACTGCAGGGGGCTTGGGGC
 GCTTCTCCACAGCTGGGGCTAGGCCAGTTCAGGGGCTTCCCTGGGACAGCATGGCC
 CTCTGACTGGACGGGCTGATCCECCAGCTGCAGACAATTCACACACAGGCCACAGAAC
 CCTGAGCTGAGTGTGGAATGCTGGGAGGGATGCTCTTGGTTCCTCAGGGTGGGGTGA
 CCTGGAAGACTCAAAGCCCTTCACTACCTACCTGGGGCCAGCCCTGGGCTTGGACT
 CTTCAACAGCTTCTGTGTGACCACTCAATTTGGCTGACCACTGAAATGAGGATTTCTI
 GAACGGCTCCAGCTGCTGTGATCAATTTTGGCTTGAAGCCCTGCTCTCTTACCTCTG
 GCTTGTCTGTGCTGTGCCACCTTGTCTTATCAGATTCGACAGCCGCTCTGCTATGGC
 GCTCGGGCCCTGCACCCCAAGGGGATCTACTATCTGCTCTGCTTCAAGTGGCCTGGCA
 GTCTGTGTCTGAGCTCTCTTCTCCCTATCTCTGCTGCTGCTGCGCTCTGTGGACCTC
 GCTACTACGGCCCTTCTGCTGGCTTCTTGGGGCCCTGGCGGTGGCACTCTTTGTGGG
 ATGCACTGCTACTTCTGCTACCGCATGCAAAAGAGGGCCGACAGCAGGACCTTGGCGGA
 CTACCAAGAAAGGACTGGGGCCGGGCTGCACTGCTCGAGGGCTCTCTCTGCTCTT
 GTGCTGGAGAAATGCTGGGGCTTTGGCCAGCAGGGGCTCAGGCCAAGATGCTGCAG
 CGGAAACGAAAGGAAATCTGAAACAGCCAGCTTGGATCGGAGAAATGGCACTGGGATG
 GCCCTTCACTCTTACAGGACTCTGAGAGCCAGGGGCTCAGGGCCAGAGGGAGAGAA
 CAGCAGACCCCAAGCTTCTGGCCCTTCTGGCCAGCAAGCCACACTCAITGGGAGCC
 AGGGTGGCAGTATACAGTGGATGCTCTCTGGGAGATGGTCTACACACTCACTACTG
 ATGGCTGGCCATAGTGTGCTCTTCTCTGATGGCTTCTCCAGGGCTCAGTACCACCT
 TAGGGTCTTCTGCTCAGCTGCTCCCAAGCACTGGGTGACTTGGCATGCTGCTCCAGT
 GGGGCTGCTCTTCTGGGGCTGCTGCTGCTGAGCCCTGTGTCTGGAGCCCTGGGATGG
 GGGTGCAGTCTGGGGTGGGCTGCTGCTGAGCCCTGCTCCCTTCTCCCTCCTCTGGGTT
 TTGGGCTACTGCTGGGGTCTTCTCTATATGTTGGCCCTTGTGCAATGCTACCCAGGCT
 TCTTCTCGGAGCCCTGCTACCCGCCATGTGCTCTCGAGGGCTGGGGCTGCTCT
 GGGGGCCGGCTCATGTCTGCCATAACCTTGTGGAGAGGGGCTACTGCCCTGACCA
 CTGAGGGCTGATGGGGCCAGTGGAAAGGGGTGGGTGCTCTTCTTCCCCCAACCC
 ASGAAITGACCCCGGACACAGGGCCAGTAGGAGCAATAGGATTTTAAATAAGAGAAC
 CATCCAAAGCCATGACTACAGCAAGTGTACTTGGACCAAAACAGATAGAAACAGCA
 GTGTGGTGGGAGGCCCAAGCCGGTGGGGAGATGTGATGAGGGCCGTGGAGGGT
 CCAGGGCTATTAATCTTGGGGAGAAACATGTTGCTTACGCCAGGGAGGGGGTGG
 GGCAAATGCAACCGAGTCCCACTTTTCTGTGCTGCCCTGGCACCTGGGGATGCAAGCC
 ATCTGGGCACATCTGCCCTTATGCTGCCACAGCCGTT

A

【 図 9 5 A - 2 】

AAACGCCCCCGATCCCAACACTAGCACACAGGTGGTTCGGGGCAGGGAGGGCAGGA
 ATGGGAAAATTTGCTTAGAGAAAAGATTTCCACTAGAAATCCAGTGAATTTGCTCATGCTCT
 TTACTTCTTCAACCCGAGTACATGGGTCACAGGGTGGAGGGTGCACAGGACATGGAA
 ATGCCCTCCGTTGCCCCCAACACACACTGACACAGGATGGTGGCTCTGCACATCA
 GATGCTATCCAGGGCATTTGGGAGGGGAGGTTTACACACACATAGATGCCCCACAGGG
 CTGTCAGACCGGAGAACACCCCTCAATAACATAGCTGTACATGGGGAACCCGAGGCTC
 CACCCCAACCTCTTCCCTGCTCTTCTCTCCCTCCAGCCAGGCAACTATTTGCTTTGAGA
 GAGCCACCCAGGGGCTGCTTCCAGGACACTTCCCTCCCAACCCCACTTTTGGC
 ACATTCGCAAGACACACAGCAGGAGTGGCAGTGGCCCTCCAGGCTCTCTGGCC
 TGGAGCTGGAGAAGGGGGTGGAGACTTCACTCTCACTCTCCCTCAACCTTCCCAAC
 CCTGCCAAACCCCACTAAGCCAGAACCCACCCCAACCCCAACACACATCAAAAG
 TGAGCTTCAAGGAAACACAGGGAAACAGGAGATTTGCTCAGGGTGGGAGCGGAGG
 CCGGGGAAAGAGACTGGAGAGCAGAGACTTCCCTCCCTGGGGGGCAGACTGGCA
 ACAGCTACTTATGTGCAATTTGGAGAGGGTGGCCAGTGGAGGGTGAAGAGGAAAGGG
 AAGGGGTTCCCAACTTCCCTGGGGCAAGAGTCCAGCTTCCAGATTTCCCAAGGAAAG
 GCTTAGCAGGAGTGGTGGAGGGCAAGGTGTGCTCTGTTTACCCGCCACCTCTCCCT
 TCCAAAATGCAITGACAGTGTCCCTTCCCTCAGCCCTCAAGTGGGCAACAGGACCTTGGAGT
 AGTACTTCAAGTAAATCAAGAGGACACTCTCCACCCCAAGCCCAAGGAGAGCCCTT
 GATTTGGCTTCTCTCAAGAGGTTGGGTGGAGGGAGGCCCAAGGAGAGCCCTTCAAG
 CCTTCTTACCCTTCCGATTTCCAGACTACTGGGCTTGGCTCAAAAGATTTCTCACTCC
 CCTTGGCCAACTGGGTCAAGGCTGCAAGAGGTTGAGACCACTCAATTAGAGGGGAA
 GGCGTCTTTGTCTTATTTCCCTTCTTAAAGTTAGGGTTCAAATAGGGGGATGG
 GGCCCACTGGTGTGGCCAGGAGTGGGTTTCTGGCTAGGGTCTGTGAAAGCTATT
 TCTTTGGGTGGGAAGGGAGGATGGGGATGCAACTGGGTATGGGAAATGGGTGAGTA
 AATGGTGGAGGGGAAGGAGGAGGGGATGCCCTCCCGTGGAGGACTCTAGGATGCAAT
 AGACAAAACCACTCATGTGCAATAAGTATACAGTGGTCAACTGACCTCTTCCAGCCG
 GCCCAATCCCACTCTCAGGACTCTTCCAGACCTTGGAGGGTGTGGAGGATCAG
 CTGAGAACCTTCACTCTGCCCCATCCCAACCCCACTTCCAGCTTCTCCCTTCTAGG
 TCCAGGAGTAAAGAGGTGCTTGGGTGGGACAGAGTGGTGGAAACAGTATGGATTTT
 CTTTGGTTACATATGAGGCAAAAGTGAAGTGAAGTGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGCA
 TGAAGGAAAGGAGGGGCACTGGCTGGGGTGGAGGGAGGAGTGGCCCTCTTACCC
 CCTTCCACCCCAAGAAACACTATCTAGTGGGTGGGAGTGGCTCAGTCTTTCTTCTCC
 GCCCAGCAGCACAACAAAGGAGAGAGCCCTCCCAAGGGGTTGCTCCCAACCCCA
 ACCTGGGCTGATCAATAGTGGTTTTGAGCAGTCTTATGGCTCAGGGGGCCAGGGGCA
 GGGAGTGGCCCTGAGTCTCAGTGGAGAGTGGAGTGAACCCGGTGTCTGTGCTTCC
 TGGGACCCAGGTTTGGCAATCGTTTTCTGAAAGGATAGTATAGACCTCAGCAGCA
 CACGGCCCAATCAGAAAATAGCTCCCAAAATCAGAAAATCAAAATGAGCTTCTTCCAT
 TCACCTCTGATTCACAGCTGTGTTTTCCCTGTCTCTATAGCCCTTCCCTGTTTCTT
 CTGGGACTGGGCTGCTCCAGGGTCTCCGCTTAAATAGCCCTTTCAAAAAAGTGC
 TTACTTCTTGAAGCAAGTGTCTTAGGGCTGGGTGGGAGAGGGGGAGGGGGAGGGCA
 AAGGAAAGGGGCTTGGCTTCCCTCTCCCTTGAAGACTAAGAGCTTGAAGAGGAGGAG
 TTITACTTCTCCACCCGTTTAAAGTCAAAATGAGTAAATAAAAAAATCTTAAATAAA
 AAATAGCAGTGGCCATGAGAAATGTCAAAATGCTTCAAATGCTTAAATAAAAT
 CCAAGGTGGGGGCTGGGGTTTTCTTGGCATAAAGGAGGAGGGCTCTCTCCCAAG
 CCTCTTCAAGCCATATGGAGGGACAGGACTCCCAACCTCCAGCTTCCAGCTGTG
 ACATGGCTGAGGGGACAGGGCCAGGAGCCCAACCTTCAATCTTCAAGCAAGACA
 ACGGGGCTGACACTCAGACGCTTCCCGCCATCAACAAAATCACTTCAAGCAAGACA
 GACTCAGCCCGCAAGTCTCTCTGGAGGACCCATCT

A (continued)

【 100 】

GGGAGTGTCCAGCTGGGAGACCCTGATATAA...
GGGAGTGTCCAGCTGGGAGACCCTGATATAA...
GGGAGTGTCCAGCTGGGAGACCCTGATATAA...

A

MKLWVSALLMAWFGVISCVQAEFFTSIGHM...
MKLWVSALLMAWFGVISCVQAEFFTSIGHM...
MKLWVSALLMAWFGVISCVQAEFFTSIGHM...

B

【 102 】

AGGTTCTTACATCGACCCGCTAAGAGTCGG...
AGGTTCTTACATCGACCCGCTAAGAGTCGG...
AGGTTCTTACATCGACCCGCTAAGAGTCGG...

A

MRECSHVQAGVQGNACWELYLEHGIQPDG...
MRECSHVQAGVQGNACWELYLEHGIQPDG...
MRECSHVQAGVQGNACWELYLEHGIQPDG...

B

【 101 】

GGAGCCGAAAGCTGTGGAGCATCGGGAGAT...
GGAGCCGAAAGCTGTGGAGCATCGGGAGAT...
GGAGCCGAAAGCTGTGGAGCATCGGGAGAT...

A

MFPFALLYVLSVSRKIFILQVGLVITYDFN...
MFPFALLYVLSVSRKIFILQVGLVITYDFN...
MFPFALLYVLSVSRKIFILQVGLVITYDFN...

B

【 103 】

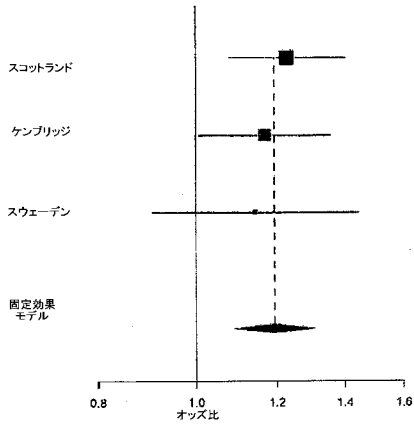
CTGGTAGTCTGTAGTGGGAGATCCTGTTG...
CTGGTAGTCTGTAGTGGGAGATCCTGTTG...
CTGGTAGTCTGTAGTGGGAGATCCTGTTG...

A

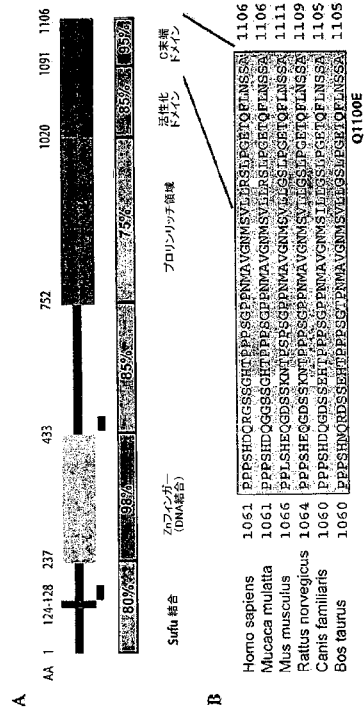
MRECSHVQAGVQGNACWELYLEHGIQPDG...
MRECSHVQAGVQGNACWELYLEHGIQPDG...
MRECSHVQAGVQGNACWELYLEHGIQPDG...

B

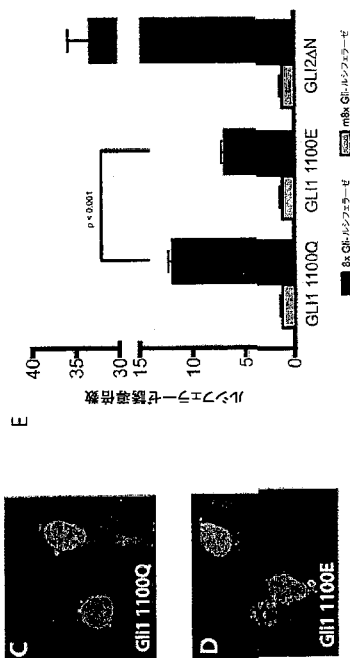
【 図 1 0 4 】



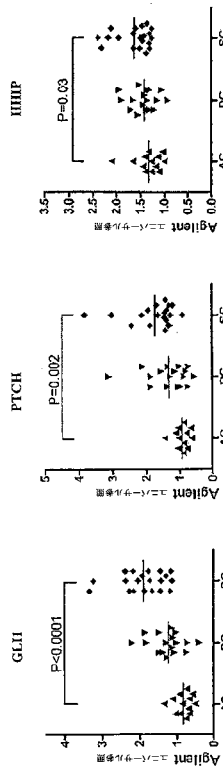
【 図 1 0 5 A 】



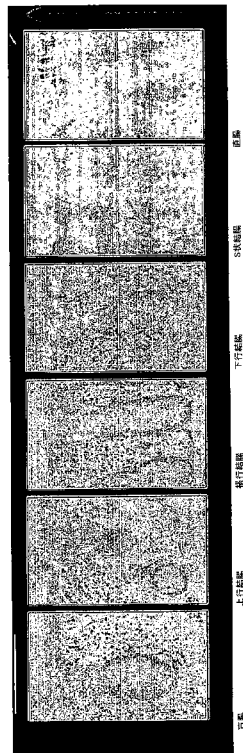
【 図 1 0 5 B 】



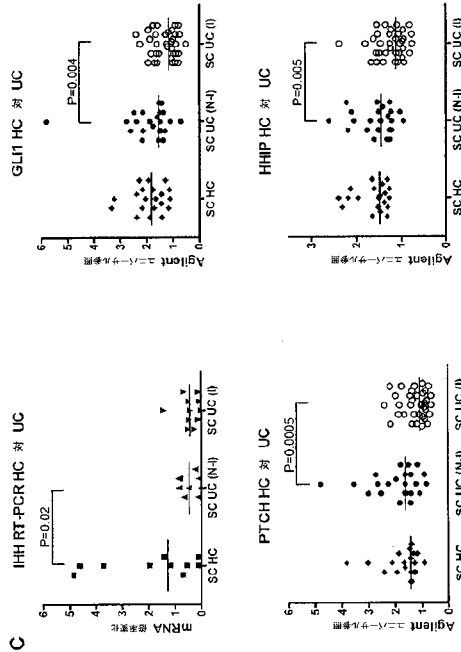
【 図 1 0 6 A 】



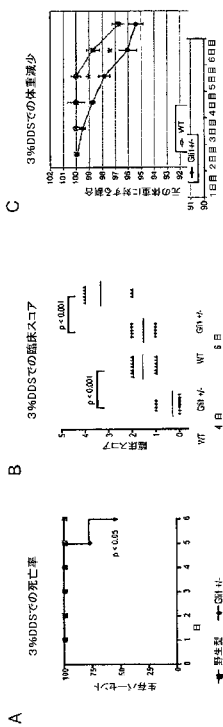
【図 106 B】



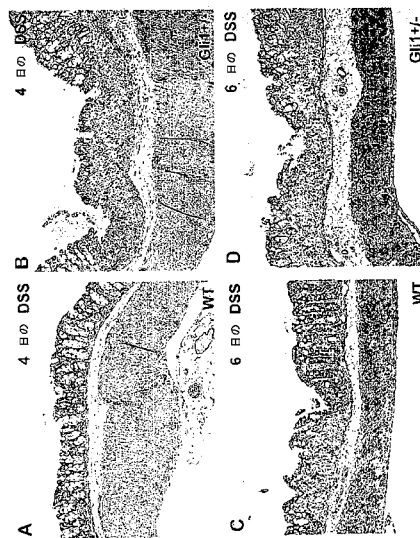
【図 106 C】



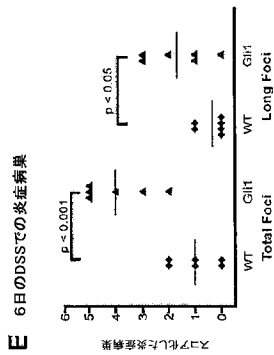
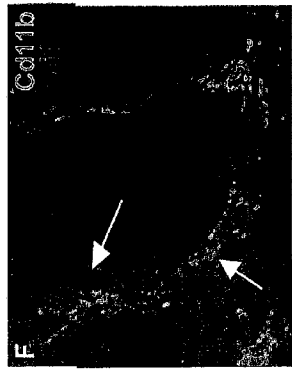
【図 107】



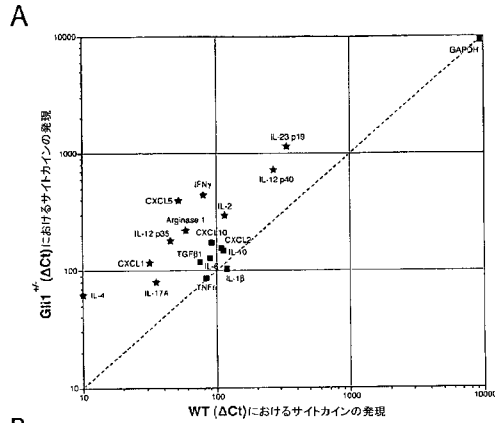
【図 108 A】



【 図 1 0 8 B 】



【 図 1 0 9 】



| 遺伝子 | WT Avg | WT SD | Gilt1 ^{-/-} Avg | Gilt1 ^{-/-} SD | 倍率変化 |
|---------------|--------|-------|--------------------------|-------------------------|-------|
| IL-23 p19 | 446.3 | 136.0 | 1129.5 | 580.0 | 2.5* |
| IL-12 p40 | 280.5 | 109.0 | 703.8 | 221.0 | 2.5* |
| IFN γ | 79.3 | 21.5 | 439.0 | 103.4 | 5.6* |
| CXCL5 | 51.8 | 16.3 | 410.8 | 84.8 | 7.9* |
| IL-2 | 112.0 | 21.0 | 258.1 | 44.2 | 2.7* |
| Arginase 1 | 59.0 | 17.3 | 222.2 | 43.0 | 3.8* |
| IL-12 p35 | 50.2 | 8.8 | 206.5 | 36.2 | 4.1* |
| CXCL1 | 29.8 | 9.0 | 113.8 | 33.0 | 3.8* |
| IL-17A | 35.5 | 8.7 | 80.0 | 30.4 | 2.3* |
| IL-4 | 6.3 | 2.1 | 65.4 | 10.2 | 10.4* |
| CXCL10 | 91.4 | 47.9 | 173.4 | 92.5 | 1.9 |
| CXCL2 | 107.6 | 43.4 | 156.5 | 77.9 | 1.5 |
| IL-5 | 111.3 | 40.4 | 148.7 | 60.6 | 1.3 |
| IL-10 | 88.7 | 27.9 | 127.9 | 97.8 | 1.4 |
| TGF β 1 | 74.6 | 14.3 | 118.1 | 45.1 | 1.6 |
| IL-1 β | 118.5 | 25.6 | 104.1 | 62.8 | 0.9 |
| TNF α | 82.6 | 22.1 | 88.1 | 49.8 | 1.0 |

【 図 1 1 0 】

GAATGTCCTCTACCCCCCAACCCCCATGCTGTGTTGAAGTCGATCGAATTAAGTGTCTG
 CCCGAGGATAGAATCTACCTGGCTGCCAGCATAAAAGGCGAGGTGATCTTAACCTTG
 AACAGCCCTGGTGGACCCATAGTGAAGGTGGAGCTCGTGGGAAGGGGTACGTGCGAA
 TGGAGTGAAGAAGCCGGGGCTCTCTGTGATTAAGCAGAAATGTTATTGGAAACAACAAG
 GCAGACTACCTGCAATAAGACAAGACATTCACAGTGGAGGATAATTGGTTAAGTGGCAGGC
 AGCCACACCTTTGACTTCTTCAACTTACCTCCAGGGCTCTCTTACCTTCAACAGC
 AATTTGGCCATGCTTCTATTTCGTACAAGCTTCCGATGGCGAGGAAACCAATTTTA
 GCCAAGAAGAGATGATTAATGGTTCAAGGAACCTCCACCTTCCACAAGAAACCCCA
 TCCAGGTACCCGATGGGGAAAGGTGGAGGTGGGAACAATCTCCAAGTCCAAGGAGAA
 GAGGGAAAGGAGAGGAGGGAGGCTCCAGCTGCTGTAAGAGGCTGAAGAGAAGCCAGAG
 CGAGAAAAGTGGGAGAACCCCTTTGTTCTGGTGGAGGCTGAGGAGAAAAGTCTCTCAACTGC
 TCCGCCAGGGCACTGCTGTTTGAACAATCCAGATGGAAGGAACAACCTTCAAGCCAGGA
 GAGAAGGTCGTTCTCAACAACAGAGATCAACAACAGCCAGCAAAATGCATCAAGAAGGTC
 GTATTCGCCCTGTATGCCACATACAGATCAAGGGCTTCAAGCCAGTGCAGAGGGCGGTG
 TCTCGGCTGGACAGCAGCGAGCTTGAAGCAGGAGGCCAACACCCCGTGAACCGCTTCA
 AACACCAACAAGGTTGTCAGCAGCTTCAACTGCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 ACCGAGGACGGTGAATCATGCACTGCTTCCAGAGTGGTCAACCCCTGACAGCAGCAGC
 TGCTCCCTTACCAAGCCAGGCCAAGGTTCCCATCATCATCAACAGCCGCTCAGTGAC
 TCTGCCATCTGCCAGCTGTCAAGAGGACGGAGTGTACCCCTGAACCCAGATCAACAGAAAT
 TAA

MGDREELSTPQPMSVVKSIELVLPEDRIYLAGSSIKGQVILTLNSTLVDPIVKVELVGRGVYVSEW
 EAGASCYVSRNVCNNKADYVHKTKTFVFDNWLVSAGHTFDHFHNLPLPSTFTSKFHVYFVY
 QASCMGRHEHIAKRMVLLVQGTSTPIKETFPQNLVFEABEKVSYNCCRGTVCLQIQMERNFTT
 PGEKVYFTTEINQTSKICKTVYFALYAHQYEGFTPSAERRSLDSELLRQEAANTPVYRFTKVVY
 STFNPLLLSVSSSTQDGEIMHTRYELVTVVHLPSWLSLTKAKVPHITSASVDSAIQQLSEDDVLPVN
 PDHQN

【 図 1 1 1 】

ATGGATTTCATCTTTTCATGAGAAACAGGAAGGTTCTCTGCTCAGCAGCTGTCTGAAC
 AATCTATTGCAAGGAGAAATTTTAGCCCTGTGGAAITAGCCCTCAATTGCAACAICAGCTA
 GATGAAAGAGGAGGATGAGAAATGGCAGAAAGGAGGATCCACAGTGAAGAGATATCTTGCA
 TTTTACAGCAGCCCTCAGAAACATGGATGATACCGGTTCTCTCCATTACAGTAAT
 AGCAATGCCCTGAAAGTCTGGGTTTACAGATCACTCAATTCATAAATCTGTAATATCAG
 AAGCTGGCATTGATCTCTAATAAGAAAGATCTTTATATGTAATTAATAACAACACTGG
 TTTACTATTGAAAATTTGGAAAACACTGGTTTAACTTGAATTTCTCTTGGCGGTGCCA
 GAAATTAATACAGATACATGGCTTGCATAATTTCTGGCTCGATTACACAACAAGCATAT
 TCTGTATTGTGTCAGGCTGATCTGCCACACTGTGAAGCTGACCAACTCTCGAGATC
 ATCAGCTCGAAGAGATGGATACCAAAACATTAAGTGGAAAATAATGTAATAACAAAA
 GACGATAGGCTCTATAAACAGCTCTTGAAGAAATATCAGAAAGAAAGTATGATGATGATG
 ACATCAGCAACAAGIUGAGGAGATTTTCAGAGGGCCCTTGAACCTAAGCCGCAAGAAAC
 AATAGAGAAGATGAAATCTCCCGAGTACTATGAGTAAAGATGCAAGGATGTTCCGGA
 AACACATCCGAAGATCTTCAAAAGACTATGTGTAACCTCTGTCAGAACAGCCGGAAG
 AAAATAAAGAAAGACTATTTTGAAGAATCAGCAGGAACAGAAAGCAGCAGCAACAACAG
 TCAGATCTGCCGGGCACTACTACCTTACAGAAAGGCCAACAAAGTCTCGAGAGAC
 ATTGAGATGATCTCAGTGTAGCACTAGTGAAGCCACAGTACAGCCGCTGTGACACC
 ATTTTAGAAAATTAGAGAAGAAATTTGAAAATCAAGGGGAAAAATAA

【 図 1 1 2 A 】

CGCTGAGATCTGGGAGGTTTCTCTGCAATGCGAAAGAAATCAGGTGGATGGATGCATA
 ATTAGCCCTGCTCTGGTCTCTTTGCTGGCATCCGAGCTTGGCTCAGGATGTCATCATCG
 GATCTGCTACTGCTCAACAGGGTTTTTCTGCTGCAAGAGAGCAAGGTGACAGAGATTCCTTCT
 GACCTCCCGAGGAAATGCCATTGAAGCTGAGTTTGTCTCCACCAAGCTTCGAGTATCCAAAA
 GGTGATTTTCAGGATTTGGGGACCTGGAGAAAATAGAGATCTCTCAGATGATGTTCTGGG
 GTGATAGAGGAGATGTTCTTCCAACTTCCAAAATACATGAAATAGAAATGAAAGAGGCC
 AACAACTGCTTACATCACTCCCTGAGGCTTCCCAAGCTTCCCAACTTCAATAATCTGTTA
 ATCCCAACAGGATTAAGCACTTCCAGATGTCACAGATTCATCTTCCCAAGAGTTT
 ACCTGACATCAAGATAACATAAACAATCCACAGATTTGAAAGAAATTTCTTGGTGGGCTGAG
 CTTTGAAGGCTGATTTCTATGGCTGAATAAGAAATGGGATTCAGAAATACACAACITGTCATTC
 AATGGAACCCAACTAGATGAGTGAATCTAAGCTGATTAATAAATTTGAAAGAAATTTCC
 GATGTTTCCACCGGAGCTCTGGACAGTCTATGATATTTTCAAGAAAGATTTGCTCAAT
 AGCTGCTACTCTGGAAGAGCTTTGCGCCCTCATGAGGCGAGCTCAGCTTCAACATTA
 CTGTGCTTTCGAAACTGGAGCGGAAATCTCTGAGCTTCACTCAATTTGCAACAAATCTAT
 TTAAGCAAGAAGTTGATTAATGACTAGGCTAGGGCTCAGAGATCTCTGCGGACAGGAC
 AATGAGTCCAGCTACAGCAGAGGATTTGACATGACCTAGCTGAGTTGACTATGACTTATGC
 AATGAGGTTGAGTGAAGTCACTGCTCCCTAAGCCAGATGCAATCAACCAATGTAAGGATATC
 ATGGGTTACAACTCTCAGATGCTGATATGTTTATCAGCATCTTGGCCATCACTGGGAA
 AGATGGCTAGTGAICTCAACTCCAGCCAAATAAACAATCAAGCTCAGGCTCCCAAGGTTCTTATC
 CAACCTGGCTTGTGATCTGCAATGGAAATCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 ATCCAAAGGCCAATAACAACTATGCCATGACITGGCAACTGGGCGAGGCTGATGCTGCTG
 CTGGCTTTTCACTGCTTTCGCAAGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 AGATGGCATACCATCACGCAATGCCATGCACTGCAAGCTGCAAGCTCAGGCTCAGGCTCAGGCTC
 AGTGTGATGGTATGGCTGGATTTTGGCTTGGCTGCAAGCTGCAAGCTCAGGCTCAGGCTCAGGCTC
 CAGCTACATGAAGTGAAGCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 GCTG
 CTACCTCAGCAGCGGCAACCAACAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 ATGGCCAICTCATCTTCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 TCCCTCAAGTGGCCCTCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 CAACCTGCTGCAACCCCTTCTCTATGCTGCTTTCACAAAACCTTTCGAGAGATTTCTTCA
 TCTGCTGAGCAAGTGTGGCTGCTGATAAGTGAAGCCCAAAATTAAGGACAGAAACTTCTCA
 TCTGCTGCAACACCCCACTCAAGGAATGGCCACTGCTCTGAGCTCCAGAGTCAACAGTGTG
 TCCACTTACATCTGCTGCTTAACTATTAGCCAAAAGCTAAAACAAATGTAAGTGAATAATGTA
 TCTGAGATTAAGATGATAATCACTGCTTGGCTTGAAGGATATGTCACAAAGGAGCTGACAGT
 CTCTTACCACTTACATCTAATTAATATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 TTAATTCATGTCATACATAGGAAGCTGAATTAAGTAAACCAACAATAATAATAAAGAACTG
 AATCTGTAATAAAGCGGGCCGAAAT

【 図 1 1 2 B 】

MALLVSLAFLSLGSGCHRHCHSNRVFLCQESKVFTEIPSDLPRNAELRFLVTLKRVIQKGFSG
 FGDLEKIEISQNDVLEVIAADVFSNLPKLEHRIEKANLLYINPEAFONLPIQLYLLISNTGKHLKPDV
 HKIHSLOKVLIDIQDNIHITERNFVGLSEFVILWLKNGIQEIHNCANFTGQDELDELNSDNNLE
 ELPNDFVHSGASGPVLDISRTIRHSLPSYGLLENLKIARSTYNYLKLPTLEKLVAMEASLTPSHC
 CAFANWRROQISELHPICNKSLRQEVDMYIQAQRSSLEADNESSYRSGFDMITFTFDYDLCEVY
 VDTGSPKPDFAFNPCEDMNGYILRVLWIFSLITLIGNIIVLITTSQYKLVPRFLMCLNFAIDLKJ
 GYLLIASVDHHTKSQYHNYAIDWQTAGCCDAAGFTVFAFSLVYVTLTALRFLMCLNFAIDLKJ
 CKVQLRHAASVMVIGWIFAFALPFIQISSYKRVISCLPMDIDPSLSQLYMSSLVNLVLAFFVI
 CGYVHILVTRNIVSSSDITRIAKRMAMLIHIDFLQMAPISFIAISGLSLPLTVSKAKILLVLFH
 PMSGANFFLYAHTKRNRRDFILLSKCCQYEMQAVYRTSTSVHNTPRNGHSSAPRYTSGST
 YILVPI.SHLAQN

【 図 1 2 4 A - 3 】

6241 icagatcatt gctctgcatg ggcagatct agaaagatg ncccaag agctgctg
6301 caictaana egacaaag gcatctgctc ttgaggtt cctctgaa ttgctgca
6361 gaatgacc aaccacaacc ctgctctcc tccctcgg aatgagatg actgctgctg
6421 acanma igctgctg agccagatg tccanctg agggagaa caactaana
6481 gctctttt cctctgaa agctgctc ttactgaa cctcaactaa ttctctt
6541 cctctgctc mtgagatc taagaaga gaaatggt gctgagat cctctgaa
6601 ttgggaaa tctctgatt ttgctgca catgggag aattcttcc tgcactgact
6661 ttgataana agaaagata ttcaaaat aaccacaana aatgcttcc glaagttg
6721 agaaagaa aatctanaa atnaagaa aactctggtt gatttana aaaaactgct
6781 aattgaaa tctctctt cctcaact caactanaa atagaanaa aattcttca
6841 agaaatct taanaaac tgcactgctc ttcaaatc caeactgctc taanaaac
6901 tgcctctc caactctt atcaatctc atttctgt caaactggt ttctcaact
6961 ttgataana gaaatggt gaaatggt cctcaantc taanaagaa taatctaa
7021 tgcactct aattctc cttattgt actctgta aatctctt actgctgctc
7081 aatgagaa tgcactgctc actgctgctc actgctgctc actgctgctc actgctgctc
7141 taanaagaa gaaatggt gaaatggt actgctgctc actgctgctc actgctgctc
7201 caactanaa aatgctgctc actgctgctc aatgctgctc caactctc taactaa
7261 gaaatggt aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc
7321 aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc
7381 aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc
7441 aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc
7501 aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc
7561 aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc aatgctgctc

A (continued)

【 図 1 2 4 B 】

TLKKMLF:AIDKNRALHAAERLQTLRERGDVANEDKLSLLKSVLQSLPFSQILSLQTSVQQLKDOV
NIATSAISMNEYAHVPHLSPAIVPTLQNESFLSPNNGNLEALTPGPHINGKPCACDFDQILKNMAQ
GRHVEVFEILKPPSGGLGFSVVGLRSENREGLGFVQIEQGSVAHRDGRKLKETOILAINQALDQ
TITHQQAISILQKAKDTVQLVIARGLPOLVSPVSRSPAASATISAHSNPVHWHQMETIENVYDGGSL
GFGHGGKATGVIVKTLPGGVADQHGRLCSGDHILKIGDIDLAMSSQVAQVLRQCCNVRKLMIM
ARGAIEERTAPTALGHTLSSPSTPBLRVDASTQKGESEETFDVELTKNVQGLGITIAGYIGPKLFP
SGIIVKSIKSSAVIHDGQDQIAVGDITLQGTINQOAVAAVLRHICDQVTLMLRNMKQZAE
LMSREVDYTKDADLSPVNAIKENYKEDFDLSTRTNMLTTEEGYPLL SAEIEIEAOKQEAALL
TKWORMGINYEVIVAHYKSFSENSGLSLEATVGHIFIRSVLPGPVCHSKLFSGDILLVENGIT
LGENHQDYNILKLEPIEVMVCRVTPVPTTQSELDLSLDLIDIELTEKPHVLRGIVLGGFESSETEDPV
LMLTDAGQSTEEVQPLAMWEGIOHIELEKSGKGLGFSILDYODPDPASTVHILSLVPGGIAEKD
GRLLPGDRI.MFVNDVNI.NESSLEAVEALKGAPGTVRIGVAKPLPLSPEFYYSXDSFLVPHHS
CEAAGLADKPLFRADLALVGTNDADLDVDESTFESPSPENDSIYTOASILSHGSSGDGLNYGSSL
PSSPKDVIENSQDPVLDLHMSLEELYQNLQRQDENTPSVDISMGPASGFTINDYTPANAIEQQVY
CENTVWVTEHILPSEVISAELPSVLPDSAGKGSYLLFOSSLACNAECYMLONYSKESFERTINIAK
GNSSLGTMVYANKDGLMIVRSIHGGAISRDGRIAGDCILSINEESTISVINAQARAMLRRHSILGP
DIKITVYPAHELEEFKISQOQSGRVMALDIPFSYTRDIPELPEREEGGESEELQNTAYSNNQPR
RVELWRKPSLGSISVGRGMSRLSNGEYMRGIFKHVLEDSPAGKNGLKPGDRIVEVDGMDL
RDAISHQAVIAIKAGNIVFVMSHRPKSLP.LLH.LYKYNFSNPNFADSLQ.NADKAPQ
SESEHEKFLCSVPPPPSAFAEMGSDHTOSSAKSIOVDKDEDFGYSWKNIERERVTLTGELHMIE
LEKSGHGLLGLAGNKRSMRVFVIGDIPNGAACKDGRLOIADELEJNGOJL.YGRSHQNASIIKC
APSKVKIIRNKDANVOMAVCPGNAVEPLNSSENQNKTEPTVTTSDAAVDLSSFKNVQHELPL
KDQGLGIAISEEDLSQVYIISL.TEHHVAATDGRKLVGDQILA.VDDEIVVGYPIEKFISLKTAKMT
VKLTIHAENPDSQAVPSAAGASGKNSQSLMVPQSGSPEPESRINTSRSSPTAIFASDPATPHIP
CGEFTIIEKGRGLGLSIVGGSDLLGALIIIEVYEEGAACKDGR.LWAGDQILEVNIQDLRKATHE
AINVLRQTPQRVRLTL.YRDEAPYKEEVCYDITL.IELQKPKGKGLGLSVGK.RNDTGVFVSDIVKGI
ADA.DGRMLQGDQILMVNGEDYRNA.TQFAVAALI.KVSEGLSFTPLSGSSTESLESSSKKNLA
SEIQRLTRVEMKKGPTDLSLISJAGGVSPLG.DVPHIAMMHP.TGVAAGTQKLRVGRDRIYICGISTE
GMHTIQTAVM.I.KNASOSIEMQV.VAGDDVSVVTGHOEAPASSL.SFTGLTSSSIFODDL.GPFOCKSIT
LBRGPDGLGFSIVGGYSPHIDLHYVKTFAK.ASEEDGR.LKRGDQ.IAVNGQSLGCVTHEEVAVI
LKRTKGVTL.MVLS

【 図 1 2 6 】

TGAAGGCTGGTGTTCAGACTGAGACTTCCTGGCTTACCCCGCCAAACAGCTTCAGA
AGAAGGTGACTTGGTGGCTCTGAGTAATCCAGTGGGCAAGAAATAGCAATTTCTGGGA
GCATCTGCTGTCTGACGAGCCCTGGGTGCTTCACTTTCTGGGACAGTGAAGGTTGGCCG
TTCCGCGCTTAAAAAAGTGGACTTTCAGCAAACTTTGGAATATTTGATTTCTT
CTGGCTTTTAAAAAAGTGGACTTTCAGCAAACTTTGGAATATTTGATTTCTT
CAGTGAACAICTGGCTTCCCTCAAGTTCTTGGAGCTTGAATCACTCCGCAAGCAAGCA
AGCAACCACTCAAGTGCCTTGATTTCTCAGCAACTCCAGAAAGAGAAATTTGGGA
AGAAAGCAAICTGCTTCTTGAAGGAGCTGCTCTCCGAAATTAATAGACTGGATTTGCT
GATTAACCTCAAAACACTGAAGGAGGAGATGGAAAGGAACTTCAGACACCCAGGCG
GGCTCAAAATTTCTGCTCAGCTTCCACTCTGTCGCAAGTGAAGTGGCGAAGCAACAG
CCAGTGCACGACACAGTCTGACTTCTGGCGGAGGGTGCATCACTTAATAAAGGGT
CAGTCTCTAAGCAATTCAGAAAGGAGGAGATGATGATCAAGAACTGGCTTGGATTTCT
TTTGAAGAGGAAATTCAGAAAGGAGGAGATGATGATCAAGAACTGGCTTGGATTTCT
CAGTGAAGTGAAGGAGGAGGAGTCTGCGGAGAGAAAGTGGACATCTCTGAAAGAGT
CTGTGGCCAAATCAACAGAGGCTCTGAGTGAATACTCAACGCACTGAAGAAATTCAGCA
AGGGAGGAGGAGTGTGGCGGATATGCAATCTGGACTCTCCAGAGAAAGGAGGAGTGA
ATCACAGACTTTCAGCAAAAGTACCAATGAAAAGCAAACTCCGGGATATCTGTGAT
CATCAACAATCAAAATTTGCAAAAGCAGGAGAGAAAGTGCCTCAACTCAGACGATAG
GGACAGGATGGAAACACACTGGATGCAAGGCTTGAACACAGCAGCTTTGAAGAGCTTCA
TTTTGAGATCAAGCCCACTGACTGACTGACTGAGCAACTCTAGATATTTGAAAAT
CTCAACACTCAGGACACAGTCAACTGGACTGCTCTCTGCTGTATGCTCTCCATGTT
AGCAAAGGGCATCACTAATGGCACTGATGACAGGAGGCCCACTATGCTGCTGACATC
TCAGTTCACTGGTGTGAAAGTGCCTTCCCTTGGTGAAGCAAACTGTTTATTTATGCA
CGCTTGCAGCGGGATGACTACCAAGAGTGTACTTACTTGTAGACTGATTCAGGAGCA
ACCTTAATGAAAATGATTTATCACTCACTCAACAGGAGATATCCCGGATGAGGCTGA
TCTTCTGCTGGGATGGCCACTGCAAGTGTTCCTACCGAAACCCCTGACAGG
AACCCTGTATCACTCAGTCACTTTGCAAGGCTGAGAGAGCGATGCTCTGAGGCGGATGA
TATCTCAACACTTCTGACTGAGTGAACATGAAAGTAAAGCAACAGGATGACAGAAATA
CATGGGAGGAGTGCCTTACTGCTACTGACTTACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACT
TGATGATGGTGTCTATTTGTTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
CTCTCTGCGCCAGCTGGAGTGAAGTGGCGTATCTCGGCTACCAGCAAGCTCCGCTCC
CGGTTACAGGCCATTTCTCTGCT

A

MDFSRNLYDIEGQDSEDLASLKFSLDYPYORQPEIKDALMLFQRLQKRMLEESNLSFLKELLF
RINRLDLLITYLNFRKEEMEKEQLTPGRAQISA YRHFRCMSWAENSQCTQVSPVFRWRVDHLLI
KVMLYQISEFVSRLRSPFI.LQEISKCKLDDDDMLLDIEMEKRVLIGEGKLDLKRVCQINIK
SLLKINDYEFESKGEELCGMVTISDPSRQDESQTLDKVYQMKSKPRGVLIJNNHMFARKEKV
PKLISIRNMGTHLDAGALTTTTFELHEIKPHDQDVEQVYELIKYQLMDHNSMDCITCCLSHGD
KGIHYTDGCEAPVELTSPDTLKCPLSAGKPKVFQACCGDNVQKQIPVETDSEOPVLEMLDSS
PQIRYVDEADFDLLGMATVNVCSYVRNPAEFTWYQSLQSLRERCFRGGDILTLTEVNYEVSNKD
DKKNMGKQMPQPTFLRKLKLVFSPD

B

【 図 1 2 5 】

GGAAATTTTACAATGGTGGGCTCAGCTCTCAGGAGAGGTTGCCATGTCATGCTTCTG
GTGAGCAAGGCAGTCACTCCAGAGGCCATCAGCCAGGCTGGGATGGAGGCCCT
CTTGACAGAGAGTGTGCCACCCAAAGAGCTCCAGGAGGCTGTGGAGGCTGTGGGCAAA
TCTTACCCTCAGGACGACCCACGAACTCCAGGAGGCTTCTCACCAGAGTTGGCAGG
AACTCCGACCAACCCAGCAATCACTCCCTGTGGCTGATCAAGGAGGAGGAGTTCAGGAC
TCTTCAACAGCAGTATGTGGCCGCTTTGGGACCCCGTTTCTCCGCTTCTCAGCAACCT
TCTCCAGTGGTCAAGCCTCGCAGAACTTTCAGAGCTTCTCAGGCTTCTCAGGCTTCTCAGC
AGCAGGAAAGAGGGGGCAACTATTTACTGAAATCGGACTCAGATGCTTGAAGCGCCACAG
TCTTCACCAACTGAGGACTTGTGACGCGCGGACTGGATGCTTCTGTGGTGGGCTGGAT
GCTCAGCGGCTCAGCAGACTCCAGCTCCAGCACTACCTTATTTTCCAGCAAGTGGAGGCC
CTCCGCTCTTCTCCAGCACTGATGATTTCTGGCTGATAAAGGATGGAAGAAAGCTCCAG
CTTCTTGAACAAGTCTCCGCTTGCCTATAAACAAGAGCAACCACTGAAGGCGCTG
AAGCTTGTAGATTTGATCTTAAAGAAACGCTTACAGGCTTCAATGCAATCTTCTTGAAG
GATGAGTGGAGATAAGTGGTGTGACTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTGAAG
ATGAGATCAACTTTCATGGAGATAAGGCTGGAGTCTTGTGGCTGGGGTGTAGGAAACA
AACTGGTCAATTCAGTGGTGTCTAAGCCGAACTCCGCTGGGCTTGTGGCTAGGATTA
GAAGAGCTGACCTGATCTTCCAGCATCTGATATCCGCTCTCTTGTGGTGTAGGAC
GAGGCTCTTGAAGCAGTCTTGTGTATCAAACTTATCCAGAAAGGAGTGTAGGACT
TCTAGCAAAATTCGGGCTGTGATCAATGATATTTCTTGTGGCTTGTAGAAATTC
CGAGAAAATGATTTCTATGACTTGTCCGAACTTGAAGGAGAGCTGGTGGAAAAGGCT
GATCTATAGCAAGTGTGATCTCAAAAGAGCCAGCAAGCCAGCCACTGCTACCGGACTC
ACTACCGCCAGTGAAGCACTCTGCTCCAGGAGAGGCTGACCACTCCAGCAAGGCT
TTGAGGAGGCTTCAAGTCCAGCTGTGGGCTGTGGGAGGAGGAGGCTGATGACTCACTT
ACTAGGCTGAGGCTCTTGGGCTCCAGGATTTCTGCTAAGGAGAAAGATATGTTT
GTGAAGCTGGGCAATCAATCTCTTTGATAAAGGATGATTTAGGACTTCAAGAAAT
AAAAGTCCGCTTGAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA

A

MVGSALRRGAHAYVYLVSKAHSHSRGHQHQWFKSRPPAAECAQTRAPSVVLELGGKSPYDDHS
NLIRKVLTRVGRNLHQHPLWLKERVKEHFVYQVYGRFGTPI.FSVYDNLSPVVTWQNGDHS
LIPADHPSRKRKGDNYLNRTHMLRAHTSAHOWDLHAGLDALVGDVYRARDIQVPHFQL
EAVRFSKHELFLAGIKDESJLQFEQSSRAHKQJBTIEMVXKLVFDLQKTLTRJ.MAHLFGDLEI
RWDVDCPFTTFRS.FEMENHFQNEVLGGVMEQQLVNSAGAQRIGWAFGLGRLEMLMILYDI
PDRLFWCEBERFLKQFVSNINOKVKFQPSKYVAINDISFWLPSYENDEYDLVTRIGDVLV
EKVDLIDKVFHPKTHKTSCHYRITRYKHMRTLSQREVRHIIQALQEAAPVQLLQVEGRF

B

【 図 1 2 7 A 】

GCACCTGCGCCGCTCGCCGCTTTCGACCCAGTTCACGGCCACAGCTATGTTCTCCGAGCCGCGG
CGCGCGGACGCTTCTGGCTCTGGGCGGTTGTGTGCGCCGCTGGCTGGGCGTGGAGCTTACGA
TTTTGACCAACCAAGCAGCTGCAAGCCGCTGACAGCCGCTGACAGCCGAGCTTCCAGCACTGCTCAGC
CGCTGCTGCAI.TGGGIGGCTGGCTTCTCTCTTCTTCCAAAGTTCAGCAAGCCGCGCGCCAGCA
CGTGGCTCTGCTGAGCCGCGGCGACCACTACAGCCAGCTGATCTGTACCTGCTTACAGGAGGCTGG
TGGCCCACTTCAAGAACCCCTGCCTCAGTCCCAAGGAGGCTGGAAATCAAGAAATTTGAATGGT
TGGAGAGCTGATCGGACCACTCTCAAGAGGAGGCAAAATTTCAATTTCTGATGGTAACTTAAAGCA
AGGGCTCACTGACTTCAATATCAGGACTTCTTGGCAATTAAGCTTCTGCTGTGTGGTGAAGT
GTGAGACTCTGTGGATCACTTCCAAAGAACCCCTTCTCTCAAAAGGAGCAAAATTTGATGCTGT
ATGAATGAATCACTTCAACTGAAAGTAGATAAGTAAACTCTTAAATTTGACCAAAATTTATGCT
ACTGGACATTCGGGTTTGAATGGAATACTCACTCTCAGAAAGTGGAGGCTGTGTGGAGCTGTGGT
GGAGGACACTTCAACACATTTCTTACAGGCAAACTCCGCTTCAAGAGGCTGGCTGAGGAGCAATCC
CATTTATGACTCTCTGATGATGGGCGGAAGTTCTGTGATGCCAGGCTATGCTTTGGGAAATCTTAA
GCTATCTGAGAGTGGAGTGGATGAAAGAGGAAAGGACTTCTTCCATTCGAAATTCGAAATTTCTTFA
ACAGCACTCTGTGAGATGCAAGTAAAGCAAGATAATCAAAATGGAGGATAAATTTGATATTT
ATTTCAACCAAGAAATGGGAAACAAATTTGCTATCTGGATGGCTCTTCAATCAAGTCTTAGAGA
ATGCAACATGGGCAACTGATTTGTGATGCAATGATTTGGGAGCACTTGAACCTGAGGAGTAAATGTT
TGCAACCACTGATCCATCTGATTTAAATGGAAGTGTATCCGGTCCGCAATGATGAACCCAACTAT
GGCAAAATTTCTGGGAGAACTGGCTGCTGATTTGGCTTGGGAGCACTTGAACCTGAGGAGTAA
AGGTTCAACCTGAGAAAGGCTTTCAGCATAGGCTCACTCCAGTCCAGGCACTTCCAGTGGAGATCTCC
GAGTATCAAAATCTGCTTTCAGCACTTGGCTGATGATTTTCCGAAAGCTGGAGCAGATGCAAAATGAT
TCTTTGGCAAGTGTGAGGCTGAGTGGCTGATGACTTCTCAAAATGGGAGGAGTAAATGGTGTACTCT
CCCAACTCTGCTGCAATGGAGATGGTTCAGATGATAAAGATGAAATTTAAGACAGTACTCT
GGTGCAAGGATACTCAAGCTGTCTTCTCATATATCTCCAAATGGGAGTAAATTTGACAGGTTGAG
TCTGGATTCGATTTTCCAGGAAAGTGCATGCAAGGAGTGTGATGATGATTTTCAATTTCTTCACT
GTTGCAACTTCAAGTAAAGGCAAAATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
GAGTATCAAAATCTGCTTTCAGCACTTGGCTGATGATTTTCCGAAAGCTGGAGCAGATAAGGAGG
TGAAGTTAGGACATAAFAAAATGAAGAGCAGACAGATGATCTCAGGCTCAGCAAGCTTGAAGT
AAAATAAATTAACATAGGCGCTTAAAGGAGAAAGGCAACTGTTAATGATCCCTGCAAAATTTGAT
GAAATTTTCTACTCAAAATTTAAACCAATTTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
TTTCAIAAAATTTTATGATTCAGCAAGGAGTAAAGGCAACTGTTAATGATCCCTGCAAAATTTGAT
TTGTCAGGAAAGGAGAGTCTTTCAGCTGCTGAGTGAAGAAAGCTGCAAGTAAAGGAGGAGTGGCT
ACCATACAGTATGCTGACAGATCCAGCTGAGCTGAGCTTGTGATGATTTTATGATATTCATGCTTCA
ACTATATCAAGTTACTTTCAGAACTAATAATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GGATGACAAATCTCTGTTATTTCTGCTCTATTTTCTGCTTATGCTTATGCTTCTGTTAATAGCAAGT
AAITGGIAIAAACACAGGATACCACTCTTCTGCAACCCACTGCTGATGATGATGATGATGATGATG
TGTATG
AGCAAGCACTTCAAGGACTGTTTATAATAAGAAAGCAAGGACTTAAAGCAATGATGATGATGATGAT
CTGTCTCTCT
CTGCACTTGTCTCTTCCAGCAAGAGGCTGAGTAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
GATG
TCCAATCTGCAAGCTACTGATAATCACTTCTTCAAGGAGTAAAGGACTTCTGCTGAGAAAGTGGGAC
CTCTGCTGCTGGGCTGAGAAATGCACTGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
CTGGAGTGGAGAGCACTGAGCTTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
AAACAGGTTGCAAAATGAGGAGCTAGGCTTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
JAAGTACTTGTATGATAAAATATCTTAACTTCAACTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTT
TAGCTTCTGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
AAACTCAATTTAGGTTTATTTTCTACTTGGCAGTAAATAGGTTAATCTTATGAAATTTTATA
AGAACTTTTATGATTTCTTAACTGCTGCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
TTGCAATG

【 図 1 2 7 B 】

MCPRARAPATL.LLALGAVL.WPAAGA.WEL.TLITNDVHISRL.EQTESDSSKCVNASRCMGVVALF
TRVQQRRAEPLV.LLDAGDQYQGTWVYVYKGAELVAFHFNAL.RYDAMALGNHEFDNCGVGLIE
PLLEKAKFPLSBNKARKG.PLASQISL.YJYK.VLVP.GDVV.VVGGHSN.FYLPJ.TGNPSP.NLV.PAGKY
ALQPEVDK.LYLNK.NKJL.HGSGEMDKL.IAQKRV.GDVV.VVGGHSN.FYLPJ.TGNPSP.NLV.PAGKY
FVTSDDKRV.PYVQYAF.PCYL.CYKJ.EFDNR.NVSS.NPHL.LNSSI.PEDPSKADINRWIKLDR
YVTOELGKTVL.DYSSOS.RFR.ECNMGLIC.DAMIN.RL.FDTEM.VHWS.NLGNHWS.NLGNHWS.PD
ERNKNTI.WENL.AAVL.PGGT.LDL.VOL.KGST.KAF.HESVIRY.QSTGE.FLVGHYV.LV.LDRSP
GDR.VKLD.VLCT.KCR.VPSY.DPLK.MDEVYK.VILPN.FLANG.GDQ.MKIM.DELLRHSD.GDDQ.DNVST
YISK.MY.PV.AEGRK.FTCS.HGHSF.SL.FL.SL.VAVIF.VLYQ

【 1 2 8 】

AAGCTCCGCCCATGTAAGTAAAGTACTGATTTCTATAGCAAATCCAAATGTTCCCTTGG
TCGCCCCGTTACATATAACAAATGTTGTCATGTTGATTTGAAATACCTAGGACGGCAG
ACACACACACCTAGCTTCTCAGCGGGAGAGCAACCCCTTTCCTGGCCACCCGGGTTATCCCC
CAGGGAGTACGGGGGCTCAAAACACCCCTTTGGAGAACAAAGTGGGAAGCAAATTCAGGAA
GTAAACCTTCCGTAATAAATAAATAATCGAAATGCTTGGAGCCCATACATTTCCAGGT
TTTCTTAATTAAGCAATTTACTTCCACCACCCCTCCAACTGGGAATACCAACTGGTT
AGAGAAATGATTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTT
GCTTCCCAACTAATGATAGAGATATTAGGGCTAGTAAACCAAGTTTTACAAGACTCCTCT
CCCGGCTGGGGCCATTTGTCATGCTGTCCGCTCCCGCCACCTGAAAGGCTCCCGCCGCC
GACTGGGGTTTGGTTGGAAGAAGGAGAAATCCCGGAAAAGGCTGAGTCTCCAGCTCAAGG
TCAAAACCTTCCAGGGCCCAAGCCCTCCAGTTTCCCGTGGACACCTTGGCTGCTCTGCTG
TCAGGACCTTCTGGAAACCGCAATTTCTCATTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTT
GGAGATGAATGTTTCCCTTTGGCTGTTTTCGCAATGACTCTGAAATTAAGCGATGCTAAC
GCCTCTTTTCCCGCTAATTTGTTAAAGACTATGGACTGCAAGAAAGTGGCTCCGCTTCTCT
ACAGTGTGATTTGGATTCATGGCCATTTCTAAAGCCCTTTGAACCTGGGATAGTTGGCCGGG
TGGGCCATCAGGAATTTGCTGCTCATCTCGGGGAGACCTGGCCTTCAGAGATGACAGCA
TTTGGCCCGCAGGAGGCTGCAATTTGGCCCTCGGCTTCCAGCGTGTGCTGCCATG
GAATACAGCACAGTAAGGAGCTAAACAGAACTGCTGCTGAAATGGGGGAACCTGCATGG
TGGAGTCTTTTGTGCTCCCGCTCCCTCTTCTACGGACGGAACTGTGACCGAGATGTC
GCAAAGACAACGTGGGGTGTGGCCCAATGACACCTGGCTCCCGCAAGAGTGTCCCTGT
GTAAATGCTGGCACGGTACGCTCCGCTGCTTCTTCCAGGCAATTTCTACCCGGCTGTGATG
GCCCTTGTGATGATGAGACCTGTGGGCTTCCAGGACTCCAGAACTACACCGCTGTGAC
GTACTACACCTTTTATGCTAGCTGGCACTCTGCTTCTTATACAAAGCTACTATTAATCGCA
CATTTGACCTATTTCCAGAAATACAAATTTAGATATATGCAAAATTTTCAATGACCCGTAAG
GCTCTGCTACAAATGCTCAATAAAGAATGATCAATTTGATGTTGCTTAAATTAAGAA
TACAATTTCCAAACGGTCTTACATTTCTTACAGAACTAACTCTTCTACCTCTT
GCCCTGCCCTTCCCAAAAACACTCTTTTTCAAAAGAAAGTACGACATATCCCAT
TG1GCCCAAGTCCAGTGTCTTTTCTTTTGTGAGACGGAGTCTACTCTGTGACCCAG
GCTGGACTGCAATGACCGGATCTCGGTTCACTGCAACCTCCGATCCGGGTTCAAGCCA
TTTCTCCCTGCTCAGCTCCCAACTAGCTGGGATGACAGGCAATGTTGACCAATGCCGCTA
ATTTTCTGATTTTGTAGTAGAGACGGGGGTTCCACCAATATGGCCAGCTGGCTCCGAACT
CTGACCTTGTGATCCATCGCTCCGCTTCGAGTGTGAGATTACACAGCTGACGAACCTGT
GCAAGGCTTGGTGTGTTCTGATACATGTAATTTCTACCAAGGCTTCTTAAATATGTTCTTT
TAAATGATTAATATACACTCAGATATTTGGAGACTAAGCTAATGTTGGACCTTAGAAAT
ACAGTTTGTGACTAGAGTTGATCAAAATCAATTAATGATGCTCTTTAAAGCAAAAGCAAAA
CATCTTTAAAGGGAGGAAACCAAGTGTGAGAAATGGAAGTCCCTTCCGCTGTGTCGAC
GGAGACTGGGTAGAAAGAGGAGGCAAAATGAGAGAGAGAGGTTGAAAAACAAATGGGTT
ACTTGTATGGTGTATGAGTGGTGTAGAGAGCAAGTAAATAAGGCTTAAATGGAAGGCA
GTTTCCATCATCTATAGAAAGCTATGTAAGACAGGACTCCCTCTTTTTCCTCCAAAGGCA
TTGTAATAAGAAATGAACTCTCTTATGAAATAAATAATATACCTCAATGTCCCAACAGAA
TGCTTAAATAATTTGTTTCTTCCCAAGCTATCAATTTCTTAACTGTGTGTAAGAGAA
AATGTTTCAACAATATATTTAGTTTAAACCAAGTATCAAACTACATATTTGAAAGCCCAT
TTTTAAATACATTTGATAATATGTTGATGACAGTAAATAAGGAACTAATGACCTAA
AAAAAAAAGAAAGCAACCTTGGACGGGACGAGCATGCTTCCAGAACTCTCTCTT
CAGAGTTCCAAAGAGGGGATAAAAACATCTTTTAAAXCCAACAAAATGAC

【 1 2 9 】

CGGCTGAGCGGCTCGAGTGAAGAGCCCTTCCACGGCTCCCGCTGAGACAGTGGCC
TGCCATCCAAATCATCCATCCACCCCTGCTGTCATCTGTTTTCATAGTGGATCAAC
CACAGGAATATCCATGGCTTTTGTGCTCATTTTGGTTCCTCATTTCTAGAGAGTGGCTGTC
AGGACAGTGGCAAGTCACTGGAACGGGGAAAGTTTCCAGGCTTGGTGGGGAGGACCG
CGTGTTCCTGCTTCCCTCTTCTTGGAGACAGTGGAGGCTTGGAAAGTGGCGTCTTCT
GAGGAATCAGTTCACAGCTCTGCTTCCCTGACAGAGATGGGGAACACTGGGAATCTAA
GCAGATGCCCACAGTATCGAGGGAGAACTGACTTCTGGAAGGCTCTATGAGGAGTGG
TGCTCTCTAAGGCTAAAAAACATCACTCCCTCCGGACATCGGCTGATAGGCTGCTGGT
CAGTCCCAAGTTTACGATGAGGAGCCACTGGGAGCTGGCGGTGGCAGCACTGGCTC
ACTTCCCTCATTTCCATCGTGGGATATGTTGACGGAGGATATCCAGTACTCTGCGGCTGTC
CTCAGGCTGGTTCCTCCAGCCACAGCCAAAGTGGAAAGGCTCCACAGGACAGGATTTGTC
TTCAGACTTCCAGCAAAATCGAGTGGCTTCCAGTGGCTGATAGTGGAGACTTCCATAT
AGTCCAGAAATGCTGGGAGCATATTTGTTCATCCACCTCTGCTGAGCAGAGATGATGA
GGGGAAATCCAGGATATGATAGGAGAGACTTTTCCAGCCCTCAGCTTGGCCCTGGC
TCTATTTTACTCGGCTTACTCTGTTGGCTGTTGGTGTGTTGCTCATGGGATGATAAT
TCTTTCTTCAAAATCCAAAGGGAAAAATCCAGCGGCAACTGGACTGGAAAGAAAGACAGG
ACAGGCAAGATTTGAGAGACGGCCGGAACACAGCTAGTGGAGTGGACTTGGATCCAGAGAC
GGCTACCCGAGGCTCTGCTTCTGATGTAACACTGTAAACCAATGAAAGCTCCCA
GGAGGTGCTCCTGATGAGAAAGATTAACAAGGAAAGGCTGGTGGCTTCCAGGGTTC
CCAGCAGGAGACAACTACTGGGAGGTGGACGCTGGGCAAAAATAGGTTGATGTTGGG
AGTGTGGGGAAGGACTAGACAGGGGAAAGAAATGCTGCTTCTCCCAACAAATGG
GTAATGGGCTTCCAGACTGACAAACAGAAATTTGATTTGACTTCAATCCCAATTTTAT
CAGCTTCCCGCCAGCACCCCTTCTACAGAGTATGGGCTTCTTCCCTGACTATGAGGGTGG
GACCATCTCTCTTCAATAAATGACAGCTCCCTATTTATACCTCTGCTGACTGTGCA
GTTTGAAGGCTTGTGGAGCCCTATATCCAGACTGGATGATGAGGAGAAAGGGGAC
TCCCATATCATATGTCAGTGTCTGGGATGAGACAGAAAGCCCTGCTTAAAGGGC
CCCAACCAAGACCCAGACACAGCCAAAGGGAAGTGTCCCGCAAGTGGCCCGAGCTT
CCTCTCCGAGCTGGCCACAGAGGACTCAGCCCGCCACTCTCTTAAAGGAGCTGAGGT
TCTTCTGCTTGGCCCTGACAGCGGCGAGTACAGTCCAGATGAGGAGTGGGATTTGGC
CTGACCTCTGGGAGTGAAGAACTAGCTGCTCCTCAAGTGGGAGGAAATGACTCACA
TTAGGTTTGTGTTTGAAGAACTCCAGCTAGGAGATCTGAAACAAATGACAACTCC
CAGGCTCTCATTTGCTAGTACAGGACAGTGTACTGCTCCTCAGGCTGAAATTAAGA
GACAACGAATGTGAATCATGCTTGGAGGTTGAGGCGACAGTGTGCTTAAATGATGTT
TTTTATATATACATTTTCCACCAATAAATCTGTTGCTTATTCAGACTTAAATTTACTTT
TCTTATACCAATACCCCAAGGAAATGATTAATGAAACACTGCTTGTGGAGCTCAAGAA
ATAAAGCAGGAGTGGATTTTCTACTGATTTCTAAAGCCCAAGTATCTGATACAA
CCAGGCAAAAGAAACAGAAAGAGGAAAGGAAACTACAGGTTCCATCTCCCTATTAACA
CAGACAAAAATTTTAAATAAATTTTAAACAAATTAACAAATATATTAAGAT
GATAATAACTACTCAGTGTGTTTCCCAACAAATGCAAGTGTGTTAAATTTAAAT
ATCAACCAAGTGAATTCAGACCAATTAATAAGTAAAAAAGAAACCAATAAAAAA
AAA

A

MAFVLLVLSFYELVSGQWVOTGPKFVQALVGEDAVFSCSLFPETAEMEAMVRFNRQFHAVVHLYRDGED
WESKQMPQYRGRTEFVKDSIAGGRVSLRKNITPDSIDGLVWFSSQIYDEATWELRVAALGSLPLISIVGY
DUGJLILLSSGWFPQPIAKWKPQQLDSUSRANADYSLYDVBESHVQENAGSHLCSHLAQSHVESK
VLIGETTFQSPWRASILLGLLQALCVVMGMHVFKSKGKQALDWRKRGKQALDWRKRGKQALDWRK
PETAHKLVSDLVTRHRAKQVPHSEKFRTRKSVASGGFQAQKHYWEVDVGNVWYVWCRDDVD
RKNVNVLPNSNYYWVLYTEHLVFTFPHHLLPSP1PPTRVGVFLDYEGGTFISFNTDQSLIYLLTQOFE
GLLRPYIQHAMYDEEKGTFICPVSWG

B

【 1 3 0 】

ctctctcag ctgtcttca gaagccctg tgggnaagi ccgtagcat ctgttacc gptctgaga aqctctgaa ctctctacc
gucctctac acagctacc cctgataag ggaattcc atgccccta cagggaagc ctgaagaaat tcttagaac
caggtctct cagltatca gnaaaagg tgcyaactc tggctcaag agtggat caacactgt ggtcagttc
atctcagga gttctcat ctgtgataa agatggcty gcaagcaaa aaaaagcca tgaagaaag cacaagagt
agttagtia ctgcccagag gtaggccc tgaatgac ctgagaata ataagctat ctatctca aaaaaaaa
aaaaaaaa

A

Met Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Ser Ile Ile Asp Val Tyr His Lys Tyr Ser Leu Ile Lys
Gly Asn Phe His Ala Val Tyr Arg Asp Asp Leu Lys Lys Leu Leu Glu Thr Glu Cys Pro Gln Tyr Ile
Arg Lys Lys Gly Ala Asp Val Trp Phe Lys Glu Leu Asp Ile Asn Thr Asp Gly Ala Val Asn Phe Gln
Glu Phe Leu Ile Leu Val Ile Lys Met Gly Trp Gln Pro Thr Lys Lys Ala Met Lys Lys Ala Thr Lys
Ser Ser

B

【 1 3 1 】

gcactccaa agaacgggt actcaaac gacgacat gttctttag ctaaaacca tggctgtac caagattg ctcttggct
ctttgatg agtctgcta ctccacct gggcgaae agaacgca agcaattg actgctgt tggatcaca accgtatc
ttactcna atttattg gttctaac ggcagctg caaagaag tggacata algctatc ctctcaaca aaaaaaag
tggctgtg ctcaatcca aaacagat ggtgaaata tttgtgtg ctctcagta aaaaatca gaaatgaa aaacttggc
ttttgaa tgaattgga ctatgcca gaacgaag aacttctg ggttggag ttccatgc aactatgga ggttttagt
ctttcaat ttgctccta ctggactg caattatg aattgac atattgac atattgct ttgttaag acaactaa
agttaacg tttttatt tattatag tggattt ctgtttag ctatttata ctatttcc atagctat ttgtttat gaaattga
aaatatt tgggggga taagtata tggactt tgaagcaag aagctatt taaaaaaa ctatttata tttttt
tatattgt ttctctaa atttgtta ttcaata aataagaa aatattata agacaat tgaataaa gaaacaaa
gtttctgt ta

A

Met Cys Cys Thr Lys Ser Leu Leu Ala Ala Leu Met Ser Val Leu Leu His Leu Cys Gly
Glu Ser Glu Ala Ala Ser Asn Phe Asp Cys Cys Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Leu His Pro Lys Phe
Ile Val Gly Phe Thr Arg Gln Leu Ala Asn Glu Gly Cys Asp Ile Asn Ala Ile Ile Phe His Thr Lys
Lys Lys Leu Ser Val Cys Ala Asn Pro Lys Gln Thr Trp Val Lys Tyr Ile Val Arg Leu Leu Ser Lys
Lys Val Lys Asn Met

B

【配列表】

2011509071000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成22年8月3日(2010.8.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳動物被検者における炎症性腸疾患（IBD）の存在を診断する方法であって、上記被検者から得られた試験試料における配列番号：70に示されたポリペプチドをコードする核酸の発現レベルがコントロールの発現レベルに対して高いことを決定し、上記高い発現レベルが、試験試料が得られた被検者におけるIBDの存在を示す方法。

【請求項2】

上記哺乳動物被検者がヒト患者である請求項1に記載の方法。

【請求項3】

上記発現レベルのエビデンスが遺伝子発現プロファイリング法によって得られる請求項2に記載の方法。

【請求項4】

上記方法がPCRベースの方法である請求項2に記載の方法。

【請求項5】

上記発現レベルが一又は複数の参照遺伝子又はその発現産物の発現レベルに対して正規化される請求項3に記載の方法。

【請求項6】

上記遺伝子又はその発現産物の少なくとも二の発現レベルのエビデンスを決定することを含む請求項1に記載の方法。

【請求項7】

上記遺伝子又はその発現産物の少なくとも三の発現レベルのエビデンスを決定することを含む請求項1に記載の方法。

【請求項8】

上記遺伝子又はその発現産物の少なくとも四の発現レベルのエビデンスを決定することを含む請求項1に記載の方法。

【請求項9】

上記遺伝子又はその発現産物の少なくとも五の発現レベルのエビデンスを決定することを含む請求項1に記載の方法。

【請求項10】

上記IBD検出をまとめるレポートを作成する工程を更に含む請求項1に記載の方法。

【請求項11】

上記IBDが潰瘍性大腸炎である請求項1に記載の方法。

【請求項12】

上記IBDがクローン病である請求項1に記載の方法。

【請求項13】

上記IBDが潰瘍性大腸炎及びクローン病である請求項1に記載の方法。

【請求項14】

上記試験試料が結腸組織生検由来である請求項1に記載の方法。

【請求項15】

上記生検が、回腸末端、上行結腸、下行結腸、及びS状結腸からなる群から選択される組織由来である請求項14に記載の方法。

【請求項 1 6】

上記生検が炎症結腸領域由来である請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

上記生検が非炎症結腸領域由来である請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 8】

上記決定工程が、上記哺乳動物被検者における I B D の再発を示し、上記哺乳動物被検者が過去に I B D と診断され、該過去に診断された I B D に対して治療されている請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

上記治療が手術からなる請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

上記決定工程が、上記哺乳動物被検者における上記 I B D の突然の再発を示す請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 1】

治療を必要とする哺乳動物被検者における炎症性腸疾患 (I B D) を治療する方法であって、

(a) 上記被検者から得られた試験試料における配列番号 : 7 0 に示されたポリペプチドをコードする核酸の発現レベルがコントロールの発現レベルに対して高いことを決定する工程であって、上記高い発現レベルが、試験試料が得られた被検者における I B D の存在を示す工程と ;

(b) 有効量の I B D 治療剤を上記被検者に投与する工程を含む方法。

【請求項 2 2】

上記哺乳動物被検者がヒト患者である請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

上記発現レベルのエビデンスが遺伝子発現プロファイリング法によって得られる請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

上記方法が P C R ベースの方法である請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

上記発現レベルが一又は複数の参照遺伝子又はその発現産物の発現レベルに対して正規化される請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

上記遺伝子又はその発現産物の少なくとも二の発現レベルのエビデンスを決定することを含む請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 7】

上記遺伝子又はその発現産物の少なくとも三の発現レベルのエビデンスを決定することを含む請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 8】

上記遺伝子又はその発現産物の少なくとも四の発現レベルのエビデンスを決定することを含む請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 9】

上記遺伝子又はその発現産物の少なくとも五の発現レベルのエビデンスを決定することを含む請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 0】

上記 I B D 検出をまとめるレポートを作成する工程を更に含む請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 1】

上記 I B D が潰瘍性大腸炎である請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 2】

上記 I B D がクローン病である請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

上記 I B D が潰瘍性大腸炎及びクローン病である請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

上記試験試料が結腸組織生検由来である請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 5】

上記生検が、回腸末端、上行結腸、下行結腸、及び S 状結腸からなる群から選択される組織由来である請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

上記生検が炎症結腸領域由来である請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 7】

上記生検が非炎症結腸領域由来である請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 8】

上記決定工程が、上記哺乳動物被検者における I B D の再発を示し、上記哺乳動物被検者が過去に I B D と診断され、該過去に診断された I B D に対して治療されている請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 9】

上記治療が手術からなる請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

上記決定工程が、上記哺乳動物被検者における上記 I B D の突然の再発を示す請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 4 1】

上記 I B D 治療剤がアミノサリチル酸である請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 4 2】

上記 I B D 治療剤がコルチコステロイドである請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

上記 I B D 治療剤が免疫抑制剤である請求項 2 1 に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2008/085045

| | | |
|--|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 | | |
| 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) C12Q | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, 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 | LAWRANCE I C ET AL: "Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes" HUMAN MOLECULAR GENETICS 1 MAR 2001,, vol. 10, no. 5, 1 March 2001 (2001-03-01), pages 445-456, XP002501364 abstract; table 1 | 1,3-6, 12-21 |
| X | WO 2006/063133 A (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; SHUKTI CHAKRAVARTI [US]; WU FENG [US]) 15 June 2006 (2006-06-15) claims 1-5; tables 1-3 | 1,3-6, 12-21 |
| | -/-- | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. |
| * Special categories of cited documents : | | |
| <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*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)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> | | <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*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</p> <p>*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.</p> <p>*B* document member of the same patent family</p> |
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report | |
| 27 March 2009 | 21/08/2009 | |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Franz, Cerstin | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/085045

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|------------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WEHKAMP JAN ET AL: "Reduced Paneth cell -defensins in ileal Crohn's disease" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC.; US, vol. 102, no. 50, 13 December 2005 (2005-12-13), pages 18129-18134, XP009110688 ISSN: 0027-8424 the whole document | 1,3-6, 12-21 |
| X | ROBERT BERKOW ET AL: "Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Chronic Inflammatory Diseases of the Bowel" MERCK MANUAL OF DIAGNOSIS AND THERAPY; [MERCK MANUAL], RAHWAY, MERCK RESEARCH LABORATORIES, US, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 830-834, XP002493450 ISBN: 978-0-911910-16-2 pages 831-836 | 22, 24-27, 33-45 |
| X | WO 2007/081486 A (VENTRIA BIOSCIENCE [US]; UNIV CALIFORNIA [US]; WEHKAMP JAN [DE]; HUANG) 19 July 2007 (2007-07-19) the whole document | 22, 24-27, 33-45 |

7

International Application No. PCT/US2008/085045

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 11, 32

Rule 39.1(v) PCT - Presentation of information

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 7-10, 28-31

Present claims 7-10 and 28-31 relate to an extremely large number of possible combinations of expression biomarkers for detection of IBD. In fact, the claims contains so many options that a lack of clarity within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Furthermore, not all possible combinations of expression biomarkers are disclosed and supported according to the requirements of Articles 5 and 6 PCT.

Consequently, the search was limited to those parts of the application which do appear to be clear and which are disclosed and supported, namely single diagnostic gene expression markers for the diagnosis of IBD and clearly defined sets of markers selected from the listed genes of claims 1 and 2 (see item IV below). However, it has to be pointed out with regard to the unity reasoning below that the validity of each diagnostic marker and its function to be sufficient as a single diagnostic marker has to be disclosed and supported. In particular, this has to be considered when paying for further inventions (see item IV below). Further, it is not evident, which combination of markers would be disclosed and supported in the sense of Article 5 and 6 PCT. If the applicant chooses as a further invention to be searched a set of markers, said set has to be defined by the individual genes and their respective SEQ ID No#s and moreover has to be supported and disclosed as such in the application.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2)PCT declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

international application No.
PCT/US2008/085045

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

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

- 1. Claims Nos.: 11, 32
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Rule 39.1(v) PCT - Presentation of information
- 2. Claims Nos.: 7-10, 28-31
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

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

see annex

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2008 /085045

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: Claims 1, 3-6, 12-22, 24-27, 33-45 all partially

Method of diagnosing the presence and methods of treating an inflammatory bowel disease in a mammalian subject, comprising determining that the level of expression of the nucleic acid encoding a polypeptide as defined by SEQ ID NO#2 (Defensin alpha 6 (DEFA6)) is higher relative to the level of expression in a control and thereby indicative of the presence of IBD in a subject and administering an effective amount of an IBD therapeutic agent.

Invention 2: Claims 1, 3-6, 12-22, 24-27, 33-45 all partially

Method of diagnosing the presence and methods of treating an inflammatory bowel disease in a mammalian subject, comprising determining that the level of expression of the nucleic acid encoding a polypeptide as defined by SEQ ID NO#4 (Defensin alpha 5 (DEFA5)) is higher relative to the level of expression in a control and thereby indicative of the presence of IBD in a subject and administering an effective amount of an IBD therapeutic agent.

Invention 3-93: Claims 1, 3-6, 12-22, 24-27, 33-45 all partially

Method of diagnosing the presence and methods of treating an inflammatory bowel disease in a mammalian subject, comprising determining that the level of expression of the nucleic acid encoding a polypeptide as defined by each of the SEQ ID Nos# 6-172 (only even numbers), 194, 197, 199, 201, 203, 205, 207 and 230 being higher relative to the level of expression in a control and thereby indicative of the presence of IBD in a subject and administering an effective amount of an IBD therapeutic agent.

Invention 94: Claims 2-6, 12-21, 22-27, 33-45 all partially

Method of diagnosing the presence and methods of treating an inflammatory bowel disease in a mammalian subject, comprising determining that the level of expression of the nucleic acid encoding a polypeptide as defined by SEQ ID NO#108 is lower relative to the level of expression in a control and thereby indicative of the presence of IBD in a subject and administering an effective amount of an IBD therapeutic agent.

Inventions 95-114: Claims 2-6, 12-21, 22-27, 33-45 all partially

International Application No. PCT/US2008/085045

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Method of diagnosing the presence and methods of treating an inflammatory bowel disease in a mammalian subject, comprising determining that the level of expression of the nucleic acid encoding a polypeptide as defined by each of the SEQ ID Nos# 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225 and 228 being lower relative to the level of expression in a control and thereby indicative of the presence of IBD in a subject and administering an effective amount of an IBD therapeutic agent.

Inventions 115 { 200: Claims 7-10 and 28-31.

Method of diagnosing the presence and methods of treating an inflammatory bowel disease in a mammalian subject, comprising determining the level of expression of a set of genes (to be clearly identified by a specific selection of a diagnostic group of genes that is disclosed and supported).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/085045

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 2006063133 A | 15-06-2006 | EP 1844158 A2 | 17-10-2007 |
| WO 2007081486 A | 19-07-2007 | NONE | |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|--------------------------|----------------|------------|
| A 6 1 K 31/606 (2006.01) | A 6 1 K 31/606 | |
| A 6 1 K 31/573 (2006.01) | A 6 1 K 31/573 | |
| A 6 1 K 45/06 (2006.01) | A 6 1 K 45/06 | |
| A 6 1 P 1/00 (2006.01) | A 6 1 P 1/00 | |
| A 6 1 P 17/00 (2006.01) | A 6 1 P 17/00 | |
| A 6 1 P 19/00 (2006.01) | A 6 1 P 19/00 | |
| A 6 1 P 1/02 (2006.01) | A 6 1 P 1/02 | |
| A 6 1 P 7/06 (2006.01) | A 6 1 P 7/06 | |
| A 6 1 P 1/16 (2006.01) | A 6 1 P 1/16 | |

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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. フロッピー

- (72)発明者 アッバス, アレクサンダー, アール.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 7 0, サン カルロス, カルメリタ ドライブ 2
1 6 4
- (72)発明者 クラーク, ヒラリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 3 1, サン フランシスコ, ノー ストリート 1
5 0 4
- (72)発明者 ディール, ローリ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 2 4, ロス アルトス, ホリデイル コート 1 4
6 0
- (72)発明者 リーズ, チャールズ
イギリス国 イーエイチ4 9 7 イーエル ウェスト ロージアン, リンリスゴー, ライオン
ウェル ワインド 4
- (72)発明者 ノーブル, コリン, エル.
イギリス国 イーエイチ5 3 キューエフ ミッドロージアン, エディンバラ, フェリー ロ
ード 3 7 2, ダンケルド ハウス
- (72)発明者 サトサング, ジャック
イギリス国 イーエイチ1 0 5 イーティ ミッドロージアン, エディンバラ, ティパーリン
ロード 1 0 エー

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA02 CA09 CA12 HA12
4B063 QA01 QA19 QQ53 QQ58 QR08 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34
4C084 AA20 NA05 ZA55 ZA66 ZA67 ZA75 ZA89 ZA96
4C086 AA01 AA02 DA10 DA17 NA05 ZA55 ZA66 ZA67 ZA75 ZA89
ZA96

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 炎症性肠病的基因表达标志物 | | |
| 公开(公告)号 | JP2011509071A | 公开(公告)日 | 2011-03-24 |
| 申请号 | JP2010536200 | 申请日 | 2008-11-26 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 健泰科生物技术公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | Genentech公司 盐湖城旧学院的爱丁堡的盐湖城法院 | | |
| [标]发明人 | アッバスアレクサンダーアール クラークヒラリー ディールローリ リーズチャールズ ノーブルコリンエル サトサンギジャック | | |
| 发明人 | アッバス, アレクサンダー, アール. クラーク, ヒラリー ディール, ローリ リーズ, チャールズ ノーブル, コリン, エル. サトサンギ, ジャック | | |
| IPC分类号 | C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 A61P1/04 A61K45/00 A61K31/606 A61K31/573 A61K45/06 A61P1/00 A61P17/00 A61P19/00 A61P1/02 A61P7/06 A61P1/16 | | |
| CPC分类号 | A61P1/00 A61P1/02 A61P1/04 A61P1/16 A61P7/06 A61P17/00 A61P19/00 C12Q1/6809 C12Q1/6883 C12Q2600/106 C12Q2600/156 C12Q2600/158 C12Q2600/172 C12Q1/6844 | | |
| FI分类号 | C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/53.M A61P1/04 A61K45/00 A61K31/606 A61K31/573 A61K45/06 A61P1/00 A61P17/00 A61P19/00 A61P1/02 A61P7/06 A61P1/16 | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QQ58 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4C084/AA20 4C084/NA05 4C084/ZA55 4C084/ZA66 4C084/ZA67 4C084/ZA75 4C084/ZA89 4C084/ZA96 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/DA10 4C086/DA17 4C086/NA05 4C086/ZA55 4C086/ZA66 4C086/ZA67 4C086/ZA75 4C086/ZA89 4C086/ZA96 | | |
| 优先权 | 60/991203 2007-11-29 US PCT/US2008/064562 2008-05-22 WO 61/192268 2008-09-17 US | | |
| 其他公开文献 | JP2011509071A5 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及用于炎性肠病发病机理的基因表达谱分析方法，其中测定来自哺乳动物受试者的一种或多种IBD标志物相对于对照的测试样品中的差异表达，其中文本样品中的差异表达表示获得测试样品的哺乳动物受试者中的IBD。

表 1 A

| 遺伝子 | 遺伝子 | 配列番号 種別, アミノ酸 | 図 |
|---|--------|------------------|------|
| グロブリン $\alpha 6$ (DEFA6) | CD, UC | 1, 2 | 8 |
| グロブリン $\alpha 5$ (DEFA5) | UC | 3, 4 | 9A-B |
| グロブリン $\beta 14$ (DEFB14) | UC | 229, 230 | 9C-D |
| HL-3 レセプター, α 低親和性 (HL3RA) | CD | 5, 6 | 10 |
| HL-2 レセプター, α (HL2RA) | CD, UC | 7, 8 | 11 |
| 再生膜誘導 3 γ (REG3G) | CD, UC | 9, 10 | 12 |
| 再生膜誘導 1 β 誘導 ストーンタンパク質 (REG1B) | CD, UC | 11, 12 | 13 |
| カリウム電位依存性チャネル, Shal 関連サブファミリー (KCND3) | CD, UC | 13, 14 | 14 |
| ヒトマウスマウス炎症性タンパク質 3 (MIP-3a) | CD, UC | 15, 16 | 15 |
| 内皮細胞増殖因子 1 微小膜由素 (ECGF1) | CD, UC | 17, 18 | 16 |
| インターロイキン 1 β (IL1B) | CD, UC | 19, 20 | 17 |
| 増殖調節タンパク質 γ (MIP2BGR0-g) | CD, UC | 21, 22 | 18 |
| ケモカイン C-X-C 亜ファミリー 1 (CXCL1) | CD, UC | 23, 24 | 19 |
| アポトーシスタンパク質 1 阻害剤 (API1) | CD, UC | 25, 26 | 20 |
| カスパーゼ 5, アポトーシス関連システインプロテアーゼ (CASP5) | CD, UC | 27, 28 | 21 |
| アポトーシス阻害因子 1 (DMBT1) | CD, UC | 29, 30 | 22 |
| プロトカドヘリン 17 (PCDH17) | CD, UC | 31, 32 | 23 |
| インターフェロン誘導性タンパク質 9-27 (IFITM1) | CD, UC | 33, 34 | 24 |
| PDZK1 相互作用タンパク質 1 (PDZK1HP1) | CD, UC | 35, 36 | 25 |
| IRTA2 / FCRH5 (IRTA2) | CD | 37, 38 | 26 |
| 溶質輸送体ファミリー 40 鉄調節トランスポーター 1 (SLC40A1) | CD, UC | 39, 40 | 27 |
| 免疫グロブリン重可変 4-4 (IGHV4-4) | CD, UC | 41, 42 | 28 |
| 再生膜誘導 3 γ (REG3G) | CD, UC | 43, 44 | 29 |
| アタラクシン 9 (ADP9) | CD, UC | 45, 46 | 30 |
| オルファクトモジン 4 (OLFEM4) | CD, UC | 47, 48 | 31 |
| S100 カルシウム結合タンパク質 A9 カルグラニニリン B (S100A9) | CD, UC | 49, 50 | 32 |
| ims-5 亜ファミリー C, エレガンス様 (UNC5CL) | CD, UC | 51, 52 | 33 |
| G タンパク質共役レセプター 110 (GPR110) | CD, UC | 53, 54 | 34 |
| HLA-G 組織適合抗原, クラス I G (HLA-G) | CD, UC | 55, 56 | 35 |
| トランスフェリン 1, ATP-結合ドメイン, サブファミリー B MDR/TAP (TAP1) | CD, UC | 57, 58 | 36 |
| マイトコンドリアタンパク質 1, ATP-結合ドメイン, サブファミリー B MDR/TAP (TAP1) | CD, UC | 59, 60 | 37 |
| ニピキチン D | CD, UC | 61, 62 | 38 |
| γ -アミノ酪酸 GABA B レセプター, 1 | | | |