

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5709341号
(P5709341)

(45) 発行日 平成27年4月30日(2015.4.30)

(24) 登録日 平成27年3月13日(2015.3.13)

(51) Int.Cl.		F I			
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	Z N A A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53	M
G O 1 N	33/566	(2006.01)	G O 1 N	33/566	

請求項の数 13 (全 33 頁)

(21) 出願番号	特願2006-541986 (P2006-541986)	(73) 特許権者	591100596
(86) (22) 出願日	平成16年12月3日(2004.12.3)		アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ
(65) 公表番号	特表2007-515955 (P2007-515955A)		サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ
(43) 公表日	平成19年6月21日(2007.6.21)		ディカル
(86) 国際出願番号	PCT/FR2004/003115		フランス国、エフー75013 パリ、リ
(87) 国際公開番号	W02005/056828		ユ・ドゥ・トルビアック 101
(87) 国際公開日	平成17年6月23日(2005.6.23)		
審査請求日	平成19年10月26日(2007.10.26)		
審判番号	不服2011-20001 (P2011-20001/J1)		
審判請求日	平成23年9月15日(2011.9.15)		
(31) 優先権主張番号	0314289		
(32) 優先日	平成15年12月5日(2003.12.5)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 個体の再構成又は標的遺伝的組換えの定量的評価の方法及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも：

(a) 個体の血液試料又は生検からのヒトゲノムDNAの抽出、

(b) マルチプレックスPCRによる、

* 次の特徴：

- 一つのプライマ対の少なくとも1つのプライマが、遺伝子再構成に関係し得る、増幅されるVx遺伝子の上流及び/又は5'末端にハイブリダイズし；

- 一つのプライマ対の少なくとも他方のプライマが、遺伝子再構成に関係し得る、増幅されるJy遺伝子の下流及び/又は3'末端にハイブリダイズする

に対応するように選択される1又はそれより多いプライマ対と、

* 数百塩基対～数十kbのサイズのゲノムDNAセグメントを増幅するための、伸長を実質的に向上させることができる訂正活性を有するDNAポリメラーゼ又はDNAポリメラーゼの混合物

との存在下での、前記ゲノムDNAの数百塩基対～数十kbのサイズのセグメントの増幅であって、

最初の変性工程に加えて、変性、ハイブリダイゼーション及び伸長のサイクルを含み、伸長工程は68～72で少なくとも10分間行われる増幅；

c) DNA標識化剤の存在下、ゲルでの電気泳動による、増幅されたgDNA断片の分離；及び

d) UV領域内又は他の適切な波長での励起後の、再構成されたか又は組換えられたセグメ

10

20

ントのゲル上での直接検出

を含むことを特徴とする、個体のT細胞受容体 (TCRAD) 遺伝子座の再構成の定量的評価の方法。

【請求項 2】

a) 個体の血液試料又は生検からのヒトゲノムDNAの抽出、

b) マルチプレックスロングPCRによる：

* 次の特徴：

- プライマVとよばれる、一つのプライマ対の少なくとも1つのプライマが、T細胞受容体の鎖の可変ドメイン(TCRAD)のVセグメントに対応する、増幅されるVx遺伝子の組換えシグナル配列(RSS)の上流に位置する領域に特異的にハイブリダイズし、

- プライマJとよばれる、一つのプライマ対の少なくとも1つのプライマが、T細胞受容体の鎖のJセグメントに対応する、増幅されるJy遺伝子のRSSの下流に位置する領域、増幅される前記Jy遺伝子の3'末端又は増幅される前記Jy遺伝子内に特異的にハイブリダイズする

に対応するように選択される1又はそれより多いプライマ対と、

* 数百塩基対～数十kbのサイズのゲノムDNAセグメントを増幅するための、伸長を実質的に向上させることができる訂正活性を有するDNAポリメラーゼ又はDNAポリメラーゼ混合物との存在下での、前記ゲノムDNAの数百塩基対～数十kbのサイズのセグメントの増幅であって、

最初の変性工程に加えて、変性、ハイブリダイゼーション及び伸長のサイクルを含み、該伸長工程は68～72 で少なくとも10分間行われる増幅、

c) DNA標識化剤の存在下、ゲルでの電気泳動による、増幅されたgDNA断片の分離、及び

d) UV領域内又は他の適切な波長での励起後の、組換えられたV(D)Jセグメントのゲル上での直接検出

を含むことを特徴とする、請求項1に記載の個体のTCRAD遺伝子座の遺伝子再構成を分析することによるヒト個体の免疫レパトアの定量的評価の方法。

【請求項 3】

増幅工程(b)において、プライマの選択が：

- 関係する遺伝子座全体の、適切なソフトウェアを用いる系統的分析、

- 3'OH末端が興味対象の領域にのみ相補的なプライマの選択、

- プライマ二量体又は安定なヘアピンを形成するプライマの、特に、適切なソフトウェアでの分析による排除、及び

- 互いにハイブリッドを形成するプライマ対の排除

により行われることを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

プライマ対V/JのプライマV及びJが、配列番号1～21の配列のプライマからなる群より選択されることを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

増幅工程(b)が、さらに、次のセグメント：TCR、鎖のDセグメント、Vセグメント及びJセグメント並びに任意に免疫グロブリン鎖のセグメントの少なくとも1つを増幅するための追加のプライマを用いることを特徴とする請求項1～4のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 6】

増幅工程(b)において、マルチプレックスロングPCR(LPCR)反応が、DNA精製の後に又は細胞溶解物に対して直接行われることを特徴とする請求項1～5のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 7】

増幅工程(b)において、伸長工程を、追加の伸長サイクル当たり15～20秒増加させることを特徴とする請求項1～6のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 8】

10

20

30

40

50

工程(c)がパルスフィールド泳動により行われることを特徴とする請求項1~7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

- 治療の始めに請求項2~8のいずれか1つに記載の免疫レパトアの評価の方法を実行し、
- 前記評価方法が、治療のさまざまな段階で反復され、かつ
- 個体の前記治療に対する応答を評価するために、毎回得られる免疫レパトアのプロフィールを標準免疫レパトアのプロフィールと比較することを特徴とする、関係する個体において免疫レパトアが初めに改変された病理に対する治療のフォローアップを補助するデータを取得する方法。

10

【請求項10】

- 病理のさまざまな段階で請求項2~8のいずれか1つに記載の免疫レパトアの評価の方法を実行し、かつ
- 前記病理の進展を評価するために、毎回得られる免疫レパトアのプロフィールを標準免疫レパトアのプロフィールと比較することを特徴とする、関係する個体において免疫レパトアが改変される病理のさまざまな段階での抗原受容体レパトアを測定する方法。

【請求項11】

前記生体試料が、胸腺細胞、末梢血からのTリンパ球、他のリンパ系器官からのTリンパ球、種々の器官からのTリンパ球及び腫瘍又は炎症部位からのTリンパ球からなる群より選択されるTリンパ球からなることを特徴とする請求項1~10のいずれか1つに記載の方法

20

【請求項12】

PCRを行うための通常のバッファー及び試薬に加えて、配列番号1~21の配列のプライマからなる群より選択される一对のプライマを含むことを特徴とする、請求項1~11のいずれか1項に記載の方法を実施するためのキット。

【請求項13】

配列番号1~21の配列のプライマからなる群より選択される一对のプライマの、請求項1~11のいずれか1項に記載の方法を実施するための使用。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、個体の再構成(rearrangement)又は標的遺伝的組換え、特に個体の免疫レパトア(immune repertoire)の定量的評価の方法、並びに特に治療のフォローアップの場合あるいはある病理の診断及び/又は予測(prognosis)におけるその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

T及びBリンパ球は、免疫応答の適応(adaptation)において主要な役割を演じる。これらは、特異的受容体の2つの群：T細胞受容体(TCR)及び免疫グロブリン(Ig)により多数の抗原を認識することができる。TCRは、MHCクラスI又はクラスII分子に結合した形で、抗原提示細胞により該TCRに提示される抗原により刺激される(1、2)。

40

【0003】

各TCR(抗原特異的)は、T細胞表面で発現され、膜に結合した2つのヘテロダイマーからなり、CD3複合体と連結している。これらのヘテロダイマーは、互いにジスルフィドブリッジを介して連結している2つの又はポリペプチド鎖で構成される(3)。各鎖は可変ドメイン(V)及び定常ドメイン(C)を含む。可変領域の と 又は と は、抗原結合ゾーンを形成する(4、5)。TCRの抗原認識ドメインは、V(D)J組換えと呼ばれる部位特異的体細胞DNA組換え反応に実質的に続いて、Tリンパ球の分化の間にTリンパ球においてつくられる(9、10)。T細胞の発達の際に、TCRの 、 、 及び 鎖は、種々の遺伝子座(TCRAD、TCRB、TCRG)に依存せずに、適切な遺伝子の再構成に続いて組み立てられる。ヒトにお

50

いては、TCR遺伝子は染色体7及び14に位置する。TCRD鎖をコードする遺伝子は、染色体14 q11-12上のTCRA鎖の遺伝子座に位置するが、TCRB及びTCRG鎖をコードする遺伝子は、染色体7上の位置7q32-35及び7p15にそれぞれ位置する。4つの遺伝子座が、4つの鎖の定常及び可変ドメインをコードする。TCRA鎖のVドメインは、V及びJ遺伝子セグメントから組み立てられる。

【 0 0 0 4 】

よって、すべてのTリンパ球が、受容体の種々の形及びそれらの抗原特異性のレジスターを構成する免疫レパトアを規定する。レパトアは、抗原受容体の構造の広い多様性に基づく。この多様性を作り出すために、リンパ球はいくつかの機構を持ち、その主要なものがV(D)J組換えである。簡単に、抗原受容体をコードする遺伝子は、生物の細胞のゲノムのレベルで、これらの遺伝子が不活性になるように中断される。いくつかの遺伝子セグメントが区別される：

- a) 定常領域(C)、これはファミリーの受容体のすべてにその特異性に関係なく共通である；
- b) 可変領域(V)、この数は、考慮するTCR鎖に応じていくつかの遺伝子から数百遺伝子まで変化する；
- c) 結合領域(J)、これはVとCとの間の中間の遺伝子であり、その数は、考慮するTCR鎖に応じて1から数十まで変化する；そして
- d) 多様性領域(D)、これは、TCRの 及び 鎖中にもみ存在する数ヌクレオチドの小さい遺伝子であり、VとJの間に介在する。

【 0 0 0 5 】

再構成プロセスは、酵素複合体(V(D)Jリコンビナーゼ)を用い(14)、これは、散在するV及びJ遺伝子セグメントをコードする配列の側面にある組換えシグナル配列(RSS)を特異的に標的する。

【 0 0 0 6 】

より具体的には、リコンビナーゼの主要な構成要素は、2つの組換え活性化遺伝子(recombination activating genes) RAG-1及びRAG-2の産物である(15、16)。RAG-1及びRAG-2タンパク質は、各V、D及びJ遺伝子の側面にある、組換えシグナル配列(RSS)とよばれる保存されたヌクレオチドモチーフに結合する(17、18)。

【 0 0 0 7 】

共通の(consensus) RSSは、コーディングエレメントに直接接するヘプタマー配列と、12又は23の比較的保存されていないヌクレオチドを含むスペーサーアームにより分離されているノナマー配列とからなる。結合部位はRSSにより決められ、12ヌクレオチドのスペーサーアームを有するRSSと、23ヌクレオチドのスペーサーアームを有するRSSとの間の組換えの確立された選択は、異なる種類の2つのセグメント間(例えばV と J)のV(D)J組換えを確実にする(19、20)。

【 0 0 0 8 】

より一般的には、V(D)J組換えは、特異的切断であるエキソヌクレアーゼ及びポリメラーゼ活性を含む一連の酵素反応並びにDNAライゲーションを含み、これらによりリンパ球当たり一つに一つの機能的遺伝子要素(entity)が形成される。この機能的遺伝子は、C領域及びVとJ(と任意にD)との組み合わせからなり、これはリンパ球の分子的個性の目印及び抗原受容体の特異性の分子的基礎を構成する。

よって、リンパ球は、多様化したTCRレパトアを作り出す精巧な機構を有する。

【 0 0 0 9 】

組換えプロセス(組み合わせ多様性(combinatory diversity))に加えて、V-J又はV-DJ結合においても欠失又は挿入が観察される(9、21)。これらの種々の機構は、TCRレパトアの多様性、よって認識される抗原の数を増加させることを可能にする。後者の機構はコードされないが、TCRレパトアをかなり増加させる。

【 0 0 1 0 】

別の多様化因子は、TCRヘテロダイマーを形成する と 鎖(又は と)との結合であ

10

20

30

40

50

る(22)。

ほとんどのTリンパ球は、膜に結合したヘテロダイマーで構成されるクロノタイプTCRを発現する。

各鎖は定常ドメインと可変ドメインとを含有し、後者は、VドメインのCDR(相補性決定領域)ループとの相互作用により、常に同様の様式で起こるMHC-ペプチド認識を担当する。

【0011】

Vドメインの組成や認識されるMHC-ペプチド複合体に応じて、いくつかのジオメトリが観察される。例えば、TCRはペプチド-MHC複合体の面の上方の対角線方向に位置し、TCR鎖のCDR1及びCDR2ループは該ペプチドのN-末端側の半分の上方に位置し、TCRの対応する領域は該ペプチドのC-末端側の半分の同じ高さに位置することが示されている。いくつかのCDR1及びCDR2は、MHCの残基と相互作用する。

10

【0012】

TCRの最も可変的なループである、TCR及びTCR鎖のCDR3ループは、中央付近に位置し、好ましくはペプチドと接触している。

【0013】

よって、V(D)Jランダム組換えにより作り出されたTCR-の可能な多様性は、いずれのV遺伝子がいずれのD及び/又はJ遺伝子と再構成されると(2、23)、約 10^{15} であると見積もられる(2、23)。

【0014】

理論的多様性は、いくつかのレベルで過大評価されている。

- Tレパトアの評価は、いずれのV遺伝子もいずれのD及び/又はJ遺伝子と再構成できるという仮説を用いて算出された。

しかし、マウスの胸腺から得られた最近のデータは、V-J組換えの数が、ランダム再構成モデルにより予測されたものよりかなり小さいこと、及びVとJセグメントの間に、それらの位置及び遺伝子座に応じて優先的な連結が存在して、調節され調和された(coordinated)使用をもたらすことを示す(24)。

20

【0015】

- ヘテロダイマー受容体を形成するように及び鎖を作製するのに、種々のサブユニット間の構造的な適合性のために制限が存在し、このことはレパトアをも制限する。

30

- 胸腺においては、作り出されたレパトアは、間質細胞上に発現されたMHC分子との相互作用により、正の選択及び負の選択の両方に付される。これらの選択は、作製されたレパトアのサイズを約100分の1に減じ、成熟T細胞の多様性のプロフィールを提供する。これらのリンパ球(CD4⁺又はCD8⁺)は末梢に移動し、ここでこれらは循環Tリンパ球のナイブプールを構成する。

【0016】

末梢Tリンパ球プールは、リンパ球集団の数及び機能を維持することを可能にする複雑な恒常性機構に付される。

これは、産生速度、成熟細胞分裂、細胞内通行(trafficking)及び細胞死の制御を含む。

40

【0017】

よって、正常な個体での末梢Tレパトアの確立は、各T細胞のそれぞれのリガンドとの相互作用だけでなく、他のリンパ球部分集団との競合にも基づく。

よって、末梢TCR多様性のサイズを決定するのは困難である。

【0018】

最近、CDR3セグメント長の分析を用いて、TCR多様性の分子測定からの外挿により推定が行われている。

しかし、これらの分析は、V鎖の遺伝子座の複雑性のために、鎖の多様性に主に関係する。

【0019】

50

ヒトのTCRAD遺伝子座は、約1000 kbを含み、41のファミリーに属する54個のV 遺伝子及び8個の偽遺伝子と、3個のJ偽遺伝子を含む61個のJ 遺伝子と、単一のC 遺伝子とからなる(25、26)。

ヒトとマウスのTCR遺伝子座間の配列同一性の程度が高いにもかかわらず、V及びJ遺伝子の機構は、2つの種間で一部分しか保存されていない。

及び鎖のJ遺伝子セグメントの数は2つの種でよく保存されているが、V 及びV セグメントの数には大きな差が存在する。

【0020】

特に、マウスにはヒトより少なくとも2倍多いV 遺伝子があり、マウスに比べてヒトにはV 遺伝子が1/3多い。

10

【0021】

進化の間に、マウスTCRAD遺伝子座は、遺伝子座の大部分を伴う多重重複プロセスに付されたが、ヒトにおいては、重複はTCRAD遺伝子座の限られた一部分でのみ起こった(26)。

これらの種々のプロセスは、マウスで観察されるデータをヒトにそのまま置き換えることができないことを示す。

【0022】

診断を目的として、ヒトの免疫レパトアの分析が提案されている。

例えば、Hodges E.ら(46)は、T細胞受容体(TCR)遺伝子評価試験の診断的役割をまとめている。特に、この文献の著者らは、ゲノムレベルで疾患の病因の研究をすることが現在では可能であることを示している。T細胞受容体(TCR)遺伝子再構成は、T細胞個体発生において重要な事象であり、このことがT細胞が特異的に抗原を認識することを許容する。

20

この高度に複雑なプロセスにおける軽微な規制解除が、疾患の原因となり得る。

【0023】

この文献は、TCR遺伝子再構成の機構に関する知見を再検討し、クローン増殖(clonal expansions)及びT細胞の増殖が観察される疾患を記載している。

種々のT細胞集団を研究するために現在用いられている方法、それらの診断的役割及びこれらの方法の限界が、この文献に記載されている。

【0024】

この文献の表Iは、TCR鎖をコードする種々の遺伝子：(A)、(B)、(G)及び(D)についてまとめ、TCRAD遺伝子座の複雑性を特に示している。正常な個体においては、TCRレパトアは安定でポリクローナルであるが、クローン集団は、腫瘍病理又は感染性病理に対する特異的免疫応答の兆候である。よって、クローン及びオリゴクローン集団は、非腫瘍、例えばHIV又はEBV感染の条件下かつ特定の状態、例えば年配の個体、自己免疫、後天性免疫グロブリン血症(CVID)及び重症複合免疫不全(SCID)で観察され、ここではV(D)J組換えに含まれる機構における異常は、TCR遺伝子の正しい再構成を限られた数しか許容しない。

30

【0025】

この文献の著者らは、以下のように考察している。

- 表現型を研究するために、フローサイトメトリがTCRレパトアを分析するための迅速で比較的安価な方法を構成する。さらに、このような方法は、再現性がありかつ種々のT細胞の部分集合(CD4⁺及びCD8⁺細胞)の種々のV遺伝子の発現の定量的評価を許容する。

40

【0026】

- 遺伝子型を研究するために、サザンプロット分析を大きく置き換えたPCRが、PCRがいくつかの利点、特に迅速な実行及び少量のDNAを使用する可能性を提供する範囲でクローン性(clonality)の研究に有用である。

【0027】

いくつかの異なるPCRプロトコルを有利に用いることができる。

1. 全てのTCRV遺伝子に相補的なファミリーに特異的なプライマと定常領域に位置するプライマとを用いる全てのVセグメントの増幅(半定量的方法のみ)(フランス特許出願第2

50

671 356号 ; Panzara M.A.ら , Biotechniques, 1992, 12, 5, 728 ~ 735及びLangerak A.W.ら , Blood, 2001, 98, 165 ~ 173)。

2. 全てのTCR転写産物を、それらが単一のオリゴヌクレオチドで増幅できるように修飾することからなる工程を含むPCR (アンカーPCR)。
3. ライゲーションにより環状転写産物の産生を許容するPCR。

【 0 0 2 8 】

後の2つの方法は、実行するために、高度な技術的知識を必要とする(日常的使用の問題)が、T細胞集団の定量的分析を許容し、クローン性の研究及び種々の病理でのTCRレパトアの評価にすでに適用されている。

【 0 0 2 9 】

この文献から、クローン性を日常的に評価する方法は、次の特徴を満足することが好ましいことがわかる。

- 単純性 ;
- 良好な検出収率及び良好な感度を伴う堅牢性 ;
- DNAへの試験の実行 ;
- 選択されたプライマを用いることによる検出及び感度の増加。

【 0 0 3 0 】

また、この文献から :

- TCRG遺伝子のPCR分析はこれらの条件を満足する(臨床的病理におけるクローン性の研究)。なぜなら、TCRG遺伝子のレパトアが限られており、よって必要なPCRプライマの数が減るからである。しかし、この選択は、付随的に発生する好ましくない増幅をもたらすという問題点を有する(正常細胞における類似の再構成) ;
- TCRD遺伝子のPCR分析はある腫瘍、特にMRDの分析に有用な手段である ;
- TCRB遺伝子座は、TCR を発現する腫瘍のクローン性を確立するためによい遺伝子座であるが、
- TCRA遺伝子座は、クローンDNA分析のためには複雑すぎることも明らかになる。

【 0 0 3 1 】

このことが、現在提案されている、種々のTCRレパトア分析方法がTCRAレパトアの分析を推奨しないことの理由である。

【 0 0 3 2 】

- サザントランスファーによる分析(DNA)

この技術は、実行するのが面倒であり、あまり綿密ではなく、また、あまり定量的ではない。これはV(D)J再構成を評価することを可能にするが、数 μ gのDNAを必要とするので感度があまりよくなく、V及びJ遺伝子を同定するための分離(resolution)がよくない。さらに、自動化にはほとんど向かない。

【 0 0 3 3 】

- Immunoscope (登録商標)による分析(特許US 5,635,354 ; Pannetierら , Immunol. Today, 1995, 16, 4, 176 ~ 181) ; この方法は、一義的に定性的である。

【 0 0 3 4 】

- Immunoscope (登録商標)による"CDR3"組換え領域の多様性の分析(mRNA) (PCT国際出願WO 02/084567)。

現在、この技術は、抗原受容体の多様性の評価のために最も用いられている。この方法は、逆転写によりcDNAに一旦変換されてPCR増幅反応に付されるRNAの使用に基づく。増幅される遺伝子断片は短く(数十ヌクレオチド)、V遺伝子とC又はJ遺伝子との間に伸び、抗原受容体の最も多様な形の領域であるCDR3を含む。この方法は、再構成の間に作り出された多様性を推定することを可能にする。この方法は、レパトアの相対的多様性を示すが、レパトア全体の定量は可能ではない。この方法の弱点は :

【 0 0 3 5 】

- 1) 容易に分解され、特別な取り扱い条件を必要とする遺伝的材料であるRNAの使用、

10

20

30

40

50

- 2) 全てのV遺伝子が必ずしも同じ効率で転写されないという事実のために、再構成の評価において偏りが存在するという事実、
- 3) cDNAの合成が、転写産物によって変動し得る。この工程は、よって、制御困難な偏りを導入し得ることに存在する。

【0036】

この方法は、受容体の多様性を完全に分析することを困難にする、非常に多数の増幅反応を必要とする。よって、ヒトTCRの鎖について、Vsについて25の独立した反応が必要であり、その一つ一つが、変性ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動分析について、13個の機能的Jsの一つを用いて繰り返されなくてはならない。

10

【0037】

- V-J結合の分析

2002年10月11日の出願日の利益を享受するが、2004年4月22日、すなわち本出願が利益を享受する出願日の後に公開されたPCT国際出願WO 2004/033728は、標準マルチプレックスPCRプライマの組み合わせを提案する方法、及びリンパ系統の増殖が疑われる試料中のIg遺伝子及びT細胞受容体(TCR)遺伝子のクローン性組換えを検出するための標準化されたプロトコルを記載している。記載された方法は、サイズが300~700 pb、好ましくは300 pb未満(より好ましくは100~300 pb)の産物を作り出すPCR条件下でマルチプレックスPCR法を用いる。より具体的には、用いられたPCRは、1分30秒間の伸長工程を含み、これは最大で1~2 Kbの増幅を可能にし、「本来の(natural)」多重化に必要な大きいサイズの増幅は不可能である。さらに、用いられたオリゴヌクレオチドの位置は、V遺伝子の間で保存された領域を標的としている。この方法で試験された種々の遺伝子は、次のとおりである：TCRB、TCRG、TCRD。TCRA遺伝子は含まれていない。これはその複雑性から、意図的に除外されたのである。

20

【0038】

この方法は、モノクローナル増幅を特徴付けることを可能にする。一方、この方法からは、レパトア全体の分離を得ることができない。よって、このアプローチは、オン/オフタイプの結果を与え、これは分離をほとんど与えず、モノクローナル増幅を特徴付けるが、マッピングの形でレパトア全体を明らかにすることができない。

【0039】

よって、この方法によっては、V-S結合のみが研究されるという事実のために、レパトアの再構成の相対的頻度を決定することができず、所定の再構成についてのいずれの区別可能な観点が得られない。実際に、種々のPCR産物のスーパーインポーズを防止せずに同じチューブ内ですべてのオリゴヌクレオチドを多重化させることは、予想される全ての再構成について200~700 pbのサイズの産物を得ることを可能にするだけであり、特定の再構成へのバンドの割り当てを妨げる。この方法は、TCR遺伝子座の「本来の」多重化の原理を用いるものではない。

30

【0040】

- フローサイトメトリ(上記のHodges E.ら, 46を参照)

この方法は、受容体V領域に特異的な蛍光標識抗体を用いる。この方法は、リンパ球の表面での抗原受容体の発現を測定する利点を有する。しかし、この方法は：

- ・ 抗体の欠如：このことにより、レパトアの完全な分析が可能ではない；
- ・ 弱い感度：このことにより、多量の細胞試料が必要である(数千万のリンパ球)；
- ・ 乏しい分離：この方法は、Jとの組み合わせについてのいずれの情報も与えずにVを同定することをのみを可能にする；
- ・ 細胞を用いて作業する必要性

により、非常に限定的である。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0041】

50

よって、本発明は、遺伝子、特に、従来技術の上記の方法よりもより実用的な必要性に対応するTCR受容体の再構成又は組換えの評価の方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0042】

実行が簡単で、堅牢で、信頼性がありかつ定量的である定量法を得るために、本発明は、いくつかの遺伝子再構成、特に、TCRADをコードする遺伝子のいくつかのV(D)J再構成を、ゲノムDNAのレベルで直接、単一の酵素反応を用いて検出する(マルチプレックスPCR)ため、規定された条件下で、「ロングPCR」(LPCR)とよばれる限定された数の酵素的DNA合成連鎖反応を用いることを推奨する。

【0043】

よって、本発明は、抗原特異的受容体をコードするV(D)J遺伝子の再構成を単一工程で検出するために、gDNAの増幅を用いる。本発明は、規定された部位を有する他の遺伝子再構成又は遺伝子組換え事象に適用できる。

よって、本発明は、いずれの標的遺伝子組換えの評価の方法にも関する。

【0044】

よって、本発明の主題は、個体の再構成又は標的遺伝子組換えの定量的評価方法であり、該方法は、少なくとも：

(a) 生体試料からのヒトゲノムDNAの抽出；

(b) マルチプレックスPCRによる、

* 次の特徴：

- 一つのプライマ対の少なくとも1つのプライマが、遺伝子再構成に関係し得る、増幅されるべきVx遺伝子上流及び/又は5'末端にハイブリダイズし；

- 一つのプライマ対の少なくとも他方のプライマが、遺伝子再構成に関係し得る、増幅されるべきJy遺伝子下流及び/又は3'末端にハイブリダイズする

に対応するように選択される1又はそれより多いプライマ対と、

* 数百塩基対～数十kbのサイズ、好ましくは10 kbより大きいサイズのゲノムDNAセグメントを増幅するための、伸長を実質的に向上させることができる訂正活性を有するDNAポリメラーゼ又はDNAポリメラーゼの混合物

との存在下での、上記ゲノムDNAの数百塩基対～数十kbのサイズのセグメントの増幅であって、

最初の変性工程に加えて、変性、ハイブリダイゼーション及び伸長のサイクルを含み、伸長工程は68 ~ 72 で少なくとも10分間行われる増幅；

c) 増幅されたgDNA断片の分離；及び

d) 再構成されたか又は組換えられたセグメントの検出

を含むことを特徴とする。

【発明を実施するための最良の形態】

【0045】

用語「個体」は、TCRA発現プロファイルを測定する利点がある哺乳動物(ヒト、その他の霊長類、家畜、食物鎖において用いられる動物、例えば畜牛(cattle)、羊、豚など)を好ましくは意味することを意図する。

【0046】

再構成又は標的遺伝子組み換えがTCRAD受容体に関係するとき、該方法は：

a) 生体試料からのヒトゲノムDNAの抽出、

b) マルチプレックスロングPCRによる、

* 次の特徴：

- プライマVとよばれる、一つのプライマ対の少なくとも1つのプライマが、T細胞受容体の鎖の変動ドメイン(TCRAD)のVセグメントに対応する、増幅されるべきVx遺伝子のRSS配列の上流に位置する領域と特異的にハイブリダイズし；

- プライマJとよばれる、一つのプライマ対の少なくとも1つのプライマが、T細胞受容体の鎖のJセグメントに対応する、増幅されるべきJy遺伝子のRSS配列の下流に位置す

10

20

30

40

50

る領域、増幅されるべきJy遺伝子の3'末端又は増幅されるべきJy遺伝子内に特異的にハイブリダイズする

に対応するように選択される1又はそれより多いプライマ対と、

* 数百塩基対～数十kbのサイズ、好ましくは10 kbより大きいサイズのゲノムDNAセグメントを増幅するための、伸長を実質的に向上させることを可能にする訂正活性を有するDNAポリメラーゼ又はDNAポリメラーゼの混合物

との存在下での、上記ゲノムDNAの数百塩基対～数十kbのサイズのセグメントの増幅であって、

最初の変性工程に加えて、変性、ハイブリダイゼーション及び伸長のサイクルを含み、伸長工程は68～72で少なくとも10分間行われる増幅；

c) 増幅されたgDNA断片の分離；及び

d) 組換えられたV(D)Jセグメントの検出

を含む。

【0047】

この方法は、いくつかの利点を有する。

- この方法は、Immunoscope（登録商標）法が行わない、ゲノムのレベルでのV(D)J組み合わせの分析を許容する；

- この方法は、大きい断片を得ることを可能にし、 V_x-J_y 、 V_x-J_{y+1} 、 V_x-J_{y+2} などの各断片が互いに明確に区別されることが可能であり、このことは良好な分離を意味する；

- この方法は、そのままのV/J対合(pairing)の分析を許容する；

- この方法は、ゲノムDNAレベルでの分子分析を可能にする。V(D)J遺伝子の所定の組換えの量を測定することにより、この再構成を有するリンパ球の数の評価を得ることができる。なぜなら、再構成された遺伝子数とリンパ球数の間には比例関係があるからである。リンパ球は、受容体のある種類について2つの再構成しか有することができず、すなわち染色体当たり1つの再構成である。この種類についての情報は、「CDR3」組換え領域での多様性の分析を介しても、V/J結合の分析を介しても入手可能でない；

【0048】

- この方法は、フローサイトメトリでもサザン法でも可能ではない、抗原受容体の多様性の綿密な評価を許容する；

- この方法は、レパトアの完全な分析のためのPCR反応の数を実質的に減少させることを可能にする。このことは、同じ増幅反応及び同じ電気泳動レーンでのいくつかのV及びJ遺伝子の同時の分析のおかげである。例えば、ヒトにおけるTCR鎖について、再構成を検出し定量するために、種々のVJ組み合わせに対応する3355の反応が必要である。本発明による方法は、10分の1の反応(ten times fewer reactions)で分析を行うことを可能にする。特に、本発明による方法の工程の組み合わせ、より具体的に増幅工程(b)との分離工程(c)の組み合わせは、本発明による方法の効率を、特にもっとも適切な分離系を選択することにより、有意に向上させるように連係する；

【0049】

- この方法は、同じ反応に由来しかつ同じ電気泳動のレーンで分析される電気泳動のバンドの相対的強度の測定により再構成を定量することを可能にする。サイズの違いを考慮に入れた標準化により、特に、値を標準化し、かつ全体に対する各再構成の割合を定量化することが可能になる(非常に良好な分離)。目下、これらの結果を得ることを可能にする技術はない；

- この方法は、受容体のV及びJ遺伝子の同定を許容する。V遺伝子の同一性(identity)は、増幅の間に用いられるプライマにより得られ、J遺伝子の同一性は、用いられるプライマJで増幅される断片のサイズの測定により及び発表されたヌクレオチド配列を参照して得られる。この操作は、配列アラインメント及びモチーフ比較ソフトウェア、例えばBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)、IMGT/GenelInfo (<http://imgt.cines.fr/GenelInfo>)などの使用により促進される。この情報は、Immunoscope（登録商標）での分析により得ることができるが、Jセグメントの同定はケースバイケースで行われる。一方、本発明による方法では、

10

20

30

40

50

いくつかのJセグメントが同じ反応で同定できる；

【0050】

- この方法は、混合物中に特に豊富なV(D)J組み合わせを明らかにすることを可能にする。このことは、免疫優性な特異的応答、すなわち1つ(モノクローナル応答)又はいくつか(オリゴクローナル応答)のリンパ球クローンによる応答の検出のために有用であることを示すことができる。さらに、これは、リンパ球増殖の検出、例えばリンパ球の癌(リンパ腫、骨髄腫、白血病)において観察されるものために用いることができる。Bリンパ球から生じる白血病は、血清中の循環Igの直接分析により検出できる。しかし、血清中にIgを産生しない白血病の検出及びTリンパ球白血病の検出は、困難でかつあまり定量的ではないままである。本発明による方法は、異常に豊富なV(D)J組み合わせを同定すること

10

【0051】

抽出工程(a)は、サザントランスファー法に用いられる、gDNAの精製のために設定された注意事項(Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989, Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor, New York, USAを参照)を遵守する既知の技術により行われる。この工程に続いて、有利に、通常の分子生物学の技法によるgDNAの精製からなる工程を行うことができる。

20

【0052】

増幅工程(b)の有利な実施形態によると、プライマの選択は、

- 関係する遺伝子座全体、特にヒトTCRAD遺伝子座の、上記で規定するような適切な配列アラインメント及びモチーフ比較ソフトウェアを用いる、特に相同配列検索ソフトウェア(例えばInformax Inc.社からの"Vector NTI suite 8.0")を用いる系統的分析、

- 上記で規定するような、3'OH末端が興味対象の領域にのみ相補的であるプライマの選択、

- 特に、適切な配列アラインメント及びモチーフ比較ソフトウェアを用いること、特に相同配列検索ソフトウェア(例えばInformax Inc.社からの"Vector NTI suite 8.0")を用いることによる、オートダイマー又は安定ヘアピンを形成するプライマの排除、及び

30

- 互いにハイブリッドを形成するプライマ対の排除により行われる。

【0053】

よって、これら全ての種々の選択工程は、プライマ間の競合又は選択したもの以外の他の標的配列との競合のようなPCRの偏りを減少させ、その結果、マルチプレックスロングPCRでの再構成分析を行うために必要なPCRの収率及び特異性を向上させる。

【0054】

本発明によると、プライマ、特にプライマ対V/JのプライマV及びJは、以下の表1に示されるプライマからなる群より選択される。

【0055】

40

【表1】

種 遺伝子座	ヒト TCRAD	S/A	bp	tm	
TRAV					
hTRAV1	GGTCGTTTTCTTCATTCCTTAGTCG (配列番号 1)	S	27	58	
hTRAV2	TCTCTTCATCGCTGCTCATCCTCC (配列番号 2)	S	24	61	
hTRAV3	TCCCTTCCCATTTCCTCACTCG (配列番号 3)	S	22	60	
hTRAV5	GCACTTACACAGACAGCTCCTCCACC (配列番号 4)	S	26	61	
hTRAV8	CAGGAGGAACCAGAGCCCAGTC (配列番号 5)	S	22	59	
hTRAV26-2	TGGAGTAGGGCAGGGAGGACAGT (配列番号 6)	S	23	60	
hTRAV35	Ggctgggaagtttggtgatatagtgtc (配列番号 7)	S	27	59	10
hTRAV38.2	AGCAGCCAAATCCTTCAGTCTCAA (配列番号 8)	S	24	58	
hTRAV40	Aagacaaaaactccccattgtgaata (配列番号 9)	S	26	60	
hTRAV41	GCCCTCTGAAAATGTGTAAGAAATGT (配列番号 10)	S	28	60	
TRAJ_do					
hAJ53do	CTTCCCCCACTCCCTTCAAACCTAC (配列番号 11)	A	25	60	
hAJ48do	AGCACTTGACGGCAGCAGCA (配列番号 12)	A	20	60	
hAJ41do	TGCCCGGAGACCTGATAACCAA (配列番号 13)	A	22	61	
hAJ29do	TCAGAACAAGCTGGAGGCAACTAGG (配列番号 14)	A	25	61	
hAJ18do	GGAATAGAAAGCGACTCACTCACCAGG (配列番号 15)	A	27	60	
hAJ10do	CCACTTTTAGCTGAGTGCCTGTCCC (配列番号 16)	A	25	60	20
hAJ5do	CTGTCTCTGCAATGATGAAATGGCC (配列番号 17)	A	25	59	
hAJ1do	GGAAACTCTGGGCATGGGCAG (配列番号 18)	A	21	59	
hAJ56do	ACTGGGCAGGAGATTCCGGTTAT (配列番号 19)				
hAJ33do	CGCCCCAGATTAAGTATAGTTGCT (配列番号 20)				
hAJ24do	ATACTAAGGGCAGGTGAGGCTCCA (配列番号 21)				

【0056】

よって、工程(b)で選択されるプライマは、良質の結果を得ることを可能にする。PCR産物の特異性は、増幅産物の配列決定により、10個のプライマV (配列番号1~10)について特に確立され、このことは、標的V遺伝子に対応する独特の配列の存在(表3を参照)及びプライマの選択の堅牢性を示す。

30

【0057】

プライマの特異性は、増幅産物の内部の配列を認識する標識オリゴヌクレオチドプローブ、例えば以下の表2で規定されるものを用いて観測できる。ハイブリダイゼーションにより、増幅断片の観察されたサイズが、プライマVとJとを隔てる距離及びその再構成を考慮に入れて、ヒトTCR 遺伝子座の配列から導き出される予測サイズに相当するかどうかを確認することができる。これらのプローブは、本発明による方法の工程(d)において有利に用いることもできる。

【0058】

【表 2】

		S/A	bp	tm	
	プローブ				
TRAV					
hTRAV1p	TCGTTTTTCTTCATTTCGTTAGTGG (配列番号22)				
hTRAV5p	ATGAAACAAGACCAAGACTCACTG (配列番号23)				
hTRAV8p	TGACCCAGCTTGACAGCCA (配列番号24)				
hTRAV26-2p	GGCAATCGCTGAAGACAGAAAG (配列番号25)				
hTRAV41p	GAGAACAGGTGTAAGTGCCGCC (配列番号26)				
TRAJ					
hAJ53p	TTGGATTCACGGTTAAGAGAGTTC (配列番号27)	A	24	59	10
hAJ48p	TCCAGTCCCAAAGGTTAATTTCTC (配列番号28)	A	24	59	
hAJ41p	CCGAAGTTGAGTGCATACCCG (配列番号29)	A	21	55	
hAJ29p	CAAAATCAAGGATGGCTAGAAACAC (配列番号30)	A	25	55	
hAJ18p	CTTCCAAAGTATAGCCTCCCCAG (配列番号31)	A	23	55	
hAJ10p	GGTGAGTTTGTTCCTCCTCCC (配列番号32)	A	22	57	
hAJ5p	CCCAAAGTAAGTGCTCCTGCC (配列番号33)	A	24	55	
hAJ1p	CGGGGAGAAGTGAAACTCTGG (配列番号34)	A	22	53	
hAJ56p	TCAGAGTTATTCCTTTTCCAAATG (配列番号35)				
hAJ33p	CGCCCAGATTAAGTATAGTTGCT (配列番号36)				
hAJ24p	GGTCCCTGCTCCAAACTGC (配列番号37)				

【0059】

本発明によるプローブ及びプライマは、検出可能及び/又は定量可能なシグナルを得るために、当業者に公知の方法により、放射性又は非放射性の化合物を用いて直接的又は間接的に標識することができる。本発明によるプライマ又はプローブの標識は、放射活性元素又は非放射性分子を用いて行われる。用いられる放射性同位体のうち、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 又は ^3H を挙げることができる。非放射性の物質は、ピオチン、アビジン、ストレプトアビジン又はジゴキシゲニンのようなリガンド、ハプテン、色素および発光性の剤、例えば放射線発光、化学発光、生物発光、蛍光又はりん光の剤から選択される。

【0060】

TCRAD遺伝子座の外側の隣接する配列の増幅を防ぐためかつ非特異性を減少させるために、工程(b)において、プライマを選択するためにヒトTCRAD遺伝子座全体にわたって行われる系統的分析は、www.ensembl.orgデータベースを用いるヒトゲノム全体にわたる検索により行われるのが好ましく、これは、ヒトゲノム上の全ての位置(fix)を3つの強度のカラーコード：赤 = 100%、緑 = 85、青 = 70を用いて視覚化することを可能にする。

TCRAD遺伝子座を赤で認識し、ゲノムの残りで限られた数の位置(fix) (緑又は青の)を有する候補オリゴヌクレオチドだけが選択される。

【0061】

以下の表3に記載されるプライマを用いるPCRによる増幅からの産物が、右欄に記載される増幅配列を与える。

【0062】

【表 3】

オリゴ up	オリゴ do	増幅されたV配列: 配列番号 38-45
配列番号 6	配列番号 11	CTTGAGAGATGCTGCTGTGTA
配列番号 1	配列番号 16	CCTTTTGAGGAGCTCCAGATGAAAGACTCTGCCTCTTACCTCTGTGCTGTGAGGAATGGGGGGG
配列番号 8	配列番号 11	GCGATGTATTTCTGTGCTTACATGAGCCCGGGGGGGGGGG
配列番号 10	配列番号 11	TATTCTGTATCTGATGATGTCTTTGAGAACAGGTGTAAGTGCCGCCAAAA ATGAAGTGGAGCAGAGTCTCAGAACCTGACTGCCAGGAAGGAGAATTT ATCACAACTCAACTGCAGTTACTCGGTAGGAATAAGTGCCTTACACTGGCT GCAACAGCATCCAGGAGGAGGCAATTGTTTCTTTATGCTGAGCTCAG GGAAGAAGAAGCATGGAAGATTAATTGCCACAATAAACATACAGGAAAAG CACAGCTCCCTGCACATCACAGCCTCCCATCCAGAGACTCTGCCGTCTA CATCTGTGCTGTGAGGGGGGGGGGGG
配列番号 9	配列番号 11	ACTCAGCCGTGTA
配列番号 4	配列番号 16	ACCTGGAGCAGGTCTCCAGCTTGTGACGTATATTTTTCAAATATGGAC ATGAAACAAGACCAAAGACTCACTGTTCTATTGAATAAAAAGGATAACAT CTGTCTGTGCGCATTGCAGACACCCAGACTGGGGACTCAGCTATCTACT CTGTGCAGAGAG
配列番号 5	配列番号 11	ACTACTCATCGTCTGTTTCACNGTATCTCTTCTGGTATGTGCAATACCCC AACCAAGGACTCCAGCTTCTCCTGAAGTANNATCAGGNNCCACCCCTGGT TAAAGGCATCAACGGTTTTGAGGCTGAATTTAACAAAGAGTGAAACNTCCT TCCACNTGANGAAACCCTCAGCCCATATNAGCGACNCGGCTGAGTACTTC TGTGCTGTGAGTGAT
配列番号 4	配列番号 11	ACCTGGAGCAGGTCTCCAGTTGCTGACGTATATTTTTCAAATATGGACA TGAAACAAGACCAAAGACTCACTGTTCTATTGAATAAAAAGGATAAACAT CTGTCTGTGCGCATTGCAGACACCCAGACTGGGGACTCAGCTATCTACT CTGTGCAGAGAGAT

10

【0063】

20

各Vx遺伝子について、該Vx遺伝子に対応するプライマVを上記で規定したプライマJ (配列番号11~22)のそれぞれとの組み合わせで含むプライマ対を用いることが好ましい。増幅工程(b)は、次いで、種々のプライマ対と並行して行われる。

【0064】

本発明による方法の別の実施形態によると、工程(b)は、さらに、少なくとも1つの次のセグメント: TCR、鎖のDセグメント、Vセグメント及びJセグメント並びに任意に免疫グロブリン鎖のセグメントを増幅するための追加のプライマを有利に用いることができる。

【0065】

30

よって、多様性を有するDセグメントを含むTCR鎖又はIg鎖の場合は特に、V及びD遺伝子の間のPCR反応は、すべての再構成に共通のV-J反応に加えて行われる。この工程は、V遺伝子とともに用いられるD及びJセグメントの両方のレパトアを決定することを可能にする。V及びJに加えてDも有する鎖の分析の場合に、TCR及びTCR鎖並びに免疫グロブリン重鎖のように、同じことがD遺伝子についても言える。

【0066】

40

増幅工程(b)で用いられるDNAポリメラーゼは、非常に長いDNA分子を増幅するための、米国特許US 6,410,277に記載されるような種類のDNAポリメラーゼの混合物が好ましい。このような酵素混合物は、伸長を実質的に向上させることを可能にする訂正活性(correction activity)を有する。よって、数kbのDNAの増幅により、用いられた2つのプライマ間に位置するすべての可能性のある遺伝子を用いて起こった連続的な(successive)組換えを検出することを可能にする。

【0067】

工程(b)の別の有利な実施形態によると、マルチプレックスロングPCR (LPCR)反応は、通常の分子生物学の方法によるDNAの精製後に、又は細胞溶解物に直接行われる。

しかし、これは、可能な限り純粋なgDNA (ヌクレオソームのようなタンパク質を含まない)を用いて行うことが好ましく、それにより大きい産物(> 10 kb)の最適な増幅を促進する。このために、ゲノムDNAを壊さないことが重要である。

【0068】

50

DNAの精製をいったん行ったら(分子生物学で公知のフェノール/クロロホルムV/Vを用いる抽出法によるか、又はDNAの抽出及び精製の市販のキットを用いるかのいずれかに

より)、DNAをマルチプレックスLPCRに直接用いる。

【0069】

反応チューブ(反応容量:20~50 μ l)は、超純水、Taq酵素又はDNA合成酵素の混合物、例えば特許US 6,410,277に記載されたもの(LATaqと呼ばれる混合物)、MgCl₂(Taq酵素補因子)、dNTPs、研究するV遺伝子の転写の方向に特異的なオリゴヌクレオチドプライマ(配列番号1~10のプライマの一つ)、研究するD又はJ遺伝子セグメントの転写の逆方向に特異的なオリゴヌクレオチドプライマ(配列番号11~21のプライマの一つ)、及びマトリックスともよばれる、ここから増幅が起こる、分析されるDNAで構成される。第一のプライマVの下流かつV遺伝子のRSSの上流に位置する、V遺伝子の内部配列に対応する第二のオリゴヌクレオチド及びノ又は第一のプライマJの上流かつJ遺伝子のRSSの下流に位置する、J遺伝子の内部配列に対応する第二のヌクレオチドJを、PCRバックグラウンドノイズを減少させるために、LPCR反応の半分で加えることができる。これらのオリゴヌクレオチドは、増幅産物の直接検出を許容するために、蛍光色素で標識してもしなくてもよい。増幅反応を行うためのサーモサイクルのプログラムは、所望の条件に従って変動できる。

10

【0070】

上記で規定するように、プライマ対V/J当たり1回のPCR(増幅工程(b))が行われる。

【0071】

工程(b)の別の有利な実施形態によると、伸長工程は、追加の伸長サイクル当たり15~20秒間増加させるのが有利である。

しかし、長いDNA断片の増幅を許容するために、:

20

- 媒質の酸性化及びDNAの分解を防ぐために、増幅されるゲノムDNAを非常に短期間の間(10~30秒程度)、90 $^{\circ}$ Cを超える温度に曝露し(変性)、
- 特にPCR媒質に基づいて、追加のサイクル当たり15~20秒間伸長工程を増加することにより、用いるDNAポリメラーゼの「消耗」を考慮すること(工程(b))が必要である。

【0072】

10 kb~20 kb程度の産物の増幅の限定しない例は、次のとおりである。

- 94 $^{\circ}$ Cで1~2分間の最初の変性、
- 変性工程:90~94 $^{\circ}$ Cで5~30秒間、プライマハイブリダイゼーション工程:58~62 $^{\circ}$ Cで15~30秒間及び伸長工程:68~72 $^{\circ}$ Cで14~20分間を含む15の連続サイクル、及び
- 変性工程:90~94 $^{\circ}$ Cで5~30秒間、プライマハイブリダイゼーション工程:58~62 $^{\circ}$ Cで15~30秒間及び伸長工程:68~72 $^{\circ}$ Cで14~20分間 + 各追加サイクルで15~20秒の追加を含む15の連続サイクル、及び
- 72 $^{\circ}$ Cで10分間の1回の伸長サイクル。

30

【0073】

該方法の別の有利な実施形態によると、増幅されたDNA断片の分離からなる工程(c)は、アガロース又はポリアクリルアミドゲルでの電気泳動、好ましくはパルスフィールド泳動により行われる。

PCR産物の分離の条件は、所望の条件の関数として変動し得る。次のものは、15 kb程度の産物を、1 \times TBE中のアガロース電気泳動での移動により分離するための条件である(この工程は、現在の技術で公知である)。

40

LPCR産物5~20 μ lを1.2%(W/V)アガロースゲルにのせる。電源を用いて8時間当たり100~150ボルトで泳動。大きい産物の分離を向上させるために、パルスフィールド泳動を用いることも可能である。

【0074】

該方法の別の有利な実施形態によると、増幅されたDNA断片の分離からなる工程(c)は、バイオアナライザ上でのマイクロキャピラリ分離により行われる。より具体的には、サイズが10 kbを超えるLPCR断片を分離するために、AGILENT Technologiesのバイオアナライザを用いるマイクロキャピラリ泳動を用いることができる。このような場合、検出工程(d)において、増幅断片の検出シグナルを増加させるために、蛍光色素(例えばCy-5)で標識

50

されたプライマの使用が考えられる。AGILENTチップは、設計者の指示；PCR産物1 μ lの沈積(deposition)、装置の使用者のためのガイドに従った定量に従って作製し使用される。

【0075】

驚くべきことに、工程(b)の次の要素の組み合わせ：

- ヒトにおける抗原受容体の再構成の研究用のプライマ配列の選択；
- 増幅反応中のサーモサイクルのプログラム；
- 大きい断片の増幅を向上させるのに用いる酵素の選択；

及び工程(c)における増幅断片の分離のためのプロトコルにより、検出されるべき組換えの定量評価を効率的に行うことができる。

【0076】

この関係において、PCR反応当たり1~11の再構成を検出し、J領域で起こった再構成の100%を視覚化することができ、所定のV遺伝子について最小で11回のPCRで充分である。

【0077】

該方法の別の実施形態によると、検出工程(d)は、次の方法の一つを用いて行うのが有利である。

- 増幅産物のナイロンメンブレンへのサザントランスファー、続いて増幅産物の内部配列に特異的な、放射性同位体又は蛍光色素で標識された1つ又はそれより多いヌクレオチドプローブ(特に配列番号22~37のプローブ)を用いるハイブリダイゼーション後の視覚化。より具体的には、この方法は、プロットングペーパー毛管作用による、例えば20 \times SSCバッファーを用いるナイロン又はセルロースナイトレートメンブレンへのサザントランスファー、700キロジュールのUV照射後のgDNAのメンブレンへの架橋(現在の技術で公知の方法)、非特異的バックグラウンドノイズを減少させることを可能にする条件下でのハイブリダイゼーション媒質でのプレハイブリダイゼーション、PCR産物を特異的に明示するための、1又はそれより多い放射性標識された内部オリゴヌクレオチドプローブでのハイブリダイゼーション(T4 キナーゼ + 32 P ATP法)、及びPCR産物のサイズの測定による再構成の特異性の確認を含む。イメージャー及び適切なソフトウェア、例えばBiorad社からのQuantity-Oneを用いる、種々の再構成に対応する各DNAバンドの強度の相対的定量化は：

- 標識された塩基(放射性同位体又は蛍光色素により標識)を増幅の間に用い、次いでゲルの中で直接、取り込まれた標識された塩基を測定することによるか；
- DNA-標識化剤(例えばエチジウムブロミド、SybrGreen Iなど)を泳動の間に用い、UV範囲又は他の適切な波長での励起後に検出することによるか；
- 蛍光色素又はその他の明示手段(例えばアビジン - ビオチン、ペルオキシダーゼなど)で標識したオリゴヌクレオチドを増幅の間に用いることによる。

いずれの他の検出方法も想定できる。

【0078】

この実施形態の有利な態様によると、プローブは、表2に規定するように、配列番号22~37の配列からなる群より有利に選択される。

【0079】

所定の再構成は、まず、増幅産物の泳動された距離により、次に、特異的内部プローブとのハイブリダイゼーションにより増幅産物から規定される。単一の反応で、いくつかの再構成を個別に検出することができる。十分な数の反応を組み合わせることにより、直接ゲノムDNAレベルで免疫レパトアを構成するすべてのV(D)J再構成を定量することができる。

【0080】

有利には、本発明による方法は、種々の生体試料：培養細胞、細胞系統、生検、顕微解剖、血液試料、分類された細胞からの試料、好ましくは血液試料について行うことができる。

【0081】

本発明による方法は、上記で規定するように、V(D)J組み合わせの分析により、特に増

10

20

30

40

50

幅工程(b)を種々のプライマ対と同時にを行うことにより、特に免疫レパトアの全体又は部分的な分析を許容する。この方法は、定性的かつ定量的である。V(D)J遺伝的組換えの検出により、特定の免疫レパトアを観測し、その多様性を種々の病理条件下で及び種々の治療の後に動的に評価することができる。DNA増幅の原理に基づいて、この方法は、免疫レパトアを早期にかつ少量の生物材料を用いて検出することを可能にする。

【0082】

これらのレパトアの測定は、V(D)Jレパトアの組み合わせが多数である観点から、困難な課題を構成する。さらに、各レパトアは2つの鎖からなり、ある受容体についての全レパトアはそれを構成する鎖のそれぞれの構造多様性の産物である。Ig又はTCR受容体の可能な形の数は、 $10^{14} \sim 10^{18}$ 程度の異なる、可能性のある受容体であると見積もられる。しかし、レパトアの評価は、生理病理学的条件下での特異的免疫応答、例えば感染、癌の進行、アレルギー、自己免疫疾患、免疫不全及びそれらの回復(reconstruction)などに対する応答を評価するための重要な投資(investment)のままである。

10

【0083】

まず、免疫レパトアの多様性は、生物の健康に関係すると考えることができる。弱く多様化したレパトアは、免疫不全に相当することができ、生物を種々の病理に感受性にする。ある特定の数の医療及び臨床の分野において、レパトアの変動を観測することが重要である。遺伝性リンパ球減少(先天性免疫不全)又は感染性リンパ球減少(例えばAIDS)、又は血液の癌(白血病、リンパ腫など)の治療の場合の体の照射による免疫系統の除去(ablation)の場合のような誘発リンパ球減少の状況が挙げられる。

20

【0084】

次に、ある数の治療試験は、特定の免疫応答を誘導することを狙いとする。これは、例えば、種々の注入経路、製剤、アジュバント、種々のベクターなどを用いる種々の抗菌及び抗腫瘍ワクチン接種のプロトコルの場合である。他の場合では、免疫応答の抑制を調べて、例えば自己免疫症候群を妨げたりアレルギー症状の発現と闘ったりする。

【0085】

これらのすべての場合において、本発明による方法は、第一に、疾患のさまざまな段階での抗原受容体のレパトアを測定することを、第二に、分子の刺激又は抑制作用を評価すること(特異的免疫応答を調節する医薬品をそこから導き出すことを狙いとして)を可能にする。

30

【0086】

よって、本発明の主題は：

* 関係する個体において免疫レパトアが初めに改変された病理に対する治療をフォローアップする方法であって、該方法は：

- 治療の始めに上記で規定するような免疫レパトアの評価の方法を実行すること、及び

- 上記の評価方法が、治療のさまざまな段階で反復されること、及び

- 上記の治療に対する上記の個体の応答を評価するために、毎回得られる免疫レパトアのプロフィールを標準免疫レパトアのプロフィールと比較すること

を特徴とする。

40

【0087】

* 関係する個体において免疫レパトアが改変される病理のさまざまな段階での抗原受容体レパトアを測定する方法であって、該方法は：

- 病理のさまざまな段階で上記で規定するような免疫レパトアの評価の方法を実行すること、及び

- 上記の病理の進展を評価するために、毎回得られる免疫レパトアのプロフィールを標準免疫レパトアのプロフィールと比較すること

を特徴とする。

【0088】

本発明によると、生体試料は、いずれの起源のTリンパ球からなる。より具体的には、

50

生体試料は、胸腺細胞、末梢血若しくは他のリンパ系器官からのTリンパ球又は他の組織からのTリンパ球、特に腫瘍、炎症部位若しくは小腸、肺、肝臓などの種々の器官由来のTリンパ球からなることができる。

【0089】

本発明の主題は、PCRを行うための通常のバッファー及び試薬に加えて、上記で規定するプライマ及びプローブを含むことを特徴とする、個体の免疫レパトアの定量的評価のためのキットでもある。

関係する病理は、リンパ球及びリンパ球関連細胞の両方の腫瘍、並びに免疫応答に関係するその他のいずれの病理、例えばウイルス性疾患、自己免疫疾患、生理病理学的状態、免疫不全、アレルギー又はV(D)J組換え機構における異常である。

10

【0090】

本発明の主題は、配列番号1～21の配列に対応するオリゴヌクレオチドプライマからなる群より選択されることを特徴とする、上記で規定する方法において用いることができるプライマでもある。

【0091】

本発明の主題は、配列番号22～37の配列のオリゴヌクレオチドプローブからなる群より選択されることを特徴とする、上記で規定する方法において用いることができる検出プローブでもある。

【0092】

本発明の主題は、上記で規定する増幅プライマ及び検出プローブの、個体の免疫レパトアの定量的評価のための使用でもある。

20

【0093】

上記の態様のほかに、本発明は、本発明の主題である方法の実施例及び添付の図面に言及する以下の記載から明らかになるその他の態様をも含む。以下の図面において：

- 図1は、胸腺のV8-J 再構成を評価するように行われた本発明による方法(マルチプレックスPCR)の結果、つまりJ 領域の全体的な分析を示す。マルチプレックスPCR反応は、gDNAに対して、hV8ファミリーのプライマV (表1参照)を11個の異なるプライマJ (表1参照：配列番号11～21)と組み合わせ用いて行われる。産物は、V8ファミリーに特異的なプローブ(配列番号24)を用いてサザンブロットングにより分析される。各レーンは、個別のPCR反応に対応する。各バンドは、レーンの左側に記載されるJ セグメントとの再構成に対応する。PCR増幅が大きい産物よりも小さい産物に対してより効率的であることから、各レーンの下に位置するバンドがより濃い。星印は、移動距離により決定された非特異的産物を示す。J領域の図(一定の比で描かれていない)：選択された11個のプライマは、この図に示すように、J 領域にわたって分布する。点は、プライマJ 及びプローブJ の位置を示す。対応する線は、各レーンにおいて検出可能なJ セグメントの範囲を示す。破線は、転写されていないJ 偽遺伝子を示す；

30

【0094】

- 図2は、J 領域との再構成の分布におけるV 遺伝子の位置の役割を示す。V-J 再構成は、6日齢の幼児の全胸腺から抽出したDNAについてのマルチプレックスPCRにより分析される。V 遺伝子に特異的なプライマが記載され、上記の表に記載されたプライマに対応する。これらのプライマを、各レーンの上に示す7つのプライマJとともに用いる(上記の表1の配列も参照)。

40

【0095】

- 図3は、ヒトV-J レパトアマトリックスの図を示し、再構成は遺伝子座上の該遺伝子の位置に依存する。図3a：図2のPCR産物のシグナルの積算(integration)によるV-J 再構成の相対的定量化のパネル図。この積算は、対数期にPCR反応を停止したPCR産物に対して、積算が直線的であることを証明した後に行われる。Z軸は、検出された再構成の相対的シグナル強度を示す。J軸は、研究したJ セグメントの相対的順序(relative order)を表す。研究したV 遺伝子は、V軸に示す。矢印は、V -J 再構成の進行の傾向を示す。図3b左：図3aで研究した7つのJ セグメントの積算による全体的なV 領域利用の分析。

50

図3b右：図3aで研究した10個のV 遺伝子の積算による全体的なJ 領域利用の分析。

【 0 0 9 6 】

- 図4は、V8-J組換えの検出に適用される本発明による方法の原理を示す。用いられたプライマは次のとおりである：配列番号5 (hTRAV8)及び配列番号13 (hTRAJ41)。検出プローブはhAJ41pプローブ(配列番号29)である。

- 図5は、ヒトV 遺伝子のRSSスコア、遺伝子座内の位置及び主に用いられたJセグメントの比較を表す。

【 0 0 9 7 】

- 図6は、末梢血リンパ球におけるヒトTCR 鎖の再構成プロフィールを表す。ドナーのTCR 再構成プロフィールの例を表す(マルチプレックスPCR)。6つのV 特異的オリゴヌクレオチドを選択し、9つのJ 特異的プライマと組み合わせて用いた(各レーンの上を参照)。この分析は、正常個体(25~55歳)の末梢血リンパ球から得られた3つの追加のDNAを用いて行われ、比較データを得た。マルチプレックスPCR分析を各DNAについて数回再現した。

【 0 0 9 8 】

- 図7は、定量的ゲノムPCR分析により測定された、6人の正常個体における特異的V-J再構成の相対的存在度を示す。選択された再構成は次のとおりである：V 1、40、41及びJ 56、53、41、33、10。各再構成について、産物が検出されるサイクルを記載する。6日、10日及び3ヶ月齢の子供をそれぞれ起源とする胸腺(A)からの3つのDNA、及び25~55歳の6人の正常個体を起源とする末梢血リンパ球(PBL) (B)を分析した。各試料のDNA含量は、G3PDHハウスキーピング遺伝子の増幅により標準化した。示したデータは、同様の結果を与えた3つの異なる実験から得られたものに相当する。結果は、種々の個体において特異的再構成に関係する産物の出現に必要なサイクル数として表す。比較的小さい数のサイクルは、より多量のDNAの存在、よってより多くの組換えを意味する。

【 0 0 9 9 】

- 図8は：

(A)において、TCR 転写産物の定量を表す。10人の正常個体から得られた末梢血リンパ球試料から抽出したcDNAを、 鎖の定常断片に特異的なプライマ(プライマAC)と組み合わせた種々のADVファミリーのオリゴヌクレオチドを用いて増幅した。図8(A)で描かれる増幅曲線は、分析した10個の試料の1つの代表である結果は、ADV1、3、5、6、7、8、10、13、16、17、19、20、22、25、26、27、30、36、38、40及びDV3について表す。曲線は、サイクル数の関数としての蛍光強度のlogに相当する。

(B)において、リアルタイム定量PCRによるADV-AC転写産物の相対的存在度を表す。ADVファミリーは、産物が検出されるサイクルについて、ADVファミリーの数によってのみ示す。

【 0 1 0 0 】

3ヶ月齢の子供からの4つの末梢血リンパ球cDNAと1つの胸腺cDNAとの比較を確立した。

他の試料においてもV ファミリーの発現の頻度が類似することが観察され、得られた結果は再現性があった。

【 0 1 0 1 】

これらの試料は本発明の主題の例証として示されるだけであって、限定を構成しないことが理解されるべきである。

【実施例】

【 0 1 0 2 】

実施例1：材料及び方法

- 命名法：

TRAV (V)遺伝子及びTRAJ (J)セグメントの命名は、IMGTベース(<http://imgt.cines.fr>)のものに従う。ヒトTCRAD遺伝子座及びマウスTCRAD遺伝子座の詳細なマップは、次のアドレスのIMGTサイトからアクセス可能である：

http://imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire/LocusGenes/locus/human/TRA/Hu_TRAmap.

10

20

30

40

50

html.

【 0 1 0 3 】

各プライマを確立するのに用いた配列は、アクセッション番号NG_001332でGenbankデータベースから抽出した。

【 0 1 0 4 】

- gDNAの抽出

ゲノムDNA (gDNA)の完全性、特にサイズ、純度並びにRNA及び塩混入がないことを保持するために、一連の予防策を行わなければならない。DNAの長鎖PCR増幅からの収率は、この条件により左右される。全体的に、サザントランスファー法で用いられるgDNAの精製で規定される予防策を遵守すべきである(Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989 . Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor, New York, USAを参照)。

10

【 0 1 0 5 】

- gDNAをボルテックスすることは避けるべきである。ボルテックスするほどgDNAは分解する。

- gDNAは、弱塩基性バッファー中に保存すべきである(例えば10 mM TRIS ; 7.5 ~ 8.5の間のpH)。

- 激しいピペット操作は避けるべきである(ピペットのチップでDNAが破壊される)。

- gDNAは、分解を防ぐために4 で保存すべきである。

20

- 長期保存の場合、gDNAはアルコール中に入れるべきである。

【 0 1 0 6 】

Quiagenの抽出キット : Genomic-Tip Systemが推奨される。

<http://www1.qiagen.com/Products/GenomicDnaStabilizationPurification/QiagenGenomicTipSystem/>

このキットは、150 Kb程度のDNA断片を保存することを可能にする。

キットで用いる抽出プロトコルの種類は、種々の細胞起源、例えば血液、細胞培養物、細胞分類由来の細胞、組織(胸腺、リンパ節など、列挙は網羅的ではない)に対する操作に用いることができる。組織の場合、キットで処理する前に、1) あまり結合性(cohesive)のない組織(胸腺、リンパ節など)について、トリプシン - EDTAでの穏やかな処理により細胞を個別化する試みを行い、2) 結合性の高い組織(例えば筋肉)について、ドライアイスの存在下の冷却条件下で乳棒での処理により粉末にする。

30

【 0 1 0 7 】

- DNA試料 :

* 胸腺

3つの全胸腺(1つは6日齢の雌性幼児、2つは10及び90日齢の雄性幼児)からのヒトゲノムDNAを、Gallagherら (28)に記載されるようにして抽出して増幅した。マルチプレックスPCR及びサザンブロッティングはManciniら (27)に記載されるようにして行う。

【 0 1 0 8 】

* 末梢血単核細胞(PBMC)

細胞は、フィコール密度勾配により分離される。試料は、25 ~ 55歳の正常個体を起源とする。cDNAは、Pernollet M.らに記載されるようにして抽出される。

40

【 0 1 0 9 】

- マルチプレックスPCR :

簡単に、マルチプレックスPCRは、Vの上流及びJの下流に位置するプライマ(上記の表1参照)を用いて行われ、これは10 kbまでを増幅することを可能にする。各反応の後、PCR産物の特異性を、内部プローブV (配列番号22 ~ 26)及びJ (配列番号27 ~ 37) (上記の表2参照)のハイブリダイゼーション並びに移動距離のコンピュータ分析(Quantity One 4.2.1 Software-Biorad, France)により確認する。

【 0 1 1 0 】

50

増幅は、以下の条件下で、反応あたり1.3単位の"エクスペンドハイファイデリティPCRシステム(expend high fidelity PCR system)" (Roche Diagnostics, Meylan, France)を用いて行う。

- 94 で1~2分間の最初の変性、
- 変性工程：90~94 で5~30秒間、プライマハイブリダイゼーション工程：58~62 で15~30秒間及び伸長工程：68~72 で14~20分間を含む15回の連続サイクル、及び
- 変性工程：90~94 で5~30秒間、プライマハイブリダイゼーション工程：58~62 で15~30秒間及び伸長工程：68~72 で14~20分間 + 各追加サイクルで15~20秒の追加を含む15回の連続サイクル、及び
- 72 で10分間の1回の最後の伸長サイクル。

10

【0111】

あるいは、条件は次のとおりにすることもできる。

- 94 で5分間の最初の変性、
- 変性工程：94 で30秒間、プライマハイブリダイゼーション工程：58 で30秒間及び伸長工程：72 で10分間を含む26回の連続サイクル、及び
- 72 で10分間の最後の伸長サイクル。

【0112】

各反応においてDNA量の標準化は、同じPCRサイクルにおける、再構成に付されない遺伝子の増幅により決定される。プライマの効率、マトリックスの連続希釈により証明される(28)。

20

選択されたすべてのプライマ(表1：配列番号1~21を参照)は、98%の増幅効率を示し、直接の相対比較を許容する。

【0113】

DNA断片を電気泳動(アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル、AGILENTバイオアナライザでのマイクロキャピラリー分離又はパルスフィールド泳動)により分離する。

視覚化は、限定されないが、次の方法により行うことができる。i) ナイロンメンブレンへのサザントランスファー及び標識プローブ(放射性同位体又は蛍光色素)のハイブリダイゼーション、ii) 標識塩基の増幅の間の使用及びゲル中で直接のその取り込みの測定、iii) DNA標識化剤(EtBr又はサイバークリーン)の増幅の間の使用、あるいはiv) 蛍光色素又はその他の酵素的視覚化手段(アビジン-ビオチン、ペルオキシダーゼ)で標識されたオリゴヌクレオチドの増幅の間の使用。

30

【0114】

- プライマ設計：

ヒトTCRAD遺伝子座のV 及びJ 遺伝子セグメントに特異的なプライマを、NTI vector-8suiteソフトウェア、Informaxを用いて、上記のようにしてそれらの配列特異性について選択した。非特異的ハイブリダイゼーションは、Blastのwww.ensembl.orgのサイトで確認される。選択されたプライマは、上記の表1に記載されたものに相当する。

【0115】

より具体的には：

・ V遺伝子について：ゲノムレベルにおいて、遺伝子の前のプロモータタイプの調節領域、シグナルペプチド又は「リーダー」をコードする領域(エキソン1)、イントロン及び可変領域をコードする領域(エキソン2)並びに再構成の空間的特異性を確実にする非翻訳RSS領域に対応する各要素が見出される。よって、可変プライマ(V)を、コーディング又は非コーディング領域にハイブリダイズするが、すべての場合においてV遺伝子のRSS配列にハイブリダイズするように選択する。

40

【0116】

・ J遺伝子について：プライマは、研究するJ遺伝子の下流(転写される鎖の3'に相当)が選択される。これは、J遺伝子のコーディング領域又は2つのJ遺伝子間の非コーディング領域内にあり得る。

【0117】

50

- gDNAのリアルタイム定量PCR :

PCR反応は、反応当たり1単位でFastStart (登録商標)キットを用いてライトサイクラー (Roche Diagnostics)で行う。

50 ngのDNAを各反応に使い、試料間のDNA量を、G3PDHハウスキーピング遺伝子の増幅により標準化する。

DNA試料の増幅条件は、次のとおりである：94 で10分間、次いで41サイクル(94 で15秒間、67 で7秒間、72 で7秒間)。

【 0 1 1 8 】

単一増幅産物の特異性を、製造業者(Roche Diagnostics)の指示に従う融解曲線の分析、並びにアガロースゲルでの移動及び特定の再構成のサイズの決定により決定する。

各試料は、3回の異なるアッセイで三重に分析する。

結果は、種々の胸腺及び末梢血リンパ球の分析したDNA試料での特定の再構成についてのサイクル数(相対的存在度)として表す。

【 0 1 1 9 】

- cDNAのリアルタイム定量PCR :

胸腺(10日齢及び3ヶ月齢の子供)から及び10個の末梢血リンパ球試料からのRNAを、製造業者の指示に従って、RNeasy RNA単離キット(Qiagen)を用いて単離する。

逆転写を、製造業者により推奨されるプロトコルに従ってSuperScript II RNase H⁻キット(Life Technologies)を用いて行う。

種々の合成反応のcDNAを混合し、同じ試料をすべてのPCRに用いる。

G3PDHハウスキーピング遺伝子及びCD3遺伝子での標準化により、等量の産物を得るように、各試料の適切な希釈を選択する。

【 0 1 2 0 】

cDNA試料についての増幅条件は、次のとおりである。95 で10分間、次いで47サイクル(95 で15秒間、70 で10秒間、72 で15秒間)。同じPCR条件下で、V 遺伝子ファミリーのメンバーの最大数を特異的に増幅するために、ハイブリダイゼーション温度は、よりストリンジентな条件に増大させた。

【 0 1 2 1 】

製造業者(Roche Molecular Biochemicals)の指示によると、所定のPCR反応の増幅効率は、次のように計算される。

$$E = 10^{-1/\text{勾配}}$$

PCRについての最大限可能な効率は $E = 2$ である。各PCR産物は、各サイクルで複製され、 -3.3 の勾配に相当する($2 = 10^{-1/(-3.3)}$)

選択された実験条件下では、すべてのV-C PCR反応は、 $3.67 \sim 3.73$ のよく似た増幅曲線勾配を示し、このことは類似の反応効率を示し、かつ $85 \sim 87\%$ のADV-AC反応の平均収率を与える。

【 0 1 2 2 】

単一増幅産物の特異性は、融解曲線の分析、アガロースゲルでの移動及び特定の再構成のサイズ測定、並びに配列決定により確立される。

PCR産物の融解曲線は、製造業者(Roche Diagnostics)の指示に従って測定される。各試料は、2つの異なるアッセイにおいて三重に分析される。

【 0 1 2 3 】

実施例2：ヒトJ領域の、そのマウスホモログ(胸腺)と比較した分析

マルチプレックスPCR (実施例1の条件)を、個別のV遺伝子についてのプライマと図1に示すようにJ領域をカバーするAJの下流の11の異なるプライマ(J1、J5、J10、J18、J24、J29、J33、J41、J48、J53、J56)とを組み合わせることにより行う。各列は、個別のPCR反応に対応し、各バンドはVのJセグメントとの再構成に対応し、各レーンの左側の数として示される。

【 0 1 2 4 】

V-J再構成で用いられる可能なJセグメントの数の決定

10

20

30

40

50

それぞれC 遺伝子の701、653及び569 kbに位置するヒトV8ファミリーの6つのメンバーのうち3つ(V8.2、V8.4及びV8.6)を、上記で規定するプライマを用いて、上記のマルチプレックスPCR法により増幅する。

図1に示す結果は、ヒトV8メンバーがJ 61~J 3の範囲のJセグメントと再構成されることを示す。全体のJ領域は、よって、組換えの影響を受けやすい。

【0125】

非機能的遺伝子セグメントの決定

TCR遺伝子座の非機能的遺伝子セグメントは、「再構成偽遺伝子」ともよばれる。本発明による方法は、これらの偽遺伝子の特徴付けることを可能にする。マウス及びヒトの両方において、あるセグメントは機能的でない(偽遺伝子)と同定されている。

マウスにおいて、60個のうち16個のJ 遺伝子が偽遺伝子である(24、29)が、ヒトにおいては、現在まで、偽遺伝子J 51、59及び60が特徴付けられているだけである(25)。

【0126】

図1に示すように、5つの追加のヒトJ セグメントが、V8ファミリーのメンバーとの再構成を与えることができない。これらの5つのJ セグメントは、J 55、J 25、J 19、J 2及びJ 1である。他のVファミリーについて同じことが観察される(図2)。

さらに、マウスにおいて記載される非再構成遺伝子J 46、41、36、29、20、14、8及び3は、ヒトにおいて機能的である。ヒトJ 領域は、再構成可能な機能的J セグメントをマウスより多く含み、このことはより多様化したJレパトアを意味する。

【0127】

実施例3：ヒトV-J再構成の定性的分析

J 領域から最も遠い4つのV 遺伝子(V1、V2、V3及びV5)及びJ 領域に近い5つのV 遺伝子(V26.2、V35、V38、V40、V41、C 遺伝子に対して-345と-227 kbの間に位置する)を、さらに具体的に研究した。

【0128】

V8多重遺伝子(multigene)ファミリーを、J領域の使用のコントロールとして用いる。これは、このファミリーが遺伝子座の中間に位置し、C 領域の-701、-653、-569 kbに位置するメンバーで構成されているからである。

V遺伝子に特異的なプライマ(表1参照)を、J 領域に特異的な7つのプライマ(53、48、41、29、18、10及び5)と組み合わせて用いる(図2)。分析を容易にするために、一回に1つのV遺伝子のみをJ 領域との再構成に供する。研究を、実施例1のマルチプレックスPCR条件下で行う(図4も参照)。

【0129】

図2は、個別のV遺伝子のJ 領域との再構成のプロフィールを表す。J 領域に関して近いV遺伝子が、最も近い5' J遺伝子と主に再構成する(V26.2、V35、V38、V40及びV41がJ 53、J 48、J 41、J 29セグメントと)ことを観察することができる。

これらの結果は、J 領域に関して遠いV遺伝子が、この領域の中心及び3'部分に位置するJ セグメントと主に再構成することも示す。

【0130】

コントロールのV8遺伝子は、J 領域にかかわらず組換えが均質であることを証明することを可能にする。図4は、配列番号5及び13のプライマ並びに配列番号29の検出プローブを用いて得た組換えを示す。

よって、V-J再構成は、染色体上のセグメントの位置に依存し、各V遺伝子は、Jセグメントの限られた量と再構成する。

【0131】

実施例4：ヒトV-J再構成の定量的分析

V-J再構成は、実施例1の条件の下では、種々の再構成に対応する各DNAバンドの強度の相対的定量化を用いて、イメージャー及びQuantity-One (Biorad)のような適切なソフトウェアを用いて定量的に分析することができる。

【0132】

10

20

30

40

50

図3aは、ヒトV-J レパトアのマトリックス図を示す。Z軸は、検出された再構成の相対的強度の積算を示し、J軸は、セグメントの分析の順序を示し、V軸は、近位から遠位の範囲の、研究したV遺伝子を表す。

【0133】

この図において、V41とV26.2の間に位置する遺伝子(TCRD遺伝子座の345 kbに位置する)は、それぞれ798及び925 kbに位置するV5とV1のものより3~7倍多く再構成することが注目される。J領域に関しては、最も近い5'領域は、遠い遺伝子より3~7倍多く再構成する。最後に、V8多重遺伝子ファミリーは、すべてのJ遺伝子セグメントとその位置にかかわらず等しい頻度で結合する。このことは、再構成が遺伝子座上の遺伝子の位置に依存するという仮定を確かにする。

【0134】

図3bは、V遺伝子(左側)及びJ遺伝子(右側)について、セグメントのそれぞれの全体的な使用を表す。

【0135】

実施例5：ヒト末梢Tリンパ球のTCR レパトア

末梢Tリンパ球のTCR 遺伝子組換えプロフィールを決定するために、胸腺について用いたのと同様のアプローチを用いる(実施例2参照)。

【0136】

V ファミリーの6つの遺伝子を選択し(TRAV)、これらは遺伝子座の遠位の領域(V1及びV2)、遺伝子座の中央の領域(V8)、及び遺伝子座の近位の領域(V38、V40及びV41)に分布していた。

これらの再構成プロフィールを、9つのプライマJ を用いて研究した。

分析を、4人の正常個体(25~55歳)を起源とする4つの個別の試料について行った。

【0137】

得られた結果は、TCRAD遺伝子座の組換えプロフィールが種々の正常個体において著しく類似していることを示す。

【0138】

正常な個体の末梢血リンパ球から得られた4つのDNA試料(PBL1~PBL4)についてのマルチプレックスPCRからのデータ

【表4】

V/J		56	53	48	41	33	29	24	18	5	1
V1	PBL 1	-	-	ND	-	+	+	+	+	-	+
	PBL 2	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
	PBL 3	-	-	ND	-	+	+	+	+	-	+
	PBL 4	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
V2	PBL 1	-	-	ND	+	+	+	+	+	+	-
	PBL 2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
	PBL 4	-	-	+	-	+	-	ND	-	-	+
V8	PBL 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PBL 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PBL 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PBL 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V38	PBL 1	+	+	+	+	+	+	ND	+	-	+
	PBL 3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	PBL 4	+	+	+	+	+	+	ND	+	-	-
V41	PBL 1	+	+	-	+	+	+	ND	-	-	-
	PBL 2	+	-	ND	+	-	+	+/-	+	-	-
	PBL 3	+	-	ND	+	-	+/-	+/-	+	-	-
	PBL 4	+	-	ND	+	-	+	-	+	-	-
V40	PBL 1	+	+	-	+	+	+	ND	-	-	-
	PBL 2	-	+	ND	+	+	+/-	+	-	-	-
	PBL 4	+	+	+	+	+	+/-	ND	-	-	-

10

20

30

【0139】

得られた結果は、胸腺で観察された近接の「規則」がここでも適用されることを示す。

【0140】

リンパ球試料の再構成プロフィール(分析した4つの試料のうち)を図6に示す。

特に、もっとも近いV 遺伝子(V38、V40及びV41)は、近いJ 遺伝子と主に再構成する。

V 遺伝子座の中間に位置するV8多重遺伝子ファミリーは、遺伝子座のJ セグメントのすべてと等しく再構成する。

遠いV 遺伝子(V1及びV2)は、中央及び3'の部分とそして最も近いJ 遺伝子と好んで再構成する。

【0141】

ある個体においては、それらの組み合わせプロフィール(combinatorial profile)において別々の違いが観察される(表5参照)。例えば、V1-J41、V2-J41及びV2を最も距離のあ

40

50

るJ遺伝子、又はV にとっては最も近いJ遺伝子と含む再構成、V40-J56、J29及びV41-J53、J24を含む再構成は、胸腺と比較すると、常に検出されるわけではない。

しかし、これらの差異は一般的な組み合わせの規則に影響せず、正常個体間でプロフィールが類似することを確認する。

【 0 1 4 2 】

- 種々のヒト末梢Tリンパ球DNA試料における特異的再配列の頻度の分析：

組換えプロフィールは胸腺及び末梢リンパ球において類似であるが、マルチプレックスPCRプロフィールは、特定の組み合わせについて異なる再構成頻度を示す。

【 0 1 4 3 】

これらの差異をより精密に分析するために、gDNAを用いるリアルタイム定量PCRを開発した。

再構成は、6人の正常個体の末梢リンパ球から得られたDNAを用いて分析した。これらは、マルチプレックスPCRにより試験した4つの試料のうち3つ及びマルチプレックスPCRにより試験された3つの胸腺DNAを含む。

近い遺伝子J56及びJ53、中央の遺伝子J41及びJ33並びに遠い遺伝子J10との組み合わせでのV1、V40及びV41の再構成を、より具体的に研究した。

【 0 1 4 4 】

結果を図7に示す。この結果は、各再構成の産物が出現するサイクル数として表し、最初に出現する産物が最も豊富である。

これらの結果に基づいて、次の知見が得られる。

- いくつかのV-J 組み合わせはPCR分析により検出可能ではなく、このことは、これらがあまり頻度が高くない(V1-J56、V1-J53、V40-J10及びV41-J10)という事実のためであることは疑いがない。この結果は、遺伝子座内のV 及びJ 遺伝子の互いの位置に依存しかつ試験したDNAすべてについて近いV -近いJ 及び遠いV -遠いJ の組み合わせを意味する、すでに観察された(図2及び6参照)組み合わせプロフィールを確かにする。

【 0 1 4 5 】

- 再構成は、胸腺に比べて末梢の細胞では量的にわずかに少ない(図7A及び7B)。

特に、V40-J56又はV41-J56及びV41-、V40-J53のようなV-J の近い再構成は、試験したリンパ球のDNAでは、胸腺で見出されたものに比べて少量しか見出されない(8~64倍少ない)。

これらの差異は、いくつかの方法で説明できる。

1) 胸腺と末梢血との間でT細胞の数が異なる；2) 胸腺では増幅されるかもしれない切り出しサークル(excision circles)に対する再構成の寄与が末梢T細胞では希釈される；3) 胸腺での二次再構成又は末梢での受容体修正事象が発生しており、このことがより遠いV-J セグメントの結合部との近い再構成を置き換えているかもしれない；4) 負の選択事象がある。

【 0 1 4 6 】

- V1-J33のようないくつかの組み合わせは、試験した個体すべてにおいて末梢で好ましい(高頻度 = 低いサイクル数)。

- 特定の再構成の拡張/収縮が、ある個体で同定できる：V40-J41、V1-J41、V1-J10、V41-J41、V41-J33、V40-J33。

他の再構成、例えばV41-J41は、ある個体では見出されず、おそらく、負の選択事象を反映している。

これらの結果は、種々の胸腺試料の間では組換えプロフィールが量的に類似であるが、末梢Tリンパ球試料の間ではより大きい不均質性が観察されることを示す。

この個体間の相違は、種々の事象、例えば胸腺の選択、免疫応答又は恒常性維持力により誘導される、あるクロノタイプの拡張に関係する。

【 0 1 4 7 】

- いくつかの個体におけるVファミリー転写産物の頻度：

V 遺伝子の半定量的分析を用いる以前の試験(48)は、CD4+又はCD8+細胞でのあるV セ

10

20

30

40

50

グメントの選択的な発現の点において偏りを示している。

しかし、ある特定のV ファミリーの普及の詳細な分析は、特異的V 試剤がないことから、確立されていない。

この問題点を克服するために、リアルタイム定量PCR分析を開発した。

【0148】

ファミリーの約77%をカバーできる特異的プライマを選択した(34個のV ファミリーのうち26について)。得られた効率は、選択したプライマのために、種々の個体におけるV ファミリーの発現の頻度を比較することを可能にする。

表5は、Vファミリー転写産物の頻度を測定するのに用いたプライマを表す。

【0149】

【表5】

プライマ	配列 5'-3'
hTRAV 1b	GCAACATGCTGGCGGAGCACCCAC(配列番号 46)
hTRAV 2b	ATGGCTTTGCAGAGCACTCTGG(配列番号 47)
hTRAV 3c	GCCTCTGCACCCATCTCGA(配列番号 48)
hTRAV 5b	GAGGATGTGGAGCAGAGTCTTTTC(配列番号 49)
hTRAV 6	CGGCCACCCCTGACCTGCAACTATA(配列番号 50)
hTRAV 7c	GGGACCCAGCAGGGAGACGTTGCC(配列番号 51)
hTRAV 8-1	ATGCTCCTGTTGCTCATAACCAGTG(配列番号 52)
hTRAV 9-2	CCTGAAAGCCACGAAGGCTGATGA(配列番号 53)
hTRAV 10c	GCATCTGACGACCTTCTTGGT(配列番号 54)
hTRAV 12-b	CCATGATGCGGGGACTGGAGTTGC(配列番号 55)
hTRAV 13-1	CATTCGTTCAAATGTGGCGAAAA(配列番号 56)
hTRAV 14c	CAGAAGATAACTCAAACCCAACCA(配列番号 57)
hTRAV 16b	AGAGTGACTCAGCCCGAGAAG(配列番号 58)
hTRAV 17	CCGGGCAGCAGACACTGCTTCTTA(配列番号 59)
hTRAV 19	TCGTCGGAAGCTCTTTTGATGAGCA(配列番号 60)
hTRAV 20	GTCTTGTGGCTTCAGCTTGGC(配列番号 61)
hTRAV 21	TGCCTCGCTGGATAAATCATCAGG(配列番号 62)
hTRAV 22D	GGGAGCTCTGCTGGGGCTCTTGAG(配列番号 63)
hTRAV 24B	GCAGCTTCCCTTCCAGCAAT(配列番号 64)
hTRAV 25	GGAGAGGACTTCAACACGTAAGTGC(配列番号 65)
hTRAV 26/DV7B	GGCTGGTGGCAAGAGTAACTG(配列番号 66)

hTRAV 27	CACTGCGGCCAGCCTGGTGATAC(配列番号 67)
hTRAV 29B	CAGCAAGTTAAGCAAAATTCACCA(配列番号 68)
hTRAV 30c	GCCGTGATCCTCCGAGAAGGGG(配列番号 69)
hTRAV 34	TGATGATGCTACAGAAAGGTGGGG(配列番号 70)
hTRAV 35	GGCTGGGAAGTTTGGTGATATAGTGTG(配列番号 71)
hTRAV 36/DV7	ATGATGAAGTGTCCACAGGCT(配列番号 72)
hTRAV 38	AGCAGCCAAATCCTTCAGTCTCAA(配列番号 73)
hTRAV 40	AAGACAAAACTCCCCATTGTGAAATA(配列番号 74)
hTRDV 3	CAGAGTTCCCCGGACCAGAC(配列番号 75)

【0150】

定量PCRの結果は、各V-C ファミリーについて所定の産物が出現するサイクル数で表す。

種々のV-C 産物の出現の順序は、試料中の考慮するcDNAでのそれらの相対的存在度に対応し、最も豊富な転写産物が最初に検出される。

【0151】

10人の個体から得られた正常末梢Tリンパ球からのcDNAを代表する増幅曲線を、図8Aに示す。

10

20

30

40

50

このデータは、ヒトVファミリーが、選択が胸腺から及び成熟末梢Tリンパ球からであるときに、Tリンパ球では同じ割合で発現されないことを示す。これらのデータは、異なる種の個体における、種々のタイプのMHCとのV発現の頻度が、やはり同様であることも示す(図8B)。

よって、ADVファミリー発現プロファイルは、V遺伝子の頻度を分析することにより同定できる。

【0152】

増幅効率における最大の差異が、種々のV-C組み合わせの間で、例えば30回の増幅サイクルにわたって、サイクル当たり2%であると考えられる場合、このことは、種々の産物の測定において1回のサイクルの差があり得ることを意味する。

【0153】

よって、いくつかの群が規定される。

- ・ グループ1：1回目又は2回目のサイクルで出現(高発現)：V 21、13、38、19及び17；
- ・ グループ2：グループ1のものより発現が4～16少ない：V 27、26、16、5、36、29、10、20、30、6、25及び24。

いくつかのVファミリー、例えばV1、V2、V3及びV8は、個体によりグループ1、又はグループ2で見出すことができる。

【0154】

- ・ グループ3：常に弱く発現している遺伝子(最も発現されている遺伝子から5サイクル以上の差)：V 7、14、22、40、34及び25。

V発現が確立されているレベルを評価するために、胸腺DNAに対して追加の分析を行った。胸腺では(図8B参照)、胸腺でより多く発現しているとみられるV40を除いて、末梢Tリンパ球におけるのと同じプロファイルが観察される。

【0155】

Vファミリーのこれらの種々のレベルの発現は、TCRレパトアの作製に更なる偏りを追加し、分析されるのはV/J対そのものであるという本発明による方法の利点を示す。

【0156】

参考文献

1. FINK P.J. et al., Journal of Experimental Medicine, 1978, 148, 766-775.
2. DAVIS M.M. et al., Nature, 1988, 334, 395-402.
3. SAITO H. et al., Nature, 1984, 309, 757-762.
4. GARCIA K.C. et al., Annu Rev Immunol, 1999, 17, 369-397.
5. ALLISON T.J. et al., Nature, 2001, 411, 820-824.
6. HENNECKE J. et al., Cell, 2001, 104, 1-4.
7. HAMROUNI A. et al., J Exp Med, 2003, 197, 601-614.
8. DIETRICH P.Y. et al., J Immunol, 2003, 170, 5103-5109.
9. BASSING C.H. et al., Cell, 2002, 109, suppl: S45-55.
10. CHIEN Y.H. et al., Nature, 1984, 309, 322-326.
11. SLECKMAN B.P. et al., Immunol Rev, 1998, 165, 121-130.
12. CAPONE M. et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95, 12522-12527.
13. VON BOEHMER H. et al., Curr Opin Immunol, 1999, 11, 135-142.
14. GELLERT M., Adv Immunol, 1997, 64, 39-64.
15. OETTINGER M.A., Science, 1990, 248, 1517-1523.

【0157】

16. GELLERT M., Annu Rev Biochem, 2002, 71, 101-132.
17. McBLANE J.F. et al., Cell, 1995, 83, 387-395.
18. VAN GENT D.C. et al., Cell, 1996, 85, 107-113.
19. HESSE J.E. et al., Genes Dev, 1989, 3, 1053-1061.
20. COWELL L.G. et al., J Exp Med, 2003, 197, 207-220.

10

20

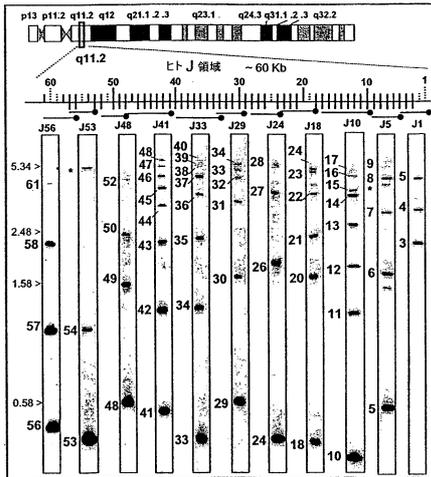
30

40

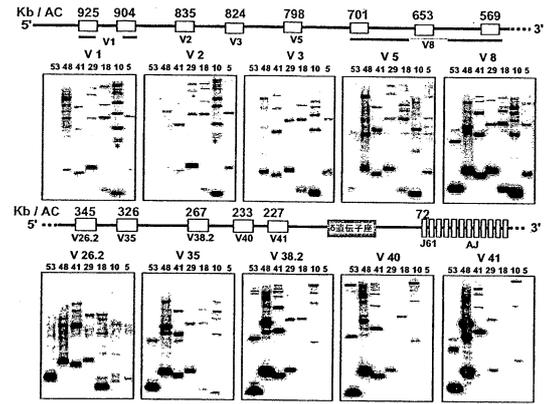
50

21. CABANIOLS J.P. et al., J Exp Med, 2001, 194, 1385-1390.
22. SAITO T. et al., J Exp Med, 1988, 168, 1003-1020.
23. CASROUGE A. et al., J Immunol, 2000, 164, 5782-5787.
24. PASQUAL N. et al., J Exp Med, 2002, 196, 1163-1173.
25. KOOP B.F. et al., Genomics, 1994, 19, 478-493.
26. GLUSMAN G. et al., Immunity, 2001, 15, 337-349.
27. MANCINI S.J. et al., J Immunol, 2001, 167, 4485-4493.
28. GALLAGHER M. et al., J Immunol, 2001, 167, 1447-1453.
29. GAHERY-SEGARD H. et al., Immunogenetics, 1996, 44, 298-305.
30. KRANGEL M.S., Nat Immunol, 2003, 4, 624-630. 10
- 【 0 1 5 8 】
31. YANCOPOULOS G.D. et al., Cell, 1986, 44, 251-259.
32. MOSTOSLAVSKY R. et al., Nat Immunol, 2003, 4, 603-606.
33. STRAHL B.D. et al., Nature, 2000, 403, 41-45.
34. McBLANE et al., Curr Biol, 2000, 10, 483-486.
35. HSIEH C.L. et al., Embo J, 1992, 11, 315-325.
36. SPICUGLIA S. et al., Mol Cell, 2002, 10, 1479-1487.
37. HUANG C. et al., J Immunol, 2001, 166, 2597-2601.
38. WANG F. et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95, 11834-11839.
39. DAVODEAU F. et al., Embo J, 2001, 20, 4717-4729. 20
- 【 0 1 5 9 】
40. McMURRY M.T. et al., Science, 2000, 287, 495-498.
41. MAUVIEUX L. et al., Eur J Immunol, 2001, 31, 2080-2086.
42. VILLEY I. et al., Immunity, 1996, 5, 331-342.
43. ARSTILA T.P. et al., Science, 1999, 286, 958-961.
44. BASSING C.H. et al., Nature, 2000, 405, 583-586.
45. LEE A.I. et al., PloS Biol 1: E1, 2003.
46. HODGES E. et al., J Clin Pathol, 2003, 56, 1-11.
47. PERNOLLET M. et al., Clin. Exp. Immunol., 2002, 130, 518-525.
48. GULWANI-AKOLKAR B. et al., J. Immunol., 1995, 154, 3843-3851. 30
- 【 図面の簡単な説明 】
- 【 0 1 6 0 】
- 【 図 1 】 胸腺のV8-J 再構成を評価するように行われた本発明による方法(マルチプレックスロングPCR)の結果、つまりJ 領域の全体的な分析を示す。
- 【 図 2 】 J 領域との再構成の分布におけるV 遺伝子の位置の役割を示す。
- 【 図 3 】 ヒトV-J レパトアマトリックスの図を示し、再構成は遺伝子座上の該遺伝子の位置に依存する。
- 【 図 4 】 V8-J組換えの検出に適用される本発明による方法の原理を示す。
- 【 図 5 】 ヒトV 遺伝子のRSSスコア、遺伝子座内の位置及び主に用いられたJセグメントの比較を表す。 40
- 【 図 6 】 末梢血リンパ球におけるヒトTCR 鎖の再構成プロフィールを表す。
- 【 図 7 】 定量的ゲノムPCR分析により測定された、6人の正常個体における特異的V-J 再構成の相対的存在度を表す。
- 【 図 8 】 (A)において、TCR 転写産物の定量を表す。(B)において、リアルタイム定量PCRによるADV-AC転写産物の相対的存在度を表す。

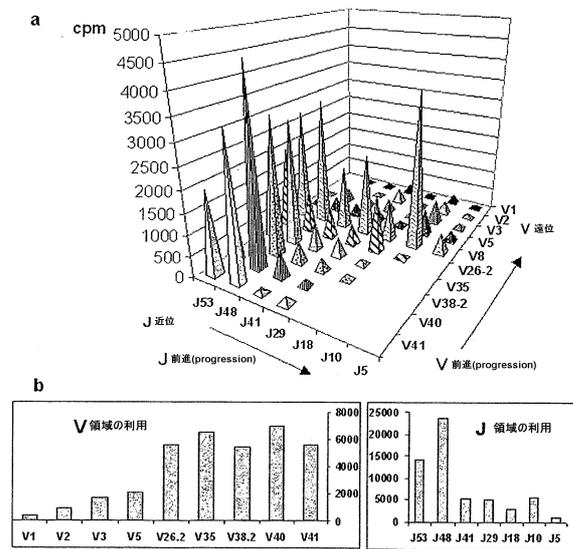
【図1】



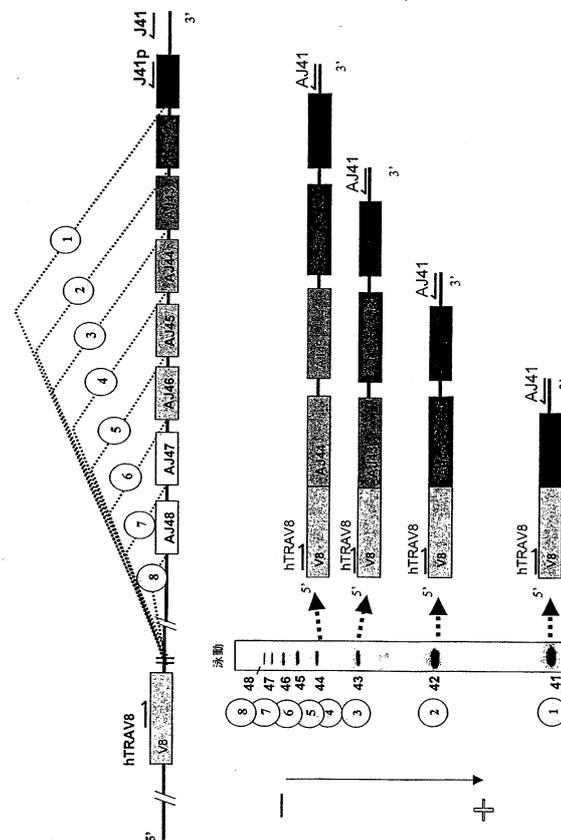
【図2】



【図3】



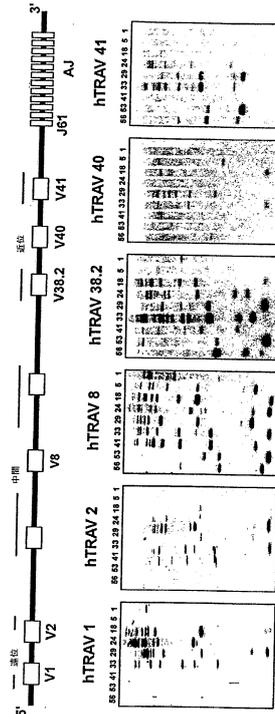
【図4】



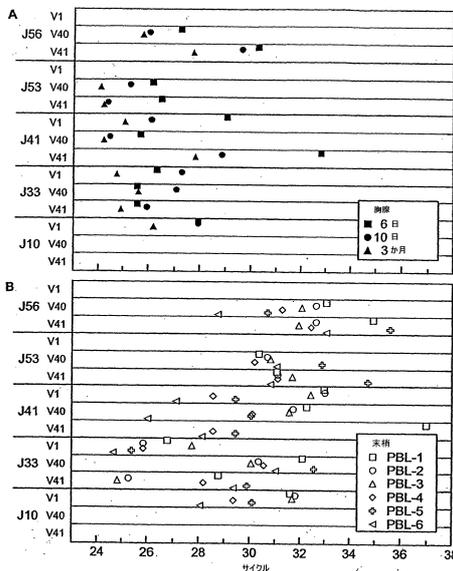
【図5】

hV遺伝子	保守配列	保守率 %	変異配列	保守率 %	RSS	DRUG	シグナル	J
hV1-1	CACAGTC	100	ACTATGAG	56	CAATTC	72	925	J10
hV1-2	CACAGTC	86	ACTATGAG	63	CAATTC	69	904	J10
hV2	CACAGTC	86	TCAGGAC	56	CAATTC	75	835	J10
hV3	CACAGTC	86	TCAGGAC	56	CAATTC	80	824	J10
hV5	CACAGTC	86	TCCTGAG	94	CAATTC	100	790	J10
hV8-2	CACAGTC	100	TCAGGAC	50	CAATTC	63	701	全J
hV8-4	CACAGTC	100	TCAGGAC	50	CAATTC	63	653	全J
hV8-6	CACAGTC	100	TCCTGAG	44	CAATTC	65	569	全J
hV26-2	CACAGTC	100	TCAGGAC	56	CAATTC	64	345	J48
hV35	CACAGTC	100	TCAGGAC	94	CAATTC	90	326	J48
hV38-2	CACAGTC	100	TCAGGAC	31	CAATTC	78	267	J48
hV40	CACAGTC	86	TCAGGAC	44	CAATTC	60	233	J48
hV41	CACAGTC	100	TCAGGAC	94	CAATTC	90	227	J48
コンソラ	CACAGTC		TCAGGAC		CAATTC			

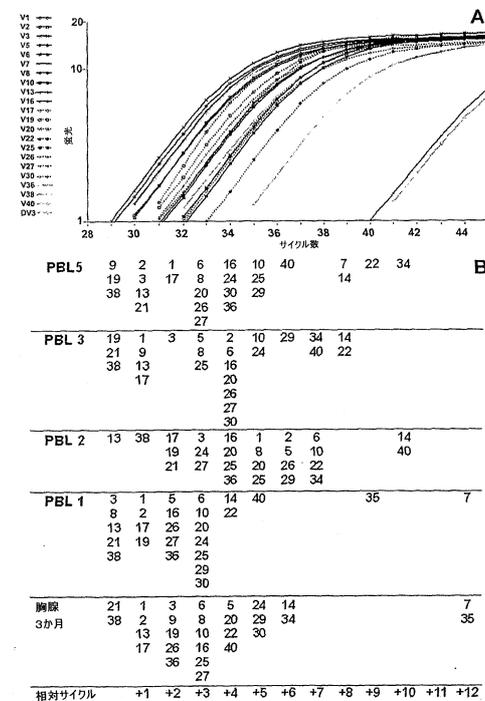
【図6】



【図7】



【図8】



【配列表】

0005709341000001.app

フロントページの続き

(73)特許権者 500539103

コミッサリア ア レネルジ アトミック エ オー エネルジ アルターネイティブス
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENE
RGIES ALTERNATIVES
フランス、75015 パリ、リュ レブラン バティメント <レ ポナント ディー>、25
25, rue Leblanc Batiment (Le Ponant D), 75015
PARIS, France

(74)代理人 100065248

弁理士 野河 信太郎

(72)発明者 マルシェ, バトリス

フランス、エフ - 38240 メイラン、アレー デュ ガイレ 2

(72)発明者 ジョピン - マルシェ, エヴェリン

フランス、エフ - 38240 メイラン、アレー デュ ガイレ 2

(72)発明者 パスカル, ニコラス

フランス、エフ - 38100 グルノーブル、アレー デ ロマンティク 43

合議体

審判長 中島 庸子

審判官 高 美葉子

審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 特表2000-500339(JP, A)

特開平04-501355(JP, A)

特開平05-509234(JP, A)

THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE(2002.1
1.04), Vol.196, No.9, p.1163-1173

Science(1999)、Vol.286, p.958-961

J Exp Med.(1986), Vol.164, No.1, p.90-103

Proc Natl Acad Sci USA(1994), Vol.91, No.6, p.
2216-2220向井博之, 「LA PCR」, 蛋白質核酸酵素, 1996.04.10発行, Vol.41, N
o.5, p.585-594武田理, LA-PCRに適した鋳型DNAの調製, 改訂PCR Tips, 1999.12.1
0発行, 第2版, p.18-24

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q1/68

C12M1/00

PubMed

WPI

专利名称(译)	用于重建个体或定量评估靶遗传重组的方法及其用途		
公开(公告)号	JP5709341B2	公开(公告)日	2015-04-30
申请号	JP2006541986	申请日	2004-12-03
[标]申请(专利权)人(译)	国立研究所多拉城主Edora雅倩鲁沙医疗安瑟伦 法国国家健康医学研究院 提交SARRIA阵列内尔双原子 原子能委员会		
申请(专利权)人(译)	国立研究所德拉城主等德拉Rushurushe医疗 (安瑟伦) Komissaria一个Reneruji原子		
当前申请(专利权)人(译)	Ansutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 Komissaria一个Reneruji原子等太子港Eneruji阿尔特本地扫描		
[标]发明人	マルシェパトリス ジョビンマルシェエヴェリン パスカルニコラス		
发明人	マルシェ,パトリス ジョビン-マルシェ,エヴェリン パスカル,ニコラス		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6881 C12Q1/6883 C12Q1/6886 C12Q2600/16		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/53.M G01N33/566		
优先权	2003014289 2003-12-05 FR		
其他公开文献	JP2007515955A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

通过选择性扩增基因组DNA定量评估靶向遗传重排或重组的方法。 - 用于定量评估靶向遗传重排或重组的方法包括： - (a) 从样品中提取人基因组DNA (I)； - (b) 通过多重PCR扩增 (I) 的区段 (II)，其大小从几百到几万碱基； - (c) 分离扩增的 (II) 和； - (d) 检测重排/重组的片段。 - 步骤 (b) 在以下情况下进行： - (i) 一个或多个引物对，其中至少一个引物与被扩增的一个基因 (Vx) 的上游和/或3'末端杂交，并且其他杂交在另一个基因的下游和/或3'末端杂交 (Jy) 正在进行分析，其中Vx和Jy可能参与遗传重排，以及 - (ii) 至少一种DNA聚合酶可以扩增 (II) (优选超过10kb) 并具有校正活性以改善延伸反应。 - 扩增步骤还包括初始变性；变性，杂交和伸长的循环，在68-72°C下伸长至少10分钟。 C.-以下还包括独立权利要求： - (1) 包含指定引物和探针的试剂盒，以及用于进行PCR的常用缓冲液和试剂； - (2) 用于新工艺的引物，具有21个序列中的任何一个； - (3) 用于新过程的检测探针，其具有16个序列中的任何一个。

V/J		56	53	48	41	33	29	24	18	5	1
V1	PBL 1	-	-	ND	-	+	+	+	+	-	+
	PBL 2	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
	PBL 3	-	-	ND	-	+	+	+	+	-	+
	PBL 4	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
V2	PBL 1	-	-	ND	+	+	+	+	+	+	-
	PBL 2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
	PBL 3	-	-	+	-	+	-	ND	-	-	+
	PBL 4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
V8	PBL 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PBL 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PBL 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PBL 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V38	PBL 1	+	+	+	+	+	+	ND	+	-	+
	PBL 3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	PBL 4	+	+	+	+	+	+	ND	+	-	-
V41	PBL 1	+	+	-	+	+	+	ND	-	-	-
	PBL 2	+	-	ND	+	-	+	+/-	+	-	-
	PBL 3	+	-	ND	+	-	+/-	+/-	+	-	-
	PBL 4	+	-	ND	+	-	+	-	+	-	-
V40	PBL 1	+	+	-	+	+	+	ND	-	-	-
	PBL 2	-	+	ND	+	+	+/-	+	-	-	-
	PBL 3	+	+	+	+	+	+/-	ND	-	-	-
	PBL 4	+	+	+	+	+	+/-	ND	-	-	-