

(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2010-524427

(P2010-524427A)

(43) 公表日 平成22年7月22日 (2010.7.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 2 4
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 67 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-505781 (P2009-505781)	(71) 出願人	504389991
(86) (22) 出願日	平成19年4月19日 (2007.4.19)		ノバルティス アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成20年12月17日 (2008.12.17)		スイス国 ツェーハー 4002 バーゼル、リヒトシュトラッセ 35
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/003437	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開番号	W02007/121922		弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開日	平成19年11月1日 (2007.11.1)	(74) 代理人	100101454
			弁理士 山田 卓二
		(74) 代理人	100067035
			弁理士 岩崎 光隆
		(74) 代理人	100062144
			弁理士 青山 稔
		(72) 発明者	ペーター・グラス
			ドイツ連邦共和国デー 79650 ショッ プフハイム、ライトバッハ 27 エフ番
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 慢性移植片機能障害のためのバイオマーカー

(57) 【要約】

本発明は移植片拒絶において調整される遺伝子の分析および同定に関する。この遺伝子発現の改変は移植片拒絶を正確に検出するための分子署名を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) 対象から移植後試料を入手すること；
(b) 表 2 で同定された遺伝子からなる群から選択される複数の遺伝子の組み合わせの移植後試料における遺伝子発現のレベルを決定すること；
(c) 移植後試料における少なくとも一つの遺伝子の遺伝子発現強度を対照試料における同一遺伝子の遺伝子発現強度と比較すること；および
(d) 少なくとも一つの遺伝子の発現レベルが対照試料と相対して上方調節されているか、または下方調節されているかを決定することであって、ここで少なくとも一つの遺伝子の上方調節または下方調節は対象が移植片拒絶を経験する可能性があることを示し、それにより対象における移植器官の拒絶の発症を評価すること；
の工程を含む、対象において移植器官の拒絶の発症を評価するための方法。

10

【請求項 2】

試料が対象から得られた細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

試料が：グラフト生検サンプル；血液；血清；および尿からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

拒絶が慢性 / 硬化性同種移植腎症である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

試料における発現強度が対照の発現強度と少なくとも約 1.1 倍異なる、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6】

試料における発現強度が対照の発現強度と少なくとも約 1.5 倍異なる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

(a) 対象から移植後試料を入手すること；
(b) 表 2 で同定された遺伝子からなる群から選択される複数の遺伝子の組み合わせの移植後試料における遺伝子発現のレベルを決定すること；および
(c) 移植後試料における遺伝子の組み合わせの遺伝子発現パターンを対照試料における遺伝子の同一の組み合わせの遺伝子発現のパターン比較することであって、ここで対照試料発現プロフィールにおける遺伝子の同一の組み合わせの発現パターンと比較して移植後試料における遺伝子の組み合わせの遺伝子発現パターンの発現パターンにおける類似性は、対象が移植片拒絶を経験する可能性があることを示し、それにより対象における移植器官の拒絶の発症を評価すること；
の工程を含む、対象における移植器官の拒絶の発症を評価するための方法。

30

【請求項 8】

試料が対象から得られた細胞を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

試料が：グラフト生検；血液；血清；および尿からなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 10】

拒絶が慢性 / 硬化性同種移植腎症である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

(a) 対象から移植後試料を入手すること；
(b) 表 2 で同定された遺伝子からなる群から選択される複数の遺伝子の組み合わせの移植後試料における遺伝子発現のレベルを決定すること；および
(c) 移植後試料における遺伝子の組み合わせの遺伝子発現パターンを対照試料における遺伝子の同一の組み合わせの遺伝子発現のパターンと比較することであって、ここで対照試料発現プロフィールにおける遺伝子の同一の組み合わせの発現パターンと比較して、移

50

植後試料における遺伝子の組み合わせの遺伝子発現パターンの発現パターンにおける類似性は移植片拒絶の等級を示し、それにより対象における移植器官の拒絶の進行を評価すること；

の工程を含む、対象における移植器官の拒絶の進行を評価するための方法。

【請求項 1 2】

試料が対象から得られた細胞を含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

試料が：グラフト生検；血液；血清；および尿からなる群から選択される、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

拒絶が慢性 / 硬化性同種移植腎症である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

移植片拒絶の段階が：等級 I；等級 II；および等級 III からなる群から選択される、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

(a) 拒絶を発達させることが分からない移植された対象から得られた試料における複数の遺伝子の組み合わせの遺伝子発現強度をベースライン値として取ること；

(b) 移植後の患者から得られた試料における複数の遺伝子の組み合わせに相当する遺伝子発現強度を検出すること；および

(c) 第 1 の値を第 2 の値と比較することであって、ここで第 2 の値よりも低いかまたは高い第 1 の値は移植された対象が拒絶を発達させる危険性を有することを予測し、ここで複数の遺伝子は表 2 で同定された遺伝子の群から選択される；

の工程を含む、対象における移植片拒絶をモニタリングする方法。

【請求項 1 7】

(a) 移植の日にドナー対象から得られた試料からの複数の遺伝子の組み合わせに相当する遺伝子発現のパターンを検出すること；

(b) 移植後のレシピエント対象から得られた試料からの複数の遺伝子に相当する遺伝子発現のパターンを検出すること；および

(c) 第 1 の値を第 2 の値と比較することであって、ここで第 2 の値よりも低いかまたは高い第 1 の値はレシピエント対象が拒絶を発達させる危険性を有することを予測し；ここで複数の遺伝子は表 2 で同定された遺伝子からなる群から選択される；

の工程を含む、対象における移植片拒絶をモニタリングする方法。

【請求項 1 8】

(a) 拒絶阻害薬の投与の前に移植された対象から投与前試料を入手すること；

(b) 投与前試料における複数の遺伝子の遺伝子発現のパターンを検出すること；

(c) 移植された対象から一つまたはそれより多い投与後試料を入手すること；

(d) 投与後試料または試料（複数可）における複数の遺伝子の遺伝子発現のパターンを検出すること；

(e) 投与前試料における複数の遺伝子の遺伝子発現のパターンを投与後試料または試料（複数可）における遺伝子発現のパターンと比較すること；および

(f) それにしたがって薬剤を調整することであって、ここで複数の遺伝子は表 2 で同定された遺伝子の遺伝子からなる群から選択される；

の工程を含む、対象における移植片拒絶をモニタリングする方法。

【請求項 1 9】

表 2 で同定された遺伝子の遺伝子からなる群から選択される遺伝子の一つもしくはそれより多い遺伝子またはコードされたその遺伝子生成物の合成、発現または活性を調整する化合物を対象に投与して少なくとも一つの拒絶の症状を軽減させることを含む、かかる処置を必要とする対象において移植片拒絶を防御、阻止、低減または処置するための方法。

【請求項 2 0】

10

20

30

40

50

表 2 で同定された遺伝子からなる群から選択される一つもしくはそれより多い遺伝子または遺伝子生成物の遺伝子発現のレベルをモニタリングすることを含む、移植片拒絶の防御、阻止、低減または処置において使用するための薬剤を同定するための方法。

【請求項 2 1】

移植された対象が腎臓移植された対象である、請求項 1 から 2 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 2】

遺伝子発現のパターンが遺伝子によりコードされるタンパク質の存在を検出することにより評価される、請求項 1 から 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 3】

タンパク質に特異的に結合する試薬を使用してタンパク質の存在を検出する、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

ノーザンブロット分析、逆転写 P C R およびリアルタイム定量 P C R からなる群から選択される技術により遺伝子発現のパターンが検出される、請求項 1 7 から 2 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 5】

複数の遺伝子の遺伝子発現強度が検出される請求項 1 7 から 2 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 6】

表 2 で列挙されるような複数の遺伝子の組み合わせまたはその発現産物の移植片拒絶のためのバイオマーカーとしての使用。

【請求項 2 7】

対象において移植片拒絶を防御または処置するための医薬品の調製のための表 2 で同定されたような一つもしくはそれより多い遺伝子またはその発現産物の合成、活性の発現、を調整する化合物の使用。

【請求項 2 8】

移植片拒絶が慢性 / 硬化性同種移植腎症であり、そして遺伝子は表 2 で同定された遺伝子からなる群から選択される、請求項 1 から 2 7 のいずれかに記載の方法または使用。

【請求項 2 9】

試料が血液、血清および尿からなる群から選択される、請求項 1 6 から 1 8 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(発明の分野)

本発明は一般的にインビトロでの組織試料の分析試験に、そしてさらに特に慢性移植片機能障害、例えば慢性同種移植腎症の臨床診断に有用な遺伝子またはタンパク質ベースの試験に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

(発明の背景)

慢性移植片機能障害は移植後数ヶ月から数年に固形臓器移植片において、最終的にはグラフト不全を招くグラフト機能の徐々の劣化を表示する現象であり、そしてそれは特徴的な組織学的様相を伴う。臨床的には、腎臓グラフトにおける慢性移植片機能障害、例えば慢性 / 硬化性同種移植腎症 (「 C A N 」) は、通常タンパク質尿症および動脈性高血圧を併発する糸球体濾過率の緩徐な進行性の低下として現れる。強力な免疫調節薬および生物薬剤の臨床適用にもかかわらず、慢性拒絶は依然一般的で、そして重篤な移植後合併症である。慢性拒絶は執拗に進行する過程である。

【0 0 0 3】

10

20

30

40

50

特に移植後 1 か月以内の早期グラフト不全の唯一の最も一般的な原因は同種移植片の免疫学的拒絶である。拒絶の好ましくない影響力は：(a) 維持免疫抑制時に併用される高用量抗拒絶治療の使用が移植に随伴される罹患率および死亡率の主要な原因である；(b) 拒絶グラフトの結果である「大衆」HLA 特異性に対する免疫はこの患者集団の再移植を困難にする；ならびに(c) 不全グラフトを有する免疫されたレシビエントが移植待ちの患者に戻るにより永続的な器官不足の問題が深刻化する；という事実により拡大される。

【0004】

生検組織の組織病理学的評価はCANの診断のための究極の判断基準であるが、CANの発症の予測は現在のところ不可能である。現在のモニタリングおよび診断モダリティーは早期段階のCANの診断に適していない。したがって、さらに鋭敏であり、そして特にその早期および/または前臨床状態で拒絶の臨床診断に使用できる分子同定試験が必要とされている。

【発明の開示】

【0005】

(発明の要旨)

本発明はBANFF 97 疾患分類 (Racusen LC, et al., Kidney Int. 55 (2) : 713 - 23 (1999)) をさらに改良するための、遺伝子発現プロファイリングを使用する分子診断方法に関係する。本発明はまた、グラフト機能障害がその他のより便利な手段により未だ検出されない場合、移植後の早期の時点で適用された場合に予測または早期診断用バイオマーカーとしてバイオマーカーを使用するための方法をも提供する。

【0006】

したがって本発明は：(a) 対象から移植後試料を入手すること；(b) 表 2 で同定された遺伝子からなる群から選択される複数の遺伝子の組み合わせの移植後試料における遺伝子発現のレベルを決定すること；(c) 移植後試料における少なくとも一つの遺伝子の遺伝子発現強度を、対照試料における同一遺伝子の遺伝子発現強度と比較すること；および(d) 少なくとも一つの遺伝子の発現レベルが対照試料と相対して上方調節されているか、または下方調節されているかを決定することであって、ここで少なくとも一つの遺伝子の上方調節または下方調節は、対象が移植片拒絶を経験する可能性があることを示し、それにより拒絶の発症を評価すること；の工程を含む、対象において移植器官の拒絶の発症を評価するための方法に関係する。

【0007】

試料は対象から得られた細胞を含む。試料をグラフト生検；血液、血清；および尿からなる群から選択することができる。拒絶は慢性/硬化性同種移植腎症である。試料において上方または下方調節された発現の絶対的な強度は、対照の発現強度と少なくとも約 1.1 倍、または少なくとも約 1.5 倍異なる。

【0008】

別の態様では、本発明は：(a) 対象から移植後試料を入手すること；(b) 表 2 で同定された遺伝子からなる群から選択される複数の遺伝子の組み合わせの移植後試料における遺伝子発現のレベルを決定すること；および(c) 移植後試料における遺伝子の組み合わせの遺伝子発現パターンを、対照試料における遺伝子の同一の組み合わせの遺伝子発現のパターンと比較することであって、ここで対照試料発現プロファイルにおける遺伝子の同一の組み合わせの発現パターンと比較して、移植後試料における遺伝子の組み合わせの遺伝子発現パターンの発現パターンにおける類似性は、対象が移植片拒絶を経験する可能性があることを示し、それにより対象における移植器官の拒絶の発症を評価すること；の工程を含む、対象における移植器官の拒絶の発症を評価するための方法に関係する。

【0009】

別の態様では、本発明は：(a) 対象から移植後試料を入手すること；(b) 表 2 で同定された遺伝子からなる群から選択される複数の遺伝子の組み合わせの移植後試料における遺伝子発現のレベルを決定すること；および(c) 移植後試料における遺伝子の組み合

わせの遺伝子発現パターンを、対照試料における遺伝子の同一の組み合わせの遺伝子発現のパターンと比較することであって、ここで対照試料発現プロフィールにおける遺伝子の同一の組み合わせの発現パターンと比較して、移植後試料における遺伝子の組み合わせの遺伝子発現パターンの発現パターンにおける類似性は移植片拒絶の等級を示し、それにより対象における移植器官の拒絶の進行を評価すること；の工程を含む、対象における移植器官の拒絶の進行を評価するための方法に係する。移植片拒絶の段階を：等級Ⅰ；等級Ⅱ；および等級Ⅲ；からなる群から選択することができる。

【0010】

別の態様では、本発明は：(a) 拒絶を発達させることが分らない移植された対象から得られた試料における複数の遺伝子の組み合わせの遺伝子発現強度をベースライン値として取ること；(b) 移植後の患者から得られた試料における複数の遺伝子の組み合わせに相当する遺伝子発現強度を検出すること；および(c) 第1の値を第2の値と比較することであって、ここで第2の値よりも低いかまたは高い第1の値は、移植された対象が拒絶を発達させる危険性を有することを予測し、ここで複数の遺伝子は表2で同定された遺伝子の群から選択される；の工程を含む、対象における移植片拒絶をモニタリングする方法に係する。

10

【0011】

別の態様では、本発明は：(a) 移植の日にドナー対象から得られた試料からの複数の遺伝子の組み合わせに相当する遺伝子発現のパターンを検出すること；(b) 移植後のレシピエント対象から得られた試料からの複数の遺伝子に相当する遺伝子発現のパターンを検出すること；および(c) 第1の値を第2の値と比較することであって、ここで第2の値よりも低いかまたは高い第1の値は、レシピエント対象が拒絶を発達させる危険性を有することを予測し；ここで複数の遺伝子は表2で同定された遺伝子からなる群から選択される；の工程を含む、対象における移植片拒絶をモニタリングする方法に係する。

20

【0012】

別の態様では、本発明は：(a) 拒絶阻害薬の投与の前に移植された対象から投与前試料を入手すること；(b) 投与前試料における複数の遺伝子の遺伝子発現のパターンを検出すること；(c) 移植された対象から一つまたはそれより多い投与後試料を入手すること；(d) 投与後試料または試料(複数可)における複数の遺伝子の遺伝子発現のパターンを検出すること；(e) 投与前試料における複数の遺伝子の遺伝子発現のパターンを投与後試料または試料(複数可)における遺伝子発現のパターンと比較すること；および(f) それにしたがって薬剤を調整することであって、ここで複数の遺伝子は表2で同定された遺伝子の遺伝子からなる群から選択される；の工程を含む、対象における移植片拒絶をモニタリングする方法に係する。

30

【0013】

別の態様では、本発明は表2で同定された遺伝子の遺伝子からなる群から選択される遺伝子の一つもしくはそれより多い遺伝子またはコードされたその遺伝子生成物の合成、発現または活性を調整する化合物を対象に投与して、少なくとも一つの拒絶の症状を軽減させることを含む、かかる処置を必要とする対象において移植片拒絶を防御、阻止、低減または処置するための方法に係する。

40

別の態様では、本発明は表2で同定された遺伝子からなる群から選択される一つもしくはそれより多い遺伝子または遺伝子生成物の遺伝子発現のレベルをモニタリングすることを含む、移植片拒絶の防御、阻止、低減または処置において使用するための薬剤を同定するための方法に係する。

【0014】

移植された対象は腎臓移植された対象である。遺伝子によりコードされるタンパク質の存在を検出することにより遺伝子発現のパターンを評価することができる。タンパク質に特異的に結合する試薬を使用してタンパク質の存在を検出することができる。ノーザンブロット分析、逆転写PCRおよびリアルタイム定量PCRからなる群から選択される技術により遺伝子発現のパターンを検出することができる。逆転写PCRまたはマイクロアレ

50

イにより一つの遺伝子または複数の遺伝子の組み合わせの遺伝子発現強度を検出することができる。

【0015】

別の態様では、本発明は表2で列挙されるような複数の遺伝子の組み合わせまたはその発現産物の使用に関係する。

別の態様では、本発明は対象において移植片拒絶を防御または処置するための医薬品の調製のための、表2で同定されたような一つもしくはそれより多い遺伝子またはその発現産物の合成、活性の発現、を調整する化合物の使用に関係する。

別の態様では、本発明はいずれかの先行の請求項に記載の方法または使用に関係し、ここで移植片拒絶は慢性/硬化性同種移植腎症であり、そして遺伝子は表2で同定された遺伝子からなる群から選択される。

10

【0016】

(図面の簡単な説明)

図1は慢性拒絶の観察された等級対予測された等級を比較するPLSのデータにより誘導されたグラフである。

図2は応答並べ替えを用いるPLSにより誘導されたバイオマーカーの予測性能を示すグラフである。

【0017】

(発明の詳細な説明)

定義

20

本発明の理解を促すために、多くの用語および語句を以下に定義する：

「下方調節」または「下方調節された」なる用語は本明細書では互換的に用いられ、そして標的遺伝子または標的タンパク質の量の低下を指す。「下方調節」または「下方調節された」なる用語はまた、標的遺伝子または標的タンパク質を伴う過程またはシグナル伝達カスケードにおける低下をも指す。

【0018】

「移植」なる用語は本明細書で使用される際には、一つの対象から「移植片」または「グラフト」と称される細胞、組織または器官を採取し、そしてそれまたはそれらを(通常)異なる対象に配する過程を指す。移植片を提供する対象は「ドナー」と称され、そして移植片を受け取る対象は「レシピエント」と称される。同一種の遺伝的に異なる二つの対象間で移植器官またはグラフトは「同種移植片」と称される。異なる種の対象間で移植されたグラフトは「異種移植片」と称される。

30

「移植片拒絶」なる用語は本明細書で使用される際には、レシピエントにより発現される活性免疫応答のために、そして器官機能障害の非免疫学的原因とは独立して、器官の機能的および構造的劣化として定義される。

【0019】

「慢性同種移植腎症」「CAN」なる用語は本明細書で使用される際には、患者の死亡に関連するもの以外の後期腎同種移植片喪失を指す。それは時間依存的免疫学的原因および非免疫学的原因からのネフロンへの漸進的な損傷を表す。それは慢性間質性線維症、尿細管萎縮、血管閉塞性変化および糸球体硬化症を伴う進行性の腎機能障害を特徴とする。

40

【0020】

「慢性拒絶」なる用語は本明細書で使用される際には、移植後最初の30-120日後に発達する移植器官(例えば腎臓)の拒絶を指す。腎臓では、腎血管の血管内膜の増殖および内膜線維症を伴い、血管の内腔の著明な低下を伴う腎硬化症(腎血管の硬化)の発達が発生する。その結果は最終的に腎不全を伴う腎虚血、高血圧、尿細管萎縮、間質性線維症および糸球体萎縮である。確立されたHLA不適合の影響に加えて、ドナー腎臓の年齢、ネフロン数、および虚血病歴が、移植された患者における究極的な進行性腎不全の原因となり得る。

【0021】

「対象」なる用語は本明細書で使用される際には、免疫応答を惹起する任意の生存生物

50

を指す。対象なる用語には、限定するものではないがヒト、チンパンジーならびにその他の類人猿およびサル種のような非ヒト霊長類；ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびウマのような家畜；イヌおよびネコのような家庭用哺乳動物；マウス、ラットおよびモルモットのようなげっ歯類を含む実験用動物等が含まれる。用語は特定の年齢または性別を示さない。故に雄性であろうと雌性であろうと、成体および新生対象ならびに胎児にまで及ぶと意図される。

【 0 0 2 2 】

「遺伝子」には、転写および翻訳された後、特定のポリペプチドまたはタンパク質をコードすることができる少なくとも一つのオープンリーディングフレームを含有するポリヌクレオチドが含まれる。本明細書に記載されるいずれかのポリヌクレオチド配列を用いて、それらが随伴される遺伝子のより大きなフラグメントまたは全長コード化配列を同定することができる。より大きなフラグメント配列を単離する方法は当分野において公知であり、そのいくつかは本明細書に記載されている。

「遺伝子生成物」には遺伝子が転写および翻訳されたときに作成されるアミノ酸（例えばペプチドまたはポリペプチド）が含まれる。

【 0 0 2 3 】

「遺伝子発現強度」なる用語は本明細書で使用される際には、マーカー遺伝子転写物を定量し、そしてこの量を構成的に発現される遺伝子の転写物の量と比較することを指す。

「遺伝子発現強度」なる用語は「正規化された、または標準化された遺伝子発現の量」を意味する。例えば細胞における全ての遺伝子の全発現は多様である（すなわち一定ではない）。増加した mRNA 転写物の検出が有意であるかどうかを正確に評価するために、試料間の発現のレベルを正確に比較するために遺伝子発現を「正規化する」ことが好ましい、すなわちそれは遺伝子発現が比較されるベースレベルである。マイクロアレイ分析を用いて遺伝子転写物の定量を達成し、そして遺伝子発現強度を正常な腎臓機能を有する試料に相対して計算した、すなわち正常からの相対偏差を測定した。

【 0 0 2 4 】

遺伝子に適用されるような「差次的に発現された」なる用語には、遺伝子から転写された mRNA または遺伝子によりコードされるタンパク質生成物の差次的生成が含まれる。差次的に発現された遺伝子は正常または対照細胞の発現レベルと比較して過剰発現または過少発現され得る。一つの態様では、それには対照試料において検出される発現レベルよりも少なくとも 1.1 倍、1.2 倍、1.3 倍、1.4 倍、1.5 倍、1.6 倍、1.7 倍、1.8 倍、1.9 倍、2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、または少なくとも 10 倍高いまたは低い差次的が含まれる。好ましい実施態様では、発現は対照試料よりも高い。「差次的に発現された」なる用語にはまた対照細胞でサイレントである場合に発現されるか、または対照細胞において発現される場合に発現されない細胞または組織におけるヌクレオチド配列もまた含まれる。とりわけ、この用語は所定の同種移植片の遺伝子発現レベルを指し、そしてベースライン発現レベルに相当する量よりも実質的に多いかまたは少ない量として定義される。本明細書ではベースラインは健常組織における発現のレベルであるとして定義される。健常組織には病理学的知見が含まれない移植器官が含まれる。

【 0 0 2 5 】

「試料」なる用語は本明細書で使用される際には生検から得られた細胞を指す。「試料」なる用語はまた限定するものではないが、気管支肺胞洗浄液の試料、胆汁の試料、胸膜腔内液もしくは腹水、または正常もしくは異常に機能する同種移植片により分泌もしくは排出された任意のその他の液体、または同種移植片を通して、もしくは同種移植片に対して解剖学的に近位の浸出もしくは漏出の結果である任意のその他の液体、または同種移植片と液体で連絡している任意の液体を含む液体試料から得られた細胞をも指す。また液体被験試料を：血液（末梢血を含む）、リンパ液、汗、腹水、胸膜腔内液、気管支肺胞洗浄液、心膜液、胃腸液、胆汁、尿、糞便、組織液もしくは膨化水、関節液、脳脊髄液、または同種移植片に近位の解剖学的部分から集められた、もしくは同種移植片と液体で連絡し

ている流体管から集められた任意のその他の、命名されているかもしくは命名されていない液体；を含む本質的に任意の体液から入手することもできる。「移植後液体被験試料」は移植が実施された後に対象から入手された試料を指す。

【0026】

逐次的試料を対象から入手することもでき、そして本明細書記載されるような免疫活性化遺伝子バイオマーカーの定量および拒絶の経過を一定期間追跡することができる。この場合、例えばバイオマーカー遺伝子（複数も可）の遺伝子発現のベースライン規模は移植後に採取された移植後試料における遺伝子発現強度である。例えば最初の試料または試料（複数も可）を例えば移植の1週間以内の非拒絶期間内で採取することができ、そしてこれらの試料中のバイオマーカー遺伝子の発現強度を1週間後に採取された試料中の遺伝子の発現強度と比較することができる。一つの実施態様では、試料を移植後2週、4週、8週、12週、24週および36週、またはそれを任意に組み合わせて採取する。

10

【0027】

「生検」なる用語は本明細書で使用される際には、診断試験用に生存患者から組織を除去することにより入手された標本を指す。その用語には吸引生検、ブラシ生検、絨毛膜絨毛生検、内視鏡的生検、切除生検、針生検（皮膚または器官の外部表面を貫通し、そして試験すべき下層組織にまで適切な針またはトロカールを通して吸引により除去することにより入手された標本）、開放生検、穿刺生検（穿孔器）、シェーブバイオプシ（shave biopsies）、擦過生検および楔状生検が含まれる。一つの実施態様では、細針吸引生検を用いる。別の実施態様では、ミニコア針生検を用いる。従来の経皮コア針生検を用いることもできる。

20

【0028】

「上方調節」または「上方調節された」なる用語は本明細書では互換的に用いられ、そして標的遺伝子または標的タンパク質の増加または上昇を指す。「上方調節」または「上方調節された」なる用語はまた標的遺伝子または標的タンパク質を伴う過程またはシグナル伝達カスケードの増加または上昇をも指す。

【0029】

「遺伝子クラスター」または「クラスター」なる用語は本明細書で使用される際には、発現パターンに係する遺伝子の群を指す。換言すると、遺伝子のクラスターはグラフト非拒絶対グラフト拒絶のような異なる条件にわたって類似の調節を有する遺伝子の群である。クラスターにおける各遺伝子に関する発現プロファイルはそのクラスターにおける少なくとも一つのその他の遺伝子の発現プロファイルと相関するはずである。種々の統計的方法を用いて相関を評価することができる。いつもではないが、しばしば遺伝子クラスターのメンバーは類似の遺伝子発現パターンに加えて類似の生物学的機能を有する。

30

【0030】

「プローブセット」は本明細書で使用される際には、二つまたはそれより多い遺伝子を検出するために用いることができる核酸の群を指す。検出は例えばPCRおよびRT-PCRにおけるような増幅による、またはマイクロアレイにおけるようなハイブリダイゼーションによる、または一本鎖または二本鎖核酸の選択的酵素分解に基づくアッセイにおけるような選択的破壊および保護によるものでよい。プローブセットにおけるプローブを一つまたはそれより多い蛍光、放射活性またはその他の検出可能な部分（酵素を含む）で標識することができる。プローブは望ましい遺伝子を選択的に検出するために十分に大きければ、任意の大きさでよい。多重PCRに典型的であるようにプローブセットは溶液でよいが、またはプローブセットをアレイもしくはマイクロアレイにおけるように固体表面に付着させることができる。PNAのような化合物を核酸の代わりに使用して遺伝子にハイブリダイズさせることができることは周知である。加えてプローブはイノシンのような稀なまたは非天然の核酸を含有することができる。

40

【0031】

「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」なる用語は互換的に用いられ、そして任意の長さのデオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドいずれかのヌクレ

50

オチドの重合形態またはその類似体を含む。ポリヌクレオチドは任意の三次元構造を有することができ、そして公知のまたは未知の任意の機能を実施することができる。以下はポリヌクレオチドの非限定例である：遺伝子または遺伝子フラグメント、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA (mRNA)、トランスファーRNA、リボソームRNA、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブおよびプライマー。ポリヌクレオチドはメチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体のような修飾されたヌクレオチドを含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾を重合体の組み立ての前または後に付与することができる。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド構成成分により中断され得る。重合化の後に標識構成成分との抱合によるように、ポリヌクレオチドをさらに修飾することができる。その用語はまた二本鎖および一本鎖分子の双方をも含む。特記または要求されない場合、ポリヌクレオチドである本発明の任意の実施態様は、二本鎖形態および二本鎖形態を作り上げることが分かっているかまたは予測される2本の相補的一本鎖形態の各々の双方を包含する。

10

20

30

40

50

【0032】

ポリヌクレオチドは四つのヌクレオチド塩基：アデニン (A)；シトシン (C)；グアニン (G)；チミン (T)；およびポリヌクレオチドがRNAである場合グアニンの代わりにウラシル (U)；の具体的な配列から構成される。この「ポリヌクレオチド配列」なる用語はポリヌクレオチド分子のアルファベット表示である。このアルファベット表示を、中央演算処理装置を有するコンピューターでデータベースにインプットし、そして機能的ゲノムおよび相同検索のようなバイオインフォマティクス適用のために使用することができる。

【0033】

「cDNA」なる用語には相補的DNA、すなわち逆転写酵素のような酵素でcDNAに作られる細胞または生物に存在するmRNA分子が含まれる。「cDNAライブラリー」には細胞または生物に存在する、逆転写酵素でcDNAに変換され、次いで「ベクター」(外来DNAの添加の後に複製を持続できるその他のDNA分子)に挿入されるmRNA分子の収集物が含まれる。ライブラリーのためのベクターの実例には、バクテリオファージ、細菌に感染するウイルス(例えばラムダファージ)が含まれる。次いでライブラリーを目的の特異的cDNA(およびしたがってmRNA)に関してプロービングすることができる。

【0034】

「プライマー」には、一般的には標的とハイブリダイズすることにより目的の試料に存在する標的または「鋳型」に結合し、その後標的に相補的なポリヌクレオチドの重合化を促進する遊離3'-OH基を有する短いポリヌクレオチドが含まれる。「ポリメラーゼ連鎖反応」(「PCR」)は「上流」および「下流」プライマーからなる「プライマーの対」または「プライマーのセット」、およびDNAポリメラーゼのような重合化の触媒、および典型的には熱安定性ポリメラーゼ酵素を使用して標的ポリヌクレオチドの複製コピーが作成される反応である。PCRの方法は周知であり、そして例えばMacPherson et al., IRL Press at Oxford University Press (1991)にて教示される。PCRまたは遺伝子クローニングのようなポリヌクレオチドの複製コピーを生成する全ての方法は包括的に本明細書では「複製」と称される。プライマーをサザンまたはノーザンブロット分析のようなハイブリダイゼーション反応におけるプローブとして使用することもできる(例えばSambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989参照)。

【0035】

「ポリペプチド」なる用語には二つまたはそれより多いサブユニットアミノ酸、アミノ酸類似体またはペプチド擬似物質の化合物が含まれる。サブユニットをペプチド結合により連結することができる。別の実施態様では、サブユニットをその他の結合、例えばエス

テル、エーテル等により連結することができる。本明細書で使用される際には、「アミノ酸」なる用語には天然および／もしくは非天然または合成のいずれかのアミノ酸が含まれ、グリシンおよびDまたはL双方の光学異性体、ならびにアミノ酸類似体およびペプチド擬似物質が含まれる。三つまたはそれより多いアミノ酸のペプチドは一般的にオリゴペプチドと称される。三つまたはそれより多いアミノ酸よりも大きなペプチド鎖はポリペプチドまたはタンパク質と称される。

【0036】

「ハイブリダイゼーション」なる用語には、一つまたはそれより多いポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合を介して安定化されている複合体を形成する反応が含まれる。ワトソン - クリック塩基対形成、フーグスティーン結合により、または任意のその他の配列特異的様式で水素結合を生じ得る。複合体にはらせん構造を形成する二本鎖、多重鎖複合体を形成する三本またはそれより多い鎖、1本の自己ハイブリダイズ鎖、または任意のこれらの組み合わせを含まれ得る。ハイブリダイゼーション反応はPCR反応の開始またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素切断のようなさらに広範な過程における一工程を構成し得る。

10

【0037】

様々な「ストリンジェンシー」の条件下でハイブリダイゼーション反応を実施することができる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーには任意の二つの核酸分子が互いにハイブリダイズする困難さが含まれる。ストリンジェント条件下では、少なくとも60%、65%、70%、75%互いに同一である核酸分子は互いにハイブリダイズし続けるが、一方低いパーセントの同一性を有する分子はハイブリダイズし続けることができない。高ストリンジェントハイブリダイゼーション条件の好ましい非限定例は、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)で約45でのハイブリダイゼーション、続いて0.2×SSC、0.1%SDSで、50で、好ましくは55で、さらに好ましくは60で、そしてなおさらに好ましくは65で1回またはそれより多い洗浄である。

20

【0038】

2本の一本鎖ポリヌクレオチド間で逆平行立体配置でハイブリダイゼーションを生じる場合、反応は「アニーリング」と称され、そしてこれらのポリヌクレオチドは「相補的」として記載される。第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドの鎖の一つの間でハイブリダイゼーションを生じ得る場合、二本鎖ポリヌクレオチドは別のポリヌクレオチドに対して「相補的」または「相同的」であり得る。「相補性」および「相同性」(一つのポリヌクレオチドが別のポリヌクレオチドと相補的である程度)を、一般的に認められている塩基対形成の規則に従って、互いに水素結合すると予期される、対する鎖における塩基の比率に関して定量化できる。

30

【0039】

本明細書で使用される際には、「マーカー」および「バイオマーカー」なる用語は互換的に用いられ、そして器官拒絶の危険性を有さない対象における量または活性に相対して、器官拒絶の危険性を有する対象における量または活性が存在するかまたは調整されている(すなわち増加または減少している)ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを含む。バイオマーカーの量または活性における相対変化は拒絶の出現または出現の危険性と相関する。

40

【0040】

本明細書で使用される際には、「マーカーのパネル」なる用語はバイオマーカーの群を含み、その各メンバーの量または活性は器官拒絶の出現または出現の危険性と相関する。特定の実施態様では、バイオマーカーのパネルは、器官拒絶の危険性を有する対象における量または活性のいずれかで増加しているこれらのバイオマーカーのみを含み得る。その他の実施態様では、バイオマーカーのパネルは器官拒絶の危険性を有する対象における量または活性のいずれかで低下しているこれらのバイオマーカーのみを含み得る。

【0041】

50

選択された用語の略語を以下の表 1 にまとめる。

【表 1】

表 1：略語

略語	用語
BMD	バイオマーカー開発
CAN	慢性同種移植片腎症
CR1、CR2、CR3	等級 1 から 2 の慢性同種移植片腎症のBanff分類
PLS	部分最小二乗法による潜在構造の射影

10

【0042】

移植片拒絶

本発明は拒絶の間、とりわけ慢性拒絶の間に差次的に調節される遺伝子の同定に関する。遺伝子の組み合わせの発現と慢性拒絶の間で高度に統計的に有意な相関性が見出されており、それにより移植片拒絶（例えば慢性腎拒絶）に関する「分子署名」が提供される。拒絶を被る可能性のあるこれらの遺伝子器官の同時発現のために、これらの遺伝子およびその発現産物を、移植片拒絶の危険性を有する患者の管理、予後診断および処置に使用できる。

【0043】

したがって一つの態様では、本発明は移植片拒絶、とりわけ移植器官の慢性拒絶を示すために、表 2 で示される遺伝子の組み合わせを含む署名認識を用いることに関係する。

20

慢性拒絶はおそらく複数の因子：抗体およびリンパ球により引き起こされる。慢性拒絶の最も確実な診断は一般的に問題の器官の生検により成される。慢性拒絶を伴う腎臓は腎臓の実質において線維症（瘢痕化）およびの微細血管に対する損傷を有する。

【0044】

拒絶の診断をグラフト機能障害のためのその他の病因から区別すること、および有効な治療の設立は：（a）拒絶を診断するために最も利用される現在的手段であるグラフトの経皮コア針生検は通常「事実」の後に実施される、すなわちグラフト機能障害およびグラフト損傷（場合によっては非可逆的である）が既に存在する；（b）グラフトの形態学的分析が所定の拒絶エピソードの逆転の可能性に関してささやかな手掛かりおよび再発（「反跳」）の可能性に関してわずかな手掛かりしか提供しない；そして（c）治療計画の設計のための必要条件である拒絶現象の基本メカニズムは拒絶の形態学的様相を含む現在の診断指針によりあまりよく定義されていない；のために困難になっている。

30

【0045】

例えば腎同種移植片拒絶の診断は、通常グラフト機能障害の発達（例えば血清クレアチニンの濃度の上昇）および単核細胞浸潤もまた現れるグラフトの部分におけるグラフト傷害の形態学的証拠により行われる。しかしながら拒絶過程の指標としての腎機能異常の使用に対して二つの警告が適用される：第 1 に、死体腎グラフトの多くは収集およびエキソピボ保存手順からの傷害のために移植直後の期間に急性（可逆性）の腎不全を患うので、腎機能の悪化は拒絶を診断するための臨床上の手掛かりとしていつも利用できるとは限らない。第 2 に、即座に損なわれていない腎機能が存在する場合であっても、免疫抑制治療自体のような非免疫学的原因のためにグラフト機能障害は発達し得る。

40

【0046】

例えばシクロスポリン（CsA）腎毒性は一般的な合併症であり、単に CsA の血漿 / 血液濃度に基づくだけでは容易に同定されない合併症である。CsA 腎毒性から拒絶を識別することの臨床上の重要性は、その治療計画が正反対であるので強調しすぎることはない：拒絶のための免疫抑制剤の増量および腎毒性のための CsA 投薬量の低下。

【0047】

本発明はある程度、多くの異なる遺伝子の発現および / またはコードされるタンパク質の増加または減少が特定のグラフト拒絶状態に関連するという観察に基づく。本明細書に

50

記載されるデータの結果として、同種移植片生検がほんの軽度な細胞浸潤を示す場合であっても、方法は今や迅速でそして信用できる慢性拒絶の診断に利用可能である。同時に差次的に調節される遺伝子の分析が本明細書で初めて記載され、そしてそれは移植片拒絶を正確に検出するための分子署名を提供する。

【0048】

加えて本発明は部分的に、特定の環境下で実質的に関係した発現プロファイルを有する、しばしば機能的に関係した遺伝子の群である遺伝子クラスターとして遺伝子が発現されるという観察に基づく。したがって本発明はそのメンバーの発現がグラフト拒絶に相関する遺伝子のクラスターを提供する。本発明はさらに適当なマーカー遺伝子の発現を測定するための古典的分子方法および大規模な方法を提供する。

10

【0049】

本明細書に記載される方法は特に慢性移植片拒絶を検出するために有用である。最も典型的には対象（すなわち移植片のレシピエント）はヒトのような哺乳動物である。移植器官には任意の移植可能な器官または組織、例えば腎臓、心臓、肺、肝臓、脾臓、骨、骨髓、腸、神経、幹細胞（または幹細胞由来の細胞）、組織構成成分および複合組織が含まれる。好ましい実施態様では移植片は腎臓移植片である。

【0050】

本明細書に記載される方法は抗拒絶治療の有効性を評価するために有用である。かかる方法はマーカー遺伝子の転写物の投与前規模を、同一遺伝子の転写物の投与後規模と比較することを伴い、ここで遺伝子の転写物の投与前規模よりも少ない同一遺伝子の転写物の投与後規模は、抗拒絶治療の有効性を示す。移植片拒絶の防御および/または処置のための任意の候補（例えば薬物、抗体または拒絶もしくは防御のその他の形態）を、候補に暴露する前および後にマーカー発現強度を比較することによりスクリーニングすることができる。加えてこの様式で価値のある情報を集めて、その生物学的材料で評価が実施される対象の将来の臨床管理の決定を補助することができる。マーカー遺伝子の遺伝子発現強度を決定するための本明細書に記載される方法を用いて、対象からの試料を使用して評価を実施することができる。分析はさらに感染病原体の検出を含み得る。

20

【0051】

慢性拒絶のバイオマーカー

本発明はある程度、選択された遺伝子が慢性移植片機能障害、例えばCANにおいて調整されるという発見に基づく。慢性拒絶（CR）は低悪性度であるが、通常非可逆的であり、そして最終的には最も血管新生化された固形臓器同種移植片の不全を招く同種移植片傷害の進行性形態である。それは罹患することなく長期間生存するための唯一の最も重要な障害である。移植後5年までに、30 - 50%もの心臓、肺、脾臓および腎臓同種移植片レシピエントがそれに罹患する。

30

【0052】

増大しつつあるヒト遺伝子配列情報と組み合わせられた、高度に平行して自動化されたDNAハイブリダイゼーション技術における進歩により、数千の遺伝子に関する発現レベルを同時に分析することが実現可能になってきている（例えばSchena et al., Science 270: 467 - 470 (1995); Lockhart et al., Nature Biotechnology 14: 1675 - 1680 (1996); Blanchard et al., Nature Biotechnology 14: 1649 (1996); Ashbyら、1996年10月29日発行の米国特許第5569588号; Perou et al., Nature 406: 747 - 752 (2000)を参照のこと）。遺伝子ごとの定量的RT-PCRのような方法は非常に正確であるが、相対的に労働集約的である。定量的PCRを用いて数千の遺伝子の発現を分析することが可能であるが、尽力および経費は莫大である。代わって大規模分析の実例として、mRNAの全集団をcDNAに変換し、そして10から10000またはそれより多い遺伝子のいずれかを示すプローブの規則配列にハイブリダイズさせることができる。これらのプローブの各々にハイブリダイズするcDNAの相対量是对応する遺伝子の発現レベルの測定値である。次いでデータを統計的に分析して遺伝子発現の情報パターンを表すことができる。実際に、腎同種移

40

50

植片拒絶の早期診断および新しい予後診断バイオマーカーは免疫抑制を最小化し、そして個別化するために重要である。組織病理学的差次的診断に加えて、遺伝子発現プロファイリングは、「分子署名」を定義することにより疾病分類を有意に改善する。

【0053】

いくつかの以前の研究は腎臓移植の様々なクラスを識別するためにトランスクリプトーム研究法を適用するのに成功している。しかしながらマイクロアレイプラットフォームの異種性および種々のデータ分析法により、着実なCANの署名の同定が困難になっている。

【0054】

この問題に取り組むために、管理された学習アルゴリズム（例えばPLS）を、安定したグラフト機能を有する患者および種々の等級のCANを有すると診断された患者からの腎プロトコール生検の遺伝子発現プロフィールに適用した。実施例Iに示されるように、この研究によりモデル、例えば様々な等級のCANを有する組織を正確に予測できるPLSモデルに有用な記述子（すなわち遺伝子マーカー；バイオマーカー）を誘導するために様々なマイクロアレイデータセットから複数の遺伝子発現署名の共通部分が同定された。すなわち、本発明は拒絶の間、とりわけCAN進行の間に調整される（すなわち上方調節または下方調節される）遺伝子の同定に関する。一つまたはそれより多いバイオマーカー遺伝子の発現とCANとの間に高度に統計的に有意な相関が見出され、それにより移植片拒絶（例えばCAN）のための「分子署名」が提供される。これらのバイオマーカー遺伝子およびその発現産物は拒絶を被る可能性のある器官を同定するため、および/または疾患（例えばCAN）進行の等級を決定するために有用であるので、これらを移植片拒絶の危険性を有する患者の管理、予後診断および処置に使用することができる。

10

20

【0055】

本明細書に開示されたデータにより、実際の臨床状況で、および遺伝子発現の分子操作なしで遺伝子の組み合わせがCANの指標であることが実証された、一つの実施態様では、組織移植後の分子署名を形成するバイオマーカー遺伝子の組み合わせは表2に示されるものである。表2の第1列はアフィメトリクスプローブセット識別番号を示し、そして第2列は関連遺伝子のUNIGENE識別番号を示す。第3および第4列は遺伝子記号および遺伝子名を表示する。第5列は正常腎機能全体で平均化された遺伝子の未処理発現強度を示し、そして第6 - 9列は正常、CR1、CR2およびCR3条件下の正規化された値を示す。遺伝子をその予測力によるのではなく、アルファベット順に列挙する。

30

【0056】

【表 2】

表2:本発明のハイマーカー遺伝子

アイトリクス プロファイル識別番 号	UNIGENE	記号	遺伝子名	未処理	正規化値			
					正常	CR 1	CR 2	CR 3
230602_at	HS.146022	ACMSD	アミノカルボキシルコナートセミアルデヒド デカルボキシルーゼ	571	-1.08	1.19	-1.38	-2.39
205364_at	HS.444959	ACOX2	アシル-CoAオキシターゼ2、 分岐鎖	276	-1.02	1.03	-1.46	-2.52
202422_s_at	HS.268785	ACSL4	アシル-CoAシンターゼ長鎖ファミリー メンバー4	1125	-1.03	1.00	1.40	1.53
205745_x_at	HS.404914	ADAM17	ジスインテグリンおよびメタロプロ テイナーセトメイン17(腫瘍壊死因 子、アルファ、変換酵素)	227	-1.01	-1.02	1.18	1.67
213532_at	HS.404914	ADAM17	ジスインテグリンおよびメタロプロ テイナーセトメイン17(腫瘍壊死因 子、アルファ、変換酵素)	259	-1.02	-1.08	1.11	1.49
222930_s_at	HS.461532	AGMAT	アグマチンウレイドローゼ(アグマチ ン)	198	-1.04	1.03	-1.57	-4.02
229229_at	HS.34494	AGXT2	アラニン-グリコキシルアミノトランスフェ ラーゼ2	858	-1.08	1.34	-1.09	-2.15
227530_at	HS.371240	AKAP12	Aキナーゼ(PRKA)アンカータンパク質 (クアラニン)12	778	1.00	1.07	1.06	1.99
218487_at	HS.1227	ALAD	アミロプロリン酸、デカルター、デヒドロ ターゼ	499	-1.03	1.02	-1.58	-2.42
211298_s_at		ALB	アルブミン	444	1.07	1.91	-4.01	-9.43
208950_s_at	HS.483239	ALDH7A1	アルデヒドデヒドゲネラーゼ7ファミ リー、メンバーA1	838	-1.02	-1.01	-1.37	-1.72
208951_at	HS.483239	ALDH7A1	アルデヒドデヒドゲネラーゼ7ファミ リー、メンバーA1	438	-1.01	-1.01	-1.62	-2.19
220148_at	HS.486520	ALDH8A1	アルデヒドデヒドゲネラーゼ8ファミ リー、メンバーA1	1505	-1.20	1.32	-1.14	-1.85

10

20

30

【表 3】

201612_at	HS.2533	ALDH9A1	アルデヒドデヒドロゲナーゼ9ファミリー、メンバーA1	3300	1.01	-1.07	-1.22	-1.55
205682_x_at	HS.534468	APOM	アポリポタンパク質M	633	-1.05	-1.08	-1.84	-3.82
205673_s_at	HS.19404	ASB9	アセチルコリン受容体およびSOCSホモログ含有 9	131	-1.03	1.06	-1.78	-3.82
219902_at	HS.114172	BHMT2	ベータインホモシステインメチルトランスフェラーゼ2	1053	-1.10	1.04	-1.40	-2.81
204741_at	HS.505202	BICD1	ビカウダル(Bicaudal)D相同体1 (ショウジョウバエ)	146	1.02	1.10	1.67	1.86
223824_at	HS.149849	C10ORF59	染色体10オープンリーディングフレーム59	345	-1.02	-1.13	-1.30	-1.70
225687_at	HS.472716	C20ORF129	染色体20オープンリーディングフレーム129	107	1.04	-1.05	-1.65	-2.32
228560_at	HS.476358	CACNA1D	カルシウムチャンネル、電位依存性、L型、アルファ1D	418	-1.13	1.31	-1.11	-1.49
216903_s_at	HS.524367	CBARA1	カルシウム結合7トピド関連自己抗原1	365	-1.03	-1.05	-1.39	-1.96
224027_at	HS.334633	CCL28	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガント28	27	-1.09	-1.09	1.53	2.35
1559590_at	HS.126688	CHDH	コリンデヒドロゲナーゼ	35	-1.36	1.20	1.09	-1.64
218252_at	HS.444028	CKAP2	細胞骨格関連タンパク質2	190	-1.00	-1.27	-1.25	-1.46
212091_s_at	HS.474053	COL6A1	コラーゲン、VI型、アルファ1	58	-1.17	-1.17	-2.25	-1.71
208146_s_at	HS.233389	CPVL	カルシホパプチナーゼ、卵黄形成様	951	1.01	-1.04	1.20	1.58
203915_at	HS.77367	CXCL9	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガント9	831	1.14	-1.05	-1.11	-2.43
206878_at	HS.113227	DAO	Dアミノ酸オキシダーゼ	202	-1.04	1.11	-1.93	-4.55
230175_s_at	HS.203691	DCBLD2	ジスコイシン、CUBおよびLCCドメイン含有2	364	1.01	-1.06	1.11	1.34
217973_at	HS.9857	DCXR	ジカルボニル/L-キシルロースリクターゼ	907	-1.11	-1.30	-1.47	-3.56

10

20

30

【表 4】

204977_at	HS.525115	DDX10	DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp)ホ ックスホリハフチト10	343	1.03	1.02	-1.47	-1.97
232381_s_at	HS.520106 HS.212360	DNAH5	タニン、軸糸、重ホリハフチト 5	147	1.05	1.28	2.65	1.97
226281_at	HS.234074	DNER	テルターノチ様EGF反復-含有 膜貫通型	484	-1.13	-1.07	1.58	1.49
203716_s_at	HS.368912	DPP4	シハフチシルハフチタセ4(C D26、アテバシテアミナーセ複合タ ンホク質2)	121	-1.05	1.20	-1.56	-2.31
219298_at	HS.22242	ECHDC3	エノルイエンザイムAヒトラセトメ イン含有3	473	-1.04	-1.05	-1.39	-2.33
224189_x_at	HS.502306	EHF	ets相同因子	24	-1.14	1.19	2.14	1.95
209368_at	HS.212088	EPHX2	エホキトヒトローセ2、細胞質 型	334	-1.17	-1.26	-1.50	-2.64
211398_at	HS.533683	FGFR2	線維芽細胞成長因子受容 体2	21	-1.04	-1.05	-1.84	-2.46
211399_at	HS.533683	FGFR2	線維芽細胞成長因子受容 体3	27	-1.15	1.09	-1.51	-2.87
211400_at	HS.533683	FGFR2	線維芽細胞成長因子受容 体4	16	-1.46	-1.28	-1.43	-2.01
230842_at	HS.533683	FGFR2	線維芽細胞成長因子受容 体5	11	1.12	1.06	-2.66	-2.18
219118_at	HS.438695	FKBP11	FK506結合タホク質11、19k Da	85	1.00	-1.00	1.96	2.19
1559011_at	HS.462392	FLJ13773	仮想タホク質FLJ13773	25	-1.21	1.12	1.79	1.86
227417_at	HS.369042	FLJ20605	仮想タホク質FLJ20605	803	-1.04	1.05	-1.47	-2.22
228397_at	HS.158783	FLJ20618	仮想タホク質FLJ20618	254	-1.02	1.01	1.46	2.21
221925_s_at	HS.370147	FLJ22490	仮想タホク質FLJ22490	51	-1.01	1.01	-1.34	-1.45
238593_at	HS.292088	FLJ22531	仮想タホク質FLJ22531	402	-1.12	1.39	1.64	1.86
207876_s_at	HS.58414	FLNC	フィラミンC、ガンマ(アクチン結合タ ホク質280)	495	1.49	1.20	1.14	1.98
215062_at	HS.149566	FMNL2	フォルミン様2	65	-1.04	1.38	1.51	1.82

10

20

30

【表 5】

206263_at	HS.386502	FMO4	フラビン含有モノオキシゲナーゼ4	388	-1.09	-1.11	-1.59	-3.50
1568955_at		FNBP2	LOC391156	358	-1.04	-1.14	1.21	2.35
226962_at	HS.529439	FRBZ1	FRBZ1タンパク質	574	1.00	1.13	1.18	1.45
214093_s_at	HS.269099	FUBP1	遠上流エレメント(far upstream element)(FUSE)結合タンパク質1	277	-1.04	-1.02	1.19	2.00
216010_x_at	HS.169238	FUT3	フコシルトランスフェラーゼ3(ガラクトシド3(4)-L-フコシルトランスフェラーゼ、Lewis血液群を含む)	32	-1.24	-1.33	-1.52	-2.66
228238_at	HS.531856	GAS5	増殖停止特異的5	260	1.01	1.07	1.25	1.83
213133_s_at	HS.435741 HS.546256	GCSH	グルタリル切断系タンパク質H(アミノメチルキラー)	443	-1.01	-1.14	-1.42	-1.85
230025_at	HS.444663	GJC1	ギャップ結合タンパク質、chi 1、31.9kDa(コネクシン31.9)	102	1.01	-1.13	-1.24	-1.52
202382_s_at	HS.278500	GNPDA1	グルタミン-6-リン酸デアミナーゼ1	690	-1.03	-1.06	-1.30	-2.10
224997_x_at	HS.533566	H19	H19、刷り込み母性発現された未翻訳mRNA	336	1.28	1.10	-1.04	1.48
205012_s_at	HS.157394 HS.513265	HAGH	ヒトロキシシクルリタチオンヒドラーゼ	455	-1.06	-1.13	-1.56	-2.26
226137_at	HS.77558 HS.546885	HMGN3	高移動度群スクレオソーム結合ドメイン3	559	1.01	-1.03	1.20	1.88
204934_s_at	HS.182385	HPN	ヘプシン(膜貫通型プロテアーゼ、セリン)	436	-1.20	-1.04	-1.25	-2.06
210253_at	HS.90753	HTATIP2	HIV-1 Tat相互作用タンパク質2、30kDa	231	-1.04	1.00	1.28	1.39
235549_at	HS.148741	IBRDC2	IBRドメイン含有2	28	-1.36	1.03	1.31	2.04
202410_x_at	HS.373908 HS.523414	IGF2	インスリン様成長因子 2(ソマトスタチンA)	10	1.04	1.09	-1.37	-1.32
210881_s_at	HS.373908 HS.523414	IGF2	インスリン様成長因子 2(ソマトスタチンA)	7	1.18	1.06	-1.20	1.03
1553594_a_at	HS.37062 HS.515247	INSL3、JAK3	インスリン様成長因子3(タンパク質チロシナーゼ、白血球)	108	-1.07	-1.26	-1.30	-1.68
210840_s_at	HS.430551	IQGAP1	IQモチーフ含有GTPase活性化タンパク質1	566	1.05	-1.10	1.39	1.71
203752_s_at	HS.2780	JUND	jun D癌原遺伝子	1456	-1.00	1.02	1.09	1.36
211806_s_at	HS.411299	KCNJ15	内向き整流性カリウムチャネル、サブファミリーJ、メンバ-15	303	-1.03	-1.12	-1.44	-1.82
238428_at	HS.411299	KCNJ15	内向き整流性カリウムチャネル、サブファミリーJ、メンバ-15	211	-1.04	1.04	-1.45	-1.64
220116_at	HS.98280	KCNN2	カリウム中間/小型コンダクタンスカルシウム活性化チャネル、サブファミリーN、メンバ-2	60	-1.10	-1.05	-2.39	-3.45

10

20

30

40

【表 6】

215268_at	HS.472475	KIAA0754	KIAA0754タンパク質	88	-1.03	1.18	1.97	1.94
213913_s_at	HS.192492	KIAA0984	KIAA0984タンパク質	125	-1.02	1.05	1.26	1.69
244370_at	HS.124128	KIAA2022	KIAA2022タンパク質	188	-1.10	-1.03	1.37	1.52
202962_at	HS.444767	KIF13B	キネシファミリーメンバー13B	598	-1.08	1.03	-1.06	-1.56
216568_x_at	HS.533782	KRT8	ケラチン8	24	-1.12	-1.06	1.66	2.51
242424_at	HS.370457	LETMD1	LETMD1トランスメン含有1	51	-1.18	1.46	2.70	2.40
227285_at	HS.54680	LOC148523	仮想タンパク質BC017397	194	-1.07	-1.34	-1.68	-2.34
228857_at	HS.537654	LOC285831	仮想タンパク質LOC285831	152	1.01	1.06	-1.25	-1.32
230554_at	HS.298252	LOC348158	仮想タンパク質LOC123876	4581	-1.25	1.38	-1.07	-1.58
231001_at	HS.32478	LOC387758	RIKEN cDNA1110018M03に類似	214	1.01	1.15	1.57	2.06
227372_s_at	HS.489237	LOC55971	インスリン受容体とシキナーゼ基質	211	-1.05	-1.04	1.33	1.42
230931_at	HS.439074 HS.449164	LPAL2	リポタンパク質、Lp(a)様2	271	-1.02	1.34	-1.52	-6.27
230863_at	HS.470538	LRP2	低密度リポタンパク質随伴タンパク質2	1433	-1.21	1.34	-1.15	-1.46
243170_at	HS.543294	LRR C2	ロイシリチン反復含有2	101	-1.04	1.02	-1.30	-1.38
236322_at	HS.197043	MAN1C1	マンノシダーゼ、アルファ、クラスC、メンバー1	112	-1.04	1.20	1.68	2.07
203929_s_at	HS.546914 HS.101174	MAPT	微小管随伴タンパク質タウ	235	1.01	1.08	-1.15	-1.87
213333_at	HS.520967	MDH2	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ2、NAD(ミトコンドリア型)	347	1.01	-1.14	-1.22	-1.56
1553715_s_at	HS.417710	MGC15416	仮想タンパク質MGC15416	543	-1.05	-1.15	-1.19	-1.97

10

20

30

【表 7】

229596_at	HS.424907	MGC35366	仮想タンパク質MGC35366	170	-1.08	1.27	-1.70	-2.98
212462_at	HS.35758	MYST4	MYST ヒストンアセチルトランスフェラーゼ(単球形性白血病)4	323	-1.00	1.06	1.12	1.42
217593_at	HS.235390	ヌル	仮想タンパク質FLJ12895	143	-1.08	1.16	1.58	1.87
219049_at	HS.387794	ヌル	ゴットロイデハーター1、4N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ	348	-1.03	-1.29	1.53	2.47
238469_at	HS.16512	OGFRL1	オビオイト成長因子受容体様1	48	-1.01	-1.13	1.18	1.70
1558017_s_at	HS.406074	PAWR	PRKC、アポトシス、WT1、レギュレーター	193	-1.05	1.45	1.58	1.98
213263_s_at	HS.546271	PCBP2	ホウ酸(C)結合タンパク質2	383	-1.05	1.02	-1.36	-1.82
232099_at	HS.147674	PCDHB16	プロトホウリンヘクター16	159	-1.01	1.07	1.54	2.31
205380_at	HS.143293 HS.444751	PDZK1	PDZドメイン含有1	2598	-1.18	1.17	-1.23	-1.79
218025_s_at	HS.15250	PECI	ペロキシソームD3、D2-エノイル-CoAイソメラーゼ	1404	-1.09	-1.18	-1.47	-2.30

10

20

【表 8】

202108_at	HS.36473	PEPD	ペプチダーゼD	1240	-1.06	-1.11	-1.50	-2.80
202464_s_at	HS.195471	PFKFB3	6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ3	2256	-1.01	1.07	1.50	2.34
220944_at	HS.58356	PGLYRP4	ペプチドグリカン認識タンパク質4	60	-1.01	-1.01	-1.54	-1.75
232530_at	HS.478230	PLD1	ホスホリパーゼD1、ホスファチジルコリン特異的	21	-1.16	1.20	2.66	4.96
232212_at	HS.334649 HS.233495	PLEKHA8	プレクストリン相同ドメイン含有、ファミリーA(ホスホイノシチド結合特異的)メンバー8	45	-1.13	-1.33	-1.57	-2.35
241916_at	HS.130759	PLSCR1	リン脂質スクランブラーゼ1	130	-1.00	1.14	1.56	1.96
222653_at	HS.514278	PNPO	ピリリトキシン5'-リン酸オキシダーゼ	370	-1.05	-1.12	-1.42	-2.01
236044_at	HS.40479	PPAPDC1	ホスファチシン酸ホスファターゼ2型ドメイン含有1	187	1.03	1.04	-1.43	-1.76
219195_at	HS.527078	PPARGC1A	ペロキシソーム増殖活性化受容体、ガンマ、ゴクテヘクター1、アルファ	1110	-1.03	1.02	1.10	1.22
206346_at	HS.368587	PRLR	プロラクチン受容体	88	1.01	1.04	-1.52	-3.78

30

40

【表 9】

204304_s_at	HS.479220	PROM1	プロミジン	1015	-1.16	1.18	1.85	3.08
209123_at	HS.75438	QDPR	キノイトシビトロフテリシソリタク ーセ	855	-1.05	-1.10	-1.49	-2.84
225188_at	HS.471162	RAPH1	Ras随伴(RaIGDS/AF-6)お よびプレクストリン相同トメイン	1025	1.01	-1.04	1.27	1.57
235144_at	HS.129136	RASEF	RASおよびEFハントトメイン含 有	209	-1.01	1.03	1.20	1.55
203344_s_at	HS.546282	RBBP8	網膜芽細胞腫結合タンパク質 8	1153	-1.03	-1.15	1.22	1.78
240245_at	HS.221436	RBMS3	RNA結合タンパク質、一本鎖相互 作用タンパク質	142	1.01	1.02	1.60	1.74
217775_s_at	HS.226007	RDH11	レチノールデヒドロゲナーゼ11(オール トランスおよび9-シス)	573	-1.06	-1.21	-1.14	-1.68
216621_at	HS.306307	ROCK1	Rho随伴、コイルコイル含有タン パク質キナーゼ1	68	1.02	1.32	1.50	1.66
206169_x_at	HS.474970	RoXaN	ロタウイルスタンパク質NSP随伴3	429	1.03	1.08	1.37	1.65
225150_s_at	HS.192854	RTKN	ロテキン(rotekin)	172	-1.10	-1.03	-1.37	-2.27
229273_at	HS.135787	SALL1	sal様1(ショウシヨウハエ)	395	-1.10	-1.04	-1.03	1.03
205075_at	HS.159509	SERPINF2	セリンまたはスレインプロテアー ゼ阻害剤、クレイトRF(アルファ-2抗 プラスミン、色素上皮由来因子) 、シナール2	139	-1.12	1.16	-1.02	-1.67

10

20

【表 10】

214016_s_at	HS.355934	SFPQ	スプライシング因子プロリン/グルタミンリッチホリホリシメントラクト結合タンパク質(随伴)	1584	1.02	1.17	1.60	2.07
213590_at	HS.369554	SLC16A5	溶質キャリアファミリー16(モノカルボン酸トランスポーター)、メンバ-5	258	-1.07	-1.07	1.42	1.67
208177_at	HS.936	SLC34A1	溶質キャリアファミリー34(リ酸ナトリウム)、メンバ-1	176	-1.05	1.75	-1.41	-4.40
238177_at	HS.481478	SLC6A19	溶質キャリアファミリー6(神経伝達物質トランスポーター)、メンバ-19	143	-1.26	1.45	-1.54	-3.65
220135_s_at	HS.408567	SLC7A9	溶質キャリアファミリー7(カチオン性アミノ酸トランスポーター、 γ^+ 系)、メンバ-9	1017	-1.15	1.36	-1.29	-2.76
222071_s_at	HS.127648	SLCO4C1	溶質キャリア有機アニオントランスポーターファミリー、メンバ-4C1	1060	-1.22	-1.01	-1.24	-1.38
203021_at	HS.517070	SLPI	分泌型白血球プロテアーゼ阻害剤(抗ロイコプロテイナーゼ)	433	1.03	-1.02	1.67	2.37
233713_at	HS.66170	SMYD2	SETおよびMYNDドメイン含有2	99	1.04	1.22	1.27	2.02
210715_s_at	HS.31439	SPINT2	セリンプロテアーゼ阻害剤、ケニツ型2	1265	-1.07	1.03	-1.01	1.10
212459_x_at	HS.186512	SUCLG2	コハク酸CoAリガーゼ、GDP形成、ベータサブユニット	1428	-1.02	-1.04	-1.24	-1.47
227480_at	HS.131819	SUSD2	スチルメイン含有2	264	1.01	1.07	-1.74	-3.78
203084_at	HS.1103	TGFB1	トランスフォーミング成長因子、ヘータ1(カミチ・エンゲルマン病)	40	-1.10	-1.37	-1.52	-1.61
203085_s_at	HS.1103	TGFB1	トランスフォーミング成長因子、ヘータ1(カミチ・エンゲルマン病)	7	1.23	1.06	-1.00	1.02
204565_at	HS.9676	THEM2	チオエステラーゼスーパーファミリーメンバ-2	239	-1.07	-1.14	-1.75	-2.41
212701_at	HS.511686	TLN2	タリン2	203	-1.04	1.17	-1.45	-2.27
226860_at	HS.7337	TMEM19	膜貫通型タンパク質19	383	-1.04	-1.10	-1.37	-1.73
200822_x_at	HS.524219	TPI1	トリオースリッ酸イソメラーゼ1	2029	-1.00	-1.19	-1.26	-1.44
211700_s_at	HS.434971	TRO	トロフィン	132	-1.12	1.09	1.80	2.20
208958_at	HS.154023	TXNDC4	チオレドキシントメイン含有4(小胞体)	65	1.02	1.12	1.23	1.66
233155_at	HS.128427	UPP2	ウリシンホスホリラーゼ2	52	-1.03	-1.03	-1.81	-3.12

10

20

30

40

【表 1 1】

244622_at	HS.314338	WDR9	WD反復ドメイン9	38	-1.02	1.30	1.50	2.35
1555192_at	HS.489722	ZNF277	シンクフィンガータンパク質(C2H2型)277	20	-1.06	-1.08	1.48	1.72
235493_at	HS.434401	ZNF638	シンクフィンガータンパク質638	156	1.01	1.17	1.52	1.38
205594_at	HS.463375	ZNF652	シンクフィンガータンパク質652	151	1.02	-1.01	1.14	1.74
1569477_at				148	1.04	1.34	1.47	1.68
1569578_at				49	-1.02	1.21	1.77	2.10
227955_s_at				547	-1.02	1.06	1.44	1.96
230168_at				103	-1.05	1.12	1.16	1.71
230332_at				260	1.06	1.20	1.35	1.58
233607_at				503	1.04	1.38	1.85	1.79
236685_at				218	1.05	1.19	1.33	1.67
237317_at				99	1.06	1.35	1.95	1.76
238299_at				90	-1.05	1.12	1.25	1.66
239066_at				333	-1.03	1.23	1.45	2.09
239264_at				159	1.06	1.28	1.57	1.66
239907_at				264	-1.00	1.27	1.74	1.74
240800_x_at				64	-1.06	1.15	1.32	1.33
242967_at				107	-1.17	1.21	-1.71	-2.48
243591_at				116	-1.05	1.15	1.99	2.86
243598_at				50	-1.09	1.15	1.71	1.72
244803_at				129	-1.04	1.20	1.57	1.79

10

20

【0057】

したがって一つの態様では、本発明は表2で示された一つまたはそれより多い遺伝子を含む署名認識を使用して移植片拒絶、とりわけ移植器官のCAN拒絶を示すことに関係する。一つの実施態様では、本発明は表2で示された複数の遺伝子の組み合わせを含む署名認識を使用して移植片拒絶、とりわけ移植器官のCAN拒絶を示すことに関係する。

30

【0058】

CANの臨床様相

慢性移植片機能障害は移植後数ヶ月から数年に固形臓器移植片において、最終的にはグラフト不全を招くグラフト機能の徐々の劣化を表示する現象であり、そしてそれは特徴的な組織学的様相を伴う。臨床的には、腎臓グラフトにおける慢性同種移植片腎症（すなわちCAN）は、通常タンパク質尿症および動脈性高血圧を併発する糸球体濾過率の緩徐な進行性の低下として現れる。

【0059】

全ての実質性同種移植片におけるCANの主要な組織形態学的様相は線維増殖性動脈内膜炎である。血管病変は動脈全長を斑模様に侵す。線維性の肥厚および小動脈の内膜の特徴的な「タマネギ状」外観に至る同心性筋内膜（myointimal）増殖がある。その他の知見には、内皮膨化、泡沫細胞蓄積、内弾性板の崩壊、硝子変性および内側肥厚、ならびに内皮細胞下Tリンパ球およびマクロファージの存在が含まれる（Hruban RH, et al., Am J Pathol 137（4）：871-82（1990））。加えて持続性の限局的血管周囲炎症がしばしば認められる。

40

【0060】

血管変化に加えて、CANを被る腎臓はまた間質性線維症、尿細管萎縮および糸球体症を示す。毛細管壁の重複および糸球体間質マトリックスの増加である慢性移植片糸球体症はCANを有する腎臓の高度に特異的な様相として同定されている（Solez K, Clin Transplant.; 8（3 Pt 2）：345-50（1994））。あまり特異的でない病変は糸

50

球体虚血性虚脱、尿細管萎縮、および間質性線維症である。さらに傍尿細管毛細血管基底膜開裂および積層がグラフト機能の後期低下に関連する (Monga M, et al., Ultrastruct Pathol. 14 (3) : 201 - 9 (1990))。腎臓同種移植片におけるCANの組織学的診断のための基準は腎同種移植片病理学に関するBanff 97 スキームにおいて国際標準化されている (Racusen LC, et al., Kidney Int. 55 (2) : 713 - 23 (1999)) ; (Kouwenhoven et al., Transpl Int. 2000 ; 13 (6) : 385 - 401 (2000) から借用)。表3はCANに関するBanff 97 基準をまとめている (Racusen LC, et al., Kidney Int. 55 (2) : 713 - 23 (1999))。

【0061】

表3：慢性同種移植片腎症 (CAN) の組織病理学的知見の等級

10

【表12】

等級	組織病理学的知見
I—軽度	軽度の間質性線維症および尿細管萎縮、慢性拒絶を示唆する特異的变化を有さない (a) または有する (b)
II—中度	中度の間質性線維症および尿細管萎縮 (a) または (b)
III—重度	重度の間質性線維症および尿細管萎縮および尿細管喪失 (a) または (b)

【0062】

20

Banff 97 に関して「適切な」標本が10個またはそれより多い系球体および少なくとも2個の動脈での生検により定義される。CANの過程を理解するために、二つの作業仮説が提示される (Kouwenhoven et al., Transpl Int. 2000 ; 13 (6) : 385 - 401 (2000))。第1の、そして恐らく最も重要な一連の危険因子は「同種抗原依存的」、免疫学的または拒絶関連因子の指定の下にひとまとめにされている。これらの中で後期発症および急性拒絶エピソードの数の増加；若年のレシピエント；雄対雌性別不一致；自己免疫性肝炎または胆管疾患の一次診断；免疫抑制ベースラインおよび非コーカサス人種レシピエントは全て慢性拒絶を発達させる危険性の増加に関連している。さらに具体的には (a) 組織適合性：長期間グラフト生存は、ドナーとレシピエントの間の組織適合性一致のその程度に強く相関すると思われる； (b) 急性拒絶：急性拒絶エピソードの発症、頻度および重篤度はCANの非依存性危険因子である。急性拒絶は最も一貫して同定される、CAN発生のための危険因子である； (c) シクロスポリンの維持用量が少なすぎるか非適応性であるために次善的な免疫抑制；および (d) 抗ドナー特異的抗体：多くの研究により、移植に続いて大部分の患者が抗体を生成することが示されている。

30

【0063】

第2の一連の危険因子は「非同種抗原依存的」または「非免疫学的」危険因子と称され、それは慢性拒絶の発達にも寄与し、高齢のドナー、ドナー器官に既存のアテローム性動脈硬化症、および長い冷阻血時間を含む。虚血のような疾患および傷害に対する非同種免疫応答はCANを引き起こすかまたは悪化させ得る。さらに具体的には (a) 系球体性腎炎のような元来の疾患の再発； (b) 移植の外科的傷害の結果； (c) 虚血の期間：内膜過形成は虚血の期間と相関する； (d) 屍体からの腎臓グラフト対生存血縁および非血縁ドナーからのもの； (e) ウイルス感染：CMV感染はICAM-1のような細胞内付着分子に直接的に影響する； (f) 高脂質血症； (g) 高血圧； (h) 年齢； (i) 性別：移植片アテローム性動脈硬化症の発症は女性よりも男性において早期であった； (j) 人種；ならびに (k) 機能的組織の量であるネフロン数の低下および過剰濾過。

40

【0064】

CANは移植器官の破壊の形態学的証拠を特徴とする。全ての実質器官の一般的な共通因子は内膜過形成の発達である。T細胞およびマクロファージはCD8⁺よりもCD4⁺T細胞が過剰な、主にグラフト侵入細胞型である。付着分子 (ICAM-1、VCAM-1) およびMHC抗原の発現増加はCANを有する同種移植片において認められ、そして

50

TGF- β の増加がしばしば見出される。グラフトがCANを発達させ得る経路の簡潔な記載は以下のとおりである：

【0065】

虚血、外科的操作および再灌流傷害による内皮細胞活性化

結果的に内皮細胞は酸素フリーラジカルを生成し、そしてそれらは増加した量のサイトカインIL-1、IL-6、IFN- γ 、TNF- α およびケモカインIL-8、マクロファージ化学遊走性タンパク質1(MCP-1)、マクロファージ炎症性タンパク質1 α および1 β (MIP-1 α 、MIP-1 β)、コロニー刺激因子、および血小板由来成長因子(PDGF)、インスリン様成長因子1(IGF-1)、トランスフォーミング成長因子 β (TGF- β)のような複数の成長因子、ならびに組織因子およびプラスミノゲンアクチベーター阻害剤(PAI)のようなプロトロンビン分子を放出する。これらのサイトカインはICAM-1、VCAM-1、P-およびE-セレクトリンを含む付着分子により、それらが内皮細胞と相互作用する傷害の部位への好中球、単球/マクロファージおよびTリンパ球の遊走を活性化する。これらの付着分子の発現増加はサイトカインIL-1 β 、IFN- γ およびTNF- α により誘起される。白血球の血管外遊走は、内皮細胞間の透過性を上昇させる、活性化された補体および酸素フリーラジカルにより促進される。

10

【0066】

CAN診断のための現在の臨床研究法に対する制限

拒絶、例えばCANの診断をグラフト機能障害のためのその他の病因から区別すること、および有効な治療の設立は：(a)拒絶を診断するために最も利用される現在の手段であるグラフトの経皮コア針生検は通常「事実」の後に実施される、すなわちグラフト機能障害およびグラフト損傷(場合によっては非可逆的である)が既に存在する；(b)グラフトの形態学的分析が所定の拒絶エピソードの逆転の可能性に関してささやかな手掛かりおよび再発(「反跳」)の可能性に関してわずかな手掛かりしか提供しない；そして(c)治療計画の設計のための必要条件である拒絶現象の基本メカニズムは拒絶の形態学的様相を含む現在の診断指針によりあまりよく定義されていない；のために複雑な過程である。

20

【0067】

例えば腎同種移植片拒絶の診断は、通常グラフト機能障害の発達(例えば血清クレアチニンの濃度の上昇)および単核細胞浸潤もまた現れるグラフトの部分におけるグラフト傷害の形態学的証拠により行われる。しかしながら拒絶過程の指標としての腎機能異常の使用に対して二つの警告が適用される：第1に、死体腎グラフトの多くは収集およびエキソビボ保存手順からの傷害のために移植直後の期間に急性(可逆性)の腎不全を患うので、腎機能の悪化は拒絶を診断するための臨床上の手掛かりとしていつも利用できるとは限らない。第2に、即座に損なわれていない腎機能が存在する場合であっても、免疫抑制治療自体のような非免疫学的原因のためにグラフト機能障害は発達し得る。

30

【0068】

例えばシクロスポリン(CsA)腎毒性は一般的な合併症であり、単にCsAの血漿/血液濃度に基づくだけでは容易に同定されない合併症である。CsA腎毒性から拒絶を識別することの臨床上の重要性は、その治療計画が正反対であるので強調しすぎることはない：拒絶のための免疫抑制剤の増加および腎毒性のためのCsA投薬量の低下。

40

【0069】

本発明はある程度、一つまたはそれより多い遺伝子の発現および/またはコードされるタンパク質の増加または減少が特定のグラフト拒絶状態に関連するという観察に基づく。本明細書に記載されるデータの結果として、同種移植片生検がほんの軽度な細胞浸潤を示す場合であっても、方法は今や迅速でそして信用できる急性および慢性拒絶の診断に利用可能である。同時に調整される(例えば上方調節または下方調節される)遺伝子の分析が本明細書で記載され、そしてそれは移植片拒絶を正確に検出するための分子署名を提供し、そして/または移植片拒絶の重篤度もしくは進行を等級分けする。

50

【0070】

本発明はさらに適当なバイオマーカー遺伝子の発現を測定するための古典的分子方法および大規模方法を提供する。本明細書に記載される方法は特に慢性移植片拒絶および好ましくは早期の慢性移植片拒絶を検出するために有用である。一つの実施態様では、慢性移植片拒絶はCANの結果である。最も典型的には対象（すなわち移植片のレシピエント）はヒトのような哺乳動物である。移植器官には任意の移植可能な器官または組織、例えば腎臓、心臓、肺、肝臓、脾臓、骨、骨髄、腸、神経、幹細胞（または幹細胞由来の細胞）、組織構成成分および複合組織が含まれ得る。好ましい実施態様では移植片は腎臓移植片である。

【0071】

本明細書に記載される方法は抗拒絶治療の有効性を評価するために有用である。かかる方法はバイオマーカー遺伝子の転写物の投与前規模を、同一遺伝子の転写物の投与後規模と比較することを伴い、ここで遺伝子の転写物の投与前規模よりも少ない同一遺伝子の転写物の投与後規模は、抗拒絶治療の有効性を示す。移植片拒絶の防御および/または処置のための任意の候補（例えば薬物、抗体または拒絶もしくは防御のその他の形態）を、候補に暴露する前および後にバイオマーカー発現強度を比較することによりスクリーニングすることができる。加えてこの様式で価値のある情報を集めて、その生物学的材料で評価が実施される対象の将来の臨床管理の決定を補助することができる。バイオマーカー遺伝子の遺伝子発現強度を決定するための本明細書に記載される方法を用いて、対象からの試料を使用して評価を実施することができる。分析はさらに感染病原体の検出を含み得る。

【0072】

本発明のバイオマーカーに関連する生物学的経路

本発明のバイオマーカーはCANにより影響を受ける選択された生物学的経路を同定し、そしてこれらの生物学的経路は固形臓器同種移植片腎症に関連性がある。実際にこの分析により遺伝子クラスターを示し得る選択された生物学的経路のための着実なバイオマーカー署名が表された。かかる生物学的経路には、限定するものではないが例えば「選択された本発明のCAN関連遺伝子」と題されたセクションにて実施例Iで示された生物学的経路が含まれる。

【0073】

大規模遺伝子発現分析の出現により、遺伝子の群がしばしば協調された様式で一緒に発現されることが表されている。例えば出芽酵母における全ゲノム発現分析により、ジオーキシシフト（diauxic shift）としても公知の成長条件の変化の間の代謝遺伝子の協調的調節が示された（DiRisi et al., Science 278: 680 - 686 (1997); Eisen et al., PNAS 95: 14863 - 14868 (1998)）。ジオーキシシフトは、グルコースをエタノールに発酵する酵母細胞が培地中のグルコースを使い果たし、そしてエタノールを代謝し始めるときに生じる。グルコースの存在下では解糖系の遺伝子が発現され、そしてグルコースのエタノールへの発酵を実施する。グルコースが使い果たされたときに、酵母細胞はエタノールを代謝しなければならず、クレブスサイクルおよび呼吸に大いに依存する過程である。

【0074】

したがって解糖系遺伝子の発現は低下し、そしてクレブスサイクルおよび呼吸遺伝子の発現は協調された様式で増加する。類似の協調的遺伝子調節が種々の癌細胞において見出されている。細胞周期進行およびDNA合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子はしばしば癌性細胞において協調的に過剰発現される（Ross et al., Nature Genet. 24: 227 - 235 (2000); Perou et al., PNAS 96: 9212 - 9217 (1999); Perou et al., Nature 406: 747 - 752 (2000)）。

【0075】

遺伝子の協調的調節は機能的な観点から論理的である。たいていの細胞過程は複数の遺伝子を必要とし、例えば：解糖、クレブスサイクル、および細胞周期進行は全て多重遺伝子過程である。したがって機能的に関係する遺伝子の協調的発現は、細胞に種々の細胞活

性を実施させるのに必須である。遺伝子のかかる群分けを「遺伝子クラスター」と称することができる (Eisen et al., PNAS 95: 14863-68 (1998))。同様に C A N および特に慢性拒絶において機能的に関係する遺伝子の協調的発現もまた本発明の範囲内である。

【0076】

遺伝子発現のクラスター化は機能的な必要性のみならず、転写制御のメカニズムの自然な結果でもある。調節エレメントとも称される、シス作用性 DNA 配列に結合する転写レギュレーターにより遺伝子発現が一次的に調節される。特定の遺伝子に関する発現のパターンはその遺伝子に作用する種々の転写レギュレーターの活性の合計の結果である。したがって類似の一連の調節エレメントを有する遺伝子もまた類似の発現パターンを有し、そして一緒にクラスター化する傾向があろう。もちろん遺伝子が特定の環境下で協調的に発現される異なる調節エレメントを有することも可能であり、そして全く一般的である。

10

【0077】

一を超える遺伝子クラスターの分析が移植片拒絶の診断のためのみならず、適切な医学的介入を決定するためにも有用であろうと予想される。例えば慢性同種移植片腎症は多くのバリエーションおよび多くの様々な最適処置計画を有する障害に関する一般的な記載である。一つの実施態様では、本発明は同時にグラフト拒絶を同定し、そして適切な処置を決定するための方法を提供する。一般に本発明は遺伝子クラスターを示し得る、様々な、情報提供するバイオマーカー遺伝子の代表的なものを測定することを含む方法を提供し、それは適切な処置プロトコルを示す。

20

【0078】

遺伝子発現の検出

本発明の特定の態様では、対象から入手された一つまたはそれより多いバイオマーカー遺伝子に関して発現強度を決定する。試料はグラフト生検からのような対象から入手された細胞を含み得る。その他の試料には、限定するものではないが血液、血漿、血清、リンパ液、CSF、囊胞液、腹水、尿、糞便および胆汁が含まれる。試料を気管支肺胞洗浄液、胸膜腔内液もしくは腹水、または正常もしくは異常に機能する同種移植片により分泌もしくは排出された任意のその他の液体、または同種移植片を通してもしくは同種移植片に対して解剖学的に近位の浸出もしくは漏出の結果である任意のその他の液体、または同種移植片と液体で連絡している任意の液体から入手することもできる。

30

【0079】

遺伝子発現を測定するための多くの様々な方法が当分野において公知である。古典的な方法には、定量的 RT-PCR、ノーザンブロットおよびリボヌクレアーゼ保護アッセイが含まれる。本明細書に記載される特定の事例ではバイオマーカー遺伝子の発現強度を測定するために競合的逆転写 (RT) - PCR が使用される。かかる方法を用いて対象遺伝子および全遺伝子クラスターの発現を試験することができる。しかしながら試験される遺伝子の数が増加するので、時間および経費が重荷になり得る。

【0080】

大規模検出方法により、より迅速で安い経費の、多くの遺伝子の発現レベルの同時分析が可能になる。かかる方法は典型的には固体基質に取り付けられたプローブの規則配列を伴う。各プローブは異なる一連の核酸にハイブリダイズできる。一つの方法では、目的の種々遺伝子のコード化領域の実質的な部分を増幅または合成することによりプローブを作成する。次いでこれらの遺伝子を固体支持体にスポットする。次いで mRNA 試料が得られ、cDNA に変換され、増幅され、そして (通常蛍光標識で) 標識される。次いで標識された cDNA をアレイに適用し、そして cDNA はその濃度に直線的に関係する様式でその各々のプローブにハイブリダイズする。標識の検出によりアレイに付着した各 cDNA の量の測定が可能になる。

40

【0081】

かかる DNA アレイ実験を実施するための多くの方法が当分野において周知である。方法の実例を以下に記載するが、限定されることを意図するものではない。

50

マイクロアレイは当分野において公知であり、そして順々に遺伝子生成物（例えば cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチド）に対応するプローブが公知の位置で結合する表面からなる。一つの実施態様ではマイクロアレイは、その中での各位置が遺伝子によりコードされる生成物（例えばタンパク質または RNA）に関して別個の結合部位を示し、そしてその中での結合部位が生物のゲノムにおける遺伝子のほとんどまたはほぼ全ての生成物に関して存在するアレイ（すなわちマトリックス）である。好ましい実施態様では「結合部位」（本明細書では以後「部位」）は、特定の同族 cDNA が特異的にハイブリダイズできる核酸または核酸誘導体である。結合部位の核酸または誘導体は例えば合成オリゴマー、全長 cDNA、全長未満の cDNA、または遺伝子フラグメントでよい。

【0082】

通常マイクロアレイは少なくとも 100 個およびさらに好ましくは 500 個、1000 個、4000 個またはそれを超える遺伝子に相当する結合部位を有するであろう。特定の実施態様では、最も好ましいアレイは示された特定の生物の約 98 - 100 % の遺伝子を有するであろう。その他の実施態様では、より少ない、具体的に選択された遺伝子に相当する結合部位を有する特化されたマイクロアレイを使用することができる。特定の実施態様では、特化されたマイクロアレイは 4000 個より少ない、1000 個より少ない、200 個より少ない、または 50 個より少ない遺伝子に関する結合部位を含み、そして表 2 のいずれかのバイオマーカーの少なくとも 2 個、好ましくは少なくとも 3 個、4 個、5 個、またはそれより多い遺伝子に関する結合部位を含む。好ましくは、マイクロアレイは目的の生物学的ネットワークモデルの試験および確認に関連性のある遺伝子に関する結合部位を有する。

【0083】

マイクロアレイに接触させる核酸を種々の方式で調製することができる。全およびポリ (A) + RNA を調製するための方法が周知であり、そして一般的には Sambrook et al., supra に記載されている。標識 cDNA はオリゴ dT - プライミングまたはランダムプライミング逆転写により mRNA から調製され、その双方は当分野において周知である（例えば Klug and Berger, Methods Enzymol. 152 : 316 - 325 (1987) 参照）。検出可能な標識に抱合された dNTP、最も好ましくは蛍光標識 dNTP の存在下で逆転写を実施することができる。これに代えて単離された mRNA を、標識 dNTP の存在下で二本鎖 cDNA のインビトロ転写により合成される標識アンチセンス RNA に変換することができる (Lockhart et al., Nature Biotech. 14 : 1675 (1996))。cDNA または RNA を検出可能な標識の不在下で合成することができ、そして続いて例えばビオチン化 dNTP または rNTP の組み込み、またはいくつかの類似の手段により標識し（例えばビオチンのソラレン誘導体を RNA に対して光架橋する）、続いて標識ストレプトアビジン（例えばフィコエリトリン抱合ストレプトアビジン）またはその均等物を添加することができる。

【0084】

蛍光標識を使用する場合、フルオレセイン、リサミン、フィコエリスリン、ローダミン (Perkin Elmer Cetus)、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、FluorX (Amersham) およびその他（例えば Kricka, Academic Press San Diego, Calif. (1992) 参照）を含む多くの適当なフルオロフォアが公知である。

別の実施態様では、蛍光標識以外の標識が使用される。例えば放射性標識、または区別される発光スペクトルを有する放射性標識の対を使用することができる (Zhao et al., Gene 156 : 207 (1995) ; Pietu et al., Genome Res. 6 : 492 (1996) を参照のこと)。しかしながら放射性同位元素はあまり好ましくない実施態様である。

【0085】

標識核酸の集団がマトリックスに取り付けられた適切な相補的核酸に特異的にハイブリダイズするように核酸ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を選ぶ。本明細書使用される際には、より短いポリヌクレオチドが 25 塩基以下である場合に、標準的な塩基対形成規則を用いて誤対合がないとき、またはより短いポリヌクレオチドが 25 塩基よりも長い

10

20

30

40

50

場合に、5%しか誤対合がないとき、一つのポリヌクレオチド配列は別のものに相補的であると考えられる。

【0086】

最適なハイブリダイゼーション条件は長さ（例えばオリゴマー対200塩基より大きいポリヌクレオチド）および標識核酸の型（例えばRNA、DNA、PNA）および固定化ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドに依存するであろう。核酸に関する特異的（すなわちストリンジェント）ハイブリダイゼーション条件に関する一般的なパラメーターはSambrook et al., supra、およびAusubel et al., 1987, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley - Interscience, New York（その全てを全目的に関して出典明示により本明細書の一部とする）に記載されている。標識核酸のアレイに対する非特異的結合を、大量の非特異的DNAでアレイを処理する、いわゆる「遮断」工程により低下させることができる。

【0087】

蛍光標識プローブを使用する場合、転写物アレイの各部位での蛍光発光を、好ましくは走査型共焦点レーザー顕微鏡により検出することができる。二つのフルオロフォアを使用する場合、使用した二つのフルオロフォアの各々に関して適切な励起ラインを用いる別個のスキャンを実施する。これに代えて、二つのフルオロフォアに特異的な波長で標本の同時照明を可能にするレーザーを使用でき、そして二つのフルオロフォアからの発光を同時に分析できる（Shalon et al., Genome Research 6: 639 - 645 (1996)を参照のこと）。好ましい実施態様では、コンピューター制御X-Yステージおよび顕微鏡対物を有するレーザー蛍光スキャナでアレイをスキャンする。マルチライン混合ガスレーザーで二つのフルオロフォアの逐次的励起が達成され、そして発光された光を波長により分割し、そして二つの光電子増倍管で検出する。蛍光レーザー走査装置はSchena et al., Genome Res. 6: 639 - 645 (1996)および本明細書に引用されたその他の文献に記載されている。これに代えてFerguson et al., Nature Biotech. 14: 1681 - 1684 (1996)に記載される光ファイバー束を使用して、多くの部位で同時にmRNA存在量レベルをモニタリングすることができる。蛍光マイクロアレイスキャナはAffymetrix、Packard BioChip Technologies、BioRobotics および多くのその他の供給者から市販により入手可能である。

【0088】

種々のコンピューターソフトウェアを使用してシグナルを記録、定量化および分析する。一つの実施態様では、グラフィックプログラム（例えばHijaak Graphics Suite）を用いてスキャンされた画像をスペckル除去し、そして次に各部位で各波長での平均ハイブリダイゼーションのスプレッドシートを創成する画像グリッド化プログラムを用いて分析する。必要により、二つの蛍光に関するチャンネル間の「クロストーク」（またはオーバーラップ）に関して実験的に決定された補正を行うことができる。転写物アレイ上の任意のハイブリダイゼーション部位に関して二つのフルオロフォアの発光の比率を計算するのが好ましい。比率は同族遺伝子の絶対的な発現レベルに非依存적であるが、その発現が薬物投与、遺伝子欠失または任意のその他の試験される事象により有意に調整される遺伝子に関して有用である。

【0089】

一つの実施態様では、二つの異なって標識されたcDNAのセットの混合物をマイクロアレイにハイブリダイズさせることにより、目的の細胞の転写状態を反映する転写物アレイを作成する。一つの細胞は目的の細胞であるが、他方の細胞は標準化対照として使用される。次いで各細胞のcDNAのマイクロアレイへの相対的ハイブリダイゼーションは二つの細胞における各遺伝子の相対的発現を反映する。

【0090】

様々な試料および条件におけるバイオマーカーの発現レベルを種々の統計的方法を用いて比較することができる。様々な遺伝子の発現パターンにおける関連性の程度を評価するために種々の統計的方法が利用可能である。統計的方法を関係する二つの部分に分けるこ

10

20

30

40

50

とができる：一つまたはそれより多い遺伝子の発現パターンの関係性を決定するための数的指標、および適当な数的指標に基づいた発現データを体系化し、そして分類するためのクラスタリング方法 (Sherlock, Curr. Opin. Immunol. 12 : 201 - 205 (2000) ; Butte et al., Pacific Symposium on Biocomputing, Hawaii, World Scientific, p. 418 - 29 (2000))。

【0091】

一つの実施態様では、PLSのような管理された学習方法を用い、そして予測モデリングの手段としてニューラルネットワーク (NN)、サポートベクトルマシン (SVP、またはk - 最近傍 (KNN)) のようなその他の管理された学習アルゴリズムを用いることができる。実施例 I に詳記されるように、本発明のバイオマーカーはCAN (例えば選択された等級のCAN) を有する組織を分類するためにPLSモデルにおける記述子として有用である。

10

別の実施態様では、ピアソン相関、ユークリッド距離測定、エントロピー計算 (Butte et al. 2000, supra)、凝集型クラスタリング法、分割型クラスタリング法および自己組織化マップ (SOM) のような管理されていない方法を用いる。

【0092】

別の態様では、本発明はプローブセットを提供する。好ましいプローブセットは一つまたはそれより多い遺伝子の発現を検出し、そしてグラフトの状態についての情報を提供するように設計されている。本発明の好ましいプローブセットは表2のいずれかのバイオマーカー遺伝子に属する少なくとも二つの遺伝子を検出するために有用であるプローブを含む。本発明のプローブセットは10000個だけの遺伝子転写物の検出のために有用なプローブを含み、そして好ましいプローブセットは4000個より少ない、1000個より少ない、200個より少ない、100個より少ない、90個より少ない、80個より少ない、70個より少ない、60個より少ない、50個より少ない、40個より少ない、30個より少ない、20個より少ない、10個より少ない遺伝子転写物の検出のために有用なプローブを含むであろう。本発明のプローブセットは移植片状態についての情報を有する遺伝子転写物の検出に標的化されている。本発明のプローブセットはまた移植片状態についての情報を有さない遺伝子転写物を検出する多数または少数のプローブをも含み得る。好ましい実施態様では、本発明のプローブセットを固体基質に取り付けてプローブのアレイを形成する。プローブセットは多重PCRにも有用であり得ると予想される。プローブセットのプローブは核酸 (例えばDNA、RNA、DNAおよびRNAの化学的に修飾された形態) もしくはPNA、または望ましい核酸配列と特異的に相互作用することができる任意のその他の重合性化合物でよい。

20

30

【0093】

本発明のバイオマーカー (複数も可) を含むコンピューター可読媒体もまた提供される。本明細書で使用される際には「コンピューター可読媒体」にはコンピューターにより直接読み取られ、そしてアクセスされ得る媒体が含まれる。かかる媒体には、限定するものではないが；フロッピーディスクのような磁気記憶媒体、ハードディスク記憶媒体、および磁気テープ；CD-ROMのような光学式記憶媒体；RAMおよびROMのような電氣的記憶媒体；ならびに磁気/光学式記憶媒体のようなこれらのカテゴリーのハイブリッドが含まれる。いずれかの現在公知のコンピューター可読媒体をどのように使用して、本発明のバイオマーカーがそこに記録されているコンピューター可読媒体を含む製品を創成することができるかは、当業者には容易に理解されよう。

40

【0094】

本明細書で使用される際には「記録された」には、コンピューター可読媒体に情報を保存するための過程が含まれる。本発明のバイオマーカーを含む製品を作成するためにコンピューター可読媒体の情報を記録するために、当業者はいずれかの現在公知の方法を容易に採用することができる。

【0095】

種々のデータ処理プログラムおよびフォーマットを用いて本発明のバイオマーカー情報

50

をコンピューター可読媒体に保存することができる。例えばバイオマーカーに相当する核酸配列をWordPerfectおよびMicroSoft Wordのような市販により入手可能なソフトウェアでフォーマットされた文書処理テキストファイルで表すか、またはDB2、Sybase、Oracle等のようなデータベースアプリケーションに保存されたASCIIファイルの形態で表すことができる。本発明のバイオマーカーがそこに記録されているコンピューター可読媒体を得るために、かなり多数のデータ処理構成フォーマット（例えばテキストファイルまたはデータベース）を適合させることができる。

【0096】

コンピューター可読形態で本発明のバイオマーカーを提供することにより、種々の目的のためにバイオマーカー配列情報に日常的にアクセスすることができる。例えば当業者は、標的配列または標的構造モチーフをデータ記憶手段に保存された配列情報と比較するために、コンピューター可読形態の本発明のヌクレオチドまたは核酸配列を使用することができる。検索手段を用いて特定の標的配列または標的モチーフと一致する本発明の配列のフラグメントまたは領域を同定する。

10

【0097】

本発明にはまた本発明のバイオマーカー（複数可）を含むアレイも含まれる。アレイを用いてアレイの一つまたはそれより多い遺伝子の発現を検定することができる。一つの実施態様では、アレイを用いて、アレイの遺伝子の組織特異性を解明するために、組織における遺伝子発現を検定することができる。この様式で約8600個までの遺伝子を発現に関して同時に検定することができる。これにより一つまたはそれより多い組織において特異的に発現される一連の遺伝子を示すプロフィールを開発することが可能になる。

20

【0098】

かかる定性的決定に加えて、本発明により遺伝子発現の定量化が可能になる。故に組織特異性のみならず、組織における一連の遺伝子の発現のレベルもまた解明可能である。故にその組織発現そのものおよびその組織における発現のレベルに基づいて遺伝子を群分けすることができる。これは例えば組織間または内で遺伝子発現の関係性を解明するのに有用である。故に一つの組織を混乱させることができ、そして第2の組織における遺伝子発現に及ぼす影響を決定することができる。この局面では、生物学的刺激に応答して一つの細胞型が別の細胞型に及ぼす影響を決定することができる。かかる決定は例えば遺伝子発現のレベルで細胞-細胞相互作用の影響を知るために有用である。薬剤が治療的に投与されて一つの細胞型を処置するが、別の細胞型に望ましくない影響を有する場合、本発明は望ましくない影響の分子基盤を決定するためのアッセイを提供し、そして故に反対に作用する薬剤を同時投与するか、またはそうでなければ望ましくない影響を処置する機会を提供する。同様に単一の細胞型内でさえ、分子レベルで望ましくない生物学的影響を決定することができる。故に標的遺伝子以外の発現に及ぼす薬剤の影響を解明し、そして反対に作用させることができる。

30

【0099】

別の実施態様では、アレイを用いてアレイにおける一つまたはそれより多い遺伝子の発現の時間経過をモニタリングすることができる。これは本明細書に開示されるように、種々の生物学的局面において、例えば発達および分化、疾患進行、細胞形質転換および老化のようなインビトロ過程、例えば痛みおよび食欲のような自律神経のおよび神経学的過程、ならびに学習または記憶のような認知機能で起こり得る。

40

【0100】

アレイはまた同一の細胞または異なる細胞において、遺伝子の発現の別の遺伝子の発現に及ぼす影響を解明するためにも有用である。例えばこれは究極のまたは下流の標的を調節できない場合の治療的介入のための代替分子標的の選択を提供する。

アレイはまた正常および疾患細胞において一つまたはそれより多い遺伝子の差次的発現パターンを解明するためにも有用である。これは診断または治療的介入のための分子標的として供され得る一連の遺伝子を提供する。

【0101】

50

タンパク質

特定のタンパク質のレベル増加により移植片についての診断情報もまた提供され得るということがさらに予想される。特定の実施態様では、表2の遺伝子によりコードされる一つまたはそれより多いタンパク質を検出することができ、そしてタンパク質レベルの上昇または低下を用いてグラフト拒絶を診断することができる。好ましい実施態様では、移植後液体試料中のタンパク質レベルを検出し、そして特に好ましい実施態様では、液体試料は末梢血または尿である。別の好ましい実施態様では、タンパク質レベルはグラフト生検において検出される。

本明細書を鑑みて、タンパク質を検出するための方法は当分野において周知である。かかる方法の実例にはウェスタンブロッティング、酵素結合検疫吸着アッセイ (E L I S A)、一次元および二次元電気泳動、質量分析および酵素活性の検出が挙げられる。適当な抗体にはポリクローナル、モノクローナル、フラグメント (例えば F a b フラグメント)、一本鎖抗体および特異的結合分子のその他の形態が含まれ得る。

【0102】

予見医学

本発明は診断アッセイ、予後診断アッセイ、遺伝薬理学および臨床試験のモニタリングが予後診断 (予測) 目的で用いられ、それにより対象を予防的に診断および処置する予見医学の分野に関係する。したがって本発明の一つの態様は試料 (例えば血液、血清、細胞、組織) からバイオマーカータンパク質および/または核酸発現を決定し、それにより対象が移植片を拒絶する可能性があるかどうかを決定するための診断アッセイに関する。

【0103】

本発明の別の態様は、以下のセクションでさらに詳記されるような臨床試験でバイオマーカーの発現または活性に及ぼす薬剤 (例えば薬物、化合物) の影響をモニタリングすることに関係する。

試料中の本発明のバイオマーカータンパク質または遺伝子の存在または不在を検出するための方法の実例は、被験対象から試料を入手すること、および試料中のバイオマーカータンパク質または核酸の存在が検出されるように、タンパク質またはバイオマーカータンパク質をコードする核酸 (例えば m R N A、ゲノム D N A) を検出できる化合物または薬剤と試料を接触させることを伴う。本発明のバイオマーカー遺伝子またはタンパク質に相当する m R N A またはゲノム D N A を検出するための好ましい薬剤は、本発明の m R N A またはゲノム D N A にハイブリダイズできる標識された核酸プローブである。本発明の診断アッセイにおける使用に適当なプローブは本明細書に記載される。

【0104】

バイオマーカータンパク質を検出するための好ましい薬剤はバイオマーカータンパク質に結合できる抗体、好ましくは検出可能な標識を有する抗体である。抗体はポリクローナルまたはさらに好ましくはモノクローナルである。インタクトな抗体またはそのフラグメント (例えば F a b または F (a b ')₂) を使用することができる。プローブまたは抗体に関して「標識された」なる用語は、検出可能な物質をプローブまたは抗体にカップリング (すなわち物理的連結) させることによるプローブまたは抗体の直接標識、および直接標識された別の試薬との反応性によるプローブまたは抗体の間接標識を包含することが意図される。間接標識の実例には、蛍光標識された二次抗体を使用する一次抗体の検出、および蛍光標識されたストレプトアビジンで検出できるような、D N A プローブのビオチンでの末端標識が挙げられる。「試料」なる用語には、対象ならびに対象内に存在する組織、細胞および液体から単離された組織、細胞および生物学的液体が含まれると意図される。すなわち本発明の検出方法を使用して、試料中のバイオマーカー m R N A、タンパク質またはゲノム D N A をインビトロおよびインビボで検出することができる。例えばバイオマーカー m R N A の検出のためのインビトロ技術には、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが含まれる。バイオマーカータンパク質の検出のためのインビトロ技術には、酵素結合検疫吸着アッセイ (E L I S A)、ウェスタンブロット、免疫沈殿および免疫蛍光が含まれる。バイオマーカーゲノム D N A の検出の

ためのインビトロ技術にはサザンハイブリダイゼーションが含まれる。さらに、バイオマーカータンパク質の検出のためのインビボ技術には、対象に標識された抗バイオマーカー抗体を導入することが含まれる。例えば対象におけるその存在および位置を標準的な撮像技術により検出することができる放射性バイオマーカーで抗体を標識することができる。

【0105】

一つの実施態様では、試料は被験対象からのタンパク質分子を含有する。これに代えて、試料は被験対象からのmRNA分子または被験対象からのゲノムDNA分子を含有し得る。好ましい試料は対象から従来の手段により単離された血清試料である。

方法はさらに対照対象から対照試料（例えば移植されていない健常腎臓から、または拒絶の徴候を示さない移植された健常腎臓からの生検）を入手すること、バイオマーカータンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在が試料中で検出されるように、バイオマーカータンパク質、mRNAまたはゲノムDNAを検出できる化合物または薬剤と対照試料を接触させること、および対照試料中のバイオマーカータンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在を、被験試料中のバイオマーカータンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在と比較することを伴う。

【0106】

本発明はまた試料中のバイオマーカーの存在を検出するためのキットをも包含する。例えばキットは試料中のバイオマーカータンパク質またはmRNAを検出できる標識された化合物または薬剤；試料中のバイオマーカーの量を決定するための手段；および試料中のバイオマーカーの量を標準と比較するための手段を含むことができる。化合物または薬剤を適当な容器に包装することができる。キットはさらに、キットを使用してバイオマーカータンパク質または核酸を検出するための説明書を含むことができる。

【0107】

さらに本明細書に記載される診断方法を利用してバイオマーカー発現または活性異常に関連する疾患または障害を有するか、またはそれを発達される危険性を有する対象を同定することができる。本明細書で使用される際には、「異常」なる用語には野生型バイオマーカー発現または活性から逸脱するバイオマーカー発現または活性が含まれる。発現または活性異常には、発現または活性の増加または減少、および野生型発達の発現のパターンまたは細胞内の発現のパターンに追従しない発現または活性が含まれる。例えばバイオマーカー発現または活性異常には、バイオマーカー遺伝子における変異がバイオマーカー遺伝子の過少発現または過剰発現を引き起こす場合、およびかかる変異が非機能的バイオマーカータンパク質または野生型の様式では機能しないタンパク質、例えばバイオマーカーリガンドと相互作用しないタンパク質または非バイオマーカータンパク質リガンドと相互作用するタンパク質を導く状況が含まれると意図される。

【0108】

さらに本明細書で記載される予後診断アッセイを用いて、対象に薬剤（例えばアゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド擬似物質、タンパク質、ペプチド、核酸、小型分子、またはその他の薬物候補）を投与して拒絶の危険性、例えばシクロスポリンを低減させることができるかどうかを決定することができる。故に本発明は、表2の遺伝子の組み合わせの遺伝子発現または活性の増加に関連する障害のための薬剤で対象を有効に処置できるかどうかを決定するための方法を提供する。

【0109】

遺伝子の発現または活性に及ぼす薬剤（例えば薬物）の影響のモニタリングを基本的な薬物スクリーニングのみならず臨床試験にも適用できる。例えば本明細書に記載されるようなスクリーニングアッセイにより遺伝子発現、タンパク質レベルを増加させるかまたは活性を上方調節すると決定された薬剤の有効性を、分子署名および薬剤での処置の間の分子署名の任意の変化を試験することにより提示する対象の臨床試験においてモニタリングすることができる。

【0110】

例えば、そして限定するものではないが、遺伝子活性を調整する薬剤（例えば化合物、

10

20

30

40

50

薬物または小型分子)での処置により細胞内で調整される遺伝子およびそのコードされるタンパク質を同定することができる。臨床試験では、細胞を単離し、そしてmRNAを調製し、そして拒絶に関連する意味づけられた遺伝子の発現のレベルに関して分析することができる。本明細書に記載されるようなノーザンブロット分析またはRT-PCRにより、またはこれに代えて本明細書に記載されるような方法の一つにより、生成されたタンパク質の量を測定することにより遺伝子発現のレベル(例えば遺伝子発現パターン)を定量することができる。この方式では遺伝子発現パターンを、細胞の薬剤に対する生理学的応答の指標である分子署名として供することができる。したがって対象の薬剤での処置の前およびその間の種々の時点でこの応答状態を決定することができる。

【0111】

好ましい実施態様では、本発明は(i)薬剤の投与の前に対象から投与前試料を入手すること;(ii)投与前試料中の遺伝子または遺伝子の組み合わせの発現、遺伝子、mRNAまたはゲノムDNAによりコードされるタンパク質のレベルを検出すること;(iii)対象から一つまたはそれより多い投与後試料を入手すること;(iv)投与後試料中のバイオマーカータンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの発現または活性のレベルを検出すること;(v)投与前試料中のバイオマーカータンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの発現または活性のレベルを、投与後試料または試料(複数可)中の遺伝子または遺伝子の組み合わせ、遺伝子、mRNAまたはゲノムDNAによりコードされるタンパク質と比較すること;および(vi)したがって対象に対する薬剤の投与を改変すること;の工程を含む薬剤(例えばアゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド擬似物質、タンパク質、ペプチド、核酸、小型分子、または本明細書に記載されるスクリーニングアッセイにより同定されるその他の薬物候補)での対象の処置の有効性をモニタリングするための方法を提供する。例えば遺伝子の発現または活性をより低いレベルまで低下させるために、すなわち移植片拒絶に対して保護するために薬剤の有効性を増大させるためには、薬剤の投与の増加が望ましいかもしれない。これに代えて、バイオマーカーの発現または活性を検出されたものよりも低いレベルまで低下させる、すなわち、例えば毒性を回避するために、薬剤の有効性を低下させるためには、薬剤の投与の減少が望ましいかもしれない。かかる実施態様にしたがって、たとえ観察可能な表現型の応答がない場合でも、遺伝子発現または活性を薬剤の有効性の指標として使用することができる。

【0112】

本発明は移植片拒絶を防御するための予防的および治療的双方の方法を提供する。処置の予防的および治療的の双方の方法に関して、薬理ゲノミクスの分野から得られた知識に基づいてかかる処置を具体的にあつらえるか、または修飾することができる。本明細書で使用される際には、「薬理ゲノミクス」には遺伝子シーケンシング、統計遺伝学、および遺伝子発現分析のようなゲノミクステクノロジーの、臨床開発中および市販されている薬物への適用が含まれる。さらに具体的には、その用語は対象の遺伝子とそのヒトの薬物に対する応答性(例えば対象の「薬物応答性表現型」または「薬物応答性遺伝子型」)をどのように決定するかの研究を指す。故に本発明の別の態様はその対象の薬物応答性遺伝子型にしたがって、本発明のバイオマーカー分子またはバイオマーカーモジュレーターのいずれかでの対象の予防的または治療的処置をあつらえるための方法を提供する。薬理ゲノミクスにより臨床医または医師が、処置から最も利益を被るであろう対象に予防的または治療的処置を標的化し、そして毒性の薬物関連副作用を経験するであろう対象の処置を回避することが可能になる。

【0113】

一つの態様では本発明は、対象にバイオマーカー発現を調整する化合物または薬剤を投与することによりバイオマーカー発現または活性の増加に関連する対象における移植片拒絶を防御するための方法を提供する。かかる化合物または薬剤の実例は、例えば移植に使用されるもののような、免疫抑制特性を有する化合物または薬剤(例えばカルシニューリン阻害剤、シクロスポリンAまたはFK506);mTOR阻害剤(例えばラパマイシン、40-O-(2-ヒドロキシエチル)-ラパマイシン、CCI779、ABT578、

10

20

30

40

50

A P 2 3 5 7 3、バイオリムス - 7 またはバイオリムス - 9) ; 免疫抑制特性を有するアスコマイシン (例えば A B T - 2 8 1、A S M 9 8 1 等) ; コルチコステロイド ; シクロホスファミド ; アザチオブレン ; メトトレキサート ; レフルノミド ; ミゾリビン ; ミコフェノール酸または塩 ; ミコフェノール酸モフェチル ; 1 5 - デオキシスベルグアリンまたはその免疫抑制性相同体、類似体または誘導体 ; P K C 阻害剤 (例えば第 W O 0 2 / 3 8 5 6 1 号または第 W O 0 3 / 8 2 8 5 9 号に開示されるようなもの、実施例 5 6 または 7 0 の化合物) ; J A K 3 キナーゼ阻害剤 (例えば N - ベンジル - 3, 4 - ジヒドロキシ - ベンジリデン - シアノアセトアミド a - シアノ - (3, 4 - ジヒドロキシ) -] N - ベンジルシンナムアミド (チルホスチン A G 4 9 0)、プロジギオシン 2 5 - C (P N U 1 5 6 8 0 4)、[4 - (4' - ヒドロキシフェニル) - アミノ - 6, 7 - ジメトキシキナゾリン] (W H I - P 1 3 1)、[4 - (3' - プロモ - 4' - ヒドロキシシルフェニル) - アミノ - 6, 7 - ジメトキシキナゾリン] (W H I - P 1 5 4)、[4 - (3', 5' - ジプロモ - 4' - ヒドロキシシルフェニル) - アミノ - 6, 7 - ジメトキシキナゾリン] W H I - P 9 7、K R X - 2 1 1、遊離形態または薬学的に許容される塩形態、例えば一クエン酸塩 (C P - 6 9 0 5 5 0 と称される) の 3 - { (3 R, 4 R) - 4 - メチル - 3 - [メチル - (7 H - ピロロ [2, 3 - d] ピリミジン - 4 - イル) - アミノ] - ピペリジン - 1 - イル } - 3 - オキソ - プロピオニトリル、または第 W O 0 4 / 0 5 2 3 5 9 号もしくは第 W O 0 5 / 0 6 6 1 5 6 号にて開示されるような化合物) ; S 1 P 受容体アゴニストまたはモジュレーター (例えば F T Y 7 2 0、場合によってはリン酸化されているか、またはその類似体、例えば 2 - アミノ - 2 - [4 - (3 - ベンジルオキシフェニルチオ) - 2 - クロロフェニル] エチル - 1, 3 - プロパンジオール、場合によってはリン酸化されているかまたは 1 - { 4 - [1 - (4 - シクロヘキシル - 3 - トリフルオロメチル - ベンジルオキシイミノ) - エチル] - 2 - エチル - ベンジル } - アゼチジン - 3 - カルボン酸またはその薬学的に許容される塩) ; 免疫抑制性モノクローナル抗体 (例えば白血球受容体に対するモノクローナル抗体、例えば M H C、C D 2、C D 3、C D 4、C D 7、C D 8、C D 2 5、C D 2 8、C D 4 0、C D 4 5、C D 5 2、C D 5 8、C D 8 0、C D 8 6 またはそのリガンド) ; その他の免疫調整化合物 (例えば C T L A 4 またはその変異体の細胞外ドメインの少なくとも一部を有する組換え結合分子、例えば非 C T L A 4 タンパク質配列に結合した C T L A 4 またはその変異体の少なくとも細胞外部分、例えば C T L A 4 I g (例えば A T C C 6 8 6 2 9 と指定されたもの) またはその変異体、例えば L E A 2 9 Y) ; 付着分子阻害剤 (例えば L F A - 1 アンタゴニスト、I C A M - 1 または - 3 アンタゴニスト、V C A M - 4 アンタゴニストまたは V L A - 4 アンタゴニスト) である。これらの化合物または薬剤を組み合わせることもできる。

【 0 1 1 4 】

本発明の別の態様は治療目的のためにバイオマーカータンパク質発現または活性を調整する方法に係る。したがって実例的な実施態様では、本発明の調整方法は、細胞を細胞に関連するバイオマーカータンパク質活性の一つまたはそれより多い活性を調整するバイオマーカータンパク質または薬剤と接触させることを伴う。バイオマーカータンパク質活性を調整する薬剤は、核酸もしくはタンパク質のような本明細書に記載されるような薬剤、バイオマーカータンパク質の天然発生標的分子 (例えばバイオマーカータンパク質基質)、バイオマーカータンパク質抗体、バイオマーカータンパク質アゴニストもしくはアンタゴニスト、バイオマーカータンパク質アゴニストもしくはアンタゴニストのペプチド擬似物質、またはその他の小型分子でよい。一つの実施態様では、薬剤は一つまたはそれより多いバイオマーカータンパク質活性を刺激する。かかる刺激剤の実例には活性バイオマーカータンパク質および細胞に導入されているバイオマーカータンパク質をコードする核酸分子が挙げられる。別の実施態様では、薬剤は一つまたはそれより多いバイオマーカータンパク質活性を阻害する。かかる阻害剤の実例にはアンチセンスバイオマーカータンパク質核酸分子、抗バイオマーカータンパク質抗体およびバイオマーカータンパク質阻害剤が挙げられる。これらの調整方法をインビトロで (例えば細胞を薬剤と共に培養することにより) またはこれに代えてインビボで (例えば薬剤を対象に投与することにより) 実

施することができる。このように本発明は、バイオマーカータンパク質または核酸分子の発現または活性異常を特徴とする疾患または障害に苦しむ対象を処置する方法を提供する。一つの実施態様では、方法は薬剤（例えば本明細書に記載されるスクリーニングアッセイにより同定された薬剤）またはバイオマーカータンパク質発現もしくは活性を調整する（例えば上方調節または下方調節する）薬剤の組み合わせを投与することを伴う。別の実施態様では、方法は、バイオマーカータンパク質または核酸分子を治療として投与して、バイオマーカータンパク質発現または活性の低下または異常を補うことを伴う。バイオマーカータンパク質が異常に下方調節され、そして／またはバイオマーカータンパク質活性の増大が有利な効果を有する可能性がある状況では、バイオマーカータンパク質活性の刺激が望ましい。例えばバイオマーカーが下方調節され、そして／またはバイオマーカータンパク質活性の増大が有利な効果を有する可能性がある状況では、バイオマーカータンパク質活性の刺激が望ましい。同様にバイオマーカータンパク質が異常に上方調節され、そして／またはバイオマーカータンパク質活性の低下が有利な効果を有する可能性がある状況では、バイオマーカータンパク質活性の阻止が望ましい。

10

20

30

40

50

【0115】

本明細書に記載されるスクリーニングアッセイにより同定されるような、本発明のバイオマーカータンパク質および核酸分子、ならびにバイオマーカータンパク質活性（例えばバイオマーカー遺伝子発現）に刺激または阻止効果を有する薬剤またはモジュレーターを対象に投与して、バイオマーカータンパク質活性異常に関連するバイオマーカー関連障害（例えば前立腺癌）を処置（予防的または治療的）することができる。かかる処置に併せて薬理ゲノミクス（すなわち対象の遺伝子型と外来性化合物または薬物に対するその対象の応答との間の関係の研究）を考慮することができる。治療薬の代謝における差異は、用量と薬理学的に活性な薬物の血中濃度との間の関係を改変することにより重篤な毒性または治療の失敗を招き得る。故に医師または臨床医は、バイオマーカー分子またはバイオマーカーモジュレーターを投与するかどうかを決定すること、ならびにバイオマーカー分子またはバイオマーカーモジュレーターでの投薬量および／または処置の治療計画をあつらえることにおいて、適切な薬理ゲノミクス研究で得られた知識を適用することを考慮できる。

【0116】

「ゲノムワイド関連解析」として公知の薬物応答を予測する遺伝子の同定に対する一つの薬理ゲノミクス研究法は、既知の遺伝子関連バイオマーカー（例えばその各々が2個のバリエーションを有する、ヒトゲノム上の60000-100000個の多型性または可変部位からなる「2対立遺伝子の」遺伝子バイオマーカー地図）からなるヒトゲノムの高分解能地図に一次的に依存する。かかる高分解能遺伝子地図を、特定の観察された薬物応答または副作用に関連するバイオマーカーを同定するための第II/III相薬物試験に参加している統計的に有意な数の対象の各々のゲノムの地図と比較することができる。これに代えて、ヒトゲノムにおけるおよそ1000万個の公知の単一ヌクレオチド多型性（SNP）の組み合わせからかかる高分解能地図を作成することができる。本明細書で使用される際には「SNP」は、一続きのDNAにおける単一のヌクレオチド塩基において生じる共通の改変である。例えばSNPはDNA1000塩基毎に1回生じ得る。SNPは疾患過程に関与し得るが、大部分は疾患関連ではないかもしれない。かかるSNPの発生に基づいた遺伝子地図が得られると、その対象ゲノムの特定のSNPパターンに依存して、対象を遺伝子カテゴリーに群分けすることができる。かかる様式では、遺伝的に類似する対象間で共通し得る形質を考慮して、処置計画をかかると類似する対象の群にあつらえることができる。

【0117】

これに代えて「候補遺伝子研究法」と称される方法を利用して、薬物応答を予測する遺伝子を同定することができる。この方法にしたがって、薬物標的をコードする遺伝子が公知である場合（例えば本発明のバイオマーカータンパク質）、集団においてその遺伝子の全ての共通するバリエーションをかなり容易に同定することができ、そして別のものに対比し

てその遺伝子の一つのバージョンを有することが特定の薬物応答に関連するかどうかを決定することができる。

【0118】

一を超える前記の薬理ゲノミクス研究法から作成された情報を用いて、対象の予防的または治療的処置に適切な投薬量および処置計画を決定することができる。この知識は、投与または薬物選択に適用される場合、逆反応または治療の失敗を回避させ、そして故に本明細書に記載されるスクリーニングアッセイの実例の一つにより同定されるモジュレーターのようなバイオマーカー分子またはバイオマーカーモジュレーターで対象を処置する場合に治療的または予防的有効性を強化することができる。

【0119】

本発明を以下の実施例によりさらに説明するが、それは限定として解釈されるべきではない。本明細書全体にわたって引用された全ての参考文献、特許および公開された特許出願の内容は出典明示により本明細書の一部とする。

【実施例】

【0120】

実施例

実施例1：慢性/硬化性同種移植片腎症の指標であるバイオマーカーの同定

本発明の研究の序文および目的

生検組織の組織病理学的評価は慢性腎同種移植片腎症(CAN)の診断の究極の判断基準であるが、CANの発症の予測は現在不可能である。遺伝子発現プロファイリングのような分子診断法はBANFF 97疾患分類(Racusen LC, et al., Kidney Int. 55(2): 713-23(1999))のさらなる改良を補助でき、そしてまた移植後の早い時点で適用された場合、その他の手段によりグラフト機能障害が依然検出できない場合に、予測または早期診断バイオマーカーとして用いられ得る。本研究では遺伝子発現プロファイリングを腎移植患者からの腎プロトコル生検から抽出された生検RNAに適用した。具体的には、腎移植患者の腎臓生検から誘導されたmRNA発現レベルに基づいて、慢性/硬化性同種移植片腎症のゲノムバイオマーカーを同定することによりCANの検出/診断が可能になる。

【0121】

患者の層別化

2カ所の臨床センターの腎移植患者からの腎臓生検試料を使用した；このバイオマーカー分析のためにセンター「A」は全部で71個の試料を提供し、そしてセンター「B」は全部で32個の試料を提供した。慢性/硬化性同種移植片腎症(CAN)の様々な等級にわたる試料分布を以下の表4に示す。

【0122】

表4：2カ所の臨床センターから採用された様々な等級のCANを有する試料の数

【表13】

CANの等級	(A)	(B)	全体
0：正常	53	12	65
I：軽度	17	4	21
II：中度	1	8	9
III：重度	0	8	8
全体	71	32	103

【0123】

全部で103個の試料を用いることができ、そのうち65個の試料はCANの徴候を呈さず、以下では「正常」と称され、そして38個の試料は様々な等級のCANのものであった。センターAでは等級IIを有する試料は1個のみであり、そして等級IIIを有する試料はなかったことに留意することは重要である。

【 0 1 2 4 】

1.2 試料の加工

この研究で使用された腎臓生検試料は、急性および慢性同種移植片拒絶の症状を有する患者からの腎臓生検ならびに調査の時点で正常な腎機能を有する、すなわち急性または慢性拒絶の徴候のない移植患者からの腎臓生検試料を提供するいくつかの臨床センターから収集した。

【 0 1 2 5 】

腎臓生検試料はBanff 97 診断基準にしたがって臨床センターの病理学者により試験され、そして判断される。腎臓生検の病理学的知見のコピーおよび個体群統計データ、病歴ならびにその他の臨床パラメーターをデータベースに保存した。

以下の詳記されるように臨床センターでmRNAを抽出した。Affymetrix U133 Plus 2 マイクロアレイでのハイブリダイゼーションにより遺伝子発現パターンに関して抽出されたmRNA試料を分析した。1カ所のセンターからの全試料を一つのバッチで分析した。MAS5 正規化転写レベルを臨床データと一緒にデータベースに保存する。

【 0 1 2 6 】

1.3 RNA抽出および精製

チオシアン酸グアニジンフェノール - クロロホルム抽出 (Trizol、Invitrogen Life Technologies) により各凍結組織切片から全RNAを入手し、そして次にアフィニティー樹脂 (RNeasy, Qiagen) で製造者の説明書にしたがって全RNAを精製し、そして定量した。吸光度 $\lambda = 260 \text{ nm}$ ($A_{260 \text{ nm}}$) での吸光度により全RNAを定量し、そして $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$ 比率により純度を推定した。非変性アガロースゲル電気泳動によりRNA分子の完全性を確認した。およそ - 80 °C でRNAを分析まで保存した。

【 0 1 2 7 】

1.4 GeneChip実験

全てのDNAマイクロアレイ実験をGenomics Factory EU (Basel, Switzerland) でGeneChip システム (Affymetrix, Inc., San Diego, CA, USA) の製造者の説明書にしたがって、および以前に記載されたように (Lockhart DJ, et al., Nat Biotechnol. 14 (13) : 1675 - 80 (1996)) 行った。

【 0 1 2 8 】

Trizol (Invitrogen Life Technologies, San Diego, CA, USA) を使用してイソチオシアン酸グアニジンフェノール - クロロホルム抽出により (Chomczynski P, et al., Anal Biochem 162 (1) : 156 - 9 (1987)) 全RNAをスナップ凍結した腎臓生検試料から入手し、そしてアフィニティー樹脂カラム (RNeasy; Qiagen, Hilden, Germany) で製造者の説明書にしたがって精製した。全RNAをT7基盤のポリメラーゼプロトコール (Affymetrix, GeneChip (登録商標) Expression 3' - Amplification Reagents Two-Cycle cDNA Synthesis Kit) で増幅した。54000個を超えるプローブセットを含み、35000個を超える転写物および28000個を超える十分に立証されたヒト遺伝子からのバリエーションを分析するヒトHG 133 plus 2 標的アレイ [Affymetrix] を使用した。腎臓生検あたり1個のGeneChipを使用した。得られた画像ファイル (.dat ファイル) をMicroarray Analysis Suite 5 (MAS5) ソフトウェア (Affymetrix) を使用して処理した。シグナル強度 (Signal) およびカテゴリー発現レベル測定値 (Absolute Call) に関するデータを含むタブ区切りファイルが得られた。150の「標的強度」を使用して未処理データを発現レベルに変換した。電子データベースにアップロードする前に品質に関してデータを検査した。

【 0 1 2 9 】

1.4.1 データ分析

Silicon GeneticsソフトウェアパッケージGeneSpringバージョン8.1を用いて、SILVERMAN - P + (バージョン11.0) でUmetrics AB (Sweden) によりデータ分析を実施した。MAS5変換されたトランスクリプトームデータを各センターの正常試料の中央値に関して別個に正規化した。(GeneSpringバージョン8.1)。全試料の25%を超えて存

在または限界のフラグを示すプローブセットが分析に含められ、そして18'149プローブセットのスタートセットを生じた。

【0130】

数的変化および生物学的情報の組み合わせであるこれらのデータの情報内容を、種々のデータベースおよび科学的文献と比較することにより評価した。いくつかのデータベース、例えばPubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、NIH David (<http://david.niaid.nih.gov>)、Affymetrix (<https://www.affymetrix.com>) および内部データベースを用いてデータセットの生物学的妥当性を調べた。

【0131】

1.4.2 予測モデリングおよびバリデーション技術

正規化された発現の値を対数変換し、そしてパレート基準化した (Pareto scaled)。部分最小二乗法を管理された学習アルゴリズムとして用いた。

課題が慢性拒絶の等級のような変数の予測であり、そして予測因子の遺伝子セットのような非常に多くの相関する予測因子が存在する場合、部分最小二乗法 (PLS) は最適な方法の一つである。恐らくそれは多重共線性および実測よりも非常に多くの数の変数が存在する場合、予測のための最良の統計研究方法の一つである。

【0132】

PLS回帰の目標は、応答変数Yのセットを予測因子変数Xのセットに関連付けたい状況で次元縮小法を提供することである。PLSは t_h と u_h との間の共分散を最大にする直交X成分 $t_h = Xw_h^*$ およびY成分 $u_h = Yc_h$ を同定する。それはXおよびYの主成分分析とXおよびYの正準相関分析との間の妥協である。実測よりも多くのさらなる予測因子 (cDNAクローン) が存在するために、正準相関分析または多変数回帰を直接適用できないということに留意されたい。加えてマイクロアレイデータで実測された高度な多重共線性により、たとえ発現レベルのサブセットが選択されたとしても、多変数回帰および正準分析の性能不良が引き起こされる。対照的に、マイクロアレイデータの場合と同様に、実測よりも多くのさらなる予測因子変数が存在する場合でさえ、PLS方法論を適用することができる (Perez - Enciso M, et al., Human Genetics 112 (5 - 6) : 581 - 92 (2003))。PLS - DAの特定の事例が、YがXのカテゴリ変数のカテゴリを記載する2値変数のセットであるPLS回帰である；すなわち数値従属性、または応答、変数がカテゴリの数と一致する。代替の識別法がNguyenb and Rocke (Nguyen DV, et al., Bioinformatics 18 : 39 - 50 (2002))に見出される。各応答変数 y_k に関して、X成分に関する回帰モデルを記す：

【数1】

$$y_k = \sum_{h=1}^m (Xw_h^*) c_h + e = XW^*c + e,$$

式中、 w_h^* はk番目の成分の各々の元来の変数に与えられた重みを含有するp次元ベクトルであり、そして c_h はh番目のX成分変数における y_k の回帰係数である。Wold et al. (Wold et al., 「PLS法により解決される化学における多変量検量法問題」 Ruhe A, Kagstrom B (eds) Proc Conf Matrix Pencils. Springer, Heidelberg, pp 286 - 293 (1983))により開発された、欠測値を考慮に入れるアルゴリズムを使用した。意味のある解を生じるためのPLSに関する基本的要件は、特徴抽出とも称されるいくつかの予備的な変数選択である。これは各変数に関するVIP (変数重要度パラメーター) に基づいて変数を選択することにより達成された。VIPはPLS文献においてよく用いられる測定であり、そして変数jに関して：

【数2】

$$VIP_j = \left\{ p \sum_{h=1}^m \sum_k R^2(y_k, t_h) w_{hj}^2 / \sum_{h=1}^m \sum_k R^2(y_k, t_h) \right\}^{1/2},$$

((Eriksson L, et al., Umetrics, Umea (1999) ; (Tenenhaus M, La regression

10

20

30

40

50

P L S . 0 Editions Technip, Paris (1 9 9 8)) 各 j 番目に関して予測因子変数 $j = 1, p$ 、ここで $R^2(a, b)$ はベクトル a および b における項目間の相関の 2 乗を表し、そして $t_h = X_{h-1} w_h$ 、ここで X_{h-1} は成分 $t_1, \dots, t_{h-1}$ における X の回帰の残差行列であり、そして w_h はノルム 1 のベクトルである (P L S 回帰アルゴリズムでは t_h はこの正規化制約を受けて構築される)) として定義される。

【数 3】

$$w_{jh}^2$$

は各変数 j の h 番目の P L S 成分に対する貢献を測定することに留意されたい。故に V I P _{j} はモデルの 2 乗総和に相対して、全成分およびカテゴリー応答 (Y で 2 を超えるカテゴリーに関して) にわたって合計された各変数の応答に及ぼす影響を定量化し ; これにより V I P が各 c D N A クローンの全体的な効果の測定を直感的に喚起することには留意されたい。V I P はまた :

【数 4】

$$\sum_{j=1}^p VIP_j^2 = p$$

の特性をも有する。

【0 1 3 3】

この作業では、1 8 ' 1 4 9 個全ての変数 (c D N A レベル) で第 1 の分析を実施し、そして各変数に関して V I P を評価した。続いて、V I P > 1 . 8 を有する変数のみを選択し、そして第 2 の最終分析に含めた。最初に利用可能な多数の変数 (c D N A クローン) のためにこの厳密な基準を設定した。新しい成分が Q^2 基準を満足した場合、P L S 成分の数を選択した ; すなわち

【数 5】

$$Q_h^2 = 1 - PRESS_h / RESS_{h-1} \geq 0.05,$$

ここで、P R E S S _{h} は h 成分を含有するモデルの予測 2 乗和であり、そして R E S S _{$h-1$} は $h-1$ 成分を含有するモデルの残差 2 乗和である。P R E S S はクロスバリデーションによりコンピューター計算され ;

【数 6】

$$PRESS_h = \sum_{i=1}^n (y_{h-1,i} - \hat{y}_{h-1,-i})^2,$$

$y_{h-1,i}$ は $h-1$ 成分が適合する場合、実測 i の残差であり、そして

【数 7】

$$\hat{y}_{h-1,-i}$$

は i 番目の実測が除かれる場合に得られる予測 y_i である。新しい実測の予測は

【数 8】

$$\hat{y}_i = \sum_{h=1}^m (x_i' w_h^*) c_h,$$

(ここで x_i は新しい実測 i に関する変数レコードを含有するベクトルである) として簡単に得られる。モデルバリデーションを応答並べ替えにより実施した。並べ替え検定はその柔軟性および増大しつつあるコンピューター力により、ここ数年非常によく用いられるようになってきたコンピューター利用手順の一部である (Good PI, Permutation tests : a practical guide to resampling methods for testing hypotheses. Springer, New York, (2 0 0 0)) 。その原理は非常に簡単で、所定の試料の統計値 T の有意性を検定したいとしよう。応答ベクトル (Y) は N 回並べ替えられ、そして並べ替えセットの各々

10

20

30

40

50

に関する T_i 、 $i = 1, N$ を計算する。ヌル仮説の下で T の分布は T_i 値のセットで近似される；例えば 5 % 有意性閾値は $0.05 \times N$ 全 T_i の最大値になる。ここで応答ベクトル (Y) を 200 回並べ替え、そして分析をやり直して、 Q^2 および R^2 をプロットし、ここで

【数 9】

$$Q^2 = 1 - \prod_{h=1}^m PRESS_h / RESS_{h-1}$$

そして R^2 はモデルにより説明される 2 乗総和の部分である。 Q^2 はモデルの予測能力の測定値であるが、 R^2 はモデルの適合の良好性に関する。SIMCA - P ソフトウェアバージョン 11.0 (Eriksson L, et al., Umetrics, Umea (1999)) で分析を行った。

10

【0134】

結果

特徴抽出により、前記した基準の $VIP > 1.8$ を通過した 164 個のプロープセットを生じた。これらの 164 個のプロープセットにより構築された予測モデルの結果を図 1 に表示し、ここではモデル予測を臨床で観察された疾患状態、すなわち正常および CR1 - CR3 に対してプロットする。

【0135】

図 1 はモデルにより予測されるような慢性拒絶の等級対、病理学者により評価されるような慢性拒絶の実際の等級を示す。2 カ所の異なるセンター (A および B) から得られたデータは異なる記号により暗号化されている。実線は回帰直線を示し、点線は 96 % 信頼限界に相当し、そして破線は 95 % 予測区間を示す。慢性拒絶の予測等級と実際の等級の間には良好な相関性が存在する。

20

【0136】

【表 14】

表 4：モデル実行型：PLS 実測 (N) = 103、変数 (K) = 165 (X = 164、Y = 1)

A	R^2X (cum)	固有値	R^2Y (cum)	Q^2	Q^2 (cum)	有意性
1	0.293	30.2	0.519	0.481	0.481	R1
2	0.432	14.3	0.629	0.141	0.554	R1
3	0.480	5.0	0.784	0.237	0.659	R1

30

【0137】

モデルは三つの有意な成分からなる (表 4 参照)。モデルの予測力はクロスバリデーションに基づいて $Q^2 (cum) = 0.659$ である。

図 2 は応答並べ替えによるバリデーションの結果を表示する。水平軸は無作為に並べ替えられた応答と比較した真の応答の類似の測定値 (すなわち相関係数) を示す。垂直軸はそれぞれの並べ替えられた応答で得られた計算された R^2 - および Q^2 - 値を示す。 R^2 はモデルにより説明される 2 乗総和の部分であり (モデルの適合の良好性)、そして Q^2 はモデルの予測能力の測定値である。モデルの適合の良好性は最適というわけではない；切片は $R^2 = 0.39$ であり、そして基準値 0.4 をわずかに下回る。しかしながら、 Q^2 - 切片が -0.01 であることに示されるようにモデルの予測能力は優れている。

40

分子署名を形成し、そして慢性同種移植片拒絶の予測を可能にする予測因子遺伝子の組み合わせを表 2 に示す。

【0138】

【表 15】

表2：本発明のバイオマーカー遺伝子

アライメント プロファイル識別 別番号	UNIGENE	記号	遺伝子名	未処理	正規化値			
					正常	CR 1	CR 2	CR 3
230602_at	HS.146022	ACMSD	アミノカルボキシムコナートセミルテ ビトデカルボキシターセ	571	-1.08	1.19	-1.38	-2.39
205364_at	HS.444959	ACOX2	アシルCoAオキシターセ 2、分岐鎖	276	-1.02	1.03	-1.46	-2.52
202422_s_at	HS.268785	ACSL4	アシルCoAシンターセ長鎖 ファミリーメンバー4	1125	-1.03	1.00	1.40	1.53
205745_x_at	HS.404914	ADAM17	ジスインテグリンおよびメタロ プロテイナーセトドメイン17(腫 瘍壊死因子、アルファ、変 換酵素)	227	-1.01	-1.02	1.18	1.67
213532_at	HS.404914	ADAM17	ジスインテグリンおよびメタロ プロテイナーセトドメイン17(腫 瘍壊死因子、アルファ、変 換酵素)	259	-1.02	-1.08	1.11	1.49
222930_s_at	HS.461532	AGMAT	アグマチンウレオビトローセ(ア グマチナーセ)	198	-1.04	1.03	-1.57	-4.02
229229_at	HS.34494	AGXT2	アラニンクワリキシラートアミトラ ンスフェラーセ2	858	-1.08	1.34	-1.09	-2.15
227530_at	HS.371240	AKAP12	Aキナーセ(PRKA)アンカーン ドク質(ケラビン)12	778	1.00	1.07	1.06	1.99
218487_at	HS.1227	ALAD	アミノアラニン酸、テラター、テ ビトラターセ	499	-1.03	1.02	-1.58	-2.42
211298_s_at		ALB	アルブミン	444	1.07	1.91	-4.01	-9.43
208950_s_at	HS.483239	ALDH7A 1	アルデヒドデヒドゲナターセ 7ファミリー、メンバーA1	838	-1.02	-1.01	-1.37	-1.72
208951_at	HS.483239	ALDH7A 1	アルデヒドデヒドゲナターセ 7ファミリー、メンバーA1	438	-1.01	-1.01	-1.62	-2.19
220148_at	HS.486520	ALDH8A 1	アルデヒドデヒドゲナターセ 8ファミリー、メンバーA1	1505	-1.20	1.32	-1.14	-1.85
201612_at	HS.2533	ALDH9A 1	アルデヒドデヒドゲナターセ 9ファミリー、メンバーA1	3300	1.01	-1.07	-1.22	-1.55
205682_x_at	HS.534468	APOM	アポリポタンパク質M	633	-1.05	-1.08	-1.84	-3.82
205673_s_at	HS.19404	ASB9	アソキリン反復およびSOC Sボックス含有 9	131	-1.03	1.06	-1.78	-3.82
219902_at	HS.114172	BHMT2	ベタインホメシタインメチルトラン スフェラーセ2	1053	-1.10	1.04	-1.40	-2.81
204741_at	HS.505202	BICD1	ビカウタード(Bicaudal)D相 同体1(ショウジョウバエ)	146	1.02	1.10	1.67	1.86

10

20

30

40

【表 16】

223824_at	HS.149849	C10ORF59	染色体10オプノリテイクフ レム59	345	-1.02	-1.13	-1.30	-1.70
225687_at	HS.472716	C20ORF129	染色体20オプノリテイクフ レム129	107	1.04	-1.05	-1.65	-2.32
228560_at	HS.476358	CACNA1D	カルシウムチャネル、電位依存性 L型、アルファ1D	418	-1.13	1.31	-1.11	-1.49
216903_s_at	HS.524367	CBARA1	カルシウム結合アトヒン関連自 己抗原1	365	-1.03	-1.05	-1.39	-1.96
224027_at	HS.334633	CCL28	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガント 28	27	-1.09	-1.09	1.53	2.35
1559590_at	HS.126688	CHDH	コリンデヒドロクサセ	35	-1.36	1.20	1.09	-1.64
218252_at	HS.444028	CKAP2	細胞骨格随伴タンパク質2	190	-1.00	-1.27	-1.25	-1.46
212091_s_at	HS.474053	COL6A1	コラーゲン、VI型、アルファ1	58	-1.17	-1.17	-2.25	-1.71
208146_s_at	HS.233389	CPVL	カルキシホチタセ、卵黄 形成様	951	1.01	-1.04	1.20	1.58
203915_at	HS.77367	CXCL9	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガ ント9	831	1.14	-1.05	-1.11	-2.43
206878_at	HS.113227	DAO	Dアミノ酸オキシターゼ	202	-1.04	1.11	-1.93	-4.55
230175_s_at	HS.203691	DCBLD2	ジスコイシン、CUBおよびLC CLドメイン含有2	364	1.01	-1.06	1.11	1.34
217973_at	HS.9857	DCXR	ジカルボニル/L-キルロースリタ クターゼ	907	-1.11	-1.30	-1.47	-3.56
204977_at	HS.525115	DDX10	DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp) ホックスホリホチト10	343	1.03	1.02	-1.47	-1.97
232381_s_at	HS.520106 HS.212360	DNAH5	タニン、軸糸、重ホリホチ ト5	147	1.05	1.28	2.65	1.97
226281_at	HS.234074	DNER	デルターノッチ様EGF反復-含 有膜貫通型	484	-1.13	-1.07	1.58	1.49
203716_s_at	HS.368912	DPP4	ジホチシルホチタセ4(CD26、アミノアミナーゼ 複合タンパク質2)	121	-1.05	1.20	-1.56	-2.31
219298_at	HS.22242	ECHDC3	エノイルコエンザイムAヒドラー セト メイン含有3	473	-1.04	-1.05	-1.39	-2.33
224189_x_at	HS.502306	EHF	ets 相同因子	24	-1.14	1.19	2.14	1.95

10

20

30

【表 17】

209368_at	HS.212088	EPHX2	エポキシトビトローセ ² 、細胞質型	334	-1.17	-1.26	-1.50	-2.64
211398_at	HS.533683	FGFR2	線維芽細胞成長因子受容体2	21	-1.04	-1.05	-1.84	-2.46
211399_at	HS.533683	FGFR2	線維芽細胞成長因子受容体3	27	-1.15	1.09	-1.51	-2.87
211400_at	HS.533683	FGFR2	線維芽細胞成長因子受容体4	16	-1.46	-1.28	-1.43	-2.01
230842_at	HS.533683	FGFR2	線維芽細胞成長因子受容体5	11	1.12	1.06	-2.66	-2.18
219118_at	HS.438695	FKBP11	FK506結合タンパク質11、19 kDa	85	1.00	-1.00	1.96	2.19
1559011_at	HS.462392	FLJ13773	仮想タンパク質FLJ13773	25	-1.21	1.12	1.79	1.86
227417_at	HS.369042	FLJ20605	仮想タンパク質FLJ20605	803	-1.04	1.05	-1.47	-2.22
228397_at	HS.158783	FLJ20618	仮想タンパク質FLJ20618	254	-1.02	1.01	1.46	2.21
221925_s_at	HS.370147	FLJ22490	仮想タンパク質FLJ22490	51	-1.01	1.01	-1.34	-1.45
238593_at	HS.292088	FLJ22531	仮想タンパク質FLJ22531	402	-1.12	1.39	1.64	1.86
207876_s_at	HS.58414	FLNC	フィラミンC、カニン(アクチン結合タンパク質280)	495	1.49	1.20	1.14	1.98
215062_at	HS.149566	FMNL2	フォルミン様2	65	-1.04	1.38	1.51	1.82
206263_at	HS.386502	FMO4	フラビン含有モノオキシゲナーゼ4	388	-1.09	-1.11	-1.59	-3.50
1568955_at		FNBP2	LOC391156	358	-1.04	-1.14	1.21	2.35

10

20

30

【表 18】

226962_at	HS.529439	FRBZ1	FRBZ1タンパク質	574	1.00	1.13	1.18	1.45
214093_s_at	HS.269099	FUBP1	遠上流エレメント(far upstream element)(FUSE)結合タンパク質1	277	-1.04	-1.02	1.19	2.00
216010_x_at	HS.169238	FUT3	フコシルトランスフェラーゼ ³ (オラクトシト ³ (4)-L-フコシルトランスフェラーゼ、Lewis血液群を含む)	32	-1.24	-1.33	-1.52	-2.66
228238_at	HS.531856	GAS5	増殖停止特異的5	260	1.01	1.07	1.25	1.83
213133_s_at	HS.435741 HS.546256	GCSH	ケラリン切断系タンパク質H(7ミノシルキリア)	443	-1.01	-1.14	-1.42	-1.85

40

【表 19】

230025_at	HS.444663	GJC1	キヤップ結合タンパク質,chi 1,31.9kDa(コネクション31.9)	102	1.01	-1.13	-1.24	-1.52
202382_s_at	HS.278500	GNPDA1	グルタミン-6-リン酸デアミナーゼ 1	690	-1.03	-1.06	-1.30	-2.10
224997_x_at	HS.533566	H19	H19,刷り込み母性発現 された未翻訳mRNA	336	1.28	1.10	-1.04	1.48
205012_s_at	HS.157394 HS.513265	HAGH	ヒドロキシアシルグルタチオンヒドロ ラーゼ	455	-1.06	-1.13	-1.56	-2.26
226137_at	HS.77558 HS.546885	HMGH3	高移動度群スクレオソーム結合 トメイン3	559	1.01	-1.03	1.20	1.88
204934_s_at	HS.182385	HPN	ヘプシン膜貫通型プロテアーゼ (セリン1)	436	-1.20	-1.04	-1.25	-2.06
210253_at	HS.90753	HTATIP2	HIV-1 Tat相互作用タンパ ク質2,30kDa	231	-1.04	1.00	1.28	1.39
235549_at	HS.148741	IBRDC2	IBRトメイン含有2	28	-1.36	1.03	1.31	2.04
202410_x_at	HS.373908 HS.523414	IGF2	インスリン様成長因子 2(ソマト シニンA)	10	1.04	1.09	-1.37	-1.32
210881_s_at	HS.373908 HS.523414	IGF2	インスリン様成長因子 2(ソマト シニンA)	7	1.18	1.06	-1.20	1.03
1553594_a_at	HS.37062 HS.515247	INSL3,JA K3	インスリン様因子3(タンパク質チロシ ナーゼ,白血球)	108	-1.07	-1.26	-1.30	-1.68
210840_s_at	HS.430551	IQGAP1	IQモチフ含有GTPase活性 化タンパク質1	566	1.05	-1.10	1.39	1.71
203752_s_at	HS.2780	JUND	jun D癌原遺伝子	1456	-1.00	1.02	1.09	1.36
211806_s_at	HS.411299	KCNJ15	内向き整流性カリウムチャネル ,サブファミリーJ、メンバー15	303	-1.03	-1.12	-1.44	-1.82
238428_at	HS.411299	KCNJ15	内向き整流性カリウムチャネル ,サブファミリーJ、メンバー15	211	-1.04	1.04	-1.45	-1.64
220116_at	HS.98280	KCNN2	カリウム中間/小型コンタックス カルシウム活性化チャネル、サブフ ァミリーN、メンバー2	60	-1.10	-1.05	-2.39	-3.45
215268_at	HS.472475	KIAA075 4	KIAA0754タンパク質	88	-1.03	1.18	1.97	1.94
213913_s_at	HS.192492	KIAA098 4	KIAA0984タンパク質	125	-1.02	1.05	1.26	1.69
244370_at	HS.124128	KIAA202 2	KIAA2022タンパク質	188	-1.10	-1.03	1.37	1.52
202962_at	HS.444767	KIF13B	キネシンファミリーメンバー13B	598	-1.08	1.03	-1.06	-1.56
216568_x_at	HS.533782	KRT8	ケラチン8	24	-1.12	-1.06	1.66	2.51
242424_at	HS.370457	LETMD1	LETMD1トメイン含有1	51	-1.18	1.46	2.70	2.40
227285_at	HS.54680	LOC1485 23	仮想タンパク質BC017397	194	-1.07	-1.34	-1.68	-2.34

10

20

30

40

【表 2 0】

228857_at	HS.537654	LOC285831	仮想タンパク質LOC285831	152	1.01	1.06	-1.25	-1.32
230554_at	HS.298252	LOC348158	仮想タンパク質LOC123876	4581	-1.25	1.38	-1.07	-1.58
231001_at	HS.32478	LOC387758	RIKEN cDNA1110018M03に類似	214	1.01	1.15	1.57	2.06
227372_s_at	HS.489237	LOC55971	インスリン受容体ロシキナーゼ基質	211	-1.05	-1.04	1.33	1.42
230931_at	HS.439074 HS.449164	LPAL2	リポタンパク質、Lp(a)様2	271	-1.02	1.34	-1.52	-6.27
230863_at	HS.470538	LRP2	低密度リポタンパク質随伴タンパク質2	1433	-1.21	1.34	-1.15	-1.46
243170_at	HS.543294	LRRC2	ロシリンリッチ反復含有2	101	-1.04	1.02	-1.30	-1.38
236322_at	HS.197043	MAN1C1	マンノシダーゼ、アルファ、クラスI C、マンナー1	112	-1.04	1.20	1.68	2.07
203929_s_at	HS.546914 HS.101174	MAPT	微小管随伴タンパク質タウ	235	1.01	1.08	-1.15	-1.87
213333_at	HS.520967	MDH2	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ2、NAD(ミトコンドリア型)	347	1.01	-1.14	-1.22	-1.56
1553715_s_at	HS.417710	MGC15416	仮想タンパク質MGC15416	543	-1.05	-1.15	-1.19	-1.97
229596_at	HS.424907	MGC35366	仮想タンパク質MGC35366	170	-1.08	1.27	-1.70	-2.98

10

20

【表 2 1】

212462_at	HS.35758	MYST4	MYSTヒストンアセチルトランスフェラーゼ(単球性白血病)4	323	-1.00	1.06	1.12	1.42
217593_at	HS.235390	ヌル	仮想タンパク質FLJ12895	143	-1.08	1.16	1.58	1.87
219049_at	HS.387794	ヌル	コントロリンヘーテリ、4N-アセチルガラクトサミコルトランスフェラーゼ	348	-1.03	-1.29	1.53	2.47
238469_at	HS.16512	OGFRL1	オビオイト成長因子受容体様1	48	-1.01	-1.13	1.18	1.70
1558017_s_at	HS.406074	PAWR	PRKC、アホトシス、WT1、レキニレター	193	-1.05	1.45	1.58	1.98
213263_s_at	HS.546271	PCBP2	ホウリ(C)結合タンパク質2	383	-1.05	1.02	-1.36	-1.82
232099_at	HS.147674	PCDHB16	プロトカヘリンヘーテリ6	159	-1.01	1.07	1.54	2.31
205380_at	HS.143293 HS.444751	PDZK1	PDZドメイン含有1	2598	-1.18	1.17	-1.23	-1.79
218025_s_at	HS.15250	PECI	ヘンチンソAD3、D2-エノールCoAイソメラーゼ	1404	-1.09	-1.18	-1.47	-2.30
202108_at	HS.36473	PEPD	ヘンチンソD	1240	-1.06	-1.11	-1.50	-2.80

30

40

50

【表 2 2】

202464_s_at	HS.195471	PFKFB3	6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ3	2256	-1.01	1.07	1.50	2.34
220944_at	HS.58356	PGLYRP4	ヘパチン糖リカン認識タンパク質4	60	-1.01	-1.01	-1.54	-1.75
232530_at	HS.478230	PLD1	ホスホリパーゼD1、ホスファチジルコリン特異的	21	-1.16	1.20	2.66	4.96
232212_at	HS.334649 HS.233495	PLEKHA8	プレクストリン相同ドメイン含有、ファミリーA(ホスホイノシチル結合特異的)メンバー8	45	-1.13	-1.33	-1.57	-2.35
241916_at	HS.130759	PLSCR1	リン脂質スクランブラーゼ1	130	-1.00	1.14	1.56	1.96
222653_at	HS.514278	PNPO	ピリドキシン5'-リン酸オキシダーゼ	370	-1.05	-1.12	-1.42	-2.01
236044_at	HS.40479	PPAPDC1	ホスファチジン酸ホスファターゼ2型ドメイン含有1	187	1.03	1.04	-1.43	-1.76
219195_at	HS.527078	PPARGC1A	ペロxisom増殖活性化受容体、ガンマ、コアクチバクター1、アルファ	1110	-1.03	1.02	1.10	1.22
206346_at	HS.368587	PRLR	プロラクチン受容体	88	1.01	1.04	-1.52	-3.78
204304_s_at	HS.479220	PROM1	プロモニン1	1015	-1.16	1.18	1.85	3.08
209123_at	HS.75438	QDPR	キノイドシヒドロクサリシンリクターゼ	855	-1.05	-1.10	-1.49	-2.84
225188_at	HS.471162	RAPH1	Ras随伴(RalGDS/AF-6)およびプレクストリン相同ドメイン1	1025	1.01	-1.04	1.27	1.57
235144_at	HS.129136	RASEF	RASおよびEFハンドドメイン含有	209	-1.01	1.03	1.20	1.55
203344_s_at	HS.546282	RBBP8	網膜芽細胞腫結合タンパク質8	1153	-1.03	-1.15	1.22	1.78
240245_at	HS.221436	RBMS3	RNA結合モチーフ、一本鎖相互作用タンパク質	142	1.01	1.02	1.60	1.74
217775_s_at	HS.226007	RDH11	レチノールデヒドロゲナーゼ11(オルトランスおよび9-シス)	573	-1.06	-1.21	-1.14	-1.68
216621_at	HS.306307	ROCK1	Rho随伴、コイルドコイル含有タンパク質キナーゼ1	68	1.02	1.32	1.50	1.66
206169_x_at	HS.474970	RoXaN	ロウイルXXタンパク質NSP随伴3	429	1.03	1.08	1.37	1.65
225150_s_at	HS.192854	RTKN	ロテキン(rhotekin)	172	-1.10	-1.03	-1.37	-2.27
229273_at	HS.135787	SALL1	sal様1(ショウジヨウハエ)	395	-1.10	-1.04	-1.03	1.03
205075_at	HS.159509	SERPINF2	セリン(またはスレイン)プロテイナーゼ阻害剤、クレイトンF(アルファ-2抗プロスタシン、色素上皮由来因子)、メンバー2	139	-1.12	1.16	-1.02	-1.67

10

20

30

40

【表 2 3】

214016_s_at	HS.355934	SFPQ	スプライシンク因子ファミリー16(モノカルボキシ酸トランスポーター)、メンバー5	1584	1.02	1.17	1.60	2.07
213590_at	HS.369554	SLC16A5	溶質キャリアファミリー34(リン酸ナトリウム)、メンバー1	258	-1.07	-1.07	1.42	1.67
208177_at	HS.936	SLC34A1	溶質キャリアファミリー6(神経伝達物質トランスポーター)、メンバー19	176	-1.05	1.75	-1.41	-4.40
238177_at	HS.481478	SLC6A19	溶質キャリアファミリー7(カチオン性アミノ酸トランスポーター、y+系)、メンバー9	143	-1.26	1.45	-1.54	-3.65
220135_s_at	HS.408567	SLC7A9	溶質キャリア有機アミノ酸トランスポーターファミリー、メンバー4C1	1017	-1.15	1.36	-1.29	-2.76
222071_s_at	HS.127648	SLCO4C1	分泌型白血球プロテアーゼ阻害剤(抗ロイコプロテアーゼ)	1060	-1.22	-1.01	-1.24	-1.38
203021_at	HS.517070	SLP1	SETおよびMYNDドメイン含有2	433	1.03	-1.02	1.67	2.37
233713_at	HS.66170	SMYD2	セリンプロテアーゼ阻害剤、キニン型2	99	1.04	1.22	1.27	2.02
210715_s_at	HS.31439	SPINT2	コハク酸CoAリガーゼ、GDP形成、ヘテロサブユニット	1265	-1.07	1.03	-1.01	1.10
212459_x_at	HS.186512	SUCLG2	スリドメイン含有2	1428	-1.02	-1.04	-1.24	-1.47
227480_at	HS.131819	SUSD2	トランスフォーミング成長因子、ヘテロ1(カムラチ・エンケルマン病)	264	1.01	1.07	-1.74	-3.78
203084_at	HS.1103	TGFB1	トランスフォーミング成長因子、ヘテロ1(カムラチ・エンケルマン病)	40	-1.10	-1.37	-1.52	-1.61
203085_s_at	HS.1103	TGFB1	チオエステラーゼスーパーファミリーメンバー2	7	1.23	1.06	-1.00	1.02
204565_at	HS.9676	THEM2	タリン2	239	-1.07	-1.14	-1.75	-2.41
212701_at	HS.511686	TLN2	膜貫通型タンパク質19	203	-1.04	1.17	-1.45	-2.27
226860_at	HS.7337	TMEM19	トリオースリン酸イソメラーゼ1	383	-1.04	-1.10	-1.37	-1.73
200822_x_at	HS.524219	TPI1	トロフィニン	2029	-1.00	-1.19	-1.26	-1.44
211700_s_at	HS.434971	TRO	チロチンキントドメイン含有4(小胞体)	132	-1.12	1.09	1.80	2.20
208958_at	HS.154023	TXNDC4	ウリジンホスホリラーゼ2	65	1.02	1.12	1.23	1.66
233155_at	HS.128427	UPP2	WD反復ドメイン9	52	-1.03	-1.03	-1.81	-3.12
244622_at	HS.314338	WDR9		38	-1.02	1.30	1.50	2.35

10

20

30

40

【表 2 4】

1555192_at	HS.489722	ZNF277	ジンクフィンガータンパク質(C2H2型)277	20	-1.06	-1.08	1.48	1.72
235493_at	HS.434401	ZNF638	ジンクフィンガータンパク質638	156	1.01	1.17	1.52	1.38
205594_at	HS.463375	ZNF652	ジンクフィンガータンパク質652	151	1.02	-1.01	1.14	1.74
1569477_at				148	1.04	1.34	1.47	1.68
1569578_at				49	-1.02	1.21	1.77	2.10
227955_s_at				547	-1.02	1.06	1.44	1.96
230168_at				103	-1.05	1.12	1.16	1.71
230332_at				260	1.06	1.20	1.35	1.58
233607_at				503	1.04	1.38	1.85	1.79
236685_at				218	1.05	1.19	1.33	1.67
237317_at				99	1.06	1.35	1.95	1.76
238299_at				90	-1.05	1.12	1.25	1.66
239066_at				333	-1.03	1.23	1.45	2.09
239264_at				159	1.06	1.28	1.57	1.66
239907_at				264	-1.00	1.27	1.74	1.74
240800_x_at				64	-1.06	1.15	1.32	1.33
242967_at				107	-1.17	1.21	-1.71	-2.48
243591_at				116	-1.05	1.15	1.99	2.86
243598_at				50	-1.09	1.15	1.71	1.72
244803_at				129	-1.04	1.20	1.57	1.79

10

20

【0139】

CAN関連遺伝子の選択

164個の遺伝子プローブおよび関連遺伝子の大多数は同種移植片拒絶において観察される進行中の免疫および炎症性応答の間に生じる主要な生物学的事実を反映する。遺伝子の実例には、限定するものではないがプラスミノーゲン、ジアミノオキシダーゼ、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド9、セリンプロテアーゼ阻害剤、およびkuntz2型からなる群から選択される遺伝子の組み合わせが挙げられる。遺伝子の別のセットには、限定するものではないがH19、SAL様1、JunD癌原遺伝子、線維芽細胞成長因子受容体2、プロラクチン受容体、アポリポタンパク質M(APOM)およびペルオキシソーム増殖活性化受容体、ガンマ、コアクチベーター1、アルファ(PPARGC1A)からなる群から選択される遺伝子の組み合わせが含まれる。遺伝子の別のセットには、限定するものではないがキナーゼアンカータンパク質12(AKAP12)、コラーゲンVI型(Col6A1)、6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ビスホスファターゼ3(PFKFB3)、TGF-ベータ1、インスリン様成長因子2、網膜芽細胞腫結合タンパク質8、ホメオボックスD13、アグマチンウレオヒドロラーゼ、アルブミン、ペプチダーゼD、微小管関連タンパク質タウ、チオレドキシンドメイン含有4(TXND4)、デルタ-ノッチ様EGF反復含有膜貫通(DNER)、コネクシオン(connexin)31.9、ジカルボニル/L-キシルロースリダクターゼ、コンドロイチンベータ、4N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ(ChGn)、MALT細胞分化タンパク質2(MAL2)、アシル-CoAシンテターゼ長鎖ファミリーメンバー4(ASCL4)、ADAM17、スプライシング因子プロリン/グルタミンリッチ(ポリピリミジントラクト結合タンパク質関連(SFPQ)、フィラミンC、ガンマ(アクチン結合タンパク質280(FLNC)、プロミン1(PROM1)、PLSCR

30

40

50

1、トリオースリン酸イソメラーゼ1 (TPI1)、SCCO4C1、HTATIP2、PRKC、アポトーシス、WT1、レギュレーター (PAWR) からなる群から選択される遺伝子の組み合わせが含まれる。遺伝子の別のセットには、限定するものではないがアタキシン7、アルファ - アミノ - ベータ - カルボキシムコナート - イブシロン - セミアルデヒドデカルボキシラーゼ (ACMSD)、ACOX2、ADAM17、AGXT2、ALLAD、ALAS2、ALDH7A1、ASBF1、BHMT2、CCL28、CHDH、CKAP2、CPVL、DCXR、DPP4、ECHDC3、EHF、EPHX2、FKBP11、FM04、FKBP1、FUT3、GAS5、HAGH、HCCR1、HPNヘプシン、INSL3、IQGAP1、KCNJ15、KIF13B、LRP2、PDZK1、PLD1、PNPN、RTKN、SLC7A9、SLPJ、THEM2 からなる

10

【0140】

PLG：プラスミノーゲン - プラスミン経路

プラスミノーゲン - プラスミン系は動脈新生内膜形成およびアテローム硬化性動脈瘤形成の間の細胞遊走およびマトリックス分解に意味づけられる。プラスミンタンパク質分解はエラスチン分解、マクロファージ浸潤、中膜リモデリング、平滑筋細胞遊走および新生内膜の形成を媒介することにより同種移植片動脈硬化症において主要な役割を果たす。プラスミノーゲン - プラスミン系は腎線維症の局面で有利なまたは有害な潜在的影響を有する。プラスミノーゲン - プラスミン系における重要な酵素前駆体であるプラスミノーゲンは実験的間質性線維症からマウスを保護せず、そして有意な病原的影響を有し得る。腎線維症の生物学における最近の研究は、腎線維症に及ぼすプラスミノーゲンアクチベーター阻害剤 - 1 (PAI-1)、組織型プラスミノーゲンアクチベーター (tPA) およびウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター受容体 (uPAR) のようなタンパク質の影響はプラスミンの作成から別個に生じるということを示している。

20

【0141】

DAO：ジアミンオキシダーゼ - ODC 経路

ジアミンオキシダーゼ (DAO) はペルオキシソーム酵素 D - アミノ酸オキシダーゼをコードする。酵素はその補欠分子族としてフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を使用するフラボタンパク質である。かつてはヒスタミナーゼと称された DAO は種々の組織で見出されるが、特に腸粘膜において活性である。その機能は細胞増殖に必須の物質であるいくつかのポリアミンの酸化脱アミノ化である。故に DAO は骨髄および腸粘膜のような急速に増殖する組織における調節酵素である。基礎およびヘパリン処理 DAO レベルの測定は小腸移植後の潜在的関連性を有する。小腸グラフトの拒絶は粘膜損傷に至り、それは考え得るところでは DAO 活性の変化に至り得る。

30

【0142】

CXCL9：ケモカイン (C - X - C モチーフ) リガンド 9、MIG に関与する経路

ケモカインは移植器官への白血球補充において、ならびに組織内の白血球局在化および特定のケモカインまたはケモカイン受容体の拮抗作用において重要な役割を果たすことが示されており、同種移植片拒絶の間に上方調節されるとして同定されており、白血球のグラフトへの浸潤を遅延させ、そしてグラフト生存を延長させることが示されている。CXCL5 および CCL2 の発現は T 細胞浸潤とは独立することが見出されたが、CCL3、CCL4、CCL5、CXCL9、CXCL10、XCL1 および CCL1 のグラフト内発現は明らかに T 細胞依存性であり、そして移植後経時的に有意に増加した。

40

【0143】

IFN - ガンマ (MIG) (CXCL9) および IFN - ガンマ誘導タンパク質 10 (IP-10) (CXCL10) により誘起されるケモカインモノカインは腎移植における急性拒絶の早期マーカーである。MIG は併発感染または腎機能の機能不全に関するその他の原因には関係しなかった。結論としては、尿 MIG は急性拒絶に対する非常に鋭敏で、そして特異的な予測因子として提供され、抗拒絶治療に対する応答を映し出し、そして

50

故に改善された長期間の腎同種移植片生存に寄与し得る。

【0144】

M I Gは閉塞性細気管支炎症候群(B O S)に意味づけられており、最終的には気道線維症/閉塞に移行する持続性の細気管支周囲炎症を特徴とする。急性の拒絶はB O Sの発達の主な危険因子であり、そして血管周囲/気管支白血球浸潤を特徴とする。これらの白血球が補充される具体的なメカニズムは明らかにされていない。C X Cケモカイン(I F N - ガンマ誘起モノカイン(M I G) / C X Cケモカインリガンド(C X C L) 9、I P - 10 / C X C L 10およびI F N誘導T細胞アルファ化学遊走物質(I T A C) / C X C L 11)はその共有する受容体C X C R 3を通して作用する。それらは強力な白血球化学遊走物質であり、そしてその他の炎症/線維増殖性疾患に関与するので、同種免疫応答の間のこれらのケモカインの発現は単核細胞の持続性の補充を促進して慢性肺拒絶を導き得る。ヒト気管支肺胞洗浄液中のM I G / C X C L 9、I F N誘導タンパク質10(I P - 10) / C X C L 10およびI T A C / C X C L 11のレベル上昇は急性から慢性拒絶への連続に関連した。

10

【0145】

S P I N T 2 : セリンプロテアーゼ阻害剤、クニッツ型、2 (H A I 2)、ビクニン

ビクニンは、シュウ酸カルシウム結晶化の阻止、増殖の調節および発癌の調整を含む種々の過程において役割を果たすことが示されているプロテアーゼ阻害剤である。ビクニンは尿路結石、増殖および発癌において役割を有すると考えられる。ビクニンの二つの形態、H A I - 1およびH A I - 2は正常な腎臓およびR C C細胞に現れる。H A I - 1およびH A I - 2は腎尿細管上皮細胞において発現された。二つのH A Iの発現はR C Cにおいて有意に下方調節されたが、H G F A発現は疾患腎臓において増強され、これはH A IとH G F Aを含むその標的プロテイナーゼとの間の不均衡を示唆しており、R C Cではプロテイナーゼ活性が優位である。

20

【0146】

H 19、刷り込み母性発現された未翻訳m R N A

H 19は癌、例えば乳癌、上咽頭癌、慢性骨髄増殖性障害、肝芽腫、膀胱癌、腎臓癌および副腎皮質腫瘍の病変形成および成長調節機能障害において重要な役割を果たす。

【0147】

S A L L 1 : S A L 様 1

S A L L 1は異質染色質への局在により基準のW n tシグナリングを増強する。S a l l 1は腎臓発達において必須の役割を有する。S A L L 1はショウジョウバエ領域特異的ホメオティック遺伝子s p a l t (s a l)の哺乳動物相同体であり、そしてヒトのS A L L 1におけるヘテロ接合性変異はタウンズ - ブロックス (Townes - Brocks) 症候群に至る。腎臓発達において必須のジンクフィンガー核因子であるS a l l 1を強く発現する細胞 (S a l l 1 - G F P (高) 細胞) はコロニーを形成し、そしてその上それらは器官培養設定で三次元腎臓構造を再構成する。

30

【0148】

J u n D : J u n D 癌原遺伝子

J u n Dはパラ分泌マイトジェンを調節することにより慢性腎臓疾患に対して保護する。A P - 1転写因子はJ u nおよびF o sタンパク質から構成され、細胞増殖の微調整において重大な役割を果たす。A P - 1複合体はネフロン減少後の腎病変の発達と平行する増殖性応答の間に活性化されることが示されているが、悪化の過程における個々のJ u n / F o s構成成分の具体的な役割についてはほとんど知られていない。

40

【0149】

F G F R 2 : 線維芽細胞成長因子受容体 2

線維芽細胞成長因子 (F G F) は後腎の発達に意味づけられている成長および分化因子のファミリーである。F G Fはチロシンキナーゼ受容体F G F Rを介してその作用を発揮し、それは四つのF G F R遺伝子 (F G F R 1 から F G F R 4) によりコードされる。ラット後腎E 1 4 からE 2 1においてF G F 1 からF G F 5、F G F 7 からF G F 10、お

50

よび F G F R 1 から F G F R 4 (I I I b および I I I c スプライシングバリエーション) に関する m R N A の発現が検出された。インサイチュハイブリダイゼーションにより、腎性ゾーン、尿管上皮および発達中のネフロンエレメントにおいて F G F 1 m R N A が検出された。成熟化で改変された区別されるパターンで F G F R タンパク質が局在した。F G F R 1 は発達中の後腎上皮および間葉において広く分布したが、発達中の間質では分布しなかった。F G F R 2 はまたネフロン上皮において、特に近位尿細管において広く分布したが、後腎間葉、間葉凝集物または発達中の間質では検出されなかった。F G F R 3 は間葉凝集物、ネフロンエレメントおよび髄質間質に局在したが、近位尿細管では局在しなかった。F G F R 4 はほとんどの成熟ネフロン構造に局在し、そして腎性間葉、間葉凝集物または発達中の間質では局在しなかった。

10

【 0 1 5 0 】

P R L R : プロラクチン受容体

シクロフィリン A と P R L R の間の相互作用は、P R L R から通じる種々のシグナリング経路で様々な調節的な役割を果たす。急性期応答のプロラクチン受容体の組織特異的遺伝子発現はリポ多糖類により誘起される。急性炎症は、宿主において恒常性を回復するために重大である急性期応答 (A P R) として公知の防御反応を惹起することができる。ストレス条件下で恒常性を維持する免疫調整因子としてのプロラクチン (P R L) に関する役割が提示されている ; しかしながら A P R の間のその機能は依然明らかになっていない。A P R に特徴的な炎症誘発性サイトカイン (T N F - アルファ、I L - 1 ベータおよび I F N ガンマ) はインビトロで肺線維芽細胞による P R L 受容体 (P R L R) の発現を誘起したことが示されている。リポ多糖類 (L P S) 誘起 A P R の間の P R L R のインビボ発現もまたマウスの種々の組織において調査されている。P R L R m R N A およびタンパク質レベルは腹腔内 L P S 注射の後、肝組織において下方調節された。m R N A 発現に及ぼす抑制効果はまた前立腺、精囊、腎臓、心臓および肺組織においても観察された。これらの知見により、A P R の局面での P R L R 発現の複合的な組織特異的調節が示唆される。

20

【 0 1 5 1 】

A P O M : アポリポタンパク質 M

アポリポタンパク質 M (a p o M) は主にヒト血漿中の高密度リポタンパク質 (H D L) に随伴される 2 6 k D a タンパク質であり、トリグリセリドリッチリポタンパク質 (T G R L P) および低密度リポタンパク質 (L D L) では少ない割合で存在する。それはリポカルタンパク質スーパーファミリーに属する。ヒト組織発現アレイ研究により、a p o M は肝臓および腎臓においてのみ発現され、そして少量は胎児肝臓および腎臓において見出されることが示される。インサイチュ a p o M m R N A ハイブリダイゼーションにより、a p o M は肝細胞および腎臓の尿細管上皮細胞において独占的に発現されることが実証される。a p o M の発現はインビボおよび / またはインビトロで血小板活性化因子 (P A F) 、トランスフォーミング成長因子 (T G F) 、インスリン様成長因子 (I G F) およびレプチンにより調節され得る。

30

【 0 1 5 2 】

ペルオキシソーム増殖活性化受容体、ガンマ、コアクチベーター 1、アルファ (P P A R G C 1 A)

40

この遺伝子によりコードされるタンパク質はエネルギー代謝に関与する遺伝子を調節する転写コアクチベーターである。このタンパク質は、このタンパク質と複数の転写因子との相互作用を可能にする P P A R ガンマと相互作用する。このタンパク質は c A M P 応答エレメント結合タンパク質 (C R E B) および核呼吸因子 (N R F) と相互作用し、そしてその活性を調節することができる。それは外的生理学的刺激とミトコンドリア発生の調節との間の直接的な連関を提供し、そして筋線維型決定を調節する主要な因子である。このタンパク質はまた血圧の制御、細胞性コレステロール恒常性の調節および肥満の発達に関与し得る。

【 0 1 5 3 】

50

A K A P 1 2 : A キナーゼアンカータンパク質 (グラビン) 1 2

A キナーゼアンカータンパク質 (A K A P) は構造的に多様なタンパク質の群であり、それはタンパク質キナーゼ A (P K A) の調節サブユニットに結合し、そして細胞内の別個の位置にホロ酵素を閉じ込める共通の機能を有する。この遺伝子は A K A P ファミリーのメンバーをコードする。コードされたタンパク質は内皮細胞、培養線維芽細胞および骨肉腫細胞において発現される。それはタンパク質キナーゼ A および C ならびにホスファターゼに随伴され、そしてシグナル伝達におけるスカффールドタンパク質として供される。このタンパク質および R I I P K A は細胞周囲で共局在化する。このタンパク質は細胞成長関連タンパク質である。

【 0 1 5 4 】

10

C o l 6 A 1 : コラーゲン、V I 型、アルファ 1

コラーゲンは種々の組織の完全性の維持において役割を果たすタンパク質のスーパーファミリーである。コラーゲンは細胞外マトリックスタンパク質であり、そしてその共通の構造エレメントとして三重らせんドメインを有する。コラーゲン V I はミクロフィブリルの主要な構造構成成分である。コラーゲン V I の基本的な構造単位はアルファ 1 (V I) 、アルファ 2 (V I) およびアルファ 3 (V I) 鎖のヘテロ三量体である。アルファ 2 (V I) およびアルファ 3 (V I) 鎖は各々 C O L 6 A 2 および C O L 6 A 3 遺伝子によりコードされる。この遺伝子によりコードされるタンパク質は V I 型コラーゲンのアルファ 1 サブユニット (アルファ 1 (V I) 鎖) である。コラーゲン V I サブユニットをコードする遺伝子における変異は常染色体優性障害であるベスレムミオパチー (Bethlem myopathy) を招く。

20

【 0 1 5 5 】

P F K F B 3 : 6 - ホスホフルクト - 2 - キナーゼ / フルクトース - 2 , 6 - ビホスファターゼ 3

酸素が制限されるようになる場合、細胞はエネルギー生成のために一次的に解糖様式にシフトする。解糖流量の重要なレギュレーターはフルクトース - 2 , 6 - ビスリン酸 (F - 2 , 6 - B P) であり、6 - ホスホフルクト - 1 - キナーゼ (P F K - 1) 強力なアロステリックレギュレーターである。F - 2 , 6 - B P のレベルは二機能性酵素のファミリーである 6 - ホスホフルクト - 2 - キナーゼ / フルクトース - 2 , 6 - ビスホスファターゼ (P F K F B または P F K - 2) により維持され、それはキナーゼおよびホスファターゼ活性の双方を有する。酵素ファミリーの各メンバーはそのホスファターゼ : キナーゼ活性比率 (K : B) およびその組織特異的発現を特徴とする。以前の研究により、P F K - 2 アイソザイム遺伝子の一つである P F K F B - 3 は低酸素誘導因子 - 1 (H I F - 1) 経路を介して低酸素により誘起されることが実証された。マウスの様々な器官におけるこのファミリーの三つのメンバーの基礎および低酸素発現もまた研究された。その知見により、四つ全てのアイソザイム (P F K F B - 1 - 4) はインビボで低酸素に応答することが示される。しかしながら、その発現および低酸素応答性の基礎レベルは研究された様々な器官で異なる。特に P F K F B - 1 は肝臓、心臓および骨格筋において高度に発現され、精巣においては低酸素に対する最も高い応答性が見出される。P F K F B - 2 は主に肺、脳および心臓において発現される。しかしながら、最も高い低酸素応答性は肝臓および精巣においてのみ見出される。P F K F B - 3 は高度に発現される骨格筋を除く全ての器官において可変的に低い基礎レベルで発現する。最も重要なことは、三つ全ての遺伝子のその低酸素応答性が最も十分であり、肺、肝臓、腎臓、脳、心臓および精巣において強く誘起される。さらなる研究により、P F K F B - 1 および P F K F B - 2 が遷移金属、鉄キレート剤および H I F ヒドロキシラーゼの阻害剤のような低酸素擬似物質に対して高度に応答することが示されたが、これはこれらの遺伝子の低酸素応答性が H I F タンパク質によっても調節されることを示唆している。データにより、P F K - 2 遺伝子がインビボで低酸素に応答することが実証され、それは生物の環境的または局所的低酸素 / 虚血に対する適応における生理学的役割を示している。

30

40

【 0 1 5 6 】

50

T G F - ベータ 1 : トランスフォーミング成長因子 - ベータ 1

多機能性成長サイトカインであるトランスフォーミング成長因子 - ベータ 1 (T G F - ベータ 1) は慢性同種移植片腎症の病原形成に意味づけられている。慢性腎グラフト拒絶では、T G F - ベータ 1 の尿分泌が増加し；T G F - ベータ 1 の尿分泌は動脈性高血圧、間質組織線維症の程度、およびグラフト不全の進行に関連し；H D L レベルとT G F - ベータ 1 の尿分泌との間の逆相関（慢性拒絶を有する患者および安定したグラフト機能を有するレシピエントの双方で）はこの成長因子の分泌に及ぼす異常脂質血症の影響を示唆している（10850587）。

【0157】

I G F 2 : インスリン様成長因子 2 (ソマトメジン A)

インスリン様成長因子 2 (I G F 2) 遺伝子バリエーションは栄養過剰誘起の代謝変化に関連する。I G F - 2 のゲノム刷り込みの喪失は正常な造血細胞における細胞増殖に強く関連する。線維芽細胞増殖、筋線維芽細胞への分化およびコラーゲン合成の増加はE G F またはI G F - 2 のいずれかと連携したC T G F 依存性経路を介して調節される。

10

【0158】

A L B : アルブミン

アルブミンはタンパク質キナーゼCアルファ媒介メカニズムを介してインスリン誘起インスリン受容体基質 (I R S) シグナリングを損なうことによりグルコース代謝に影響を及ぼす。アルブミンは特異的分子吸着剤として作用する。ビリルビン、胆汁酸、芳香族アミノ酸および銅のようなアルブミン結合分子の除去は臨床的に肝臓、心血管系および腎機能ならびに肝性脳症の改善を伴う。

20

【0159】

M A P T : 微小管随伴タンパク質タウ

M A P 2 C およびT A U は、もしかするとチューブリン界面を架橋することにより、個々の原線維に沿って結合することにより微小管を安定化する。アルファシヌクレインおよびタウはその線維化を促進し、そしてヒト神経変性疾患における病理学的封入体の形成を推進することができる。

【0160】

M A L 2 : M a l 、 T 細胞分化タンパク質 2

データによりM A L 2 がH E P G 2 細胞における経細胞輸送に必須であることが示される。M A L 2 タンパク質m R N A 種は甲状腺において検出され、そして甲状腺濾胞の免疫組織化学的分析により、M A L 2 が頂端膜に分布することが示された。

30

【0161】

L O C 2 8 5 1 4 8 (A D A M 1 7)

A D A M 9 、A D A M 1 0 およびA D A M 1 7 はジスインテグリンおよびメタロプロテアーゼファミリーのメンバーであり、アルファ分泌型切断を触媒し、そしてしたがってA 1 7 2 細胞においてアルファセクレターゼとして作用する。A D A M - 1 7 はコレラ菌プロサイトリシンの強力なアクチベーターである。A D A M - 1 7 / T A C E およびT I M P - 3 はまた前立腺癌の病原形成において重要な役割を果たし得る。

【0162】

40

F L N C : フィラミンC、ガンマ (アクチン結合タンパク質 2 8 0)

カルパイン3の基質であり得て、サルコグリカンとのタンパク質 - タンパク質相互作用を調節する。蓄積は、筋肉ミオパチーにおけるコア形成の強力であるが、非特異的な免疫組織化学的マーカーである。

【0163】

P A W R : P R K C 、 アポトーシス、 W T 1 、 レギュレーター

P A R - 4 は細胞表面のC D 9 5 受容体を上方調節することによりアポトーシスを増加させ、そしてイニシエーターカスパーゼ8および10の切断を促進することにより、同時にF L I C E 様阻害タンパク質 (F L I P) を減少させる。P A R - 4 はC H T 1 と相互作用することにより、および細胞表面でのその組み込みを低下させることにより、コリン

50

の取り込みの調節に直接的に関与する。

【0164】

S C A 7 : アタキシン 7

中枢神経系で富化された新規アタキシン 7 タンパク質の同定により、複数のポリグルタミン含有タンパク質の発現が S C A 7 に特徴的な神経変性パターンにおいて役割を果たし得ることが示唆される。

【0165】

A C M S D : アルファ - アミノ - ベータ - カルボキシムコナート - イブシロン - セミアルデヒドデカルボキシラーゼ

L - トリプトファン - キヌレニン経路の代謝体、L - キヌレニンおよびキノリン酸 (Q u i n) の著明な増加が腎不全を有するラットおよびヒトの双方の血清および脳脊髄液 (C S F) で観察された。腎不全後のその蓄積の原因となるメカニズムが調査された。慢性腎不全を有する患者では、血清 L - キヌレニンおよび Q u i n のレベル上昇が血液透析により低下した。腎不全ラットでは血清、脳および C S F における Q u i n および L - キヌレニンレベルもまた腎不全の重篤度に平行して上昇した。Q u i n (3 . 5 倍) および L - キヌレニン (2 . 8 倍) の尿分泌もまた増加した。キヌレニン経路の律速酵素である肝臓 L - トリプトファン 2 , 3 - ジオキシゲナーゼ活性 (T D O) は血中尿素窒素およびクレアチニレベルに比例して増加した。キヌレニン 3 - ヒドロキシラーゼおよびキノリン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼは未変化であったが、キヌレイナーゼ、3 - ヒドロキシアントラニラートジオキシゲナーゼおよびアミノカルボキシムコナート - セミアルデヒドデカルボキシラーゼ (A C M S D a s e) の活性はわずかに低下した。ピラジナミド (A C M S D a s e 阻害剤) の全身投与により対照ラットにおける血清 Q u i n 濃度が上昇し、それは腎不全に应答した身体 A C M S D a s e 活性における変化が血清 Q u i n 濃度の決定のための重要な因子であることを実証している。血清 L - キヌレニン濃度の上昇は主に肝臓における T D O 増加およびキヌレイナーゼ活性の低下のためであり、そして血清 Q u i n 濃度の上昇は腎不全後の身体における A C M S D a s e 活性の低下のためである。C S F L - キヌレニンの蓄積は血清 L - キヌレニンの増加の開始により引き起こされ、そして C S F Q u i n の蓄積は血漿からの Q u i n および / または脳への Q u i n 前駆体に対して二次的である。

【0166】

A C O X 2

同種移植片拒絶の間に、サイトカインおよび脂質メディエーターは細胞傷害および臓器不全の原因となる。ペルオキシソームはペルオキシソームベータ酸化による脂質メディエーターの分解を含む脂質代謝において重大な役割を果たす。ラット肝臓同種移植の後の肝臓ペルオキシソームの改変が調査された。M H C 不適合性 D a r k A g o u t i (R T 1 a) ドナーラットおよび L e w i s (R T 1 (1)) レシピエントラットを同種移植に使用した。免疫抑制のために、これらの動物の群はシクロスポリン (C s A) を腹腔内投与された (1 m g / k g 体重 / 日) 。 L e w i s ラットを同系移植の組み合わせに使用した。移植後 10 日にペルオキシソーム直径および体積密度の決定のために形態計測学的方法を用いて肝臓を調査した。ペルオキシソームカタラーゼ (C A T) およびアシル補酵素 A オキシダーゼ (A O X) の活性を決定し、そして対応するタンパク質を定量的免疫細胞化学および免疫プロッティングにより評価した。C A T および A O X をコードする m R N A の発現をノーザンプロッティングにより調査した。同種移植された肝臓ではペルオキシソームの体積密度および直径が有意に減少したが、C s A 処置動物では未変化であった。C A T および A O X の活性ならびにそのタンパク質レベルの双方は肝臓同種移植片で有意に低下した。さらに C A T および A O X の対応する m R N A レベルは肝臓同種移植片で有意に減少したが、一方 C s A 処置によりこれらの m R N A の増加に至った。同系移植された肝臓により、対応する酵素値のわずかな低下のみが示された。結論：ペルオキシソームは肝臓同種移植後に形態学および機能的の双方で重篤な影響を受ける。これらの結果により、ペルオキシソーム脂質酸化の機能障害は、炎症性応答の調節に関与する脂質メディ

10

20

30

40

50

エーターの異化反応の低下による拒絶過程の病原形成の原因となり得ることが示唆される。その免疫抑制効果に加えて、C s Aはこれらの重要なペルオキシソーム機能の維持により同種移植片生存に寄与し得る (Steinmetz et al., Transplantation, Jul 27; 66 (2): 186-94 (1998))。

【0167】

A D A M 1 7

慢性腎同種移植片拒絶は細胞外マトリックス区画および種々の細胞型の増殖における改変を特徴とする。これらの様相はマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) を含むメタロエンドペプチダーゼのメトジンシンスーパーファミリー、ジスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ (ADAM) ならびにメブリンによりある程度制御される。したがって 10
確立された Fisher から Lewis ラットへの腎臓移植モデルにおけるメトジンシンの調節を調査した。ラット腎臓の凍結ホモジネートおよびパラフィン切片を使用して 0 日 (健常対照) および移植後 + 60 日および + 100 日の慢性拒絶の期間に研究を実施した。Affymetrix Rat Expression Array 230A GeneChip およびリアルタイム Taqman ポリメラーゼ連鎖反応分析によりメッセンジャー RNA (mRNA) 発現を試験した。酵素電気泳動、ウェスタンブロット分析および免疫組織学によりタンパク質発現を研究した。MMP (MMP-2/-11/-12/-14)、その阻害剤 (メタロプロテイナーゼの組織阻害剤 (TIMP)-1/-2) の、ADAM-17 およびトランスフォーミング成長因子 (TGF)-ベータ 1 の mRNA レベルは慢性腎同種移植片拒絶の間に有意に増加した。したがって MMP-2 活性および免疫組織学的染色は増強された。MMP-12 の 20
場合に最も重要な mRNA 上昇が観察された。予測されたとおり、ウェスタンブロット分析によってもまた MMP-12、MMP-14 および TIMP-2 (後者の 2 例では個々のタンパク質として、および複合体として) の生成の増加が実証された。対照的に MMP-9/-24 およびメブリンアルファ/ベータの mRNA レベルは低下した。したがって MMP-9 タンパク質レベルならびにメブリンアルファ/ベータ合成および活性は有意に下方調節された。メトジンシンファミリー (MMP、ADAM およびメブリン) および TIMP のメンバーは慢性腎同種移植片拒絶において差次的に調節される。故にメトジンシンの改変されたパターンは新規診断マーカーを示し得て、そしてもしかすると将来的な治療的介入のための新規標的を提供し得る。 (Berthier et al., Kidney Int. 69 (2): 358-68 (2006 Feb)) 30

【0168】

A G X T 2

アラニン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ (AGT) 2 は、ラットでは腎臓で高レベルで発現されるピリドキサル 5'-リン酸依存性、ミトコンドリア酵素である。 (Lee IS et al., Nephron. 83 (2): 184-5 (1999))

【0169】

A L A D

腎同種移植片移植後の障害を受けた腎機能はしばしばレシピエントにおいて貧血を招く。急性拒絶の間に貧血に至る分子メカニズムは十分には理解されておらず; 不十分なエリトロポイエチン生成および鉄欠乏が主な原因であると報告されている。急性拒絶における 40
貧血に潜む分子事象の理解を深めるために、9000 個のヒト cDNA クローンを含有する DNA マイクロアレイ (7469 個の独特な遺伝子を示す) を用いて急性拒絶および貧血の併発を有する 4 人の小児腎同種移植片レシピエントからの末梢血リンパ球 (PBL) の遺伝子発現プロファイルを試験した。これらの貧血の拒絶患者では、ヘモグロビン転写および合成、鉄および葉酸結合および輸送に関与する 11 個の下方調節された遺伝子の「赤血形成クラスター」が同定された。加えていくつかの同種免疫応答遺伝子が同時に下方調節された、いくつかは急性拒絶を有し、そしていくつかは急性拒絶および貧血の併発を有する 36 個の PBL 試料の別個のデータを分析して、急性拒絶と貧血との間の可能な関連性を支持した。結論としては、DNA マイクロアレイを使用する分析により、正常腎臓と比較して腎同種移植片拒絶を有する腎臓において改変されたヘモグロビン合成および / 50

または赤血球形成に係る遺伝子のクラスターが同定された。このクラスターの発現における改変の間の可能な関係性、腎機能の低下、同種免疫過程自体および腎移植に及ぼすその他の影響についてはさらなる分析が待たれる。(Chua et al., Am J Transplant. 3 (1): 17 - 22 (2003 Jan))

【0170】

A L A S 2

鉄調節タンパク質 (IRP) 1 および 2 は転写後にトランスフェリン受容体 (TfR) フェリチンおよびその他の鉄代謝タンパク質の発現を調節する。IRP 2 の除去により鉄制限された赤血球形成を招く。IRP 2 - / - マウスの赤血球前駆体における TfR 発現は低下し、そして骨髓鉄貯蔵はないが、トランスフェリン飽和レベルは正常である。5 - アミノレブリン酸シンターゼ 2 (ALAS2) の著明な過剰発現は IRP 依存性翻訳抑制の喪失の結果であり、そして遊離プロトポルフィリン IX および亜鉛プロトポルフィリンのレベルの著明な増加は IRP 2 - / - 赤血球系細胞において作成される。IRP 2 - / - マウスは遺伝的小赤血球性貧血の新しいパラダイムを示す。IRP 2 変異または欠失は、正常トランスフェリン飽和、血清フェリチンの上昇、赤血球プロトポルフィリン IX レベルの上昇および成人発症性神経変性を有する患者における不応性小赤血球性貧血および骨髓鉄欠乏の原因であり得る (Cooperman SS et al., Blood. 106 (3): 1084 - 91 (2005 Aug 1), Epub 2005 Apr 14)。

10

【0171】

A L D H 7 A 1

ベタインは種々腎細胞の浸透圧調節において重要な役割を果たす。腎臓ではベタイン合成は皮質において最も高くなるようであるが、一方浸透圧で調節された蓄積は髓質内部で重大な役割を果たすようだ。ベタイン合成の改変はおそらくベタインアルデヒドデヒドロゲナーゼの浸透圧調節により引き起こされる。この酵素の活性は等張対照条件と比較して、低浸透圧条件下で有意に高かった。これらの結果により、長期間適応の間、ウサギ腎臓の髓質外部の TALH 細胞におけるベタイン合成が細胞外浸透圧により調節され得ることが実証される。(Furuyama K et al., Blood. 101 (11): 4623 - 4 (2003 Jun 1), Epub 2003 Jan 16)。

20

【0172】

B H M T 2

グリシンベタイン補充は、ベタイン - ホモシステインメチルトランスフェラーゼ (BHMT) により触媒されるメチル化を介してホモシステイン尿症および慢性腎不全患者におけるホモシステインレベルを低下させる。低ベタイン食を与えたラットにグリシンベタイン、プロリンベタイン、トリゴネリン、ジメチルスルホニオプロピオン酸 (DMSP) またはジメチルテチン (dimethylthetin) (1.5 ミリモル) を皮下投与した。各ベタインの全血漿ホモシステインならびに尿および血漿ベタイン濃度に及ぼす効果をモニタリングした。グリシンベタイン、DMSP およびジメチルテチンの循環ホモシステイン濃度に及ぼす効果はインビボで BHMT により媒介された。循環グリシンベタイン濃度は DMSP およびジメチルテチン処置に続いて上昇した。全てのベタインでの処置に続いてグリシンベタインの尿分泌が増加し、それは腎臓におけるグリシンベタインの再吸収が阻止されたことを示唆している。その研究により、グリシンベタイン類似体はホモシステイン代謝に複数の影響を及ぼすことが示された (Slow S. et al., Int J Biochem Cell Biol. 36 (5): 870 - 80.0 (2004 May))。

30

40

【0173】

C C L 2 8

ケモカイン CCL28 はいくつかの粘膜部位で上皮細胞により構成的に発現され、ならびに T 細胞および IgA B 細胞の亜集団の恒常性化学遊走物質として機能し、そして抗微生物活性を媒介すると考えられている。インビボでは、CCL28 は正常ヒト結腸と比較して病理学的に炎症を起こした上皮において著明に増加した。ヒト結腸および小腸異種移植片を使用してインビボヒト腸上皮をモデル化した。炎症誘発性刺激により上方調節さ

50

れたその発現と合致して、CCL28 mRNA発現はNFカッパB活性化の薬理的阻害剤により減弱された。これらの知見により、CCL28はヒト結腸上皮において「炎症性」ケモカインとして機能することが示され、そしてCCL28が結腸炎症を対抗制御するために作用し得るという概念が示唆される(Ogawa et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 287(5):G1062-9(2004 Nov). Epub 2004 Jul 8)。

【0174】

DCXR

血流中のカルボニル化合物は糖尿病または末期腎不全対象の腎臓に蓄積する傾向がある。以前にジカルボニル/L-キシルロースリダクターゼ(DCXR)をコードするcDNAがマウス腎臓cDNAライブラリーから単離された。腎臓におけるDCXRの機能的役割がTgマウスで試験された。腎臓におけるDCXRタンパク質発現レベルが6倍増加したが、ホモ接合性Tgマウスでは顕著な組織学的異常は何ら示されなかった。全身にわたってDCXR発現の上昇が観察されたが、その腎分布は内因性DCXRタンパク質のものに類似した、すなわち主要な発現部位は集合尿細管であり、その他の尿細管およびボーマン嚢では中度の発現を伴ったが、間質部分および糸球体では存在しなかった。糖尿病性腎症の進行におけるDCXRの役割を試験するために、TgマウスをKK-A(y)糖尿病モデルマウスと交配させた。得られた子孫Tg/A(y)はその+/A(y)同腹仔と比較して、軽体重、低レベルの血中グルコース、水摂取およびクレアチニンクリアランスを示した。顕微鏡レベルで、およびカルボキシメチルリジンの腎蓄積において著明な病理学的差異は観察されなかったが、データはDCXRがグルコースまたはカルボニル化合物の代謝において機能し、そして高血糖圧下である腎臓において保護的な役割を果たし得ることを意味する。したがってDCXR TgマウスおよびTg×KK-A(y)ハイブリッドマウスは糖尿病のバックグラウンドを有する腎臓におけるカルボニル代謝に関する具体的なモデルとして供される。(Sudo et al., Transgenic Exp Anim. 54(5):385-94(2005 Oct))

10

20

【0175】

EhF

etsファミリーは保存されたDNA結合「ETS」ドメインを共有し、そして過剰発現された場合に腫瘍形成を誘起するいくつかの腫瘍性タンパク質を含む転写因子の大きな多重遺伝子族である。マウス下垂体成長ホルモン分泌細胞腫瘍からcDNAがクローン化され、シーケンシングされ、そして特徴付けられて、新規etsファミリー遺伝子、「Ehf」(「ets相同因子」)が示された。推定300個のアミノ酸Ehfタンパク質が高度に多岐にわたるetsファミリーメンバーであるが、最近同定された腫瘍性タンパク質ESXに対して最も関連性が高い(全体の36%および84%のETSドメインアミノ酸同一性)。故にEhfおよびESXは新しいetsサブファミリーを含む。Ehfは単一のコピー遺伝子であるが、4つの異なるmRNA転写体を生成する。Ehf転写体はマウス腎臓および肺に豊富であり、筋肉および肝臓ではそれほど多くなく、そして脳、脾臓または精巣では検出されない。成長ホルモン分泌細胞腫瘍におけるその存在およびESXに対するその関連性のために、Ehfは新しい腫瘍性タンパク質を示し得る(Bochert MA et al., Biochem Biophys Res Commun. 246(1):176-81(1998 May 8))。

30

40

【0176】

適当であるその他の好ましい遺伝子には、限定するものではないがEPHX2(Imig JD et al., Hypertension. 46(4):975-81(2005 Oct), Epub 2005 Sep 12)、FKBP11(Han IS et al., J Korean Med Sci. 17(1):41-8(2002 Feb)); Sheppard KE, J Neuroendocrinol. 7(11):833-40(1995 Nov)、FMO4(Zhang J et al., Drug Metab Dispos. 34(1):19-26(2006 Jan). Epub 2005 Sep 23; Krause RJ et al., J Pharmacol Exp Ther. 304(1):185-91(2003 Jan))、FNBP2(Chan DC et al.,

50

, EMBO J. 15 (5) : 1045 - 54 (1996 Mar 1))、F U B P 1 (Scholz H et al., J Biol Chem. 272 (52) : 32836 - 46 (1997 Dec 26))、F U T 3 (Xia L et al., Blood. 104 (10) : 3091 - 6 (2004 Nov 15)) . Epub 2004 Jul 27 ; Yan JL et al., Acta Pharmacol Sin. 24 (9) : 878 - 84 (2003 Sep) ; Rhim AD et al., Glycoconj J. 18 (9) : 649 - 59 (2001 Sep) ; Lacha J et al., J Leukoc Biol. 71 (2) : 311 - 8 (2002 Feb) ; Poland DC et al., Glycoconj J. 18 (3) : 261 - 8 (2001 Mar) ; Artrip JH et al., Erratum in: J Biol Chem ; 274 (21) : 15292 (1999 May 21) ; Cooper DK, Xenotransplantation. 5 (1) : 6 - 17 (1998 Feb) ; Cowan PJ et al., Transplantation. 65 (12) : 1599 - 604 (1998 Jun 27) ; Chen CG et al., Transplantation. 65 (6) : 832 - 7 (1998 Mar 27) ; Osman N et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 94 (26) : 14677 - 82 (1997 Dec 23))、G A S 5 (Bek MF et al., Am J Pathol. 168 (1) : 20 - 32 (2006 Jan) ; Lake AC et al., Cell Commun Signal. 1 (1) : 5 (2003 Nov 24))、H A G H (Mulley JC et al., Hum Genet. 74 (4) : 423 - 4 (1986 Dec))、H C C R 1 (Chung YJ et al., Histol Histopathol. 20 (3) : 999 - 1003 (2005 Jul)) ; Ko J et al., Oncogene. 22 (30) : 4679 - 89 (2003 Jul 24))、H P N : ヘプシン (Li Y et al., Biochim Biophys Acta. 1681 (2 - 3) : 157 - 65 (2005 Jan 11)) . Epub 2004 Dec 15 ; Roemer A et al., J Urol. 172 (6 Pt 1) : 2162 - 6 (2004 Dec))、I N S L 3 (Fu P et al., Ann N Y Acad Sci. 1041 : 516 - 9 (2005 May))、I Q G A P 1 (Lehtonen S et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 102 (28) : 9814 - 9 (2005 Jul 12)) . Epub 2005 ; Jia Z et al., J Biol Chem. 280 (34) : 30564 - 73 (2005 Aug 26)) . Epub 2005 Jun 28) 、K C N J 15 (Derst C et al., J Biol Chem. 273 (37) : 23884 - 91 (1998 Sep 11) ; Shuck ME et al., J Biol Chem. 272 (1) : 586 - 93 (1997 Jan 3))、K C N N 2 (Kusaka M et al., Transplant Proc. 37 (1) : 364 - 6 (2005 Jan - Feb))、K I F 13 B (Venkateswarlu K et al., J Cell Sci. 118 (Pt 11) : 2471 - 84 (2005 Jun 1))、L R P 2 (de Jong M et al., J Nucl Med. 46 (10) : 1696 - 700 (2005 Oct))、Oleinikov AV et al., J Pathol. 192 (2) : 251 - 6 (2000 Oct))、P D Z K 1 (Miyazaki H et al., J Am Soc Nephrol. 16 (12) : 3498 - 506 (2005 Dec)) . Epub 2005 Oct 19) 、P L D 1 (Zhao Y et al., Biochem Biophys Res Commun. 278 (1) : 140 - 3 (2000 Nov 11) ; Slaaby R et al., Biochem J. 351 Pt 3 : 613 - 9 (2000 Nov 1))、P N P N (Okuda T et al., Biochem Biophys Res Commun. 313 (3) : 647 - 53 (2004 Jan 16))、R T K N (Liu CA et al., J Biomed Sci. 11 (5) : 661 - 70 (2004 Sep - Oct))、S L C 34 A 1 (Baum M et al., Kidney Int. 68 (3) : 1148 - 53 (2005 Sep) ; Nashiki K et al., Kidney Int. 68 (3) : 1137 - 47 (2005 Sep))、S L C 7 A 9 (Yuen YP et al., Kidney Int. 69 (1) : 123 - 8 (2006 Jan))、S L P I (He Z et al., J Mol Med. 81 (10) : 600 - 12 (2003 Oct)) . Epub 2003 Aug 19) 、T H E M 2 (Lucas et al., Oncogene. 24 (42) : 6418 - 31 (2005 Sep 22)) が含まれる。

【0177】

考察

C A N の予測 / 早期診断のためのゲノムバイオマーカーを同定する目的でいくつかの腎同種移植片プロトコル生検の遺伝子発現プロファイリングを実施した。バイオマーカーはC A N が組織学的パラメーターにより明らかになる前にC A N を診断するための分子手段として有用である。

【0178】

10

20

30

40

50

均等物

本発明は本出願において記載された特定の実施態様に関して限定されるべきではなく、それは本発明の個々の態様の単なる説明として意図される。当業者に明らかであろうように、本発明の多くの修飾および変更をその精神および範囲から逸脱することなく行うことができる。本発明の範囲内である機能的に均等な方法および装置は、本明細書に列挙されるものに加えて、前記の記載から当業者に明白であろう。かかる修飾および変更は添付の特許請求の範囲内に入ると意図される。本発明は添付の特許請求の範囲が権利を付与する均等物の全範囲を伴うかかる特許請求の範囲の表現によってのみ限定されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0179】

【図1】慢性拒絶の観察された等級対予測された等級を比較するPLSのデータにより誘導されたグラフである。

【図2】応答並べ替えを用いるPLSにより誘導されたバイオマーカーの予測性能を示すグラフである。

【図1】

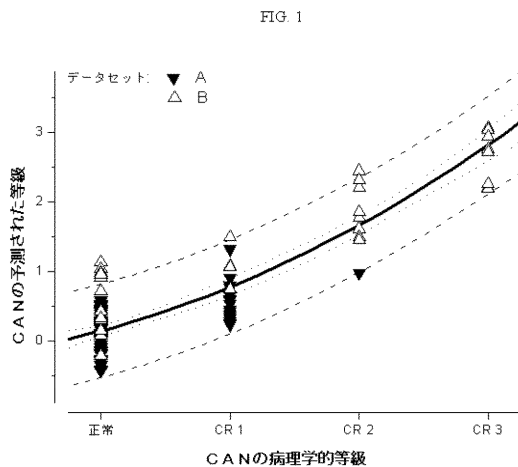


Figure 1: 慢性拒絶の予測モデル対実際の等級

【図2】

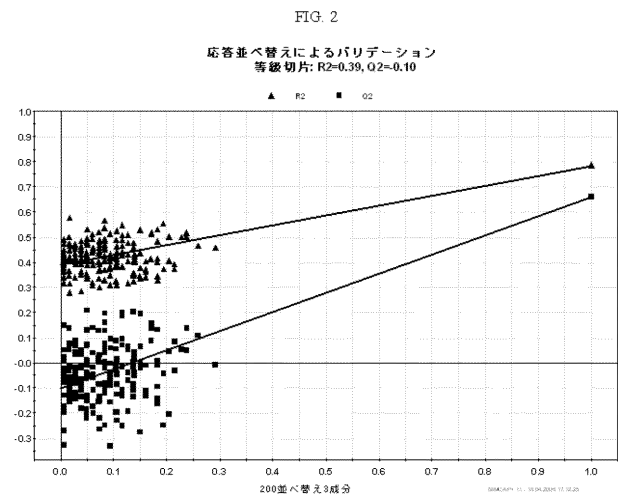


Figure 2: 応答並べ替えによるバリデーション

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/003437

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

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

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

EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/15700 A (BETH ISRAEL HOSPITAL [US]; CORNELL RES FOUNDATION INC [US]) 1 April 1999 (1999-04-01) see whole doc. esp. claims and e.g. Fig 1b,	1-26,28, 29
X	WO 2004/018710 A (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS PHARMA GMBH [AT]; KRAUSE ANDREAS [CH]; NIE) 4 March 2004 (2004-03-04) see whole doc. esp. claims and Tab.	1-26,28, 29
X	WO 03/062467 A (UNIV GLASGOW [GB]; SHIELS PAUL G [GB]) 31 July 2003 (2003-07-31) see whole doc. esp. claims and p.1 ff.	1-26,28, 29
-/--		

☒ 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 document but published on or after the international filing date

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

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

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

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.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 August 2007

Date of mailing of the international search report

18/10/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mueller, Frank

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/003437

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/104371 A1 (STROM TERRY B [US] ET AL.) 5 June 2003 (2003-06-05) see whole doc. esp. claims and Fig.4, pars. 31,205 and Tabel 5	1-26,28, 29
X	WO 2004/074815 A (BETH ISRAEL HOSPITAL [US]; STROM TERRY B; LIBERMANN TOWIA [US]; SCHACH) 2 September 2004 (2004-09-02) see whole doc. esp. claims adn p.2, 1.1.ff. and Fig.5	1-26,28, 29
A	RACUSEN L.C. ET AL.,: "the banff97 working classification of renal allograft pathology" KIDNEY INTERNATIONAL, vol. 55, 1999, pages 713-723, XP002446462 the whole document	
A	NANKIVELL B.J. ET AL.,: "the natural history of chronic allograft nephropathy" N. ENGL J. MED., vol. 349, no. 24, 11 December 2003 (2003-12-11), pages 2326-2333, XP002446463 the whole document	

International Application No. PCT/EP2007/003437

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 19 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 27

Present claim 27 relate to a compound which has a given desired property or effect, namely to prevent transplant rejection. However, the description does not provide support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT for any such compound having the said property or effect and there is no common general knowledge of this kind available to the person skilled in the art. This non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the no search for claim 27 has been carried out.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2007/003437

Box 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.: 27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 19 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 27
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box 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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-26, 28, 29 (part.)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2007/003437

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-26,28,29 (part.)

method for assessing the onset of a rejection of a transplanted organ by determining the expression of the gene aminocarboxymuconate semialdehyde decarboxylase (1. gene in table 2) as formulated in the wording of claims 1-29

2. claims: 1-26,28,29 (part)

Inventions 2-164

method for assessing the onset of a rejection of a transplanted organ by determining the expression of the genes listed in table 2 - 2.gene in table 2 to 164.gene in table 2 -as formulated in the wording of clamis 1-29 for each sequence separetly

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/003437

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9915700	A	01-04-1999	AT 354674 T AU 9493198 A CA 2304159 A1 EP 1015639 A1 ES 2280103 T3 HK 1029143 A1 JP 2001517459 T US 6187534 B1	15-03-2007 12-04-1999 01-04-1999 05-07-2000 01-09-2007 27-04-2007 09-10-2001 13-02-2001
WO 2004018710	A	04-03-2004	AU 2003258648 A1 EP 1532278 A2 JP 2005536212 T	11-03-2004 25-05-2005 02-12-2005
WO 03062467	A	31-07-2003	EP 1466017 A2 JP 2005514960 T US 2005158721 A1	13-10-2004 26-05-2005 21-07-2005
US 2003104371	A1	05-06-2003	NONE	
WO 2004074815	A	02-09-2004	AU 2004213839 A1 CA 2516013 A1 EP 1599602 A2	02-09-2004 02-09-2004 30-11-2005

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 P 37/06 (2006.01) A 6 1 P 37/06

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(特許庁注 : 以下のものは登録商標)

1 . フロッピー

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA04 CA05 CA06 CA09 CA10 CA12 GA18 HA08
 HA09 HA12 HA14
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ20 QQ42 QQ53 QR08 QR32
 QR36 QR42 QR56 QR62 QR63 QR66 QR77 QR82 QS10 QS12
 QS16 QS25 QS34 QS36 QX02
 4C084 AA17 NA14 ZB082

专利名称(译)	用于慢性移植功能障碍的生物标志物		
公开(公告)号	JP2010524427A	公开(公告)日	2010-07-22
申请号	JP2009505781	申请日	2007-04-19
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华公司		
[标]发明人	ペーター・グラス		
发明人	ペーター・グラス		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 C12Q1/02 C12N15/09 A61K45/00 A61P37/06		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/106 C12Q2600/112 C12Q2600/136 C12Q2600/156 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.D C12Q1/02 C12N15/00.A A61K45/00 A61P37/06		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/CA12 4B024/GA18 4B024/HA08 4B024/HA09 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ20 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR63 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS10 4B063/QS12 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB082		
代理人(译)	田中，三夫 山田卓司		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及在移植排斥中调节的基因的分析 and 鉴定。这种基因表达的改变提供了准确检测移植排斥的分子特征。

表 1：略語

略語	用語
BMD	バイオマーカー開発
CAN	慢性同種移植片腎症
CR1、CR2、CR3	等級1から2の慢性同種移植片腎症のBanff分類
PLS	部分最小二乗法による潜在構造の射影