

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5704684号
(P5704684)

(45) 発行日 平成27年4月22日 (2015. 4. 22)

(24) 登録日 平成27年3月6日 (2015. 3. 6)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	15/09	(2006. 01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 Q	1/68	(2006. 01)	C 1 2 Q	1/68	A
G O 1 N	33/53	(2006. 01)	G O 1 N	33/53	D

請求項の数 13 (全 41 頁)

(21) 出願番号	特願2010-194326 (P2010-194326)	(73) 特許権者	507189460
(22) 出願日	平成22年8月31日 (2010. 8. 31)		学校法人金沢医科大学
(65) 公開番号	特開2012-50369 (P2012-50369A)		石川県河北郡内灘町大学 1 - 1
(43) 公開日	平成24年3月15日 (2012. 3. 15)	(74) 代理人	230104019
審査請求日	平成25年8月28日 (2013. 8. 28)		弁護士 大野 聖二
		(74) 代理人	100106840
			弁理士 森田 耕司
		(74) 代理人	100105991
			弁理士 田中 玲子
		(74) 代理人	100119183
			弁理士 松任谷 優子
		(74) 代理人	100114465
			弁理士 北野 健
		(74) 代理人	100156915
			弁理士 伊藤 奈月

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I g G 4 関連疾患診断用マーカー及びその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者のIgG4関連疾患の罹患の有無を判定する方法であって：

1) 被験者から単離された末梢血中における、遺伝子シンボル CLC、DEFA3、DEFA4、IL8R A、IL8RB、及びMS4A3で示される遺伝子の発現量、及び/又は蛋白質シンボルCLUS及びALT Aで示される蛋白質の発現量を測定し、

2) 前記遺伝子の発現量、及び/又は蛋白質の発現量を、健常人における当該遺伝子、及び/又は当該蛋白質の発現量の平均値と比較解析し、

3) 前記被験者における前記遺伝子の発現量が健常人における当該遺伝子の発現量の平均値に比較して低い場合、及び/又は、前記被験者における前記蛋白質の発現量が健常人における当該蛋白質の発現量の平均値に比較して高い場合、前記被験者はIgG4関連疾患に罹患している可能性が高いと判定することを特徴とする、前記方法。

【請求項 2】

前記被験者におけるCLC、IL8RA、及びIL8RBの発現量が健常人における当該遺伝子の発現量に比較してFold changeが2.0以上である場合に、前記被験者はIgG4関連疾患に罹患している可能性が高いと判定することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記被験者におけるCLC、IL8RA、及びIL8RBの発現量が健常人における当該遺伝子の発現量に比較してFold changeが3.0以上である場合に、前記被験者はIgG4関連疾患に罹患している可能性が高いと判定することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項4】

前記蛋白質に加えて、さらに蛋白質シンボルPEDF、DCD、及びSAA4で示される蛋白質の発現量も比較解析し、前記被験者におけるこれら蛋白質の発現量が健常人における当該蛋白質の発現量に比較して高い場合、前記被験者はIgG4関連疾患に罹患している可能性が高いと判定することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

被験者のIgG4関連疾患の病態を判定する方法であって：

1) 治療前及び治療後において、被験者から単離された末梢血中の遺伝子シンボル DEFA3、DEFA4、及びMS4A3で示される遺伝子の発現量、及び/又は蛋白質シンボルCLUS及びALTAで示される蛋白質の発現量を測定し、

2) 治療前及び治療後における、前記遺伝子の発現量、及び/又は蛋白質の発現量を比較解析し、

3) 治療後における前記遺伝子の発現量が、治療前における当該遺伝子の発現量に比較して高い場合、及び/又は、治療後における前記蛋白質の発現量が、治療前における当該蛋白質の発現量に比較して低い場合、前記被験者の病態は治療により改善されたと判定することを特徴とする、前記方法。

【請求項6】

治療後における前記遺伝子の発現量が、治療前における当該遺伝子の発現量に比較してFo Id changeが2.0以上である場合に、前記被験者はIgG4関連疾患に罹患している可能性が高いと判定することを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

治療後における前記遺伝子の発現量が、治療前における当該遺伝子の発現量に比較してFo Id changeが3.0以上である場合に、前記被験者はIgG4関連疾患に罹患している可能性が高いと判定することを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項8】

前記蛋白質に加えて、さらに蛋白質シンボルPEDF、DCD、及びSAA4で示される蛋白質の発現量も比較解析し、前記被験者における前記蛋白質の発現量が健常人における当該蛋白質の発現量に比較して高い場合、前記被験者はIgG4関連疾患に罹患している可能性が高いと判定することを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項9】

遺伝子の発現量が、マイクロアレイ、及びメンブレンフィルターから選ばれる固相化試料を用いた核酸ハイブリダイゼーション法、RT-PCR法、リアルタイムPCR法、サブトラクション法、ディファレンシャル・ディスプレイ法、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーション法、次世代シーケンス解析法ならびにクロスハイブリダイゼーション法から選ばれるいずれかの方法によって測定されることを特徴とする、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

蛋白質の発現量が、ウエスタンブロット法、ドットブロット法、スロットブロット法、ELISA法、質量分析法、プロテインチップ法、ピアコア(登録商標)を含む分子間相互作用解析法及びRIA法から選ばれるいずれかの方法によって測定されることを特徴とする、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

以下の1)～4)のいずれか1又は2以上を含むIgG4関連疾患の診断用試薬又はキット：

1) 遺伝子シンボルCLC、DEFA3、DEFA4、IL8RA、IL8RA、及びMS4A3で示される遺伝子にそれぞれ特異的にハイブリダイズし、当該遺伝子を増幅するためのプライマー

2) 遺伝子シンボルCLC、DEFA3、DEFA4、IL8RA、IL8RA、及びMS4A3で示される遺伝子にそれぞれ特異的にハイブリダイズし、当該遺伝子を検出するためのプローブ

3) 遺伝子シンボルCLC、DEFA3、DEFA4、IL8RA、IL8RA、及びMS4A3で示される遺伝子にそれぞれ特異的にハイブリダイズし、当該遺伝子を検出するためのプローブを固定した固相化試料

10

20

30

40

50

4) 蛋白質シンボルCLUS及びALTAで示される蛋白質にそれぞれ特異的に結合する抗体。

【請求項12】

以下の1)～5)の手段を有するIgG4関連疾患の診断システム

- 1) 被験者から単離された末梢血中の遺伝子シンボルCLC、DEFA3、DEFA4、IL8RA、IL8RA、及びMS4A3で示される遺伝子群、及び/又は蛋白質シンボルCLUS及びALTAで示される蛋白質群の発現量を入力する手段と、
- 2) 予め入力されたIgG4関連疾患患者および健常人の末梢血中の前記遺伝子群、及び/又は蛋白質群の発現量に関するデータを記憶する手段と、
- 3) 前記被験者における前記遺伝子群、及び/又は蛋白質群の発現量と前記健常人における前記遺伝子群、及び/又は蛋白質群の発現量を比較解析する手段と、
- 4) 前記被験者における前記遺伝子の発現量が健常人における当該遺伝子の発現量に比較して低い場合、及び/又は、前記被験者における前記蛋白質の発現量が健常人における当該蛋白質の発現量に比較して高い場合、当該被験者がIgG4関連疾患の罹患している可能性が高いと判定する手段と、
- 5) 前記評価結果を出力する手段。

10

【請求項13】

以下の1)～4)の手段を有するIgG4関連疾患の診断システム

- 1) 治療前及び治療後において、被験者から単離された末梢血中の遺伝子シンボルDEFA3、DEFA4、及びMS4A3で示される遺伝子群、及び/又は蛋白質シンボルCLUS及びALTAで示される蛋白質群の発現量を入力する手段と、
- 2) 治療前と治療後における前記遺伝子群、及び/又は蛋白質群の発現量を比較解析する手段と、
- 3) 治療後における前記遺伝子の発現量が、治療前における当該遺伝子の発現量に比較して高い場合、及び/又は、治療後における前記蛋白質の発現量が、治療前における当該蛋白質の発現量に比較して低い場合、当該被験者の病態は治療により改善されたと判定する手段と、
- 4) 前記評価結果を出力する手段。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、IgG4関連疾患診断用マーカーとその利用に関する。より詳細には、IgG4関連疾患診断用マーカーとなりうる遺伝子群及びタンパク群、ならびに末梢血中における前記マーカーの発現を指標としたIgG4関連多臓器リンパ増殖性疾患の診断方法に関する。

【背景技術】

【0002】

IgG4関連疾患は、血清IgG4高値とIgG4陽性形質細胞の腫瘍形成あるいは組織浸潤を特徴とする新たな疾患概念である。

【0003】

発明者らは、従来、シェーグレン症候群、キャスルマン病、悪性リンパ腫、自己免疫性膵炎、硬化性胆管炎、後腹膜線維症、炎症性偽腫瘍、キュツナー腫瘍、間質性腎炎、各臓器癌などと診断されてきた症例のなかに、血清IgG4高値とIgG4陽性形質細胞の組織浸潤又は腫瘍形成を特徴とする“疾患群”の存在を見出し、これを「IgG4関連多臓器リンパ増殖症候群(IgG4+MOLPS)」と命名した(非特許文献1)。その後、後述する厚生労働省難治性疾患克服研究事業を通じて、「IgG4関連疾患(IgG4-related disease)」として病名統一がなされた。

40

【0004】

IgG4関連疾患発見の端緒は、Hamanoらが硬化性膵炎における高IgG4血症について報告したことに始まる(非特許文献2)。本邦の自己免疫性膵炎の大半はIgG4関連疾患と考えられているが、自己免疫性膵炎は、硬化性胆管炎、硬化性唾液腺炎涙腺炎などの多彩な膵外病変を伴うことから、KamisawaらはIgG4関連硬化性疾患(IgG4-related sclerosing disea

50

se)という概念を提唱している(非特許文献3)。

【0005】

一方で、後腹膜及び縦隔の線維症(非特許文献4~5)、肺や肝の炎症性偽腫瘍(非特許文献6)、キツナー腫瘍(非特許文献7)、間質性腎炎(非特許文献8)などでもIgG4陽性形質細胞浸潤が見られることが報告された。Yamamotoらは、ミクリッツ病における高IgG4血症やIgG4陽性形質細胞浸潤を確認し、全身性疾患としてSystemic IgG4 plasma cytic syndrome(SIPS)を提唱している(非特許文献9)。このように、IgG4関連疾患の解析は日本が先駆的な役割を果たしてきたが、様々な疾患名で報告されていることがIgG4関連疾患の統一的な解明を妨げている原因でもあった。

【0006】

こうした中で、厚生労働省難治性疾患克服研究事業によるIgG4関連疾患診断確立のための研究班により、「IgG4関連疾患(IgG4-related disease)」として病名統一の合意が成された。

【0007】

IgG4関連疾患は新たな疾患単位を形成することは明らかであるが、未だほとんどの臨床医に周知されていない。定点観測サンプリング法によれば、全国のIgG4関連疾患の患者数は26,000人と推測され、多くの患者のためにも各診療領域におけるIgG4関連疾患の啓蒙が重要である。

【0008】

IgG4関連疾患は、(1)IgG4陽性形質細胞増殖を主体とした単一もしくは多臓器に及ぶリンパ増殖性病変、(2)血清IgG4の増加(135mg/dl以上)、(3)ステロイド治療が著効する、といった特徴を有する。それゆえ、他の多クローン性高ガンマグロブリン血症を呈するシェーグレン症候群やキャッスルマン病などの鑑別が必要となる。

【0009】

IgG4関連疾患は、適切な治療を行えば、本来コントロールの良好な疾患である。しかしながら、その認知度の低さゆえに、他の既存の疾患と混同されたり、原因不明疾患として取り扱われ、効果的な治療が行われないことも少なくない。

【0010】

こうした状況のもと、早急にIgG4関連疾患の疾患概念の確立と診断基準の制定を行い、広く臨床医の注意を喚起することが望まれる。現時点では、個別の疾患について、眼瞼・唾液腺・耳下腺に腫瘤形成する「IgG4-ミクリッツ病診断基準」と自己免疫膵炎に関する「IgG4-自己免疫性膵炎診断基準」が制定されているにすぎず、「IgG4関連肺疾患診断基準」「IgG4関連腎炎診断基準」などの策定も推進する必要がある。しかしながら、IgG4関連疾患は全身の諸臓器に発生するという特徴があるため、単一の診療科による診断基準確定には無理があり、統一的な診断基準の策定が必要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Masaki Y, et al: Proposal for a new clinical entity, IgG4-positive multi-organ lymphoproliferative syndrome: Analysis of 64 cases of IgG4-related disorders. *Ann Rheum Dis* 68:1310-1315, 2009.

【非特許文献2】Hamano H, et al: High serum IgG4 concentrations in patients with sclerosing pancreatitis. *N Engl J Med* 344:732-738, 2001.

【非特許文献3】Kamisawa T, et al: A new clinicopathological entity of IgG4-related autoimmune disease. *J Gastroenterol* 38: 982-984, 2003.

【非特許文献4】Kamisawa T, et al: IgG4-related sclerosing disease incorporating sclerosing pancreatitis, cholangitis, sialadenitis and retroperitoneal fibrosis with lymphadenopathy. *Pancreatol* 6:132-137, 2006.

【非特許文献5】Zen Y, et al: A case of retroperitoneal and mediastinal fibrosis exhibiting elevated levels of IgG4 in the absence of sclerosing pancreatitis (a

10

20

30

40

50

utoimmune pancreatitis). Human Pathol 37:239-243, 2006.

【非特許文献6】Zen Y, et al: IgG4-positive plasma cells in inflammatory pseudotumor (plasma cell granuloma) of the lung. Human Pathology 36:710-717, 2005.

【非特許文献7】Kitagawa S, et al: Abundant IgG4-positive plasma cell infiltration characterizes chronic sclerosing sialadenitis (Kuttner's tumor). Am J Surg Pathol 29:783-791, 2005.

【非特許文献8】Saeki T, et al: Lymphoplasmacytic infiltration of multiple organs with immunoreactivity for IgG4-related systemic disease. Intern Med 45:163-167, 2006.

【非特許文献9】Yamamoto M, et al: The analysis of interleukin-6 in patients with systemic IgG4-related plasmacytic syndrome-expansion of SIPS to the territory of Castleman's disease. Rheumatology (Oxford) 48:860-862, 2009.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明の課題は、IgG4関連疾患の特徴的マーカーを同定し、IgG4関連疾患を類似する疾患と区別して簡便に診断する方法を提供すること、並びに、前記マーカーに基づきIgG4関連疾患の病因病態を解明し、IgG4関連疾患の疾患概念の確立と診断基準を制定することにある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

上記課題を解決するために、発明者らはIgG4関連疾患と診断された患者の血清及びDNAを収集し、DNAアレイ法を用いた疾患特異的遺伝子の網羅的検索と、プロテオミクス的手法を用いた疾患関連蛋白質の解析を行った。

【0014】

そして、IgG4関連疾患治療前後及び患者と健常人間における遺伝子発現変動を解析し、疾患特異的遺伝子を特定した。また、IgG4関連疾患治療前後及び患者と健常人間における血清中蛋白質の発現変動を、プロテオミクス的手法により解析し、1 アンチトリプシン、クラスレリンなどの炎症性因子を疾患特異的蛋白質として同定した。

【0015】

すなわち、本発明は、被験者から単離された検体における、表1及び表2に記載の遺伝子群から選ばれる少なくとも1以上の遺伝子の発現量、あるいは蛋白質シンボルCLUS、ALTA、PEDF、DCD、及びSAA4からなる群から選ばれる少なくとも1以上の蛋白質の発現量に基づき、当該被験者のIgG4関連疾患の罹患あるいは病態を評価する方法に関する。

【0016】

1つの実施形態において、本発明は、遺伝子シンボル CLC、DEFA3、DEFA4、IL8RA、CXC R1、IL8RA、CXCR2、及びMS4A3からなる群より選ばれる少なくとも1以上の遺伝子、あるいは蛋白質シンボルCLUS、ALTA、PEDF、DCD、及びSAA4からなる群より選ばれる少なくとも1以上の蛋白質の発現量に基づき、前記被験者のIgG4関連疾患の罹患あるいは病態を評価する。

【0017】

別な実施形態において、本発明は、表1 - (1)(A)及び(2)(A)記載の遺伝子群から選ばれる少なくとも1以上の遺伝子の発現量に基づき、前記被験者がIgG4関連疾患か否かを評価する。

【0018】

また別な実施形態において、本発明は、表2に記載の遺伝子群から選ばれる少なくとも1以上の遺伝子の発現量に基づき、前記被験者がIgG4関連疾患か否かを評価することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【0019】

さらに別な実施形態において、本発明は、表2に記載の遺伝子群から選ばれる少なくと

10

20

30

40

50

も1以上の遺伝子、あるいは蛋白質シンボルCLUS、ALTA、PEDF、DCD、及びSAA4からなる群から選ばれる蛋白質群から選ばれる少なくとも1以上の蛋白質の発現量に基づき、当該被験者のIgG4関連疾患の病態を評価する。

本発明において、用いられる検体は特に限定されないが、たとえば末梢血を用いることができる。

【0020】

遺伝子の発現量は、たとえば、マイクロアレイ、及びメンブレンフィルターから選ばれる固相化試料を用いた核酸ハイブリダイゼーション法、RT-PCR法、リアルタイムPCR法、サブトラクション法、ディファレンシャル・ディスプレイ法、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーション法、次世代シーケンス解析法ならびにクロスハイブリダイゼーション法から選ばれるいずれかの方法によって測定することができる。

10

【0021】

蛋白質の発現量は、たとえば、ウエスタンブロット法、ドットブロット法、スロットブロット法、ELISA法、質量分析法、プロテインチップ法、ピアコアを含む分子間相互作用解析法及びRIA法から選ばれるいずれかの方法によって測定することができる。

【0022】

本発明は、IgG4関連疾患の診断用試薬又はキットも提供する。本発明の試薬又はキットは、たとえば、以下の1)~4)のいずれか1又は2以上を含む：

1) 表1及び表2に記載の遺伝子群から選ばれる遺伝子に特異的にハイブリダイズし、当該遺伝子を増幅するためのプライマー

20

2) 表1及び表2に記載の遺伝子群から選ばれる遺伝子に特異的にハイブリダイズし、当該遺伝子を検出するためのプローブ

3) 表1及び表2に記載の遺伝子群から選ばれる遺伝子に特異的にハイブリダイズし、当該遺伝子を検出するためのプローブを固定した固相化試料

4) 蛋白質シンボルCLUS、ALTA、PEDF、DCD、及びSAA4からなる群から選ばれる蛋白質に特異的に結合する抗体、リガンド、又は受容体分子。

【0023】

本発明はまた、IgG4関連疾患の診断システムも提供する。本発明のシステムは、たとえば、以下の1)~5)の手段を有する：

1) 被験者から単離された検体における、表1と表2記載の遺伝子群、及び/又は蛋白質シンボルCLUS、ALTA、PEDF、DCD、及びSAA4からなる蛋白質群の発現量を入力する手段と

30

2) 予め入力されたIgG4関連疾患患者および健常人の前記遺伝子群、及び/又は蛋白質群の発現量に関するデータを記憶する手段と、

3) 前記被験者における前記遺伝子群、及び/又は蛋白質群の発現量と前記健常人における前記遺伝子群、及び/又は蛋白質群の発現量を比較解析する手段と、

4) 前記解析結果に基づき、当該被験者がIgG4関連疾患の罹患あるいは病態を評価する手段と、

5) 前記評価結果を出力する手段。

【発明の効果】

40

【0024】

本発明によれば、患者から単離した検体(末梢血)を用いることにより、IgG4関連疾患を類似する疾患と区別して簡便に診断することができる。また、IgG4関連疾患患者の病態を簡便に評価することができ、治療の進捗の確認や予後の予測に利用できる。

【0025】

本発明は、検体(末梢血)中のRNA発現量や蛋白質発現量を一括定量することによってIgG4関連疾患に特有の所見を得ることでIgG4関連疾患を診断する方法を提供するものであって、IgG4関連疾患の診療に画期的な向上をもたらすものである。

【0026】

本発明によれば、患者の特別な協力を必要とせず、通常の採血による2-5ccの血液をも

50

とに解析が可能であり、非侵襲的、簡便かつ日常的にIgG4関連疾患の診断が可能になる。数多くのRNA発現量から生体機能を多面的に把握する本法は、従来の限られた因子を測定する方法に比べ、IgG4関連疾患のようにさまざまな診療科にわたる複雑な疾患の検査方法として原理的にも適切である。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】患者と健常人間で発現量に有意な差があった遺伝子群(t検定： $p < 0.05$ 、かつFold change 1.5以上)のマイクロアレイデータ

【図2】患者と健常人間で発現量に有意な差があった遺伝子群(t検定： $p < 0.05$ 、かつFold change 2.0以上)のマイクロアレイデータ

10

【図3】患者と健常人間で発現量に有意な差があった遺伝子群(t検定： $p < 0.05$ 、かつFold change 3.0以上)のマイクロアレイデータ

【図4】患者の治療前後で有意に変動していた遺伝子群(t検定： $p < 0.05$ 、かつFold change 3.0以上)

【図5】Charcot-Leyden crystal protein (CLC) の患者と健常人、患者の治療前後における発現変動(リアルタイムPCR)

【図6】Defensin, alpha 3 (DEFA3) の患者と健常人、患者の治療前後における発現変動(リアルタイムPCR)

【図7】Defensin, alpha 4 (DEFA4) の患者と健常人、患者の治療前後における発現変動(リアルタイムPCR)

20

【図8】Interleukin 8 receptor, alpha (IL8RA, CXCR1) の患者と健常人、患者の治療前後における発現変動(リアルタイムPCR)

【図9】Interleukin 8 receptor, beta (IL8RB, CXCR2) の患者と健常人、患者の治療前後における発現変動(リアルタイムPCR)

【図10】Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (MS4A3) の患者と健常人、患者の治療前後における発現変動(リアルタイムPCR)

【図11】ウエスタンブロットによるClusteringの発現解析結果(レーン(1)及び(2)：IgG4関連疾患患者1治療前、レーン(3)：IgG4関連疾患患者1治療後、レーン(4)：IgG4関連疾患患者2治療前、レーン(5)：IgG4関連疾患患者2治療後、レーン(6)：IgG4関連疾患患者3治療前、レーン(7)：IgG4関連疾患患者3治療後、レーン(8)：健常人1、レーン(9)：健常人2、レーン(10)：健常人3)

30

【図12】ウエスタンブロットによる 1 antitrypsinの発現解析結果(レーン(1)及び(2)：IgG4関連疾患患者1治療前、レーン(3)：IgG4関連疾患患者1治療後、レーン(4)：IgG4関連疾患患者2治療前、レーン(5)：IgG4関連疾患患者2治療後、レーン(6)：IgG4関連疾患患者3治療前、レーン(7)：IgG4関連疾患患者3治療後、レーン(8)：健常人1、レーン(9)：健常人2、レーン(10)：健常人3)

【図13】ELISAによるClusteringの発現解析結果(左：IgG4関連疾患患者(7例)治療前、右：健常人(6例))

【図14】ELISAによる 1 antitrypsinの発現解析結果(左：IgG4関連疾患患者(7例)治療前、右：健常人(6例))

40

【発明を実施するための形態】

【0028】

1. IgG4関連疾患

IgG4関連疾患は、シェーグレン症候群、キャスルマン病、悪性リンパ腫、自己免疫性膵炎、硬化性胆管炎、後腹膜線維症、炎症性偽腫瘍、キュツナー腫瘍、間質性腎炎、各臓器癌などと診断されてきた症例に存在する共通の“疾患群”である。

【0029】

IgG4関連疾患は、血清IgG4高値とIgG4陽性形質細胞の腫瘤形成あるいは組織浸潤を特徴とし、(1) IgG4陽性形質細胞増殖を主体とした単一もしくは多臓器に及ぶリンパ増殖性病変、(2) 血清IgG4の増加(135mg/dl以上)、(3) ステロイド治療が著効する、といった

50

共通の特徴を有する。

【0030】

以下、IgG4関連疾患に含まれる各疾患について、その臨床的特徴を既存の症候群と相違を含めて詳述する。

【0031】

1) IgG4関連ミクリッツ病とシェーグレン症候群

当初、いわゆるミクリッツ病及びミクリッツ病の徴候は呈していなくても、血清IgG4高値(>135mg/dl)かつ特徴的な組織像を呈する58例をIgG4関連疾患と診断した。IgG4関連疾患を典型的シェーグレン症候群症例と比較解析した結果、以下に示すIgG4関連疾患の特徴が明らかになった。

【0032】

(1) 眼乾燥、口腔乾燥や関節痛の自覚症状が少なく、自己免疫性膵炎、間質性腎炎、アレルギー性鼻炎、気管支喘息の合併例が多く認められる。(2) IgG4関連疾患の殆どが抗SS-A抗体及び抗SS-B抗体が陰性で、RF及びANA陽性率も低率であることが確認されている。(3) IgG4関連疾患では血清IgG4のみならずIgEが有意にシェーグレン症候群より高値である。(4) シェーグレン症候群ではステロイド治療の効果は限定的であるが、IgG4関連疾患はステロイド投与が初期には著効する。以上の相違点と後述する病理像の違いより、侵される臓器は類似しているが、シェーグレン症候群とIgG4関連疾患は異なった疾患単位である。

【0033】

2) IgG4関連ミクリッツ病の病理像

IgG4関連ミクリッツ病もシェーグレン症候群も著明なリンパ球浸潤を認めるが、IgG4関連ミクリッツ病では、リンパ瀰胞を形成するほどリンパ球浸潤が華々しい反面、唾液腺導管へのリンパ球浸潤が少なく導管の構造が保たれている。すなわち、シェーグレン症候群のようにリンパ上皮性病変を形成しないことが、涙腺や唾液腺の腫脹が著明な割に、乾燥症状が少ない理由である可能性がある。最も重要な相違は、IgG4関連疾患ではIgG4陽性形質細胞の著明な浸潤(IgG4陽性細胞/IgG陽性細胞が50%以上)が認められるが、シェーグレン症候群では殆ど認められないことである。多くの症例は多クローン性のB細胞増殖であり、免疫グロブリンの鎖、鎖が同等に染色される。

【0034】

3) IgG4関連キュツナー(Kuttner)腫瘍

片側性の硬化性顎下腺炎であるキュツナー腫瘍もIgG4関連疾患であることが判明している。ミクリッツ病とキュツナー腫瘍の両者はIgG4関連疾患としての唾液腺炎であるという点で共通している。キュツナー腫瘍の組織は非常に強い線維性硬化性病変が存在し、その中にIgG4陽性形質細胞が認められる。一方、ミクリッツ病ではそれほど線維化は強くないことが多い。しかし、一般的に口唇小唾液腺生検で診断されるミクリッツ病では線維化が軽く評価されている傾向にあり、両者に厳密な境界を設けることは難しい。

【0035】

4) IgG4関連膵炎と自己免疫性膵炎

1961年のSarlesらによる自己免疫機序による慢性膵炎の報告、1978年のNakanoらによるシェーグレン症候群に合併し、ステロイドにより改善した腫瘤形成性膵炎の報告、1991年のKawaguchiらによる自己免疫性膵炎の特徴的な病理所見としてLymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis (LPSP)の報告に続き、1995年にYoshidaらによって、高グロブリン血症、各種自己抗体の存在、膵組織へのリンパ球浸潤、他の自己免疫性疾患の合併、良好なステロイド反応性等の特徴を持つ自己免疫性膵炎の疾患概念が提唱された。その後、2001年HamanoらによるIgG4上昇の発見があり(前掲)、厚生労働省難治性膵疾患調査研究班の精力的な研究により、自己免疫性膵炎はIgG4関連疾患と考えられるようになった。

【0036】

一方、欧米の自己免疫性膵炎の組織像は、idiopathic duct-centric chronic pancreatitis (IDCP)あるいはautoimmune pancreatitis with granulocytic epithelial lesion (

10

20

30

40

50

GEL)と記載される、主に好中球浸潤による病態 (IDCP/GEL型) である。IgG4関連膵炎 (LPSP型) は高齢の男性に多く、様々な膵外病変を併発しやすいのに対して、好中球関連膵炎 (IDCP/GEL型) は、性差が無く発症年齢も若く (40歳以下が多い)、炎症性腸疾患と関連がある等、両者は異なった病態である可能性が高い。自己免疫性の診断基準を巡っては世界的な議論が行われており、IgG4関連膵炎をType 1 (LPSP型)、好中球関連をtype2 (IDCP/GEL型) とする自己免疫性膵炎の基準が欧米より提案されたが、国際的なコンセンサスは得られていない。

【 0 0 3 7 】

最近、イタリアのグループが自己免疫性膵炎患者のプール血清から、*Helicobacter pylori* のplasminogen-binding protein (PBP)とubiquitin-protein ligase E3 component n-recognin 2 (UBR2)に類似のペプチドに反応する抗体を同定し、自己免疫性膵炎患者においてはH. pyloriに対する抗体陽性者が有意に高率であることを報告した。しかし、この報告にはIgG4高値症例 (135mg/dl以上) は半数しか含まれておらず、IgG4関連膵炎と好中球関連膵炎の検体が混在した結果である可能性が高い。

【 0 0 3 8 】

5) IgG4関連腎症

IgG4関連疾患の腎病変には、後腹膜線維症に伴う水腎症や腎盂・尿管腫瘍などの腎実質病変以外の場合も存在するが、腎実質病変の代表は間質性腎炎である (IgG4関連間質性腎炎)。IgG4関連間質性腎炎は、他の間質性腎炎に比べ、膵炎、唾液腺炎、リンパ節炎などの腎外性病変の合併が多く、IgG4関連疾患の中では低補体血症頻度が高い。画像上は、腎に腫瘍や多発結節など不均一な陰影を認めることが多く、他の間質性腎炎ではみられない所見である。病理学的には腎尿細管間質に多数のリンパ球、形質細胞の浸潤と線維化を認め、IgG4免疫染色で多数のIgG4陽性形質細胞が確認される。糸球体には著変がないとの報告が多いが、膜性腎症をはじめ糸球体病変の合併も報告されている。ほとんどの症例でステロイド (prednisolone 0.6-1.0mg/kg/日) が著効し、腎機能の改善が認められる。

【 0 0 3 9 】

6) IgG4関連肺疾患

肺のIgG4関連疾患と考えられる症例は、これまで炎症性偽腫瘍、間質性肺炎、器質化肺炎、lymphomatoid granulomatosisなどの診断名で報告されていたものが多い。それらを集計すると、男性優位 (80.5%) で年齢の中央値は65歳であり、IgG4関連疾患の特徴と似かよっている。乾性咳や呼吸困難など初発時の呼吸器症状を認めたものは少数で、75%の症例は無症状で偶然に胸部異常陰影として発見されている。画像上は、炎症性偽腫瘍型と間質性肺炎型に大別される。炎症性偽腫瘍型は、結節性あるいは腫瘍性病変、浸潤影などと表現され、腫瘍周辺に放射状に伸びる網状陰影が特徴である。間質性肺炎型は、両下肺野に網状影、すりガラス状陰影、間質性線維化を認める例が多い。

【 0 0 4 0 】

炎症性偽腫瘍は、病理学的には形質細胞性肉芽腫で、形質細胞とリンパ球主体の細胞浸潤、不規則な線維化、リンパ濾胞形成、結節辺縁の間質性肺炎像、閉塞性静脈炎動脈炎、好酸球浸潤が認められる (前掲)。間質性肺炎型では、形質細胞とリンパ球浸潤による肺胞隔壁の肥厚、びまん性線維化が認められ、従来、nonspecific interstitial pneumonia (NSIP)と分類されて来たパターンを取るものが多い。

【 0 0 4 1 】

7) IgG4関連リンパ節症とキャッスルマン病

リンパ節病変を主体とするIgG4関連疾患の場合には、キャッスルマン病や特発性形質細胞性リンパ節症 (IPL: idiopathic plasmacytic lymphadenopathy) との鑑別が問題となることがある。IgG4関連リンパ節症は好酸球の浸潤と血清IgEの上昇を伴い、IgG4陽性形質細胞の浸潤形態により、interfollicular plasmacytosis typeとintra-germinal center typeの2型に分類される。多中心性キャッスルマン病 (multicentric Castelman's disease) の大きな違いは、IgG4関連リンパ節症に比べ、発症年齢が若いこと (43.3 vs 68.8 歳)、CRP高値であること (8.71 vs 0.29 mg/dl)、IL-6が高値であること (34.82 vs 8.45 pg/

10

20

30

40

50

ml)である。

【0042】

現時点では、IgG4関連疾患の診断のための大前提として、1)血清IgG4が135 mg/dl以上であること、2)病理組織におけるIgG4陽性形質細胞がIgG陽性形質細胞の40%以上を占めること、という2点についての合意が得られている。

【0043】

IgG4関連疾患は、多クローン性高ガンマグロブリン血症を呈するシェーグレン症候群やキャッスルマン病など類似した病態を呈する既存の疾患との鑑別が必要であり、また全身の諸臓器に発生するという特徴があるため、単一の診療科に限定されない、統一的な診断基準、診断方法の策定が望まれる。

10

【0044】

本発明は、IgG4関連疾患の疾患特異的遺伝子(IgG4関連疾患診断用マーカー遺伝子)、及び疾患特異的蛋白質(IgG4関連疾患診断用マーカー蛋白質)を特定し、これらを指標としたIgG4関連疾患の簡便かつ統一的な診断方法を提供する。

【0045】

2. IgG4関連疾患診断用マーカー遺伝子

発明者らは、IgG4関連疾患患者末梢血リンパ球におけるmRNA量を、DNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析することにより、病態関連遺伝子群の検索を行なった。具体的には、IgG4関連疾患患者(治療前後)と健常人から末梢血を採取し、その単核球から抽出したRNAを用いてDNAマイクロアレイ解析を行なった。そして、患者の治療前後において有意に発現が変動する遺伝子、及び患者と健常人間において有意に発現が異なる遺伝子群を抽出した。さらに抽出された各遺伝子について、リアルタイムPCRによるバリデーションを行った。

20

【0046】

そして、患者と健常人間で統計的に有意な変動が見られ、かつ、患者の治療前後で1.5倍以上の発現量変化を認めた遺伝子群(表1:(1)FC 1.5以上2.0未満、(2)FC 2.0以上3.0未満、(3)FC 3.0以上)、患者と健常人間で3倍以上の発現量の違いを認めた遺伝子群(表2)を「IgG4関連疾患診断用マーカー遺伝子」として抽出した。

【0047】

表1記載の遺伝子群のうち、表1(3)に示される遺伝子群は、患者と健常人間で3.0倍以上の発現量変化を認めた遺伝子群である。これらの遺伝子シンボルを以下に列挙する：

30

【0048】

本発明にかかる「IgG4関連疾患診断用マーカー遺伝子」は、ヒトIgG4関連疾患に特異的な遺伝子であり、かつ、その病態を反映して発現が変化する遺伝子である。それゆえ、本発明にかかる「IgG4関連疾患診断用マーカー遺伝子」は、IgG4関連疾患の罹患の有無を評価するためのマーカーとして利用できる。また、IgG4関連疾患患者における病態の評価、例えば、治療の進捗をモニターしたり、予後を予測するためのマーカーとして利用できる。

とくに、治療前後で発現が相違する表2に記載の遺伝子群は、病態評価のマーカーとして好ましい。

40

【0049】

なお、本明細書中において、「遺伝子」という用語には、DNAのみならずそのmRNAやcDNAも含むものとする。また、全長遺伝子のみならずESTも含むものとする。

【0050】

以下、本発明の「IgG4関連疾患診断用マーカー遺伝子」のうち有望なものについて説明する。

(1) Charcot-Leyden crystal protein (CLC)

CLCは -galactoside-binding lectin familyに属しており、ガレクチン-10とも呼ばれる。CLCは、長く好酸球、好塩基球におけるlysophospholipaseとして機能していると考え

50

られていたが、最近はその否定する論文が報告されている。一方でCLCはガレクチンファミリーに属しており、ガレクチンはヒトでは15種類知られているが、その遺伝子をノックアウトした場合にみられる影響は、免疫、感染、炎症等に深く関係していることから、免疫系における機能が推定されている。

【 0 0 5 1 】

(2) Defensin, alpha 3 (DEFA3) 及び Defensin, alpha 4 (DEFA4)

Defensinは哺乳類の代表的な抗菌ペプチドであり、その抗菌活性により自然免疫のエフェクター因子として機能している。ヒトでは α -defensinと β -defensinが存在するが、DEFA3がコードしているhuman neutrophil peptide-3 (HNP-3)、DEFA4がコードしているHNP-4は β -defensinとして好中球のアズール顆粒中に大量に存在する。また単球において、HNP-1~3はIL-8産生を誘導することが知られている。

10

【 0 0 5 2 】

(3) Interleukin-8受容体 : Interleukin 8 receptor, alpha (IL8RA, CXCR1) 及び Interleukin 8 receptor, beta (IL8RB, CXCR2)

CXCR-1及びCXCR-2が同定されている。ともに7回膜貫通三量体Gタンパク共役型受容体で、アミノ酸レベルで76%の相同性を示す。これらの受容体は好中球、好酸球、肥満細胞、CD8陽性T細胞、CD56陽性NK細胞及び単球の一部に発現している。

Interleukin-8は、IL-1やTNFといった炎症性サイトカインの刺激により、主に単球やマクロファージから産生されるケモカインである。CXCR-1、CXCR-2の両方にほぼ同様に作用し、主に好中球の遊走と活性化を促し、炎症反応を促進する。

20

【 0 0 5 3 】

(4) Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (MS4A3)

この遺伝子はmembrane-spanning 4A(MS4A) gene familyに属する。MS4A3は造血系細胞において、好塩基球で最も優位に発現を認めるが、その他の顆粒球やB細胞、T細胞にも低いレベルで発現している。染色体の局在が、同じMS4A familyであるFc γ RI抗原レセプター鎖 (MS4A2) に近接しており、この染色体領域は有意にヒトアトピー表現型と関連していることが報告されている。MS4A3はアトピー喘息と強い関連を示し、アトピー遺伝子の候補であると考えられている。

【 0 0 5 4 】

3 . IgG4関連疾患診断用マーカー蛋白質

30

発明者らは、IgG4関連疾患の治療前後及び健常人における血清中蛋白質を、プロテオミクス的手法により解析し、「IgG4関連疾患診断用マーカー蛋白質」として抽出した。

【 0 0 5 5 】

具体的にはフォームドコンセントを得たIgG4関連疾患の治療前・治療後、及び健常人の血清から調製したポリペプチドを2次元電気泳動 (pH3-10) により展開し、治療前後で変動したスポットを切り出し、質量分析解析で蛋白質を同定した。その結果、IgG4関連疾患治療前の血清では、IgG1、IgG4、Ig α 、Ig β の増加、 α 1アンチトリプシン、アポリポ蛋白-L1、補体因子4 (Complement 4)、C1q、血清アミロイドAタンパク質前駆体 (Serum amyloid A protein precursor) などの炎症性因子の増加がみられ、健常人と比べても明らかに異なるパターンが得られた。さらに上記蛋白質についてウエスタンブロットによるバリデーションを行った。こうして、健常人と患者間、また患者の治療前後について有意に発現が変動するタンパク質群を「IgG4関連疾患診断用マーカータンパク質」として特定した。

40

【 0 0 5 6 】

本発明にかかる「IgG4関連疾患診断用マーカータンパク質」は、ヒトIgG4関連疾患に特異的な蛋白質であり、かつ、その病態を反映して発現が変化する蛋白質である。それゆえ、本発明にかかる「IgG4関連疾患診断用マーカー蛋白質」は、IgG4関連疾患の罹患の有無を評価するためのマーカーとして利用できる。また、IgG4関連疾患患者における病態の評価、例えば、治療の進捗をモニターしたり、予後を予測するためのマーカーとして利用できる。

50

【 0 0 5 7 】

以下、本発明の「IgG4関連疾患診断用マーカー蛋白質」の有望な例について説明する。

(1) クラステリン (CLUS : Clustering precursor)

ヒトクラステリンは、ジスルフィド結合で強く結合した、75~80kDaヘテロ二量体性糖蛋白質である。クラステリンは、上皮細胞や神経細胞等、多くの細胞や母乳、血漿、尿等、体液性物質から分泌される主要蛋白質である。このように、クラステリンは体内に広範囲で存在するため、膜組織の再生や、リン脂質の輸送等、多くの生理的機能を起因する物質と考えられています。さらに、細胞死をプログラムする機能を持つ細胞外シャペロンとしての役割も示唆されています。また、腎臓変性疾患、前立腺癌、卵巣癌、アルツハイマー病等の神経性疾患等、重度の疾患の発症に関与しているとの報告もある。

10

【 0 0 5 8 】

(2) 1アンチトリプシン (ALTA : Alpha-1-antitrypsin precursor)

代表的な急性相反応物質の一つ。欠損すると若年性肺気腫を引き起こすことが知られている蛋白質である。

【 0 0 5 9 】

1アンチトリプシンは394個のアミノ酸からなる分子量約51000の糖蛋白である。血清中の代表的なプロテアーゼインヒビターであり、トリプシンのみならず活性中心にセリンをもつ蛋白分解酵素(セリン・プロテアーゼ)一般を阻害する働きをもち、serin protease inhibitor superfamilyの原型蛋白と考えられている。トリプシン、キモトリプシン、トロンピン、エラスターゼなど広範なセリン・プロテアーゼを阻害するが、主眼となる生理機能は好中球エラスターゼの阻害であり、1対1で結合して組織障害の拡大を防ぐ役割を担っている。

20

【 0 0 6 0 】

1アンチトリプシンの高値を示す病態としては、急性・慢性感染症、悪性腫瘍、自己免疫疾患、膠原病、肝疾患(急性・慢性肝炎、アルコール性肝炎、肝癌など)、アレルギー性疾患、外科手術後、妊娠が知られている。また、副腎皮質ステロイド、エストロゲン、経口避妊薬など薬剤投与によっても増加する。

【 0 0 6 1 】

1アンチトリプシンの低値を示す病態としては、先天性の1アンチトリプシン欠乏症または欠損症、後天性のネフローゼ症候群、新生児呼吸促進症候群、栄養不良、蛋白喪出性胃腸症、劇症肝炎などが知られている。

30

【 0 0 6 2 】

(3) 色素上皮由来因子 (PEDF : Pigment epithelium-derived factor precursor)

網膜色素上皮より単離された分泌性蛋白。血管新生抑制、抗酸化作用、神経新生作用を有する。平滑筋細胞の増殖・遊走を抑制し、単球・T cell 活性化を抑制する。

【 0 0 6 3 】

(4) ダームシジン (DCD : Dermcidin precursor)

抗菌ペプチドのひとつ。侵入した病原体に対し、直接的な抗菌作用をもつ。特にE.coli、E.faecalis、S.aureus、C.albicansに対しより強い抗菌作用を持つ。汗に含まれる。アトピー性皮膚炎患者では、表皮の分化異常のため、抗菌ペプチドの発現が低下し、炎症があっても抗菌ペプチドがうまく誘導されない。

40

【 0 0 6 4 】

(5) 血清アミロイドA4蛋白 (SAA4 : Serum amyloid A-4 protein precursor)

SAAは血中では高比重リポ蛋白 (HDL) の構成アポ蛋白として存在する。最も増大率の高い炎症蛋白質。SAAには4種類のアイソタイプ (SAA1, SAA2, SAA3, SAA4 : ヒトではSAA3は非発現) があり、このうちSAA1, SAA2がIL-1, IL-6, TNFなどの炎症性サイトカインに応答する急性相反応物質で、アミロイド原性蛋白である。SAA4はHDLの構成蛋白で、炎症時には変動しない。SAAは主に肝臓で産生されるが、その他末梢血単球や血管内皮細胞から産生されているという報告もある。

【 0 0 6 5 】

50

4 . IgG4関連疾患の診断方法

本発明のマーカー遺伝子及び本発明のマーカー蛋白質の発現量は、IgG4関連疾患の罹患、病態や予後を反映する。従って、検体中の前記遺伝子又は蛋白質の発現量を測定することにより、IgG4関連疾患の罹患の有無や病態を評価し、IgG4関連疾患の診断に利用することができる。

【0066】

なお、「検体」とは、被験者や臨床献体等から単離された、血液、体液、組織又は排泄物等の試料を意味するが、本発明では末梢血が好ましく、血清又は末梢血リンパ球画分がより好ましい。

【0067】

4 . 1 マーカー遺伝子を利用した診断方法

本発明のマーカー遺伝子を利用した診断方法は、例えば、以下の工程1)～3)の工程により実施できる。

- 1) 被験者から単離された検体(例えば、末梢血)より、全RNAを抽出する；
- 2) 上記検体由来全RNAにおける、マーカー遺伝子の発現量を測定する；
- 3) 上記各マーカー遺伝子の発現量に基づき、当該被験者のIgG4関連疾患の罹患あるいは病態を評価する。

【0068】

工程1)

工程1)における全RNAの抽出は、特に限定されず、例えば、チオシアン酸グアニジン・塩化セシウム超遠心法、チオシアン酸グアニジン・ホットフェノール法、グアニジン塩酸法、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., (1987) Anal. Biochem., 162, 156-159)等を採用することができる。抽出された全RNAはさらに精製してmRNAとして使用することが好ましい。

【0069】

工程2)

工程2)におけるマーカー遺伝子発現量は、工程1)で得られた全RNA(あるいはmRNA)中におけるマーカー遺伝子(mRNA)の発現量を、マイクロアレイ(遺伝子チップ、cDNAアレイ)等の固相化試料を用いた核酸ハイブリダイゼーション法、RT-PCR法、リアルタイムPCR法、サブトラクション法、ディファレンシャル・ディスプレイ法、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーション法、次世代シーケンス解析法(パイロシーケンス、Sequencing by Ligationなどを利用した高速シーケンス)ならびにクロスハイブリダイゼーション法など公知の方法を用いて測定することができる。

【0070】

なお、本発明において、指標とするマーカー遺伝子の「発現量」は、その物理的な量に限定されず、これを間接的に示す活性やシグナル強度等も含む。

【0071】

工程3)

工程3)における評価は、特定のマーカー遺伝子について個別に評価して行うことも可能であるが、複数のマーカー遺伝子について、その発現量の相違を総合的に評価(発現プロファイル解析)して行うことが好ましい。例えば、健常人血清に対する検体中のマーカー遺伝子群の発現プロファイルが、IgG4関連疾患患者血清における発現プロファイルと類似している場合、当該患者はIgG4関連疾患に罹患している可能性が高いと予測される。また、個々の患者について、該マーカー遺伝子の発現変動を経時的に観察すれば、該患者の病態、予後を評価(予測)することができる。

【0072】

さらに、データが蓄積され、各マーカー遺伝子において診断の目安となる所定の基準値(閾値)が決定されれば、その基準値との比較結果に基づいて当該被験者がIgG4関連疾患に罹患しているか否か、病態が回復に向かっているかどうか等を評価することができる。

【0073】

10

20

30

40

50

4.2 マーカー蛋白質を利用した診断方法

本発明のマーカー蛋白質を利用した診断方法は、例えば、以下の工程1)~3)の工程により実施できる。

- 1) 単離された検体(例えば、末梢血)中のポリペプチドを固相化する;
- 2) 上記固相化ポリペプチドにおける、本発明の各マーカー蛋白質の発現量を該マーカー蛋白質に特異的に結合する抗体を用いて検出する;
- 3) 上記各マーカー蛋白質の発現量に基づき、当該被験者のIgG4関連疾患の罹患あるいは病態を評価する。

【0074】

上記のような方法のほか、ピアコアのような分子間相互作用を利用した解析法を用いて、検体中のマーカー蛋白質を検出(測定)してもよい。

10

【0075】

工程1)

工程1)において、単離された検体(例えば、末梢血や血清)は、必要に応じて高速遠心を行うことにより不溶性の物質を除去した後、以下のようにELISA/RIA用試料やウエスタンブロット用試料として調製する。

【0076】

ELISA/RIA用試料は、例えば、回収した血清をそのまま使用するか、緩衝液で適宜希釈したものをを用いる。ウエスタンブロット用(電気泳動用)試料は、例えば、心筋組織細胞抽出液をそのまま使用するか、緩衝液で適宜希釈して、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動用の2-メルカトルエタノールを含むサンプル緩衝液(シグマ社製等)と混合したものをを用いる。ドット/スロットブロット用試料は、例えば、回収した心筋組織細胞抽出液そのもの、又は緩衝液で適宜希釈したものを、プロットング装置を使用する等して、直接メンブレンへ吸着させたものをを用いる。

20

【0077】

上記のようにして得られた試料中のポリペプチドを特異的に検出するため、該ポリペプチドを固相化する。ウエスタンブロット法、ドットブロット法又はスロットブロット法に用いられる固相としては、ニトロセルロースメンブレン(例えば、バイオラッド社製等)、ナイロンメンブレン(例えば、ハイボンド-ECL(アマシャム・ファルマシア社製)等)、コットンメンブレン(例えば、プロットアブソベントフィルター(バイオラッド社製)等)又はポリビニリデン・ジフルオリド(PVDF)メンブレン(例えば、バイオラッド社製等)等が挙げられる。

30

【0078】

電気泳動後のゲルからメンブレンにポリペプチドを移す、いわゆるプロットング方法としては、ウェット式プロットング法(CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY volume 2 ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober)、セミドライ式プロットング法(上記CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY volume 2 参照)等を挙げることができる。ドットブロット法やスロットブロット法のための器材は市販のもの(例えば、バイオ・ドット(バイオラッド)等)を用いることができる。

【0079】

一方、ELISA/RIA法で検出・定量を行うためには、専用の96穴プレート(例えば、イムノプレート・マキシソープ(ヌンク社製)等)に試料又はその希釈液(例えば、0.05%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水(以下「PBS」という)で希釈したもの)を入れて4~室温で一晩、又は37℃で1~3時間静置することにより、ウエル底面にポリペプチドを吸着させて固相化する。

40

【0080】

工程2)

工程2)において、マーカー蛋白質発現量は、抗原抗体反応を利用した免疫学的方法を用いて測定することができる。

【0081】

50

免疫学的方法としては、例えば、免疫沈降法や、ウエスタンブロット法、ドットブロット法、スロットブロット法、ELISA法、及びRIA法を含む固相免疫法あるいはこれらに改変を加えた公知の変法（サンドイッチELISA、US Patent No.4202875記載の方法、Meagerらの方法（Meager A., Clin Exp Immunol. 2003 Apr, 132(1), p128-36）等）を挙げることができる。すなわち、これらの方法に基づき、マーカー蛋白質と特異的に結合する抗体を用いてマーカー蛋白質発現量を測定する。

【0082】

抗体は、必要に応じて標識してもよい。標識は、抗体を直接標識するか、又は該抗体を一次抗体とし、該一次抗体を特異的に認識する（抗体を作製した動物由来の抗体を認識する）標識二次抗体と協同で用いてもよい。前記標識の種類として好ましいものは、酵素（アルカリホスファターゼ又は西洋ワサビペルオキシダーゼ）又はビオチン（ただし二次抗体のビオチンにさらに酵素標識ストレプトアビジンを結合させる操作が加わる）であるが、これらに限定されない。標識二次抗体（又は標識ストレプトアビジン）としては、予め標識された抗体（又はストレプトアビジン）が、各種市販されている。なお、RIAの場合は¹²⁵I等の放射性同位元素で標識された抗体を用い、測定は液体シンチレーションカウンター等を用いて行う。

10

【0083】

これら標識された酵素の活性を検出することにより、抗原の発現量が測定される。アルカリホスファターゼ又は西洋ワサビペルオキシダーゼで標識する場合、これら酵素の触媒により発色する基質や発光する基質が市販されている。

20

【0084】

発色する基質を用いた場合、ウエスタンブロット法やドット/スロットブロット法を利用すれば、目視で検出できる。ELISA法では、市販のマイクロプレートリーダーを用いて各ウェルの吸光度（測定波長は基質により異なる）を測定し、定量することが好ましい。また上述の抗体作製に使用した抗原の希釈系列を調製し、これを標準抗原試料として他の試料と同時に検出操作を行い、標準抗原濃度と測定値をプロットした標準曲線を作成することにより、他の試料中の抗原濃度を定量することも可能である。

【0085】

一方、発光する基質を使用した場合は、ウエスタンブロット法やドット/スロットブロット法においては、X線フィルム又はイメージングプレートを用いたオートラジオグラフィや、インスタントカメラを用いた写真撮影により検出することができる。また、デンシトメトリーやモレキュラー・イメージャーF xシステム（バイオラッド社製）等を利用した定量も可能である。さらに、ELISA法で発光基質を用いる場合は、発光マイクロプレートリーダー（例えば、バイオラッド社製等）を用いて酵素活性を測定する。

30

【0086】

なお、本発明において、指標とするマーカー蛋白質の「発現量」は、その物理的な量に限定されず、これを間接的に示す活性、力価（抗体価等）も含む。

【0087】

工程3)

工程3)における評価は、特定のマーカー蛋白質について個別に評価して行うことも可能であるが、複数のマーカー蛋白質について、その発現量の相違を総合的に評価して行うことが好ましい。例えば、健常人血清に対する検体中のマーカー蛋白質群の発現プロファイルが、IgG4関連疾患患者血清における発現プロファイルと類似している場合、当該患者はIgG4関連疾患に罹患している可能性が高いと予測される。また、個々の患者について、マーカー蛋白質の発現変動を経時的に観察すれば、当該患者の病態、予後を評価（予測）することができる。

40

【0088】

さらに、データが蓄積され、各マーカー蛋白質において診断の目安となる所定の基準値（閾値）が決定されれば、その基準値との比較結果に基づいて当該被験者がIgG4関連疾患に罹患しているか否か、病態が回復に向かっているかどうか等を評価することができる。

50

【 0 0 8 9 】

以上、マーカー遺伝子とマーカー蛋白質を利用した診断方法をそれぞれ別個に説明したが、本発明の診断は、両者の結果を比較解析して行ってもよい。また、本発明の診断方法は、すでに公知となっている病理診断の結果を踏まえて評価することを除外するものではない。

【 0 0 9 0 】

5 . IgG4関連疾患の診断用試薬、キット

本発明はまた、IgG4関連疾患の診断用試薬又はキットを提供する。本発明のキットは、例えば、以下の1)～4)の1又は2以上を含む：

- 1) 表1及び表2に記載の遺伝子群から選ばれる遺伝子に特異的にハイブリダイズし、当該遺伝子を増幅するためのプライマー
- 2) 表1及び表2に記載の遺伝子群から選ばれる遺伝子に特異的にハイブリダイズし、当該遺伝子を検出するためのプローブ
- 3) 表1及び表2に記載の遺伝子群から選ばれる遺伝子に特異的にハイブリダイズし、当該遺伝子を検出するためのプローブを固定した固相化試料
- 4) 蛋白質シンボルCLUS、ALTA、PEDF、DCD、及びSAA4からなる群から選ばれる蛋白質に特異的に結合する抗体、リガンド、又は受容体。

【 0 0 9 1 】

1) マーカー遺伝子増幅用プライマー

プライマーは、本発明のマーカー遺伝子の特異的に増幅するため、当該遺伝子の少なくとも一部に相補的な配列を有する5～30塩基長の連続したオリゴヌクレオチドである。本発明のマーカー遺伝子の配列情報は、公共のデータベースであるGenBankやUnigeneに公表されている。プライマーは各マーカー遺伝子の塩基配列に基づき、市販のプライマー設計ソフトを用いるなど、常法にしたがい容易に設計し、増幅させて調製することができる。このようなプライマーの例としては、後述する実施例記載のオリゴヌクレオチドプライマーを挙げることができる。

【 0 0 9 2 】

プライマーは、適当な標識によりラベル(例えば、酵素標識、放射性標識、蛍光標識等)されていてよく、またビオチン、リン酸、アミン等により修飾されていてよい。

【 0 0 9 3 】

2) マーカー遺伝子検出用プローブ

プローブは、マーカー遺伝子に特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、20～1500塩基長程度のものが好ましい。具体的には、ノーザンハイブリダイゼーション法であれば、20塩基長程度の1本鎖オリゴヌクレオチドか2本鎖DNAが好適に用いられる。また、マイクロアレイであれば、100～1500塩基長程度の2本鎖DNA、又は20～100塩基長程度の1本鎖オリゴヌクレオチドが好適に用いられる。Affimetrix社のGene Chipシステムの場合は、25塩基長程度の1本鎖オリゴがよい。これらは、特に遺伝子の3'非翻訳領域に存在する配列特異性が高い部分に特異的にハイブリダイズするプローブとして設計することが好ましい。

【 0 0 9 4 】

マーカー遺伝子検出用プローブは、適当な標識によりラベル(例えば、酵素標識、放射性標識、蛍光標識等)されていてよく、ビオチン、リン酸、アミン等により修飾されていてよい。また、ガラス板、ナイロンメンブレン、マイクロビーズ、シリコンチップ等の適当な固定されていてよい。

【 0 0 9 5 】

3) 固相化試料

固相化試料は、前記2)記載のプローブをガラス板、ナイロンメンブレン、マイクロビーズ、シリコンチップ等の固相に固定することにより作製される。このような固相化試料としては、例えば、遺伝子チップ、cDNAアレイ、オリゴアレイ、メンブレンフィルター等を挙げることができる。

【0096】

4) 抗体、リガンド、受容体

マーカー蛋白質に結合する抗体は、本発明のマーカー蛋白質のアミノ酸配列又はその部分配列(エピトープペプチド)にもとづき、常法にしたがって作製できる。

【0097】

抗体は、適当な標識によりラベル(例えば、酵素標識、放射性標識、蛍光標識等)されていてもよいし、ビオチン等により適当に修飾されていてもよい。また、適当な支持体に固相化されていてもよいし、あるいは固相化可能なように別個に支持体がキットに含まれていてもよい。そのような支持体としては、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリブチレン、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリアクリルアミド等の蛋白質を付着可能な合成樹脂、ガラス、ニトロセルロース、セルロース、及びアガロース製の支持体、あるいはゲル型支持体を使用することができる。支持体の形態は特に限定されないが、極小球あるいはビーズ(例えば“ラテックス”ビーズ)などの微粒子、微量遠心チューブなどのチューブ(内壁)、マイクロタイタープレート(ウェル)等の形態で提供される。

10

【0098】

マーカー蛋白質に結合するリガンド、受容体は、ピアコアなどの分子間相互作用を用いた解析法で用いられる特異的結合分子で、当該蛋白質について、公知の受容体あるいはリガンドが存在すれば、そのような分子を用いることができる。

【0099】

本発明のキットは上記した構成要素のほか、必要に応じて、ハイブリダイゼーション、プローブの標識、ラベル体の検出等、本発明にかかる診断方法に必要な試薬、二次抗体等を適宜含んでいてもよい。

20

【0100】

6. IgG4関連疾患の診断プログラム、診断システム

本発明は、本発明のIgG4関連疾患の検査方法を実施するためのプログラムや当該プログラムを用いた診断システムも提供する。

【0101】

本発明プログラムやシステムは、

1) 被験者から単離された検体における、表1と表2記載の遺伝子群、及び/又は蛋白質シンボルCLUS、ALTA、PEDF、DCD、及びSAA4からなる蛋白質群の発現量を入力する手段と

30

2) 予め入力されたIgG4関連疾患患者および健常人の前記遺伝子群、及び/又は蛋白質群の発現量に関するデータを記憶する手段と、

3) 前記被験者における前記遺伝子群、及び/又は蛋白質群の発現量と前記健常人における前記遺伝子群、及び/又は蛋白質群の発現量を比較解析する手段と、

4) 前記解析結果に基づき、当該被験者がIgG4関連疾患の罹患あるいは病態を評価する手段と、

5) 前記評価結果を出力する手段、を有する。

【0102】

1つの実施形態では、前記3)において、前記被験者の前記マーカー遺伝子(前記マーカー蛋白質)の発現量と、健常人における当該遺伝子(蛋白質)の発現量との発現比を求め、前記発現比を記憶手段に予め記憶されているIgG4関連疾患患者および健常人の発現量と比較解析する。この比較解析は、当該分野で公知の機械学習のアルゴリズムを用いて実施できる。

40

【0103】

本発明のプログラムは、前述した手段に加えて、前記被験者の前記マーカー遺伝子(前記マーカー蛋白質)の発現量を記憶し、必要に応じて、前記IgG4関連疾患患者および健常人のデータを更新する手段を有していることが好ましい。

【0104】

本発明のシステムでは、IgG4関連疾患患者および健常者の発現データを臨床情報と合わ

50

せてデータベースとして蓄えておき、被験者の発現データをデータベースを参照して解析することで、被験者のIgG4関連疾患の状態を検査することが好ましい。IgG4関連疾患患者および健常者の発現データをコンピューターにあらかじめ学習させておき、被験者の発現データが患者と健常者のどちらの発現パターンに近いかをコンピューターに判断させ、それによって被験者の罹患の有無や病態を評価する。

【0105】

7. IgG4関連疾患の治療用組成物

IgG4関連疾患患者において健常人よりも発現が低下している本発明のマーカー遺伝子やマーカー蛋白質は、IgG4関連疾患の治療に利用できる可能性がある。

【0106】

例えば、当該遺伝子の全オープンリーディングフレーム配列を、公知の方法に従い、IgG4関連疾患患者に導入・発現させることにより、該遺伝子の発現不足による病態を治療できる可能性がある。同様の効果は、当該遺伝子がコードする本発明のマーカー蛋白質をIgG4関連疾患患者に導入することによっても期待しうる。

【0107】

また、IgG4関連疾患患者において健常人よりも発現が増加している本発明のマーカー遺伝子は、アンチセンス、リボザイム、siRNA等の方法により当該遺伝子の発現を抑制することにより、当該遺伝子の発現過剰による病態を治療できる可能性がある。同様の効果は、当該遺伝子がコードする本発明のマーカー蛋白質を特異的に認識・中和する抗体分子、該蛋白質のドミナントネガティブ体又は当該蛋白質の活性を特異的に阻害する物質等を、IgG4関連疾患患者に導入することによっても期待しうる。

【0108】

7.1 遺伝子導入によるIgG4関連疾患の治療

IgG4関連疾患患者において健常人よりも発現が低下しているマーカー遺伝子の全オープンリーディングフレーム配列を組換えベクター (gene transfer vector) に挿入し、筋細胞で発現させることにより、IgG4関連疾患患者における当該遺伝子の発現低下を正常状態に回復できる可能性がある。

【0109】

7.2 蛋白質投与によるIgG4関連疾患の治療

IgG4関連疾患患者において健常人よりも発現が低下しているマーカー遺伝子がコードする蛋白質を患者に投与することにより、IgG4関連疾患の治療できる可能性がある。

【0110】

マーカー蛋白質は、公知の方法に従って、薬学的に許容される担体あるいは希釈剤と混合され、薬学的に有用な組成物に製剤化することができる。前記薬学的組成物は、一又は複数の治療的に有効な量の前記ポリペプチドを含んでなる。適当な担体、及び希釈剤については、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences等に記載されている。

【0111】

前記蛋白質に関して、投与に適した剤型は特に限定はされないが、既に医薬として使用されている多くのヒト蛋白質を含む薬学的組成物と同様に注射剤として調製されることが好ましい。より具体的に言えば、ポリペプチドを、水、生理食塩水、等張化した緩衝液等の適当な溶媒に溶解することで注射剤とする。その際、ポリエチレングリコール、グルコース、各種アミノ酸、コラーゲン、アルブミン等を保護材として添加して調製可能である。また、リボソーム等の封入体にポリペプチドを包埋させて投与することも可能である。

【0112】

7.3 遺伝子の発現抑制によるIgG4関連疾患の治療

IgG4関連疾患患者において健常人よりも発現が増加しているマーカー遺伝子の翻訳を、アンチセンス核酸、リボザイム又はsiRNAを用いて阻止し、IgG4関連疾患患者における該遺伝子の発現上昇を正常状態に回復させることができる。

【0113】

8. IgG4関連疾患の治療又は予防剤としての効果を試験する方法

10

20

30

40

50

本発明のマーカー遺伝子を利用することにより、多数の被検物質から、IgG4関連疾患の治療又は予防剤としての可能性を有する物質を機能的に同定することができる。前記方法において、被検物質は(1)本発明のマーカー遺伝子の発現を亢進又は抑制させたときに現れる表現型の変化、あるいは、(2)ヒトIgG4関連疾患病態を反映した培養細胞又はモデル動物におけるマーカー遺伝子やマーカー蛋白質の発現量を指標として評価される。マーカー遺伝子やマーカー蛋白質は、元々細胞中に存在する内在性のものを利用してよいし、人為的に導入した外来性のものを利用してよい。以下、これらの試験方法について、具体的に説明する。

【0114】

8.1 レポーター遺伝子を指標とした方法

IgG4関連疾患関連遺伝子(IgG4関連疾患の病態依存的に発現が促進される遺伝子)のプロモーター支配下に、プロモーター活性の検出を可能にする遺伝子(以下「レポーター遺伝子」という)を組み込んだ発現プラスミドを作製する。次いで、

(i)上記レポーター遺伝子発現プラスミドと、本発明のマーカー遺伝子を哺乳類細胞で発現可能にした組換えベクターを同時トランスフェクションした群、

(ii)上記レポーター遺伝子発現プラスミドと、本発明のマーカー遺伝子を含まない上記組換えベクターを同時トランスフェクションした群、

の2つの細胞群を作製する。IgG4関連疾患の治療又は予防剤としての可能性は、各群の細胞培養時に被検試料を添加し、上記各群のレポーター遺伝子の発現量に差異が現れるか否かによって評価することができる。例えば、本発明のマーカー遺伝子によってコードされるマーカー蛋白質の産生が促進されるような条件下で、レポーター遺伝子の発現を強く抑制する被検試料は、IgG4関連疾患の治療又は予防剤として有用な可能性が高い。

【0115】

前記試験方法で用いられる動物細胞は、本発明のマーカー遺伝子を哺乳類細胞で発現可能にする組換えベクターをトランスフェクションした場合に、レポーター遺伝子の発現量が亢進するものでなければならない。また、(i)群における該レポーター遺伝子の発現量と(ii)群における発現量の差が大きいものほど好ましい。

【0116】

レポーター遺伝子は、宿主細胞が本試験方法の一連の過程において産生し得る他のいかなる蛋白質とも特異的に区別可能な、レポーター蛋白質をコードするものであればよい。好ましくは、形質転換前の細胞がレポーター蛋白質と同一又は類似の蛋白質をコードする遺伝子を持たないようなものがよい。例えば、レポーター蛋白質が該細胞に対して毒性を有するようなものや、該細胞が感受性を有する抗生物質の耐性を付与するものであるような場合でも、レポーター遺伝子の発現の有無は細胞の生存率で判定することが可能である。しかしながら、本発明で用いられるレポーター遺伝子としてより好ましいものは、発現量を特異的かつ定量的に検出することができる(例えば、レポーター遺伝子にコードされる蛋白質に対する特異的抗体が取得されているような)構造遺伝子である。より好ましくは、外来の基質と特異的に反応することにより定量的測定が容易な代謝産物を生じるような酵素等をコードする遺伝子である。そのようなレポーター遺伝子としては、例えば、以下の蛋白質をコードする遺伝子を例示することができる。

a) クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ:

b) ホタルルシフェラーゼ:

c) -ガラクトシダーゼ:

d) 分泌型アルカリホスファターゼ:

e) 緑色蛍光蛋白質(green-fluorescent protein):

【0117】

以上のような、一過的な遺伝子導入法を利用した試験方法とは別に、レポーター遺伝子、及び本発明のマーカー遺伝子の発現ベクターで、宿主細胞を二重に形質転換した細胞を利用した試験方法も採択可能である。

【0118】

10

20

30

40

50

上記したような細胞を培養すると、マーカー遺伝子の発現依存的にレポーター遺伝子の転写が促進される。したがって、レポーター遺伝子の発現が可能な条件下において、培地中に任意の被検物質を添加した場合と添加しない場合でのレポーター遺伝子の発現量変化をみれば、該被検物質のIgG4関連疾患の治療又は予防剤としての効果が評価できる。

【0119】

8.2 培養細胞における表現型の変化を指標とした方法

適当な細胞に、本発明のマーカー遺伝子を強制発現させるか、本発明のマーカー蛋白質を外部から作用させる。これによって現れる、IgG4関連疾患につながると考えられる表現型の変化を確認し、その変化を指標として、IgG4関連疾患の治療又は予防剤として有用な物質として評価することができる。なお、表現型の変化としては、例えば、IgG4関連疾患病態関連遺伝子の発現変動、細胞の形態変化、総蛋白質の変化等を挙げることができる。

10

【0120】

8.3 トランスジェニック動物における表現型の変化を指標とした方法

本発明のマーカー遺伝子を導入したトランスジェニック動物（例えば、マウス等）を作製し、高発現させることにより、ヒトIgG4関連疾患に類似した変化が現れれば、該動物を利用してIgG4関連疾患の治療や予防に有用な物質を探索することができる。あるいは、本発明のマーカー遺伝子に対するリボザイムやsiRNAを動物に導入して、ヒトIgG4関連疾患に類似した変化が惹起できれば、この動物を利用して、IgG4関連疾患の治療や予防に有用な物質を探索することができる。なお、本発明のマーカー遺伝子はヒト由来の遺伝子であるため、前記トランスジェニック動物の作製にあたっては、例えばマウスであれば、該遺伝子のマウスオソログを取得してこれを導入することになる。

20

【0121】

前記試験は、本発明のマーカー蛋白質やその抗体を直接動物に導入することによっても、実施することが期待できる。

【0122】

なお、5.に記載した「IgG4関連疾患診断用試薬、キット」は、上記したIgG4関連疾患の治療又は予防効果試験用の試薬やキットとしても利用できる。

【実施例】

【0123】

以下、実施例を用いて、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

30

【0124】

実施例1：IgG4関連疾患患者末梢血リンパ球におけるトランスクリプトーム解析

IgG4関連疾患患者末梢血リンパ球におけるmRNA量を網羅的に解析し、病態関連遺伝子群の検索、及び疾患特異的なマーカーの検索を行なった。

【0125】

1.材料及び方法

(1) 試料の調製 (RNAの抽出)

IgG4関連疾患患者2人の治療前後と健常人4人の末梢血を採取し、末梢血単核球をLympho prepを用いて分離した。分離した末梢血単核球をRneasy Plus Miniを用いてRNAを抽出した。

40

【0126】

(2) DNA microarray

抽出したRNAからAmbion WT Expression Kitを用いてcDNAを作製し、GeneChip WT Terminal Labeling and control kitを用いて断片化し、ラベルした。チップはAffymetrix社GeneChip Human Gene 1.0 ST Arrayを用い、データ取得はAffymetrix社GeneChip Operating Softwareにより行なった。

【0127】

(3) データ解析

DNAマイクロアレイデータの解析はAgilent社GeneSpring version 11.0を利用した。

50

【 0 1 2 8 】

2 . マイクロアレイ解析による遺伝子の抽出

2 . 1 患者と健常人間で変動のあった遺伝子の抽出

患者2名における治療前後のデータ合計4セットと健常人4名分のデータを比較した。

まず、治療に関係なく患者と健常人間で発現の差が有意 (t -検定 $p>0.05$) で、かつ、1.5倍以上のFold Changeを満たす遺伝子群を候補遺伝子として抽出した (図 1)。参考として、Fold Changeを2倍及び3倍まで拡大したグラフを図 2 及び 3 に示す。抽出された遺伝子群を表 1 にまとめて示す ((A) FC 1.5以上2.0未満、 (B) FC 2.0以上3.0未満、 (C) FC 3.0以上)。

【 0 1 2 9 】

2 . 2 治療前後で変動のあった遺伝子の抽出

患者2名における治療前後のデータ合計4セットと健常人4名分のデータを比較した。

治療の前後において、3.0倍以上のFold Changeが2名の患者で共通して観察された遺伝子群と、K-means clusteringで治療前の患者でのみ変動が観察された遺伝子群を合わせて候補遺伝子として抽出した (図 4)。抽出された遺伝子群を表 2 にまとめて示す。

【 0 1 3 0 】

3 . リアルタイムPCRによるバリデーション

前項で抽出された遺伝子のうち、Charcot-Leyden crystal protein (CLC)、Defensin, alpha 3 (DEFA3)、Defensin, alpha 4 (DEFA4)、Interleukin 8 receptor, alpha (IL8RA, CXCR1)、Interleukin 8 receptor, beta (IL8RB, CXCR2)、Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (MS4A3) についてリアルタイムPCRにより発現変動をみた。

【 0 1 3 1 】

DNA microarrayに用いたIgG4関連疾患患者治療前後2人と健常人コントロール4人に加え、新たにIgG4関連疾患患者治療前後1人、治療前6人、健常人2人の末梢血単核球から、前項と同様の方法でRNAを抽出した。RNAからSensiscript RT kit、Oligo dT primerを用いてcDNAを作製した。

【 0 1 3 2 】

リアルタイムPCRはTaqMan gene expression assay、THUNDERBIRD Probe qPCR Mixを用い、ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems)にて行なった。リファレンス遺伝子には β -actinを使用し、検量線を用いた相対定量で評価した。用いたプライマーの製品情報を以下に記載する。また、結果を図 5 ~ 10 に示す。

【 0 1 3 3 】

リアルタイムPCRの結果はDNAマイクロアレイにより選抜された発現変動遺伝子の確認に成功した。一部は治療により発現が回復したが、残りは治療に反応して発現が回復することとはなかった。

【 0 1 3 4 】

プライマー情報 (Applied Biosystems) :

TaqMan(R) Gene Expression Assays, Inventoried

Assay ID: Hs00960994_m1

Category: Defense/immunity protein

Gene Name: membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (hematopoietic cell-specific)

Gene Group: Immunoglobulin receptor family member

Qty/Pkg: 250 uL Part Number: 4331182

【 0 1 3 5 】

TaqMan(R) Gene Expression Assays, Inventoried

Assay ID: Hs00414018_m1

Category: Defense/immunity protein

Gene Name: defensin, alpha 3, neutrophil-specific; defensin, alpha 1; defensin,

10

20

30

40

50

alpha 1

Gene Group: Other defense and immunity protein

Qty/Pkg: 250 uL Part Number: 4331182

【 0 1 3 6 】

TaqMan(R) Gene Expression Assays, Inventoried

Assay ID: Hs00157252_m1

Category: Defense/immunity protein

Gene Name: defensin, alpha 4, corticostatin

Gene Group: Other defense and immunity protein

Qty/Pkg: 250 uL Part Number: 4331182

10

【 0 1 3 7 】

TaqMan(R) Gene Expression Assays, Inventoried

Assay ID: Hs00174146_m1

Category: Receptor

Gene Name: interleukin 8 receptor, alpha

Gene Group: G-protein coupled receptor

Qty/Pkg: 250 uL Part Number: 4331182

【 0 1 3 8 】

TaqMan(R) Gene Expression Assays, Inventoried

Assay ID: Hs00174304_m1

Category: Receptor

Gene Name: interleukin 8 receptor, beta

Gene Group: G-protein coupled receptor

Qty/Pkg: 250 uL Part Number: 4331182

20

【 0 1 3 9 】

TaqMan(R) Gene Expression Assays, Inventoried

Assay ID: Hs00171342_m1

Category: Molecular function unclassified

Gene Name: Charcot-Leyden crystal protein

Gene Group: Molecular function unclassified

Qty/Pkg: 250 uL Part Number: 4331182

30

【 0 1 4 0 】

実施例 2 : IgG4関連疾患の診断治療に関するタンパクの解析

IgG4関連疾患の診断治療のための疾患関連マーカー蛋白質を特定するため、「治療前」及び「治療後」の患者血清中蛋白質をプロテオミクスの手法により解析した。

【 0 1 4 1 】

1 . 二次元電気泳動による蛋白質の発現解析

IgG4関連疾患の「治療前」及び「治療後」の血清中蛋白質を二次元電気泳動により展開した。二次元電気泳動した蛋白質は、銀染色により呈色させ、「治療前」及び「治療後」に変動したスポットをピックアップし、in gel消化法により処理した。in gel消化法により得られたペプチドを、質量分析装置で解析し、蛋白質を同定した。

40

【 0 1 4 2 】

実験方法 :

1) 等電点電気泳動

患者血清 5.0 mlに10倍量の冷アセトンを加えて、1 hr、-20 で静置した。12000 rpm、r=10 cmで4 minで遠心し、蛋白質を沈殿させた。アセトンの量は、対象物の液量の10倍程度を用いた。

【 0 1 4 3 】

デカンテーションでアセトンを除去し、スピードバックにより減圧乾燥した。タンパク沈殿物にlysis buffer (112.5 μl)と 膨潤buffer (337.5 μl)を加えて総量450 μlとした

50

。

ゲルは、Ph3-10 Immobililine Drystrip gel (24cm) (Gelife Science)を用い、前記した450 μ lの蛋白質溶液を加え、GE healthcareのプロトコールにしたがい等電点電気泳動を行った。

【0144】

2) SDS-PAGE (二次元目の電気泳動)

等電点電気泳動の終了後、ゲルを水洗し、10mg/mlのDTT添加平衡化Bufferに浸漬して、室温で30分静置し、ジスルフィド結合を開裂させた。ついで、25mg/mlのヨードアセトアミド添加平衡化バッファーに浸漬して、室温の暗所で30分静置し、ジスルフィド結合の開裂部分をカルバミド修飾した。ゲルをSDS-PAGE用のゲル(アクリルアミド濃度12.5%)に装着し、分子量マーカーを封入したゲルとともにアガロースゲルで固め、GE healthcareのプロトコールにしたがい、電気泳動を行った(展開距離20 cm)。電気泳動終了後、銀染色で呈色させた。

10

【0145】

3) 銀染色

電気泳動の終了後、Bio RadのDodeca kitを用いて銀染色を行った。銀染色の方法は、すべてBio Radのプロトコールに拠った。

【0146】

4) 変動蛋白質の選定

「治療前」と「治療後」のゲル画像を比較し、変動した蛋白質を選定した。変動したスポットの質量分析により解析した。

20

【0147】

結果：

IgG4関連疾患治療前の血清では、IgG1、IgG4、Ig lambda、Ig kappaの増加、Alpha-1-antitrypsin precursor、Apolipoprotein-L1、Complement 4、C1q、Serum amyloid A protein precursorなどの炎症性因子の増加がみられた。また、健常人と比べても異なるパターンがみられた。

特に発現が有意に変動した蛋白質は、Alpha-1-antitrypsin precursor (ALTA)、Clusterin precursor (CLUS)、Dermcidin precursor (DCD)、Serum amyloid A-4 protein precursor (SAA4)、Pigment epithelium-derived factor precursor (PEDF)であった。

30

【0148】

2. ウェスタンブロットによるバリデーション

ウェスタンブロットにより、上記で特定された蛋白質のうち、Clusteringと 1 antitrypsinのバリデーションを行った。

【0149】

実験方法：

1) SDS-PAGE：電気泳動により分子量の差で蛋白質を分離。

常法にしたがい均一ゲルを調製し、IgG4関連疾患患者血清試料タンパク量 4 μ gをPBSで溶解したものを載せた。2 \times SDS buffer 10 μ Lを加え、95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱後、氷冷した。その後、コールドルームで電気泳動を行った(ゲル1枚あたり30mA、250V、2時間)。

40

【0150】

2) プロットティング：分離された蛋白質をゲルからメンブレンへトランスファー

メタノールで前処理したPVDF膜(Hyoid-P)・ろ紙をトランスファーバッファー(Tris-Glycin Buffer + メタノール + DW)で10分間、平衡化させた。セミドライ式プロットティング装置を組み立て、メンブレン1枚あたり30mA、250V、2時間トランスファーさせた。

【0151】

3) ブロッキング：非特異的な吸着防止

プロットティング済みメンブレンをブロッキングバッファー(5%スキムミルク + PBS-0.1% Tween)に浸し、室温で1時間振盪した。

【0152】

50

4) 1次抗体反応：目的蛋白質を特異的に検出

ハイブリバッグにメンブレンを移し、1000倍希釈した1次抗体を加え、overnightで振盪した後、PBS-0.1%Tweenで5分間、3回洗浄した。

【0153】

5) 2次抗体反応：HRP標識二次抗体

25000倍希釈したHorse-Radish Peroxidase標識2次抗体(anti Mouse IgG , HRP linked Whole Ab from sheep)を加え、1時間振盪した後、PBS-0.1%Tweenで5分間、5回洗浄した。

【0154】

6) 検出

洗浄済みのメンブレンの余分なバッファーを除去し、ECL plus ウェスタンブロッティングシステム試薬をかけ、5分間放置した。検出試薬を除去し、X線フィルムに感光させ、検出を行った。結果を図11～14に示す。

【0155】

結果：

Clustering (precursor) と 1 antitrypsin (precursor) は、いずれも患者（治療前）において健常人よりも有意に高い発現が確認された。

【0156】

【表 1】

(1) 健常人に比較して患者で発現が上昇した遺伝子群

Gene Symbol	Gene description	Genbank ID	Transcripts Cluster Id
(A) Fold Change 3.0以上			
NR4A2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	BC009288	8065962
AREG LOC727738	amphiregulin (schwannoma-derived growth factor) similar to Amphiregulin precursor (AR) (Colorectum cell-derived growth factor) (CRDGF)	BC009799	8095744
AREG LOC727738	amphiregulin (schwannoma-derived growth factor) similar to Amphiregulin precursor (AR) (Colorectum cell-derived growth factor) (CRDGF)	BC009799	8095736
UNQ9364	FLFF9364	AY358259	8116992
NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	C78579	8156848
PER1	period homolog 1 (Drosophila)	AF022991	8012349
THBS1	thrombospondin 1	AK291639	7982597
RGS1	regulator of G-protein signaling 1	EC015510	7908388
SNORD3A SNORD3B-1 SNORD3B-2 SNORD3C SNORD3D	small nucleolar RNA, C/D box 3A small nucleolar RNA, C/D box 3B-1 small nucleolar RNA, C/D box 3B-2 small nucleolar RNA, C/D box 3C small nucleolar RNA, C/D box 3D		8005547
SNORD3A SNORD3B-1 SNORD3B-2 SNORD3C SNORD3D	small nucleolar RNA, C/D box 3A small nucleolar RNA, C/D box 3B-1 small nucleolar RNA, C/D box 3B-2 small nucleolar RNA, C/D box 3C small nucleolar RNA, C/D box 3D		8013329
SNORD3A SNORD3B-1 SNORD3B-2 SNORD3C SNORD3D	small nucleolar RNA, C/D box 3A small nucleolar RNA, C/D box 3B-1 small nucleolar RNA, C/D box 3B-2 small nucleolar RNA, C/D box 3C small nucleolar RNA, C/D box 3D		8013325
SNORD3A SNORD3B-1 SNORD3B-2 SNORD3C SNORD3D	small nucleolar RNA, C/D box 3A small nucleolar RNA, C/D box 3B-1 small nucleolar RNA, C/D box 3B-2 small nucleolar RNA, C/D box 3C small nucleolar RNA, C/D box 3D		8013323
SNORD3A SNORD3B-1 SNORD3B-2 SNORD3C SNORD3D	small nucleolar RNA, C/D box 3A small nucleolar RNA, C/D box 3B-1 small nucleolar RNA, C/D box 3B-2 small nucleolar RNA, C/D box 3C small nucleolar RNA, C/D box 3D		8005553
IGHE	immunoglobulin heavy constant epsilon	AK130825	7981708
MOP-1		AB014771	8101322
SNORD75	small nucleolar RNA, C/D box 75		7922416
(B) Fold Change 2.0以上 3.0未満			
CD83		BC030830	8116983
SNF1LK	SNF1-like kinase	AB047788	8070665
FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	BC036724	8028693
SNORD56B	small nucleolar RNA, C/D box 56B		7975453
SNORD28	small nucleolar RNA, C/D box 28		7946904
TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	BC064689	8122265
SNORD78	small nucleolar RNA, C/D box 78		7922408
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3	BC040482	7926037
RNU5E	RNA, U5E small nuclear	M77839	7897801
ERMN	ermin, ERM-like protein	BC026345	8059969
JUN	jun oncogene	BC068522	7910609
CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3	M23452	8014369
DUSP10	dual specificity phosphatase 10	BC031405	7924450
ST100B	ST100 calcium binding protein B	BC001766	8071036
ZNF331	zinc finger protein 331	BC009433	8030999
SNORA4 EIF4A2	small nucleolar RNA, H/ACA box 4 eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	AB209021	8084708
SNORD79	small nucleolar RNA, C/D box 79		7922406
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3	BC060658	8018864
SNORD76 GAS5	small nucleolar RNA, C/D box 76 growth arrest-specific 5	BC038733	7922414
SNORD20	small nucleolar RNA, C/D box 20		8059710
ENC1	ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	AK096578	8112615
ND2	NADH dehydrogenase, subunit 2 (complex I)	AK074482	8165658
ELL2	elongation factor, RNA polymerase II, 2	BC028412	7921344
HIST1H3A HIST1H2BN HIST1H3D HIST1H3C HIST1H3E HIST1H3I HIST1H3G HIST1H3J HIST1H3H HIST1H3B HIST1H3F	histone cluster 1, H3a histone cluster 1, H2bn histone cluster 1, H3d histone cluster 1, H3c histone cluster 1, H3e histone cluster 1, H3i histone cluster 1, H3g histone cluster 1, H3j histone cluster 1, H3h histone cluster 1, H3b histone cluster 1, H3f	BC066245	8117330

10

20

30

40

SNORA30	small nucleolar RNA, H/ACA box 30		7994926	
HIST1H3E HIST1H2BN HIST1H3A HIST1H3D HIST1H3C HIST1H3E HIST1H3J HIST1H3G HIST1H3J HIST1H3H HIST1H3F	histone cluster 1, H3b histone cluster 1, H2bn histone cluster 1, H3a histone cluster 1, H3d histone cluster 1, H3c histone cluster 1, H3e histone cluster 1, H3i histone cluster 1, H3j histone cluster 1, H3g histone cluster 1, H3j histone cluster 1, H3h histone cluster 1, H3f	BC099630	8124388	
CCL4L1 CCL4L2 LOC728835	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 1 chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2 chemokine (C-C motif) ligand 4 similar to cytokine	AY766447 AY766446	8019651	
CCL4L1 CCL4L2 LOC728835	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 1 chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2 chemokine (C-C motif) ligand 4 similar to cytokine	AY766447 AY766446	8006621	
FLJ14107		BC013100 AK024169	8149718	
SNORA75	small nucleolar RNA, H/ACA box 75		8059708	
PPP1R15A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	U83981	8030128	10
JUND	jun D proto-oncogene	X56681	8035445	
SNORA67 EIF4A1	small nucleolar RNA, H/ACA box 67 eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1		8004508	
HIST1H2BM	histone cluster 1, H2bm	BC066244	8117594	
AXUD1	AXIN1 up-regulated 1	BC038949	8086330	
LGALS2	lectin, galactoside-binding, soluble, 2	CR456512	8075956	
ITGB3	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	U95204	8007931	
JUNB	jun B proto-oncogene	BC004250	8026047	
ITGA2B	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)	BC117443	8016044	
(C)Fold Change 1.5以上 2.0未満				
SNORA5A	small nucleolar RNA, H/ACA box 5A		8139482	
FOSL2	FOS-like antigen 2	BX647822	8041048	
DUSP5	dual specificity phosphatase 5	BC062545	7930413	
SNORA28	small nucleolar RNA, H/ACA box 28		7977075	
DUSP8	dual specificity phosphatase 8	BC038231	7945641	20
UNQ5814 ARID5A	RFVG5814 AT rich interactive domain 5A (MRF1-like)	AY358167 BC047390	8043830	
SNORD4A	small nucleolar RNA, C/D box 4A		8005953	
CCL4L1 CCL4L2 LOC728835	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 1 chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2 chemokine (C-C motif) ligand 4 similar to cytokine	AY766452 AY766446	8006608	
SNORA19	small nucleolar RNA, H/ACA box 19		7936637	
DUSP2	dual specificity phosphatase 2	BC007771	8053882	
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	AB209485	8119398	
RPPH1	ribonuclease P RNA component H1		7977507	
SNORD77	small nucleolar RNA, C/D box 77		7922412	
ELL2	elongation factor, RNA polymerase II, 2	BC023412	8113220	
OVOS2	ovostatin 2	BX647938	7953873	
BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3	BC064993	8029465	
IRS2	insulin receptor substrate 2	AF073310	7972745	
GNA15	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 15 (Gq class)	BC013585	8024572	30
GRASP	GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1)-associated scaffold protein	BC053666	7955578	
SNORA37	small nucleolar RNA, H/ACA box 37		8023392	
HIST1H2A HIST1H3H HIST1H2AK HIST1H2AJ HIST1H2AL HIST1H2AM HIST1H2AG HIST1H2BN HIST1H3A HIST1H3D HIST1H3C HIST1H3E HIST1H3I HIST1H3G HIST1H3J HIST1H3B HIST1H3J	histone cluster 1, H2ai histone cluster 1, H3h histone cluster 1, H2ak histone cluster 1, H2aj histone cluster 1, H2al histone cluster 1, H2am histone cluster 1, H2ag histone cluster 1, H2bn histone cluster 1, H3a histone cluster 1, H3d histone cluster 1, H3c histone cluster 1, H3e histone cluster 1, H3i histone cluster 1, H3g histone cluster 1, H3j histone cluster 1, H3b histone cluster 1, H3f	BC007518 BC112254 BC062305	8117583	
PIGT	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class T		8086528	
SNORD22 SNHG1	small nucleolar RNA, C/D box 22 small nucleolar RNA host gene (non-protein coding) 1	AK095849	7948896	
RNU11	RNA, U11 small nuclear		7899502	
NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	BC002601	7978644	
RELB	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (avian)	BC028013	8029580	40
UIMC1	ubiquitin interaction motif containing 1	AF284753 AK027429	8165703	
UIMC1	ubiquitin interaction motif containing 1	AF284753 AK027429	7911343	
SLC7A5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	AF104032	8003298	
SNORD49A	small nucleolar RNA, C/D box 49A		8005202	
HIST2H2AB	histone cluster 2, H2ab		7915642	
ATF4	activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)	D90209	8073148	

PTGER4	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	L28175	8105067
HIST1H2AM HIST1H2AJ HIST1H2AK HIST1H2AJ HIST1H2AL HIST1H2AG	histone cluster 1, H2am histone cluster 1, H2aj histone cluster 1, H2ak histone cluster 1, H2aj histone cluster 1, H2al histone cluster 1, H2ag	BC0032756	8124540
SNORA33	small nucleolar RNA, H/ACA box 33	AK096147	8122144
TMEM137	transmembrane protein 137	BC007641	7941707
SNORD37	small nucleolar RNA, C/D box 37		8032749
HIST2H3D HIST2H3C HIST2H3A	histone cluster 2, H3d histone cluster 2, H3c histone cluster 2, H3a		7919612
SNORA2B	small nucleolar RNA, H/ACA box 2B		7962329
CLK4	CDC-like kinase 4	BC063116	8116245
HIST1H2AH	histone cluster 1, H2ah	BC093849	8117543
CORO7 Magmas	coronin 7 mitochondria-associated protein involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor signal transduction	BC117289	7999120
OVOS LOC728715	ovostatin similar to hCG38149		7961026
OTUD1	OTU domain containing 1	AB188491	7926677
F5	coagulation factor V (proaccelerin, labile factor)	M16967	7922174
ICOSLG	inducible T-cell co-stimulator ligand	AB014553	8070720
FLJ10246		AK001108	8105144
SMAD1	SMAD family member 1	U59423	8097657
SCARNA12	small Cajal body-specific RNA 12		7960728
PPIF	peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	BC005020	7928589
HIST1H2AI HIST1H2AK HIST1H2AJ HIST1H2AL HIST1H2AM HIST1H2AG HIST1H3F	histone cluster 1, H2ai histone cluster 1, H2ak histone cluster 1, H2aj histone cluster 1, H2al histone cluster 1, H2am histone cluster 1, H2ag histone cluster 1, H3f	BC112254 BC062305	8117580
RBM38	RNA binding motif protein 38	AF432218	8083583
CCL4 CCL4L2 LOC728835 CCL4L1	chemokine (C-C motif) ligand 4 chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2 similar to cytokine chemokine (C-C motif) ligand 4-like 1	AY760446	8006602
HIST1H2BH	histone cluster 1, H2bh	BC096116	8117426
ZNF124	zinc finger protein 124	BC099661	7925691
ZBTB10	zinc finger and BTB domain containing 10	BC127098	8147040
C1orf63	chromosome 1 open reading frame 63	AK292532	7913824
SNORA70 RPL10	small nucleolar RNA, H/ACA box 70 ribosomal protein L10	AK027197	8170863
SNORA38	small nucleolar RNA, H/ACA box 38		8118207
SNORD62A SNORD62B	small nucleolar RNA, C/D box 62A small nucleolar RNA, C/D box 62B		8158864
SNORD62A SNORD62B	small nucleolar RNA, C/D box 62A small nucleolar RNA, C/D box 62B		8158862
JMY	junction-mediating and regulatory protein	BC130624	8106516
RPL7A SNORD36C SNORD36A	ribosomal protein L7a small nucleolar RNA, C/D box 36C small nucleolar RNA, C/D box 36A	BX641050	8158998
HIST2H3A HIST2H3C HIST2H3D	histone cluster 2, H3a histone cluster 2, H3c histone cluster 2, H3d	BC074969	7919614
HERPUD1	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain	BC008320	7995895
HIST2H3A HIST2H3C HIST2H3D	histone cluster 2, H3a histone cluster 2, H3c histone cluster 2, H3d	BC074969	7905085
TMEM2	transmembrane protein 2	AF137030	8161701
C20orf111	chromosome 20 open reading frame 111	BC064973	8066402
PLXND1	plexin D1	AY116661	8090591
RAPGEF1	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	AF467069	8164692
SNORD52 C6orf48	small nucleolar RNA, C/D box 52 chromosome 6 open reading frame 48		8118322
PROS1	protein S (alpha)	M15036	8089015
FAM133B	family with sequence similarity 133, member B	BC057771	8140942
HIST1H3F HIST1H3B HIST1H3A HIST1H3D HIST1H3C HIST1H3E HIST1H3I HIST1H3G HIST1H3J HIST1H3H HIST1H3B	histone cluster 1, H3f histone cluster 1, H3bn histone cluster 1, H3a histone cluster 1, H3d histone cluster 1, H3c histone cluster 1, H3e histone cluster 1, H3i histone cluster 1, H3g histone cluster 1, H3j histone cluster 1, H3h histone cluster 1, H3b	BC096131	8124437
TRA2A	transformer-2 alpha	AB052759 BC069011	8138592
CCRL2 LOC727811	chemokine (C-C motif) receptor-like 2 similar to chemokine (C-C motif) receptor-like 2	AF015525 AF014958	8079407
FAM133B	family with sequence similarity 133, member B	BC057771 BC062706	8055978
SNORD101 SNORA33	small nucleolar RNA, C/D box 101 small nucleolar RNA, H/ACA box 33	AK096147	8122142
MGC16384		BC009492	7967636

10

20

30

40

FAM133B FLJ11903	family with sequence similarity 133, member B similar to hypothetical protein MGC40405	BC090868 BC062706 BC017874 AK021965	8105504
STARD5	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 5	AK097024	7990839
ARID5A	AT rich interactive domain 5A (MRF1-like)	BC032488	8043621
RBM14 TMEM137	RNA binding motif protein 14 transmembrane protein 137	BC007641 AB209007	7941702
CMTM5	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 5	AK094840	7973403
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	BC000312	8119088
GOLGA8B GOLGA8A	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8B golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8A	BX648160	7987279
CCRL2 LOC727811	chemokine (C-C motif) receptor-like 2 similar to chemokine (C-C motif) receptor-like 2	AF015525 AF014958	8093304
HNRNPA1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	BC070315	7955890
EBI2	Epstein-Barr virus induced gene 2 (lymphocyte-specific G protein-coupled receptor)	BC020752	7972557
C6orf114	chromosome 6 open reading frame 114	AF264036 BC066553 AK055131	8123981
GP1BB SEPT5	glycoprotein Ib (platelet), beta polypeptide septin 5	L20860	8071268
ANKRD36	ankyrin repeat domain 36	BC128517 BX647769	8043687
PRDM1	PR domain containing 1, with ZNF domain	AY198414	8121257
SNORA64 RPS2	small nucleolar RNA, H/ACA box 64 ribosomal protein S2	BC063011	7998666
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	BC033694	8044375
CCNL1	cyclin L1	BC038394	8091653
PIK3R5	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5	BC028212	8012558
HIST1H2BK H2BF	histone cluster 1, H2bk H2B histone family, member S	BC126339	8068898
LOC100132418	similar to PRO1102		7933261
RNU5F	RNA, U5F small nuclear	M77838	7915592
GOLGA8A GOLGA8B	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8A golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8B	BX648160	7987248
IFNG	interferon, gamma	BC070256	7964787
LOC100132418	similar to PRO1102		7933572
SNORA2A	small nucleolar RNA, H/ACA box 2A		7962327
AVPI1	arginine vasopressin-induced 1	AF241786	7935521
PPP1R16B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16B	BC152467	8062557
LRRFIP1	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	AF115510	8049542
HIST1H2AL HIST1H2AJ HIST1H2AK HIST1H2AJ HIST1H2AM HIST1H2AG	histone cluster 1, H2al histone cluster 1, H2aj histone cluster 1, H2ak histone cluster 1, H2aj histone cluster 1, H2am histone cluster 1, H2ag	BC112072	8117608
SNORD32A RPL13	small nucleolar RNA, C/D box 32A ribosomal protein L13a	AK056837	8030360
SNORA55	small nucleolar RNA, H/ACA box 55		7915227
LOC51336	mesenchymal stem cell protein DSCD28	AF242772	7916018
NECAP1	NECAP endocytosis associated 1	BC002888	7953715
EMD	emerin (Emery-Dreifuss muscular dystrophy)	BC000738	8170850
TNS3	tensin 3	AF417489	8139500
SNORA71C	small nucleolar RNA, H/ACA box 71C		8066260
SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1	AK127621	7999423
ZMIZ1	zinc finger, MIZ-type containing 1	AY235683	7928558
HIST2H3D HIST2H3C HIST2H3A	histone cluster 2, H3d histone cluster 2, H3c histone cluster 2, H3a		7919589
ARHGAP4	Rho GTPase activating protein 4	BC052303	8175900
S100A4	S100 calcium binding protein A4	BC000838	7920271
UBE2S	ubiquitin-conjugating enzyme E2S	AB062397 M91670	8012958
ODC1	ornithine decarboxylase 1	M16650	8050240
RGS13	regulator of G-protein signaling 13	AF030107	7908397
LENG8	leukocyte receptor cluster (LRC) member 8	BC028048	8031176
BHLHB3	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 3	BC025968	7961891
POLR3E	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E (80kD)	AK023160	7993973
GSTP1	glutathione S-transferase pi	BC010915	7941936
PDE4D LOC653198	phosphodiesterase 4D, cAMP-specific (phosphodiesterase E3 dunce homolog, Drosophila) similar to phosphodiesterase 4D, cAMP specific	AY245866 BX648604	8112220
ARRDC2	arrestin domain containing 2	AK128588	8026915
BAK1	BCL2-antagonist/killer 1	BC110337	8125766
MEF2D	myocyte enhancer factor 2D	BC054520	7921014
PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	BC110620	7965040
DTL	denticleless homolog (Drosophila)	AK292343	7908568
C20orf149	chromosome 20 open reading frame 149	BC002531	8064100

10

20

30

40

LOC595101 LOC440354 LOC641298 LOC440345	PI-3-kinase-related kinase SMG-1 pseudogene hypothetical protein LOC440345	BC090929 D86974	8000687
SLC5A6	solute carrier family 5 (sodium-dependent vitamin transporter), member 6	AF069307	8051030
GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	AF087853	8024485
HIST1H2EN	histone cluster 1, H2bn	BC009783	8117600
LOC338799		BC038786	7967210
CLK1	CDC-like kinase 1	BC028573	8058127
SNORA31	small nucleolar RNA, H/ACA box 31		7971386
SNORD103A	small nucleolar RNA, C/D box 103A		7914322
CD151		BC001374	7937508
DDX39	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39	BC010455	8034806
SNORD103A	small nucleolar RNA, C/D box 103A		7914324
CTPS	CTP synthase	BC009408	7900510
PGLS	β-phosphogluconolactonase	BC014006	8026780
SERTAD3	SERTA domain containing 3	AF192529	8036908
UBXD5	UBX domain containing 5	BX647774	7913918
LOC388931			8040522
QSOX2	quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 2	AJ318051	8165094
SCARNA17	small Cajal body-specific RNA 17		8021183
SLC1A4	solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4	BC026216	8042310
SNORA21	small nucleolar RNA, H/ACA box 21	AK095288	8014755
ZC3H12A	zinc finger CCCH-type containing 12A	BC005001 CR457364	7900146
ATG2A	ATG2 autophagy related 2 homolog A (S. cerevisiae)	BC110650	7949277
PI4K2A	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 alpha	BC003167	7929677
NR1H2	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2	BC007790	8030830
ADFP	adipose differentiation-related protein	BC005127	8160297
C7orf54	chromosome 7 open reading frame 54	AF191492	8135902
FABP5 FABP5L7	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated) fatty acid binding protein 5-like 7	BC070303	7948420
FABP5 FABP5L7	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated) fatty acid binding protein 5-like 7	BC070303	8147049
VPS18	vacuolar protein sorting 18 homolog (S. cerevisiae)	AF308802	7982845
SNORA29	small nucleolar RNA, H/ACA box 29		8130580
USP36	ubiquitin specific peptidase 36	AB040886	8018937
WDR33	WD repeat domain 33		8055085
LGALS1	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galactin 1)	BC020675	8072876
FAM46C	family with sequence similarity 46, member C	BC131726	7904361

10

20

(2) 健常人に比較して患者で発現が低下した遺伝子群

Gene Symbol	Gene description	Genbank ID	Transcripts Cluster Id
(A) Fold Change 3.0以上			
LRRN3	leucine rich repeat neuronal 3	BC035133	8135488
CLC	Charcot-Leyden crystal protein	L01664	8036755
IL8RA	interleukin 8 receptor, alpha	L19591	8058905
IL8RB	interleukin 8 receptor, beta	L19593	8048227
DSC1	desmocollin 1	X72925	8022728
(B) Fold Change 2.0以上 3.0未満			
FCER1A	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide	X06948	7906443
MME	membrane metallo-endopeptidase	J03779	8083494
CPA3	carboxypeptidase A3 (mast cell)	BC012613	8083260
P2RY14	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	BC034989	8091511
ABCD2	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2	BC104901	7962312
GIMAP4	GTPase, IMAP family member 4	BC020657	8137244
KCNJ15	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15	BC013327	8068583
SULT1B1	sulfotransferase family, cytosolic, 1B, member 1	BC010895	8100798
C1orf25	chromosome 1 open reading frame 25	AF288399	7922870
TSHZ2	teashirt zinc finger homeobox 2	AF230201 AY926481	8063444
ITGA6	integrin, alpha 6		8046380
DPP4	dipeptidyl-peptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)	BC085265	8056222
AK5	adenylate kinase 5	BC036666	7902452
MOSPD2	motile sperm domain containing 2	BC030641	8166140
EMR3	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 3	AF239764	8034851
GOLPH3L	golgi phosphoprotein 3-like	BC013870	7919780
DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	BC132786	8160559

30

40

MS4A2	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2 (Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; beta polypeptide)	D10583	7940226
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	BC032722	8092169
GCET2	germinal center expressed transcript 2	AY212246	8089478
ZNF429	zinc finger protein 429	AY269786	8027312
NOG	noggin	BC034027	8008627
NELL2	NEL-like 2 (chicken)	D83018	7962455
GIMAP1	GTPase, IMAP family member 1	AK091818	8137252
PTGDR	prostaglandin D2 receptor (DP)	BC040968	7974363
KRT23	keratin 23 (histone deacetylase inducible)	BC028356	8015133
C5orf29	chromosome 5 open reading frame 29	BC063534 AK090960	8105481
(C)Fold Change 1.5以上 2.0未満			
GVIN1	GTPase, very large interferon inducible 1		7946275
SLFN5	schlafen family member 5	BC125200	8006531
SLCO4C1	solute carrier organic anion transporter family, member 4C1	AY273896	8113369
ZNF260	zinc finger protein 260	BC042676	8036324
MGC57346	hypothetical LOC401884	BC045575	8007799
NAPEPLD	N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D	BC071604 AY357337	8141872
HLTF	helicase-like transcription factor	BC044659	8091354
ZNF382	zinc finger protein 382	AF513816	8028194
VSIG1	V-set and immunoglobulin domain containing 1	BC043216	8169263
FAM118B	family with sequence similarity 118, member B	BC001647 CR457334	7945058
SAMD9	sterile alpha motif domain containing 9	AF445355	8140967
ZNF486	zinc finger protein 486	BC027608 AB209550	8027260
PROK2	prokineticin 2	AF333025	8088813
TRIM5	tripartite motif-containing 5	AF220025	7946089
UBLCP1	ubiquitin-like domain containing CTD phosphatase 1	AY444562	8109597
ASF1A	ASF1 anti-silencing function 1 homolog A (S. cerevisiae)	AF151856	8121734
TRAT1	T cell receptor associated transmembrane adaptor 1	AK291931	8081537
ARV1		AF290878	7910494
MSH2	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)	BC021566	8041867
C21orf109	chromosome 21 open reading frame 109	AF490769 BC065252	8068100
FANCF	Fanconi anemia, complementation group F	BX640936	7947138
CCR3	chemokine (C-C motif) receptor 3	AK123050	8079383
STYX LOC730432	serine/threonine/tyrosine interacting protein similar to serine/threonine/tyrosine interacting protein	BX647636	7974387
RNASEL	ribonuclease L (2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent)	BC090934	7922707
ZNF175	zinc finger protein 175	BC052997	8030831
C1orf103	chromosome 1 open reading frame 103	AY190122	7918487
CAMSAP1L1	calmodulin regulated spectrin-associated protein 1-like 1	BC125228	7908614
ARSK	arylsulfatase family, member K	AY358596	8106962
RWDD2B	RWD domain containing 2B	BC012546 Y19009	8069744
MNDA	myeloid cell nuclear differentiation antigen	M81750	7906377
CD200R1	CD200 receptor 1	AK126349	8089568
LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1	AF288571	8102232
PIGM	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class M	BC019865	7921526
LOC339803		BC008254 AK023856	8052438
TMEM106B	transmembrane protein 106B	BC033901	8131539
LOC129293		AK128325 BC051789	8053379
PCYOX1	prenylcysteine oxidase 1	BC051891	8042519
P2RY5	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 5	BC045651	7971565
FAM70A	family with sequence similarity 70, member A	BC047054	8174767
GIMAP6	GTPase, IMAP family member 6	BC060760	8143781
GIMAP8	GTPase, IMAP family member 8	BC107037	8137232
ST8SIA4	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4	BC053657	8113358
C2orf44	chromosome 2 open reading frame 44	BC035698	8050689
C7orf36	chromosome 7 open reading frame 36	AF228046 CR457198 BX646555	8132399
ZMAT4	zinc finger, matrin type 4	BC019598	8150419
MTFMT	mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase	BC016630	7989708
LOC285636		BC131721	8105104

10

20

30

40

C9orf64	chromosome 9 open reading frame 64	AK090882	8162039
RNF157	ring finger protein 157		8018652
ZNF204	zinc finger protein 204 (pseudogene)		8124498
CTSO	cathepsin O	BC049206	8103389
CREBL2	cAMP responsive element binding protein-like 2	BC106052	7954021
LOC221442		AK126092 BX537595 BX648193 BC126399	8119423
LDHB	lactate dehydrogenase B	AY189689	7961693
SMAD2	SMAD family member 2	AY134745	8023191
TFB1M	transcription factor B1, mitochondrial	AK289484	8130438
MCM8	minichromosome maintenance complex component 8	BC101057	8060813
TRIP11	thyroid hormone receptor interactor 11	AF007217	7980923
HPS3	Hermansky-Pudlak syndrome 3	AY033141	8083282
LDLRAP1	low density lipoprotein receptor adaptor protein 1	BC029770	7899023
KRCC1	lysine-rich coiled-coil 1	BC107580	8053648
DPY19L4	dpy-19-like 4 (C. elegans)	BX538174	8147375
SLC16A10	solute carrier family 16, member 10 (aromatic amino acid transporter)	AK126183	8121515
VAMP4	vesicle-associated membrane protein 4	BC007019	7922309
UNQ3104	ACAH3104	AY356109	7960362
CHM	choroideremia (Rab escort protein 1)	AK291160	8173892
NUDT7 LOC440388	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 7 similar to coenzyme A diphosphatase		7997332
EPHX2	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	BC011628	8145532
ZNF623	zinc finger protein 623	BC067516	8148658
FAM134B	family with sequence similarity 134, member B	BC053326	8111136
TMEM154	transmembrane protein 154	BC060775	8103228
GIMAP5	GTPase, IMAP family member 5	AK055588	8137257
ACVR1C	activin A receptor, type IC	BC022530	8055992
USO1		AL832010	8095773
KIAA1107		AB029030 BC037317 AF017090 BC047628	7902977
DDX60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	BC033115 BC020601 AL137464	8103563
SLC46A3	solute carrier family 46, member 3	BC036662	7970793
OSGEPL1	O-sialoglycoprotein endopeptidase-like 1	BC011904	8057689
MIKKS	McKusick-Kaufman syndrome	AF221993	8064967
RPAP3	RNA polymerase II associated protein 3	BC056415	7962590
C12orf23	chromosome 12 open reading frame 23	AK001731 AL117658	7958346
GSTM3	glutathione S-transferase M3 (brain)	BC000088	7918379
C10orf88	chromosome 10 open reading frame 88	BC032645	7936817
ZNF146	zinc finger protein 146	BC110500	8028186
TMEM204	transmembrane protein 204	AY678494	7992293
BBS2	Bardet-Biedl syndrome 2	AF342736	8001507
LARS	leucyl-tRNA synthetase	BC152422	8114861
ZNF780B	zinc finger protein 780B	AK127063	8036813
CYSLTR1	cysteinyl leukotriene receptor 1	BC035750	8173745
PAQR8	progesterone and adiponectin receptor family member VIII	AY424286	8120215
LNPEP	leucyl/cystinyl aminopeptidase	D50810	8107066
ANKRD55	ankyrin repeat domain 55	BC106914	8112159
NDUFB5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 5, 16kDa	BC017909	8084092
SCYL3	SCY1-like 3 (S. cerevisiae)	AK292507	7922250
GPR171	G protein-coupled receptor 171	BC036615	8091503
ECHDC1	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 1	BC003549	8129379
HERC4	hect domain and RLD 4	AY221963	7933947
TSHZ2	teashirt zinc finger homeobox 2	AF230201	8063437
IKZF3	IKAROS family zinc finger 3 (Aiolos)	AY377981	8014891
FAM48A	family with sequence similarity 48, member A	AJ130894	7971039
ZNF681	zinc finger protein 681	BC062216	8035855
LOC100129030 LOC51152	hypothetical protein LOC100129030 melanoma antigen		8155453
THNSL1	threonine synthase-like 1 (S. cerevisiae)	BC035132 CR457346	7926708
LOC100129030 LOC51152	hypothetical protein LOC100129030 melanoma antigen		8161375
SEC22B	SEC22 vesicle trafficking protein homolog B (S. cerevisiae)	BC001364	7804695

10

20

30

40

INPP4B	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, 105kDa	BC110918	8102950
CD40LG	CD40 ligand (TNF superfamily, member 5, hyper-IgM syndrome)	BC071754	8170187
ZC3H8	zinc finger CCH-type containing 6		8044450
IDH1	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	BC093020	8058552
BBS10	Bardet-Biedl syndrome 10	BC026355	7965060
FHIT	fragile histidine triad gene	AK289824 AK127931 BC057223	8088458
HSDL2	hydroxysteroid dehydrogenase like 2	AY093428	8157233
ZNF90	zinc finger protein 90	M61870	8027254
DISP2 LOC728211	dispatched homolog 2 (Drosophila) hypothetical LOC728211	AL359580	8022338
MID2	midline 2	Y18880	8169249
KLHL9	kelch-like 9 (Drosophila)	BC039133	8160405
NT5DC1	5'-nucleotidase domain containing 1	BC108699	8121578
ATG4C	ATG4 autophagy related 4 homolog C (S. cerevisiae)	AK027773	7901895
ATM NPAT	ataxia telangiectasia mutated nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus	U33841 X9119	7943620
ZDHHC13	zinc finger, DHHC-type containing 13	AB024495	7938816
VTA1	Vps20-associated 1 homolog (S. cerevisiae)	AF271994	8122348
CXCR7	chemokine (C-X-C motif) receptor 7	BC036661	8049471
CHORDC1	cysteine and histidine-rich domain (CHORD)-containing 1	AK226099	7950983
TNFAIP8	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	BC007014	8107520
SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2	BC070039	7957551
TES	testis derived transcript (3 LIM domains)	AF245356	8135576
SPRYD5	SPRY domain containing 5	BC005014	7939979
SLC30A6	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 6	BC066903	8041257
METTL4	methyltransferase like 4	BX647373	8022009
SVIP	small VCP/p97-interacting protein	AL833119	7947147
HDAC8	histone deacetylase 8	AF230097	8173531
JRKL	jerky homolog-like (mouse)	AF004715	7943314
PDE7A	phosphodiesterase 7A	U67932	8151074
GTF2H1	general transcription factor IIH, polypeptide 1, 62kDa	BC004452	7938762
PAPOLG	poly(A) polymerase gamma	AF312211	8042119
RBL2	retinoblastoma-like 2 (p130)	BC034490	7995631
POLR3K	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K, 12.3 kDa	AF060223	7998129
ZNF234	zinc finger protein 234	BC007303	8029392
ERGIC2	ERGIC and golgi 2	AL834128	7962013
ZNF717	zinc finger protein 717	BC084565	8088911
SLAIN1	SLAIN motif family, member 1	BC111497	7969533
PTER	phosphotriesterase related	BC015092	7926356
C21orf55	chromosome 21 open reading frame 55	AF462153	8070097
ZNF280B	zinc finger protein 280B	BC040020	8074845
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	AB425196	7986359
TCL6	T-cell leukemia/lymphoma 6	AB035332	7976523
SLC26A2	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2	BC059390	8109194
ZNF512	zinc finger protein 512	BC093041	8040965
RECK	reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs	D50406	8155169
NAP1L3	nucleosome assembly protein 1-like 3	D50370	8173917
UEVLD	UEV and lactate/malate dehydrogenase domains	AF503350	7947027
MRPS14	mitochondrial ribosomal protein S14	BC009788	7922462
EEA1	early endosome antigen 1	L40157	7965436
FIG4		BC041338	8121429
SMU1	smu-1 suppressor of mec-8 and unc-52 homolog (C. elegans)	BC110654	8160622
PIP3-E		AK289917	8130408
C14orf104	chromosome 14 open reading frame 104	BC011400	7978838
FMO4	flavin containing monooxygenase 4	BC002780	7907297
METAP1	methionyl aminopeptidase 1	BC030054	8096556
LOC492311	similar to bovine IgA regulatory protein	AB073888	8108475
ANAPC7	anaphase promoting complex subunit 7	BC141848	7966301
ATP10D	ATPase, class V, type 10D	BC131535	8094911
DACT1	dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 1 (Xenopus laevis)	AF251079	7974689
ZNF470	zinc finger protein 470	AY484591	8031669
SCRN3	secernin 3	BC119684	8046502
MGC70870	C-terminal binding protein 2 pseudogene	BC063803	8019563
PM20D2	peptidase M20 domain containing 2	BC035036	8121087
ZNF616	zinc finger protein 616	BC033199	8038954
ZADH2	zinc binding alcohol dehydrogenase, domain containing 2	BC078661	8023871

10

20

30

40

TNFRSF10C MGC31957	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c, decoy without an intracellular domain hypothetical protein MGC31957	AF033854 BC005043 BC021569	8145244
--------------------	---	----------------------------	---------

【表 2】

(1) 治療後に発現が上昇した遺伝子群

Gene Symbol	Gene description	Genbank ID	Transcripts Cluster Id
Fold Change 3.0以上			
MS4A3	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (hematopoietic cell-specific)	L35848	7940216
TCN1	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	J03068	7948444
MMP8	matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)	AK292659	7951246
OLFM4	olfactomedin 4	AY358567	7969288
RNASE3	ribonuclease, RNase A family, 3 (eosinophil cationic protein)	M28128	7973105
CTSG	cathepsin G	AK225914	7978351
ERAF	erythroid associated factor	AF112995	7995237
SLC4A1	solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group)	BC096106	8015991
MPO	myeloperoxidase	M19507	8016932
SERPINB10	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 10	BC096217	8021645
CEACAM6	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting	BC005008	8029098
CLC	Charcot-Leyden crystal protein	L01664	8036755
CEACAM8	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8	M33326	8037222
BPI	bactericidal/permeability-increasing protein	DQ414668	8062444
SLPI	secretory leukocyte peptidase inhibitor	BC020708	8068493
LTF	lactotransferrin	X53961	8086607
ARG1	arginase, liver	BC020653	8122058
CRISP3	cysteine-rich secretory protein 3	X94323	8126905
SLC25A37	solute carrier family 25, member 37	AY032828	8145281
SLC25A37 LOC100133914	solute carrier family 25, member 37 hypothetical protein LOC100133914	AF495725	8145291
DEFA4	defensin, alpha 4, corticostatin	BC106747	8149109
DEFA1 DEFA3 LOC728358	defensin, alpha 1 defensin, alpha 3, neutrophil-specific	M21130 M23281 BC069423	8149116
DEFA1 DEFA3 LOC728358	defensin, alpha 1 defensin, alpha 3, neutrophil-specific	M23281 BC069423	8149126
DEFA3 DEFA1 LOC728358 DEFT1P	defensin, alpha 3, neutrophil-specific defensin, alpha 1 defensin, theta 1 pseudogene	BC119706 BC069423	8149137
CA1	carbonic anhydrase I	M33987	8151592
LCN2	lipocalin 2	BC033089	8158167
ALAS2	aminolevulinate, delta-, synthase 2	BC030230	8173135
CD24		BC064619	8177222

10

20

(2) 治療後に発現が低下した遺伝子群

Gene Symbol	Gene description	Genbank ID	Transcripts Cluster Id
Fold Change 3.0以上			
IFI44L	interferon-induced protein 44-like	AL832618	7902541
SNORA42	small nucleolar RNA, H/ACA box 42		7920873
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	AY151286	7922976
EGR2	early growth response 2 (Krox-20 homolog, Drosophila)	BC035625	7933872
IL1B	interleukin 1, beta	BC008678	8054722
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	BC015753	8100994
HIST1H2BB	histone cluster 1, H2bb	BC096728	8124394

30

【産業上の利用可能性】

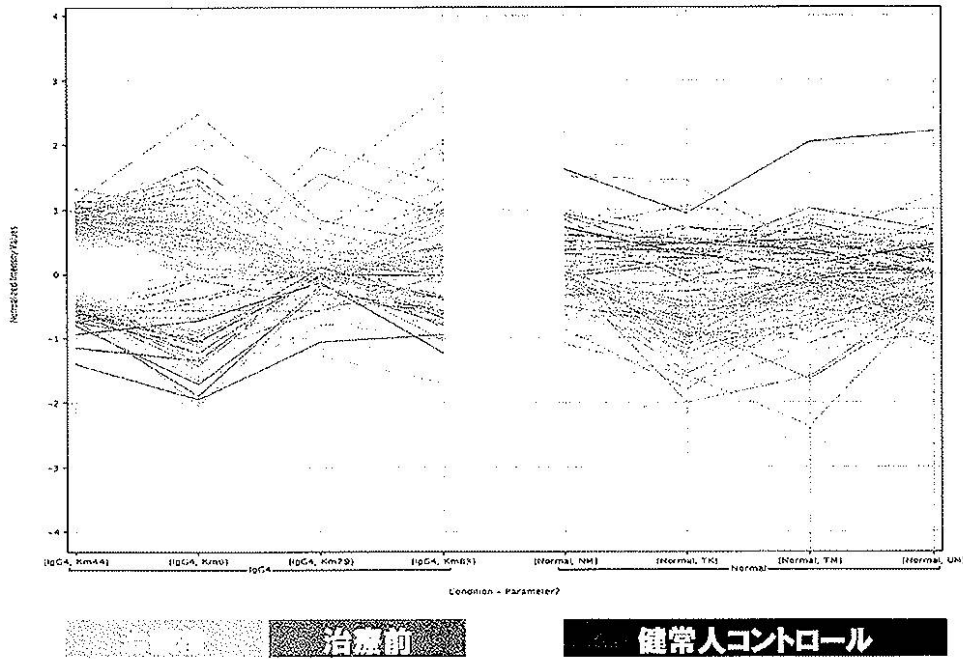
【0158】

本発明によれば、被験者から単離した末梢血を用いて、IgG4関連疾患を簡便に鑑別診断できる。また、IgG4関連疾患患者の病態（治療の進度や予後）を簡便にモニターすることができ、治療の進度の確認や予後の予測に利用できる。

40

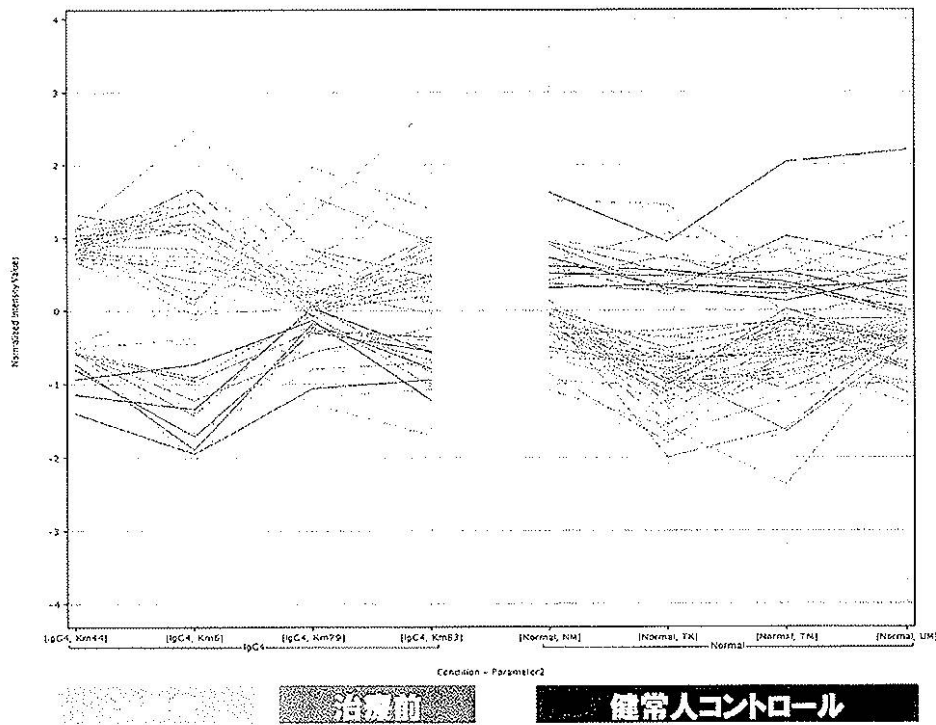
【 図 1 】

患者4検体vs健常人コントロール
(t検定+1.5 Fold change)



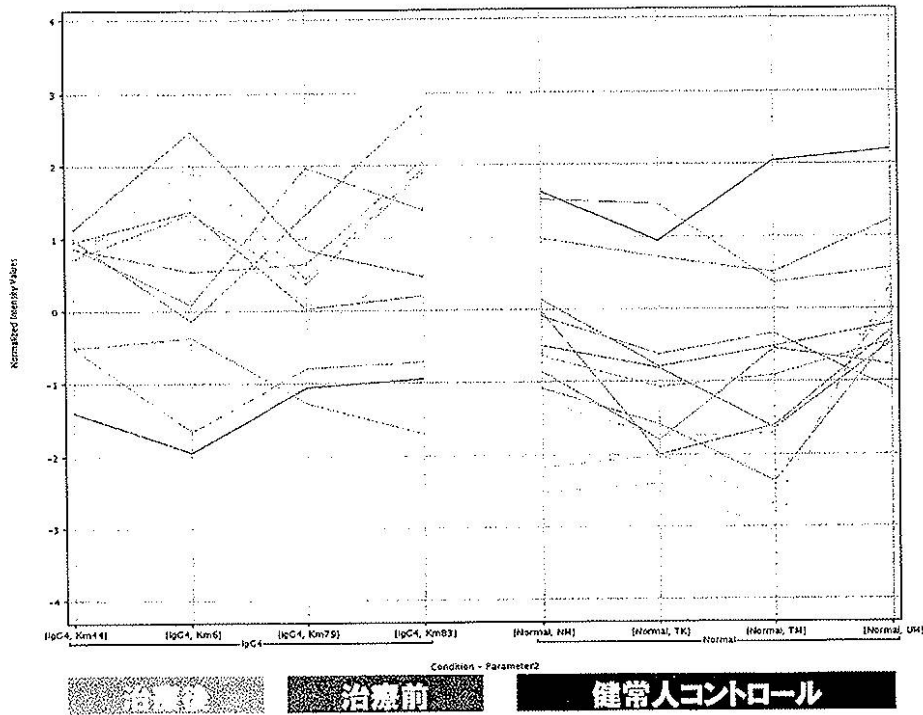
【 図 2 】

患者4検体vs健常人コントロール
(t検定+2.0 Fold change)



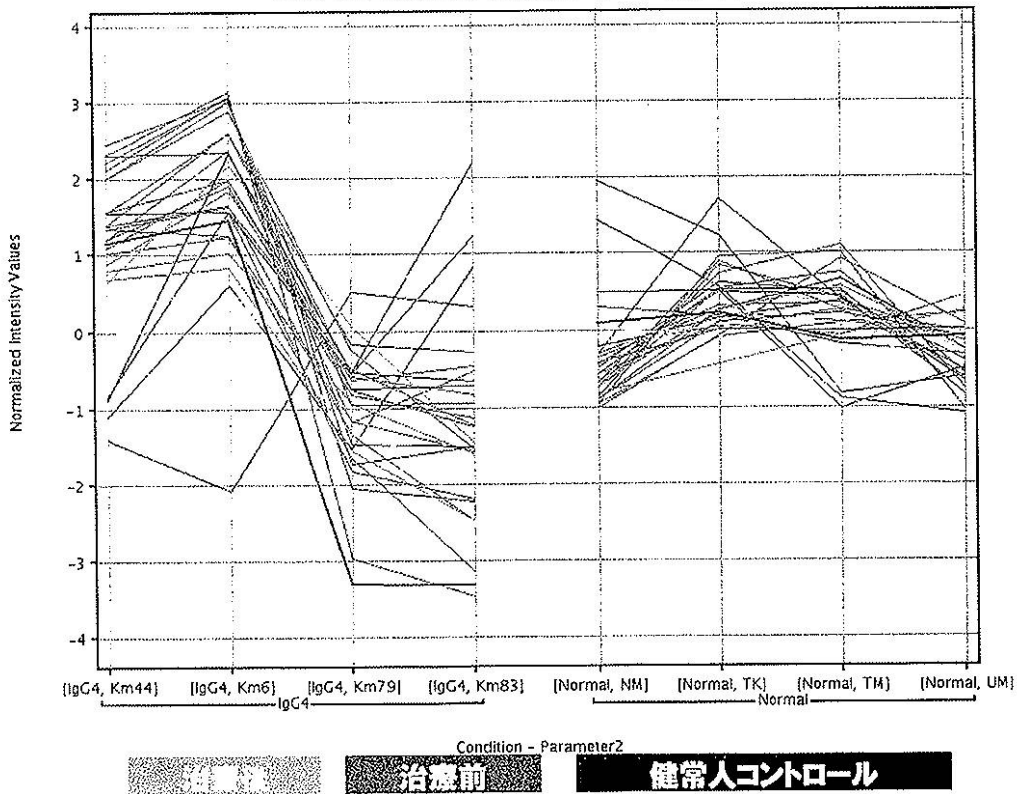
【 図 3 】

患者4検体vs健常人コントロール
(t検定+3.0 Fold change)



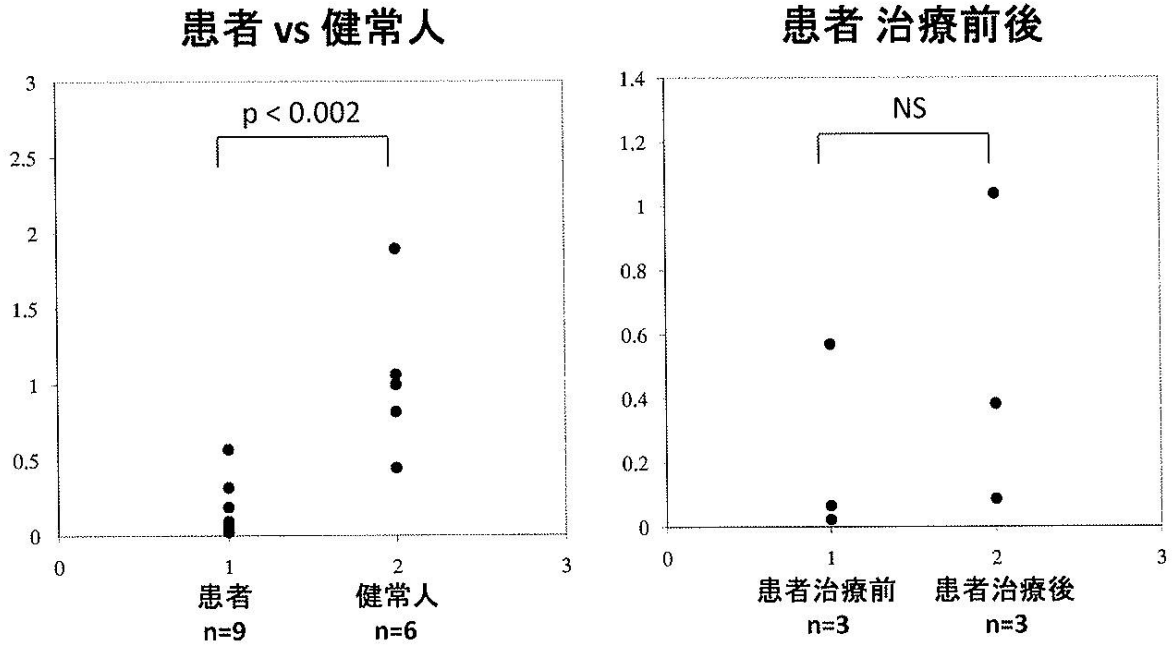
【 図 4 】

患者の治療前後で変動していた遺伝子



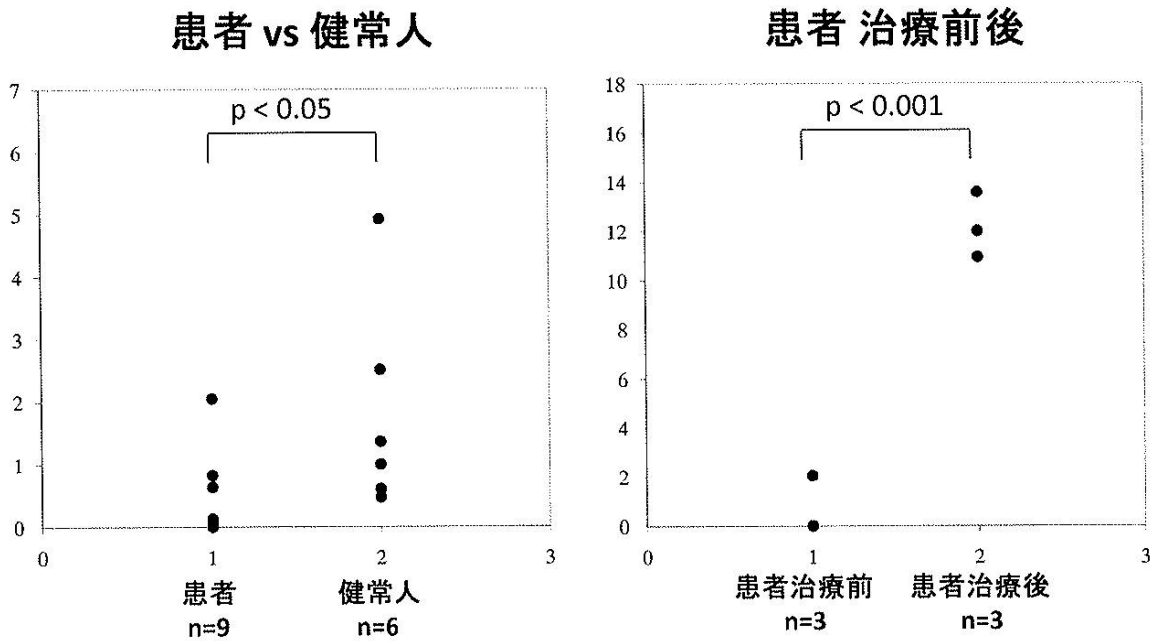
【 図 5 】

Charcot-Leyden crystal protein (CLC)



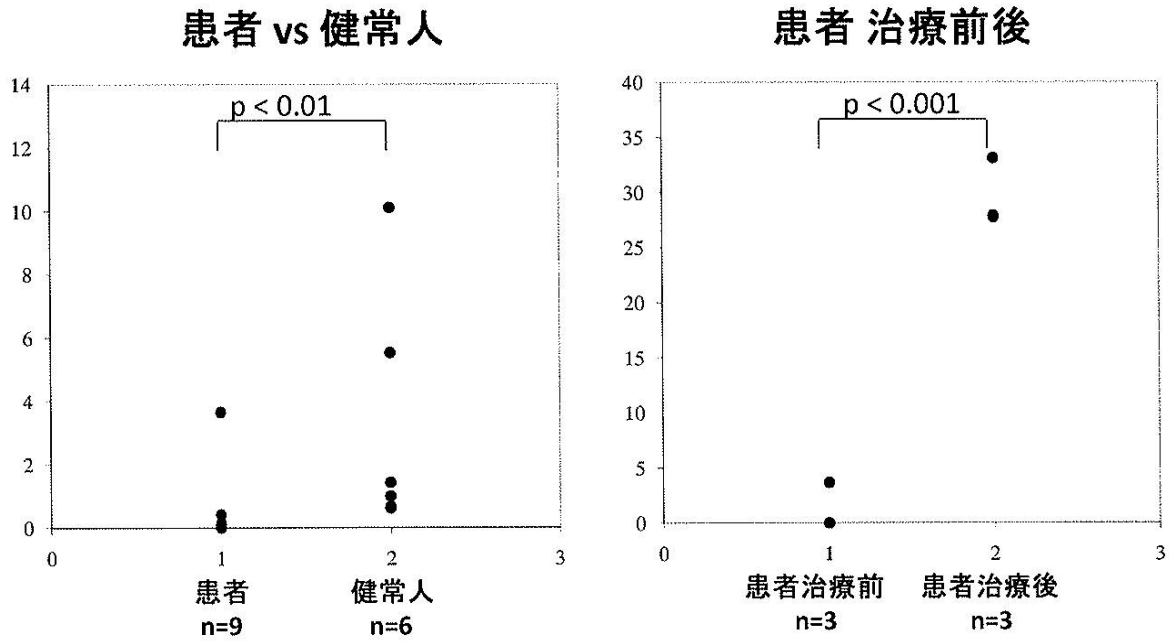
【 図 6 】

Defensin, alpha 3 (DEFA3)



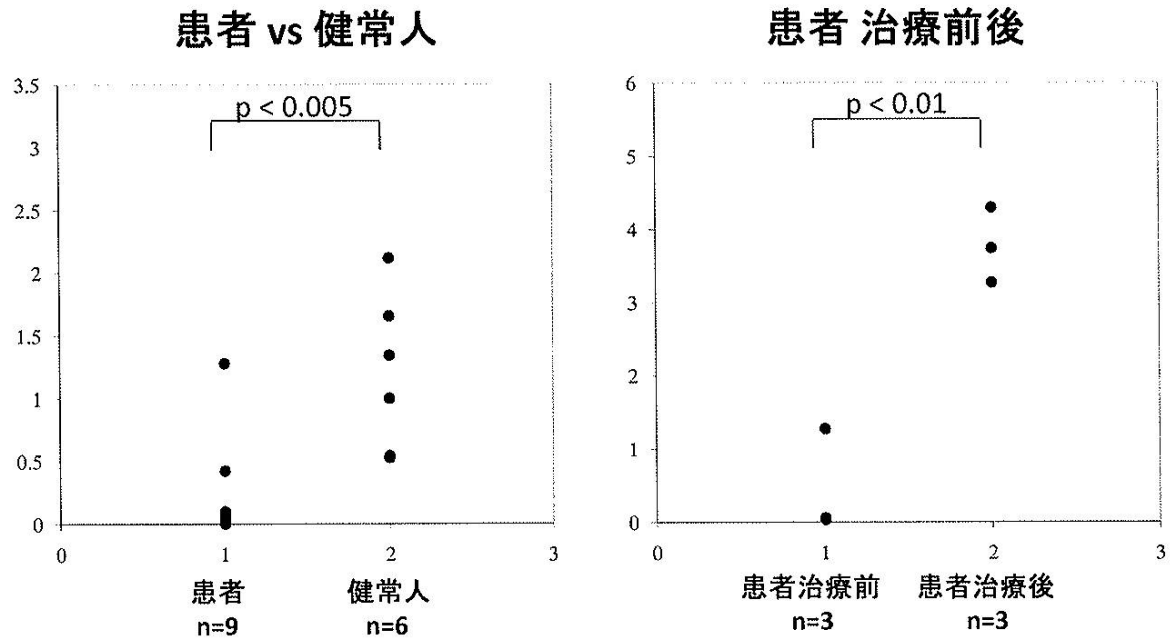
【 図 7 】

Defensin, alpha 4 (DEFA4)



【 図 8 】

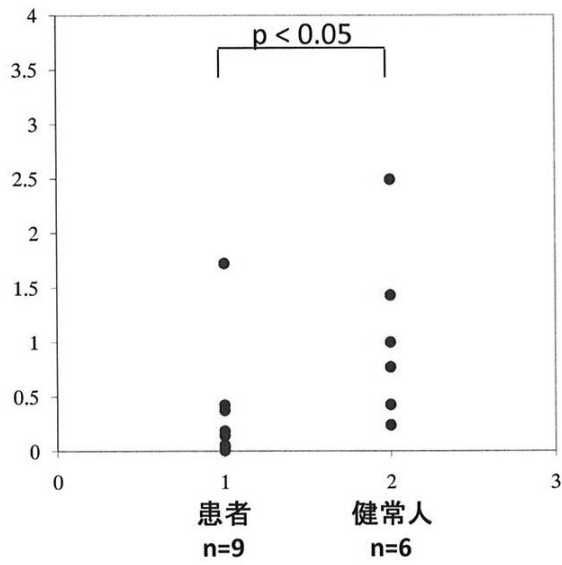
Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (MS4A3)



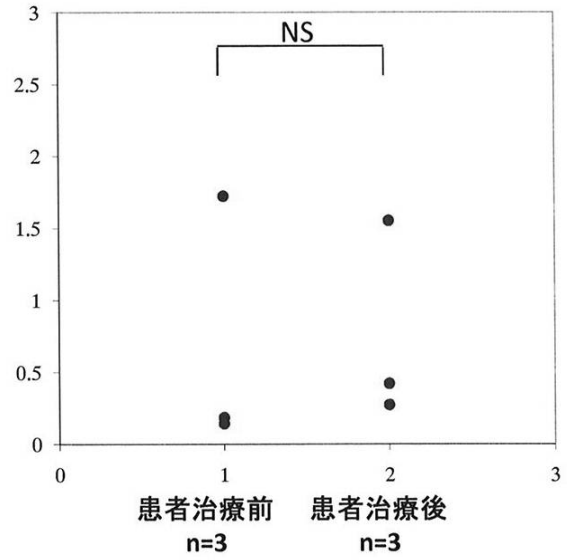
【 図 9 】

Interleukin 8 receptor, alpha (IL8RA, CXCR1)

患者 vs 健常人



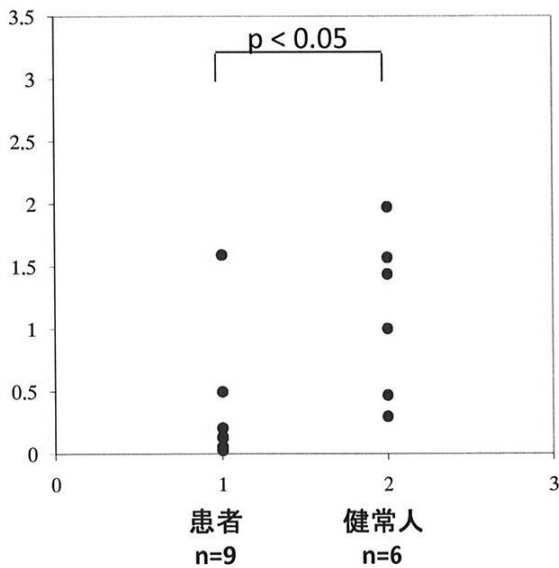
患者 治療前後



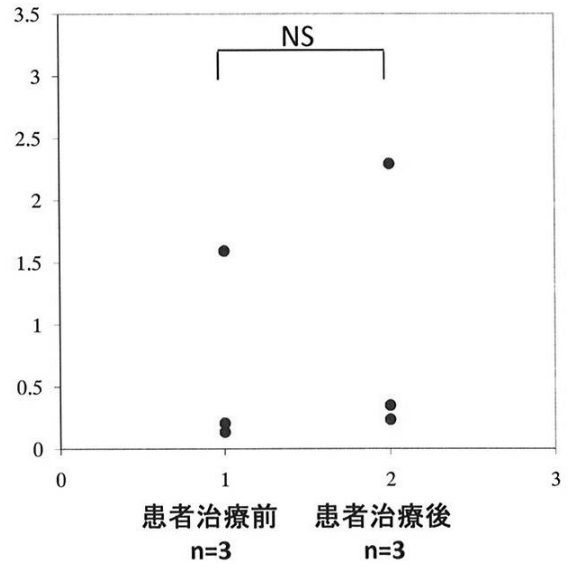
【 図 1 0 】

Interleukin 8 receptor, beta (IL8RB, CXCR2)

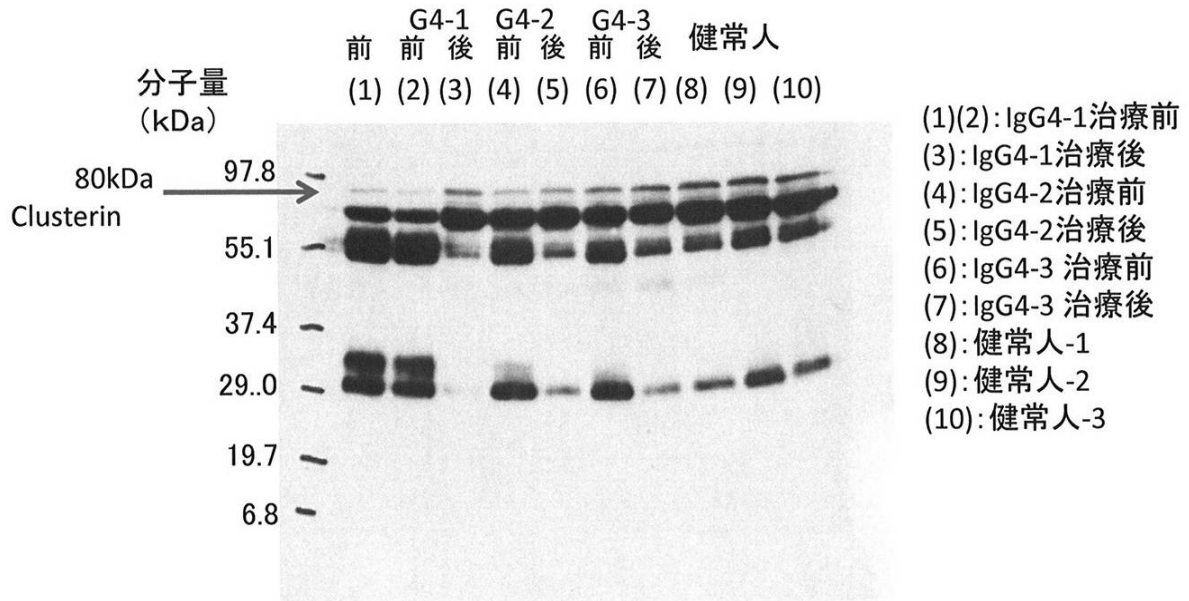
患者 vs 健常人



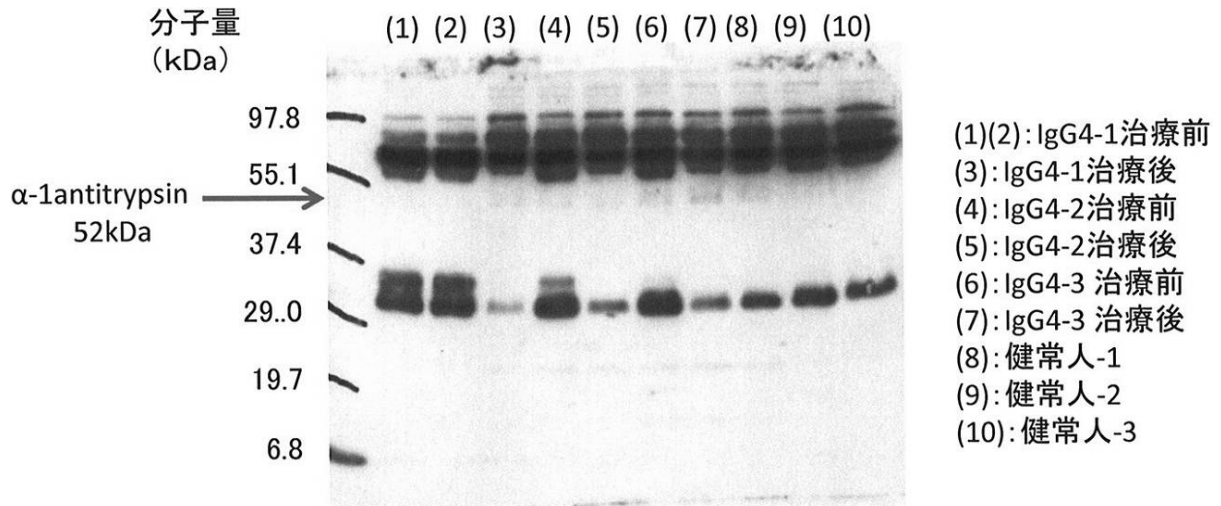
患者 治療前後



【圖 1 1】

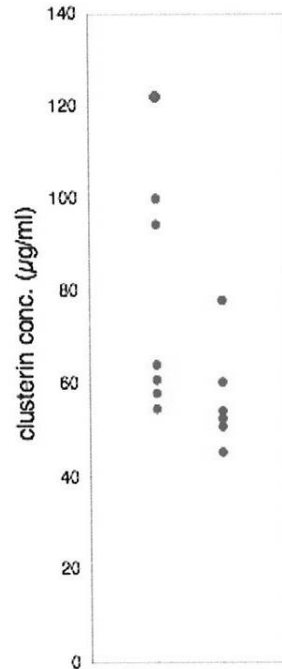
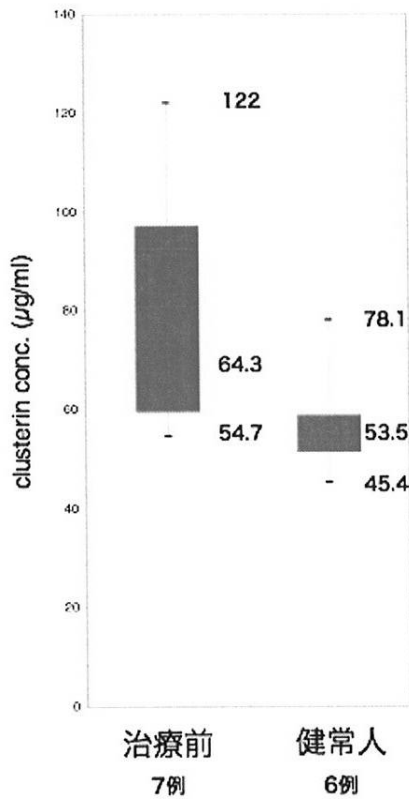


【圖 1 2】



【 図 1 3 】

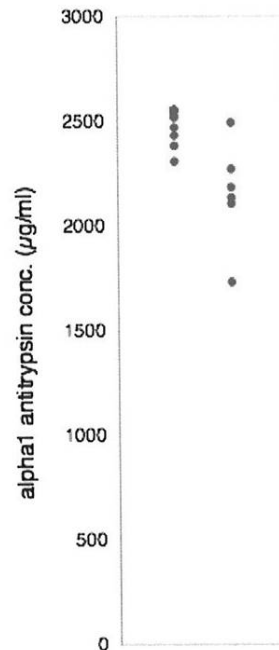
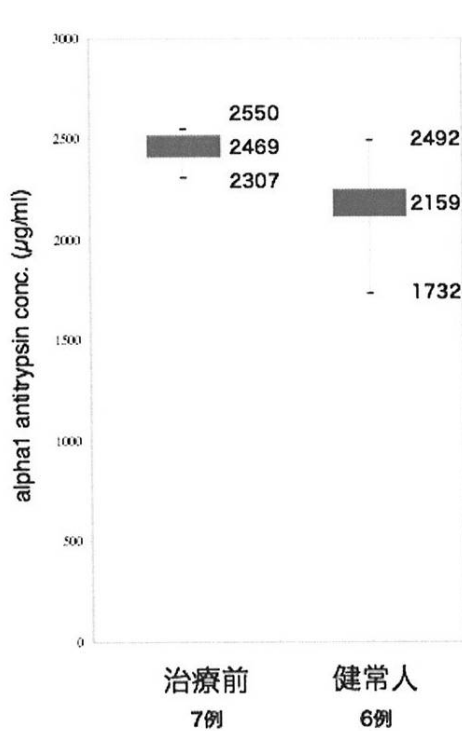
Clusterin ELISA (治療前vs健常人)



Mann-WhitneyのU検定
正規分布表より、両側検定では
 $p < 0.05$
(精密P値= 0.03832)

【 図 1 4 】

Alpha1-Antitrypsin ELISA (治療前vs健常人)



Mann-WhitneyのU検定
正規分布表より、両側検定では
 $p < 0.05$
(精密P値= 0.01842)

フロントページの続き

- (72)発明者 梅原 久範
石川県河北郡内灘町字大学一丁目1番地 学校法人金沢医科大学内
- (72)発明者 正木 康史
石川県河北郡内灘町字大学一丁目1番地 学校法人金沢医科大学内
- (72)発明者 友杉 直久
石川県河北郡内灘町字大学一丁目1番地 学校法人金沢医科大学内
- (72)発明者 石垣 靖人
石川県河北郡内灘町字大学一丁目1番地 学校法人金沢医科大学内

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 新規疾患,IgG4関連多臓器リンパ増殖性疾患(IgG4+MOLPS)の確立のための研究 平成21年度 総括
・分担研究報告書, (2010.03), p.77-79
日本消化器病学会雑誌, (2006), 103, [臨時増刊号], p.A688(消W14-4)
月刊医学と薬学, (2010.07), 64, [1], p.95-104

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/68

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

PubMed

专利名称(译)	用于诊断IgG4相关疾病的标志物及其用途		
公开(公告)号	JP5704684B2	公开(公告)日	2015-04-22
申请号	JP2010194326	申请日	2010-08-31
申请(专利权)人(译)	学校法人金沢医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	学校法人金沢医科大学		
[标]发明人	梅原久範 正木康史 友杉直久 石垣靖人		
发明人	梅原 久範 正木 康史 友杉 直久 石垣 靖人		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/53		
FI分类号	C12N15/00.A C12Q1/68.A G01N33/53.D C12N15/12 C12N15/13 C12Q1/6809.Z C12Q1/6813.Z C12Q1/6827.Z C12Q1/6837.Z C12Q1/6851.Z C12Q1/686.Z C12Q1/6869.Z C12Q1/6883.Z G01N33/68		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	森田浩二 田中玲子 松任谷裕子 北野 健		
其他公开文献	JP2012050369A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种方法，用于鉴定IgG4相关疾病的特异性标志物，区分IgG4相关疾病与类似疾病，并简单诊断IgG4相关疾病，以阐明疾病的原因和病理状况。基于该标记的IgG4相关疾病，建立疾病概念并提供IgG4相关疾病的诊断标准。溶解：评估受试者的IgG4相关疾病的感染或病理状况的方法基于表达量的一种或多种基因，其选自分离自受试者的样品中的特定组或至少一种或多种蛋白质的表达量，所述蛋白质选自蛋白质符号CLUS，ALTA，PEDF，DCD和SAA4。

(1) 通常人に対して患者で発現が上昇した遺伝子群

Gene Symbol	Gene description	Genebank ID	Transcript Cluster Id
NKX2-2	nuclear receptor subfamily 2, group A, member 2	BC020288	805597
ANCELOL2	201900011 (chondrocyte-derived growth factor) [similar to Amphiregulin precursor (AR)]	BC030789	4068744
ANCELOL1	201900008 (chondrocyte-derived growth factor) [similar to Amphiregulin precursor (AR)]	BC030790	6065733
FLRT3	fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase 3	AY352255	8110993
FLRT2	fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase 2	AF022901	4012349
FLRT1	fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase 1	AF022901	7802507
FLRT4	fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase 4	U08083	7900383
FLRT5	fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase 5	U08083	8005817
FLRT6	fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase 6	U08083	8013320
FLRT7	fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase 7	U08083	8013320
FLRT8	fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase 8	U08083	8013320
FLRT9	fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase 9	U08083	8005053
FLRT10	fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase 10	U08083	7981708
FLRT11	fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase 11	U08083	8101322
FLRT12	fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase 12	U08083	7922410

(B) Fold Change 2.0以上の遺伝子群

Gene Symbol	Gene description	Genebank ID	Transcript Cluster Id
CD3E	CD3 epsilon chain, T cell receptor	U08083	8110872
CD3D	CD3 delta chain, T cell receptor	U08083	8070605
CD3EAP	CD3 epsilon-associated protein	U08083	8070605
CD3DAP	CD3 delta-associated protein	U08083	7275473
CD3G	CD3 gamma chain, T cell receptor	U08083	7828704
CD3Z	CD3 zeta chain, T cell receptor	U08083	8122284
CD3E2	CD3 epsilon chain 2, T cell receptor	U08083	7924657
CD3D2	CD3 delta chain 2, T cell receptor	U08083	7924657
CD3G2	CD3 gamma chain 2, T cell receptor	U08083	8055663
CD3Z2	CD3 zeta chain 2, T cell receptor	U08083	7924657
CD3E1	CD3 epsilon chain 1, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D1	CD3 delta chain 1, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G1	CD3 gamma chain 1, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z1	CD3 zeta chain 1, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E3	CD3 epsilon chain 3, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D3	CD3 delta chain 3, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G3	CD3 gamma chain 3, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z3	CD3 zeta chain 3, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E4	CD3 epsilon chain 4, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D4	CD3 delta chain 4, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G4	CD3 gamma chain 4, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z4	CD3 zeta chain 4, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E5	CD3 epsilon chain 5, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D5	CD3 delta chain 5, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G5	CD3 gamma chain 5, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z5	CD3 zeta chain 5, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E6	CD3 epsilon chain 6, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D6	CD3 delta chain 6, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G6	CD3 gamma chain 6, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z6	CD3 zeta chain 6, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E7	CD3 epsilon chain 7, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D7	CD3 delta chain 7, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G7	CD3 gamma chain 7, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z7	CD3 zeta chain 7, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E8	CD3 epsilon chain 8, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D8	CD3 delta chain 8, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G8	CD3 gamma chain 8, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z8	CD3 zeta chain 8, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E9	CD3 epsilon chain 9, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D9	CD3 delta chain 9, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G9	CD3 gamma chain 9, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z9	CD3 zeta chain 9, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E10	CD3 epsilon chain 10, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D10	CD3 delta chain 10, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G10	CD3 gamma chain 10, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z10	CD3 zeta chain 10, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E11	CD3 epsilon chain 11, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D11	CD3 delta chain 11, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G11	CD3 gamma chain 11, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z11	CD3 zeta chain 11, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E12	CD3 epsilon chain 12, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D12	CD3 delta chain 12, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G12	CD3 gamma chain 12, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z12	CD3 zeta chain 12, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E13	CD3 epsilon chain 13, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D13	CD3 delta chain 13, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G13	CD3 gamma chain 13, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z13	CD3 zeta chain 13, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E14	CD3 epsilon chain 14, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D14	CD3 delta chain 14, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G14	CD3 gamma chain 14, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z14	CD3 zeta chain 14, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E15	CD3 epsilon chain 15, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D15	CD3 delta chain 15, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G15	CD3 gamma chain 15, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z15	CD3 zeta chain 15, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E16	CD3 epsilon chain 16, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D16	CD3 delta chain 16, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G16	CD3 gamma chain 16, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z16	CD3 zeta chain 16, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E17	CD3 epsilon chain 17, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D17	CD3 delta chain 17, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G17	CD3 gamma chain 17, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z17	CD3 zeta chain 17, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E18	CD3 epsilon chain 18, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D18	CD3 delta chain 18, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G18	CD3 gamma chain 18, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z18	CD3 zeta chain 18, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E19	CD3 epsilon chain 19, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D19	CD3 delta chain 19, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G19	CD3 gamma chain 19, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z19	CD3 zeta chain 19, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E20	CD3 epsilon chain 20, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D20	CD3 delta chain 20, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G20	CD3 gamma chain 20, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z20	CD3 zeta chain 20, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E21	CD3 epsilon chain 21, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D21	CD3 delta chain 21, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G21	CD3 gamma chain 21, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z21	CD3 zeta chain 21, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E22	CD3 epsilon chain 22, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D22	CD3 delta chain 22, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G22	CD3 gamma chain 22, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z22	CD3 zeta chain 22, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E23	CD3 epsilon chain 23, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D23	CD3 delta chain 23, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G23	CD3 gamma chain 23, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z23	CD3 zeta chain 23, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E24	CD3 epsilon chain 24, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D24	CD3 delta chain 24, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G24	CD3 gamma chain 24, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z24	CD3 zeta chain 24, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E25	CD3 epsilon chain 25, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D25	CD3 delta chain 25, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G25	CD3 gamma chain 25, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z25	CD3 zeta chain 25, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E26	CD3 epsilon chain 26, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D26	CD3 delta chain 26, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G26	CD3 gamma chain 26, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z26	CD3 zeta chain 26, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E27	CD3 epsilon chain 27, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D27	CD3 delta chain 27, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G27	CD3 gamma chain 27, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z27	CD3 zeta chain 27, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E28	CD3 epsilon chain 28, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D28	CD3 delta chain 28, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G28	CD3 gamma chain 28, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z28	CD3 zeta chain 28, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E29	CD3 epsilon chain 29, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D29	CD3 delta chain 29, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G29	CD3 gamma chain 29, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z29	CD3 zeta chain 29, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E30	CD3 epsilon chain 30, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D30	CD3 delta chain 30, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G30	CD3 gamma chain 30, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z30	CD3 zeta chain 30, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E31	CD3 epsilon chain 31, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D31	CD3 delta chain 31, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G31	CD3 gamma chain 31, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z31	CD3 zeta chain 31, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E32	CD3 epsilon chain 32, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D32	CD3 delta chain 32, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G32	CD3 gamma chain 32, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z32	CD3 zeta chain 32, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E33	CD3 epsilon chain 33, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D33	CD3 delta chain 33, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G33	CD3 gamma chain 33, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z33	CD3 zeta chain 33, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E34	CD3 epsilon chain 34, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D34	CD3 delta chain 34, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G34	CD3 gamma chain 34, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z34	CD3 zeta chain 34, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E35	CD3 epsilon chain 35, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D35	CD3 delta chain 35, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G35	CD3 gamma chain 35, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z35	CD3 zeta chain 35, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E36	CD3 epsilon chain 36, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D36	CD3 delta chain 36, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G36	CD3 gamma chain 36, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z36	CD3 zeta chain 36, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E37	CD3 epsilon chain 37, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D37	CD3 delta chain 37, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G37	CD3 gamma chain 37, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z37	CD3 zeta chain 37, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E38	CD3 epsilon chain 38, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D38	CD3 delta chain 38, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G38	CD3 gamma chain 38, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z38	CD3 zeta chain 38, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E39	CD3 epsilon chain 39, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D39	CD3 delta chain 39, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G39	CD3 gamma chain 39, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z39	CD3 zeta chain 39, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E40	CD3 epsilon chain 40, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D40	CD3 delta chain 40, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G40	CD3 gamma chain 40, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z40	CD3 zeta chain 40, T cell receptor	U08083	8071036
CD3E41	CD3 epsilon chain 41, T cell receptor	U08083	8071036
CD3D41	CD3 delta chain 41, T cell receptor	U08083	8071036
CD3G41	CD3 gamma chain 41, T cell receptor	U08083	8071036
CD3Z41	CD3		