

(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2014-524015

(P2014-524015A)

(43) 公表日 平成26年9月18日(2014.9.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Z N A Q	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 2 9
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 F	4 B O 6 3
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 Z	4 B O 6 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 64 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-515293 (P2014-515293)
 (86) (22) 出願日 平成24年6月18日 (2012.6.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年2月5日 (2014.2.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2012/051390
 (87) 国際公開番号 W02012/172370
 (87) 国際公開日 平成24年12月20日 (2012.12.20)
 (31) 優先権主張番号 1110371.0
 (32) 優先日 平成23年6月17日 (2011.6.17)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 505423678
 エレクトロフォレティクス リミテッド
 イギリス国 K T 1 1 3 E P サリー
 コバム ダウンサイド ブリッジ ロード
 コヴェハム ハウス
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100122389
 弁理士 新井 栄一
 (74) 代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫
 (74) 代理人 100169971
 弁理士 菊田 尚子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化合物の感受性ポテンシャルを決定するための材料と方法

(57) 【要約】

本発明は細胞のin vitroプロテオーム分析であって、前記細胞に対する化合物の感作ポテンシャル(アレルギーポテンシャルを含む)を決定する前記分析に関する。化学物質が接触および/または呼吸器感作物質の感作ポテンシャルを有するかどうかを決定するために実施するアッセイを可能にするいくつかのタンパク質マーカーが提供される。

【選択図】図1

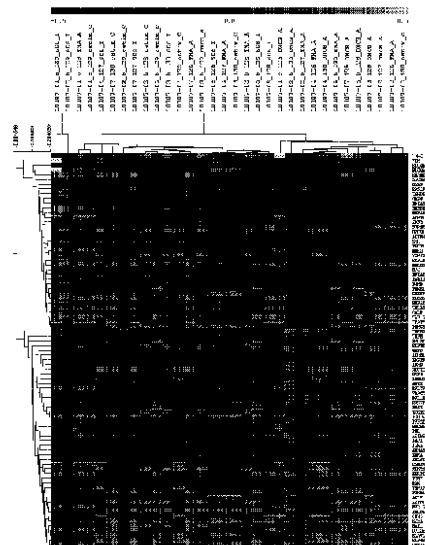


Figure 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

試験化合物の感作ポテンシャルを決定する *in vitro* の方法であって、

(a) 前記試験化合物を細胞と接触させるステップ；

(b) 前記細胞における、表1、表1(A)グループ1、表1(B)グループ2、表1(C)グループ3またはそれらの組み合わせから選択される1以上のマーカータンパク質の存在または発現レベルの変化を決定するステップ；および

(c) 前記存在または発現のレベルの変化に基づいて前記試験化合物の感作ポテンシャルを決定する（ここで、前記1以上のマーカータンパク質の発現の存在もしくはレベルの変化は前記試験化合物が感作ポテンシャルを有することを示す）ステップ

を含むものである前記方法。

10

【請求項 2】

前記細胞が皮膚、肺または免疫系から成る群より選択される代表的な細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記免疫系の細胞が樹状細胞である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記細胞が樹状様特性を持つヒトまたは動物細胞株由来である、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記細胞がリンパ様または骨髓細胞株由来である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞株が THP-1、U937 および Mutz-3 細胞から成る群より選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記1以上のマーカータンパク質が表1(A)グループ1から選択される、請求項 1 ～ 6 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

前記1以上のマーカータンパク質が表1(B)グループ2から選択される、請求項 1 ～ 6 のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記1以上のマーカータンパク質が表5から選択される、請求項 1 ～ 6 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 10】

ステップ(b)が1以上のタンパク質マーカーの存在または発現レベルを参照レベルと比較するステップを含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ(b)が細胞を前記マーカータンパク質または前記マーカータンパク質をコードする核酸配列と選択的に結合する少なくとも1つの特異的結合メンバーと接触させるステップ；および前記特異的結合メンバーとマーカータンパク質または前記マーカータンパク質をコードする核酸配列により形成される複合体を検出および/または定量するステップを含むものである、請求項 1 ～ 10 のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記決定するステップが1以上のマーカータンパク質の既知の発現レベルの標準を用いる標準曲線を準備するステップおよび試験化合物と接触させた細胞を用いて得た読取値を比較して1以上のマーカータンパク質の発現レベルの変化の測定値を得るステップを含むものである、請求項 1 ～ 11 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 13】

前記特異的結合メンバーが前記マーカータンパク質と特異的かつ選択的に結合する抗体またはそのフラグメントであってもよい、請求項 11 または請求項 12 に記載の方法。

50

【請求項 14】

前記特異的結合メンバーが前記マーカータンパク質と特異的かつ選択的に結合する自己抗体またはそのフラグメントであり、前記自己抗体は皮膚または肺刺激またはアレルギーのある患者から得た血液サンプルから調製されたものである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

特異的結合メンバーがアプタマーである、請求項 11 または請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

ステップ(b)を質量分析により実施する、請求項 1 ~ 10 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 17】

ステップ(b)をタンパク質マーカー由来のペプチドに対する1以上の遷移を用いる選択反応モニタリング；

(i) 試験下の細胞中のペプチドレベルを、細胞の感受性を表すことが先に決定されたペプチドレベルと比較するステップ、および

(ii) 前記1以上のマーカータンパク質の発現の変化に基づいて試験化合物の感受性ポテンシャルを決定するステップ

により実施する、請求項 1 ~ 10 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 18】

ステップ(i)が、既知量の対応する合成ペプチドを用いて試験下の細胞からのマーカータンパク質由来のペプチドの量を決定するステップを含み、ここで合成ペプチドは標識を除いて細胞から得られるペプチドと配列が同一である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

標識は異なる質量または重同位体のタグである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

ステップ(b)が試験化合物と接触後の細胞中の前記1以上のマーカータンパク質をコードするmRNAの存在および量を決定するステップを含むものである、請求項 1 ~ 12 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 21】

mRNAの存在または量を、タンパク質マーカーをコードする遺伝子またはそれらの相補体の配列と選択的に結合するプライマーまたはプローブを用いて決定する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

結合メンバーが固体支持体上に固定された、請求項 11 ~ 21 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 23】

1以上のマーカータンパク質または前記マーカータンパク質をコードする核酸配列と特異的かつ選択的に結合することができる1以上の結合メンバーを含むものである固体支持体。

【請求項 24】

表1から選択されるタンパク質マーカーの断片と同一である配列を有する合成ペプチドであって、前記断片がトリプシンによるタンパク質マーカーの消化後にArgC、AspN または Lys-C消化物であることが決定されている前記合成ペプチド。

【請求項 25】

さらに標識を含むものである、請求項 24 に記載の合成ペプチド。

【請求項 26】

標識が重同位体である、請求項 25 に記載の合成ペプチド。

【請求項 27】

選択反応モニタリングに使用する、請求項 24 ~ 26 のいずれか1項に記載の合成ペプチド。

【請求項 28】

前記タンパク質マーカーが表5から選択される、請求項 24 ~ 27 のいずれか1項に記載

10

20

30

40

50

の合成ペプチド。

【請求項 29】

試験化合物の感作ポテンシャルをin vitroで決定するために使用するキットであって、利用者が表1に与えられた1以上のマーカートンパク質またはその断片、前記マーカートンパク質に対する1以上の抗体、および前記マーカートンパク質またはその断片をコードする核酸分子から選択される分析物の試験下の細胞中の存在または発現レベルを決定することを可能にするキットであり、かつ

(a)分析物と結合することができる結合メンバーがその上に固定された固体支持体；

(b)標識を含む現像剤；および、任意に

(c)洗浄液、希釈剤およびバッファーから成る群より選択される1以上の成分を含むものである前記キット。

10

【請求項 30】

結合メンバーが表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(C)グループ3あるいはそれらの組み合わせから選択されるマーカートンパク質と選択的に結合できる抗体である、請求項 29 に記載のキット。

【請求項 31】

前記結合メンバーが表5から選択されるマーカートンパク質と選択的に結合できる抗体である、請求項 30 に記載のキット。

【請求項 32】

結合メンバーが前記マーカートンパク質をコードする核酸と選択的に結合できる核酸配列である、請求項 29 に記載のキット。

20

【請求項 33】

試験化合物の感作ポテンシャルをin vitroで決定するために使用するキットであって、利用者が表1に与えられた1以上のマーカートンパク質またはその断片の試験下の細胞中の存在または発現レベルを決定することを可能にするキットであり；

(a)アッセイに適合しうるフォーマットの参照ペプチドのセット（ここでセット中の各ペプチドは表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(c)グループ3あるいはそれらの組み合わせに与えられた記載の1以上のマーカートンパク質のそれぞれを一意的に表すものである）；および

任意に(c)洗浄液、希釈剤およびバッファーから成る群より選択される1以上の成分を含む前記キット。

30

【請求項 34】

アレルゲンまたは刺激物質に曝された個体における、前記アレルゲンまたは刺激物質による接触または呼吸感作を診断または予後モニタリングする方法であって、

(a)前記個体から得た生体サンプル中の、表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(c)グループ3から選択される1以上のタンパク質マーカまたは前記タンパク質マーカもしくはその部分をコードする核酸の存在または発現レベルを決定するステップを含むものである前記方法。

【請求項 35】

生体サンプルが皮膚細胞、肺細胞、または免疫系細胞から選択される細胞を含むものである、請求項 34 に記載の方法。

40

【請求項 36】

前記1以上のマーカートンパク質が表5から選択される、請求項 34 または請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

アレルゲンまたは刺激物質に曝された個体における、前記アレルゲンまたは刺激物質による接触または呼吸感作を診断または予後モニタリングするキットであって、

(a)1以上の結合メンバー（ここで、各結合メンバーは表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(c)グループ3から成る群より選択されるタンパク質マーカ；またはタンパク質マーカもしくはそれらの断片をコードする核酸と選択的に結合するものである

50

）がその上に固定された固体支持体；
(b) 標識を含む現像剤；および
(c) 洗浄液、希釈剤およびバッファーから選択される1以上の成分
を含むものである前記キット。

【請求項 38】

前記タンパク質マーカーが表5から選択される、請求項 37 に記載のキット。

【請求項 39】

化学感作物質に対する個体の診断または予後モニタリングに用いるための、表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；表1(c)グループ3、または表5から選択される複数のタンパク質マーカー。

10

【請求項 40】

化学感作物質に対する個体の *in vitro* 診断および予後モニタリングのための、表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；表1(c)グループ3、または表5から選択される複数のタンパク質マーカーの使用。

【請求項 41】

化学感作物質に対する個体の *in vitro* 診断および予後モニタリングのための、表1または表5に記載の1以上のマーカータンパク質またはその断片、前記マーカータンパク質に対する1以上の抗体および前記マーカータンパク質またはその断片をコードする1以上の核酸分子から選択される、分析物と結合することができる複数の結合メンバーの使用。

20

【請求項 42】

前記結合メンバーが固体支持体に固定されている、請求項 41 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は化合物の細胞に対する感作ポテンシャル（アレルギーポテンシャルを含む）を決定するための、細胞の *in vitro* プロテオーム分析に関する。いくつかのタンパク質マーカーが同定されていてこれらはある化合物がアレルギーまたは刺激ポテンシャルを有するかどうかを決定するための細胞に基づく分析を可能にする。特に、限定されるものでないが、試験化学物質が接触（すなわち、皮膚における）および/または呼吸器（すなわち、肺における）感作物質の感作ポテンシャルを有するかどうかを決定するためのアッセイを提供する。

30

【背景技術】

【0002】

アレルギーは免疫系の1型過敏性障害である。通常のアレルギー反応は喘息および接触皮膚炎を含む。世界中でアレルギー疾患の発症は着実に増加している。アレルギー障害は患者の職業的および社会的生活に負の影響を与える。アレルギー疾患を治療する保険システムに対する費用は相当に大きく、流行に対応して増加する。アレルギー接触性皮膚炎（ACD）はヒトに見られる免疫毒性の最もありふれた形態とされている。ACDはT細胞が介在する遅延型皮膚過敏症であって、通常は金属および各種の様々な化学物質および化粧品に反復曝露した後に発症する。通常は化学接触感作剤は、シナムアルデヒド（CA）、ジニトロクロロベンゼン（DNCB）、グリオキザール、オイゲノール、p-フェニレンジアミン（PPD）、およびテトラメチルチウラム（TMTD）である。PPDは広くパーマネント毛髪染剤として、繊維製品、一時的なタトゥー、写真現像剤、印刷インク、黒色ゴム、オイル、グリースおよびガソリンにおいて使用される化学物質である。化学呼吸器アレルギーはそれほど一般的でない。しかし、呼吸器感作は喘息を引き起こすこともあり、やはり重要な挑戦課題である。通常は化学呼吸器感作物質は、グルタルアルデヒド、無水トリメリット酸（TMA）、ジフェニルメタンジイソシアネートおよびヘキサクロロ白金酸アンモニウムである。

40

【0003】

アレルギー性接触皮膚炎を引き起こす多くの職業病のアレルゲンは化学物質（またはハ

50

ブテン)であって、遅延型免疫応答を引き起こすには担体タンパク質と結合しなければならない。現在、化学物質の感作ポテンシャルは動物実験、例えば、モルモット最大化試験(Magnussen and Kligman, 1969)および局所リンパ節アッセイ(LINA)(Kimber et al., 1995)において評価されている。しかし、欧州指針(the European Directive 86/609/EEC)および化粧品指針第7回改定版(the 7th Amendment to the Cosmetics Directive 86/609/EEC)は2009年3月以後の全ての化粧成分に対して動物試験禁止を施行する。さらに市販禁止は、反復投与毒性(これについては締切期限は2013年である)を除く全ての評価項目について動物で試験した成分を含有する化粧品に対して施行されている。

【0004】

in vitroおよびin silico予測試験方法の開発を目指して多数の研究が行われている。しかし、接触感作化学物質の同定とスクリーニングのための認証されたin vitroアッセイは利用できるものがない。

【0005】

典型的な化学アレルゲンは低分子量であって1000ダルトン未満の質量を持ち、求電子性または親水性であって、タンパク質の求核アミノ酸と反応しうる。かかる反応性の低分子量化学物質は体内の大きい担体タンパク質と結合してハブテン-タンパク質を形成するとアレルゲンになることができる。いくつかの化学アレルゲンは元来アレルゲンでなく、アレルギー反応に加わる前に代謝変換(プロ-ハブテン)または酸化(プレ-ハブテン)を受けなければならない。例えば、オイゲノールはプロ-ハブテンと考えられるが、イソオイゲノールとPPDはプレ-ハブテンに分類される。

【0006】

皮膚はヒトの身体の最大器官であり、潜在のアレルギー誘発性化学物質に対して大きい接触部位を提示する。皮膚はアレルギー反応に積極的に参加するランゲルハンス細胞(LC、抗原を提示する樹状細胞)、Tリンパ球、ナチュラルキラー細胞およびケラチノサイトから構成される。全ての表皮細胞のほぼ95%はケラチノサイトであって、これは外来抗原と遭遇する最初の細胞である。ケラチノサイトは代謝酵素を発現するので、ACDの誘導において重要な機能を有する。さらに、ケラチノサイトはいくつものサイトカイン、例えば、局所リンパ節への遊走を誘導するインターロイキン-18(IL-18)および腫瘍壊死因子 α (TNF- α)を産生する。ハブテン-タンパク質複合体は樹状細胞(DC)により認識され、DCは抗原を内部化し処理しかつリンパ節へ輸送しそしてT-リンパ球に提示する。末梢組織における外来または自己抗原の摂取とプロセッシングの後、LCは複雑な成熟プロセスを経る。それ故に、ケラチノサイトとDCモデルを含むかかる試験系は、化学物質の感作ポテンシャルを予測する代替りのアプローチを開発するために有用でありうる。

【0007】

刺激物質およびアレルゲンに対する細胞の反応は2つの主な道筋で明示される。最初の曝露はおそらく代替りの遺伝子発現を誘発し、続いて、曝された細胞のタンパク質組成の変化が起こると思われる。刺激物質またはアレルギー曝露のポテンシャルマーカーは遺伝子発現の分析を通してまたはモデル系のプロテオーム分析により見出しうることは理解されよう。本発明の主な目的は、色々なクラスの化合物に曝された細胞において増加または減少することが既知のタンパク質マーカーを提供することである。当業者は、タンパク質レベルの変化も随伴しうることもおよびしばしば遺伝子発現の平行した変化が先行することを理解するであろう、そしてかかる遺伝子発現変化は本発明の範囲に含まれる。

【0008】

化学物質安全試験のモデル系におけるタンパク質発現変化の研究は非常に少なかったものの、刺激物質およびアレルゲンの遺伝子発現プロファイルに与える効果についてはいくつかの研究が行われている。

【0009】

PBMC-DC

従来の研究は、末梢血単球(PBMC-DC)由来またはCD34+幹細胞由来のDCの分析に基づくin vitro感作アッセイの開発に重点が置かれてきた(Tuschl & Kovac (2001)、De Smedt

10

20

30

40

50

ら（2002））。最初の研究は皮膚感作物質へ曝露した後の表面マーカーの測定に重点を置いた（Tuschlら（2000））。他の研究はDC成熟プロセスにおける遺伝子転写の変化の測定に重点を置いた。

【0010】

Ryanら（2004）の研究では、PBMC由来のDCの変化を、細胞を1mMまたは5mMジニトロベンゼンスルホン酸（DNBS）へ曝露した後に分析した。同型培養からの平均シグナル値を比較すると、1mM DNBS処理したDCと無処理の対照DCの間で有意差のある遺伝子（ $P < 0.001$ ）は173個であり、そして5mM DNBS処理したDCと無処理の対照DCの間では有意な遺伝子変化は1249個であった。このスクリーニングで同定された60個までの遺伝子の発現をさらにGildeaら（2006）がリアルタイムPCRを用いて試験した。PBMC-DCを5種の刺激物質と11種の接触アレルゲンを用いて処理した。この試験は、試験したアレルゲン、例えば、AK1R C2、ARHGD1B、CCL23、CD1E、CYP27A1、HML2、NOTCH3、S100A4、およびシグナル伝達リンパ性の活性化分子（SLAM）の全てによって影響を受けた10個の遺伝子を同定した。他の遺伝子（ABCA6、BLNK、CCL4、EPB41L2、TRIM16、およびTTRAP）は試験したアレルゲンの大部分との結合を示した。

10

【0011】

Szameitら（2008）は66個の免疫関連の遺伝子を含有する標的化マイクロアレイを開発し、2種の接触アレルゲンと1種の刺激物質に曝したPBMC由来のDCについて試験した。

【0012】

Schoetersら（2005）はヒトCD34⁺祖先由来のDCをモデルアレルゲンのジニトロクロロベンゼン（DNCB）へ曝した後に遺伝子発現の変化を研究した。cDNAマイクロアレイを用いて11000個のヒト遺伝子の転写活性を評価した。対照遺伝子発現と比較すると、DNCBへの曝露後に±2倍より大きい変化が、241個の遺伝子について観察された。これらの遺伝子のうちで、137個はアップレギュレーションされ104個はダウンレギュレーションされた。引き続き研究（Schoetersら（2006））において、硫酸ニッケルに曝したCD34⁺祖先由来のDCの遺伝子発現プロファイルを分析した。cDNAマイクロアレイを用いて約11,000個の遺伝子の転写活性を評価した。283個の遺伝子の発現に有意な変化が観察された：178個の遺伝子がアップレギュレーションされかつ93個の遺伝子がダウンレギュレーションされた。他の研究においてSchoetersら（2007）は、4種の接触アレルゲン（硫酸ニッケル、ジニトロクロロベンゼン、オキサゾロンおよびオイゲノール）および2種の刺激物質（ドデシル硫酸ナトリウムおよび塩化ベンズアルコニウム）に曝したCD34⁺祖先由来のDCの遺伝子発現の変化を分析した。試験したアレルゲンに対してだけ特異的である25個の遺伝子の特徴的なサインを同定した。得られる遺伝子発現データと文献調査から13個の遺伝子を選択して多マーカーモデルを開発し、化学物質の感作ポテンシャルを分類しかつ予測した（Hooyberghsら（2008））。構築した分類子（classifier）モデルをVITOSENS（登録商標）と名付け、CD34⁺-DCについて試験した。

20

30

【0013】

DC細胞モデル

生存ドナーまたはin vitro分化DCから単離した一次LCを用いることはできるものの、標準化スクリーニングアッセイにおける一次細胞の広範な使用はドナーの変動および十分な量の細胞を得ることが困難であることから限定される。従って、本発明では樹状様特性をもつヒト細胞株を予測の皮膚感作試験に対するin vitro分化モデルとして用いることが好ましい。現在、THP-1、UD937またはMutz-3細胞を含有するいくつかのリンパ様または骨髓細胞株が皮膚感作試験用の代理LC細胞株として利用される。

40

【0014】

DCで先に同定された13種の遺伝子マーカーのVITOSENS（登録商標）セットを応用して、ヒト単球様細胞株THP-1を用いて皮膚感作物質および非感作性物質を識別できるかどうかを試験するために、Lambrechtら（2009）はTHP-1を5種の皮膚感作物質および5種の非感作性物質に曝した。しかし、13種のマーカーのうちの1つのサブセットだけしかTHP-1細胞で決定できず、DCとTHP-1細胞で得た結果の間の相関が乏しいことを示した。類似の研究にお

50

いて、Ottら（2010）はPMBC由来のDCとTHP-1の遺伝子発現応答を比較し、ここでもまた、DCで見出される11種のマーカー遺伝子（IL-8、CD1e、CD200R1、PLA2G5、TNFRSF11A、AKR1C3、SLC7A11、GCLM、DPYLS3、TFPI、TRIM16）のうちのわずか4種（IL-8、TRIM16、CD200R1、GCLM）しかTHP-1細胞において確認できないことを見出した。

【0015】

他の研究において、Verstraelenら（2009）は3種の呼吸器感作物質、2種の刺激物質および1種の皮膚感作物質に曝されたTHP-1マクロファージの遺伝子発現応答を研究した。20種の最も区別可能な遺伝子のうち、EIF4E、PDGFRB、SEMA7A、およびZFP36L2が呼吸器感作に関連しうるものであった。

【0016】

他の有望な一次DCの代替物はヒト細胞株Mutz-3であり、これは急性骨髄単球性白血病の患者から単離されたものであってサイトカイン依存性増殖と生存を示す（HUら、1996）。Phytonら（2009）はMutz-3とPBMC-DCの感作物質シンナムアルデヒドに対する遺伝子発現応答を比較し、PBMC-DCとMutz-3の間で重複する80種の遺伝子マーカーのセットを見出した。他の研究者はMutz-3をDCモデルとして、Mutz-3の感作物質への曝露後のサイトカイン遺伝子発現プロファイルおよびDC成熟マーカーの細胞表面発現プロファイルを分析することにより評価した。サイトカイン発現プロファイルはCD34⁺-DCの応答と相関があったものの、細胞表面マーカー応答の誘発性が低かった（Nelissenら（2009）；Williams（2010））。

【0017】

従って、化学物質安全性に対する代行スクリーニングとしてin vitroで用いるのに最も適当な細胞株の合意はまだ存在しない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0018】

【非特許文献1】Magnusson, B., Kligman, A.M., 1969. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. J. Invest. Dermatol. 52, 268-276.

【非特許文献2】Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Scholes, E.W., Ladics, G.S., Loveless, S.E., House, R.V., Guy, A., 1995. An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. Toxicology 103, 63-73.

【非特許文献3】Tuschi H, Kovac R (2001). Langerhans cells and immature dendritic cells as model systems for screening of skin sensitizers. Toxicol In Vitro. (4-5):327-31.

【非特許文献4】De Smedt AC, Van Den Heuvel RL, Van Tendeloo VF, Berneman ZN, Schoeters GE, Weber E, Tuschi H. (2002). Phenotypic alterations and IL-1beta production in CD34(+) progenitor- and monocyte-derived dendritic cells after exposure to allergens: a comparative analysis. Arch Dermatol Res. 294:109-116.

【非特許文献5】Tuschi H, Kovac R, Weber E (2000). The expression of surface markers on dendritic cells as indicators for the sensitizing potential of chemicals. Toxicol In Vitro. (6):541-9.

【非特許文献6】Ryan CA, Gildea LA, Hulette BC, Dearman RJ, Kimber I, Gerberick GF (2004). Gene expression changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. Toxicol Lett. 150(3):301-16.

【非特許文献7】Gildea LA, Ryan CA, Foertsch LM, Kennedy JM, Dearman RJ, Kimber I, Gerberick GF (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. J Invest Dermatol. 126(8):1813-22

【非特許文献8】Schoeters E, Verheyen GR, Van Den Heuvel R, Nelissen I, Witters

10

20

30

40

50

H, Van Tendeloo VF, Schoeters GE, Berneman ZN (2005). Expression analysis of immune-related genes in CD34(+) progenitor-derived dendritic cells after exposure to the chemical contact allergen DNCB. *Toxicol In Vitro*. 2005 19(7):909-13.

【非特許文献 9】Schoeters E, Nuijten JM, Van Den Heuvel RL, Nelissen I, Witters H, Schoeters GE, Van Tendeloo VF, Berneman ZN, Verheyen GR (2006). Gene expression signatures in CD34+-progenitor-derived dendritic cells exposed to the chemical contact allergen nickel sulfate. *Toxicol Appl Pharmacol.*;216(1):131-49.

【非特許文献 10】Schoeters E, Verheyen GR, Nelissen I, Van Rompay AR, Hooyberghs J, Van Den Heuvel RL, Witters H, Schoeters GE, Van Tendeloo VF, Berneman ZN (2007). Microarray analyses in dendritic cells reveal potential biomarkers for chemical-induced skin sensitization. *Mol Immunol*. 44(12):3222-33.

【非特許文献 11】Hooyberghs J, Schoeters E, Lambrechts N, Nelissen I, Witters H, Schoeters G, Van Den Heuvel R. (2008). A cell-based in vitro alternative to identify skin sensitizers by gene expression. *Toxicol Appl Pharmacol*. 231(1):103-111

【非特許文献 12】Lambrechts N, Verstraelen S, Lodewyckx H, Felicio A, Hooyberghs J, Witters H, Van Tendeloo V, Van Cauwenberge P, Nelissen I, Van Den Heuvel R, Schoeters G (2009). THP-1 monocytes but not macrophages as a potential alternative for CD34+ dendritic cells to identify chemical skin sensitizers. *Toxicol Appl Pharmacol*. 236(2):221-30.

【非特許文献 13】Ott H, Wiederholt T, Bergstroem MA, Heise R, Skazik C, Czaja K, Marquardt Y, Karlberg AT, Merk HF, Baron JM. High-resolution transcriptional profiling of chemical-stimulated dendritic cells identifies immunogenic contact allergens, but not prohaptens. *Skin Pharmacol Physiol*. 2010;23(4):213-24.

【非特許文献 14】Verstraelen S, Nelissen I, Hooyberghs J, Witters H, Schoeters G, Van Cauwenberge P, Van Den Heuvel R. (2009) Gene profiles of THP-1 macrophages after in vitro exposure to respiratory (non-)sensitizing chemicals: identification of discriminating genetic markers and pathway analysis. *Toxicol In Vitro*.23(6):1151-62.

【非特許文献 15】Hu ZB, Ma W, Zaborski M, MacLeod R, Quentmeier H, Drexler HG (1996). Establishment and characterization of two novel cytokine-responsive acute myeloid and monocytic leukemia cell lines, MUTZ-2 and MUTZ-3. *Leukemia*.10(6):1025-40.

【非特許文献 16】Python F, Goebel C, Aebly P. (2009). Comparative DNA microarray analysis of human monocyte derived dendritic cells and MUTZ-3 cells exposed to the moderate skin sensitizer cinnamaldehyde. *Toxicol Appl Pharmacol*. 239(3):273-83.

【非特許文献 17】Nelissen I, Selderslaghs I, Heuvel RV, Witters H, Verheyen GR, Schoeters G. (2009). MUTZ-3-derived dendritic cells as an in vitro alternative model to CD34+ progenitor-derived dendritic cells for testing of chemical sensitizers. *Toxicol In Vitro*. 23(8):1477-81.

【非特許文献 18】Williams EH, Williams CA, McLeod JD (2010). Identification of PDL-1 as a novel biomarker of sensitizer exposure in dendritic-like cells. *Toxicol In Vitro*. 24(6):1727-35.

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0019】

アレルギー反応にはタンパク質発現の変化が介在するという仮説から出発して、本発明者らは、推定マーカーである公知の刺激物質および感作物質に曝した関係細胞株、例えば、樹状細胞およびケラチノサイトの詳細なプロテオーム分析を実施した。驚いたことに

、色々なクラスの化学物質への曝露に応答して変化するのが見られる従来報じられた遺伝子調節とタンパク質の間に実質的な重複は存在しなかった。結果的に、本発明者らは化学物質安全性のin vitroスクリーニングにおいてアレルギー反応の客観的基準を果たしうる130種のタンパク質の小パネルを定義した。

【0020】

本発明はこれらのタンパク質マーカーのいずれか1以上の測定に基づいて、全生物試験に代わることができるin vitro方法を用いて接触および呼吸器感作物質を予測する方法を可能にする。

【0021】

従って、その最も一般的な方法において、本発明は表1に同定した130種のタンパク質マーカーの1以上を用いるin vitroプロテオーム分析を使って、試験化合物の感作ポテンシャルを決定する材料と方法を提供する。

10

【0022】

化合物の感作ポテンシャルは、アレルギー反応を誘発するその能力（例えば、アレルギー接触感作物質またはアレルギー呼吸器感作物質）、または非アレルギー刺激物質として作用するその能力を含む。

【0023】

第1の態様において、試験化合物の感作ポテンシャルを決定するin vitroの方法であって、

20

- (a) 前記試験化合物を細胞と接触させるステップ；
 - (b) 前記細胞中の表1から選択される1以上のマーカータンパク質の発現の存在またはレベルの変化を決定するステップ；および
 - (c) 前記発現の存在またはレベルの変化に基づいて前記試験化合物の感作ポテンシャルを決定する（ここで、前記1以上のマーカータンパク質の発現の存在もしくはレベルの変化は前記試験化合物が感作ポテンシャルを有することを示す）ステップ
- を含むものである前記方法が提供される。

【0024】

発現の存在またはレベルの変化は、細胞または周囲環境中のタンパク質マーカーの量を確立することにより決定してもよい。あるいは、それは前記マーカータンパク質をコードする核酸配列またはそれらの、例えば、mRNAの型の存在または量を検出することにより決定してもよい。コードする核酸またはタンパク質それ自体の存在または増加を間接的に測定してもよい。例えば、核酸を細胞から抽出し増幅した後に定量してもよい。タンパク質を細胞から抽出しかつ濃縮しおよび/または標識した後に決定してもよい。

30

【0025】

表1は130種のタンパク質マーカーを含有する。本発明の好ましい実施形態において、本方法はこれらのタンパク質マーカーの複数の発現の存在またはレベルの変化を決定する。従って、本発明の第1の態様による方法は表1に与えたタンパク質マーカーの2、3、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120種以上の発現の存在またはレベルの変化を決定してもよい。

【0026】

40

あるいは、本方法は表1に与えたタンパク質マーカーの少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%の発現の存在またはレベルの変化を決定するステップを含んでもよい。

【0027】

一実施形態において、本方法は表1に与えたタンパク質マーカーの100%（すなわち、130種全て）の発現の存在またはレベルの変化を決定してもよい。

【0028】

本発明の好ましい実施形態においておよび本明細書に記載の全ての態様に関して、1以上の、または複数のマーカータンパク質が表5から選択される。これは表5に掲げた3以上、5以上、7以上、9以上、または全11種のマーカータンパク質であってもよい。

50

【0029】

本発明のこのおよび他の態様による方法は、前記1以上のタンパク質マーカーの発現のレベルの存在を参照レベルと比較するステップを含んでもよい。本発明の開示を照合すると、当業者は、例えば、同じかまたは同等の細胞株由来の細胞からの値の平均および範囲を誘導することにより、好適な参照レベルを容易に決定することができる。確かな実施形態において、本発明のこのおよび他の態様による方法はさらに、前記1以上のマーカータンパク質に対する参照レベルを決定するステップを含んでもよく、試験化合物と接触した細胞で発現される前記1以上のタンパク質マーカーの参照レベル以上または以下の存在または量はその化合物の感作ポテンシャルを示すと考えることができる。

【0030】

しかし参照レベルは、好ましくは、例えば、入手しうるデータ記録の形態で与えてもよい予め定めたレベルである。

【0031】

試験化合物をいずれかの細胞と接触させてもよい。好ましくは、代表的な細胞は哺乳動物皮膚細胞、哺乳動物肺細胞または哺乳動物免疫系からの細胞、例えば樹状細胞のような抗原提示細胞である。より好ましくは、細胞は哺乳動物皮膚細胞の細胞株、例えばランゲルハンス細胞、ケラチノサイト；肺細胞の細胞株；免疫系細胞の細胞株、例えば樹状細胞から得られる。

【0032】

好ましい実施形態において、細胞は樹状様の特性を持つヒト細胞株から得られる。例えば、リンパ様または骨髄細胞株、例えば、THP-1、U937またはMutz-3細胞である。THP-1およびU937はAmerican Type Culture Collection (ATCC, Mansassas, USA) から、そしてMutz-3細胞はthe Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Germany) から購入することができる。

【0033】

多くの他の細胞株が当業者には公知であろう。

【0034】

本発明のこの態様による方法を用いて、試験化合物を細胞に接触させた時に表1(A)グループ1に与えた1以上のマーカータンパク質の存在または発現レベルの変化を決定することにより、試験化合物の接触感作ポテンシャルを決定することができる。

【0035】

1以上のマーカータンパク質は表1(A)グループ1から選択される2、4、5、6、8、12またはそれ以上のものであってもよく；または全15のマーカータンパク質を含んでもよい。

【0036】

さらなる実施形態においては、本方法を用いて、試験化合物を細胞に接触させた時に表1(B)グループ2に与えた1以上のマーカータンパク質の存在または発現レベルの変化を決定することにより、試験化合物の呼吸器感作ポテンシャルを決定することができる。1以上のマーカータンパク質は表1(B)グループ2から選択される2、4、5、6、8またはそれ以上のものであってもよく；または全10のマーカータンパク質を含んでもよい。

【0037】

表1：化学感作効果のタンパク質マーカー

(A) グループ1：トップ15の皮膚感作物質マーカー；(B) グループ2：トップ10の呼吸器感作物質マーカー；(C) グループ3：さらなる感作効果の一般的マーカー。

【0038】

* 報じられた変化は主な知見である。いくつかの感作物質については反対の調節が見られることもある。

【0039】

+ タンパク質の分泌レベルの同時増加がELISAにより分析した細胞増殖培地で見られた。

10

20

30

40

【表 1】

配 列 番 号	タンパク質名	IPI 受託番号	遺伝子名	UniProt ID	公知の感作物質 に曝露時の細胞 溶解液タンパク 質レベルの変化
	<u>Aグループ1</u>				
1	6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ、脱炭酸	IPI00219525	PGD	6PGD_HUMAN	増加
2	ミエロペルオキシダーゼのアイソフォームH17	IPI00007244	MPO	PERM_HUMAN	減少*
3	熱ショック同族71kDaタンパク質のアイソフォーム1	IPI00003865	HSPA8	Q96BE0_HUMAN	減少
4	チモシンβ-4-様タンパク質3	IPI00180240	TMSL3	TMSL3_HUMAN	減少*
5	電位依存性アニオン-選択的チャネルタンパク質2	IPI00024145	VDAC2	VDAC2_HUMAN	増加
6	タンパク質S100-A8	IPI00007047	S100A8	D3DV37_HUMAN	減少*
7	タンパク質S100-A9	IPI00027462	S100A9	D3DV36_HUMAN	減少*
8	ADP/ATP転移酵素2	IPI00007188	SLC25A5	ADT2_HUMAN	増加
9	ヒストンH1.2	IPI00217465	HIST1H1C	A8K4I2_HUMAN	減少
10	ペプチジル-プロリルcis-transイソメラーゼA	IPI00419585	PPIAL3	Q567Q0_HUMAN	減少
11	好酸球リゾホスホリパーゼ	IPI00216071	CLC	C5HZ14_HUMAN	増加
12	トランスアルドラーゼ	IPI00744692	TALDO1	TALDO_HUMAN	増加
13	ヒストンH2B 1-L型	IPI00018534	HIST1H2B L	H2B1L_HUMAN	減少
14	ビルビン酸キナーゼアイソザイムR/LのアイソフォームR-型	IPI00027165	PKLR	KPYR_HUMAN	増加
15	チューブリンα-4A鎖	IPI00007750	TUBA4A	TBA4A_HUMAN	減少
	<u>Bグループ2</u>				
16	グルコース-6-リン酸1-デヒドロゲナーゼのアイソフォーム ロング	IPI00216008	G6PD	G6PD_HUMAN	増加
17	セリン/トレオニン-タンパク質キナーゼ24のアイソフォームB	IPI00002212	STK24	STK24_HUMAN	増加
18	スーパーオキシドジスムターゼ[Cu-Zn]	IPI00218733	SOD1	D3DSE4_HUMAN	減少*
19	ATPシンターゼサブユニットa	IPI00654820	ATPase6/COX3	Q9B1D3_HUMAN	増加
20	60Sリボソームタンパク質L26	IPI00027270	RPL26P33	Q61BH6_HUMAN	増加
21	アクチン-関連タンパク質3	IPI00028091	ACTR3	B4DXW1_HUMAN	増加
22	細胞質のアスパラギニル-tRシントターゼ (細胞質)	IPI00306960	NARS	SYNC_HUMAN	増加
23	真核生物の翻訳開始因子3サブユニットE	IPI00013068	EIF3E	EIF3E_HUMAN	増加
24	真核生物の開始因子4A-III	IPI00009328	EIF4A3	IF4A3_HUMAN	増加
25	スプライシング因子、アルギニン/セリン-リッチ2	IPI00005978	SFRS2	SRSF2_HUMAN	減少
	<u>Cグループ3</u>				
26	スプライシング因子のアイソフォーム1、アルギニン/セリン-リッチ7	IPI00003377	SFRS7	Q564D3_HUMAN	減少
27	4F2細胞-表面抗原重鎖のアイソフォーム2	IPI00027493	SLC3A2	4F2_HUMAN	減少
28	α-アクチニン-4	IPI00013808	ACTN4	ACTN4_HUMAN	減少
29	アミノアシルtRシントターゼ 複合体-	IPI00006252	AIMP1	AIMP1_HUMAN	減少

10

20

30

40

	相互作用性の多機能タンパク質1				
30	タンパク質S100-A4	IPI00032313	S100A4	D3DV46_HUMAN	減少
31	s l l l c	IPI00027444	SERPINB1	B4DNT0_HUMAN	増加
32	マクロファージ-キャッピングタンパク質	IPI00027341	CAPG	D6W5K8_HUMAN	減少
33	フェルミチンファミリー同族体3のアイソフォーム2	IPI00216699	FERMT3	URP2_HUMAN	増加
34	タンパク質ジスルフィド-イソメラーゼ	IPI00010796	P4HB	PDIA1_HUMAN	減少
35	ロイシン-リッチPPRモチーフを含有するタンパク質 (ミトコンドリア)	IPI00783271	LRPPRC	LRPPRC_HUMAN	増加
36	核の自己抗原精子タンパク質のアイソフォーム1	IPI00179953	NASP	NASP_HUMAN	減少
37	プロテアソームアクチベーター複合体サブユニット1	IPI00479722	PSME1	Q6FHU3_HUMAN	減少
38	スクレオシドニリン酸キナーゼ	IPI00604590	NME2	Q32Q12_HUMAN	減少
39	PRA1ファミリータンパク質3	IPI00007426	ARL6IP5	B3KQB4_HUMAN	増加
40	スプライセオソームRヘリカーゼBAT1のアイソフォーム2	IPI00641829	BAT1	UAP56_HUMAN	増加
41	DPH:アドレノドキシノオキシンドレダクターゼのアイソフォームショート (ミトコンドリア)	IPI00026958	FDXR	Q6GSK2_HUMAN	増加
42	26Sプロテアーゼ調節サブユニット6A	IPI00018398	PSMC3	PRS6A_HUMAN	減少
43	ストレス-70タンパク質 (ミトコンドリア)	IPI00007765	HSPA9	GRP75_HUMAN	減少
44	KH-型スプライシング調節タンパク質	IPI00479786	KHSRP	FUBP2_HUMAN	減少
45	Tu翻訳伸長因子、ミトコンドリア前駆体	IPI00027107	TUFM	EFTU_HUMAN	増加
46	R結合タンパク質、自己抗原 (枯死黄化 (lethal yellow) 同族体に関連するHnRNP (マウス))、アイソフォームCRA_a (断片)	IPI00011268	RALY	Q53GL6_HUMAN	増加
47	40Sリボソームタンパク質S2	IPI00013485	RPS2P17	Q3KQT6_HUMAN	増加
48	TATA-結合タンパク質-関連因子2Nのアイソフォームショート	IPI00020194	TAF15	Q86X94_HUMAN	減少
49	チオレドキシンドメイン-含有タンパク質5	IPI00171438	TXNDC5	Q658S9_HUMAN	減少
50	軟骨加齢に関連するタンパク質	IPI00748502	CRTAP	E3KME2_HUMAN	増加
51	小胞輸送タンパク質SEC22b	IPI00006865	SEC22B	SC22B_HUMAN	増加
52	ビメンチン	IPI00418471	VIM	D3DRU4_HUMAN	増加
53	プロテアソームサブユニットα型-7のアイソフォーム	IPI00024175	PSMA7	PSA7_HUMAN	増加
54	40Sリボソームタンパク質S19	IPI00215780	RPS19	BOZBD0_HUMAN	減少
55	カルレティキュリン	IPI00020599	CALR	CALR_HUMAN	減少
56	ホスファチジルエタノールアミン-結合タンパク質1	IPI00219446	PEBP1	PEBP1_HUMAN	減少
57	cDNA FLJ60076、ELAV-様タンパク質1と高度に類似	IPI00301936	ELAVL1	B4DVB8_HUMAN	減少
58	トランスフェリン受容体タンパク質1	IPI00022462	TFR1	TFR1_HUMAN	増加
59	ビスチン	IPI00328987	BYSL	BYST_HUMAN	増加
60	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (ミトコンドリア)	IPI00291006	MDH2	Q75MT9_HUMAN	増加
61	非ヒストン染色体のタンパク質HMG-17	IPI00217950	HMG2	HMG2_HUMAN	減少

10

20

30

40

62	ミトコンドリアのシトクロムb-c1複合体おサブユニット2	IPI00305383	UQCRC2	QCR2_HUMAN	増加
63	セリン/トレオニン-タンパク質ホスファターゼ2A触媒サブユニットαアイソフォーム	IPI00008380	PPP2CA	B3KUN1_HUMAN	増加
64	推定未特徴付けタンパク質	IPI00010402	SH3BGR13	Q86Z22_HUMAN	減少
65	タンパク質ジスルフィド-イソメラーゼA6のアイソフォーム2	IPI00299571	PDIA6	B7Z4M8_HUMAN	減少
66	ラミン-A/CのLMアイソフォームA	IPI00021405	LMNA	Q516Y6_HUMAN	増加
67	ミトコンドリアの、DHデヒドロゲナーゼ[ユビキノ]フラボプロテイン1アイソフォーム1	IPI00028520	NDUFV1	Q53G70_HUMAN	増加
68	14 kDaタンパク質	IPI00893541	PDIA3		減少
69	膜貫通タンパク質33	IPI00299084	TMEM33	TMM33_HUMAN	増加
70	好中球サイトゾル因子4のアイソフォーム1	IPI00014338	NCF4	Q53FG4_HUMAN	増加
71	リボヌクレアーゼT2のアイソフォーム1	IPI00414896	RNASET2	E1P5C3_HUMAN	減少
72	60Sリボソームタンパク質L18a	IPI00026202	RPL18A	RL18A_HUMAN	増加
73	小胞関連の膜タンパク質8	IPI00030911	VAMP8	VAMP8_HUMAN	減少
74	コピン-1	IPI00018452	CPNE1	CPNE1_HUMAN	増加
75	タンパク質セットのアイソフォーム1	IPI00072377	SET	B2RCX0_HUMAN	減少
76	アネキシンA5	IPI00329801	ANXA5	D3DNW7_HUMAN	増加
77	伸長因子1-β	IPI00178440	EEF1B2	EF1B_HUMAN	減少
78	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ミトコンドリア)	IPI00018206	GOT2	AATM_HUMAN	増加
79	ACLYATP-クエン酸シンターゼ	IPI00021290	ACLY	ACLY_HUMAN	増加
80	プロテアソーム26S非ATPaseサブユニット13アイソフォーム2	IPI00375380	PSMD13	B3KT15_HUMAN	増加
81	ADP-リボシル化因子3	IPI00215917	ARF3	ARF3_HUMAN	増加
82	フィラミン-Aのアイソフォーム2	IPI00302592	FLNA	FLNA_HUMAN	増加
83	推定未特徴付けタンパク質RPL7 (断片)	IPI00871827	RPL7P20		増加
84	α-セントラクチン	IPI00029468	ACTR1A	ACTZ_HUMAN	増加
85	10 kDa熱ショックタンパク質 (ミトコンドリア)	IPI00220362	HSPE1	CH10_HUMAN	減少
86	推定未特徴付けタンパク質TRAPPC3	IPI00647089	TRAPPC3		減少
87	40Sリボソームタンパク質S15a	IPI00221091	RPS15A12	B2R4W8_HUMAN	増加
88	カルシウム-結合タンパク質39	IPI00032561	CAB39	A8K8L7_HUMAN	増加
89	三機能酵素サブユニットα (ミトコンドリア)	IPI00031522	HADHA	Q9UQC5_HUMAN	増加
90	低酸素アップレギュレートされたタンパク質1	IPI00000877	HYOU1	B7Z766_HUMAN	減少
91	プログラム細胞死タンパク質6	IPI00025277	PDCD6	PDCD6_HUMAN	増加
92	GTP-結合核のタンパク質Ran	IPI00643041	RAN	A8K3Z8_HUMAN	増加
93	ガレクチン-1	IPI00219219	LGALS1	Q15954_HUMAN	増加
94	増殖細胞核の抗原	IPI00021700	PCNA	D3DW02_HUMAN	増加
95	ヒストンH1.5	IPI00217468	HIST1H1B	H15_HUMAN	減少
96	トリオースリン酸イソメラーゼのアイソフォーム	IPI00465028	TPI1	Q53HE2_HUMAN	減少
97	電位依存性アニオン-選択的なチャネル	IPI00216308	VDAC1P1	D3DQ93_HUMAN	減少

10

20

30

40

	ルタンパク質1				
98	チオレドキシン	IPI00216298	TXN	チオ_HUMAN	減少
99	ペルオキシレドキシン-1	IPI00000874	PRDX1	PRDX1_HUMAN	増加
100	タンパク質S100-A11	IPI00013895	S100A11	S10AB_HUMAN	増加
101	チューブリン β -2C鎖	IPI00007752	TUBB2C	TBB2C_HUMAN	減少
102	異種核のリボヌクレオプロテインKの アイソフォーム1	IPI00216049	HNRNPK	HNRPK_HUMAN	減少
103	コロニン-1A	IPI00010133	COR01A	COR1A_HUMAN	増加
104	熱ショックタンパク質HSP90- β	IPI00414676	HSP90AB1	HS90B_HUMAN	減少
105	60kDa熱ショックタンパク質 (ミトコ ンドリア) 、	IPI00784154	HSPD1P6	B9VP19_HUMAN	増加
106	F-アクチン-キャッピングタンパク質 サブユニット α -1	IPI00005969	CAPZA1	CAZA1_HUMAN	増加
107	HIST2H4A ; HIST1H4I ; HIST1H4J ; HIST1H4E ; HIST1H4H ; HIST1H4D ; HIST2H4B ; HIST1H4C ; HIST1H4B ; HIST1H4F ; HIST1H4L ; HIST1H4A ; HIST1H4K ; HIST4H4ヒストンH4	IPI00453473	HIST1H4C	B2R4R0_HUMAN	減少
108	ヘモグロビンサブユニット ϵ	IPI00217471	HBE1	D9YZU7_HUMAN	増加
109	ミトコンドリアのATPシンターゼ脂質- 結合タンパク質	IPI00008727	ATP5G3	D3DPF0_HUMAN	増加
110	熱ショックタンパク質90kDa α (サイ トゾル) 、クラスAメンバー1アイソフ ォーム1	IPI00382470	HSP90AA2	HS90A_HUMAN	増加
111	ヘモグロビンサブユニット α	IPI00410714	HBA2	Q96T46_HUMAN	増加
112	伸長因子2	IPI00186290	EEF2	EF2_HUMAN	減少
113	HIST2H3D ; HIST2H3C ; HIST2H3Aヒスト ンH3.2	IPI00171611	HIST2H3A	H32_HUMAN	減少
114	Transgelin-2	IPI00550363	TAGLN2	TAGL2_HUMAN	減少
115	ATPシンターゼサブユニット β (ミト コンドリア)	IPI00303476	ATP5B	ATPB_HUMAN	増加
116	フルクトース-ビスリン酸アルドラー ゼA	IPI00465439	ALDOA	ALDOA_HUMAN	増加
117	グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒド ロゲナーゼ	IPI00219018	GAPDH	G3P_HUMAN	増加
118	アクチン、大動脈平滑筋	IPI00008603	ACTA2	D2JYH4_HUMAN	減少
119	レジスチン	IPI00006988	RETN	D6W649_HUMAN	増加
120	伸長因子1- α	IPI00025447	EEF1A1	Q6IQ15_HUMAN	減少
121	伸長因子1- α 2	IPI00014424	EEF1A2	E1P5J1_HUMAN	減少
122	真核生物の翻訳開始因子5A-2	IPI00006935	EIF5A2	IF5A2_HUMAN	減少
123	ヘモグロビンサブユニット ζ	IPI00217473	HBZ	HBAZ_HUMAN	減少
124	推定熱ショックタンパク質HSP90- α A2	IPI00031523	HSP90AA2	HS902_HUMAN	増加
125	cDNAFLJ45706f1s、クローン FEBRA2028457 (ヌクレオリンと高度に 類似)	IPI00444262	NCL	Q6ZS99_HUMAN	減少
126	ヌクレオホスミンのアイソフォーム2	IPI00220740	NPM1	D3DQL6_HUMAN	減少
127	ペプチジルプロリルcis-transイソメ ラーゼA-様4B	IPI00030144	PPIAL4C	PAL4A_HUMAN	減少
128	トリオースリン酸イソメラーゼ (断 片)	IPI00383071	RCTPI1		増加
129	60Sリボソームタンパク質L3-様	IPI00219335	RPL3L	RL3L_HUMAN	減少
130	TUBA1Cタンパク質	IPI00166768	TUBA1C	Q8N532_HUMAN	減少

10

20

30

40

本発明のこの第1のおよび他の態様において、1以上のマーカータンパク質の発現レベルの存在または変化の決定は当業者の十分に能力内の多くの手段で達成することができる。

【0041】

前記決定は、核酸またはタンパク質レベルの直接決定に関わってもよく、または、例えば、存在するマーカータンパク質の量と相関のある測定値を与える試験法を用いてもよい。従って、1以上のマーカータンパク質の存在または発現のレベルの決定は

(a)その細胞を前記マーカータンパク質または前記マーカータンパク質をコードする核酸配列と選択的に結合する少なくとも1つの特異的結合メンバーと接触させるステップ；および

(b)前記特異的結合メンバーとマーカータンパク質または前記マーカータンパク質をコードする核酸配列により形成される複合体を検出しおよび/または決定するステップを含むもの。

10

【0042】

特異的結合メンバーはマーカータンパク質と特異的かつ選択的に結合する抗体または抗体フラグメントであってもよい。前記決定は、1以上のマーカータンパク質の既知の発現レベルの標準を用いて標準曲線を準備するステップおよび試験化合物と接触させた細胞を用いて得た読取値を比較して1以上のマーカータンパク質の発現のレベルの変化の測定値を得るステップを含むものである。

【0043】

色々な方法が1以上のマーカータンパク質の存在または発現のレベルの変化を決定するために好適でありうる：限定されるものでないが、これらの例としては、ウェスタンブロット、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、RIA（ラジオイムノアッセイ）、競合EIA（競合酵素イムノアッセイ）、DAS-ELISA（二重抗体サンドイッチ-ELISA）、液体イムノアレイ技法）、免疫細胞化学または免疫組織化学技法、特異的抗体を含むタンパク質マイクロアレイの使用に基づきウ技法、「ディップスティック」アッセイ、アフィニティクロマトグラフィ技法および液体結合アッセイが挙げられる。特異的結合メンバーはタンパク質マーカーまたはその部分と選択的に結合する抗体または抗体フラグメントであってもよい。いずれの好適な抗体フォーマットを使用してもよい。

20

【0044】

本発明のいずれかの態様による本発明で意図する特異的結合メンバーのさらなるクラスは、アプタマー（核酸アプタマーおよびペプチドアプタマーを含む）を含むものである。有利な方法として、タンパク質マーカーを指向するアプタマーを米国特許5,475,096および5,270,163に記載のSELEX（Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment）として知られる技法により与えることができる。

30

【0045】

本発明のこのおよび他の態様において、1以上のマーカータンパク質の存在または発現のレベルの決定は質量分析により実施することができる。表1から選択されるタンパク質マーカーのレベルを測定するのに好適な技法は当業者が容易に利用できるものであって、選択反応モニタリング（SRM）および多重反応モニタリング（MRM）、同位体希釈質量分析に関する技法を含み、SILAC、AQUA（WO 03/016861に開示され、その全内容は具体的に本明細書に参照により組み込まれる）およびTMTキャブリレーター（WO 2008/110581に開示され；その全内容は具体的に本明細書に参照により組み込まれる）が含まれる。

40

【0046】

WO 2008/110581は、同重体質量タグを用いて参照サンプル中の全てのタンパク質の別々のアリコートに標識し、前記サンプルの標識後に、定量的な比率で混合して標準校正曲線を送り出す方法を開示している。次いで試験サンプルを同じセットの同重体質量タグのさらなる独立メンバーで標識し、そして標準校正曲線と混合する。この混合物をタンデム質量分析で処理し、MS/MSスペクトルの同重体質量タグから遊離される一意的な質量を報じるイオンの出現に基づいて特定のタンパク質から誘導されたペプチドを同定しかつ定量することができる。

50

【0047】

参照レベルとして、既知または予測タンパク質マーカー由来のペプチドを、前記タンパク質マーカーのトリプシンによるArgC、AspNまたはLys-C消化により作製することができる。いくつかの事例において、質量分析に基づくタンパク質マーカーの決定を使う場合、本発明の方法は、タンパク質マーカーおよび/または少なくとも1つのタンパク質マーカー由来のペプチドを含む少なくとも2つの異なるアリコートを含む校正サンプルを提供し、それぞれのアリコートは既知の量であり、そして前記生体サンプルとそれぞれの前記アリコートは1以上の同重体質量標識で区別して標識されている。好ましくは、同重体質量標識はそれぞれ異なる質量分析的に明確な質量マーカーグループを含むものである。

【0048】

従って、本発明の好ましい実施形態において、本方法は、既知タンパク質マーカー由来のペプチドの1以上の遷移の決定を用いる選択反応モニタリングにより、試験化合物と接触させた細胞中の表1から選択されるマーカータンパク質の存在または発現レベルを決定するステップ；試験下の細胞中のペプチドレベルを、先に細胞による接触または呼吸器感受性を表すと決定したペプチドレベルと比較するステップ；ならびに前記1以上のマーカータンパク質の発現の変化に基づいて試験化合物の感受性ポテンシャルを決定するステップを含むものである。比較ステップは既知量の対応する合成ペプチドで処理した細胞から得たマーカータンパク質由来のペプチドの量を決定するステップを含んでもよい。合成ペプチドは、細胞から得られるペプチドと配列は同一であるが、標識、例えば異なる質量または重同位体のタグにより識別することができる。

【0049】

1以上のこれらの合成タンパク質マーカー由来の標識したまたは無標識のペプチドは本発明のさらなる態様である。これらの合成ペプチドは、試験化合物の感作ポテンシャルを決定するキットの形で提供することができる。

【0050】

タンパク質マーカー発現のレベルを決定する他の好適な方法には、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間（SELDI-TOF）質量分析；マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間（MALDI-TOF）質量分析；エレクトロスプレーイオン化（ESI）質量分析；ならびに好ましいSRMが含まれる。

【0051】

いくつかの実施形態において、1以上のタンパク質マーカーの存在または量の決定は試験下の細胞由来のmRNAの存在または量を測定するステップを含む。試験化合物に接触させた細胞中のタンパク質マーカーをコードするmRNAの存在またはレベルによって、試験化合物が感作ポテンシャルを有するかどうかを決定することができる。当業者はmRNAをコードするタンパク質マーカーのレベルを測定するのに好適な技法を容易に利用することができる、これには「リアルタイム」逆転写酵素PCRまたはノーザンブロットが含まれる。mRNAをコードするタンパク質マーカーのレベルを測定する方法は、タンパク質マーカーの配列をコードする遺伝子またはその相補体に向けられた少なくとも1つのプライマーまたはプローブの使用を含む。前記少なくとも1つのプライマーまたはプローブは表1または表5（および図10）に記載のタンパク質マーカーをコードするヌクレオチド配列と少なくとも70%、80%、90%、95%、98%、99%または100%同一性を有する少なくとも10、15、20、25、30または50隣接ヌクレオチド配列のヌクレオチド配列を含むものであってもよい。

【0052】

好ましくは、少なくとも1つのプローブまたはプライマーはストリンジェントな条件下でタンパク質マーカーをコードする核酸配列とハイブリダイズする。

【0053】

本発明の方法は細胞を結合メンバーと上記のように接触させるステップを含むが、また細胞により分泌された産物を含む細胞周囲の培地と接触させるステップを含んでもよい。さらに、細胞を溶解した後に結合メンバーと接触させて1以上のマーカータンパク質との接触を直接または間接に増加することが好ましいであろう。

【0054】

結合メンバーを固体支持体上に固定してもよい。これは抗体アレイまたは核酸マイクロアレイの形であってもよい。このようなアレイは当技術分野では周知である。固体支持体を細胞周囲の細胞溶解液または培地と接触させて、それにより結合メンバーが1以上のマーカータンパク質の存在もしくは量を表す細胞産物または分泌された産物と結合できるようにしてもよい。

【0055】

いくつかの実施形態において、結合メンバーはマーカータンパク質またはその一部分と結合できる抗体またはそのフラグメントである。他の実施形態において、結合メンバーは検出すべき核酸の配列と結合できる（すなわち、相補性の）核酸分子であってもよい。

10

【0056】

本方法はさらに固体支持体を、その占有結合部位、非占有結合部位または1以上のマーカータンパク質、抗体または核酸と結合できる現像剤と接触させるステップを含むものであってもよい。

【0057】

現像剤は標識を含んでもよくそして本方法は標識を検出して、細胞、細胞培地または細胞溶解液中の1以上のマーカータンパク質、抗体または核酸の存在または量を表す値を得るステップを含んでもよい。

【0058】

標識は、例えば、放射性標識、蛍光色素分子、リン光体、レーザー染料、色素生産性染料、高分子コロイド粒子、着色ラテックスビーズ、磁性または常磁性体、検出可能な結果を生じる反応を触媒する酵素であってもよく、または標識はタグである。

20

【0059】

本方法は単一サンプル中の複数のマーカータンパク質または前記マーカータンパク質をコードする核酸の発現の存在またはレベルを決定するステップを含みうる。例えば、表1、表1(A)グループ1、表1(B)グループ2、表1(C)グループ3またはそれらの組み合わせまたは表5から選択される複数の結合メンバーを固体支持体上の予め規定した位置に固定してもよい。固体支持体上の表1から選択される結合メンバーの数は支持体上の結合メンバーの総数の10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% または 100% であってもよい。

30

【0060】

あるいは、複数の質量特性を上記の質量分析技法に対して選択する。

【0061】

結合メンバーはマーカータンパク質またはその一部分に特異的な抗体であってもよく、またはマーカータンパク質の発現の存在、増加または減少を表す核酸分子、例えばmRNA配列と結合する核酸分子であってもよい。

【0062】

特異的なマーカータンパク質に対する抗体はマーカータンパク質のいずれかの生物学的に関係のある状態に対する抗体であってもよい。従って、例えば、前記抗体は体内ではグリコシル型で存在するタンパク質の非グリコシル型に対して、タンパク質の前駆体型、もしくは前駆体タンパク質のより成熟した型、例えばそのシグナル配列を差し引いたものに対して、または、マーカータンパク質の関係するエピトープを運ぶペプチドに対するものであってもよい。

40

【0063】

本発明の第2の態様において、試験化合物の感作ポテンシャルをin vitroで決定するために使用するキットを提供する。本キットは利用者が試験下の細胞中の、表1に与えられた1以上のマーカータンパク質またはその断片、前記マーカータンパク質に対する1以上の抗体、および前記マーカータンパク質またはその断片をコードする核酸分子から選択される分析物の存在または発現のレベルを決定することを可能にするものであって、

(a) 分析物と結合することができる結合メンバーがその上に固定された固体支持体；

50

(b) 標識を含む現像剤；および、任意に

(c) 洗浄溶液、希釈剤およびバッファーから成る群より選択される1以上の化合物を含むものである。

【0064】

結合メンバーは上記の通りでありうる。

【0065】

特に、マーカートンパク質またはその断片を検出するための結合メンバーは、表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(C)グループ3またはそれらの組み合わせから選択される1以上のマーカートンパク質と結合できる抗体であってもよい。

【0066】

好ましい実施形態において、1以上のマーカートンパク質は表5から選択される。

【0067】

一実施形態において、キットは分析物をアッセイに適合しうるフォーマットで提供しうる。上記の通り、サンプル中のタンパク質、抗体または核酸分子の存在または量を決定するための様々なアッセイは当技術分野で公知である。様々な好適なアッセイを以下にさらに詳しく記載するが、それぞれが本発明の実施形態を形成する。

【0068】

本キットは試験化合物の感作ポテンシャルを決定する *in vitro* の方法に用いることができる。この方法は複数サンプルの全体的なスクリーニングの一部として実施してもよいし、または個体から得た単一サンプルで実施してもよい。

【0069】

キットはさらに定量的な測定値を与える標準または参照を提供することができ、それにより1以上のマーカートンパク質の発現レベルの決定を比較することができる。この標準は前記化合物に対する接触または呼吸器感受性を示すマーカートンパク質表現のレベルを示しうる。

【0070】

キットはまた、本方法を実施するための印刷した取扱説明書を含んでもよい。

【0071】

一実施形態において、試験化合物の感作ポテンシャルを決定するキットは、表1に与えたマーカートンパク質の1セットまたは表5に与えたマーカートンパク質のサブセット、前記抗体を前記試験化合物に曝した細胞または前記細胞から得た抽出物とインキュベートする手段、および前記タンパク質の前記抗体との結合を定量的に検出する手段を含有するものである。

【0072】

キットはまた、さらなる試薬およびバッファーおよび本方法を実施する方法を詳述した印刷した取扱説明書および、任意に、定量的な結果を前記化合物に対する接触または呼吸器感受性を示すものとして解釈する方法を含有してもよい。

【0073】

さらなる実施形態において、キットは質量分析アッセイを実施するものであってもよく、参照ペプチド（例えばSRMペプチド）のセットを適合しうるフォーマットで含んでもよく、ここでセット中の各ペプチドは表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(c)グループ3に記載の1以上のマーカートンパク質のそれぞれまたはそれらの組み合わせを一意的に表すものである。好ましくは2つそしてより好ましくは3つのかかる一意的なペプチドがキットを設計した各タンパク質に対して用いられ、ここで、一意的なペプチドの各セットは、既知の感作化合物に曝された前記細胞の標準調製物中のかかるタンパク質レベルを反映する既知の量だけ与えられる。任意に、キットはまた、前記細胞からタンパク質を単離および抽出するためのプロトコルおよび試薬、トリプシンなどのタンパク質分解酵素の精製調製物ならびにモニターすべき前駆体質量および特異的な遷移物の詳細を含む方法の詳しいプロトコルを与えてもよい。

【0074】

10

20

30

40

50

任意に、本発明のキットはまた、適当な細胞、容器、増殖培地およびバッファーを含む。

【0075】

本発明の第三の態様においては、前記アレルギーまたは刺激物質に曝された個人に対するアレルギーまたは刺激物質による接触または呼吸感作を診断または予後モニタリングする方法であって、(a)前記個人から得た生体サンプル中の表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；表1(c)グループ3；または表5から選択される1以上のタンパク質マーカーまたは前記タンパク質マーカーもしくはその一部分のいずれか1つをコードする核酸の存在または発現のレベルを決定するステップを含むものである前記方法が提供される。

【0076】

生体サンプルは好ましくは、個人からの細胞、例えば、皮膚細胞または肺細胞または樹状細胞などの免疫系細胞を含むサンプルである。細胞を溶解しそして細胞溶解液について決定ステップを行ってもよい。決定ステップは本発明の第1の態様に記載の通り実施することができる。

【0077】

前記方法は、アレルゲンまたは刺激物質との接触を時点ゼロとする時間軸の期間全体にわたり採取した複数の生体サンプル中の1以上のタンパク質マーカーの存在または発現のレベルを決定するステップを含んでもよい。

【0078】

本発明の第三の態様による方法を行うキットも提供される。

【0079】

前記キットは

(a)1以上の結合メンバーがその上に固定された固体支持体であって、ここで各結合メンバーは表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(C)グループ3；表5に与えられたグループから選択されるタンパク質マーカーまたは前記タンパク質マーカーもしくはその断片をコードする核酸と選択的に結合する前記固体支持体；

(b)標識を含む現像剤；および

(c)洗浄溶液、希釈剤およびバッファーから選択される1以上の成分を含んでもよい。

【0080】

キットはまた、その方法を実施するための印刷された取扱説明書を含んでもよい。

【0081】

キットはさらに、定量的な基準を提供する標準または参照を含んでもよく、それにより1以上のマーカータンパク質の発現レベルの決定を比較することができる。

【0082】

標準は前記化合物に対する接触または呼吸器感受性を示すマーカータンパク質発現のレベルを示してもよい。

【0083】

同様に、アレルゲンまたは刺激物質に曝しておいた個人から採取した組織サンプル中の表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(C)グループ3；または表5から選択される1以上のタンパク質の発現レベルを測定し、そのレベルをアレルゲンまたは刺激物質に曝さなかった細胞からのレベルと比較してもよく；ここで、表1に記載の変化と一致するタンパク質発現レベルの変化はアレルギーの誘発であると診断する。

【0084】

その発現レベルが化学感作物質、例えばアレルゲンまたは刺激物質への曝露後に改変される特定のタンパク質の決定は、皮膚炎および喘息などの化学誘発性アレルギー症状を診断および治療するための新しい標的を、初めて提供するものである。

【0085】

従って、本発明の第四の態様においては、化学感作物質、例えばアレルゲンまたは刺激物質に対する個人の診断または予後モニタリングのための、表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(C)グループ3；または表5から選択される1以上のタンパク質マ-

10

20

30

40

50

カーの使用が提供される。

【0086】

例えば、表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；表1(c)グループ3；または表5からの複数のタンパク質マーカーを、アレルギーまたは刺激を患う患者における皮膚もしくは呼吸器アレルギーまたは刺激に対する治療の有効性をモニタリングする方法に用いることができる。その方法は、前記個人から治療前に得た組織サンプルと治療後または治療中に採取した1以上のさらなるサンプルとにおける前記タンパク質マーカーの存在または発現のレベルの変化を決定するステップ（例えば、本発明の第1の態様により）を含むものであってもよく、ここで複数のタンパク質マーカーの正常な発現レベルへの回復が治療の成功を示す。

10

【0087】

本発明のこの態様のある実施形態においては、治療を表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；表1(c)グループ3；または表5から選択される複数のタンパク質マーカーの1以上を標的化するように特に設計してもよい。従って、本発明は表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；表1(c)グループ3；または表5に与えた1以上のタンパク質マーカーまたはそれらの一部分の皮膚または呼吸器アレルギーを治療するための標的としての使用の提供に拡張される。

【0088】

本発明にはまた、化学感作物質に対する個人のin vitro診断または予後モニタリングをするための、表1に与えられた1以上のマーカータンパク質またはそれらの断片、前記マーカータンパク質に対する1以上の抗体および前記マーカータンパク質をコードする1以上の核酸分子またはそれらの断片から選択される分析物と結合できる1以上の結合メンバーの使用が含まれる。

20

【0089】

これらの結合メンバーは好ましくは固体支持体上に提供される。

【0090】

本発明の全ての態様において、本方法はほとんどの場合、in vitroの方法で初代細胞培養、確立された細胞株、または接触アレルギー、例えばACD、または呼吸器アレルギーもしくは喘息などの刺激を患う患者から採取した生検サンプル由来のサンプルについて行われる。本明細書に記載の方法に用いるサンプルは、全細胞溶解液、細胞成分画分、例えば細胞質、核、ミトコンドリア、細胞膜、細胞培地上清、組織または体液サンプル、例えば皮膚、肺または樹状細胞培養、皮膚または肺組織サンプル、気管支肺泡洗浄（BAL）液、血液または血液産物（例えば、血清または血漿）サンプルまたは尿サンプルであってもよい。

30

【0091】

ここで本発明の実施形態を、例を用いて、限定されるものでない次の添付図を参照して記載しよう。本明細書に記載の全ての文書は本明細書に参照により組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0092】

【図1】図1：第4データセットで見出された、83種のタンパク質バイオマーカーを用いる非監視型ヒエラルキーのクラスター形成（ $p \leq 0.05$ ）である（MeVパッケージ）。

40

【図2】ANOVAフィルターにかけた第4研究で見出したバイオマーカーのPLS負荷プロットである。

【図3】第4研究で分析した全サンプルの、主成分1（X軸）および2（Y軸）に基づくPLSスコアプロットである。

【図4】Mutz-3細胞の上清中のミエロペルオキシダーゼ濃度である。

【図5】Mutz-3細胞の上清中のカルプロテクチン濃度である。

【図6】Mutz-3細胞の上清中で測定したZn/Cu-SODである。

【図7】未知化合物の化学クラスメンバーシップを予測するためのPLS-DAモデルである。

AL：アレルギー；IR：刺激物質；未知化合物：C、B、EおよびF。

50

【図 8 - 1】83種のタンパク質バイオマーカーのLog2-変換して参照した倍数変化である。
。ダイヤ型：アレルゲン；円：刺激物質；矩形：対照。

【図 8 - 2】（図 8 - 1 の続き）

【図 8 - 3】（図 8 - 2 の続き）

【図 8 - 4】（図 8 - 3 の続き）

【図 9 - 1】TMAとDNCBの間の75種のタンパク質バイオマーカーの相対的存在量の差異である。対照：矩形； 刺激物質 / SDA：円；DNCB：三角；TMA：逆三角

【図 9 - 2】（図 9 - 1 の続き）

【図 9 - 3】（図 9 - 2 の続き）

【図 10 - 1】表4 タンパク質配列表である。

10

【図 10 - 2】（図 10 - 1 の続き）

【図 10 - 3】（図 10 - 2 の続き）

【図 10 - 4】（図 10 - 3 の続き）

【図 10 - 5】（図 10 - 4 の続き）

【図 10 - 6】（図 10 - 5 の続き）

【図 10 - 7】（図 10 - 6 の続き）

【図 10 - 8】（図 10 - 7 の続き）

【図 10 - 9】（図 10 - 8 の続き）

【図 10 - 10】（図 10 - 9 の続き）

【図 10 - 11】（図 10 - 10 の続き）

20

【図 10 - 12】（図 10 - 11 の続き）

【図 10 - 13】（図 10 - 12 の続き）

【図 10 - 14】（図 10 - 13 の続き）

【図 10 - 15】（図 10 - 14 の続き）

【図 10 - 16】（図 10 - 15 の続き）

【図 10 - 17】（図 10 - 16 の続き）

【図 10 - 18】（図 10 - 17 の続き）

【図 10 - 19】（図 10 - 18 の続き）

【図 10 - 20】（図 10 - 19 の続き）

【図 10 - 21】（図 10 - 20 の続き）

30

【図 10 - 22】（図 10 - 21 の続き）

【図 10 - 23】（図 10 - 22 の続き）

【図 10 - 24】（図 10 - 23 の続き）

【図 11】表5 SensiDerm経路アッセイである。好適な皮膚感作アッセイは、化学アレルゲンに対する色々な細胞反応経路の関与を研究するために、表1からの標的タンパク質の組み合わせを含んでもよい。

【図 12 - 1】表6 SRMアッセイに用いた、ペプチド、遷移質量およびASQ Vantage (Thermo Scientific) の質量分析計設定である。

【図 12 - 2】（図 12 - 1 の続き）

【図 12 - 3】（図 12 - 2 の続き）

40

【図 12 - 4】（図 12 - 3 の続き）

【図 12 - 5】（図 12 - 4 の続き）

【図 12 - 6】（図 12 - 5 の続き）

【図 13】表7 SRMデータの統計学的検定である。

【図 14】SRMデータのROC曲線である。

【図 15】SRMデータに基づく感作物質サンプルを予測するためのPLS-DAモデルである。U：無処理サンプル。

【発明を実施するための形態】

【0093】

定義

50

用語「抗体」にはポリクローナル抗血清、モノクローナル抗体、抗体のフラグメント、例えば1本鎖およびFabフラグメント、ならびに遺伝子操作で作られた抗体が含まれる。抗体はキメラまたは単一種のものであってもよい。

【0094】

用語「マーカータンパク質」または「バイオマーカー」には、翻訳後修飾を含む、同定されたタンパク質の全ての生物学的に関連する形態が含まれる。例えば、マーカータンパク質はグリコシル化された、リン酸化された多量体または前駆体の形態で存在してもよい。

【0095】

用語「対照」は、試験細胞と同等であるが試験化合物を欠くバッファーとインキュベートしておいた培養細胞株、ヒトまたは動物被験体から採取した細胞の初代培養、またはヒトまたは動物被験体から採取した生検材料を意味する。

【0096】

表現「対照サンプルと比較した濃度の増加/減少」は、比較のステップを実際に行うことを意味しない、何故なら、当業者にはその濃度が異常に高いかまたは低いことが明らかでありうるからである。代わりに、以前に決定した非感作性化学物質への曝露後の正常なレベルを参照値として用いてもよい。

【0097】

用語「抗体アレイ」または「抗体マイクロアレイ」は一意的な位置指定が可能な固体表面上のエLEMENTを意味し、それにより、それぞれの一意的な位置指定可能なELEMENTに、抗原に対して規定された特異性をもつ抗体が固定され、その後の標的抗原の捕獲およびその後のかかる結合の程度の検出が可能になる。それぞれの一意的な位置指定可能なELEMENTは固体表面上の全ての他の一意的な位置指定可能なELEMENTから間隔がおかれていて、その結果、特異的な抗原の結合と検出はいずれの隣接するかかる一意的な位置指定可能ELEMENTとも干渉することがない。

【0098】

用語「ビーズ懸濁液アレイ」は、それぞれの粒子がそのサイズおよび色または蛍光サインに関係するコード特性を含有し、1以上の同定可能な異なる粒子の水性懸濁液を意味し、そしてこのかかるコード特性の特別な組み合わせのビーズの全てが抗原に対して規定した特異性を持つ抗体でコートされ、その後の標的抗原の捕獲およびその後のかかる結合の程度の検出が可能になる。かかるアレイの例はwww.luminexcorp.comに見出すことができ、ここにはLuminex(登録商標)100™系のxMAP(登録商標)ビーズ懸濁液の応用が記載されている。

【0099】

用語「化合物」は任意の物理的状態の任意の元素の化学的処方を意味し、その最も広い意味で解釈されるものとする。本発明の文脈において、化合物は可溶性薬剤、例えば医薬品、食品添加剤または化粧品；気体、例えば医療ガス、噴霧剤または冷媒；または固体、例えば合成もしくは天然ポリマー、プラスチックまたは金属デバイス、医療移植片、保護設備、衣類であってもよく、そしてかかる化合物の混合物を含む。

【0100】

用語「選択反応モニタリング」、「SRM」および「MRM」は、既知のバイオマーカーを表す既知の質量-対-電荷比の前駆体イオンを、イオントラップのタンデム質量分析またはトリプル四極質量分析計による分析用に選択的に標的化した質量分析アッセイを意味する。分析中に、親イオンはフラグメント化され、第2の予め規定した質量-対-電荷比の娘イオンが計数される。典型的には、予め規定した数の安定な同位体置換を有するがその他は標的イオンと化学的に同一である同等の前駆体イオンがこの方法には含まれ、これが定量的な内部標準として作用する。かかる方法の例は、http://en.wikipedia.org/wiki/Selected_reaction_monitoringに見出すことができる。

【0101】

用語「感作物質」は、化学物質への反復曝露の後に、曝されたヒトまたは動物にアレル

10

20

30

40

50

ギー反応を誘発する化学物質を意味する。

【0102】

「皮膚感作」は、感受性の個人が誘発性の化学アレルゲンに局所的に曝されたときに誘発される免疫学的プロセスを意味する。

【0103】

「感作ポテンシャル」は局所曝露を介して皮膚または呼吸器の損傷を引き起こす化合物または元素のポテンシャルを意味し、前記曝露はそれぞれ局所曝露または吸入であってもよい。本発明の目的には、化合物の感作ポテンシャルはアレルギー反応（感作物質）および/または炎症（刺激物質）を介して損傷を引き起こすポテンシャルが含まれる。

【0104】

「刺激物質」は接触部位において化学作用により生体組織に炎症効果を引き起こす化学物質を意味する。皮膚感作に対するバイオマーカーを開発する場合、刺激性化学物質を含めることは重要である、何故なら感作物質（すなわち、DNCB）も刺激を与えうるからである。

【0105】

感作を誘発しない化学物質は「非感作性物質」と呼ぶが、刺激物質も含みうる。

【0106】

詳細な説明

化学物質安全性試験の必要性は、医薬品に対してならびに化粧品およびヒトの皮膚および粘膜と接触する広範囲の他製品の販売認可に対して長期にわたり規制プロセスを確立してきた。いくつかの試験体制が確立されていると共に、いくつかの事例ではこれらの試験のごく少数が国家規制機関による目的によって禁止されている。概してこれらの試験は全生存生物研究、典型的にはげっ歯類に基づくものである。

【0107】

今や医薬品および化学物質安全試験に用いる動物数を減らす強い倫理的かつ経済的な動向、ならびに、禁止された試験法に置換わる好適な *in vitro* 試験を同時に見出す必要性が存在する。この状況のもとで本発明者らは、培養細胞株または組織生検内の発現レベルがアレルギーまたは刺激物質化合物に応答して予測しうる方式で変化する一式のタンパク質を提示することについて述べる。

【0108】

かかるタンパク質のセットを発見するために、本発明者らはMUTZ-3細胞株に基づく樹状細胞培養モデルに特許のプロテオーム発見作業手順（Masterson et al., Blood, 2002 Jul 15; 100(2):701-3.）を適用した。概略を述べると、MUTZ-3細胞株を公知のアレルゲン接触感作物質、アレルゲン呼吸器感作物質の存在のもとで培養した。いくつかの事例において、曝露は単一用量であったが、その他はある範囲の濃度に曝して用量効果を探った。曝露した後、MUTZ-3細胞を収穫して溶解し、タンパク質を抽出した。抽出後、総細胞溶解液をトリプシンを用いてタンパク質の分解処理をして、得られるペプチドをシクスプレックス（sixplex）セットの同重体質量タグの1つで標識した（Tandem Mass Tags（登録商標）、Proteome Sciences plc）。

【0109】

タンデム質量タグは、6種までの混合前に異なるサンプルの区別しうる標識と1回の質量分析試験で全6サンプルの分析を可能にするように設計した。セット中の各タグは同じ総質量（同重）であるが、質量分析計におけるフラグメント化により一意的なレポーター遺伝子を放出し、他のレポーターイオンと比較したその強度はサンプル中のタンパク質の存在量に正比例した。本発明者らの発見実験において3173種のペプチドに対する相対的に定量的な情報を得ることができ、これらのペプチドは時間および費用効果的なやり方の全ての質量分析測定値の少なくとも50%で一致して測定された741種の一意的なタンパク質を表すものであった。

【0110】

サンプルを初期混合することにより、タンデム質量タグはデータの堅牢性を増加し、発

10

20

30

40

50

見方法より高い処理能力によるその後の標的化スクリーニング試験における日常測定に対する最良候補の選択を可能にする。しかし、その発現が化学曝露により改変されることが予測されるこれらのタンパク質を同定するには、監視型および非監視型クラスター解析などの一式の統計解析を行う必要がある。かかる一連の統計手段の選択的応用を介して、本発明者らは一式のトレーニング化学物質への曝露に対する応答で有意に制御される130種のタンパク質マーカーを同定した。これらの130種のタンパク質の中には、接触および呼吸器感作物質 / アレルゲンならびの非感作性刺激物質のマーカーが存在する。一式のトレーニング化学物質を用いる候補バイオマーカーの同定の後に、本発明者らは分類モデルを開発したが、このモデルは化合物が感作物質 / アレルゲンまたは非感作性刺激物質であるかどうかを、表1に掲げた130種のバイオマーカーの1以上の検出量に基づいて予測することができた。この分類モデルを用いると未知の化学物質または化学物質の組み合わせに曝したMUTZ-3細胞からのタンパク質発現データを解釈しかつ前記化学物質をアレルゲンまたは刺激物質のグループに割当てることができる。この試験系はそれ故に化学物質安全性のための生存全生物試験に置換えるのに好適である。

【0111】

この研究で用いた発見方法は、動物試験および係属中のEU立法に置換わる倫理的必要性に適合するために必要とされる、未知の安全プロファイルをもつ100、1,000または10,000種の化学物質の日常分析に十分適合していると言えないことは認められる。この潜在的な隘路を克服するためには、表1に掲げた130種のタンパク質バイオマーカーの1以上の分析のもっと標的化した手段の提供が必要であろう。1回の分析で130種までの異なるタンパク質の標的化した測定をする好適な方法がいくつか存在する。1つのかかる方法はイムノアッセイであって、この場合、バイオマーカータンパク質に対する特異性をもつ抗体を用いて前記タンパク質を捕獲、検出または捕獲および検出する。イムノアッセイフォーマットには、限定されるものでないが、酵素結合イムノアッセイ (ELISA)、抗体サンドイッチELISA、競合ELISA、免疫PCRおよびウェスタンブロットが含まれる。少数のタンパク質を測定する場合、各タンパク質に対するELISAまたはウェスタンブロットなどの個々の試験を用いることが可能である。あるいは、複数のバイオマーカーを検出しかつ同時に決定する多重試験法、例えば、抗体アレイおよび / またはビーズ懸濁アレイを用いることもできる。

【0112】

いくつかの事例では、タンパク質発現のレベルを選択的に決定するために抗体を用いることが望ましくないまたは不可能でありうる。例として挙げられるのは、バイオマーカーが翻訳後に化学曝露の結果として改変され、かかる改変が免疫学的に不活性である場合、またはタンパク質分解活性がタンパク質の分解を生じ、それにより、利用しうる抗体が認識するエピトープを破壊する場合である。かかる状況では非抗体結合剤、例えばアプタマーを用いてもよい。より好ましくは、選択反応モニタリング (SRM) の原理に基づいて定量的質量分析法を開発することができる。

【0113】

SRM法においては、標的マーカータンパク質を表すペプチドを、マーカー発見中に得た実験データに基づいて選択するかまたはin silicoツールを用いて設計する。典型的には、これら2つのアプローチの組み合わせを用いて最良の結果を得る。SRMによる絶対的定量については、分析サンプル中で測定される生来の形とは同位体として異なる外部の同等の「重」ペプチドを提供することが必要である。かかる同位体として異なる参照ペプチドを提供するためのいくつかの異なるアプローチが存在するものの、それらは全て、1以上の安定な重同位体を生産中にペプチドに加えるという共通の特徴を共有する。最も簡単なしばしば「AQUA」と呼ばれるアプローチは1以上の安定な水素、炭素、窒素または酸素の同位体を用いる。典型的には、同位体の組み合わせを用いて1ペプチド当たり6~10ダルトンの総質量差を導入する。かかる重AQUAペプチドのいくつかの商業的供給源が存在する (例えば、Thermo Scientific (www.thermoscientific.com))。AQUQの代わりアプローチは標準合成ペプチドに付着した共有結合標識を介して重同位体を加える方法である。かかる

方法は参照ペプチドを生産する速度とコストに利点を有する。しかし、この方法は次いで、それぞれの分析サンプルを標識するために、同位体として異なるが化学的に同等であるタグの使用を必要とする。タグに基づくSRM法に対するいくつかのアプローチが存在し、それにはmTRAQ(登録商標)(ABSciex)およびTMT(登録商標)(Thermo Scientific)が含まれる。複数の参照ペプチドが必要である場合、コンカテマーポリペプチドで全ての所望のペプチドをコードする合成遺伝子を作製することも可能である。これを次いで好適な発現宿主またはin vitro転写系に形質移入し、発現されるポリペプチドを精製した後に切断して個々の参照ポリペプチドを遊離させる。典型的には、これを重アミノ酸を用いて実施して同位体置換を行い、全てのペプチドが分析サンプル中の天然型と比較して「重」であるようにする。かかる方法の一例はQCONCATシステム(Pratt et al. Nature Protocols 1, 1029 - 1043 (2006))である。

10

【0114】

当業者は理解しうるように、検出方法は特に本発明を限定するものでなく、標的タンパク質を相対的または絶対的に定量する全ての方法が本発明に組込まれる。

【0115】

ヒトMUTZ-3細胞株をDC細胞培養モデルとして用いて、化学感作物質の感作ポテンシャルを決定するためのタンパク質バイオマーカーに基づくin vitroアッセイ系を開発した。その結果として本発明の追加の態様において、これらのタンパク質マーカーを、呼吸器または皮膚アレルギーを患う哺乳動物またはヒトのかかるアレルギーを診断するために利用することができる。この文脈においては、好適な組織サンプル、例えば、皮膚または気管支肺胞洗浄液の生検サンプルを採集し、タンパク質を抽出し、そして本発明の方法の1つによって測定する。前記サンプルで検出したレベルを次いでMUTZ-3細胞株において感作剤への応答に関連する既知レベルと比較する。

20

【0116】

本発明のさらなる態様は現在開示したタンパク質が接触皮膚炎および喘息などの化学的に誘発されるアレルギーを治療する代替りの手段を提供することである。

【実施例】

【0117】

本発明をさらに以下の実験により説明する。

【0118】

(実施例1) 樹状細胞モデルのプロテオーム分析
候補バイオマーカーの発見に用いたトレーニング化学物質

ヒトMutz-3細胞中のバイオマーカー発見するために一式のトレーニング化学物質を選択した。選択した化学物質は5種の異なる強度の皮膚感作剤、2種の呼吸器感作剤および3種の非感作性/刺激物質を含んだ(表2)。

30

【0119】

接触感作物質/アレルギー;

DNCB: 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン(DNCB)はカラー写真処理に用いられる有機化合物である。DNCBは極端なアレルギーと考えられる。

40

【0120】

オキサゾロン: 4-エトキシメチレン-2-フェニルオキサゾール-5-オンは極端な化学アレルギーと考えられる。

【0121】

PPD: パラ-フェニレンジアミンは極端な化学アレルギーである。PPDはパーマネント毛髪染料として、繊維製品、一時的な入れ墨、写真現像剤、印刷インク、黒色ゴム、オイル、グリースおよびガソリンに広く用いられる。PPD酸化はDC活性化の前提条件である。

【0122】

オイゲノール: オイゲノールはフェニルプロパノイドクラスの化合物の1メンバーである。これは特定の精油から、とりわけシナモンおよびバジルから抽出される無色透明~単黄色の油状の液である。オイゲノールは香料、香味、精油に、および医薬に、局所消毒薬お

50

よび麻酔薬として用いられる。オイゲノールはプロ-ハブテンと考えられ、アレルギー反応を誘発する前に代謝されなければならない。

【0123】

桂皮酸アルデヒド：3-フェニル-2-プロペナル；シンナマル、シンナムアルデヒドは強いシナモン臭をもつ油状の黄色液である。この化合物はシナモンオイルの主成分である。シンナムアルデヒドの主要な応用先は香料および芳香剤産業である。これはチューイングガム、アイスクリーム、キャンディ、および飲料として用いられる。桂皮酸アルデヒドは穏やかな感作物質と考えられる。

【0124】

呼吸器感作物質 / アレルゲン：

TMA：無水トリメリット酸は非常に反応性の化学物質であって、これを用いて工業的にトリメリット酸エステルを合成する。これらのエステルは、とりわけ温度安定性が必要とされる場合に、例えば、電線およびケーブルのコーティングにおけるポリ塩化ビニル用可塑剤として使われる。これは呼吸器感作物質と考えられる。

【0125】

MDI：2,4-ジフェニルメタンジイソシアネートはポリウレタン化合物を還元するのに用いる反応性材料である。BASFのMDIに対する商標はLupranate(登録商標)(北米)およびLupranat(登録商標)(欧州)である。MDIは呼吸器感作物質である。

【0126】

刺激性 / 非感作性化学物質：

SDS：ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)またはラウリル硫酸ナトリウム(SLS)は多くの洗浄および衛生製品に利用される界面活性剤である。SDSは皮膚および眼刺激を引き起こす。

【0127】

フェノール：石炭酸としても知られる有機化合物である。フェノールの主な用途はプラスチックへの変換または関係する材料に関わる。フェノールは眼および皮膚に腐食性がある。

【0128】

サリチル酸：2-ヒドロキシベンゼンカルボン酸としても知られる。サリチル酸は痛みと疼痛を和らげかつ熱を下げる能力で知られる。サリチル酸は、ざ瘡、乾癬、たこ(皮膚硬結)、まめ(皮膚硬結)、毛孔性角化、およびいぼを治療するための多数の皮膚ケア製品における重要成分である。その皮膚細胞における効果の故に、サリチル酸はフケを治療するのに用いるいくつかのシャンプーに使われている。サリチル酸への曝露は過敏性を生じうる。

【0129】

細胞培養

ヒト骨髄白血病由来の細胞株MUTZ-3(DSMZ, Braunschweig, Germany, Hu et al. 1996)は増殖および生存用の培地へサイトカインと成長因子の添加が必要である。MUTZ-3の祖先細胞を、20%FCSおよび40ng/ml GM-CSFを補充したL-グルタミンおよびヌクレオチドを含有するα-MEMで培養した(Invitrogen, 22571-020)。細胞を37 °Cおよび5%CO₂で増殖し、培地を毎週3回変えた。その細胞を200,000細胞/mlの濃度で保った。細胞を分割する場合、それらを800rpmにて5分間遠心分離した。上清を除去し、そして細胞を注意深く1mlの培地に再懸濁し、そして計数して適当な濃度を設定した。

【0130】

化学物質への細胞の曝露

表2：バイオマーカーを発見するために用いた参照化学物質の表

10

20

30

40

【表 2】

化学物質	化学物質／溶媒	最終試験濃度
ジメチルスルホキシド	DMSO	0.1% (v/v)
ジフェニル-メタン-4,4'-ジイソシアネート (MDI)	MDI [μ M]、DMSO中	150 μ M
無水トリメリット酸 (TMA)	TMA [μ M]、DMSO中	500 μ M
ジニトロクロロベンゼン (DNCB)	DNCB [μ M]、DMSO中	4 μ M、8 μ M、10 μ M
桂皮酸アルデヒド (CA)	CA [μ M]、水中	50、 μ M、100 μ M、120 μ M、200 μ M
パラ-フェニレンジアミン (PPD)	PPD [μ M]、DMSO中	75 μ M、150 μ M
オイゲノール	オイゲノール [μ M]、DMSO中	500 μ M
オキサゾロン	オキサゾロン [μ M]、DMSO中	250 μ M
ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)	SDS [μ M]、水中	200 μ M、300 μ M、600 μ M
サリチル酸 (SA)	SA [μ M]、DMSO中	500 μ M
フェノール	フェノール [μ M]、水中	500 μ M

10

20

【0131】

MUTZ-3細胞を細胞培地中で 2×10^5 細胞/mlの細胞密度にて増殖した。試験化学物質を加え、プレートを24時間37℃にて5% CO₂加湿インキュベーター中でインキュベートした。化学物質をDMSOに溶解するときに、0.1% DMSOの最終濃度を関連ネガティブ対照に用いた。24時間のインキュベーション後に、細胞を収穫し、2回PBSで洗浄した。

【0132】

細胞を収穫し、遠心分離して曝露前に2時間無血清状態にする。化学物質を様々な濃度でMUTZ-3祖先またはiMUTZ3 DCに加える（表2）。曝露の日に、1000Xストック溶液を新しく調製する。水に溶解できない化学物質をDMSOに最大最終ウエル中の濃度0.1%で溶解する。試験化学物質に加えて、培地およびビヒクル対照も調製した。適当な試験または対照培地を加えた後に、細胞を37℃にて5% CO₂を含有する大気で閉じたインキュベーター中で48時間インキュベートした。曝露の後、使用した培地を除去して炎症性マーカーの標的化測定用に貯蔵する一方、細胞をプロテオームのバイオマーカー発見用に調製した。

30

【0133】

細胞溶解とサンプル調製

細胞を4体積の100mM TEAB（炭酸水素トリエチルアンモニウム）、pH 8.5±0.1、1mM TCEP（トリス[2-カルボキシエチル]ホスフィン^{*}HCl）、0.1% SDSに溶解した。細胞ペレットを溶解バッファーに懸濁した後、懸濁液を95℃にて10分間、熱ミキサー中で加熱した。細胞溶解液を氷上で2分間、2回超音波処理し、その後、第2サイクルの加熱と超音波処理を行った。サンプルを次いで14,000gにて10分間遠心分離しそして上清をさらなる分析に用いるかまたは-80℃にて貯蔵した。

40

【0134】

タンパク質濃度の決定

タンパク質濃度をBradford試薬を用いて決定した。その結果を、BSA/IgG（50%/50%）から成る標準の希釈液の測定値から作成した標準曲線を用いて計算した。

【0135】

トリプシン消化と同重体質量タグ標識化

50

タンデム質量タグ (TMT) (Thermo Scientific) は一式のアミン反応性標識を含み、これらは重および軽同位体で合成されて同じ総質量を示すが衝突誘起解離 (CID) による活性化とその後のタンデム質量分析 (MS/MS) 後に異なる質量のレポーターイオンを与える。

【0136】

1サンプル当たり100 µgまでのタンパク質溶液の同等物をプロテオームのプロファイル作成実験に用いた。参照プールは全サンプルのアリコートから作製し、それにはそれぞれのTMTシクスプレックス標識反応を含んだ。サンプルの最終体積はMT標識バッファー (100 mM TEAB pH 8.4~8.6、0.1% SDS) で1サンプル当たり100 µlに調節した。サンプルを、水中の20 mM TCEPをそれぞれ5.3 µL加えることにより、30分間室温にて還元し、次いでアセトニトリル中の150mM ヨードアセトアミドをそれぞれ5.5 µLを加えることにより、1時間室温にてアルキル化した。

【0137】

タンパク質を消化するために、100mM TEABバッファー pH 8.4~8.6中の10 µLの0.4 µg/µLトリプシン溶液 (配列決定グレードの改変トリプシン、Promega) をそれぞれのバイアルに加えて37 °Cにて18時間インキュベートした。消化したタンパク質サンプルをTMTシクスプレックス試薬 (TMT6-126、TMT6-127、TMT6-128、TMT6-129、TMT6-130およびTMT6-131) を用いて標識した。TMTシクスプレックス試薬をアセトニトリルに溶解して60mMの濃度とし、40.3 µLの対応する試薬溶液をサンプルバイアルに加え、サンプルを室温にて1時間インキュベートした。Tyr、SerおよびThr残基を逆臨時標識するために、8 µLのヒドロキシアミン水溶液 (5% w/v) を加え、15分間室温にてインキュベートした。TMTシクスプレックス標識したサンプルを組み合わせせて精製した。

【0138】

サンプル精製

サンプルを3mL水/アセトニトリル95:5+0.1%TFAでそれぞれ希釈し、次いでHLB Oasisカートリッジ (1cc、30mg、Waters) を用いて脱塩した。溶出画分をそれぞれさらに、自己作製カートリッジ (CHROMABOND 空カラム 15ml、Macherey-Nagel、650 µL SP Sephalose Fast Flowを充填、Sigma) を用いて強カチオン交換により精製した。ペプチドを充填し、かつ4mL水/アセトニトリル75:25+0.1%TFAで洗浄後、ペプチドを2mL H₂O: ACN75:25+400 mMの酢酸アンモニウムを用いて溶出した。サンプルを真空濃縮器中で乾燥し、それぞれ50 µL水/アセトニトリル95:5+0.1%TFAに溶解し、そして分析まで-20 °Cにて保存した。

【0139】

液体クロマトグラフィとタンデム質量分析 (LC-MS/MS)

TMTシクスプレックス標識サンプルを高性能液クロマトグラフィ-タンデム質量分析 (HP LC-MS/MS) により測定した。例えば、5 µL (5 µg) の各サンプルを、Proxeon EASY-nLC (Thermo Scientific) と結合したエレクトロスプレーイオン化線形イオントラップ四重極Orbitrap質量分析計 (Thermo Scientific) に注入して測定した。ReproSil C18 (5 µm 粒子、Dr. Maisch) を充填した自己充填の0.1 × 20mmトラップカラムにサンプルを供給し、かつ10分間、H₂O: 蟻酸 (99.9%/0.1%) により洗浄した後、分離を90分間、H₂O: 蟻酸 (99.9%/0.1%; 溶媒A) およびアセトニトリル: 蟻酸 (99.9%/0.1%; 溶媒B) の勾配を用いて300nL/minの流速で行った。0.075 × 150mmカラムをReproSil C18 (3 µm 粒子、Dr. Maisch) を用いて自己充填した。全ての質量スペクトルを、陽イオン化モードにて350~1800m/zの走査範囲でフラグメンテーションに対するトップ10 HCD法を用いて取得した。

【0140】

ペプチドとタンパク質の同定と定量

ピークリストをOrbitrap生データから、mascot ジェネリックファイル (*.MGfデータファイル) としてProteome Discoverer (バージョン1.1; ThermoFisher, San Jose, USA) を用いて作製した。得られる*.mgfファイルをIPIヒトデータベース (バージョン3.68; 2011年2月) に対してMASCOT (バージョン2.2; MatrixScience, London, UK (質量分析データを用いる、配列データベースの検索による確率に基づくタンパク質同定)、Perkins DN

, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Electrophoresis. 1999 Dec;20(18):3551-67) により検索した。ペプチドとタンパク質同定を次のパラメーターを用いて実施した：システムにおけるカルバミドメチル、N-末端部位およびリシンにおけるTMT改変は固定した改変として設定した。トリプシンを用いて酵素制限を行い、3つのミス切断を許容しかつ前駆体質量については許容質量耐性 ± 10 ppmおよびフラグメントイオンについては0.05を許容した。対応するMASCOT結果ファイル (*.datデータファイル) をダウンロードし、そしてレポーターイオン強度とタンパク質同定を社内ツールで抽出した。レポーターイオン強度およびタンパク質同一性をリレーショナルMySQLデータベース (version 5.157; Oracle, Redwood Shores, USA) に送ってレポーターイオンのlog2比を計算した。

【0141】

抽出したレポーターイオン強度と相対的定量のデータ前処理

1つのLC/MS/MS試験内の任意のレポーターイオンの一定積分 (constant integral) の仮定に基づくサムスケール (sum scaling) の方法により、質量タグの6つのレポーターイオン強度を同位体分布およびシステム偏差と関係付けた。加えて、全6つのタグが80 AU (任意のユニット) より小さくかつ2未満のタグのレポーターイオン強度が10 AUより小さい場合、これらのMS/MSスキャンをフィルターにかけて外した。レポーターイオンの相対強度はサンプル中のペプチドの相対量を表す。あるペプチド相対量の全サンプルに対する相対量を比較するために、各サンプル-対-プールした参照サンプル間の比を計算した。比をlog2変換して各ペプチドに対する参照測定値を得た。タンパク質レベルの相対的变化についての情報を得るために、1つのタンパク質同一性に属する各同定したペプチドに対するlog2参照レポーターイオン強度の幾何平均値を求めた。

【0142】

(実施例2) 統計解析と分類モデルの作製

感作物質および刺激物質のグループに属する参照化学物質ならびに適当な対照 (ビヒクル) 物質のグループに属する参照化学物質を用いて候補タンパク質バイオマーカーを選択した。これらの化学物質を色々な組み合わせと濃度で4つの分析発見研究に適用した。

【0143】

複数の仮説を検定するために、分散分析 (ANOVA、 $p \leq 0.05$) を計算して3クラス間の比較可能性のいずれかに関係するバイオマーカーを研究した。事後分析 (Tukey Test) を実施してクラス差を個々に研究した。統計学的記述言語Rまたはデータ解析ソフトウェアMeV (TIGR) バージョン4.3を全ての統計解析に用いた。その後、130種のタンパク質バイオマーカーのリストを得た (配列番号1~130)。そのリストを表1にそしてタンパク質配列を表4 (図10) に詳述した

アッセイ用の候補タンパク質バイオマーカーの同定

感作物質と非感作物質の間の区別を可能にする候補タンパク質バイオマーカーを発見するために、表2に掲げた色々なセットの化学物質を含む4通りの発見研究を次の通り実施した。第1の研究 (40-002_2) では、Muts-3細胞を2つの呼吸器感作物質 (150 μ M MDI、500 μ M TMA)、4つの接触感作物質 (10 μ M DNCB、200 μ M 桂皮酸アルデヒド、150 μ M PPD、500 μ M オイゲノール)、2つの刺激物質 (500 μ M サリチル酸、500 μ M フェノール) および2つの対照 (無処理、0.1% DMSO) と共にインキュベートした。第2の研究 (40-002_3) では、Muts-3細胞を2つの異なる濃度の2つの接触感作物質 (50および100 μ Mの桂皮酸アルデヒド、4および8 μ MのDNCB)、1つの刺激物質 (300および600 μ M SDS) および2つの対照 (無処理、0.1% DMSO) と共にインキュベートした。第3の研究 (40-002_4) では、Muts-3細胞を4つの接触感作物質 (120 μ M 桂皮酸アルデヒド、4 μ M DNCB、75 μ M PPD、250 μ M オキサゾロン)、3つの刺激物質 (200 μ M SDS、500 μ M サリチル酸、500 μ M フェノール) および2つの対照 (無処理、0.1% DMSO) と共にインキュベートした。

【0144】

第4の研究40-002_8では、Muts-3細胞を2つの接触感作物質 (120 μ M桂皮酸アルデヒド、4 μ M DNCB)、1つの呼吸器感作物質 (150 μ M TMA)、1つの刺激物質 (200 μ M SDS) および1つの対照 (無処理) と共にインキュベートした。

【 0 1 4 5 】

統計解析の目的は化学物質の感作化学物質 (A= アレルゲン) または非感作化学物質 (I = 刺激物質) のグループへの割り当てを可能にする分類モデルを開発することであった。4つのデータセット ($p \leq 0.05$) の統計解析後に候補バイオマーカーの最終リストを得た。4つのデータセットはそれぞれトレーニング化学物質のリストから選択される化学物質の色々な組み合わせの試験に関わった。従って、新しい化学物質を評価するまたは化学物質の色々な組み合わせを解析する本発明の方法の使用はバイオマーカー候補のデータベースの増加に寄与するであろう。第1のアプローチにおいては、最適な候補をp値の増加に基づいて上から下に格付けした。表1は、Mutz-3の一式のトレーニング化学物質への曝露後に有意に影響を受けるトップ130の候補バイオマーカーを示す。その結果、感作物質 (A=アレルゲン) および非感作物質 (I=刺激物質) は、DCまたはDC-様細胞モデルに発現される極く限られたセットの遺伝子産物: ACLY、ACTA2、ACTN4、ACTR1A、ACTR3、AIMP1、ALDOA、ANXA5、ARF3、ARL6IP5、ATP5B、ATP5G3、BAT1、BYSL、CAB39、CALR、CAPG、CAPZA1、CLC、CORO1A、RBM12、CRTAP、EEF1A1、EEF1A2、EEF1B2、EEF2、IF3E、EIF4A3、EIF5A2、ELAVL1、FDXR、FERMT3、FLNA、G6PD、GAPDH、GOT2、HADHA、HBA2、HBE1、HBZ、HIST1H1B、HIST1H1C、HIST1H2BL、HIST2H3A、HIST1H4C、HMG2、HNRNPK、HSP90AA2、HSP90AB1、HSPA8、HSPA9、HSPD1P6、HSPE1、HYOU1、KHSRP、LGALS1、LMNA、LRPPRC、MDH2、MPO、COX3、NARS、NASP、NCF4、NCL、NDUFV1、NME2、NPM1、P4HB、PCNA、PDCD6、PDIA3、PDIA6、PEBP1、PGD、PKLR、PPIAL3、PPIAL4C、PPP2CA、PRDX1、PSMA7、PSMC3、PSMD13、PSME1、RALY、RAN、RCTPI1、RETN、RNASET2、RPL18A、RPL26P33、RPL3L、RPL7P20、RPS15AP12、RPS19、RPS2P17、S100A11、S100A4、S100A8、S100A9、SEC22B、SERPINB1、SET、SFRS2、SFRS7、SH3BGRL3、SLC25A5、SLC3A2、SOD1、STK24、TAF15、TAGLN2、TALD01、TFRC、TMEM33、TMSL3、TPI1、TRAPPC3、TUBA1C、TUBA4A、TUBB2C、TUFM、TXN、TXNDC5、UQCRC2、VAMP8、VDAC1P1、VDAC2、VIMの存在を測定することにより同定することができる。第2のアプローチにおいては、タンパク質をアレルゲン (A) と刺激物質 (I) の間を区別するその能力に基づいて選択した。事後ペアワイズ (Post-hoc pairwise) グループ比較をTukey検定を用いて実施した。C-A: 対照対アレルゲンのグループ比較; I-A: 刺激物質対アレルゲンのグループ比較; I-C: 刺激物質対対照のグループ比較。

10

20

【 0 1 4 6 】

第1の研究において、アレルゲンと刺激物質の間の比較は17種のタンパク質 (Tukey 試験 $p \leq 0.05$): ATP5B、MPO、S100A11、ACTA2、HBA2/HBA1、S100A8、NCL、VDAC1、EEF1A2、PPIA、NPM1、TMSL3、TXN、HBE1、TUBA4A、HNRNPK および PPIAL4を同定した。第2の研究において、アレルゲンと刺激物質の間の比較は7種のタンパク質 (Tukey試験 $p \leq 0.05$): TUBA4A、HSP90AA1、PKLR、CLC、HSP90AA2、TALD01およびVDAC2を同定した。第3の研究において、アレルゲンと刺激物質の間の比較は12種のタンパク質 (Tukey試験 $p \leq 0.05$): HIST1H1C、CLC、HIST2H3D、RCTPI1、HIST1H1B、TMSL3、HIST1H2BL、GAPDH、PCNA、HIST2H4A; SLC25A5およびPRDX1を同定した。

30

【 0 1 4 7 】

最も有望なバイオマーカー候補を、色々なデータセット間の重複を解析することにより選択することもできる。第3のアプローチにおいては候補タンパク質バイオマーカーを、同じタンパク質が異なる組み合わせの化学物質の試験に関わった異なるデータセット ($p \leq 0.05$) 4つのうちの2つで見出されたかによって選択した。これらのタンパク質は15種の最も有望なタンパク質を含むタンパク質のセットに属する。グループ1は次のタンパク質: 4つの実験のうちの少なくとも2つで重複した ($p \leq 0.05$) HSPA8、MPO、S100A8、TMSL3、VDAC2、CLC、HIST1H1C、HIST1H2BL、PGD、PKLR、PPIA、S100A9、SLC25A5、TALD01 および TUBA4Aを含有する。

40

【 0 1 4 8 】

(実施例 3) 呼吸器感作物質に対するバイオマーカー

現在、呼吸器感作物質を同定するための確証された細胞株に基づくアッセイは無く、樹状細胞株のIL-8アッセイはTMAに反応しない (Mitjans et al, 2009)。呼吸器感作物質に

50

対する適当なタンパク質バイオマーカーを同定するために、Mutz-3細胞を呼吸器感作物質（TMA）、プロトタイプ接触感作物質（DNCB）、1つの刺激物質（SDS）を含む参照化合物に曝した。TMA-対-対照サンプルを比較する2つのサンプルt-検定（ $p \leq 0.05$ ）を実施し、呼吸器感作物質TMAに対する細胞の反応を示すバイオマーカーを同定した。タンパク質をp-値の増加の順に並べた。

【0149】

表1のグループ2中のタンパク質は、ACTR3、EIF3E、G6PD、COX3、NARS、RPL26P33、SFRS2、EIF4A3、SOD1、STK24を含むTMA特異的マーカーパネルを表す。表1はバイオマーカーのuniprot ID、タンパク質名および公式遺伝子名を与える。それぞれのタンパク質配列を表4（図10）に示す。対照、刺激物質、TMAおよび典型的な皮膚感作物質DNCBの間の候補バイオマーカーの相対的存在量の相違を図9に示す。

10

【0150】

表1のグループ3は、化学刺激物質と感作物質の色々な組み合わせの試験に関わる4つの研究の少なくとも1つにおいて所要の $p \leq 0.05$ の有意な判定基準に合格するさらなる感作物質バイオマーカーを含む。

【0151】

ヒエラルキー・クラスター分析

図1は、感作物質と刺激物質を区別するために提案したバイオマーカーの効用の他の例を示す。第4の研究では、Mutz-3細胞を1つの接触感作物質（DNCB）、1つの呼吸器感作物質（TMA）、1つの刺激物質（SDS）に曝すかまたは無処理のまま放置した。83種のタンパク質を含む問題のリストからのタンパク質のサブセットを用いて無鑑査ヒエラルキクラスターを形成し、アレルゲン、刺激物質および対照グループに属するサンプルの分離が良いことを示した。存在量が増加または減少する2つの主なタンパク質のクラスターを見出した。

20

【0152】

部分最小二乗判別分析（PLS-DA）

化学物質を分類する好ましい方法は部分最小二乗回帰分析（PLS）を使う方法である。PLS判別分析は問題のリストから最も重要な分類子（classifier）を同定する。モデルを赤で強調した応答変数（y）および予測因子（predictor）（x）としてANOVAでフィルターしたタンパク質を用いて構築した。第1のPLS成分（x軸）を第2のPLS成分（y成分）に対してプロットし、3つの実験グループ「対照」、「刺激物質」および「感作物質」を分類する役割を有するバイオマーカーを分離した。

30

【0153】

図2は第4の研究で見出した候補バイオマーカーのプロットを載せるPLS-DAを示す。タンパク質バイオマーカー（IPI受託番号）を、最初の2つの主軸に対する重み変数に対応する座標を用いてプロットする。応答変数「is アレルゲン」に近いバイオマーカーは化学物質をポテンシャルアレルゲンとして分類する上で強い役割を有する。応答変数「is 刺激物質」に近いバイオマーカーは化学物質を刺激物質と同定する。

【0154】

図3は第4の研究の全サンプルについてお互いに対してプロットした2つの第1の主成分の対応するPLSスコアプロットを示す。このスコアプロットにおいて、各点は1つのサンプルを表す。ANOVAフィルターされたタンパク質リストサンプルに基づいて対照、感作物質および刺激物質処理されたサンプル間で良い分離が達成された。非常に強い感作物質DNCBで処理したサンプルは対照から最大相対距離を有するが、TMA処理したサンプルは対照サンプルからより小さい距離を示し、TMAがMUTZ-3細胞にはるかに小さい反応を誘発することを示すと見ることができる。

40

【0155】

（実施例4）標的化バイオマーカー測定

感作ポテンシャルを予測するマーカーを見出す代替りのアプローチとして、3種の公知の炎症性マーカーのレベルを測定する市販のイムノアッセイを用いるさらに標的化したア

50

ブローチを採用することにより、本発明者らは化学安全性のマーカーの供給源として細胞培養上清の可能性を探索した。ELISAにより測定する3種のタンパク質は、化学感作物質に対して分泌される炎症性タンパク質応答に対する参考文献の総括に基づいて選択した。細胞を実施例1に記載の通り培養し、使用済みの培地を取り出してELISAにより直接分析した。全てのキットは製造業者取扱説明書に従って用いた。

【0156】

ミエロペルオキシダーゼ (MPO)

Huら (1996) によると、MUTZ-3細胞株は単球の特徴を示し、MPOを発現する。MPOはリソソームに貯蔵され、炎症の間、放出されるペルオキシダーゼ酵素であり、ミエロペルオキシダーゼはELISA (Assay-Designs) により測定された (図4)。驚いたことにその結果は、MPMがMutz-3細胞の接触感作物質DNCBに対する曝露の指標であるが呼吸器感作物質TMAに対するものでないことを示した。実施例1で本発明者らがMutz-3細胞の上清で見出したMPOのレベルの増加との組み合わせで起こったMPOの細胞内レベルの減少を同定したことに注意すべきであって、これは接触感作物質による曝露に反応したMPOの活性分泌を示唆する。

【0157】

カルプロテクチン (S100A8/S100A9)

カルプロテクチンはS100A8/S100A9のヘテロ二量体であって、Mutz-3細胞の上清中で市販イムノアッセイ (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany) により測定した (図5)。カルプロテクチンはストレスに応答して食細胞により活性化されて分泌され、Toll様受容体4 (TLR4) と結合する。Toll様受容体は先天的免疫系において重要な役割を果たし、カルプロテクチンによるTLR4の活性化はさらに炎症を増幅する (Ehrchenら 2009)。TLR4とインターロイキン12の二重ノックアウトマウスは、2,4,6-トリニトロ-1-クロロベンゼン (TNCB)、オキサゾロン、およびフルオレセインイソチオシアナート (Martinら、2008) を含む広範囲の色々な感作物質によるDC感作の著しい減少を示す。カルプロテクチン分泌に関係する一般的な炎症経路に基づいて、全てのクラスの化学アレルゲンに対するマーカーであることが期待されうる。思いがけなく、本発明者らのデータはS100A8/S100A9レベルがDMCB曝露によりモジュレートされるが、呼吸器感作物質TMAに反応しないことは、2つの異なる化学物質によって異なる細胞経路が活性化されることを示す。MPOのように、カルプロテクチンの細胞外レベルの増加は、実施例1で見られた相関のある細胞内レベルの対応する減少と一致した。

【0158】

Cu/Zn-SOD (SOD1)

Zn/Cu-SOD (SOD1) は遊離スーパーオキシド・ラジカルを分子状酸素と過酸化水素に変換する酵素である。SOD1は身体的全細胞で発現される細胞内酵素である。DC分化の間、SOD1発現は増加して成熟DCにおいて最高レベルに到達する (Rivollier ら、2006)。SOD1発現はLPS、TNF- α およびIL-1bなどのプロ炎症性メディエーターによりアップレギュレーションされる (Visnerら、1990)。成熟したDC段階における細胞に関連したSOD1レベルの増加を報じたRivollier ら (2006) とは対照的に、本発明者らはSOD1レベルが細胞抽出物中のアレルゲン曝露に反応して減少しかつMutz-3の上清中で増加することを見出した (図6)。上清中でSOD1を、特異的ELISAアッセイを用いて定量した (IBL, Hamburg, Germany) 。

【0159】

(実施例5) 一般的な感作物質に対するバイオマーカーパネル

実施例1~4の結果は、化学感作物質を刺激物質または対照化学から識別するための130種のタンパク質のパネル (表1、グループ1~3) を同定した。参照化学物質を用いて130種のバイオマーカーのパネルを決定するために記載した方法を今や、改定した形態で用いて新しくまたは今まで未試験の化学剤を試験し、それらのアレルゲン、感作物質または非感作性物質としてのポテンシャルを決定することができる。本発明によれば、その方法は、新しい化学物質またはポジティブおよびネガティブ対照としての参照化学物質と組み合わせる新しい化学物質に曝したサンプルの試験セットにおける表1から選んだバイオマーカー

ーの濃度を測定する方法を使うことができる。典型的には、新しい試験化学物質を評価する際に、表1からのバイオマーカーの組み合わせを用いて、とりわけグループ1またはグループ2からのバイオマーカーを選択して実施すべきである。グループ1およびグループ2から選択されるバイオマーカーのパネルの使用は、感作物質、刺激物質および対照の間の最も堅牢な組み合わせを確実なものにするであろう。選択したバイオマーカーが新しい化合物について巧く行けば、そのバイオマーカーの組み合わせを保持しうる。あるいは、グループ1または2からのプロセスを繰り返して他のバイオマーカーの組み合わせを試験することができる。また、グループ1または2からのバイオマーカーを拒絶し、グループ3からのバイオマーカーを含むこともできる。この繰り返しプロセスを優れた分類モデルが得られるまで続けうる。表1に記載のバイオマーカーの濃度を測定することにより皮膚刺激を起こす化学物質を同定することも可能である。典型的には、可能性のある刺激物質および感作物質の間を識別する際に、この分析は炎症性および細胞のストレスプロセスと連結したバイオマーカーを用いて実施すべきである。特に、SDSへの曝露後に誘導されるグループ3から選択されるバイオマーカーが有用でありうる。これは、限定されるものでないが、SLC3A2（膜貫通糖タンパク質CD98の成分）、またはHYOU1（低酸素誘発性の細胞損傷に重要な細胞保護的な役割を有するタンパク質）またはSH3BGRL3/TIP-B1（TNF抑制タンパク質）の濃度の測定に関わりうる。感作または刺激化学物質によりモジュレートされるタンパク質の包括および組み合わせは新しい化学物質の感作または刺激ポテンシャルを正しく予測することを可能にするであろう。

10

20

30

40

50

【0160】

（実施例6）接触感作剤のバイオマーカーパネル

感作ポテンシャルの一般的マーカーのパネル内で、接触感作物質効果に関連する最強識別マーカーを選択することもできる。PLS-DAを用いて、全ての他のクラスから皮膚感作物質の最強分離を提供する15種のタンパク質のサブグループを同定した（表1、グループ1）。従ってちょっとこれらの15種のタンパク質を測定する標的化分析を実施して公知の皮膚感作物質を検出し、未知の試験化学物質または化学物質の組み合わせが皮膚感作ポテンシャルを有するかどうかを実証することができる。

【0161】

（実施例7）呼吸器感作剤用のバイオマーカーパネル

感作ポテンシャルの一般的マーカーのパネル内で、呼吸器感作物質効果に関連する最強識別マーカーを選択することもできる。PLS-DAを用いて、全ての他のクラスから呼吸器感作物質の最強分離を提供する10種のタンパク質のサブグループを同定した（表1、グループ2）。従ってちょっとこれらの10種のタンパク質を測定する標的化分析を実施して公知の皮膚感作物質を検出し、未知の試験化学物質または化学物質の組み合わせが皮膚感作ポテンシャルを有するかどうかを実証することができる。

【0162】

（実施例8）未知化学物質のアレルギーおよび刺激物質ポテンシャルを決定する方法

本発明者らは、Mutz-3培養樹状細胞モデルを用いて、試験時点でそのアレルギーまたは刺激物質状態が未知であった一連の化合物を試験した。Mutz-3細胞を実施例1に記載の通り培養し、5種の未知化学物質（A、B、C；E、F）に曝した。1化合物当たり平均して3つのサンプルを処理した。Mutz-3細胞の培養を公知のアレルゲンPPDおよび公知の刺激物質SDSと共にインキュベートするかまたは無処理で放置してそれぞれポジティブおよびネガティブ対照とした。細胞培養後、使った培地を除去し、将来の分析用に貯蔵した。細胞を洗浄し、収穫し、タンパク質を抽出し、そして実施例1に記載の通りTMTを用いて標識した。

【0163】

それぞれの未知化合物の標識した溶解液をアレルゲン、刺激物質および非感作物質対照および参照細胞消化物と混合し、そして本質的には実施例1に記載のLC-MS/MS分析で処理した。質量分析の後、データを編集し、表1の130種の定義したマーカーに対するTMTレポーターイオンスペクトルを抽出し、そして試験および対照サンプル中の各タンパク質の相対存在量を決定するために用いた。未知の化学物質を特定のカテゴリーに割付ける第1の

試験を構築するために、数学的線形回帰モデルを用いることができる。直接モデルはPLS-DAであって、ここでは、公知の感作物質および刺激物質を、タンパク質プレディクター変数のレベルから未知化学物質の特別な化学クラスを予測する内部参照点として使う。かかるモデルを使って、感作、刺激物質および対照化学に対する重要な識別マーカーの従来の知見に基いてブラインド研究における個々のマーカー性能を分析する。未知の化合物から得た結果をアンブラインド化して真の状態を実際の状態と比較した。5つの事例のうちの4事例において、定量的なタンパク質バイオマーカーパネルは未知化合物に対する化学安全性状態の正しい割付けを可能にした。4つの正しく同定した化学物質に対するこの第1のPLS-DA分析の結果を図3に示した。PLSスコアプロットは、2つの未知の化学物質をポジティブ対照としてPPD、ネガティブ対照としてSDSに対して試験した個々の測定値を表す。表1から選択されるバイオマーカーに基づく参照化学物質への距離の短さはこれらの化学物質がいくつかの共通の特性を共有することを示す。これらの感作ポテンシャルは予めマウス局所リンパアッセイ(LLNA)またはモルモット皮膚反応試験を用いて決定した。LLNAに基づく、エチレンジアミン(化学物質A)は中度の感作物質として特徴付けられる必要がある典型的なプロハブテンであるが、その故に、細胞培養に基づく試験を用いると、しばしば偽ネガティブ結果が得られる典型的なプロハブテンと見られている(Natch 2010)。化学物質Aのカテゴリーは予測することができないであろう。エチルバニリン(化学物質B)は極度に弱かつ非感作性として分類されるが、モルモット皮膚試験ではポジティブと試験されている。表1からのバイオマーカーのリストを用いると、化学物質B(エチルバニリン)は弱い感作物質として分類された。化学物質C(ホルムアルデヒド)は強い感作物質として、そして化学物質E(イソプロパノール)およびF(サリチル酸メチル)はそれぞれ非感作物質として正しく分類された。

【0164】

表3：試験化学物質と予測の結果

【表3】

化学物質	LLNA	予測
A=エチレンジアミン	中度	偽ネガティブ
B=エチルバニリン	極度に弱／非感作性	弱感作物質
C=ホルムアルデヒド	強感作物質	強感作物質
E=イソプロパノール	非感作物質	非感作物質
F=サリチル酸メチル	非感作物質	非感作物質

【0165】

(実施例9) 特定経路に関連するバイオマーカーのパネル用の選択反応モニタリング(SRM)アッセイ

色々な化学感作物質アッセイに対する複雑かつ可変性の細胞応答にアプローチするためには、色々な細胞の応答経路を表すいくつかのバイオマーカーの同時分析を可能にするアッセイが必要である。SRMに基づくアプローチは、技法の感度と選択性、多重化能力および抗体の限られた利用可能性の故に、魅力的なELISAの代替法である。本技法では、目的のタンパク質に一意的なサインペプチドを測定し、サンプル中のタンパク質の定量的な情報を提供する。化学曝露実験に応答するペプチド存在量の変化は、典型的な同位体TMT-SRの作業手順を用いて決定することができる。本技法において、定量はTMTゼロで標識したサンプルペプチド-対-TMTシックスプレックス重同位体で標識した内部参照サンプルの相対MS強度に基づいて行われる。

【0166】

表5(図11)は、統計的有意性および経路表現に基づいてアッセイ開発のために選択した発見データから浮かび上がったバイオマーカー候補を示す。

【0167】

10

20

30

40

50

方法

SRM決定のための候補ペプチドの選択

現存するMS/MSデータを用いて、最も高頻度で観察される特異的ペプチドを選択して定量した。もし可能であれば、SRM開発のためにタンパク質1種当たり少なくとも3種のペプチドを選択した。11種のバイオマーカー候補に対する代表的ペプチドを表6（図12）に示した。選択のための判定基準には次が含まれる：トリプシンによる切断ミスのないことおよび可変性の修飾がないこと（in vivoまたは実験において）

サンプル

発見研究に記載の通り、MUTZ3細胞を感作物質（4 μ M DNCB、150 μ M TMA）および刺激物質（200 μ M SDS）に曝すかまたは無処理のままとした。

【0168】

サンプルの調製

プールしたサンプルをトリプシンで消化しかつTMTシクスプレックスで標識して、定量の参照となるペプチドの重標識バージョンを作製した。試験サンプルを消化しかつTMTゼロで標識して、ペプチドの軽標識バージョンを作製した。各15 μ gのプールおよび試験サンプルをその後に混合し、固相抽出による引き続いての精製および揮発性バッファーを用いる強カチオン交換を実施した。

【0169】

サンプルのSRM分析

混合した重および軽標識サンプルを5%アセトニトリル（=ACN）、0.2%蟻酸（=FA）に再懸濁し、TSQ Vantageトリプル四重極質量分析計（Thermo Fisher）と結合したAccela 1250液体クロマトグラフィ（LC）系に注入し、そしてSRMデータを得た。対応するTMTシクスプレックス標識およびTMTゼロ標識をしたフラグメントイオン質量を計算し、そしてMS計器パラメーターを個々のQ1およびQ3遷移対について最適化した。プールした細胞溶解サンプルを消化し、TMTシクスプレックスで標識し、そしてTMTゼロ標識した参照ペプチドと組み合わせた。各ペプチドに対する正確な保持時間を用いると、各SRM遷移に与えられた走査時間を最大化するために用いた保持時間ウィンドウでSRMサイクル時間は1.5秒であった。洗浄およびカラムを平衡化する時間を含めて、本方法の総試験時間は23分であった。脱クラスター電圧を5ボルトに設定し、ピーク幅（FWHM）を0.5に設定し、そしてクロムフィルターピーク幅を6秒に設定した。SRMアッセイは153種のSRM遷移物を含み、19ペプチドと11タンパク質をカバーした。SRM遷移物を表6（図12）に掲げた。

【0170】

データ解析

SRMをSkylineバージョン1.2.0.3425（<https://skyline.gs.washington.edu/labkey/project/home/software/Skyline/begin.view>）を介して可視化しかつ全てのピーク整合を可視的に実証した。ピーク面積をMicrosoft Excelに出力した。遷移を合計して各ペプチドに対する全遷移の総強度を得た。内因性（軽）ペプチドの量を、内部の重標識した参照サンプルに対する相対的なピーク面積比に基づいて計算した。

【0171】

結果

SRMマルチマーカーアッセイを適用し、特異的タンパク質応答サインに基づいて、化学感作物質で処理したサンプルを対照および刺激物質サンプルから識別した。表6（図12）に掲げたマーカーのうちの8つに特異的なペプチドを含むマルチマーカーのパネルの性能を試験するために、サンプルを典型的な接触感作物質（DNCB）および呼吸器感作物質（TMA）および刺激物質（SDS）に曝した。各サンプル（1処理当たり8複製）について3つの分析複製を実施した。SRMペプチドデータを分散分析（ANOVA）（ $P < 0.05$ ）により分析した後、Tukeyの事後（post-hoc）検定（対照と比較したアレルゲン、アレルゲン-対-刺激物質、 $P < 0.05$ ）を行った。表7（図13）はタンパク質前駆体PGD、MPO、HSPA8、TMSL、S100A8、S100A9およびS100A4から選択した20のペプチドの性能を示す。3つのペプチドを除外した全てのペプチドは有意判定（ $p < 0.05$ ）を合格し、アレルゲンと個々のペプチドとしての対

照との間を識別する優れた性能を示した。

【 0 1 7 2 】

化学感作物質を正しく同定するポテンシャルを最大化するために、8つのマーカーパネルのROC曲線下面積（AUC）に与える効果を計算した。図14に示したように、8つのマーカーパネルは、0.96のAUCで化学感作剤を同定する優れた特異性と感受性を示した。この8つのマーカーパネルの、異なるクラスの化学物質を差別化する力をさらに示すために、本発明者らはサンプルのPLS-DAスコアプロットを行った（図15を参照されたい）。試験セットで用いた4つの化合物は、TMT-SRMアッセイにより決定した異なるタンパク質発現に基づいて優れた分離を示した。

【 0 1 7 3 】

参考文献

Gildea LA, Ryan CA, Foertsch LM, Kennedy JM, Dearman RJ, Kimber I, Gerberick GF. (2006) Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. J Invest Dermatol. 126(8):1813-22.

Python F, Goebel C, Aebly P. (2009). Comparative DNA microarray analysis of human monocyte derived dendritic cells and MUTZ-3 cells exposed to the moderate skin sensitizer cinnamaldehyde. Toxicol Appl Pharmacol. 239(3):273-83.

Magnusson, B., Kligman, A.M., 1969. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. J. Invest. Dermatol. 52, 268-276.

Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Scholes, E.W., Ladics, G.S., Loveless, S.E., House, R.V., Guy, A., 1995. An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. Toxicology 103, 63-73.

Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers--functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin sensitizers. Toxicol Sci. 113:284-92.

【 0 1 7 4 】

PBMC由来のDC

10

20

30

Tuschl H, Kovac R (2001). Langerhans cells and immature dendritic cells as model systems for screening of skin sensitizers. *Toxicol In Vitro*. (4-5):327-31.

Tuschl H, Kovac R, Weber E (2000). The expression of surface markers on dendritic cells as indicators for the sensitizing potential of chemicals. *Toxicol In Vitro*. (6):541-9.

De Smedt AC, Van Den Heuvel RL, Van Tendeloo VF, Berneman ZN, Schoeters GE, Weber E, Tuschl H. (2002). Phenotypic alterations and IL-1beta production in CD34(+) progenitor- and monocyte-derived dendritic cells after exposure to allergens: a comparative analysis. *Arch Dermatol Res*. 294:109-116.

10

Ryan CA, Gildea LA, Hulette BC, Dearman RJ, Kimber I, Gerberick GF (2004). Gene expression changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol Lett*. 150(3):301-16.

Gildea LA, Ryan CA, Foertsch LM, Kennedy JM, Dearman RJ, Kimber I, Gerberick GF (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J Invest Dermatol*. 126(8):1813-22

20

Schoeters E, Verheyen GR, Van Den Heuvel R, Nelissen I, Witters H, Van Tendeloo VF, Schoeters GE, Berneman ZN (2005). Expression analysis of immune-related genes in CD34(+) progenitor-derived dendritic cells after exposure to the chemical contact allergen DNCB. *Toxicol In Vitro*. 2005 19(7):909-13.

Schoeters E, Nuijten JM, Van Den Heuvel RL, Nelissen I, Witters H, Schoeters GE, Van Tendeloo VF, Berneman ZN, Verheyen GR (2006). Gene expression signatures in CD34+-progenitor-derived dendritic cells exposed to the chemical contact allergen nickel sulfate. *Toxicol Appl Pharmacol*.;216(1):131-49.

30

Schoeters E, Verheyen GR, Nelissen I, Van Rompay AR, Hooyberghs J, Van Den Heuvel RL, Witters H, Schoeters GE, Van Tendeloo VF, Berneman ZN (2007). Microarray analyses in dendritic cells reveal potential biomarkers for chemical-induced skin sensitization. *Mol Immunol*. 44(12):3222-33.

40

Hooyberghs J, Schoeters E, Lambrechts N, Nelissen I, Witters H, Schoeters G, Van Den Heuvel R. (2008). A cell-based in vitro alternative to identify skin sensitizers by gene expression. *Toxicol Appl Pharmacol*. 231(1):103-11

Lambrechts N, Vanheel H, Nelissen I, Witters H, Van Den Heuvel R, Van Tendeloo V, Schoeters G, Hooyberghs J. (2010). Assessment of chemical skin-sensitizing potency by an *in vitro* assay based on human dendritic cells. *Toxicol Sci*. 116(1):122-9.

50

DC細胞モデルの転写プロファイル (THP-1、Mutz-3) :

Verstraelen S, Nelissen I, Hooyberghs J, Witters H, Schoeters G, Van Cauwenberge P, Van Den Heuvel R. (2009) Gene profiles of THP-1 macrophages after *in vitro* exposure to respiratory (non-)sensitizing chemicals: identification of discriminating genetic markers and pathway analysis. *Toxicol In Vitro*.23(6):1151-62.

Lambrechts N, Verstraelen S, Lodewyckx H, Felicio A, Hooyberghs J, Witters H, Van Tendeloo V, Van Cauwenberge P, Nelissen I, Van Den Heuvel R, Schoeters G (2009). THP-1 monocytes but not macrophages as a potential alternative for

CD34+ dendritic cells to identify chemical skin sensitizers. Toxicol Appl Pharmacol. 236(2):221-30.

Nelissen I, Selderslaghs I, Heuvel RV, Witters H, Verheyen GR, Schoeters G. (2009). MUTZ-3-derived dendritic cells as an *in vitro* alternative model to CD34+ progenitor-derived dendritic cells for testing of chemical sensitizers. Toxicol In Vitro. 23(8):1477-81.

Ott H, Wiederholt T, Bergström MA, Heise R, Skazik C, Czaja K, Marquardt Y, Karlberg AT, Merk HF, Baron JM. High-resolution transcriptional profiling of chemical-stimulated dendritic cells identifies immunogenic contact allergens, but not prohaptens. Skin Pharmacol Physiol. 2010;23(4):213-24.

10

Williams EH, Williams CA, McLeod JD (2010). Identification of PDL-1 as a novel biomarker of sensitizer exposure in dendritic-like cells. Toxicol In Vitro. 24(6):1727-35.

Hu ZB, Ma W, Zaborski M, MacLeod R, Quentmeier H, Drexler HG (1996). Establishment and characterization of two novel cytokine-responsive acute myeloid and monocytic leukemia cell lines, MUTZ-2 and MUTZ-3. Leukemia. 10(6):1025-40.

20

Visner GA, Dougall WC, Wilson JM, Burr IA, Nick HS (1990). Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. J Biol Chem. 265(5):2856-64

Rivollier A, Perrin-Cocon L, Luche S, Diemer H, Strub JM, Hanau D, van Dorsselaer A, Lotteau V, Rabourdin-Combe C, Rabilloud T, Servet-Delprat C (2006). High expression of antioxidant proteins in dendritic cells: possible implications in atherosclerosis. Mol Cell Proteomics. 5(4):726-36.

30

Byamba D, Kim TG, Kim DH, Je JH, Lee MG (2010). The Roles of Reactive Oxygen Species Produced by Contact Allergens and Irritants in Monocyte-derived Dendritic Cells. Ann Dermatol. 2010 22(3):269-78.

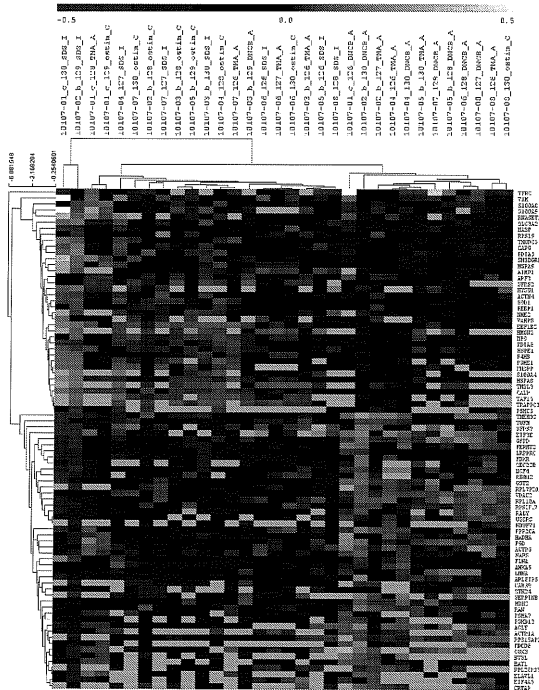
Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, Vogl T, Roth J (2009). The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. J Leukoc Biol. 86(3):557-66.

40

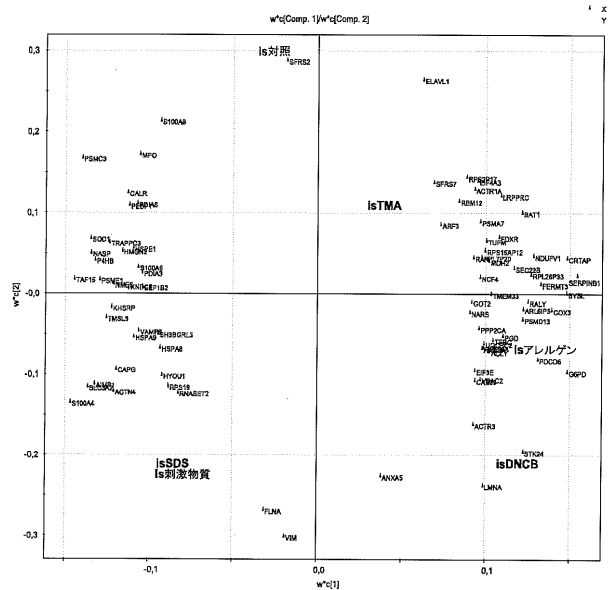
Martin SF, Dudda JC, Bachtanian E, Lembo A, Liller S, Dürr C, Heimesaat MM, Bereswill S, Fejer G, Vassileva R, Jakob T, Freudenberg N, Termeer CC, Johnner C, Galanos C, Freudenberg MA (2008). Toll-like receptor and IL-12 signaling control

susceptibility to contact hypersensitivity. J Exp Med. 2008; 205(9):2151-62.

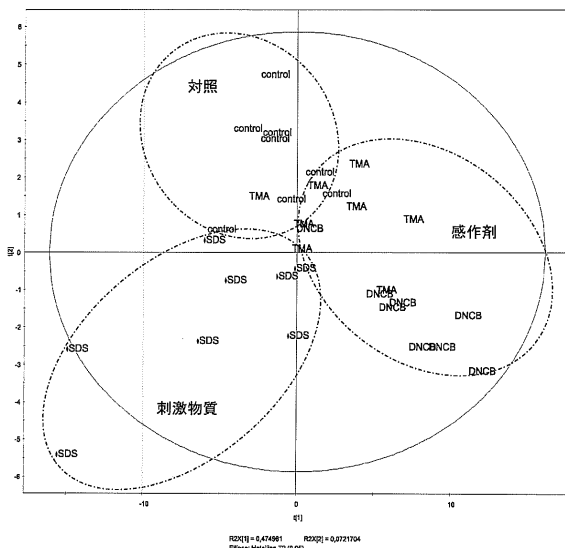
【図 1】



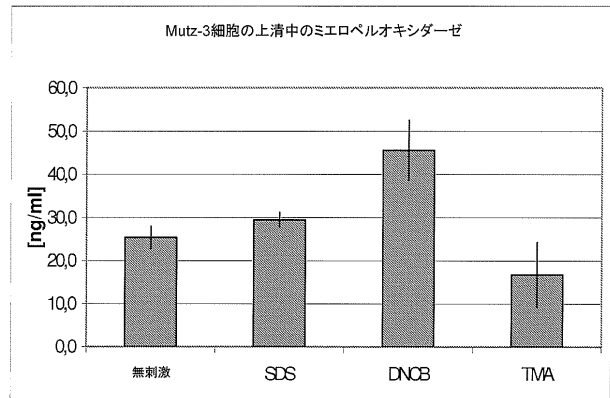
【図 2】



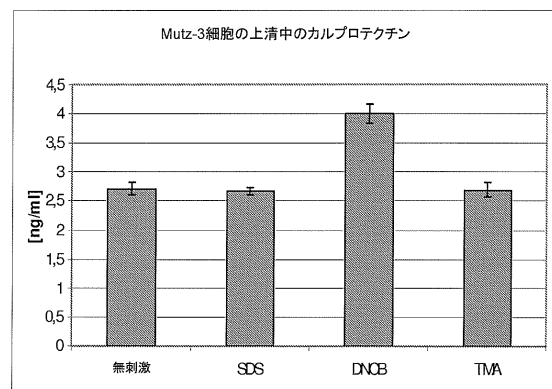
【図 3】



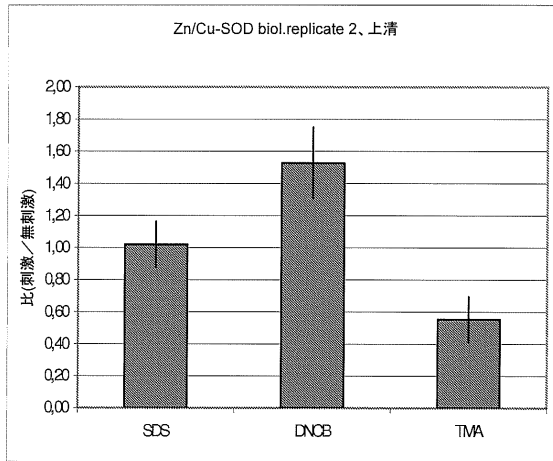
【図 4】



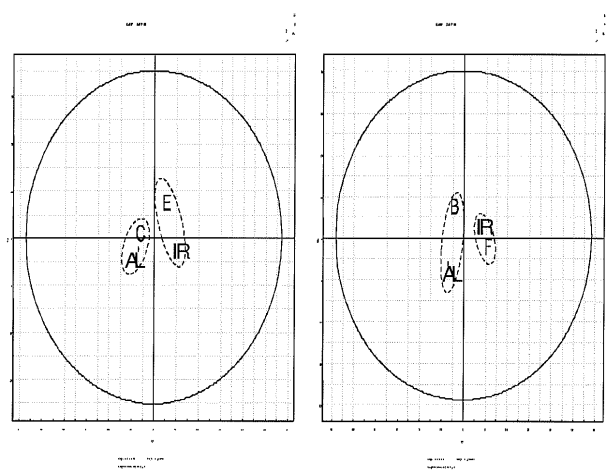
【図 5】



【 図 6 】

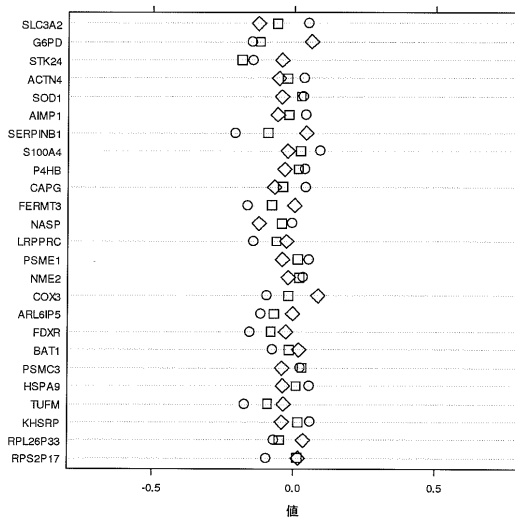


【 図 7 】



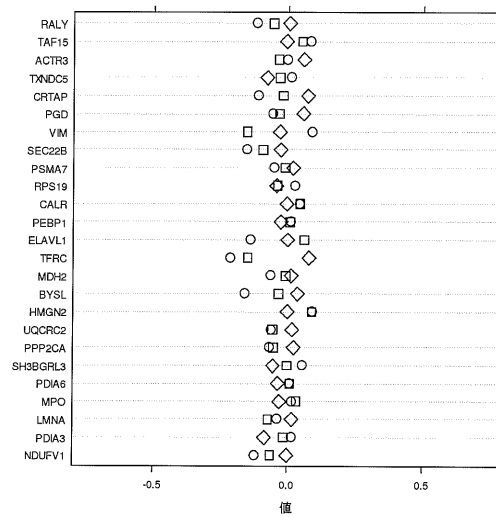
【 図 8 - 1 】

A)



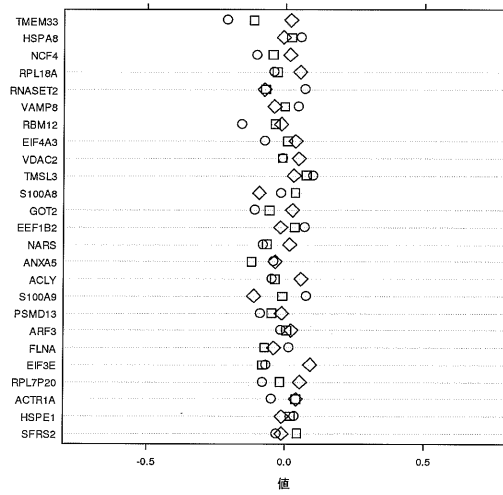
【 図 8 - 2 】

B)

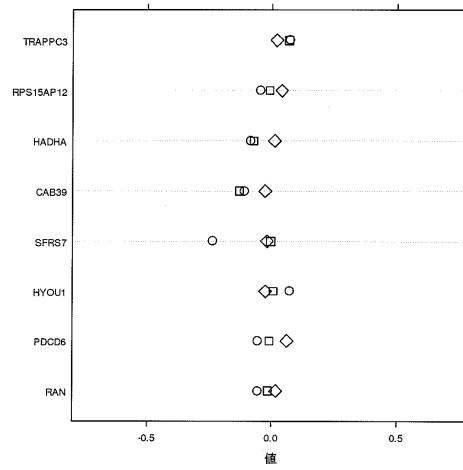


【図 8 - 3】

c)

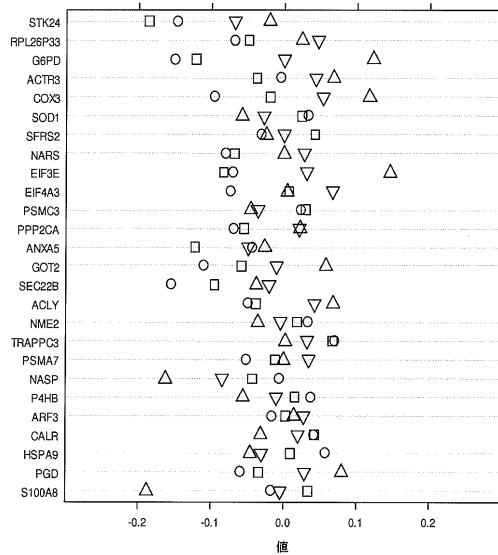


【図 8 - 4】



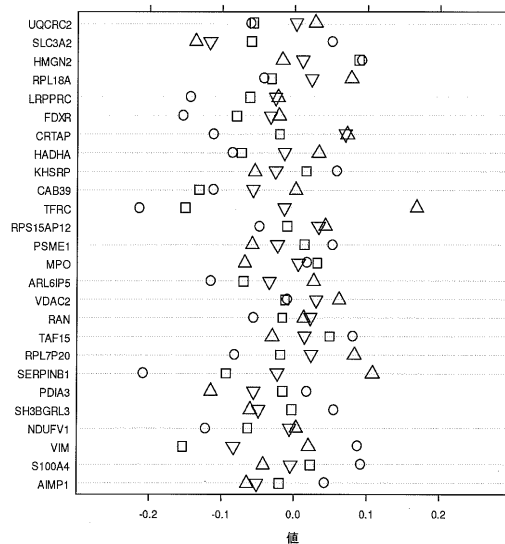
【図 9 - 1】

A)



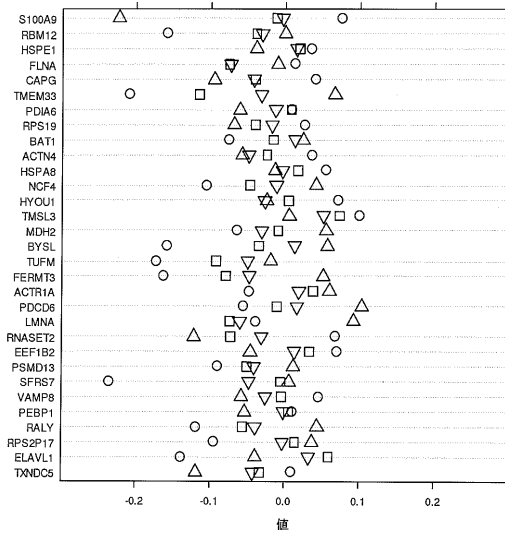
【図 9 - 2】

B)



【図 9 - 3】

C)



【図 10 - 1】

表 4

No	アミノ酸配列
1	>ipi IPI000219525 IPI000219525.10 6-PHOSPHOGLUCONATE DEHYDROGENASE, DECARBOXYLATING, MAQADIALIGLAVMGQNLINMNDHGFVVCANRTVSKVDPLANEAKGTQVVAQSLKE MVSKLKKPRRIILVLLKAGQAVDDFIEKLVPPLDTGDIIDGGNSVEYRDTTRCRDLKAG ILFVGSGVSGGEGGARYGSPMLPGNKEAWPHIKTIFQGIAGVGTGPECCDWVDEGAG HFVVMVHNGIEYGDMLICEAYHLMKDVLMQAQDEMAQAFEDWNKTELDSELEITANIL KFQDITGKHLPLKIRDSAGQKGTGKWTASALEYGVPTLIGEAVPARCLSSLDKDERIQAS SKKLKGPKQFQDGDKKSFLIEDIRKALYASKIISYAQGFMLLRQAATFEGWTNLNYGGIAL MWRGGCIIRSVFLGKIKDAFDRNPQLNLLDDPFKSAVNCQDSWRRAVSTGVQAGIPM PCFTTALSFYDGRHEMLPASLIQAQRDYFGAHTYELLAKPGQPIHTNWTGHHGTVSSSS YNA
2	>ipi IPI00007244 IPI00007244.1 ISOFORM H17 OF MYELOPEROXIDASE. MGVPFFSSLRMCVLDGPGWAGGLTAEMKLLALAGLAILATPQSEGAAPAVLGEVDTS LVLSSMEEAKQLVDKAYKERRESIRQLRSGSASPMELLSYFQKQVAAATRAVRAADYLH VALDLLEKRLSLWRFRFNVDTVLTPAQLNVLSSKSGCAYQDVGTCTPEQDKYRTITGMC NNRRSPTLGASNRFAVRWMLFAEYEDGFSLPYGTWPGVGRNGFVGLARAVSNEIVRFPD QLTPOQERSLMFMQWGLLDHDLDTPEPARASFTVGVNCTSCVQQPFCPIKIPND FRKMQADIFPFRSCPACPGSNITIRNOIALITSPVDASVNGFSEELARLNRMSQQL GLAVNQRFQDNGRALLPFDNLHDDPCLLTNRGARIPCLAGDTRSEMPLELTSMHTLL REHNRALATELSLNPWRDGERLYQEPARKIVGAVQIITYRDYLPVLGPTAMRKYLPTYS SYNDSDPRIANVTFNAFRYGHLLIQPFMERLDRNYQPMENPRVPLSRVFFASMRVYLE GGIDPILRGLMATPAKLNRQNIQAVDEIRERLEFQVMRIGLDLPAIMNQRSDHGLPGYN AWRFPGLPOFETVQGLGTVLRLNLKARKLMEQYGIPIINIDIMWGGVSEPLKRRGRVGPL LACIIGTQFRKLDGRDFWNEGVFSMQQRQALAQISLPRICDNTGITTVSKNNIFMS NSYPRDFVNCSTLPAALNASWREAS
3	>ipi IPI00004865 IPI00004865.1 ISOFORM 1 OF HEAT SHOCK COGNATE 71 KDA PROTEIN. MSKGPVAGIDLTGTYSCVGVGHGKVEIANDQGNRTTPSYVAFDTERLIGDAKNQVA MNPTNTVFDAKRLIGRRFDDAVQSDMKHWPVMVNDAGRPKVQVGEYKGETSFYEEVS SMVLTKMKEIAEAYLGKTVNAVTVPAYFNDQSQRAQKAGTIAGLNLVRLINFEPTAA IYAGLDKKGVAERNVILFDLGGTFDVSILITIEDGIEPVKSTAGDTLHGEGDFDNRMVNH FIAEFKRKKHKDISENKRVRRLRTACERAKRLSSSTQASIEDSLYEDGIDPYTSITRA RFEELNADLFRGTLOPVEKALDAKLDKQIHDIVLVGSGSTRIPKIQKLLQDFNGKLEL KSINPDEAVYGAQAAILSGDKSENQDQLLDLVDTPSLSGIETAGGVMTVLKRNITTI PTKQITFTTYSNDQFGLVQYVEGERAMIKDNNLLGRFELIGPAPRGPVQIEVTDI DANGILNVSAVDKSTGKKNKTTINDKGRLSKEDTERVQAEKRYKAEQDKRQVSKN SLSSVAPNMKATVDEKILCKINDEKQKILLDKCNEIINWLDKQNTAKEEPEHQKLE RVCNEPITKLQVAGSGMPGMPGPGGPGGASPGSSGPTIEBVD
4	>ipi IPI00180240 IPI00180240.2 THYMOSIN BETA-4-LIKE PROTEIN 3. MSDKPMMAIEKFKDKPKLKKTEQEKNLPSKETIEQEKQAGES
5	>ipi IPI00024145 IPI00024145.2 ISOFORM 2 OF VOLTAGE-DEPENDENT ANION-SELECTIVE CHANNEL PROTEIN 2. MCIPSSYADLGAARDIFNKGFGFLVKLDVTKSCSGVEFSSTGSSNTDTGKVTGLET KYKWCVEYGLTFTEKWNITDNLGTEIAIEDQICQGLKLTFTDTPSPNTGKSGIKSSYKR ECINLGDVDVDFAGPAIGHSAVFYEGWLAGYQMTFDSAKSLTRNNFAVGRTGDFQL HTNVNDGTEFGGSIYQKVCEDLTSVNLAWTSGTNCRTFGIAKYQLDPTASIAKVNNS SLIGVGTQTLRPGVKLTLSALVDGKSLNAGSHVGLALELA

【図 10 - 2】

6	>ipi IPI00007047 IPI00007047.1 PROTEIN S100-A8. MLTELEGRALNSIDVYHYSYLRGNFHAVYRDLKLLTECPQYIRKKAGDVFVKELDI NTDGAVNPQEFILVIMKMGAAHKKSHHESHKH
7	>ipi IPI00027462 IPI00027462.1 PROTEIN S100-A9. MTRCMSQLERNIETINTTHQYSVKLGHDPDLNQGEEKELVRDLQNLFLAKENKNEKVIE HIMEDLDTNADKQLSFEETIMLARLTWASHHERMHEGDEGPGHHKPLGEGGTP
8	>ipi IPI00007188 IPI00007188.6 ADP/ATP TRANSLOCASE 2. MTDAAVSFAKDFLAGVAAASIKTAVAPIERVKLLQVQHASKQITADKQYKGIIDCVVR IPKEQGVLSFWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKQYKQIFLGGVDKRTQFWLYFAGNLAS GAAGATSLCFVYPLDFARTLAADVGAERERGLGDCLVIKYKSDGILKGLYQGFNVV VQGIILYRAAYFGIYDTAKGMLPDKPNTHIIVSMIAQTVTAVAGLTSYPPDITVRRMM QSGRKGDTIMYTGILDCWRKRIADDEGGAFFKGAWSNVLRCMGGAFFVLVLYDEIKRYT
9	>ipi IPI00217465 IPI00217465.5 HISTONE H1.2. MSETAPAAPAAPAEKAPVKKAAKAGGTGPKKASGPPVSELTITKAAVASKERSGVSLA ALKKAALAAQYDVENNRSRIKLGLKSLVSKGTIVGTGTGASGSGFLNKRKAASGEAKPKV KKAOGTKPKFVGAAPKPKKAAGATPKSAKRTPKKAKKPAATITVKKVASKPKAKVA KPKKAAKSAKAVKPKAKPKVKKPKKAAKPKK
10	>ipi IPI00419585 IPI00419585.9 PEPTIDYL-PROLYL CIS-TRANS ISOMERASE A. MVNPTVFDDIADVGEPLGRVSPFLPADKVPKTAENFRALSTGEGFGYKSGCFHRIIPGF MCQGGDFTRHNTGCKSISYGEKFEDEFNLKHTGPGILSMANAGPNTNGSQFFICTAKTE WLDGKHVVFGKVKMGMINVEAMERFGSRNGKTSKTIITADCGQL
11	>ipi IPI00216071 IPI00216071.4 EOSINOPHIL LYSOPHOSPHOLIPASE. MSLLPVYTEAASLSTGTVTIKGRPLACFLNBPYLVQVDFHTMKRESDIVVFHQVCFGR RVVMSREYGAQWQVESKNMPPQDQGEFELSISVLPDKYQVMNVGQSSYTFDHRKPEA VKMVQVRDISLTKFNVSYLKR
12	>ipi IPI00744692 IPI00744692.1 TRANSALDOLASE. MSSEFVKQRMESALDQLQETTVIADTGPFAIDVEYKQDATTNPSLILAAQMPAYQE LVVEAAYGRKLGGSEDDIKNAIDKIFVLFGAEILKIPRVSSTVEDARLSFODKADVA RARRLILEYKAGISKRDLIKLSSTWEGIQAGKELEBQGHICNNMLLFSFAQAVACAE AGVTLISPFVGRILMDHVAINDKKYEPLEDPDGKSVKTRINYNYKFKSYKTIVMGASFRN TGEIKALAGCDFLTISPKLIGELLQDNALVPVLAKAAQASDLEKIHLDKESFRWLHNE DQMAVEKLSGDIRKFAADAVKLERMLTERMFNAENGK
13	>ipi IPI00018534 IPI00018534.4 HISTONE H2B TYPE 1-L. MPFLAKSAPAPKPKGSKKAVTKAOKKDGKRRKRSREYSYVYKVLKQVHPOTGISSKAM GIMNSFVNDIFERIASERLAHYNNKSTITSREIQTAVRLLLPGLAKHAVSEGTAKVT KYTSSK
14	>ipi IPI00027165 IPI00027165.3 ISOFORM R-TYPE OF PYRUVATE KINASE ISOZYME3 R/L. MSIQENISSQLRSWKSQRDLAKSLILGAPGGPAGYLRRASVAQLTQELGTAFQOQQ LPAAAMDTFLEHLCLLDIDSPVAASTSIATIGPASPVERLEKEMIKAMNIRALNFS HGSHEYHAESIANVREAVESFAGSLSYRFPVALDITKGPETRTIGLQGGPESEVELVKG SOVLVTVDFAPFTRNGANTVWVDYNIIVRVVPVGGRIYIDGGLISLVQKIGPEGLVTOV ENGVVLGSRKGVNLPGAQVDLPGLSEQVDRDLRFGEVHGVDIVFASPVKASDVAAVRAA LGPEGHGIKIISKINHEGKRFDEILEVSDGIMVARGDLGIEIPAKEYVLAQKMMIGRC NLAGKPVVCAQTMLESMTIKPRPTRAETSVDANAVLDGADCLMSGETAKGNFPEAVKM QHAIAREAEAAVYHQLFEEELRAAPLSDPTVEVTAIGAVEAAPKCAAAITVLTTTGS QALLSRYRPAAVIAVTRSAQAARQVHLRCGVFPLLYREPPPEAIWADDVDRVQFIEGSG KLRGFLRVGLDVLVVTGWKPGSGYINIMRWLSIS

【図 10 - 3】

15	>ipi IPI00007750 IPI00007750.1 TUBULIN ALPHA-4A CHAIN. MREGISVHVQAGVQMGNAWELCYLEHGTPDQGMPSDKTIQGGDSFTTFCETGAGK HVPRAVVDLEPTVIDEIRNGPYQLFHEPQLITGKEADANNYARGHTYIGKEIIDPVL DRIKLSDOCTGLQGLVHFHSGGGTSGFTSLMERLSDVYQKSKSLFISYAPQVSTA VVEPYNISILTTHTLHSDCAFVMDNEAIYDICRNRDLIERPTTYMLNRIISOVSITA SLRFDGALNVDTLETQNLVNPYPRIFHFLATYAPVISAEKAYHEQLSVABITNACFEFAN QMVKCDPRHGYMAACCLLYRGDVPVKDVNAIAIKTRKSIQFVDWQTFKGVGINQYPP TVVPGDGLAKVRQAVMLSNNTATAEAWARLDHFKFLMAYAKRAFVWVVGEGMEGEFSE AREDDMALEKDEYEEVGISDEDEDEGE
16	>ipi IPI00216008 IPI00216008.4 ISOFORM LONG OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE 1-DEHYDROGENASE. MASQVALSRITQVCGILREELFGQDAFHQSDTHIFIMASGDLAKKIYPTIWWLFRDGL LPENFTFVGYARSRLVALIRKQSEFPKATPEKILKLEDDFARNSVAGQYDPAASVYQR LNSHMLALHSGQANRLYALPPTTYVEAVTKNTHESCMSQIGNNRIYKPFGRDLQSS DRLSNHISLFPREDQIYRIHDYLGKEMVQNLMLVRFANRIFGPIWNRONITACVILTFKEP FGTEGRGGYDFEFGIIRGPGRGQSGSGSECSLSLGLSVWGPALPEPGQGLRRLAAS VPRDVMQNHLLQMLCLVAMEKPASTNSDDVDEKVKVLCICEVQANNVVLQGVGNPDG EGEATKGYLDODTVPFGSTTATFAAVLVYENERWDGVPFIRCGKALNERKAEVRLQFH DVAGDIFHQCKRNLVIRVQPNNAVYTKMMTKKPGMFNPPESELDLTYGNYKNVLF DAYERLLDVFQSGSMHFVRSDELREAVRIPTLLHQLELEKPKPIPIYISGRGPTADE LMKRVGQYEGTYKWNPHKL
17	>ipi IPI00002212 IPI00002212.1 ISOFORM B OF SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE 24. MDSRAQLMGLANKRATLPHFGGSLNKAADPELTFTLEKIKGSGCEVFQKIDNRQK VVAIKIDLEAEAEIEIDQIETTLVSGQDSPPYIKYSGYLKDTKLWIMEXLGGSSAL DLEPQGLDETQIATILREILKGLDYLSEKKIHRDIKAANVLLSEHGEVKLADFGVAGL LDTQIKRNTFVGTFFWMAPEVIKQSAYDSKADVLSGITAELARGEPPHSEHLMKFL FLIPKNNPTLEGNYSKPLKEFVEACLNKPSFRPTAKELLKHKHTILRNKAKTSYLTLEI DRYKRWKAEQSHDDSSSESDSAETDQASGSDSGDWIPTIREKDPKMLGALQPSDLD RNMKMDIKPRFPSCQSLSTISPLFAELKEKSGAQCGNLGSEIEELGAILAEAEPCGISD TMVAQLVQRLQRYLSLGGGTS
18	>ipi IPI00218733 IPI00218733.6 SUPEROXIDE DISMUTASE [CU-ZN]. MATRAVCVLKGDGPVQGIINFEQKESNGPVKVGSGIKGLEGLGHVHVEHFGDNTAGTS AGPHFNPLSRKHGPGKDEERHVGDLGNVADKDGADVADSDVSDVLSGSDHCIIIGRLTVV HEKADDLGKQNESSTKTNAGSRLAGSVIGAQ
19	>ipi IPI00654820 IPI00654820.2 ATP SYNTHASE F0 SUBUNIT 6. MNENLFASTFIAPTILGPAVAILLPPPLIPTSKYLSNNLRIITQOWILKLSKOMMTM HNTKGRVSLMLVSLIIFIAITNLLGLLPSYFTPTTQSLSMNLAMAPLWAGAVIMGRSK IKNALAHFLPGQTPPLPMLVITETISLLIQPMALVRLTANITAGHLLMHLIGSATLA MSTINLPSTLIIFTILILILLTILEIAVALIQAVALTLLVSLVLTQWNTQWNTNMPIM

【図 10 - 4】

20	>ipi IP100027270 IP100027270.1 60S RIBOSOMAL PROTEIN L26. MKFNPFVTSRDSKRRHRFNAPSHIRKRMSSPLSKELRQKYNVRSMPIRKDDVQVVRG HYKQQQIGKVYQVVRKVVYIERRQVRKANGTVVHVGHPKRVVITRLKLDKRRKILAE RKAARSQVGKEGKGYKEETIEKMQE
21	>ipi IP100028091 IP100028091.3 ACTIN-RELATED PROTEIN 3. MAGRLPACVCGDGTGKLYAGANTPEQFIPSCIAIKESAKVGDQAQRVMVGVDLDF FGDGEAEKPTATKWPFRHGIWEDWDLERFMEQVIPKYLAEPEDHDTLLTEPPLNTIP EAREYTAEMFESFNWPCGLYIAQVALLAASMTSRQVCEIATLGTVIDSGDQVTEHVPV AEGVIGSCIKHIPIAGSDITVYFQQLLRKREGVIPPEOSLETAHAKVARYSVYCPDLVK EFNKYDTGSKWIKQVTGINAISKEPFSIDVGYERFLGPEIFHPEFANPOPTQPISEVV DEVIONCPIDVRRPLVKNIVLGGSTMFDRFGRRQLRDLKRTVDARLKLSELSGGRLKP KPIDVQVITHHMORYAVWFGGSLASTPEFYQVCHTKDYBEIGPSICRHNPFVGMS
22	>ipi IP100306960 IP100306960.3 ASPARAGINYL-TRNA SYNTHETASE, CYTOPLASMIC. MVLAEIYVSDREGSDATGDGTEKPEKFTGLKALMTVKGPEPPTIYVDSQKENERNWNISK SOLKNIKMMHWEQMSSEKREKAEDSLRREKNLEAAKITIKNDPSLPEPKCVKIGAL EGYRGQVRKVGWVHRLRQGNLMLVLVRDGTGYLQVLADELCCQYNGVLLSTESSVA VYGMNLNLPFGKQAFQGGHLSCDFWELIGLAPAGADNLINEESDVGDLNRRHMRIGE NWSKILKARSWTRCFRHFHFDGRTYEVPTTTLVQIVGEGGATLFLKLDYFGEAFLTQSS QLYLETCPLALGDFVIAQSYRAQSRTRHAEITVIEACFPPLTDDLLNRLEDLVCD VVDRILKSPAGSVHELNNFNPQPKPRFKKNVYSDAIVWLKEDHVKKEDGTTFYFEGEDIP EAPERLMTDITNEPILLCRFPEVKSYPMQRCPEOSRLTESVQVLMNVNVEIGVGGSRIF DSEIILAGYKREGIDTFYVYVWTKYGTCPHGQYGLGLERFLTWILMYHRDWCPLY RFVQRCPT
23	>ipi IP100013068 IP100013068.1 EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 3 SUBUNIT E. MAEYDLTRIAHFLDRHLVPELLEFLSVKEIYNEKELLQGLKDLLSDTNMVFAMDVYKN LYSDDIPHALREKRTTVVAAQLKQLAETEPYKMFEDPETTRQMOSYTRDGRMLFDYLADK HGFRQBYLDLTRYAKRFQYEGCNGYSGAAYSYLYFFRVLVPAVDNRNALSSLWGKLASEILMQ NWDAAEMDLTRIEKTLIDNNSVSPQLSQGRTWLHWSLFFVFNHFKGRDNIIIDLFLYQP QYLNATIQMCPHILRLVLTAVITNKRQVNRKVLKDLVIVLQYVYKPDITETFEVCLY VNFDFDGAQKRLKECESVLDVDFIACLEDITMARLPIETFCRIHQICISINLADKLL NMTPEEAERWIVNLRNARLDAKISDGLKGVHVMGNNAVSPYQVIERKSLSPRSQMLAM NIEKKLNQNSRSEAPNMAQDSGFY
24	>ipi IP100009328 IP100009328.4 EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4A-III. MATTATMATSGSARKRLKEEDMTKVFETSEEVDPITFDTMGLREDLLRGIYAYGFEK PSATQORAIQIKIGRDPVIAQSQSGTGKTATFSISVLQCLDIQVRETQALILAPTRERLAV QIQKGLLALGDYMNVCQCHACIGTVNGEDIRKLDYQGVHVAQGRVDMIRRRSLRTRA IRLMVLDEADEMLNKGKEQIYDVRVLPPEATQVLLISATLPHETLEMTNKRPMFDPIRIL VKRDELTLEIKQFVAVREKPFDDLDYDITLITQAVIFCMTKRKVDWLTKEKMEA NPTVSSMHGDMQPKERESIMKEFSGASVLIISTDVMARGLVQFVILLINTDLPNNRKL VYHRIGRSGYGRKGVAINFVKNDRIIRLDIIRIDQYQIODEMFMVADLI
25	>ipi IP100005978 IP100005978.8 SERINE/ARGININE-RICH SPLICING FACTOR 2. MSYGRPPPDVEGMSLKVNLTYRTPDTRLRVFYKRYGVGDVYIPDRDYTESRSGFAPV RFHDKRDADAMDAMDAGVLDGRELVRQMARYGRPPDHSRRGPPPRYGGGYGRRSR SPRRRRRSRSSRSRSRSSRSRYSRKSRSRTSRSSRSRSTSRSSARRSKSSSVSRSR SRSRSRSSRSPPPVSKRESKSSRSKSPKSPPEEGAVSS

【図 10 - 6】

31	>ipi IP100027444 IP100027444.1 LEUCOCYTE ELASTASE INHIBITOR. MEQLSSANTRFALDLFLALSENPNAGNIFISPSISANAMVFLGTRGNTAQLSKTTFH NVTVEEHSRFQSLNADNKRGAIFYFLKANLRYGKTYNLFPEFLVSQTKTYGADLASVD FQHASEDARKTINQWVGQTEGRIPELLASGMVDMITKLVLNVAIYFGKNWKKDFMKEAT TNAPFRLNKKDRKTKVMYQKFKAFYGIEDLCKRVLDEPYQGEELSMVILLDPDDTESNS TGLKKIEQQLTEKLHEWTKPENLDFIVENVSLPRFKLEESYTLNSDLARLQGVQDLFNSS KADLSGMSGARDIFISKIVHKSFEVNEEGTEAAATAAGIATFTCMLMPEENTADHPFLF FIRHNSSGSLFLGRFSSP
32	>ipi IP100027341 IP100027341.2 MACROPHAGE-CAPPING PROTEIN. MYTAIPOSQPPFGSVDQPLHVRWVRKELKPVVLAQNGQVFFSGOSTYLHNGQPEEVS H LHLWTGQSSRDQGCACAVLHVLNLTGERPQVHREVOGNESDLMSYFPRGLKYQGGG VESAFHKTSTGAPAAIKKLYOVKGNKTRATERALNWDSPNTGDCPILDLGQNIFAWCGG KSNILERNKARDLALATRSRQGAQVQVITVDGEEPAEMIQVLGPKPALKEGNEPEDTL ADKANAQAALYKVSADTGMNLTKVADSSFFALLESIDDCFVLNDGLCKGIYWKGRK ANEKERQAALQVAGFISRMQYAPNTQVILLPGHESPIFKQFFKDMK
33	>ipi IP100216699 IP100216699.1 ISOFORM 2 OF FERMITIN FAMILY HOMOLOG 3. MAGMKTASGDYIDSSWELRVFVGEEDPEASEVILRVGTGESHIGVLLKIVEQINRKQDWS DHAIIWQKQKQWLLQTHWTLDRYGLLADARLFFGQHRPVIYLRPNRRALRLRASFSQPL FOAVAAICRLLSIRHPEELSLLRAPERKEKKKEKEEPEELYDLRSKVLVLAGVAPALFRG HPAHSDQAQTEACVHMLSQPOPPDPLLQLRPLRPSLSDKTQLRSRWLDSKSLCMQGG IKAGDALWLRFKYSPFDLPKPTDPEVLTLQVDAQRWLLLEIDICEEMFVAALQYH INKLSQSGVEGEPAGTDQGLDLDVALSNLKVLEGSAPTDVLOSLLTIPELKDHLRIFR PRKLLTKGYRQHWVVFKEITLISYKSGQDAPGDPICQNLKKGCEVVPDVAVSGQKFCIKL LVSPGEMSEIYLRQDQDEQYKARWAGCLASKRGMTADSSYSEVQAILAPLSLQRTGS GPGPNHPHGDASADGLNLYGLVAFRQRKFKAKQLTPRILEAHQNVQALSLAEAQLRFTI QAWQSLPDFGISYVMVRFKSKRDELDIGLIANNRLIRILDVAGDVVKTWRFNMQRQNVN DIRQVAIEFDEHINVAFSCVSAASCRIVHEIYGGVYFLSTRERAGEELDEDLFLQLTGGH EAF
34	>ipi IP100010796 IP100010796.1 PROTEIN DISULFIDE-ISOMERASE. MLRRALICLVAALVRADPEEDHVLVLRKSNFAGALAAHKYLLVYFAPWCGHCKKALA PEYAKAAGKLKAGSEIRLAKVDAESDLAQVQYVLTIFRFGDTSAPREYTAAT EADDIVNWLKRRTPAATLPDGAASALVSSSEVAVIGFFKDVSDSARQFLOAAEAID DIPFGITSNDSVFSKYQDKDQVLFKFGDEGRNNEGEVTKENLLDIKHNKLLPVIEF TEQAPKIFGGEIKTHILLFLPKFSVDYDGLKSNFKTAESFKGKILFIFIDSHDNDQR LIEFFGLKKECEPAVRLITLEEEMTKYKPESEELTAERITFCRFLRGLKIKPHLMSGL PEDWDQKPVVLVGNKFDVADDEKKNVVFVEFYAPWCCHQCKLAPIDWKLGETYKDHENI VIKAMDSTANEVAKVRSFPLKFFPKASADRTVIDYNGERTLOGFKLGEISGGQDQAGD DDDLEDELEAEFPMDEDDQKAVKDEL

【図 10 - 5】

26	>ipi IP100003377 IP100003377.1 ISOFORM 1 OF SERINE/ARGININE-RICH SPLICING FACTOR 7. MSRYGRYGGETKVYVGNLGTGAGKGLERAFSYYGPLRTVMIARNPPGFAVFEDPRDA EDVAVRLDGLKVICGSRVVELSTGMPRRSRFRDPPARPPFDNDRCYEGCKGKHVAYDCH RYSRRRRSRSSRSRSHSRGRGRRYSRGRSRGRSRGRSRSPRSPRSI SLRRSSASLRSR SSGIKGSRVYQSPSRSSRSRISRPSSRSRSPSPKRSRSPSGQSPSRSPASPERMD
27	>ipi IP100027493 IP100027493.1 ISOFORM 2 OF 4F2 CELL-SURFACE ANTIGEN HEAVY CHAIN. MSODTEVDKVELNELPEKQPMNAASGAAMSLAGAKNGLVKIKVAEDEAEEAAAAPF TGLSKEELLKVGSGPGWVRTRWALLLLFWLQWLMQACAVIVIVRAPRCRELPAQKRWHT GALTLYIGDLQAFQGHGAGNLAGLKGRLDYLSLKVGLVLGPHKNNQKQDVAQTDLLQID PNFSGKEDPDSLLQSAKKKSIRVILDLTPYRGENGWFSQVDTVATKVDALFELWQAG VDGQVDRIDENLKASSFLAEQWQNTKGFSEDRLLIAGTNSDQLLSLSEKNDLMLLT SSYLSDSGSGTGEHTKSLVTQYLNATGNRWCSWSLSQARLLTSFLPAQLRLYLQKMLTLP GTPVFSYGDIEGLDAAALPGQMEAPVLMDESSFPDIPGAVSANMTVKGSGQSDPGLLS LFRRLSDQSRKSRSLHGDGHAFSAGGPLFSYIRHWDQNERFLVVLNPFQDGLSAGLQAS DLPASASLPAKADLLSTQPGREEGSPLELERLKLPEHGLLRFPPYAA
28	>ipi IP100014808 IP100014808.1 ALPHA-ACTININ-4. NUDYHAAQSYIQGFSAGNAGGGGSGMDYMAQDDDDRDLLDPAWEKQQRKTFITANC NDLHRKAQTQIENIDEDFDGLKMLLLEVISGERLKPFGKRMVHKINNVKALDFTA SKGVKLVSIGAEIVDGNAKMTLGMITWILLRFAIDIOSVEETSAGEKLLWCKQRTAFY KNNVQNPHFSWKDGLAFNALIHRHPELIEYDKLRKDDPVTNLNNAFEVAKYI.DIPKM LDAEDINTARPEKAIMTVSSFYHAFSGAKAETAANRICKLAVNQEHEHLMDEYK LASDLEWIRRTIPWLEDRVPQKTIQEMQKQLEDYDFRRVHFKPQVQEKQCLEINTFTL QTKRLSNRPAFMPSEGRMVSIDINNGWHLQEAQEGYEWLLNEIRRLERLDHLAEKFRQ KASIEHAEWTDGKEAMLKHROYDETATLSIDIKALIRKHEAFESDLAAHQDEVQETAAIAQSL NELDYDSDHNVNTRQCKICQWDALGSLTHSRREALKTEKTELEAIDQLHLEYAKRAAFP NNWMEASAMELDQDMFIVHTTIEIEGLISAHDQKSTLPADDEREALIAIHKEAQRIAS NIKRLSGSNPTTIVTQIINSKWEKQVGLVPARDHALLLEEQSKSQSNEHLRRQFASQAMV VQGVWLTQKMEIGKRSISEMMGTLEDQLSHLQYERSIVDYKPNLLDLQOHLQEAQLI DKNHTNYTMEHTRVGMQGLTTIARTINEVENQILTRADAKISOEQMOQEPASFNFHDKD HGALGPEEFKACILSLGQVDVENDRQGEAFNRNMSLVDPNHSGLVTPQAPIDPMSETTT DTDADQVIAFSKVLAGDKNFIATAEELRRELPPDQAEYCIARMAPYQGPDAVGAALDYS FSTALYGESDL
29	>ipi IP100006252 IP100006252.3 AMINOACYL TRNA SYNTHASE COMPLEX-INTERACTING MULTIFUNCTIONAL PROTEIN 1. MANNDVAVLRLEKQGAEDQIIEYLKQVVSLLKEKAILQATLEREKKLRVENAKLKKEIE ELKQELIQAEIQNGVQKIPFSPSGTPLHANSMVSENVQSTAVTTVSSGKQKQKGGTGE KKAKEIKIEGGEKKEKQIAGSADSPIDVSRDLDRIGCIITARKHKGVLDEEVEDV VGEIAPRTVYSGVIVNVPLEQMKRRVILLCNLCKPARKMGLVSOAMVWCASSPEKTEILA FPNCSVPGDRIITFDAPFCEPDKELNPKKRIWEOIQLDHTNECVATYGVFPFVKGQGV CRAQTMSSNGIK
30	>ipi IP100032313 IP100032313.1 PROTEIN S100-A4. MACPLEKALDMVMSFTFKYSKGEKDFKLNKSELKELLTRELPSFLGKRTDEAFAQKLS NLDSDNRDNEVDFOQYCVFLSCIAMMCEFFEGFPDKQPRKK

【図 10 - 7】

35	>ipi IP100783271 IP100783271.1 LEUCINE-RICH PFR MOTIF-CONTAINING PROTEIN, MITOCHONDRIAL. MAALLRSARWLRLAGAAPRLPLSLRLPGPGKRLHAASLYPARAGPVAGGLSPARLYA IAAEKEDIQEESTSSRRKISNQFDWALMRDLVSRRTRGRIPKLLQKVFNCTDRCSSGLG SHALLLRLSCGSLIPELKLEERTFAHRIWDTLQKLGAVDYDSHNSALLKVYLQNEYKFS PTDPLAKMEANIQPNRVTYQRLIASYCNVGDIGSAGKILGFMTKDLPLTEAVFSALVT GHARAGDMENANILTVMRDAGIEPQDPTLALLNAYAEKGDIDHVKTQLEKVEKSELH MDRLDLQIIFSFSGKAGYQYVSEILEKVTICERRYIPDAMNILLVLVTEKLEQVALQILLA CPVSKEDGSPVFGSFFLQHCVTMTPTVEKLTIDYCKKLEKVEQMSFFLQTLTHCALLANKT DLAKALMKAVKEEGFFIRPHYFWLVLVGRKRRKENVGQIIEILKMQEELGVHPQDETYYDY VTPCPDSVNSAAILQENGLCDSDDMFQAGLRSEAAANGNLFVLSKNTLPISTQSI RGSLLLCFRSMNMLNWSIEILLKYKGRVCOEPRGTEAVGVFLYNLSDMSDESVQAK EHLRQYFHLQELKMNKVPENITRYGIRNLNLSYHVPVELIKDHLVSNMNDTQKTVOLT SELESTLETLKAEQNPIDRVLKQILVLCSENMMSQKALEKAYESDMVTKQALAINL CCRHDKVEDALNLKEEFDRLDSSAVLDTGKYVGLVRLVLAHKGKQDAINILKEMKEKDVIL IKDITALLSFHMLNGAALRGEITVKQLHEAVITLGLAEPSTNISFPLTVHLEKGDLSL ALEVAIDCYEKYKVLPRTHDVLCKLVEKGETDLIQKAMDFVSQEGQEMVMYDLFFAPLQ TGNKYEAKKIIEETPGIRARSARLQWCDRCVANNQVETLEKVELTQKLFECDDRCQMYN LKLYKINGDQWADAVWNKIQEENVIPREKTLRLALEILREGNQEVFPDVPPELWYDEDEK HSLNSSASSTIEPQFQKDILACRLNQRKGAYDIFLNAREQNVFNNAETYSNLIKLMLSE DYTQAMEVKAFASTHIGKFTLNDANASRLIITVQVRDYKREAVTTIKTVLDQQQDTPSRL AVTRVQALAMQGOVENTEVQWMALEDGSLGNMFTLNNIATAGIQRNNIDAAETEN ENMLTSENKVIPEQYGLAYLFRKVIIEQLEFARVETISINERLANVATYKVEVTFPIQ LYDAGVDDARALLQRCGAIAEQPTILLFLNLSRQKQKASTVKSVEVILPELANKEEA YNSLMKSYVSEKDVTSARALYHLLTAKNKLDDLFLKRYASLKYVGEVPPTEPESFE FYAQQLKRLRENS
36	>ipi IP100179953 IP100179953.2 ISOFORM 1 OF NUCLEAR AUTOANTIGENIC SPERM PROTEIN. MAMESTATAAVALVSAKIEDVPAPSTADRVESLDVDSKAKLLGLGQKHLVMDIP AAVNAFQEAASLGLKGYGETANECGEAFFYQKSLLELARMENGLVGNALGVHVEEERG EKTEDSELVENNDNIDEAREELREQVVDAMGEKEAKRTEDKSLAKPTEKQDQDSMEK GRDEMDISKAABDFQEKVOLLDWLTSSEAKGGAAPGPNBNAEYTSGGKFPQSDPAE EKSYSCTDQVEERKESQGEVIVSIEEKFPEVSEBOPVTLKEGCAVFAEASL DTPKVPDVGDEPEEKVITSENEAGKAVLLBQLVQGEVPPAESEPTVTEAASAVEAG SEVSEKPGQEAFLPKDGAVNGFSVVGQDPTIEPQTSIERLTETKDSGLSEERKAVLKP SQEETKLSVEESAAGDGVTKVAQATEKSPDKVQIAANEOTEQREOMKMEGETEGS EEDDKNDKTEEMPNDVLENKSLQNEEBEIEGNLELAWMLDAKIFIKRQETKRAQLY AAQHLKLGEVSVESENQVAVEFQSCINLQEQYLEAHDRLAETHYQLEGLAYGNSQY DEAVAQFSKSEIENRMAVLNEQVKEAGSSAEYKKEIEBELKELLPETREKIDEAKESQ RSGNVAELAKATLVESSTSGFTPGGGGSSVSMISARKPTDAGSSSNCTDISHLVKKR KPEESPKDKDAKKAQEPVNGSGDAVPSGNEVENMEEEAENQAESRAAVEGTVEAG AIVESTAC
37	>ipi IP100479722 IP100479722.2 PROTEASOME ACTIVATOR COMPLEX SUBUNIT 1. MAMLRVQPEAKVQVDFREDLCTKENLGSYPKKIISELOAFLEKAPALNANLNLKAP LDIPVDPVEKEKEERKQKQEKEDKDEKKGDEDEKGGPPCQVNCNEKIVVLLQRLKPE IKDVIQNLNLVTLQLQIFRITEDGNNGFVAVQEKVELMSTLTKLEGHQITISKYFSE RGDVITKAQPHVGDYRQLVHDEAEYDIRLMVMEIRNAVAVYDILIKNFKELKLP RGETKMGY

【 図 1 0 - 9 】

[illegible][illegible]

【 図 1 0 - 1 1 】

[illegible][illegible]

【図 10 - 12】

59	>ipi IP100328987 IP100328987.3 BYSTIN. MPKFKAAARGVGQEKHAPLAQDLAGNAVVRGVRKRRGRGTGEAEEYVGPRLSRRLIQ QARQQEELAEAGHTGDKPAAPRETRTGRPMPOQDSDDEEWPTEKAAITMAAGHH AEVVDPEDEIRAEMPNKNPPARTLAOIIMKLETKQTEVETVMSVEVSGFPMQDLPDR VLEVYRGVREVLKSYRSGKLPKAFKIIPALSNWEGILYVTEPAWTAAMYQATRIFASN LKERMAQRVYNLVLFRVRDVAEYKRLNFHLMALKALKPKPAWFGKILPLCESGTC TLREAIIVGSIITKCSIPVLHSSAAMLKIAMHYSIGANSIFLRLLDKRYALPYRVLDAL VPHFLGFTKEKRELVFWHQCLLTIVQRKADLATDQKEALLLELLRLQHPQLSPERIRE LQSAVPRDVEDVEITYE
60	>ipi IP100291006 IP100291006.2 MALATE DEHYDROGENASE, MITOCHONDRIAL. MLSALARFASAAALRRSFSTSAONNAKVAVLGASGGIGQPLSLLLKNSPLVRLTYDIAH TPGVAADLSHETKAAYKYLGPQELPDCLKGCDDVVIPAGVPRKPGMTRDDLNTNATI VATLTAACQHCPEAMICVIANPVNSIPTATSVFKKHGVYNPNKIFGVTTLDIVRANTF VAELKGLDPARVNVFVIGAGHAKTIIPLSQCTPKVDFPQDQLTALTRIQAEGTEVVKKA KAGAGSATLSMAYAGARFVPLVDAMNGKEGVVCEVKSQETECTYFSTPLLLGKKGIE KMLGKGVSSFEKMIISDAIPELKASKKGEDEVKTKL
61	>ipi IP100217950 IP100217950.5 NON-HISTONE CHROMOSOMAL PROTEIN HMG-17. MPKKAEGDAGDKARVKEPQRRGARLGAAPKPPKPEPKPKKAPAKKGEKVPKGGKGA DAGKEGNNPAENGDAKTDQAQKAEAGADAK
62	>ipi IP100305483 IP100305483.1 CYTOCHROME B-C1 COMPLEX SUBUNIT 2, MITOCHONDRIAL. MKLLTRAGSFSRFVSLKAVPKVATAAPAGAPPQDLEFTKLPLNGLVASLENYSPVSR IGLEFKAGSRYEDFNLLGTLRLTSSLLTTGASFKITRGIEAVGGKLSVATRENMA YVTECLRGDVIDLEFLLNVTTAPEFRFWEVADLQPOLKIDKAVAFQNPQTHVLENHAA AYRNALANFLYCPDYRIKGVTSSEELHPLVFNHDSARMAIIGLVGSHPLKQVAEQFLNM RGGSLGSAKANYRGGIEIREONGDSLVHAAFAVASAVGASAEANASVLOHVLGAGPHVK RGSNTTSHLHQAVAKATQOPPDVSAFNASYSDSLFGIYTTISQATAAGDVIAAYNQVKT IAGNLSNTDVAQAANKKLKAGYLMSEVSESCFLEPVEGSAQVAGSVYMPFSTVLQQDSVA NADINAAKKVSGQKMAAGSCLGHFFVDEL
63	>ipi IP100008480 IP100008480.1 SERINE/THREONINE-PROTEIN PHOSPHATASE 2A CATALYTIC SUBUNIT ALPHA ISOFORM. MDEKVFTEKLDQWIBQINCEKQLSFQSVKSLCEKAKEILTKESNVQEVRCFVPCGDVHG QFHDLMELFRIGGKSPDTNLYFMGDYVDRGYVSEVTVLLVALKVRYRERTILRGNIHS RQITQVYGFDECLRKYGANVMKVFYTLDPDYLPLTALVDQICFLHGLGPSIDTLDHI RALDRLQEVPHEDGMCDLLWSDDPDRGGWISPRGAGVYFGQDISETHNANGLTVLSRA HQLVMEGYNCHDRNMVITIFSAFNYCVRCNGNQAIMEIDDTLKYSFLQDPAPRRGEFV TRKTPDYFL
64	>ipi IP100010402 IP100010402.2 PUTATIVE UNCHARACTERIZED PROTEIN. MHQTCVLEREASARSPGFVLPFRPLPIYTELQIREGPKRTIRAAAEAGAPCVGRVRCAP CNRGGREGASGVRGVAVQVPRLPAPFIEERODLAGAGAKRPLPSTAAASSPFGSAAAA AALCPPARLSTFMSGLRVYSTSVTGSREIKSQSSEVTRILGGRKIQYQLVDISQDMLAR DEMRLAGNPATPPQIVNGDQCGGYELFVEAVEQNTLQEPFLKLA

【図 10 - 13】

65	>ipi IP100299571 IP100299571.5 ISOFORM 2 OF PROTEIN DISULFIDE-ISOMERASE A6. MRDLREKLWVCRPLAPVEVPANISSDFQPCSPSTFSAHLSRKSPIMYPSTTMANAPGL VSCTFPLAVNGLYSSDDVIELTPSNFNREVQSLSLWVEFYAPWCGCHQRLTEPWKKA ATALKDVGKVAVDADKHHSLGGQYGVQGPPTIKIFGSKNNRPEDYGGRTGEAIVDAAL SALRLVKDLRGGSSGGYSSGKQGRSDSSSKRDVIELTDDSFDPKVNLODESDVMVVEYAP WGHCNRLPEFVAASVEKVGKVGKVAVDATVQNVKLAVDAITVQNVLASRYGIRGFTIKI PVDYDGGRTRELVSRALDLFSNADNPPPELLEIINEDAKRTCEHQLCVVYLPHELOT GAAGNSYLYELLLADKYKKKMMWGLWATEACGAQSELTALGIGCFGYPMMAINARKWK FALLKGSFSEQGINEFLRELFSRGSTAPVGGGGAFTTIVEREPWGDRSELPEVDIDLS DVLEDDLKDEEL
66	>ipi IP100021405 IP100021405.3 ISOFORM A OF PRELAMIN-A/C. METPSQRRATRSQAQASSTPLSPTRITRLQKEDLQELNDRLAVYIDRVSRLETNAGLR LRITSEEVSVREVSIGKAAAEALGDARTLDSVAKERARLQLELSKVREEFKELKARN TRKREGDIAAARLKLDEALLNSKEAALSTALSEKRTLGEGLHDLRQVAKLEAALGAAL KQLQDEMLARVDAENRLQTKMEELDFQKNITYSEELRETRKRRLTRVLVDINGQREPEFSR LADALQELRAHQHEDQVQYKKELEKTYSAKLDNARQSAERNNSLVGAHEELQQSRIRID SLSAQLSQLQRLAASAKRLROEDSLARERTSRRLLAEKREMAEMHARMQQQLDEIQ ELLIDIKALDMEIHAHYRKLLEGEERKLRLSPUTSQRSGRASSSSOTQGGSGVTKRK LESTESRSFSGHARTSGRVAVEEDGKGFVRLNKKSNEDQSMGNWQIKRQNGDDPLLT YRFPPKFTLKAGQVVTIWAAGAGATHSPPTDLVWKAQNTWCCGNSLRTALINSTGEVAM RKLVRSVTVVEDEDEDGDDLLHHHSHCSGSDGPAEYNSRSTVLCGTCCGAPAKKASA SGSQAQVGGPISSGSSASSVTVTRSYRSVSGSGSGSGFQNDLVTRSYLLGNSSPRTQSPQN CSIM
67	>ipi IP100028520 IP100028520.2 ISOFORM 1 OF NADH DEHYDROGENASE (UBIQUINONE) FLAVOPROTEIN 1, MITOCHONDRIAL. MLATRRLLGWSLFAARVSVRFSGDTTAPKRTSFGSLKDEDRIFTNLYGRHDWRLKGLSLRG DWYKTEILLKGPWILGEIKTSLGRLGGAGAGFTGLKSGFMMKPSDGPRIYLVNADGE EPYCKDEKLRHPRKWLLEOCILVGGRAMGARAATYIIRGEFNEASNLQVIAIREAIEAG LIGKNACGSGDYDFDVVVRGAGAYTCGETALISIEGCKQKRLKPPADVGVCFT TVANVETVAVSPTICRRGGTWFAGFGRENRSGTKLFNLSGHVNHCEIYEEMSGVPLEKIL EKHAGGVGTGGNDMLAVIPGSSSTPLIPKSVCTVLNMDPDLVAQOTGLGTAAVIVMDSR TDIVKIALRIEFYKHSQCQCTPCRGEDVMNNKVMARFVRGDARPAEIDSLWESKQIE GHTICALGDGAAMPVQGLIRHFRPELEERMORPAQHQARQAAS
68	>ipi IP100893541 IP100893541.1 14 KDA PROTEIN, PDIA3. SDVLELTDNDFESRISDTSGAGMLVEFPAPWCGHCKRLAPEYEAATRLKGIQVPLAKVD CTANTNTCNKYGVSGYPTLKIFRDGEAGYDQGPRTAGVSSYFVLHLSILSLRKLWHIQ SKK
69	>ipi IP100299084 IP100299084.1 TRANSMEMBRANE PROTEIN 33. MDPTNPGFCGQAGVQFWMLNLDPAHMLVPLLLGLLGLLGLLGLLGLLGLLGLLGLL ANALTSALRLHQRPLVQFLSRAFLAQLLEDSCHYLLVSLIFWNSYPTMSIFPLLLSL LHAATYTKKVLDAAGNSLPLLRSLVDKLSANQONKILPACNELIMPATVEMLSPSGG SLLOPFIYRFLTLRYSSRRNPYCRITLFLNELRLVIEHIMKPCACPLCEGLQSIAPTS RLAPTVP
70	>ipi IP100014348 IP100014348.2 ISOFORM 1 OF NEUTROPHIL CYTOSOL FACTOR 4. MAVAQQLRAESDFELPDDVAISANIADIEEKGRTSHFVFVIEVTKGSGSKYLIYRRYR QFHALQSKLEERFGDPSKSSALACTLPTLPKAVYVVGKQIEAMRIPALNAYKSLSLSP VWLMDEDVRIFFYQSPYDSEVQVQALRLRLPRTRKVKVSPQGNVDRMAAPRAELAFD FTGNSKLELAFNAGVITFLSRINKDMLGWTVRGATGIFPLSFVKLRKDFPEEDDTNWL RCYXYEDTISITKDIABVEDLSLPLKOLLETRREFORDIALNYRDAEGDLVRLSLSD EDVALMVQARGLFSQKRLFPKHLITQKDNRYRVNTWP

【図 10 - 14】

71	>ipi IP100414896 IP100414896.1 ISOFORM 1 OF RIBONUCLEASE T2. MRPAALRGALLGCLLALCGDADKRLRDNHEWKKLMVQHWPEVCEKIQNDCRDPPD YHTILGWRDSSGGGSRVFNLEELRDLPLFMAHAYPDVISHPPNRSRWHEWKEKHTG CAQVDALNSQKTYGRSLILEYRELIDNSVLKIGKIPKINTYVADFKDALARVGVYIP KIQCLPPSQDEEVQTIQJELCLTRQDQQLQNTCEPGEQSPKQEVWLWANGAASRGRLV CEDGPVYFPPPKTKH
72	>ipi IP100026202 IP100026202.1 60S RIBOSOMAL PROTEIN L18A. MKASGITREYKVVGRCLPTPKCHTFLPYMRIFAPNHHVAKSRFVYVSQLMKMKSSSGE IYVCGQVFEKSLPRVKNFGLWLRDYSRCHTHNMYREYRDLTTAGAVTQCYRDMGARHRR AHSIQIMKVEEIAASCKRCPAVKQFHDSKIFPLPHRVLRRQHKPRFTTKRPNTFF
73	>ipi IP100030911 IP100030911.2 VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN 8. MEEASEGGGNDVRNQLQSEVEGKNYMTQNVRLIARGENLEHNRNKTEDLEATSEHKFT TSQRVARKFWMNVMVILICIVIFIIILFIVLFAITGAFS
74	>ipi IP100018452 IP100018452.3 COPINE-1. MAHCWLVQLGSIQSDHIDKIGSKSDPLVLLQDVGGSSWABLGRTERVNRCSSEPFSSK TLQLEYRFTVQKLRFCYIDINKTEPLRDDDFLGAECSLGOIVSSQVLTLPMLHKPK PAGRGITTVSAQDLKNQVRVMEVEARNLDKDFLGKSDPFLFFRGDQKWHLYNRSEV IKNNLNTWKFRFVSPVQHFQGGNPSPTIQVQCSYDSDSGHDLTFGFTSLAQALQAVP FECIHPEKQKKKSKYNSGTRIRVKICRVETSEYSLDYVMGGCQINFYGVDFGTSNGDPS SPDSLHYLSPTGVNEYLMALNSVGSVVQDSDKLPAPAGFGCAQVPPDWQVSHFALNFN SPNPYCACIGQIVDAYRQALPQVRLYGPNTAPIINHVARFAQAHAQGTASQYFMILL TDGAVTDVETREAVRANLPMFSVIIVGVGGADPEAMELODADGGPLHTRSQGAARIDI VQFVYRRFQNAPREALQTLVAEPTQLVSFYRAGWAPLKLPPSAKDPAPQAQQA
75	>ipi IP100072377 IP100072377.1 ISOFORM 1 OF PROTEIN SET. MAHVPKLLFPKQKFRPPALGPEETSASAGLPKKGKQGEATIHIDEVQNEIDRLNE QASSELKVEQVQKRLQPPQKSELIAKIPNFWTTFVNNHPOVSALLGEDEEALHYK TRVEVTEFDIKSGVRIQFVDEPNFYENKVLISKEZHLNNSGDPSSKTEIKWKSODLT KRSSQTONKASRKQHEEPESFTWFDHSDAGADELGEVIKDQIWNPLQYVLVPMDD EEGEDEDEDDDEEEDLEDEDEDEDEDEDDDEEEDDEDEDD
76	>ipi IP100329801 IP100329801.12 ANNEXIN A5. MAQVLRGTVDFPFGDERADAETLRKAMKGLQDDEESLTLTSLRSNAQRQEISAFAKTL FGRLDLLKSELTKGFEKLIVALMKPSRLYDAYELKHALKAGAGTNEKVLTEIIASRTPE ELRAIKQVYEEYSSLEDDVGDTSGYQRMLVVLQANRDPDAGIDEAQVEQDAQALF QAGELKWTIDEKFTITPTGRSVSHLRKVPDKYMITISGFQIBETIDRETSNGLEQLLAV VKSIRSFPAYLAETLYAMKAGAGTDHDLTRVWVSRSIDOLFNRIRKEFRKNFATSLYSMI KQDTSQVKKALLLCEDD
77	>ipi IP100178410 IP100178410.3 ELONGATION FACTOR 1-BETA. MGFDKLSAPAGLVNDYLADKSYIEGVPSQADVAFAVSPFPADLCHALRWYNNHK SYEKEKASLPKQKALGKYGPADVEDTSGAGATDQKDDIDDLFGSDDEESEEAKRLE ERLAQYSEKSKKALPVAKSSILLDVKVPDEDTMAKLEECVRSIQADGLVWGSKLVFV GYGIKGLIQCVVEDDKVTDMLREQIATFEDYVQSDMVAAFNKI

【図 10 - 15】

78	>ipi IP100018206 IP100018206.4 ASPARTATE AMINOTRANSFERASE, MITOCHONDRIAL. MALLHSGRVLPGIAAAPHGLGAAAASARASSWHTHVEMGPDDPITGLVTEAFKRDNTSKKM NLGVGAVRDONGKPYVLPVSRKAAQIAAKNLKXEYLPIGGLAEFCFCAASAEALGENSEV LKSGRVETVQITSGTALRTGASFLQRFKFSRDVLFKFTWNGHTPIFRDAGMLQGVYR YYDPKTCGFDTGAVEDISIKIPEQSVLLHACAHNFTGVDPREQWKEIATVVKRNLFA FFDMAVYQGFASGDDGDKNDAVNRHFIEQINVLCLCQSYAKNMGLYGERGVAFTKQKDADE AKRVESQLKLIRPMYNSPPLNGARIAAALNTPLDRKQWQKEVKNVADRIIGMTROLV NLKKEGSHNQHWTIDQIGMFCFTGLKPEQVEKRLIKEFSIYMTKDGRIWAGRTSVNNGY LAHAHQVTK
79	>ipi IP100021290 IP100021290.5 ATP-CITRATE SYNTHASE. HSAKAISEQTKKELLVKPCTTSAIQNRFYARVPTDWARLLQDHPMLLSQNLVVKPD QLIKRAGKGLGVVNLTLDDGVKSWLKPRLQEAATVCKATGLKNELETPVPHSQAEEYF VCVIATREGDYVLFHHEGGVDVGDVDAKQKLLVGVDEKLNEDIKHLLVHAPEDKKEI LASFISGLFNVEDLYFTYLEINPLVVKDGVYVLDLAADVADATADYICVKWVGDIPEPP PFGREAYPEEAYIADLDAKSGASLKLTLNPKGRITWIMVAGSGASVYSDTICDLGGVNE LANYGEYSAGPSEQQTYDYAKTILSLMTREKHPDGKTLIIGGSIANFTNVAATFGKLVRA IRDYQGPLKEHEVTIFVRGGPNYQELRVMGVEVGTKTGIPHVGTETHMTAIVGMALG HRPFPNQPTAAHTANFLNLSAGSTSPAPSRSTASFSERADEVAPAKKAMPQDQSV SPRSLOGKSTTLFSRHTKALVWGMQTRAVQGMDFDVCVCSREDEPSVAAMVPTGDHKKQ FYWGHKEILIPVFKNMADAMRKHPVEDVILNFASLRSAYDSTMETMNYAQTRTIAIAG IPEALTKLKKKADQKGYTIIIGPATVGGIKPCCFRIKNTGGLMDNI LASKLYRPGSVAYV SRSGWSNEMLNWISRTIDVVEGVALVIGGRDVEGTSMDHVLRYQDTPGVKMTVGLSIEG GTEYKICRQIKRGLTKPIVCMWICITCATMFSSEVQGHAGACANQASAVARWQALK EAGVEVPRSPDELGEIQSVYEDLVANGVIVPAQEVPPPTVPMVAGWSARELGLIRKPASP MTSICDERGQELIYAGMPITEVFKEMGIGVGLLWPKRLPKYSQCFIEMCLMVTAD GPAYSAHNTIICARAGKDLVSLTSGLLTIGDRFGGALDAAKMFSKAFDSGIPMEFV NKMKEGKLMIGIGHRVKSIINPNMRVQLKDVVRQHPATPLLOYALEVEKTIKSKFN LILNVGLIGVAFVMLNRCGSPFREEADEYIDIGALNGIFVLGRSGMFIHLYLQKRLK QGLYRHPDDISYVLEPHMSM
80	>ipi IP100375480 IP100375480.4 26S PROTEASOME NON-ATPASE REGULATORY SUBUNIT 13 ISOFORM 2. MDVPSGLQQSGNSGQPAVWHRHLELYTKNPKTLVSNVNTGKSLSSVPHFENECEIDA RRCSKAGGFYFVNPISLVEIILHVRQMTDPNVALTLEKTRAEKRVSSDEAVILCKTARI GALKNLIGDLQVTKETIEDVEHMLNLLPGVTSVHSRZYDLSKPYQTIQNHASVYKDLR FLGCVDIKDLPVSEQKRAFTLGLAGLLEGVGFNGLMHPVLESILNRDQWIDTLY AFNSGNVRFQTLKTAWQQQPDLAANEAQLLRKIQLLCLMIMETITRPAHNRQLTFEEIAK SAKITVNEVELLVMKALSVGLVKSGSIDVDRKRVHTWQVPRDLDLQKQIKRDLREFWCT DVKSMEMLVEHQADHILT
81	>ipi IP100215917 IP100215917.3 ADP-RIBOSYLATION FACTOR 3. MGNIFGNLLKSLGKKEMRILMVLGDAAGKTTILYKLKLGVEIITPTIIFGNFVEVTEYN ISFTVMDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVDSNDRREVAREELMRLEMLDEADLRAV LLVFANQQLPNAMAAETDKLGLHSLHRNRYIQTATCATSGDGLYEGLDWANLQKRNK K

【 図 1 0 - 1 7 】

82 >|p1|IP003025291|IP003025292 2 ISOFORM 2 OF FLAMIN-A.
MSSHRSAGQSGAAGAPGGVDVTDRAEMATEKDLAEADAPKKIQTQITRWNEHLKVC
SKRIANLITLSDGLRLITLITLVLQKSHMKRHHKQITPRQMLQNSVLAFLDRESTR
VSDSIAKATVDGNLKLITLGLTILSLHSYISMPMDDEEDEEAQKTPQKRLGLQNKPL
PQPIITNFSRDQSGSRGALGVSLCAGPCALPGDWDMSASVTPNAREAQQADWLPGCI
VLT129PDMVDHSESVMLYSQFPAKALPGVLRAPLRKPNPKKARAYGPIETGNMVKR
RAEFTVETRSAGQGEVLVLDVDPADGQAEKAVTNANNDKNNITFSVMVYVETGTHKVLTV
AGQHARSFVSLVQSGQSDASVTAQGPFLSESNIAKNTIPELFTAGAGVEGEVETV
QAGKSTVETVQSGVTVQSGVTVQSGVTVQSGVTVQSGVTVQSGVTVQSGVTVQSGVTV
SACRAVGRGLQPKVRKETAADPKVYTKAGSGLGLVTVQSGVTKGPEGRVQKDLGDQVGF
EYPMVPCTGYITITWGGQNGIRSPFVQVETGCGNKQVRKAGGLEGVSGKADFVE
AIGDDVGTGLSVEGFSQAGIECDKDGKSDCVRVYPOEABEYAVHVLNSNEDIRLSFPM
ADIRADAPQHDPIRVKARGKLELQGVANKPACITVDAHKGKAPLRVQVQDNGEPLV
ALVNDKNGITYSYCSYSPKPKHTAMVSGGVSIPNSPFRVYVAGSHSNKKVKVGPVGA
KTGLKAHEPTVITDCAEABKQDVGSGIGIKACVQVGPAAEADIFDOIIRNDNTITVKYTP
RGAGSYITMFLPADFVETIRVIRKVEHSDASKVAGSGGLSLRVEGLKPTHTVNAK
AAGKGLRVQFSGLTGDAVDRIITDHDNTITVKYTPVQGGQVGVNVTYGGDIPKPS
FSVAVPSLDSLTKVTSVGGLEGVVQDQGTQVSKSAGQGGKAVKIVKSGSAVAPKVF
SADANVYVETVQSGVTVQSGVTVQSGVTVQSGVTVQSGVTVQSGVTVQSGVTVQSGVTV
SAGSPARTITDTKAGTGLGVTEGPEACQLCGLDNGDSTGVSYPVTEINILFL
ADHTIGPSFKRVPFCDFKASQSGPLERATAGEVQVQDSSAGSAELETICESE
AGLPAEYVITQDHDGTHTITITPLCPGAYTITKYGQVPMFPFSLQVEPAVDTSVGG
VYGGIEGQGVFEATIEFSDVARALITQGGPHVAVRANVPSGHTITVQDRGDGMYYKE
YTPYEGELHSVDVTVYDGSFVSPFQVPTVQDGSPSRVIRVNGLETQSGTNNKPKFTVE
RGATGGGLGKVGSGPEAKMSMDNKGDCSVSEYIPEAGTYSLVQVGHQGVSPFVKV
PVHDVDAKSKVCSGSPGLSVPANRPLQSPQVDTASQVAPLQVQVQKGLPEPVDVY
DNAGDTQVNTVYVPSREGYSVLTIVDEEVPSPFVKVPLVTHDASKVAVPNTGNTTGV
VYVETVITDCAEABKQDGLSLVQITDEGPKFKTITQDHDGTVYAVVPDGRYTLITL
KYGDIEITPFRVYVETVQSGVTVQSGVTVQSGVTVQSGVTVQSGVTVQSGVTVQSGVTV
CTPGDSEVDVVDNEDGDTFITPYTAPQVYCVRFGEVSNVSPFOVTLAAGDQPSV
QPEPLSQQLAPQVTVYQSGQQTNAPEPLVQVGNVLDLSRPLPDLTITKIGEITVE
RMPSPGVAQPTITDNKDGTVIRVYAPSEAGLHEMIRYONNMHSGTVPDYVYVNGCHV
TAYGGLTGKVNKPATITVNTKDAGEGLSIAEGSPAKICTDNQDGTGSVSLVPL
PGDYSILVKNYVNGVSPGFTARTVDGDSMRHSLVGSAAIDPINISDLSLTATV
VPSGDEEPLKRLRHNGVHSYVPEKTEGHLVHKNGQHVASPPIVTSIQGSDAS
RRVRSVQGLHEGHTFEPAEPTITDRDAGVGLGSLSEBQSPVDINTEDELDCRTVYCP
TEPNTIITNIPKADQVGVSPSFVKVITDEAGVGLSITRRRRAPSVANGVCSHDLKPIE
VITQDHDGTVYVETVITDCAEABKQDGLSLVQITDEGPKFKTITQDHDGTVYAVVPDGRYTLITL
VTVCLPGCGGAHVRVAGPPLERATAGEVQVQDSSAGSAELETICESE
KDGSGEAVVYVQVQDYSVFKNEEITPDSPTVYVAPSGDARLTVLSLQSGSLGVN
QAPSAFVSLNAGKADIAKVSFSGALCEAYVETIDQKRVAVTIPRENGVITIDVFNKTH
TIPGSPFTIRVGEFGHGDDPLGVASLGAVLEGVTPNGAEFVNTSNAGASALSTVTDG
PSKVMQDSCGCEPGRYVITTPMAGYSVLTIKYGGYTHIGGSPFKTGRPLVSNHSIL
TETSSEVDLSLTACAPQHGAPGPADASKVAGKLGSIAVYKQKSFSTVDQSKAGNM
MLLVYVQGTPTCEELLKVHGSRSLYSVSLYLDKDEGYITLVKVGKDEHIGPSFVRVVPV
83 >|p1|IP008178271|IP00817827.1 32 KDA PROTEIN.
KKKKKKKKKKRVLLQAKNEKNNTAHNVREKKKEVPAVPETLKKRRNFAELKILKKRK
LKKKKKKKKRRVLLQAKNEKNNTAHNVREKKKEVPAVPETLKKRRNFAELKILKKRK
LGINVSPKRVYLLORLRLQINFLVQKSLVQKSLVQKSLVQKSLVQKSLVQKSLVQKSLV
RGYCKNKKRIALTDLNARSJGLQYITCMEDLTHIYTVGKRKEANNPLMPKLSLP
RGMMKKTKTHEVGGSDAGDNDQINRLIRGN.

【 ㊦ 1 0 - 1 9 】

[illegible]

84	> p IP100029468 IP100029468.1 ALPHA-CENTRACTIN. MESDYVIANPQNVINGSGVAKAGFADGQIPKPYCFPNVYGRPKHVRVAGALEGDIFFIG KAEHRHGLLSIRYMENGVSKVDNMWRILVYQYSDQLQTFSEEPHVLLTEAPLMRPNK RRERAEVEFTTNVPAFLISMQAVLSIATGRTTGVQSGVYTHAVPIYEGFAMPHSI MRDIAEGVDISFRLRALVIRKEGVYDHSSESEIIVKAIKERACYSILNSPKQKDELTETKA FRPLIDPILPSSGSRFRAPELLFRPLIDPILPSSGSEBGIHEVLVFAIQKSDMDRLRTLSNVL SGGSTLKFQGDRLSEVKKLAPKDVKIRISAPQERLYSTWIGGSLASLDTFRKKMVS KEYEDGARSIRHKT
85	> p IP100220362 IP100220362.5 10 KDA HEAT SHOCK PROTEIN, MITOCHONDRIAL. MAQAFRRFLPLFDRLVRSAAETAVITGGKIMLPEKSGQKVLAQTVVAGVSGSGKRGKGEI QPVSKVQGVLDLPEYEGGTVKVLDDKQYFLFRDGDILGKYVD
86	> p IP100647089 IP100647089.1 UNCHARACTERIZED PROTEIN. MSRQANGRTSESKMSMSFTLTLYGALVTQCKDYENEDNKQLDKMGFINIGRLTEDFL ARSNVQCDGCFRETADVIKAKRMFLQKQNTKQAKIYDAVKERGAASCTDAPLSL
87	> p IP100221091 IP100221091.9 40S RIBOSOMAL PROTEIN S15A. MVNRNVLDALASILINNAEKRGKRVILRPSCKVTLTVMMKHGIEGFEIIDDHRAGK IVMLTIRKNCNGVTSISPRFDVLQKDLQKMNLLPSRQFGFTVILTTSAGINDEHEARRKH TGKLGIRFFE
88	> p IP100032561 IP100032561.1 CALCIUM-BINDING PROTEIN 39. MPFFPEKSHKSPADLVINSGLSMAVLKQDIDSKKAKATDSSEKSNLVAMKTLVYTN EPTFAVEAQAQELVYNNKLLSTVLADQLIDPEFGKDAQVFPNNILRQKITGRTTPEYI CTQOINFLMMLKGYESPEIALNCGIMLRERICIRHEPLKAIILWSQEPDYFRFVMEGFTDI ASDAFATFKDILLTRKHLISAEFLQGHYDRFFSEYKLLHSENYTVRQSGILKGLCELLDR HNTITMTQYIISKENLLMMNLKDSKSNQIEFAFHVRFVFPVNPKNPTQILDILLKNQA KLIEPLSKFDQNTDEQDFENQDVLVYVQIGRLDRKPAQOEA
89	> p IP100031522 IP100031522.2 TRIFUNCTIONAL ENZYME SUBUNIT ALPHA, MITOCHONDRIAL. MVACARIGLISRSFAFRILNRSRGYICRNTFGSSALLIRTHINYVGRGDVAVVRINSPNK VNTLSKLSHESSEPMNEVDQIRSAVLISKSPCFEIGADINNNKLAKCTLQEVTLQS QEAOIRVEKLESTKPIVIAINGSGGLGGLVLAISQYRIATKOKTVLGTGFEVLLGALP GAGGTORLPMKVGPVALDMMGLTSTIRADRKKMLQVLDQVLEPLGQKPFPEERTIYLI EVAALITFAKLGAULIKSPRKLGDKRGITAYAMITPFVROQYKVEKVRKQITGLVYLA PKLIIIDVAGTGIEQSGSDAGLYCSQKQFGLVMTESKALMGLYHGGLVCKKNKFGAPQKD VKHLAIJLDMGKADGAGVQSDVKGLTKILKDAITLALORQDQKIDVNNKVKKAILTSF ERDSIFSNLTQQLYQGHFQEKADMVLEAFEDLSLKHRLVLEKEAVIPHOCHIFASNTLVP ISEAAVSRKPKRVIGMSEFVSPDKMGLITITERTKSQDASAVAGVAGKSNITIVK DGGPYITTRCLFASPMSEVIRILQGVDPDKLDSLTITGYFPGFVGAALIDVSDVDVAKHVA EDLGKVEGRFEGGNNFLLTMVSGFGLGRKSGRQYTSFGEYVGRKRLDNDEGVLILASKL LPEKSSSDSDQFRLVTFPNEVAMCLOEGILATPAGSDIGAVFLGGLPCFLGGPFRF VDLYGAQKIVDRLKLYZAAVQGFTEFQCLADHAINSPKNKFYQ
96	> p IP100465028 IP100465028.7 TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE ISOFORM 2. MAEDGEEAEFFHAALVIGSGVFLRLARDTLQRLSGKSAVSRKFFVGGNWRKNGRQKSL LEIGTLNAAKVAPEADTEVVCAPITLIDFARQKLDPKIAVAQKQNYNTNAGTGEISPP IDKCGATWVLGHSDRRHVFVFGSEDLGQKVHAGLQVAGIATVCIKGLKEDREKSDTAV VEPFAITVAGVDSKNSVLAPEVFAITVAGVDSKNSVLAPEVFAITVAGVDSKNSVLAPE STRIIYGGSVGTACKELASQSDVDPVGLVGGASLKPEFVIDINAKQ
97	> p IP100216308 IP100216308.5 VOLTAGE-DEPENDENT ANION- SELECTIVE CHANNEL PROTEIN 1. NAVATVYADLGKRSARDTFRGYGGLIKDLDKTKSENGLEFTSSGSANETTTRKVTGS TEVLTYSGLITFEKTVNTDITLGTETVQDLARGKLKTSSEKNTGNKNAKIKTGVYK EHLINLCGMDPDIAGPSIRKALVLVYECWGLAQYMNFTSEKASVSTQSNFAPGKIDTQ HTNVNDTPEFGSGTYGVKNVGLTAVNLATAGNSNTIRGLAIQYIDPACQSAKVNNL SILGLGYQTQFLPKQILLSALLDGKNVAGGSHGLVLEQFQA
98	> p IP100216298 IP100216298.6 THIORIBODXIN. MYVKIESTKATVLAADAGKLVVDFSATWCPCPKMIFKPFHLSSEKYSNVIFLEVQDI QDQVASEGSCFKMPTQFFKKQGVGFSGSANKKELELAINELV
99	> p IP100000874 IP100000874.1 PEROXIREDOXIN-1. MSSNGAKLGHAPNFATAVMPGQKDISLDYKRGYVFFVFFYDTEFVCPCTEIIAIFS DKRAEPEKILMCAQVYISGVSDSHFLAVLNMFRKQGLVGMNPIVLSDDQVGTQVGLV ADBGISFKGLFITIDGKIGLITVLDLVPGRSVDETLRLQVAFQFDKHXEGFCVAGQVFL SOTIKDYKQSSVSK
100	> p IP10014895 IP10014895.1 PROTEIN S100-AL1. MAKISIPSTERCIESLILAPQVAKGDDYNYITLSTKFLSPFNTELAATTKNQKDPVFI DRMKMLKLTDSNGDGLDFEFLNLIIGGLAMACHDSFLKAVPSQRT
101	> p IP100007752 IP100007752.1 TUBULIN BETA-2C CHAIN. MREIVLQAGCGQNGQIKGAFWEVISEDHIGDPTGYTHGSDQLQRINIVYNEATGGKYV PRAVLVLEDFGCTQNVSVSGFGFQIFRDPNFVGGTSGKSNNAKNGHYTEGALVSDVLDV RKEAESCDCLQGFQLLSLGGGTGGMGMTLLSILREEPYDNLNITSVVSPSKSGVTVI EPYNATLSVHLVENTEDITYCINDEALYDLCFTRLKLTIPPTYGDLHNVLSATMSGVTTC FQFQNLNDRKLVANVMFPFRLHGFHMFPGFAPLTSRGSQGTFRVLTPVELTQKQAMDKM KACQDPHGRVLTVAIFRGMKMKVYEDGKGRDGVNFGFSADETWAMSLADITDPSSEWMA LYPQGGSGDYSVYAGRGSGDILGQPIITTOVTFKDLASGITGGQKQITKHESGAS IKIDEPELGGSDRIITITGSDNOINLVYQNSVYSGKFF
102	> p IP100216049 IP100216049.1 ISOFORM 1 OF HETEROGENEOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN X. METQPEPTFPTNTEINGEGRKPAEDMEEEQAFKRSNTDEMVELRILLOSKNAGAVIGK GGKNIKALPDIYNASVSDSSSGPRTISADIEITGILKLIITPEELGQLPSPTAT SQPLESDAVECINLVQHYRKGSDPFCDELRLLIHQSLAGLIGVKAKIKELRENTQITTKL FQECQCHPDRVLVIGGGRDPRVCEIKIILDLISESPFKRAQGPQVFNPDYDTYDYGFT NMEDRRGRFPPFPPFGGLMDMPFGKRGKRDVNPFRSRDYMDSPPRGGPPPPPPRGGP GSRARLILPFPFPPFGGLMDMPFGKRGKRDVNPFRSRDYMDSPPRGGPPPPPPRGGP LYPQGGSGDYSVYAGRGSGDILGQPIITTOVTFKDLASGITGGQKQITKHESGAS IKIDEPELGGSDRIITITGSDNOINLVYQNSVYSGKFF

【図 10 - 20】

103	>ipi IP100010133 IP100010133.3 CORONIN-1A. MSRQVVRSSKFRHVGQPAKADQCVEDVRVSQTTWDSGFCVANKPFVALICEASGGGAPL VLPLGKTGRVDKNAPTVCGHTAPVLDIAWCFPHNDNVIASGSEDCVTVMVWEIPDGGMLPL REPVTVELEGTRKRVGIYAHNHTAQNVLLSAGCDNVMMVVDVGTGAAMLLGPEVHPDITIY SVDSRSDGGLICTSCROKRVRIIEPRKGTVVVAEKDRPHEGTRPVRVAVFVSEKGLITGFS RMSEQRQVALWDTHLEELPLSLQELDTSGSVLLFPFPDPTNIVYLCKGSDSSIRYFEITSE APFLHYLSMFSQSGRMGCMYPMKRGLEVNKCEIARFYKHERCEPIAMTVPRKSDLPQ EDLYPPTAGPDPAALTAEEMLGGDRADGPLLISLKDGYVPPKSRDLRVNRGLDTRGRRAAPE ASGTFPSDAVSRLEEEMRKLAQTVELQRLDRLEETVQAK
104	>ipi IP100414676 IP100414676.6 HEAT SHOCK PROTEIN HSP 90- BETA. MPEEVHGGEEVEVTFAPQAEIAQLMSLIINTFYNSKEIFLRELISNASDALDKIRYESLT DPSKLDGSGKELKIDIIINPQOERTLTLVDITGIMTKADLINNLGTTIAKSGTKAFMEALQAG ADISIMIGQFVGVSAYLVAEKVVITKHNDEQYAWESSAGGSFTVRADHGEPIGRGTRK VILHLKEDQTEYLEERRVREVKKHSQFIGYPIITLYLEKEREKEISDDEAEERKEKEKEE KDDEEEKPRIEDVGSDEEDSGDKKKTKRIKEKIIDQELNKTPIWTRNPDITQEE YGEFYKSLTNDWEDHLAVKHFSEVQGLFEALLPIPRAPFDFENKKKKNNIKLVYRV FIMDSCELIPEYLFNIRGVVSDLEDPLNISREMLQQSKILKVRKNIVKKCLELFSILA EDKENYKKFYEAFSKNLKLGHEDSNRRRLSELLRYHTSQSGDEMTSLSEYVSMKRETO KS.IYIITGESKEQVANSAPFVRRKGEFVVMTEPIDEYCVQQLKEGCKSLSVYSTRKG LELPEDEEEKKMEESAKFENLCKMLKEILDKKEKVTISNRILVSSPCIVTSTYGTWA NMERIMKAQALRDNSTMGVMAKKHLEINPDHPIVETLRQKAEADKNDAVKDLVLLPE TALLSGFSLDDPQTHSNRIYMRKLGIDIDEVAAEENAAVDEIPELEGDEDAASRM EEVD
105	>ipi IP100784154 IP100784154.1 60 KDA HEAT SHOCK PROTEIN, MITOCHONDRIAL. MLRLPTVFRQMRPVSRVLAPHLTRAYAKDVKGADARALMLQGVLLADAVAVTMGPKGR TVIIEQSWGSPKVTXKDGVTVAKSIDLKDKYKNI GAKLVQDVANNITNEEAGDGTITATVLA RSIAKEGEKISKGANPVBIIRRGVMLAVDAVIAELKKQSKPVTTPTEIAQVATISANGDK ELGNIIIDAMKKVGRKGVITTVTKDRTLNDLELEIIEGKRFORGYSPIVINTSGKQKCEPQ DAVYLLSEKTSISQSTVPALEITANHRKPLVITAEVDVGEALSTVLNMLKVLGVQVAV KAPGSGNRRKMLKMDAIAITAGGAFEGELTLNLEDVPHDGLKGVCEVITVKDQAMLLKG KGDKAQIEKRIQEIIEQLDVTTSYEYKEKNLERLAKLDGKVAVLKVGSTSDVEYNEKKDR VTDALNATRAAVEEGIVLGGCALKRCPALDSLTAPNEDQKIGIEIKRTKLIPAMTIA KNAGVGSGLIVEKIMQSSEVGYDAAAGDFVMNVEKGIIDPTKVVRTALLDAGVASLLT TAEVVVTEIPKEKKDPGCMGAMGGGGGGGGMF
106	>ipi IP100005969 IP100005969.3 F-ACTIN-CAPPING PROTEIN SUBUNIT ALPHA-1. MAFDVDRVSDSEKVRARIAFTIAPPGEFNEFVNDVRLNNNDNLLREGAABAFAPQNMND QFTPVKIDYQDQVLTIEHGDGNSRFLDPKRNKISFPHDLKKAASDQPPDEADGGKLSW RESCOSALAAVYKIDYSGFCTYAKITDQQTIIACIESHQPQKPFNMWGRSEKMT ITPFTAQVGVGLIKIYHVEDGCVQLVSHKQVQDSTLVSNEAQTAKEFKITINENAEVQI TAISENYQIMSDTIPKALRGLPVTTRIKTDWNKILSYIKIKEMQNA
107	>ipi IP100453473 IP100453473.6 HISTONE H4. MSGRGKGKGLGKGKGRHRLRDNIGQITKPAIRRLARRGGVKRISGLIYEETRGVLK VFLENVIRDAVITYEHAARKTIVTAMDVVYALKRQGRTYLFGFG
108	>ipi IP100217471 IP100217471.3 HEMOGLOBIN SUBUNIT EPSILON. MVHFTAEKAAVTSIWSKNVVEEAGGEALGRLLVVYPPTQRFDFGNLSFSAIILGNPK VKAHGKVLTSFGDAIKNNDKLPAPAKLSEILHCDLIVDPENKLLGNVMVII LATHPG KEFTPEVQAAWQKLSVAVALIAAHKH

【図 10 - 22】

114	>ipi IP100550363 IP100550363.3 TRANSGLUTIN-2. MANRGPAYGLSREVQKIEKQYDADLQILLQWITITQCKVDQRPQRENFWNLKDTG VLCELINALYPEQAGPVKTIQSTHAFKMQSISQFLQAERYGINTDITQIVDLWEGK NMACVQRTLNNLGGALVADRGDLFGSDPNWPFKKSKENPRNFSDNLQEGKRNVLQMG NRGASQAGMTGYMPRL
115	>ipi IP100303476 IP100303476.1 ATP SYNTHASE SUBUNIT BETA, MITOCHONDRIAL. MLGFCVGRVAAAPASGALRRLTFSASLPPAQLLLRAAPTAVHPVRDYAAQTSPSPKAGAA GRIVAVIGAVVDVQDFDEGLPIINALVEQGRTRALVLEVAQHLGESTVRTIAMDTEGLV RGQRVLDSGAPIKIPVGVETLGRIMNVIGEPIDERGPIKQFAPIHAEAPFEMMSVEQ EILVTGIRVVDLLAPYAKGGRIKGLFGGAGVGVKTVLIMELINNVAKAHGGYSVFAGVGERT REGMILYHEMIESGVNLKDAISKVALVYGGMNEPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEGD VYLPIDNIFRFTQAGSEVALLGRPSAVGIVQETLATDMGTWQRIITTTKKSIIISVQAI VYPADDLDPAPATTFPHLDDATTVLSRAIAELGIYPAVDPILODSTRIMDNVSGSEHYD ARGVQKILQDYKSLQDITAILGMDLESEEDKLTVSSARKIQRPLSQFPQVAEVTTHMGK LVPLKETIKGFQQLAGEYDHLPEAQFVYMGPIEBAVAKADKLAEEHSS
116	>ipi IP100465439 IP100465439.5 FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE A. MPYQYFALTPQKQKLSDAHRIVAPGKGLAEDSTGSIKRLQSIGTENTENRRFYR QLLLTADDRVNCIGGVILFHEITLYKADDGRFPQVIKSGGVGVIKVDKGVVPLAGTN GETTITQDLGDSERCAQYKKGDAQFAKWCVLKIGHTPSALAIMENANVLARYASIQQQ NGIYVIVEPELIPDGDHDLKRCQYVTEKVLAAVYKALSDEHIIYLEGTLKPNMVTGPHAC TQKFSHEEIAATVIALRKTVPPAVTGITFISGGQSEBEASINLMAINKCPLLKFWALTF SYGRALQASALKAWGGKKENLKAQGEYVYKRALANSLACQKYTPSGQAAGAAASELVS NHAY
117	>ipi IP100219018 IP100219018.7 GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE. MGKVKVGVNGFGRIGRLVTRAAFNSGKVDIVAINDPDILNMYVMFYQDSTHGKPHGT KAENGKLVINGNPITIFQERDPSKIKWGDAGAEYVVESTGVFTIMEKAGAHLQGGAKRVI ISAPSADAMPVGMVNGHEKYONSILKISNASCTNCLAPLAKVITHDNFGIVEGLMTTVHA ITATQKTVDGSPGKILWDRGQALONIPASGAARAVKVPILNGLKTGMARFVPTANV SVVDLTRLEKPAKYDIDIKRVVQASBGLKGLGYTHEQVSSDFNSDTHSSFTPDAGAG IALNDHFKVLSWVNDPEFYGNRVLDLMHMAKSE
118	>ipi IP100008603 IP100008603.1 ACTIN, AORTIC SMOOTH MUSCLE. MCEEDSTALVCNDSGLCKAGFADGAPVAFVPSIVGRPERHQGMVWGKQDSYVGEA QSKRGILTLYPIEIGHIITNDDMKDIWHFSYFNELRVAPREHPTLLTEAPLNKANREK MTQIMFETFNVPAMYVAIQVLSYASGRTTIGVLVSDGQGVTHNVPIYEGYALPHAIMRL DLAGRDLDYLMKILITRERGYSFTTAEAREIVQDIKEKLCYVALDFENEMATAASSSSLEK SYELPDGQVITIGNERPRCPETLFPQSPFIMGESAGIHETYSIMKCDIDIRKDLAYMNV LSGGTMYPGIARDMKEITAPSTMKIKIAPPERKYSVWVGSIILASTFQQMWIS KQYEAGFPIVHRKCF

【図 10 - 21】

109	>ipi IP100008727 IP100008727.1 ATP SYNTHASE LIPID-BINDING PROTEIN, MITOCHONDRIAL. MFACAKLACTPFLIRAGSRVAYRPIASAVLSRPEASRTGEGSTVFNQAQNVQSILIQREF QTSIAISRDITAAKFTGAGAAVTGVAGSGAGITGVGSLIGIYARNPSLKKQLFSYAILG FALSEAMGLFCMLVAFILFLPAM
110	>ipi IP100482470 IP100482470.3 ISOFORM 2 OF HEAT SHOCK PROTEIN HSP 90-ALPHA. MPPCSGGSDSTPFGSLRDRDCPAQSAEYPRDLRPPRSGPSEASSPPFLSRAPVNWYQ BKQVFLHMLMVSGSTTLLCKMOPFHVSAFVTSASLAFQSGAQHLYKDLQPTTLAR LLMPEETQTDQPMEEVEVTFAPQAEIAQLMSLIINTFYNSKEIFLRELISNASDALDK IRYESLTDPSKLDGSKELHNLINPNKQDRTLTIVDTGIMTKADLINNLGTTIAKSGTKAF MEALQAGADISIMIGQFVGVSAYLVAEKVTVITKHNDEQYAWESSAGGSFTVRTDTEGE PMRGTRKVLHLKEDQTEYLEERRIKEIVKHSQFIGYPIITLVSEKERDKEVSDDEAEK EDKEEKEKEEKESEDKPEIEDVGSDEEEKKDGKKKKIKKRYIDQELNKTPIWTRNPD ITNNEYGEFYKSLTNDWEDHLAVKHFSEVQGLFEALLFVPRAPFDFENRKKK NNIKLYYRVFVTHDNCEELIPEYLFNIRGVVSDLEDPLNISREMLQQSKILKVRKNLVK KCELELTAEADKENYKRYEYQFSKNIKLGIHEDSQNRKRLSELLRYTISASGDEMVSILK DYCTMRKQKHIIYITGETKQVANSAPFVRRKGEFVVMTEPIDEYCVQQLKEGCKSLSV YSTRKGLELPEDEEEKKMEESAKFENLCKMLKEILDKKEKVTISNRILVSSPCIVTSTYGT WATANMERIMKAQALRDNSTMGVMAKKHLEINPDHPIVETLRQKAEADKNDAVKDLVLLPE TALLSGFSLDDPQTHSNRIYMRKLGIDIDEVAAEENAAVDEIPELEGDEDAASRM EEVD
111	>ipi IP100410714 IP100410714.5 HEMOGLOBIN SUBUNIT ALPHA. MVLSPADKTNVKAANGKVGAGAGEYGAELRMFLSFTTKTTPYHPFDLSHGSAQVKGHG KKVADALNAAVHDDMPNALSALSDLAHLKRLVDFVFNFKLLSHCLVTLAAHLPAEFT AVHASLDKFLASVSTVLTSKYR
112	>ipi IP100186290 IP100186290.6 ELONGATION FACTOR 2. MNVFTVDQIRAIMDKKANIRNMNSVIAHVDHGGKSTLTDGSLVCKAGIIASARAGETRTDTR KDEQRCITIKSTAI SLFYELSENDLNFIRQSKDGAAGLILNLDSPGHVDFSEVATAGLR VTDGALVYDQVSGVGVQTEVTVLRSQIAERKFPVLNHNMRDALLEQLPEELQYTFGR IVENNVNII STYGEGESGPMGNIMIDPVLGTGVGSGGLHGAFTLQCPAEMVYAKFAKQ EGQLPAERAKKVEDMMKLLWQDRYFDPANGRFPKSKATSPGKKLPRTCOLLDPIFKV FDAIMNFKEETAKLIEKLDLSEDKDRKGLPKLLKAMRMLPADGALLQMTIHLPS FVTAQMYRCELLYEGPPDEAAMGICSDCPKPGVSL VSTGLVRIMGPNTYPGKKEDLYKPIQRTILMMGRVVEPTEDPCGNVLGVGVQDVLV KTGTITTFEHAHNMRVMKFSVSPVVRVAEAKNPADLPKLVEGLRKLAKSDPMVQCIEE SGEHIITAGAGELHLEICLKDLEEDHACIPITKKSDPVSVYRSTVSEENSVCLSKSPNKN RLYHKAERPPDGLAEDIDRGEVSAQELRQARYLAEKYVWVDAERKATWCFGDPDTPGN TLTDITKQVQYLMETKDSYAGFQWAKGALCENRNVGRFVDVHTLHADAIRGGGQ IIPBARCLYASVLTQAPRLMEPTLYVEIGLQCPQVGVVILNHNKSGHVEESVQAGTF MEVVKVAYLVNESFGTADLRNNTGGQFPQCVFDMQILPGDFDSSRSPQVVAETRK RKGLREGIPALDNLDKLI
113	>ipi IP100171611 IP100171611.7 HISTONE H3.2. MARTKQARKSTGGKAPRQKLAKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALREIRYQKSTE LILRKLFPQRLVREIAQDFKDLRFQSSAVMALQEAESAYLVGLFEDTLMCAIHKARVTI MPDKILARRIRGERA

【図 10 - 23】

119	>ipi IP100006988 IP100006988.1 RESISTIN. MKALCLLLPLVLGLLVSSKTLCSHEEAIRNERIQVAGSLIFRAISSIGLEQCVSTSRGDL ATCPRGFAVTGCTCGSAGSDVRAETTHCQCQAGMDWTGARRCVRQ
120	>ipi IP100025447 IP100025447.8 EEF1A1 PROTEIN. MGKEKTHINIVIGHVDSGKSTTTGHLIYKCGGIDKRTIEKFEKEAEMGKSGFYAWVL DKLKAERERGITIDISLWKFETSKYVYITIDAPGHRDPINKNITGTSGQADCAVLVAAVG GEFEAGISKNQOTREHALLAYSQKRYEIVKEVSTYIKKIGNPDVAFVPISGWGDMM LEPSANMPWFKGVKVTDRKDNAGSAGTLLEALCOLLPPTRTDKPLRLQDQVYKIGGIT VPVGRVETGLKPGHMVTFAPVNVITVEKVSVMHHEALSEALPDGNVGNVRKVSVDVR RGNVAGSDKNDFPEAAQTAQVILNHPGQISAGYAVPLDCHTAIACKFAELKEKIDR RSGKKLEDGPKFLKSGDAAIVDMVFGKMPCVESFDYPLFGFAVRMDRQTVAVGVIRAV DKAAGAGKVTLSAQKQAKK
121	>ipi IP100014424 IP100014424.1 ELONGATION FACTOR 1-ALPHA 2. MGKEKTHINIVIGHVDSGKSTTTGHLIYKCGGIDKRTIEKFEKEAEMGKSGFYAWVL DKLKAERERGITIDISLWKFETSKYVYITIDAPGHRDPINKNITGTSGQADCAVLVAAVG GEFEAGISKNQOTREHALLAYSQKRYEIVKEVSTYIKKIGNPDVAFVPISGWGDMM LEPSANMPWFKGVKVTDRKDNAGSAGTLLEALCOLLPPTRTDKPLRLQDQVYKIGGIT VPVGRVETGLKPGHMVTFAPVNVITVEKVSVMHHEALSEALPDGNVGNVRKVSVDVR RGNVAGSDKNDFPEAAQTAQVILNHPGQISAGYAVPLDCHTAIACKFAELKEKIDR RSGKKLEDGPKFLKSGDAAIVDMVFGKMPCVESFDYPLFGFAVRMDRQTVAVGVIRAV DKAAGAGKVTLSAQKQAKK
122	>ipi IP100006935 IP100006935.3 EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 5A-2. MADEIDTITGDAAGASTVYPKQSAALRNKQYVVLKGRPCIKVIMSTSKTGKHGKAVHLVG IDIFTGKYEDICPSTHNNVQIKRNDYQITCQDQGLSLLTETGVEEDLKLPESELG KEIECKYNAGDEVQVSWCMASEEYAVAKPC
123	>ipi IP100217473 IP100217473.5 HEMOGLOBIN SUBUNIT BETA. MSLTKTERTIIVSMMAKISTQADTIGTETLIERLIVRDFVNFKLLSHCLVTLAARFPADFTA EHAANDKFLSVSVSLTEKYR
124	>ipi IP100031523 IP100031523.4 PUTATIVE HEAT SHOCK PROTEIN HSP 90-ALPHA A2. MPEETQTDQPMEEVEVTFAPQAEIAQLMSLIINTFYNSKEIFLRELISNASDALDKW YESLTDPSKLDGSKELHNLINPNKQDRTLTIVDTGIMTKADLINNLGTTIAKSGTKAFME ALQAGADISIMIGQFVGVSAYLVAEKVTVITKHNDEQYAWESSAGGSFTVRTDTEGERM GRGTAVLHLKEDQTEYLEERRIKEIVKHSQFIGYPIITLVSEKERDKEVSDDEAEK EDKEEKEKEEKESEDKPEIEDVGSDEEEKKDGKKKKIKKRYIDQELNKTPIWTRNPD ITNNEYGEFCRNLTNDWEDHLAVKHFSEVQGLFEALLFVP
125	>ipi IP100444262 IP100444262.3 CDNA FLJ45706 FTS, CLONE FEBRA2028457, HIGHLY SIMILAR TO NUCLEOLIN. MVKLAKAGKNGQDPPKMAPPPKEVEEDSEDEMSDEDEDEDDDEEDDEEDSEEMETTP AKGKKAARVVPVAKAGKNGKNAKKEDESEDEEDSEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDEDE AAAAPASEDE KAAPAAKQKVGTEFTAFNLFVGNLNFNKSAPELKTIGSDVFAKNDLAVDVIRIGTR RFGYVDFESAEDLEKALELTLGVFGNEIKLEKPGKDSKSKERDARTLAKNLPVYKVGQ ELAEVFEADAERIVSKDGNSKGNATIEFTTEADAKFTKEQSTEDIGRSISLYTTEGK QNMQYSGKNSGKMSSEKIVLNLVSNLSVSAETTELQEVFEKATFTIKVQNGKSKSVA IEPASEPDAKEALNSCNKREIEGRALRLELQCPGSGNARSQSPKSLFKYGLSEDTTET LKESPDGSVRARIVTDRETGSEKGFVDFNSENDEAKAEMDEIDGKNYTLDAWKP KQEGGFGRRGGGRGGFGRRGGGRGGFGRRGGGRGGFGRRGGGRGGGRGGGRGGGRGG KFE

【図 10 - 24】

126	>ipi IP100220740 IP100220740.1 ISOFORM 2 OF NUCLEOPHOSMIN. MEDSMDMDMSPLRPQNYLFGCELKADKDYHFKVDNDNEHQLSLRTVSLGAGAKDELHIV EAEAMNYEGSPKVTALTKMSVQPTVSLGGFETPPVVLRLKCGSGPVHISGQHLVAVE EDAEEDEDEEDVKLLSISGKRSAPEGGSQVPOKVKLAADDDDDDEDEDDDDDDDD FDDEAEKAPVKKQGSFQKQKTPKTPKPGPSVDEIKAKMQASIERGGSLPKVEAKFI NYVKNCFRMTDQEAQDLQWQKSL
127	>ipi IP100030144 IP100030144.1 PEPTIDYLPROLYL CIS-TRANS ISOMERASE A-LIKE 4A/B/C. MVNSVFPDITVDGKFLCRISIKLFAKDKLTAENFRALSTGEKGFYKSGCFHRIIPGF MCQGGDTFRNGTCDKSIYGERFDDENLIRKHTGSGILSMANAGPTNGSQFFICAAKTE WLDGKHVAFGKVKERVNIWEAEHFGYRNSKTSKKITADCGQF
128	>ipi IP100797270 IP100797270.4 ISOFORM 1 OF TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE (IPI history IPI00483071). MAPSRKFFVGGNWMNGRQSLGELIGTLNAAKVPADEVVCAPTAYIDFARQKLDPKI AVAAQNCYKVTNGAFTGEISPGMIKDOGATVWVLGHSERRHVFGESDELIGQVAHALAE GLGVIACIGEKLDEREAGITEKVVEQTKVIADNVKDKSVVLAYEPVVAIGTGKTATPQ QAQEVHEKLRGWLKSNVSDAVAQSTRIIYGGSVTGATCKELASQFDVDGFLVGGASLKPE FVDIINARQ
129	>ipi IP100219335 IP100219335.10 60S RIBOSOMAL PROTEIN L3- LIKE. MSHRKFSAPRHGHLGFLPHKSRHRRHKVKIWPDDPSQPVHLTAFLYGKAGMHTLTREV HRPGLKISKREEEVAITVETPLVVGVVGVVATPAGLRSFKTFIAEHLSDCERRRFYK DWHKSKKQAFKACKRWRIDGKQLQKDFAMKKYKVKIRVIVHTQMKLLPFRQKKAHI MEIQNGGTVAEKVAMQARLEKQVPVSVHSVSQSEVIDVIAVTKGRGKVTSRWHTKKL PRKTHKGLRKVACIGAMHPARVGCISARAGQGYHRTLNKKIFRIGRGPHEMEDGKLKVK NNASTSYDVTAKSITPLGGFPHYGEVNNDFVLMKGCIGAGTKKRVITLRKSLVHHSRQAV ENIELKFDITTSKFGHRGFTQAEKRAFNGPQKRLKEKETPETSGLD
130	>ipi IP100166768 IP100166768.3 TUBA1C PROTEIN. MRECSIHVQAGVQIGNACNELYCLGHIQPDGQMP\$DKITGGGDSFNFTTSETGAGK HVPRAVVDLEPTVIDEVRTGYRQLFHPQELITGKEDANNYARGHYTIGKEIIDLVLD RIRKLKSFPAKTRHFPATYAPVISAERYHLEQLTVAEITNACFEPANQMVKCDPRHG KYMACCLLYRGDVPKVNAAIATIKTKRTIQFVDMCPTGKVGINYOPTVPPGGDLAK VQRAVCMLSNTTAVAEAWARLDRKFDLMLPLRMRRLQEVILTERMVKSINLCAVLLHS FVLELSYFCVNVYCRLLIKLKKFF

【図 11】

表 5

ID	遺伝子名	数	群	分子機能
PGD	ホスホグルコン酸 デヒドロゲナーゼ	1	1	グルコース代謝プロセス、 Nf2被制御遺伝子
MPO	ミエロペルオキシダーゼ	2	1	酸化ストレスに反応、抗アポトーシス、 防御反応
HSPA8	熱ショック70kDaタンパク質8	3	1	細胞周期の調節、 変性タンパク質に反応
TMSL3	チモンβ-4-様3	4	1	細胞骨格組織
S100A8	S100カルシウム結合タンパク質 A8	6	1	防御反応、炎症反応
S100A9	S100カルシウム結合タンパク質 A9	7	1	細胞運動、防御反応、炎症反応
SOD1	スーパーオキシジスムターゼ1、 可溶	18	1	MAPKKKカスケード、反応性酸素種に 反応、スーパーオキシドに反応
S100A4	S100カルシウム結合タンパク質 A4	30	3	1-kBキナーゼ/NF-κBカスケードの 阻害制御、カルシウムイオン結合
G6PD	グルコース-6-リン酸1- デヒドロゲナーゼ	16	2	酸化ストレスに対する細胞反応； グルコース結合、Nf2-被制御遺伝子
SerpinB1	白血球エラスターゼインヒター	31	3	セリン型エンドペプチダーゼインヒター 活性、細胞外空間
SLC3A2	4F2細胞-表面抗原重鎖	27	3	細胞表面、白血球遊走

【図 12 - 1】

表 6

分析物	ペプチド配列	TMT ラベル	m/z (Q1)	m/z (Q3)	フラグ メント イオン型	衝突 エネルギー	開始 時点	停止 時点
PGD	AGQAVDDFIEK	軽	820.944 315	760.456 33	y4	37	10.5	12.5
PGD	AGQAVDDFIEK	軽	820.944 315	766.405 357	b6	31	10.5	12.5
PGD	AGQAVDDFIEK	軽	820.944 315	881.432 3	b7	31	10.5	12.5
PGD	AGQAVDDFIEK	軽	820.944 315	1028.50 0714	b8	35	10.5	12.5
PGD	AGQAVDDFIEK	重	825.954 715	765.466 73	y4	37	10.5	12.5
PGD	AGQAVDDFIEK	重	825.954 715	771.415 757	b6	31	10.5	12.5
PGD	AGQAVDDFIEK	重	825.954 715	886.442 7	b7	31	10.5	12.5
PGD	AGQAVDDFIEK	重	825.954 715	1033.51 1114	b8	35	10.5	12.5
PGD	GILFVSGVSGG EEGAR	軽	908.481 596	508.345 323	b3	41	11.13	
PGD	GILFVSGVSGG EEGAR	軽	908.481 596	655.413 737	b4	48	11.13	
PGD	GILFVSGVSGG EEGAR	軽	908.481 596	1062.48 1041	y12	42	11.13	
PGD	GILFVSGVSGG EEGAR	軽	908.481 596	1161.54 9455	y13	40	11.13	
PGD	GILFVSGVSGG EEGAR	重	910.986 796	513.355 723	b3	41	11.13	
PGD	GILFVSGVSGG EEGAR	重	910.986 796	660.424 137	b4	48	11.13	
PGD	GILFVSGVSGG EEGAR	重	910.986 796	1062.48 1041	y12	42	11.13	
PGD	GILFVSGVSGG EEGAR	重	910.986 796	1161.54 9455	y13	40	11.13	
PGD	VDDFLANEAK	軽	785.425 758	554.278 031	b3	39	11.12	
PGD	VDDFLANEAK	軽	785.425 758	756.421 007	y5	36	11.12	
PGD	VDDFLANEAK	軽	785.425 758	814.430 509	b5	37	11.12	
PGD	VDDFLANEAK	軽	785.425 758	1016.57 3485	y7	32	11.12	
PGD	VDDFLANEAK	重	790.436 158	559.288 431	b3	39	11.12	
PGD	VDDFLANEAK	重	790.436 158	761.431 407	y5	36	11.12	
PGD	VDDFLANEAK	重	790.436 158	819.440 909	b5	37	11.12	
PGD	VDDFLANEAK	重	790.436 158	1021.58 4885	y7	32	11.12	

【図 12 - 2】

HSPA8	GILDPVEK	軽	653.8804 55	611.33588	b 2 4 9	9.5	11.6
HSPA8	GILDPVEK	軽	653.8804 55	696.42503	y 3 4 0	9.5	11.6
HSPA8	GILDPVEK	軽	653.8804 55	811.45197 3	y 3 5 1	9.5	11.6
HSPA8	GILDPVEK	軽	653.8804 55	936.49965 1	b 3 7 1	9.5	11.6
HSPA8	GILDPVEK	重	658.8908 55	616.34628	b 2 4 9	9.5	11.6
HSPA8	GILDPVEK	重	658.8908 55	701.43543	y 3 4 0	9.5	11.6
HSPA8	GILDPVEK	重	658.8908 55	816.46237	y 3 5 1	9.5	11.6
HSPA8	GILDPVEK	重	658.8908 55	941.51005	b 3 7 1	9.5	11.6
HSPA8	TVTNAVVTVPAYFND SQR	軽	736.0535 96	640.36242	b 4 7 2	11.12	
HSPA8	TVTNAVVTVPAYFND SQR	軽	736.0535 96	711.39954	b 3 5 6	11.12	
HSPA8	TVTNAVVTVPAYFND SQR	軽	736.0535 96	810.46795	b 3 6 2	11.12	
HSPA8	TVTNAVVTVPAYFND SQR	軽	736.0535 96	1097.5010	y 2 9 8	11.12	
HSPA8	TVTNAVVTVPAYFND SQR	軽	737.7237 29	645.37282	b 4 7 2	11.12	
HSPA8	TVTNAVVTVPAYFND SQR	重	737.7237 29	716.40994	b 3 5 6	11.12	
HSPA8	TVTNAVVTVPAYFND SQR	重	737.7237 29	815.47835	b 3 6 2	11.12	
HSPA8	TVTNAVVTVPAYFND SQR	重	737.7237 29	1097.5010	y 2 9 8	11.12	
MPO	VFFASWR	軽	568.8141 9	618.36097	b 2 3 9	12.6	
MPO	VFFASWR	軽	568.8141 9	689.39808	b 2 4 8	12.6	
MPO	VFFASWR	軽	568.8141 9	776.43011	b 2 5 9	12.6	
MPO	VFFASWR	軽	568.8141 9	813.40423	y 2 6 7	12.6	
MPO	VFFASWR	重	571.3193 9	623.37137	b 2 3 9	12.6	
MPO	VFFASWR	重	571.3193 9	694.40848	b 2 4 8	12.6	
MPO	VFFASWR	重	571.3193 9	781.44051	b 2 5 9	12.6	
MPO	VFFASWR	重	571.3193 9	813.40423	y 2 6 7	12.6	
MPO	VVLEGGIDPILR	軽	752.9564 97	498.33984	y 3 4 7	12.7	
MPO	VVLEGGIDPILR	軽	752.9564 97	840.49377	y 3 8 7	12.7	
MPO	VVLEGGIDPILR	軽	752.9564 97	1007.5731	b 3 8 1	12.7	

【図 1 2 - 3】

MPO heavy	VVLEGGIDPI LR	軽	752.95649 7	1082.62043 5	y1 0	3 5	12 7	13. 7
MPO heavy	VVLEGGIDPI LR	重	755.46169 7	498.339844	y4	3 7	12 7	13. 7
MPO heavy	VVLEGGIDPI LR	重	755.46169 7	840.493778	y8	3 7	12 7	13. 7
MPO heavy	VVLEGGIDPI LR	重	755.46169 7	1012.58355 1	b8	1 12	7 7	13. 7
MPO heavy	VVLEGGIDPI LR	重	755.46169 7	1082.62043 5	y1 0	3 5	12 7	13. 7
MPO light	AVSNEIVR	軽	556.32511 9	596.336215	b4	3 1	8.6 8	10. 8
MPO light	AVSNEIVR	軽	556.32511 9	725.378808	b5	3 0	8.6 8	10. 8
MPO light	AVSNEIVR	軽	556.32511 9	816.457393	y7	9 9	8.6 8	10. 8
MPO light	AVSNEIVR	軽	556.32511 9	848.462872	b6	8 8	8.6 8	10. 8
MPO light	AVSNEIVR	重	558.83031 9	601.346615	b4	3 1	8.6 8	10. 8
MPO light	AVSNEIVR	重	558.83031 9	730.489208	b5	0 0	8.6 8	10. 8
MPO light	AVSNEIVR	重	558.83031 9	816.457393	y7	2 9	8.6 8	10. 8
MPO light	AVSNEIVR	重	558.83031 9	843.473272	b6	8 8	8.6 8	10. 8
MPO light	FPTDQLTPDQ ER	軽	835.92084	644.299829	y5	3 9	10 9	11. 9
MPO light	FPTDQLTPDQ ER	軽	835.92084	986.490149	y8	4 4	10 9	11. 9
MPO light	FPTDQLTPDQ ER	軽	835.92084	1027.54185	b7	3 7	10 9	11. 9
MPO light	FPTDQLTPDQ ER	軽	835.92084	1299.61753 5	y1 1	7 7	10 9	11. 9
MPO light	FPTDQLTPDQ ER	重	848.42604	644.299829	y5	3 9	10 9	11. 9
MPO light	FPTDQLTPDQ ER	重	848.42604	986.490149	y8	4 4	10 9	11. 9
MPO light	FPTDQLTPDQ ER	重	848.42604	1032.55225	b7	3 7	10 9	11. 9
MPO light	FPTDQLTPDQ ER	重	848.42604	1299.61753 5	y1 1	7 7	10 9	11. 9
S10A4	ELPSFLGK	軽	669.90119	775.467229	y5	3 0	11. 5	13. 4
S10A4	ELPSFLGK	軽	669.90119	872.519993	y6	2 9	11. 5	13. 4
S10A4	ELPSFLGK	軽	669.90119	985.604057	y7	2 8	11. 5	13. 4
S10A4	ELPSFLGK	重	674.91159	780.477629	y5	3 0	11. 5	13. 4
S10A4	ELPSFLGK	重	674.91159	877.530393	y6	2 9	11. 5	13. 4
S10A4	ELPSFLGK	重	674.91159	990.614457	y7	2 8	11. 5	13. 4

【図 1 2 - 4】

S10A8	ALNSIIDVYHK	軽	574.33537 5	610.351865	b	4	3	11. 4	12. 9
S10A8	ALNSIIDVYHK	軽	574.33537 5	723.435929	b	5	2	11. 7	12. 9
S10A8	ALNSIIDVYHK	軽	574.33537 5	885.478856	y	5	2	11. 6	12. 9
S10A8	ALNSIIDVYHK	軽	574.33537 5	951.546936	b	5	2	11. 7	12. 9
S10A8	ALNSIIDVYHK	重	577.67564 2	615.362265	b	3	1	11. 4	12. 9
S10A8	ALNSIIDVYHK	重	577.67564 2	728.446329	b	2	11. 5	12. 4	9
S10A8	ALNSIIDVYHK	重	577.67564 2	890.489256	y	2	11. 5	12. 4	9
S10A8	ALNSIIDVYHK	重	577.67564 2	956.557336	b	2	11. 7	12. 4	9
S10A9	LGHPTDLNQGEFK	軽	635.34471	704.39373	y	2	4	11. 5	6
S10A9	LGHPTDLNQGEFK	軽	635.34471	946.495235	y	2	6	10 6	11. 6
S10A9	LGHPTDLNQGEFK	軽	635.34471	958.53162	b	2	7	10 5	11. 6
S10A9	LGHPTDLNQGEFK	軽	635.34471	1072.57454	b	2	8	10 8	11. 6
S10A9	LGHPTDLNQGEFK	重	648.68497 7	709.40413	y	2	4	10 5	11. 6
S10A9	LGHPTDLNQGEFK	重	648.68497 7	951.505635	y	2	6	10 6	11. 6
S10A9	LGHPTDLNQGEFK	重	648.68497 7	963.54202	b	2	7	10 5	11. 6
S10A9	LGHPTDLNQGEFK	重	648.68497 7	1077.58494	b	2	8	10 8	11. 6
S10A9	NIETIINTFHQYSV K	軽	752.41664 6	682.372994	b	4	12. 4	14. 2	
S10A9	NIETIINTFHQYSV K	軽	752.41664 6	720.42503	y	3	12. 4	14. 2	
S10A9	NIETIINTFHQYSV K	軽	752.41664 6	795.457058	b	4	12. 5	14. 2	
S10A9	NIETIINTFHQYSV K	軽	752.41664 6	908.541122	b	3	12. 6	14. 2	
S10A9	NIETIINTFHQYSV K	重	755.75691 4	687.483394	b	4	12. 4	14. 2	
S10A9	NIETIINTFHQYSV K	重	755.75691 2	725.43543	y	3	12. 5	14. 2	
S10A9	NIETIINTFHQYSV K	重	755.75691 2	800.467458	b	4	12. 5	14. 2	
S10A9	NIETIINTFHQYSV K	重	755.75691 2	913.551522	b	3	12. 6	14. 2	
SOD1	GDGPVQGIINFEQK	軽	650.69199 9	628.362429	y	2	11. 8	13 3	
SOD1	GDGPVQGIINFEQK	軽	650.69199 9	650.346779	y	2	11. 5	13 3	

【図 1 2 - 5】

SOD1	GDGPVQGIINFE QK	軽	650.69199 9	835.426821	b	2	7	11. 3	13
SOD1	GDGPVQGIINFE QK	軽	650.69199 9	948.510885	b	2	7	11. 3	13
SOD1	GDGPVQGIINFE QK	重	654.03226 5	633.372829	y	2	3	11. 8	13
SOD1	GDGPVQGIINFE QK	重	654.03226 5	655.357179	b	3	4	11. 3	13
SOD1	GDGPVQGIINFE QK	重	654.03226 5	840.437221	b	2	7	11. 3	13
SOD1	GDGPVQGIINFE QK	重	654.03226 5	953.521285	b	2	7	11. 3	13
TMSL3	ETIEQEK	軽	662.86754 5	628.362429	y	3	4	8.4 5	10. 5
TMSL3	ETIEQEK	軽	662.86754 5	697.37266	b	3	4	8.4 5	10. 5
TMSL3	ETIEQEK	軽	662.86754 5	757.405023	y	3	4	8.4 5	10. 5
TMSL3	ETIEQEK	軽	662.86754 5	971.536765	y	3	6	8.4 5	10. 5
TMSL3	ETIEQEK	重	667.87794 5	633.372829	y	3	4	8.4 5	10. 5
TMSL3	ETIEQEK	重	667.87794 5	702.48306	b	3	4	8.4 5	10. 5
TMSL3	ETIEQEK	重	667.87794 5	762.415423	y	3	4	8.4 5	10. 5
TMSL3	ETIEQEK	重	667.87794 5	976.547165	y	3	6	8.4 5	10. 5
TMSL3	NPLPSK	軽	552.34076 9	555.346051	y	2	8	9.1 1	11. 1
TMSL3	NPLPSK	軽	552.34076 9	668.430115	y	2	4	9.1 1	11. 1
TMSL3	NPLPSK	軽	552.34076 9	765.482879	y	2	5	9.1 1	11. 1
TMSL3	NPLPSK	重	557.35116 9	560.356451	y	2	3	9.1 1	11. 1
TMSL3	NPLPSK	重	557.35116 9	673.440515	y	2	4	9.1 1	11. 1
TMSL3	NPLPSK	重	557.35116 9	770.493279	y	2	5	9.1 1	11. 1
optiona 1									
G6PD	VQPNEAVYTK	軽	798.9494	635.372266	y	4	2	9.5 5	11. 5
G6PD	VQPNEAVYTK	軽	798.9494	805.477794	y	3	9	9.5 5	11. 5
G6PD	VQPNEAVYTK	軽	798.9494	863.458121	b	6	6	9.5 5	11. 5
G6PD	VQPNEAVYTK	軽	798.9494	962.526535	b	4	7	9.5 5	11. 5
G6PD	VQPNEAVYTK	軽	798.9494	1145.61607 8	y	3	8	9.5 5	11. 5
G6PD	VQPNEAVYTK	重	803.9598	640.482666	y	4	2	9.5 5	11. 5

【図 1 2 - 6】

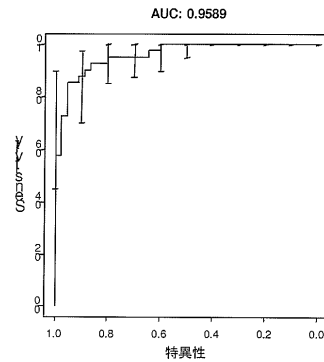
G6PD	VQPNEAVYTK	重	803.9598	810.48819	y	5	3	9.5 5	11.5
G6PD	VQPNEAVYTK	重	803.9598	868.46852	b	3	6	9.5 4	11.5
G6PD	VQPNEAVYTK	重	803.9598	967.53693	b	4	7	9.5 2	11.5
G6PD	VQPNEAVYTK	重	803.9598	1150.6264	y	3	8	9.5 5	11.5
SERPINB 1	TYNFLPEFLVST QK	軽	712.3950 71	687.39954	y	2	4	12.7 5	14.7
SERPINB 1	TYNFLPEFLVST QK	軽	712.3950 71	750.37807	b	3	4	12.7 6	14.7
SERPINB 1	TYNFLPEFLVST QK	軽	712.3950 71	863.46214	b	2	5	12.7 7	14.7
SERPINB 1	TYNFLPEFLVST QK	軽	712.3950 71	1089.5575	b	2	7	12.7 7	14.7
SERPINB 1	TYNFLPEFLVST QK	軽	712.3950 71	1236.6259	b	2	8	12.7 4	14.7
SERPINB 1	TYNFLPEFLVST QK	重	715.7353 37	692.40994	y	2	3	12.7 4	14.7
SERPINB 1	TYNFLPEFLVST QK	重	715.7353 37	755.48847	b	3	4	12.7 6	14.7
SERPINB 1	TYNFLPEFLVST QK	重	715.7353 37	868.47254	b	2	5	12.7 7	14.7
SERPINB 1	TYNFLPEFLVST QK	重	715.7353 37	1094.5679	b	2	7	12.7 5	14.7
SERPINB 1	TYNFLPEFLVST QK	重	715.7353 37	1241.6363	b	2	8	12.7 4	14.7
SLC3A2	GLVLGPIHK	軽	461.2998 25	494.32967	b	2	3	10.4 9	12.4
SLC3A2	GLVLGPIHK	軽	461.2998 25	607.41373	b	2	4	10.4 9	12.4
SLC3A2	GLVLGPIHK	軽	461.2998 25	621.40423	y	2	3	10.4 6	12.4
SLC3A2	GLVLGPIHK	軽	461.2998 25	664.4352	b	2	5	10.4 3	12.4
SLC3A2	GLVLGPIHK	軽	461.2998 25	874.57202	b	2	7	10.4 3	12.4
SLC3A2	GLVLGPIHK	重	464.6400 92	499.34007	b	2	3	10.4 9	12.4
SLC3A2	GLVLGPIHK	重	464.6400 92	612.42413	b	2	4	10.4 9	12.4
SLC3A2	GLVLGPIHK	重	464.6400 92	626.41463	y	2	3	10.4 6	12.4
SLC3A2	GLVLGPIHK	重	464.6400 92	669.4456	b	2	5	10.4 3	12.4
SLC3A2	GLVLGPIHK	重	464.6400 92	879.58242	b	2	7	10.4 3	12.4

【図 13】

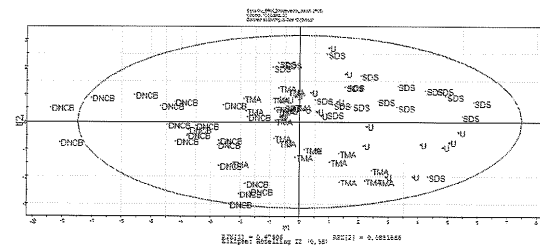
表 7

タンパク質	ペプチド	p-値 (Tukey HSD) 群	刺激剤-対- アレルゲン
TMSL3	NPLPSK	0.000	0.000
TMSL3	ETIEQEK	0.000	0.000
S100A8	ALNSIIDVYHK	0.012	0.069
S100A9	LGHPDTLNQGEFK	0.007	0.000
S100A9	NIETIINTFHQYSVK	0.007	0.000
MPQ_light	AVSNEIVR	0.041	0.002
MPQ_light	SPTLGASNR	0.002	0.004
MPQ_light	FPTDQLTPDQER	0.018	0.002
MPQ_heavy	VFFASWR	0.000	0.000
MPQ_heavy	QALAQISLPR	0.012	0.029
MPQ_heavy	IANVFTNAFR	0.001	0.000
MPQ_heavy	QNQIAVDEIR	0.000	0.000
MPQ_heavy	VVLEGGIDPILR	0.000	0.001
SOD1	GDGPVQGIINFEQK	0.032	0.089
S100A4	ELPSFLGK	0.031	0.000
HSPA8	GTLDPVEK	0.010	0.005
HSPA8	TVTNVTVVPAYFNDSSQR	0.813	0.865
PGD	VDDFLANEAK	0.163	0.001
PGD	AGQAVDDPIEK	0.011	0.000
PGD	GILFVGSGVSGGEGAR	0.303	0.020

【図 14】



【図 15】



【配列表】

2014524015000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成26年2月18日(2014.2.18)

【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】

試験化合物の感作ポテンシャルを決定するin vitroの方法であって、

(a)前記試験化合物を細胞と接触させるステップ；

(b)前記細胞における、表1、表1(A)グループ1、表1(B)グループ2、表1(C)グループ3またはそれらの組み合わせから選択される複数のマーカータンパク質の存在または発現レベルの変化を決定するステップ；および

(c)前記存在または発現のレベルの変化に基づいて前記試験化合物の感作ポテンシャルを決定する(ここで、前記複数のマーカータンパク質の存在もしくは発現のレベルの変化は前記試験化合物が感作ポテンシャルを有することを示す)ステップを含むものである前記方法。

【請求項 2】

前記細胞が皮膚、肺または免疫系から成る群より選択される代表的な細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記免疫系の細胞が樹状細胞である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記細胞が樹状様特性を持つヒトまたは動物細胞株由来である、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞がリンパ様または骨髄細胞株由来である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞株がTHP-1、U937およびMutz-3細胞から成る群より選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記複数のマーカートンパク質が表1(A)グループ1から選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

前記複数のマーカートンパク質が表1(B)グループ2から選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】

前記複数のマーカートンパク質が表5から選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 10】

ステップ(b)が複数のタンパク質マーカの存在または発現レベルを参照レベルと比較するステップを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ(b)が細胞を前記マーカートンパク質または前記マーカートンパク質をコードする核酸配列と選択的に結合する少なくとも1つの特異的結合メンバーと接触させるステップ；および前記特異的結合メンバーとマーカートンパク質または前記マーカートンパク質をコードする核酸配列により形成される複合体を検出および/または定量するステップを含むものである、請求項 1 ~ 10 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 12】

前記決定するステップが複数のマーカートンパク質の既知の発現レベルの標準を用いる標準曲線を準備するステップおよび試験化合物と接触させた細胞を用いて得た読取値を比較して複数のマーカートンパク質の発現レベルの変化の測定値を得るステップを含むものである、請求項 1 ~ 11 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 13】

前記特異的結合メンバーが前記マーカートンパク質と特異的かつ選択的に結合する抗体またはそのフラグメントであってもよい、請求項 11 または請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記特異的結合メンバーが前記マーカートンパク質と特異的かつ選択的に結合する自己抗体またはそのフラグメントであり、前記自己抗体は皮膚または肺刺激またはアレルギーのある患者から得た血液サンプルから調製されたものである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

特異的結合メンバーがアプタマーである、請求項 11 または請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

ステップ(b)を質量分析により実施する、請求項 1 ~ 10 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 17】

ステップ(b)をタンパク質マーカ由来のペプチドに対する1以上の遷移を用いる選択反応モニタリング；

(i) 試験下の細胞中のペプチドレベルを、細胞の感受性を表すことが先に決定されたペプチドレベルと比較するステップ、および

(ii) 前記複数のマーカートンパク質の発現の変化に基づいて試験化合物の感受性ポテンシャルを決定するステップ

により実施する、請求項 1 ~ 10 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 18】

ステップ(i)が、既知量の対応する合成ペプチドを用いて試験下の細胞からのマーカートンパク質由来のペプチドの量を決定するステップを含み、ここで合成ペプチドは標識を除いて細胞から得られるペプチドと配列が同一である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

標識は異なる質量または重同位体のタグである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

ステップ(b)が試験化合物と接触後の細胞中の前記複数のマーカートンパク質をコードするmRNAの存在および量を決定するステップを含むものである、請求項 1 ~ 12 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 21】

mRNAの存在または量を、タンパク質マーカをコードする遺伝子またはそれらの相補体の配列と選択的に結合するプライマーまたはプローブを用いて決定する、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

結合メンバーが固体支持体上に固定された、請求項 11 ~ 21 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 23】

複数のマーカートンパク質または前記マーカートンパク質をコードする核酸配列と特異的かつ選択的に結合することができる複数の結合メンバーを含むものである固体支持体。

【請求項 24】

表1から選択されるタンパク質マーカ断片と同一である配列を有する合成ペプチドであって、前記断片がトリプシンによるタンパク質マーカの消化後にArgC、AspN または Lys-C消化物であることが決定されている前記合成ペプチド。

【請求項 25】

さらに標識を含むものである、請求項 24 に記載の合成ペプチド。

【請求項 26】

標識が重同位体である、請求項 25 に記載の合成ペプチド。

【請求項 27】

選択反応モニタリングに使用する、請求項 24 ~ 26 のいずれか1項に記載の合成ペプチド。

【請求項 28】

前記タンパク質マーカが表5から選択される、請求項 24 ~ 27 のいずれか1項に記載の合成ペプチド。

【請求項 29】

試験化合物の感作ポテンシャルをin vitroで決定するために使用するキットであって、利用者が表1に与えられた複数のマーカートンパク質またはその断片、前記マーカートンパク質に対する複数の抗体、および前記マーカートンパク質またはその断片をコードする核酸分子から選択される複数の分析物の試験下の細胞中の存在または発現レベルを決定することを可能にするキットであり、かつ

(a)分析物と結合することができる結合メンバーがその上に固定された固体支持体；

(b)標識を含む現像剤；および、任意に

(c)洗浄液、希釈剤およびバッファーから成る群より選択される1以上の成分を含むものである前記キット。

【請求項 30】

結合メンバーが表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(C)グループ3あるいはそれらの組み合わせから選択されるマーカートンパク質と選択的に結合できる抗体である、請求項 29 に記載のキット。

【請求項 31】

前記結合メンバーが表5から選択されるマーカートンパク質と選択的に結合できる抗体

である、請求項 30 に記載のキット。

【請求項 32】

結合メンバーが前記マーカートンパク質をコードする核酸と選択的に結合できる核酸配列である、請求項 29 に記載のキット。

【請求項 33】

試験化合物の感作ポテンシャルを *in vitro* で決定するために使用するキットであって、利用者が表1に与えられた複数のマーカートンパク質またはその断片の試験下の細胞中の存在または発現レベルを決定することを可能にするキットであり；

(a) アッセイに適合しうるフォーマットの参照ペプチドのセット（ここでセット中の各ペプチドは表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(c)グループ3あるいはそれらの組み合わせに与えられた記載の複数のマーカートンパク質のそれぞれを一意的に表すものである）；および

任意に(c)洗浄液、希釈剤およびバッファーから成る群より選択される1以上の成分を含む前記キット。

【請求項 34】

アレルゲンまたは刺激物質に曝された個体における、前記アレルゲンまたは刺激物質による接触または呼吸感作を診断または予後モニタリングする方法であって、

(a) 前記個体から得た生体サンプル中の、表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(c)グループ3から選択される複数のタンパク質マーカ―または前記タンパク質マーカ―もしくはその部分をコードする核酸の存在または発現レベルを決定するステップを含むものである前記方法。

【請求項 35】

生体サンプルが皮膚細胞、肺細胞、または免疫系細胞から選択される細胞を含むものである、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記複数のマーカートンパク質が表5から選択される、請求項 34 または請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

アレルゲンまたは刺激物質に曝された個体における、前記アレルゲンまたは刺激物質による接触または呼吸感作を診断または予後モニタリングするキットであって、

(a) 複数の結合メンバー（ここで、各結合メンバーは表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；または表1(c)グループ3から成る群より選択されるタンパク質マーカ―；またはタンパク質マーカ―もしくはそれらの断片をコードする核酸と選択的に結合するものである）がその上に固定された固体支持体；

(b) 標識を含む現像剤；および

(c) 洗浄液、希釈剤およびバッファーから選択される1以上の成分を含むものである前記キット。

【請求項 38】

前記複数のタンパク質マーカ―が表5から選択される、請求項 37 に記載のキット。

【請求項 39】

化学感作物質に対する個体の診断または予後モニタリングに用いるための、表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；表1(c)グループ3、または表5から選択される複数のタンパク質マーカ―。

【請求項 40】

化学感作物質に対する個体の *in vitro* 診断および予後モニタリングのための、表1、表1(A)グループ1；表1(B)グループ2；表1(c)グループ3、または表5から選択される複数のタンパク質マーカ―の使用。

【請求項 41】

化学感作物質に対する個体の *in vitro* 診断および予後モニタリングのための、表1または表5に記載の1以上のマーカートンパク質またはその断片、前記マーカートンパク質に対

する1以上の抗体および前記マーカートンパク質またはその断片をコードする1以上の核酸分子から選択される、分析物と結合することができる複数の結合メンバーの使用。

【請求項42】

前記結合メンバーが固体支持体に固定されている、請求項41に記載の使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2012/051390

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/50 C07K14/00
ADD.

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)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	H OTT ET AL: "High-Resolution Transcriptional Profiling of Chemical-Stimulated Dendritic Cells Identifies Immunogenic Contact Allergens, but Not Prohaptens", SKIN PHARMACOL PHYSIOL, vol. 23, no. 4, 30 April 2010 (2010-04-30) , pages 213-224, XP55035598, DOI: 10.1159/000313897 abstract; table 1 ----- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 October 2012

Date of mailing of the international search report

23/10/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rosin, Oliver

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2012/051390

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LAMBRECHTS N ET AL: "THP-1 monocytes but not macrophages as a potential alternative for CD34<+> dendritic cells to identify chemical skin sensitizers", TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 236, no. 2, 15 April 2009 (2009-04-15), pages 221-230, XP026029805, ISSN: 0041-008X, DOI: 10.1016/J.TAAP.2009.01.026 [retrieved on 2009-02-11] abstract; table 2	1
A	----- N. LAMBRECHTS ET AL: "Assessment of Chemical Skin-Sensitizing Potency by an In Vitro Assay Based on Human Dendritic Cells", TOXICOLOGICAL SCIENCES, vol. 116, no. 1, 7 April 2010 (2010-04-07), pages 122-129, XP55035599, ISSN: 1096-6080, DOI: 10.1093/toxsci/kfq108 abstract; figure 1; table 1	1
X	----- VERSTRAELEN S ET AL: "Gene profiles of THP-1 macrophages after in vitro exposure to respiratory (non-)sensitizing chemicals: Identification of discriminating genetic markers and pathway analysis", TOXICOLOGY IN VITRO, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol. 23, no. 6, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 1151-1162, XP026437429, ISSN: 0887-2333 [retrieved on 2009-06-13] abstract	1-32, 34-36, 40-42
A	----- D BASKETTER ET AL: "Skin Irritation and Sensitization: Mechanisms and New Approaches for Risk Assessment", SKIN PHARMACOL PHYSIOL, vol. 21, 29 May 2008 (2008-05-29), pages 191-202, XP55035612, chapter "In vitro Alternatives"	1
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2012/051390

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	1. KIMBER ET AL: "Chemical Allergy: Translating Biology into Hazard Characterization", TOXICOLOGICAL SCIENCES, vol. 120, no. Supplement 1, 22 November 2010 (2010-11-22), pages S238-S268, XP55035627, ISSN: 1096-6080, DOI: 10.1093/toxsci/kfq346 S244 left col second par. -----	1
A	PETRA BUDDE ET AL: "Protein Profiling Using Tandem Mass Tags (TMT) to identify Skin Sensitizing Chemicals in Human Cell Culture Models", 58TH ASMS CONFERENCE ON MASS SPECTROMETRY, 16 April 2010 (2010-04-16), page TP226, XP55035593, abstract -----	1
X	Eiaab: "Human Phosphogluconate dehydrogenase, PGD ELISA Kit", 23 May 2011 (2011-05-23), XP55035899, Retrieved from the Internet: URL: http://www.uscnlife.com.cn/UploadFile/file95902.pdf [retrieved on 2012-08-21] the whole document -----	23-31, 33,37-42
X	R. J. VANDEBRIEL ET AL: "Keratinocyte Gene Expression Profiles Discriminate Sensitizing and Irritating Compounds", TOXICOLOGICAL SCIENCES, vol. 117, no. 1, 20 June 2010 (2010-06-20), pages 81-89, XP55040503, ISSN: 1096-6080, DOI: 10.1093/toxsci/kfq182 table 1 -----	1,2,4, 8-13, 20-29, 32,34-36
T	Petra Budde ET AL: "Protein Biomarker Profiles Discriminate between Sensitizing and Irritating Chemicals in Cell-Based Assays", 28 February 2012 (2012-02-28), XP55040510, Retrieved from the Internet: URL: http://www.proteomics.com/docs/20120228_PBudde_SOT12.pdf [retrieved on 2012-10-10] the whole document ----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2012/051390

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kamiya Biomedical Company: "Human Superoxide Dismutase 1, Soluble (SOD1) ELISA", 26 April 2011 (2011-04-26), pages 1-7, XP55040538, Retrieved from the Internet: URL: http://www.kamiyabiomedical.com/pdf/KT-28990.pdf [retrieved on 2012-10-10] the whole document -----	23-31, 33,37-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2012/051390**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ 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.:

1-42 (partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The 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/ GB2012/ 051390

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-7, 9-42(all partially)

Methods, supports, peptides, kits and uses comprising PDG as biomarker in the context of allergenic sensitizing.

2-130. claims: 1-42(partially)

Methods, supports, peptides, kits and uses comprising MPO (invention 2), ... up to ... TUBA1C (invention 130) as biomarker in the context of allergenic sensitizing, in as far as mentioned in the corresponding tables.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/543 5 0 1 A	
	G 0 1 N 33/53	Y
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, 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, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, I D, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(74) 代理人 100125508

弁理士 藤井 愛

(74) 代理人 100144794

弁理士 大木 信人

(72) 発明者 スコフィールド, エマ

イギリス国 ケイティー 1 1 3 イーピー サリー, コバム, ダウンサイド ブリッジ ロード, カバム ハウス

(72) 発明者 ユング, シュテファン

ドイツ連邦共和国 5 5 1 2 2 マインツ, フリッツ - コール - シュトラーセ 1 5

(72) 発明者 ブッデ, ペトラ

ドイツ連邦共和国 6 0 4 3 7 フランクフルト, アム エンテンブファド 1 4

(72) 発明者 ツヒト, ハンス - ディーター

ドイツ連邦共和国 3 0 5 3 9 ハノーファー, ゲルディングシュトラーセ 1 0 ベー

(72) 発明者 ゼルツァー, シュテファン

ドイツ連邦共和国 6 6 6 7 9 ロスハイム アム ゼー, エーリンガーシュトラーセ 9

(72) 発明者 コンカレビック, ササ

ドイツ連邦共和国 9 7 5 2 6 ゼンフェルト, プファーラー - ジクスト シュトラーセ 1 6

(72) 発明者 クーン, カルステン

ドイツ連邦共和国 6 5 7 1 9 ホフハイム アム タウヌス, ウーピアシュトラーセ 1 3

(72) 発明者 バイク, イアン

イギリス国 ケイティー 1 1 3 イーピー サリー, コバム, ダウンサイド ブリッジ ロード, カバム ハウス

F ターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA24 AA25 AA40 BA13 BB20 CA26 CB01 CB03

CB26 DA14 DA20 DA36 FA34 FB01 FB02 FB03 FB06 FB12

FB15 GC15 JA01 JA06

4B024 AA11 CA12 DA03 HA14

4B029 AA07 BB17 BB20 CC03 CC08 FA12

4B063 QA13 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QQ79 QR36 QR48

QR62 QR72 QR77 QS33 QS34 QS39 QX01 QX10

4B064 AG27 CA19 CC24 DA13

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 DA86 EA50 FA34
FA71

专利名称(译)	确定化合物敏感性的材料和方法		
公开(公告)号	JP2014524015A	公开(公告)日	2014-09-18
申请号	JP2014515293	申请日	2012-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	电泳有限公司		
申请(专利权)人(译)	电Foret的遗传学有限公司		
[标]发明人	スコフィールドエマ ユングシュテファン ブッデペトラ ツヒトハンスディーター ゼルツァーシュテファン コンカレビクササ クーンカルステン パイクイアン		
发明人	スコフィールド,エマ ユング,シュテファン ブッデ,ペトラ ツヒト,ハンス-ディーター ゼルツァー,シュテファン コンカレビク,ササ クーン,カルステン パイク,イアン		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02 C12Q1/68 C12N15/09 C12M1/34 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/543 C12P21/08		
CPC分类号	G01N33/5008 C12Q1/68 G01N33/5023 G01N33/5047 G01N2500/04 G01N2500/10 G01N2800/24		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.Q C12Q1/02 C12Q1/68.A C12N15/00.F C12M1/34.Z C07K14/47 C07K16/18 G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/543.501.A G01N33/53.Y C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB26 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FA34 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB12 2G045/FB15 2G045/GC15 2G045/JA01 2G045/JA06 4B024/AA11 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/BB17 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA12 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX10 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA34 4H045/FA71		
代理人(译)	荒井英一 藤井 爱 Nobuto 滤纸冲		
优先权	2011010371 2011-06-17 GB		
其他公开文献	JP6232375B2		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

[illegible]

Figure 1