

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 238568

(P2002 - 238568A)

(43)公開日 平成14年8月27日(2002.8.27)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 31/711	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/711		39/395	D 4 B 0 6 3
39/395			N 4 C 0 8 4
		45/00	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 18数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 36362(P2001 - 36362)

(22)出願日 平成13年2月14日(2001.2.14)

(71)出願人 597177471

株式会社ジェノックス創薬研究所
茨城県つくば市東光台5 - 1 - 3

(71)出願人 500095665

国立小児病院院長
東京都世田谷区太子堂3 - 35 - 31

(72)発明者 杉田 雄二

神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大学生
物工学研究センター内 株式会社ジェノッ
クス創薬研究所内

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志 (外 1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アレルギー性疾患の検査方法

(57)【要約】

【課題】 本発明は、アレルギー性疾患の検出方法の提供を課題とする。

【解決手段】アレルギー性疾患の患者と健常者との間で発現レベルに差が見られる遺伝子defensin 1を見出した。末梢血単核球における該遺伝子の発現レベルを指標とする、アレルギー性疾患の検査方法、および該疾患の治療のための化合物のスクリーニング方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】次の工程を含む、アレルギー性疾患の検査方法。

(1)被検者の生体試料におけるdefensin 1遺伝子の発現レベルを測定する工程

(2)健常者の生体試料におけるdefensin 1遺伝子の発現レベルと比較する工程

【請求項2】アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、請求項1に記載の検査方法。

【請求項3】遺伝子の発現レベルを、cDNAのPCRによって測定する請求項1に記載の検査方法。

【請求項4】遺伝子の発現レベルを、defensin 1遺伝子によってコードされる蛋白質の検出によって測定する請求項1に記載の検査方法。

【請求項5】defensin 1遺伝子の塩基配列を含むポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも15塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドからなる、アレルギー性疾患検査用試薬。

【請求項6】defensin 1蛋白質のアミノ酸配列を含むペプチドを認識する抗体からなる、アレルギー性疾患検査用試薬。

【請求項7】次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法。

(1)defensin 1遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させる工程、(2)前記遺伝子の発現レベルを測定する工程、(3)対照と比較して前記遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

【請求項8】細胞が株化白血球細胞である請求項7に記載の方法。

【請求項9】defensin 1遺伝子の塩基配列を含むポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも15塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドと、defensin 1遺伝子を発現する細胞を含む、アレルギー性疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングするためのキット。

【請求項10】defensin 1蛋白質のアミノ酸配列を含むペプチドを認識する抗体と、defensin 1遺伝子を発現する細胞を含む、アレルギー性疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングするためのキット。

【請求項11】defensin 1遺伝子の単核球における発現強度を上昇させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物からなるアレルギー性疾患モデル動物。

【請求項12】次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法。

(1)請求項11に記載のモデル動物に候補化合物を投与する工程、(2)前記モデル動物の生体試料におけるdefensin 1遺伝子の発現強度を測定する工程、(3)対照と比較して前記遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程、

【請求項13】次の工程を含む、アレルギー性疾患の治

*療薬のスクリーニング方法。

(1)defensin 1遺伝子の転写調節領域と、この転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子とを含むベクターを導入した細胞と候補物質を接触させる工程、

(2)前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、および(3)対照と比較して前記遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

【請求項14】次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法。

(1)defensin 1蛋白質と候補物質を接触させる工程、(2)前記蛋白質の活性を測定する工程、および(3)対照と比較して前記蛋白質の活性を低下させる化合物を選択する工程

【請求項15】請求項7、請求項12、請求項13、および請求項14のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有する、アレルギー性疾患の治療薬。

【請求項16】defensin 1遺伝子、またはその一部のアンチセンスDNAを主成分として含むアレルギー性疾患の治療薬。

【請求項17】defensin 1蛋白質のアミノ酸配列を含むペプチドを認識する抗体を主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、アレルギー性疾患の検査方法に関する。

【0002】

【従来の技術】アトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患は、多因子性の病気(multifactorial diseases)と考えられている。これらの病気は多くの異なる遺伝子の発現の相互作用によって起こり、これらの個々の遺伝子の発現は、複数の環境要因によって影響を受ける。このため、特定の病気を起こす特定の遺伝子を解明することは、非常に困難である。またアレルギー性疾患には、変異や欠陥を有する遺伝子の発現や、特定の遺伝子の過剰発現や発現量の減少が関わっていると考えられている。病気に関して遺伝子発現が果たしている役割を解明するためには、遺伝子が発症にどのように関わり、薬剤などの外的な刺激が遺伝子発現をどのように変化させるのかを理解する必要がある。

【0003】さて、現在アレルギー性疾患の診断においては、一般に、問診、家族歴、そして本人の既往症の確認が重要な要素となっている。またアレルギーをより客観的な情報に基づいて診断するために、血液を試料とする試験方法や、アレルゲンに対する患者の免疫学的な応答を観察する方法も実施されている。前者の例として、アレルゲン特異的IgE測定、白血球ヒスタミン遊離試験、あるいはリンパ球幼若化試験等が挙げられる。アレルゲン特異的IgEの存在は、そのアレルゲンに対するア

レルギー反応の証明である。しかし患者によっては、必ずしもアレルギー特異的なIgEを検出できるとは限らない場合もある。また、その測定原理上、診断に必要なアレルギーの全てに対して、試験を実施しなければならない。白血球ヒスタミン遊離試験やリンパ球幼若化試験は、免疫システムのアレルギーに対する反応をin vitroで観察する方法である。これらの方法は、操作が煩雑である。

【0004】一方、患者を実際にアレルギーに接触させたときに観察される免疫応答をアレルギーの診断に役立てる方法(後者)も公知である。ブリック・テスト、スクラッチ・テスト、パッチ・テスト、皮内反応、あるいは誘発試験等が、この種の試験に含まれる。これらの試験では、患者のアレルギー反応を直接診断することができる反面、実際に被検者をアレルギーに曝露する侵襲性の高い検査であると言うことができる。

【0005】この他、アレルギーに関わらず、アレルギー反応の関与を証明するための試験方法も試みられている。たとえば、血清IgE値が高値である場合、その患者にはアレルギー反応が起きていると推定することができる。血清IgE値は、アレルギー特異IgEの総量に相当する情報である。アレルギーの種類に関わらずIgEの総量を決定することは容易であるが、非アトピー型気管支炎等の疾患を持つ患者では、IgEが低値となる場合がある。

【0006】従って、患者に対する危険が少なく、しかも診断に必要な情報を容易に得ることができるアレルギー性疾患のマーカーが提供されれば有用である。このようなマーカーは、アレルギー性疾患の発症に深く関与していると考えられるので、診断のみならず、アレルギー症状のコントロールにおいても、重要な標的となる可能性がある。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、アレルギー性疾患の検査を可能とする新しい指標の提供、さらに、該指標に基づくアレルギー性疾患の検査方法、およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法の提供を課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、アレルギー性疾患の患者と健常者との間で発現レベルに差が見られる遺伝子を単離し、アレルギー反応との関連性を明らかにすることにより、アレルギー性疾患治療の新たな標的を見出すことができるものと考えた。

【0009】このような考えに基づき、本発明者らは、ステロイド軟膏治療を受けているアトピー性皮膚炎患者と健常者との間で発現状態の違う遺伝子の探索を行った。一般的にステロイド治療では、その応答としてグルココルチコイド受容体の発現変動が見られるが、今回の被検者においては、この発現変動の大きな差が見られな

いことから、患者と健常者間における遺伝子発現の変動は、ステロイド治療自体に起因するものではないと考えられる。また、遺伝子の発現状態を比較する生体試料としては、末梢血単核球を選択した。アトピー性疾患の患者への抗原刺激によって末梢血単核球からのIL-5、IL-6およびIL10の分泌が知られており、末梢血単核球はアレルギー反応と密接に関係している(Jenmalm M. C. et al., *Pediatr. Allergy Immunol.* 10: 168-177, 1999)。つまり、末梢血単核球において発現が変動する遺伝子は、アレルギー反応に深い関連性を有する遺伝子であると言える。さらに末梢血単核球は、取得するのが容易であるため偽陰性をなくすための高収量が期待でき、従って微量な遺伝子の発現を検出することが可能なものと考えられる。

【0010】本発明者らは、末梢血単核球における遺伝子の発現状態を解析した結果、defensin 1遺伝子がアレルギー性疾患の患者の単核球において、発現が増加していることを確認した。このdefensin 1遺伝子は、defensinファミリーに属する既知遺伝子であり、抗微生物(殺菌)作用を代表として、正常細胞や癌細胞に対する細胞障害作用、肥満細胞からのヒスタミン放出作用、単球走化性作用、および抗ACTH(副腎皮質刺激ホルモン)作用等を有する(Bateman A. et al., *J. Biol. Chem.* 1991; 266:7524-30)ことが知られている。しかし、アレルギー性疾患との直接的な関連性についてはこれまでのところ知られていない。今回、アレルギー性疾患患者の末梢血単核球において、該遺伝子の発現レベルに変動が観察されたという事実は、該遺伝子とアレルギー症状との深い結びつきを表しているものと言える。以上の知見に基づいて、本発明者らは、このdefensin 1遺伝子の発現レベル、あるいは該遺伝子によってコードされる蛋白質の活性を指標とすることにより、アレルギー性疾患の診断、および該疾患のための治療薬のスクリーニングをすることが可能であることを見出し、本発明を完成させた。

【0011】即ち、本発明はアレルギー性疾患の検査を可能とする新しい指標の提供、さらに、該指標に基づくアレルギー性疾患の検査方法、およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法に関し、より具体的には、〔1〕次の工程を含む、アレルギー性疾患の検査方法、(1)被検者の生体試料におけるdefensin 1遺伝子の発現レベルを測定する工程、(2)健常者の生体試料におけるdefensin 1遺伝子の発現レベルと比較する工程、〔2〕アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、〔1〕に記載の検査方法、〔3〕遺伝子の発現レベルを、cDNAのPCRによって測定する〔1〕に記載の検査方法、〔4〕遺伝子の発現レベルを、defensin 1遺伝子によってコードされる蛋白質の検出によって測定する〔1〕に記載の検査方法、〔5〕defensin 1遺伝子の塩基配列を含むポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相

補的な塩基配列を有する少なくとも15塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドからなる、アレルギー性疾患検査用試薬、〔6〕defensin 1蛋白質のアミノ酸配列を含むペプチドを認識する抗体からなる、アレルギー性疾患検査用試薬、〔7〕次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法、(1)defensin 1遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させる工程、(2)前記遺伝子の発現レベルを測定する工程、(3)対照と比較して前記遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程、〔8〕細胞が株化白血球細胞である〔7〕に記載の方法、〔9〕defensin 1遺伝子の塩基配列を含むポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも15塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドと、defensin 1遺伝子を発現する細胞を含む、アレルギー性疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングするためのキット、〔10〕defensin 1蛋白質のアミノ酸配列を含むペプチドを認識する抗体と、defensin 1遺伝子を発現する細胞を含む、アレルギー性疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングするためのキット、〔11〕defensin 1遺伝子の単核球における発現強度を上昇させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物からなるアレルギー性疾患モデル動物、〔12〕次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法、(1)〔11〕に記載のモデル動物に候補化合物を投与する工程、(2)前記モデル動物の生体試料におけるdefensin 1遺伝子の発現強度を測定する工程、(3)対照と比較して前記遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程、〔13〕次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法、(1)defensin 1遺伝子の転写調節領域と、この転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子とを含むベクターを導入した細胞と候補物質を接触させる工程、(2)前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、および(3)対照と比較して前記遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程、〔14〕次の工程を含む、アレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法、(1)defensin 1蛋白質と候補物質を接触させる工程、(2)前記蛋白質の活性を測定する工程、および(3)対照と比較して前記蛋白質の活性を低下させる化合物を選択する工程、〔15〕〔7〕、〔12〕、〔13〕、および〔14〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有する、アレルギー性疾患の治療薬、〔16〕defensin 1遺伝子、またはその一部のアンチセンスDNAを主成分として含むアレルギー性疾患の治療薬、〔17〕defensin 1蛋白質のアミノ酸配列を含むペプチドを認識する抗体を主成分として含む、アレルギー性疾患の治療薬、を提供するものである。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明において、アレルギー性疾

患(allergic disease)とはアレルギー反応の関与する疾患の総称である。より具体的には、アレルゲンが同定され、アレルゲンへの曝露と病変の発症に深い結びつきが証明され、その病変に免疫学的な機序が証明されることと定義することができる。ここで、免疫学的な機序とは、アレルゲンの刺激によって白血球細胞が免疫応答を示すことを意味する。アレルゲンとしては、ダニ抗原や花粉抗原等を例示することができる。

【0013】代表的なアレルギー性疾患には、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、花粉症、あるいは昆虫アレルギー等を示すことができる。アレルギー素因(allergic diathesis)とは、アレルギー性疾患を持つ親から子に伝えられる遺伝的な因子である。家族性に発症するアレルギー性疾患はアトピー性疾患とも呼ばれ、その原因となる遺伝的に伝えられる因子がアトピー素因である。アトピー性皮膚炎は、アトピー性疾患のうち、特に皮膚炎症状を伴う疾患に対して与えられた総称である。

【0014】本発明のアレルギー性疾患の検査方法は、被検者の生体試料におけるdefensin1遺伝子の発現レベルを測定し、健常者の測定値と比較する工程を含む。両者の比較の結果、健常者よりも発現が亢進している場合には、被検者がアレルギー性疾患であると判定される。

【0015】本発明において、defensin 1遺伝子の発現レベルとは、該遺伝子のmRNAへの転写、並びに蛋白質への翻訳を含む。従って本発明によるアレルギー性疾患の検査方法は、defensin 1遺伝子に対応するmRNAの発現強度、あるいは該遺伝子によってコードされる蛋白質の発現レベルの比較に基づいて行われる。

【0016】本発明におけるアレルギー性疾患の検査におけるdefensin 1遺伝子の発現レベルの測定は、公知の遺伝子解析方法にしたがって実施することができる。具体的には、例えばこの遺伝子にハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション技術、または本発明の遺伝子にハイブリダイズするDNAをプライマーとした遺伝子増幅技術等を利用することができる。

【0017】本発明の検査に用いられるプローブまたはプライマーは、defensin 1遺伝子の塩基配列に基づいて設定することができる。defensin 1遺伝子の塩基配列、および該遺伝子によってコードされるアミノ酸配列は公知である(GenBank登録番号:M26602)。

【0018】なお一般に高等動物の遺伝子は、高い頻度で多型を伴う。また、スプライシングの過程で相互に異なるアミノ酸配列からなるアイソフォームを生じる分子も多く存在する。多型やアイソフォームによって塩基配列が異なる遺伝子であっても、defensin 1遺伝子と同様の活性を持ち、アレルギーに関与する遺伝子は、いずれも本発明のdefensin 1遺伝子に含まれる。

【0019】プライマーあるいはプローブには、defensin 1遺伝子の塩基配列からなるポリヌクレオチド、また

はその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを利用することができる。ここで「相補鎖」とは、A:T (RNAの場合はU)、G:Cの塩基対からなる2本鎖DNAの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。塩基配列の相同性は、BLAST等のアルゴリズムにより決定することができる。

【0020】このようなポリヌクレオチドは、defensin 1遺伝子を検出するためのプローブとして、またdefensin 1遺伝子を増幅するためのプライマーとして利用することができる。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp~100bp、好ましくは15bp~35bpの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、defensin 1遺伝子(またはその相補鎖)の少なくとも一部若しくは全部の配列を有し、少なくとも15bpの鎖長のDNAが用いられる。プライマーとして用いる場合、3'側の領域は相補的である必要があるが、5'側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

【0021】なお、本発明における「ポリヌクレオチド」は、DNAあるいはRNAであることができる。これらポリヌクレオチドは、合成されたものでも天然のものでもよい。また、ハイブリダイゼーションに用いるプローブDNAは、通常、標識したものが用いられる。標識方法としては、例えば次のような方法を示すことができる。なお用語オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのうち、重合度が比較的低いものを意味している。オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドに含まれる。

- ・DNAポリメラーゼIを用いるニックトランスレーションによる標識

- ・ポリヌクレオチドキナーゼを用いる末端標識

- ・クレノーフラグメントによるフィルイン末端標識 (Berger SL, Kimmel AR. (1987) Guide to Molecular Cloning Techniques, Method in Enzymology, Academic Press; Hames BD, Higgins SJ (1985) Genes Probes: A Practical Approach. IRL Press; Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press)

- ・RNAポリメラーゼを用いる転写による標識 (Melton D A, Krieg, PA, Rebagkiati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR. (1984) Nucleic Acid Res., 12, 7035-7056)

- ・放射性同位体を用いない修飾ヌクレオチドをDNAに取り込ませる方法 (Kricka LJ. (1992) Nonisotopic DNA Probing Techniques. Academic Press)

【0022】ハイブリダイゼーション技術を利用したアレルギー性疾患の検査は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション法、ドットプロット法、DNAマイクロアレ

イを用いた方法などを使用して行うことができる。さらには、RT-PCR法等の遺伝子増幅技術を利用することができる。RT-PCR法においては、遺伝子の増幅過程においてPCR増幅モニター法を用いることにより、本発明の遺伝子の発現について、より定量的な解析を行うことが可能である。

【0023】PCR遺伝子増幅モニター法においては、両端に互いの蛍光を打ち消し合う異なった蛍光色素で標識したプローブを用い、検出対象 (DNAもしくはRNAの逆転写産物) にハイブリダイズさせる。PCR反応が進んでTaqポリメラーゼの5'-3'エクソヌクレアーゼ (exonuclease) 活性により同プローブが分解されると二つの蛍光色素が離れ、蛍光が検出されるようになる。この蛍光の検出をリアルタイムに行う。検出対象についてコピー数の明らかな標準試料について同時に測定することにより、PCR増幅の直線性のあるサイクル数で目的試料中の検出対象のコピー数を決定する (Holland, P.M. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280; Livak, K. J. et al., 1995, PCR Methods and Applications 4(6):357-362; Heid, C. A. et al., Genome Research 6:986-994; Gibson, E. M. U. et al., 1996, Genome Research 6:995-1001)。PCR増幅モニター法においては、例えば、ABI PRISM7700 (PEバイオシステムズ社) を用いることができる。

【0024】また本発明のアレルギー性疾患の検査方法は、defensin 1遺伝子によりコードされる蛋白質を検出することにより行うこともできる。このような検査方法としては、例えば、このdefensin 1蛋白質に結合する抗体を利用したウェスタンブロットティング法、免疫沈降法、ELISA法などを利用することができる。

【0025】この検出に用いるdefensin 1蛋白質に結合する抗体は、当業者に周知の技法を用いて得ることができる。本発明に用いる抗体は、ポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体 (Milstein C, et al., 1983, Nature 305(5934): 537-40) であることができる。例えば、defensin 1蛋白質に対するポリクローナル抗体は、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出し、この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用することができる。あるいは必要に応じてこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離することもできる。また、モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物から免疫細胞を取り出して骨髄腫細胞などと細胞融合させる。こうして得られたハイブリドマをクローニングして、その培養物から抗体を回収しモノクローナル抗体とすることができる。

【0026】defensin 1蛋白質の検出には、これらの抗体を適宜標識して用いればよい。また、この抗体を標識せずに、該抗体に特異的に結合する物質、例えば、プロテインAやプロテインGを標識して間接的に検出すること

もできる。具体的な検出方法としては、例えば、ELISA法を挙げることができる。

【0027】抗原に用いる蛋白質もしくはその部分ペプチドは、例えばdefensin 1遺伝子もしくはその一部を発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して、形質転換体を作成し、該形質転換体を培養して組み換え蛋白質を発現させ、発現させた組み換え蛋白質を培養液または培養上清から精製することにより得ることができる。あるいは、該遺伝子によってコードされるアミノ酸配列、あるいは全長cDNAによってコードされるアミノ酸配列の部分アミノ酸配列からなるオリゴペプチドを

化学的に合成し、免疫原として用いることもできる。【0028】更に本発明においては、defensin 1遺伝子の発現レベルのみならず、生体試料におけるdefensin 1蛋白質の活性を指標として、アレルギー性疾患の検査を行うこともできる。defensin 1蛋白質の活性とは、該蛋白質が備える生物学的な活性を言う。defensin 1蛋白質の活性の検出は、defensin 1蛋白質の抗体を用いたELISA法、またはウェスタンブロット法等の公知の方法に基づいて行うことができる。

【0029】本発明の検査方法においては、通常、被検者の生体試料を試料とする。生体試料としては、血液、喀痰、鼻粘膜分泌物等を用いることができるが、好ましくは、末梢血単核球細胞を用いる。末梢血単核球細胞は、末梢血から公知の方法によって調製することができる。例えば、実施例1に示す方法によって調製することができる。調製された単核球を破壊してライセートとすれば、defensin 1蛋白質の免疫学的な測定のための試料とすることができる。また、本発明の単核球細胞以外の生体試料の採取方法についても公知である。

【0030】上記の生体試料からライセートを調製すれば、defensin 1蛋白質の免疫学的な測定のための試料とすることができる。あるいはこのライセートからmRNAを抽出すれば、defensin 1遺伝子に対応するmRNAの測定のための試料とすることができる。生体試料のライセートまたはmRNAの抽出には、市販のキットを利用すると便利である。上記試料は、必要に応じて緩衝液等で希釈して本発明の方法に使用することができる。

【0031】本発明におけるdefensin 1遺伝子の発現レベルの測定値は、公知の方法によって補正することができる。補正により、細胞における遺伝子の発現レベルの変化を比較することができる。測定値の補正は、上記生体試料における各細胞において、発現レベルが大きく変動しない遺伝子(例えば、ハウスキーピング遺伝子)の発現レベルの測定値に基づいて、本発明においてdefensin 1遺伝子の発現レベルの測定値を補正することによって行われる。発現レベルが大きく変動しない遺伝子の例としては、 β -アクチン、GAPDH等を挙げることができる。

【0032】本発明におけるdefensin 1遺伝子は、健康

者とアトピー性皮膚炎患者との比較において、患者の単核球で発現量の増加を示した。従って、defensin 1遺伝子の発現レベルを指標として、アレルギー性疾患の検査を行うことができる。

【0033】本発明におけるアレルギー性疾患の検査とは、たとえば以下のような検査が含まれる。アレルギーが疑われる症状を示しながら、一般的な検査ではアレルギー性疾患と判定できない患者であっても、本発明に基づく検査を行えばアレルギー性疾患の患者であるか否かを容易に判定することができる。より具体的には、アレルギー性疾患が疑われる症状を示す患者におけるdefensin 1遺伝子の発現の上昇は、その症状の原因がアレルギー性疾患である可能性が高いことを示している。

【0034】あるいは、アレルギー症状が改善に向かっているのかどうかを判断するための検査が可能となる。つまり、アレルギー性疾患に対する治療効果の判定に有用である。また、アレルギー性疾患と診断された患者におけるdefensin 1遺伝子の発現の上昇は、アレルギー性疾患がさらに進行している可能性が高いことを示している。

【0035】また本発明は、defensin 1遺伝子の単核球細胞における発現レベルを上昇させたトランスジェニック非ヒト動物のアレルギー性疾患モデル動物に関する。

【0036】本発明によって、defensin 1遺伝子の単核球細胞における発現レベルが、アトピー性皮膚炎患者の単核球において上昇することが明らかとなった。従って、単核球細胞においてdefensin 1遺伝子の発現レベルを人為的に増強した動物は、アレルギー性疾患のモデル動物として利用することができる。該アレルギー性疾患モデル動物は、アレルギーにおける生体内の変化を明らかにするために有用である。更に、該アレルギー性疾患モデル動物を使用することにより、defensin 1遺伝子のさらなる機能を解明すること、および該遺伝子を標的とする薬剤を評価することには大きな意義がある。

【0037】また本発明によるアレルギー性疾患モデル動物は、後に述べるアレルギー性疾患の治療または予防のための医薬品のスクリーニングに加えて、アレルギー性疾患のメカニズムの解明、さらにはスクリーニングされた化合物の安全性の試験に有用である。たとえば本発明によるアレルギー疾患モデル動物が皮膚炎を発症したり、何らかのアレルギー性疾患に関連した測定値の変化を示せば、それを回復させる作用を持った化合物を探索するスクリーニングシステムが構築できる。

【0038】本発明において、発現レベルの上昇とは、目的とする遺伝子が外来遺伝子として導入され強制発現している状態、あるいは宿主が備える遺伝子の転写と蛋白質への翻訳が増強されている状態、並びに翻訳産物である蛋白質の分解が抑制された状態のいずれかを意味する。遺伝子の発現レベルは、たとえば実施例に示すような定量的なPCRにより確認することができる。また翻訳

産物である蛋白質の活性は、正常な状態と比較することにより確認することができる。

【0039】代表的なトランスジェニック動物は、目的とする遺伝子を導入し強制発現させた動物である。この他のトランスジェニック動物には、たとえば遺伝子のコード領域に変異を導入し、その活性を増強したり、あるいは分解されにくいアミノ酸配列に改変した動物などを示すことができる。アミノ酸配列の変異として、置換、欠失、挿入、あるいは付加を示すことができる。その他、遺伝子の転写調節領域を変異させることにより、本発明の遺伝子の発現そのものを調節することもできる。

【0040】特定の遺伝子を対象として、トランスジェニック動物を得る方法は公知である。すなわち、遺伝子と卵を混合してリン酸カルシウムで処理する方法や、位相差顕微鏡下で前核期卵の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第4873191号）、胚性幹細胞（ES細胞）を使用する方法などによってトランスジェニック動物を得ることができる。その他、レトロウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵に導入する精子ベクター法等も開発されている。精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である（M. Lavitrano et al., Cell, 57, 717, 1989）。

【0041】本発明のアレルギー性疾患モデル動物として用いるトランスジェニック動物は、ヒト以外のあらゆる脊椎動物を利用して作成することができる。具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ミニブタ、ヤギ、ヒツジ、あるいはウシ等の脊椎動物において様々な遺伝子の導入や発現レベルを改変されたトランスジェニック動物が作り出されている。

【0042】さらに本発明は、アレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法に関する。本発明において、defensin 1遺伝子は、アレルギー性疾患を持つ患者において有意に発現レベルが上昇している。従って、該遺伝子の発現レベルを低下させることができる化合物を選択することによって、アレルギー性疾患の治療薬を得ることができる。本発明において遺伝子の発現レベルを低下させる化合物とは、遺伝子の転写、翻訳、蛋白質の活性発現のいずれかのステップに対して阻害的に作用する作用を持つ化合物である。

【0043】本発明のアレルギー性疾患治療候補化合物のスクリーニング方法は、in vivoで行うこともin vitroで行うこともできる。このスクリーニングは、例えば以下のような工程にしたがって実施することができる。

(1) 被験動物に、候補化合物を投与する工程、(2) 前記動物の生体試料におけるdefensin 1遺伝子の発現レベルを測定する工程、(3) 対照と比較して、defensin

1遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

【0044】本発明のスクリーニング方法における被験動物としては、例えばヒトのdefensin 1遺伝子を強制発現させたトランスジェニック動物からなる本発明の上記アレルギー性疾患モデル動物を利用することができる。発現ベクターに使用するプロモーターとして、適当な薬剤等の物質により転写が調節されるプロモーターを用いれば、該物質の投与によってトランスジェニック動物における外来性のdefensin 1遺伝子の発現レベルを調整することができる。

【0045】このようにしてdefensin 1遺伝子を強制発現させたモデル動物に薬剤候補化合物を投与し、モデル動物由来の生体試料におけるdefensin 1遺伝子の発現に対する化合物の作用をモニターすることにより、defensin 1遺伝子の発現レベルに与える薬剤候補化合物の影響を検出することができる。被験動物の由来の生体試料におけるdefensin 1遺伝子の発現レベルの変動は、前記本発明の検査方法と同様の手法によってモニターすることができる。更にこの検出の結果に基づいて、defensin 1遺伝子の発現レベルを低下させる薬剤候補化合物を選択すれば、薬剤候補化合物をスクリーニングすることができる。

【0046】より具体的には、被験動物から、生体試料を採取し、defensin 1遺伝子の発現レベルを対照と比較することにより、本発明によるスクリーニングを実施することができる。生体試料としては、平滑筋細胞、角化細胞、鼻粘膜上皮細胞、腸上皮細胞、単核球、リンパ球、マスト細胞、好酸球、好塩基球、あるいは好中球等を利用することができる。これらの生体試料の採取方法、および調製方法は公知である。

【0047】このようなスクリーニングにより、defensin 1遺伝子の発現に様々な形で関与する薬剤を選択することができる。具体的には、たとえば次のような作用点を持つ薬剤候補化合物を見出すことができる。

- ・defensin 1遺伝子の発現をもたらしシグナル伝達経路の活性化
- ・defensin 1遺伝子の転写活性の上昇
- ・defensin 1遺伝子の転写産物の安定化もしくは分解の阻害等

【0048】また、in vitroでのスクリーニングにおいては、例えば、defensin 1遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させ、該遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する方法が挙げられる。このスクリーニングは、例えば以下のような工程に従って実施することができる。

(1) defensin 1遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させる工程(2) 前記遺伝子の発現レベルを測定する工程、(3) 対照と比較して、前記遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する工程

【0049】本発明において、defensin 1遺伝子を発現する細胞は、defensin 1遺伝子を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより得ることができる。利用できるベクター、および宿主細胞は、本発明の遺伝子を発現し得るものであればよい。宿主-ベクター系における宿主細胞としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等が例示でき、それぞれ利用できるベクターを適宜選択することができる。

【0050】ベクターの宿主への導入方法としては、生物学的方法、物理的方法、化学的方法などを示すことができる。生物学的方法としては、例えば、ウイルスベクターを使用する方法、特異的受容体を利用する方法、細胞融合法(HVJ(センダイウイルス)、ポリエチレングリコール(PEG)、電気的細胞融合法、微少核融合法(染色体移入))が挙げられる。また、物理的方法としては、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、ジーンパーティクルガン(gene gun)を用いる方法が挙げられる。化学的方法としては、リン酸カルシウム沈殿法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、プロトプラスト法、赤血球ゴースト法、赤血球膜ゴースト法、マイクロカプセル法が挙げられる。

【0051】本発明のスクリーニング方法においては、defensin 1遺伝子を発現する細胞として、末梢血白血球細胞、白血球由来株化細胞を用いることができる。白血球細胞としては、単核球細胞、未熟好中球を例示することができる。この中でも、顆粒球系株化細胞は、本発明のスクリーニング方法に好適である。

【0052】スクリーニングの方法は、まず前記株化白血球細胞に候補化合物を添加する。その後、該株化白血球細胞におけるdefensin 1遺伝子の発現レベルを測定し、該遺伝子の発現レベルを低下させる化合物を選択する。

【0053】なお本発明のスクリーニング方法において、defensin 1遺伝子の発現レベルは、該遺伝子がコードする蛋白質の発現レベルのみならず、対応するmRNAを検出することにより比較することもできる。mRNAによって発現レベルの比較を行うには、蛋白質試料の調製工程に代えて、先に述べたようなmRNA試料の調製工程を実施する。mRNAや蛋白質の検出は、先に述べたような公知の方法によって実施することができる。

【0054】さらに本発明の開示に基づいて本発明の遺伝子の転写調節領域を取得し、レポーターアッセイ系を構築することができる。レポーターアッセイ系とは、転写調節領域の下流に配置したレポーター遺伝子の発現量を指標として、該転写調節領域に作用する転写調節因子をスクリーニングするアッセイ系をいう。

【0055】転写調節領域としては、プロモーター、エンハンサー、さらには、通常プロモーター領域に見られるCAATボックス、TATAボックス等を例示することができる。またレポーター遺伝子としては、CAT(chlorampheni

col acetyltransferase)遺伝子、ルシフェラーゼ(luciferase)遺伝子、成長ホルモン遺伝子等を利用することができる。本発明におけるdefensin 1遺伝子は、既に転写調節領域が明らかにされている(Human neutrophil peptide-1 gene, complete cds. (accession; L12690))。

【0056】あるいは本発明におけるdefensin 1遺伝子の転写調節領域を、次のようにして取得することもできる。すなわち、まず本発明で開示したcDNAの塩基配列に基づいて、BACライブラリー、YACライブラリー等のヒトゲノムDNAライブラリーから、PCRまたはハイブリダイゼーションを用いる方法によりスクリーニングを行い、該cDNAの配列を含むゲノムDNAクローンを得る。得られたゲノムDNAの配列を基に、本発明で開示したcDNAの転写調節領域を推定し、該転写調節領域を取得する。得られた転写調節領域を、レポーター遺伝子の下流に位置するようにクローニングしてレポーターコンストラクトを構築する。得られたレポーターコンストラクトを培養細胞株に導入してスクリーニング用の形質転換体とする。この形質転換体に候補化合物を接触させ、レポーター遺伝子の発現を制御する化合物のスクリーニングを行うことができる。

【0057】これらスクリーニングに用いる被験候補化合物としては、ステロイド誘導体等既存の化学的方法により合成された化合物標品、コンビナトリアルケミストリーにより合成された化合物標品のほか、動・植物組織の抽出物もしくは微生物培養物等の複数の化合物を含む混合物、またそれらから精製された標品などが挙げられる。

【0058】本発明による各種のスクリーニング方法に必要な、ポリヌクレオチド、抗体、細胞株、あるいはモデル動物は、予め組み合わせてキットとすることができる。これらのキットには、標識の検出に用いられる基質化合物、細胞の培養のための培地や容器、陽性や陰性の標準試料、更にはキットの使用方を記載した指示書等をパッケージしておくこともできる。

【0059】本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物は、アレルギー性疾患の治療薬として有用である。あるいは、defensin 1遺伝子の発現を抑制することができるアンチセンスDNAも、アレルギー性疾患の治療薬として有用である。さらに、defensin 1蛋白質のアミノ酸配列を含むペプチドを認識する抗体も、アレルギー性疾患の治療薬として有用である。defensin 1遺伝子は、アレルギー性疾患患者の単核球において発現が上昇する遺伝子である。従って、該遺伝子の発現を抑制する、あるいは該遺伝子によってコードされる蛋白質の機能を抑制することによって、アレルギー性疾患の治療効果を期待することができる。

【0060】本発明のアレルギー性疾患の治療薬は、スクリーニング方法によって選択された化合物を有効成分として含み、生理学的に許容される担体、賦形剤、ある

いは希釈剤等と混合することによって製造することができる。本発明のアレルギー性疾患の治療剤は、アレルギー症状の改善を目的として、経口、あるいは非経口的に投与することができる。

【0061】経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、乳剤、あるいは懸濁剤等の剤型を選択することができる。注射剤には、皮下注射剤、筋肉注射剤、あるいは腹腔内注射剤等を示すことができる。

【0062】また、投与すべき化合物がタンパク質からなる場合には、それをコードする遺伝子を遺伝子治療の手法を用いて生体に導入することにより、治療効果を達成することができる。治療効果をもたらすタンパク質をコードする遺伝子を生体に導入し、発現させることによって、疾患を治療する手法は公知である。

【0063】あるいはアンチセンスDNAは、適当なプロモーター配列の下流に組み込み、アンチセンスRNA発現ベクターとして投与することができる。この発現ベクターをアレルギー疾患患者の単核球細胞へ導入すれば、これらの遺伝子のアンチセンスを発現し、当該遺伝子の発現レベルの低下によってアレルギーの治療効果を達成することができる。単核球細胞への発現ベクターの導入としては、*in vivo*、あるいは*ex vivo*で行う方法が公知である。

【0064】投与量は、患者の年齢、性別、体重および症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分の種類などにより異なるが、通常成人一人あたり、一回につき0.1 mgから500 mgの範囲で、好ましくは0.5 mgから20 mgの範囲で投与することができる。しかし、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量よりも少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を超える投与量が必要な場合もある。

【0065】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1] DNAチップを使った候補遺伝子の選択

(1) DNAチップ用のRNAの調製

健康人ボランティア2名(以下、「健常群」と記載)、ステロイド軟膏治療応答者3名、弱応答者3名(以下、それぞれ「ステロイド応答群」、「ステロイド弱応答群」と記載。また、両群を合わせて「患者群」と記載)からヘパリン採血した。次いで以下の方法により血液を比重遠心分離して単核球分画を採取し、培養した。

【0066】全血(ヘパリン抗凝固剤使用、最終濃度50 unit/mL) 40 mLを遠心管に入れた。次いで、等量の3% dextran/0.9% NaClを加え、静かに数回、転倒混和して室温に30分静置した。静置後、上清(platelet rich plasma)を回収し、1,200 rpm (revolutions per minute、毎分回転)で5分間、室温で遠心した。上清を除き、ペレ

ットを5 mLのHank's Balanced Salt Solutions (HBSS, GIBCO BRL)で懸濁後、5 mLのFicol-Paque™ PLUS(Amersham Pharmacia Biotech)に重層し、1,200 rpmで5分間、室温遠心後、回転数を1,500 rpmに上げ、更に30分間、室温で遠心した。上清を除いて中間層を回収し、これをPBSで懸濁後、1,500 rpmで5分間、室温で遠心した。上清を捨てペレットをPBSで再懸濁し、1,500 rpmで5分間、室温で遠心した。ペレットをRPMI1640 (GIBCO BRL) /10%FCS(SIGMA) 10 mLに懸濁した。懸濁液20 μLを取り、Trypan Blue Stain 0.4% (GIBCO BRL) で細胞染色を行い、細胞数を数えた。10 mLのRPMI1640/10%FCS (1.5×10⁶個/mL)を調製し、37℃、CO₂ 5%下で24時間培養を行った。次いで、以下の方法に従って全RNAを抽出した。

【0067】全RNA抽出は、RNA抽出キットISOGEN (ニッポンジーン)を用いてその説明書に従って行った。培養後の細胞を3 mLのIsogen (4M guanidium thiocyanate, 25mMsodium cyanate, 0.5% Sarcosyl, 0.1M β-メルカプトエタノール,pH7.0)に溶解させた。20Gカテラン注射針付2.5 mL注射器で20~30回吸出操作を行った。CHCl₃を0.6 mL (Isogenの1/5量)加えて、ミキサーで15秒間混合させた後、室温で2~3分間静置させた。4℃で15,000 rpm、15分間遠心を行った。上清を新しいチューブに移し、Ethachinmate (ニッポンジーン)3μL、イソプロパノール1.5 mL (Isogenの1/2量)を加え、転倒混和して室温に10分間静置させた。4℃で15,000rpm、15分間遠心を行い、沈殿物に75% エタノール3 mL (Isogenの等量)を加え、15,000 rpm、4℃で5分間遠心した。沈殿物を風乾もしくは2~3分間真空乾燥させた。RNase-free DWを10 μL加えてRNA溶液とした。

【0068】(2) DNAチップ用のcDNA合成

全RNA 2-5 μgから、T7-(dT)₂₄ (Amersham Pharmacia Biotech)をプライマーとして、Affymetrix社のExpression Analysis Technical Manualの方法に従いSuperscript II Reverse Transcriptase(Life Technologies社)を用いて逆転写し1本鎖 cDNAを作製した。T7-(dT)₂₄プライマーは、以下のようにT7プロモーターの塩基配列にd(T)₂₄を付加した塩基配列からなる。

T7-(dT)₂₄プライマー: 5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTC ACTATAGGAGGCGG-(dT)₂₄-3' (配列番号: 1)

【0069】次に、Expression Analysis Technical Manualに従い、DNA Ligase, DNA polymerase I、およびRNase Hを加え、2本鎖cDNAを合成した。cDNAをフェノール・クロロホルム抽出後、Phase Lock Gelsに通し、エタノール沈澱し精製した。さらに、BioArray High Yield RNA Transcription Labeling Kitを用い、ピオチンラベルしたcRNAを合成した。RNeasy Spin column (QIAGEN)を用いてcRNAを精製し、熱処理により断片化した。そのうち12.5 μgのcRNAをExpression Analysis Technical Manualに従いHybridization Cocktailに加えた。これを

アレイに入れ、45℃で16時間ハイブリダイゼーションした。DNAチップとしてはGeneChip[®] HuGeneFL (Affymetrix社製)を用いた。GeneChip[®] HuGeneFLは、およそ5600種類のヒトcDNAやESTに由来する塩基配列からなるプローブで構成されている。DNAチップを洗浄した後、Streptavidin Phycoerythrinを加え染色した。洗浄後、normal ヤギIgGとビオチン化ヤギ抗ストレプトアビジンIgG抗体の抗体混合液をアレイに加えた。さらに、蛍光強度を増強する目的で、再度Streptavidin Phycoerythrinを加え染色した。洗浄後、スキャナーにセットし、DNAチップ解析ソフトにて解析した。

【0070】(3) DNAチップ解析

DNAチップ解析ソフトであるSuiteを用いて発現蛍光感度を測定し、データ解析を行った。まず全てのチップについてAbsolute analysisを行い、用いたサンプル各々の遺伝子発現量を測定した。

【0071】1個のチップデータの解析は、プローブセットのパーフェクトマッチとミスマッチの蛍光強度を比較して、positiveとnegativeを決定した。Positive Fraction、Log Avg、Pos/Negの値から判定されるAbsolute CallであるP(present)、A (absent)、およびM (marginal)の3区分の判定を行った。用語定義は以下に示した。

Positive Fraction; Positiveなペアの割合

Log Avg; パーフェクトマッチとミスマッチのプローブセルの蛍光強度比の対数の平均

Pos/Neg; Positiveペア数とNegativeペア数の比

また、パーフェクトマッチとミスマッチのプローブセルの蛍光強度の差の平均値であるAverage Difference (Avg Diff) も計算した。

【0072】次に2つのデータの比較を行った。比較実*30

健常1 対 応答1、応答2、応答3、弱応答1、弱応答2、弱応答3

健常2 対 応答1、応答2、応答3、弱応答1、弱応答2、弱応答3

上記の12通りの組み合わせで、患者群と健常群で同様な発現変動が認められる遺伝子を選抜した。

【0075】Gene Chip Comparison Analysisにより選出された遺伝子の分類を表1に示す。rawデータ測定値

無刺激状態	応答群		弱応答群	
	上昇	減少	上昇	減少
健常人	2	0	7	41
応答群			4	2

【0077】ABI7700と相関を付けるために、Absolute analysisのAvg Diff値を基に各々の アクチンによる補正を行い、健常群と患者群で興味深い変動を示した遺伝子について最終的に選抜した。その結果、患者群で発現レベルの上昇が見られた遺伝子としてdefensin 1遺伝子が選抜された。defensin 1遺伝子は、アトピー性皮膚炎患者において発現レベルが上昇するアトピー性皮膚炎疾患に密接に関連した遺伝子である。

【0078】[実施例2] defensin 1遺伝子の末梢血単

*験は基準に対するチップを決め、基準チップの全遺伝子発現量を基準にComparison Analysisを行った。基準は健常人1人について、患者群6人のComparison Analysisを行った。基準となる健常人について発現量の高い遺伝子は、ソフト内の計算値の一つであるfold change値が-3以下で、かつ

(i) 健常人についての遺伝子発現判断基準Absolute callがP(present)の遺伝子

(ii) 患者においての遺伝子発現判断基準Absolute callがA(absent)またはM(marginal)の遺伝子は、健常人の発現判断基準M(marginal)の遺伝子

(i)(ii)どちらかを満たす遺伝子を絞り込み、difference callの値がNC(Not change)、MD(Marginal Decrease)、D(Decrease)を選んだ。

【0073】一方、発現量の低い遺伝子については、fold change値が3以上で、かつ

(i)患者についてのAbsolute callがP(present)の遺伝子

(ii)健常人においてのAbsolute callがA(absent)またはM(marginal)の遺伝子は、患者の発現判断基準M(marginal)の遺伝子

(i)(ii)どちらかを満たす遺伝子を絞り込み、difference callの値がNC(Not change)、MI(Marginal Increase)、I(Increase)を選んだ。次いで、Avg Diff値のlogスケールでのscatter plotsを用いた図から、原点に近い遺伝子は削除した。

【0074】解析ソフトSuiteで選んだ遺伝子については、健常群の遺伝子発現が高い場合では、基準となる二人の合計12通りの解析結果で選ばれた遺伝子のみを選抜出した。

からfold change3倍以上、1/3倍以下のものを示す。

【0076】

【表1】

核球細胞での発現レベルの確認

実施例1で選択されたdefensin 1遺伝子の発現量を定量的に確認するために、重症アトピー性皮膚炎患者と健常者の末梢血より単離した単核球細胞(PBMC; peripheral blood mononuclear cell)において、defensin 1遺伝子の発現変動について解析を行った。

【0079】健常人ボランティア7名(以下、「健常群」と記載)、ステロイド軟膏治療応答者5名、弱応答者6名(以下、それぞれ「ステロイド応答群」、「ステ

ロイド弱応答群」と記載。また、両群を合わせて「患者群」と記載)を被検者とした。実施例において用いる、遺伝子発現定量のための、PBMC (peripheral blood mononuclear cell, 末梢血単核球細胞)分離・培養、RNA抽出操作は、実施例1(1)に記載の方法に従って行った。逆転写反応操作、および定量的PCRの方法は以下の通りである。

【0080】(1)全RNAのDNase処理

全RNA溶液20 μ g、10 \times DNase Buffer 5 μ L (ニッポンジーン)、RNase inhibitor (Amersham Pharmacia Biotech) 25ユニット、DNase I(ニッポンジーン)1ユニットを加え、DNase & RNase freeの水で50 μ Lとした。37 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベーションを行い、25 μ Lの水飽和フェノール(pH 8.0)、25 μ LのCHCl₃を加え、転倒混和した。室温で15,000 rpm、15分間遠心した後、上清に5 μ Lの3M酢酸ナトリウム (pH5.2)、125 μ Lのエタノール、1 μ LのEthachinmateを加え、-20 $^{\circ}$ Cに15分間置いた。4 $^{\circ}$ Cで15,000 rpm、15分間遠心を行い、沈殿物に125 μ Lの80%エタノールを加えた。4 $^{\circ}$ Cで15,000 rpm、5分間遠心を行い、沈殿物を風乾もしくは2~3分間真空乾燥させた。RNase-free DWを10 μ L加えて吸光度を測定しRNA溶液とした。

【0081】(2)逆転写反応

RNA溶液1-5 μ g、Oligo(dT)₁₂₋₁₈プライマー(GIBCO BRL)500 ng、BSA 1 μ gを加え、滅菌蒸留水で12 μ Lとした。70 $^{\circ}$ Cで10分間静置し、氷冷した。5 \times First Strand Buffer (GIBCO BRL)4 μ L、1M DTT 2 μ L、10mM dNTPs 1 μ L (N=G、A、T、C)を加え、混和した。42 $^{\circ}$ Cで2分間、加温した後、200ユニットのSuperScriptII(GIBCO BRL)を加え、42 $^{\circ}$ Cで50分間反応させた。70 $^{\circ}$ Cで15分間処理し、逆転写酵素を失活させ、2ユニットのRNaseH (GIBCO BRL)を加え、37 $^{\circ}$ C20分間加温した。滅菌蒸留水を加えて10ng/ μ L濃度のcDNA溶液とし、定量的PCR反応に供した。

【0082】(3)目的領域のPCR増幅

10 \times PCR Buffer (100 mM Tris-HCl, pH8.3、500 mM KCl、15 mM MgCl₂)5 μ L、2.5 mM dNTPs 4 μ L (N=G、A、T、C)、プライマーF 10 pmol/ μ L、プライマーR 10 pmol/ μ L、5 ng cDNA溶液、1.25ユニットrTaq DNAポリメラーゼ (TaKaRa)を加え、滅菌蒸留水で50 μ Lとした。プライマーは下記の塩基配列を有する。

【0083】プライマーF: 5'- CCA GGC TCA AGG AAA AAC ATG -3' (配列番号: 2)

プライマーR: 5'- AGG TTC CAT AGC GAC GTT CTC -3' (配列番号: 3)

【0084】95 $^{\circ}$ C、10分間静置後、反応サイクル:95 $^{\circ}$ C、15秒 60 $^{\circ}$ C、1分を1サイクルとし、40サイクル実施した。次いで、電気泳動緩衝液1 \times TAE (50 \times TAEは1リットル中、Trisベース242g、57.1ml氷酢酸、EDTA 50mM含有、pH8.0)を用いて、3%アガロースゲル(Agarose-1000、GIBCO-BRL)/5 μ g/mlエチジウムブロマイドを使用

し、電圧100Vで30分間泳動した。UVランプでPCR産物76bpのバンドを観察した。

【0085】(4)DNA断片切り出し

目的PCR産物のゲルからの切り出しは、QIAEX II Agarose Gel Extractionキット(QIAGEN)を用いてその説明書に従って行った。PCR産物の3%アガロースゲルにより分離した後、目的断片を長波長(316 nm)UVで切り出した。ゲルを剃刀を用いて細断し、1.5mlチューブ(~250 mg gel)に移した。6倍量のBufferQX1 (ex.gel 50mgに対して300 μ l)、10 μ LのQIAEX IIガラスビーズを加え30秒間vortex mixerを用いてよく攪拌した。50 $^{\circ}$ Cで10分間加温し、この時、数分おきに混和し、混合液が黄色になっていることを確認した。もし混合液がオレンジか紫なら10 μ Lの3M酢酸ナトリウム(pH5.0)を加える。室温で12,000 rpm、30秒間遠心した後、沈殿物に500 μ LのBufferQX1を加え、vortex mixerを用いてよく攪拌し、室温で12,000 rpm、30秒間遠心した。次いで、沈殿物に500 μ LのPE溶液を加え、室温で12,000 rpm、30秒間遠心した(操作(A))。操作(A)を2回繰り返して、上清を捨て、ペレットが白くなるまで乾燥させた。20 μ Lの滅菌蒸留水を加え、5分間静置した後、室温で12,000 rpm、30秒間遠心し、上清を回収した(操作(B))。操作(B)を2回繰り返した後、アガロースゲル電気泳動で抽出確認を行った。

【0086】(5)PCR産物のTAクローニング

精製PCR産物のクローニングは、pGEM^R-T Easy Vector System I (Promega)を用いてその説明書に従って行った。2 \times Rapid Ligation Buffer 5 μ L、pGEM^R-T Easy Vector(50ng/ μ L)1 μ L、精製PCR産物3 μ L、T4 DNA Ligase(3 weiss units/ μ l)1 μ Lを混ぜ、室温で1時間(もしくは16 $^{\circ}$ Cで一昼夜)静置した。ライゲーション反応液2 μ LをCompetent Cell DH5 (GIBCO BRL)50 μ Lに加え、氷上で20分間静置した。42 $^{\circ}$ Cで45~50秒間の熱ショック処理を行い、氷上で2分間静置した。SOCmedium (GIBCO BRL)950 μ Lを加え、37 $^{\circ}$ Cで1~1.5時間、150 rpmで混和した後、培養液100 μ LをLB/amp/IPTG/X-galにプレatingし、37 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。

【0087】(6)plasmid DNA抽出

サブクローンプラスミドDNAはWizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega)を用いてその説明書に従って行った。白コロニーをピックアップし、100 μ g/mLアンピシリン-LB培地1~5mLで37 $^{\circ}$ Cで一晩培養し、3,000 rpmで6分間遠心した。沈殿物に250 μ Lのresuspended solutionを加え懸濁し、250 μ LのLysis solutionを加え、4回転倒混和した。10 μ LのAlkaline Proteinaseを加え、4回転倒混和し、5分間室温にて静置した。350 μ LのNeutralization solutionを加えて4回転倒混和し、室温で14,000 rpm、10分間遠心した。次いで、上清をデカンテーションで添付カラムに移し、室温で14,000 rpm、10分間遠心した。カラム部分(フォロースルーは

捨てる)に700 μ LのWash solutionを加え、室温で14,000 rpm、1分間遠心した。カラム部分(フォロースルーは捨てる)に250 μ LのWash solutionを加え、室温で14,000 rpm、2分間遠心した。カラム部分を新しいチューブに移し、20 μ Lの滅菌蒸留水を加え、室温で14,000 rpm、1分間遠心した。溶液をプラスミドDNAとし、吸光度測定にて濃度を決定した。

【0088】(7) シークエンス反応

サブクローンプラスミドDNAが目的DNA配列を含んでいるかを確認するためのシークエンス反応は、Thermo Sequi 10 nase IIダイターミネーター(Amersham Pharmacia Biotech)を用いてその説明書に従って行った。M13 primer 3 pmol、DNA溶液200~300 ng、TSII Reagent Mix 2 μ Lを加え、滅菌蒸留水で10 μ Lとした。96 $^{\circ}$ C、1分間静置後、反応サイクル:96 $^{\circ}$ C、30秒 50 $^{\circ}$ C、15秒 60 $^{\circ}$ C、1分を1サイクルとし、30サイクル実施し、反応終了後は4 $^{\circ}$ Cに設定した。反応液に1.5M酢酸ナトリウム/250 mM EDTAを1 μ L加え、vortex mixerで攪拌した。イソプロパノール20 μ Lを加えよく混和後、室温で10分間静置した。12,000 rpmで20分間遠心を行い、沈殿に70%エタノール150 μ L 20 を加え、混和した。12,000 rpmで5分間遠心を行い、沈殿物を風乾もしくは2~3分間真空乾燥させた。次いで、ローディングダイ1.5 μ Lを加え、95 $^{\circ}$ Cで2分間熱処理を行い、氷冷した。ABI377 DNAシークエンサー(Applied Biosystems)にセットしたLongRangerゲル(LongRanger 5 mL、尿素15 g、10 \times TBE 5mL、10%APS 250 μ L、TEMED 35 μ L、滅菌蒸留水で50 mLとする)に全量アプライし、泳動を開始した。目的DNA配列を含んでいることを確認の後、これを標準サンプルとした。

【0089】(8) 定量的PCR

遺伝子発現定量は、ABI PRISM 7700 Systemを用いたTaq Manプローブ使用のリアルタイムPCRにより行い、その説明書に従って行った。反応試薬はTaqMan 1000Reaction PCR Core reagents (Applied Biosystems)を用い、その説明書に従って行った。検量線作成のための標準サンプルは最低5段階の濃度勾配、 $10^7 \sim 10^3$ コピーを作成した。1サンプル当りのn数は最低2つとした。10 \times Buffer A 5 μ L、25 mM MgCl₂ 7 μ L、10mM dNTPs 1 μ L (N=G、A、T、C)ずつ、AmpTaqGold 1.25ユニット、UNG 0.5ユニット、プライマーF (配列番号: 2) 10 pmol、プライ 40 マーR (配列番号: 3) 10 pmol、cDNA溶液 5 ng、TaqM

an Probe 5 pmolを加え、滅菌蒸留水で50 μ Lとした。プローブは下記の塩基配列を有する。

【0090】TaqManプローブ: 5'-(FAM)TTG CAG AAT ACC AGC CTG GAT TGC(TAMRA) -3' (配列番号: 4)

FAM: 6-carboxyfluorescein

TAMRA: 6-carboxy-tetramethylrhodamine

【0091】50 $^{\circ}$ C、2分間、95 $^{\circ}$ C、10分間静置後、反応サイクル:95 $^{\circ}$ C、15秒 60 $^{\circ}$ C、1分を1サイクルとし、50サイクル実施した。標準サンプルの相対的な初期濃度の対数値に対してのPCR増幅曲線のCt (threshold cycle s)値から、検量線が自動的に作成され、これをもとに未知サンプルの相対的な初期濃度を算出した。

【0092】また、試料中のcDNA濃度の差を補正するため、補正用内部標準として -アクチン(-actin)遺伝子、およびグリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素(GAPDH)遺伝子について同様の定量解析を行い、それら遺伝子のコピー数を基に補正して、目的遺伝子のコピー数を算出した。アクチン、あるいはGAPDH測定用のプライマーとプローブは、TaqMan -actin Control Reagents (Applied Biosystems)に添付のものを用いて行った。塩基配列は以下の通りである。

【0093】アクチンフォワードプライマー: 5' - TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACGA -3' (配列番号: 5)

アクチンリバースプライマー: 5' - CAG CGG AAC CG C TCA TTG CCA ATG G -3' (配列番号: 6)

アクチンTaqManプローブ: 5' - (FAM)ATGCCC-T(TAMRA) -CCCCCATGCCATCCTGCGTp-3' (配列番号: 7)

GAPDHフォワードプライマー: 5' - GAAGGTGAAGGTCCG AGT -3' (配列番号: 8)

GAPDHリバースプライマー: 5' - GAAGATGGTGATGGGATTT C -3' (配列番号: 9)

GAPDH TaqManプローブ: 5' - (FAM)CAAGCTTCCCCTTCTCA GCC(TAMRA) -3' (配列番号: 10)

【0094】アクチンにより補正したdefensin 1遺伝子の発現量 (copy/ng RNA)を図1(上)に、GAPDHにより補正したdefensin 1遺伝子の発現量 (copy/ng RNA)を図2(上)に示す。また、実際のデータを表2に示す。

【0095】

【表2】

28

Type	mRNA発現量(copy/ng)		
	raw data	β -actin補正	GAPDH補正
V1	2565	4797	6418
V2	16456	11920	23052
V3	18199	22456	69165
V4	19517	49625	91960
V5	139	109	128
V6	7500	6905	22333
V7	6621	6771	27777
R1	78711	116305	188483
R2	9353	17114	35241
R3	152773	225839	381156
R4	73551	221761	426419
R5	290695	603693	1587114
P1	426371	1256471	1956897
P2	230057	677053	816983
P3	153291	658192	1037593
P4	123833	524804	625549
P5	5066	4499	11960
P6	14116	37598	69462

	copy数 (mean \pm SD)		
	V (n=7)	R (n=5)	P (n=6)
raw data	10142 \pm 7848	121017 \pm 107600	158789 \pm 156520
β -actin補正	14655 \pm 16942	236942 \pm 222339	526436 \pm 190121
GAPDH補正	34405 \pm 33659	523683 \pm 614735	753074 \pm 716528

【0096】(9)統計解析

統計解析は、3群間での比較はFisher分散分析とKruskal-Wallis検定により、また、健常群と患者群、あるいはステロイド応答群とステロイド弱応答群の2群間の比較はFisher分散分析とMann-Whitney検定により行った。結果を表3、および図1(下)、図2(下)に示す。患者群においてdefensin1の発現量が有意に高いことが確認さ*

健常群/患者群 2群比較	pattern	ANOVA p値	Mann-Whitney p値
raw data	患>健	0.0188	0.0128
β -actin補正	患>健	0.0211	0.0075
GAPDH補正	患>健	0.0251	0.0057

【0098】

【発明の効果】アレルギー性疾患の患者と健常者との間で発現レベルに差が見られるdefensin1遺伝子が見出された。該遺伝子の発現レベルを指標とすることにより、アレルギー性疾患の検査方法、および該疾患の治療のための化合物をスクリーニングする方法が可能となった。本発明のdefensin 1遺伝子は、その発現亢進が病態と結びついていることから、それを抑えることがアレルギー性疾患の治療戦略のターゲットとなるとともに、そのような新しい治療法におけるモニタリングのための新しい臨床診断指標としての有用性が期待できる。本発明によって提供されたdefensin 1遺伝子は、アレルゲンの種類に関わらず、簡便にその発現レベルを知ることができ

れた。以上の結果より、defensin 1遺伝子の発現量差が重症アトピー性皮膚炎患者と健常人間で認められ、この発現増加がアトピー性皮膚炎の重症度と関連することが分かった。

【0097】

【表3】

る。従って、アレルギー反応の病態を総合的に把握することができる。また本発明によるアレルギーの検査方法は、生体試料を試料としてその発現レベルを解析することができるので、患者に対する侵襲性が低い。しかも遺伝子発現解析に関しては、微量サンプルによる高感度な測定が可能である。遺伝子解析技術は、年々ハイスループト化、低価格化が進行している。従って本発明によるアレルギーの検査方法は、近い将来、ベッドサイドにおける重要な診断方法となることが期待される。この意味でこのdefensin 1遺伝子の診断的価値は高い。

【0099】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

The President of National Children
's Hospital

<120> Method for examination fo
r allergosis

<130> G1-A0010

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence:an artificially
synthesized T7-d(T)24 primer seque
nce

<400> 1

ggccagtga ttgtaatacg actcactata ggga
ggcgggt tttttttttt tttttttttt 60
ttt

3

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 2

ccaggctcaa ggaaaaacat g
21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 3

aggttcata gcgacgttct c
21

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
Sequence:an artificially

<223> Label TAMRA
 (6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethyl
 rhodamine)
 <400> 4
 ttgcagaata ccagcctgga ttgc
 24
 <210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:an artificially
 synthesized primer sequence
 <400> 5
 tcaccacac tgtgccatc tacga
 25
 <210> 6
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:an artificially
 synthesized primer sequence
 <400> 6
 cagcgaacc gctcattgcc aatgg
 25
 <210> 7
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:an artificially
 synthesized TaqMan probe sequence
 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (1)
 <223> Label FAM (6-carboxy-fluo
 rescein)
 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (7)
 <223> Label TAMRA
 (6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethyl
 rhodamine)
 <400> 7
 atgccctccc ccatgccatc ctgcgt
 26
 <210> 8
 <211> 18

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:an artificially
 synthesized primer sequence

<400> 9
 gaagatggtg atgggatttc
 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:an artificially
 synthesized TaqMan probe sequence

<220>
 <221> misc_binding
 <222> (1)
 <223> Label FAM (6-carboxy-fluo
 rescein)
 <220>
 <221> misc_binding
 <222> (2)

26

【図面の簡単な説明】223> Label TAMRA

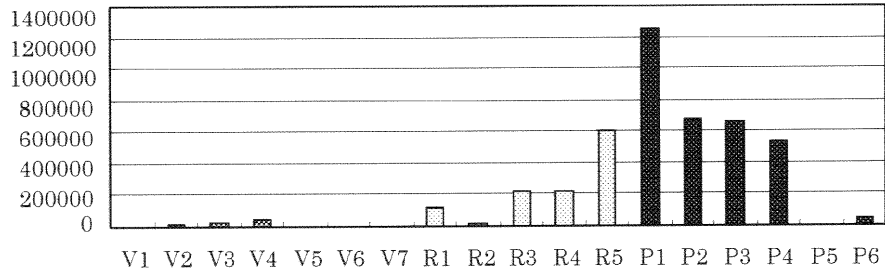
【図1】アレルギー性疾患患者および健康者におけるdefensin 1遺伝子の発現レベルを測定した結果を示すグラフ。上のグラフは、各被検者の - アクチン遺伝子で補正した測定値 (copy/ng RNA) を示す。下のグラフは、各群間の統計解析結果を示す。図中、Vは健康者、Rはステロイド応答群、PIはステロイド弱応答群を示す。また数字は、被検者の番号を表す。

【図2】ステロイド応答群、ステロイド弱応答群、および健康者におけるdefensin 1遺伝子の発現レベルを測定した結果を示すグラフ。上のグラフは、各被検者のGAPDH遺伝子で補正した測定値 (copy/ng RNA) を示す。下のグラフは、各群間の統計解析結果を示す。図中、Vは健康者、Rはステロイド応答群、PIはステロイド弱応答群を示す。また数字は、被検者の番号を表す。

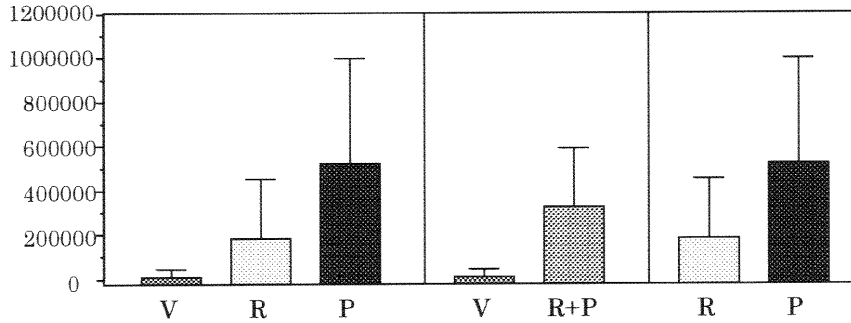
【図1】

β-actin補正

(copy/ng)



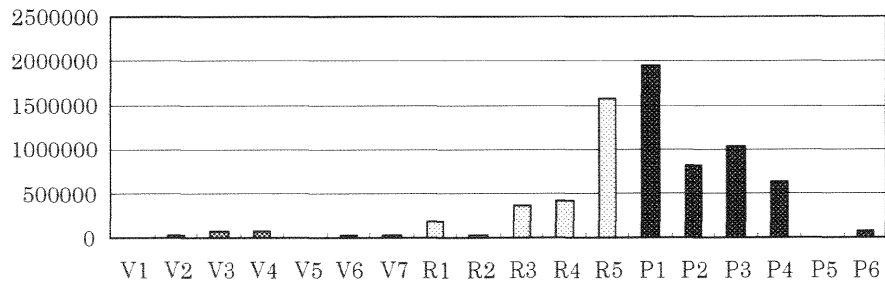
(copy/ng)



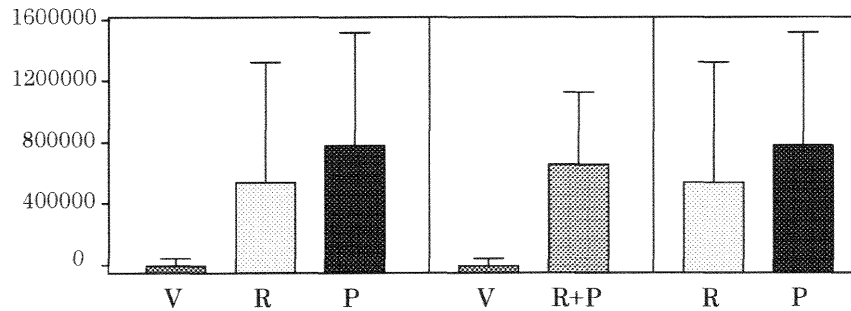
【図2】

GAPDH補正

(copy/ng)



(copy/ng)



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コード ⁸ (参考)	
A 6 1 K	45/00	A 6 1 K	48/00	4 C 0 8 6
	48/00	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	37/08	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/02		1/68	A
	1/68	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/15		33/50	Z
	33/50	G 0 1 N	33/53	Q
// G 0 1 N	33/53	(C 1 2 Q	1/02	
(C 1 2 Q	1/02	C 1 2 R	1:91)	
C 1 2 R	1:91)	C 1 2 N	15/00	Z N A A

(72)発明者 瓶子 昌幸
神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大学
生物工学研究センター内 株式会社ジェノ
ックス創薬研究所内

(72)発明者 加賀谷 伸治
神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大学
生物工学研究センター内 株式会社ジェノ
ックス創薬研究所内

(72)発明者 郡司 誉道
東京都中央区銀座2-7-12 三共株式会
社臨床研究部

(72)発明者 斎藤 博久
東京都世田谷区太子堂3-35-31 国立小
児病院・小児医療研究センター 免疫アレ
ルギー研究部

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB07 BB10 BB20
BB24 BB48 CA25 DA13 DA36
FB02 FB03 FB07 GA01 GC15
4B024 AA11 CA04 CA09 HA09 HA14
HA15
4B063 QA01 QA12 QA18 QA19 QQ02
QQ08 QQ20 QQ52 QQ53 QQ58
QR32 QR40 QR56 QR62 QR80
QR84 QS05 QS14 QS25 QS34
QS39
4C084 AA13 AA17 NA14 ZB132
4C085 AA02 AA08 BB11 CC21 CC32
4C086 AA01 EA16 NA14 ZB13

专利名称(译)	测试过敏性疾病的方法		
公开(公告)号	JP2002238568A	公开(公告)日	2002-08-27
申请号	JP2001036362	申请日	2001-02-14
[标]申请(专利权)人(译)	杰弗里·诺克斯药物发现研究所		
申请(专利权)人(译)	杰弗里·诺克斯药物发现研究所有限公司 国立小兒病院院长		
[标]发明人	杉田雄二 瓶子昌幸 加賀谷伸治 郡司誉道 斎藤博久		
发明人	杉田 雄二 瓶子 昌幸 加賀谷 伸治 郡司 誉道 斎藤 博久		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/711 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P37/08 C07K14/47 C12N15/09 C12N15/85 C12Q1/02 C12Q1/68 C12R1/91 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	C12N15/8509 A01K2217/05 A01K2227/105 A01K2267/03 A01K2267/0381 A61K38/00 C07K14/4723 C12Q1/6883 C12Q2600/136 C12Q2600/158		
FI分类号	A01K67/027 A61K31/711 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P37/08 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.Q C12R1/91 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/85.P C12N15/85.Z C12Q1/6883.C C12Q1/6883.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB07 2G045/BB10 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/BB48 2G045 /CA25 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/GA01 2G045/GC15 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/HA09 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063 /QA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ20 4B063/QQ52 4B063/QQ53 4B063/QQ58 4B063/QR32 4B063/QR40 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR80 4B063/QR84 4B063 /QS05 4B063/QS14 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB132 4C085/AA02 4C085/AA08 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/CC32 4C086/AA01 4C086 /EA16 4C086/NA14 4C086/ZB13		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种检测过敏性疾病的方法。 SOLUTION：发现了在患有过敏性疾病的患者和健康受试者之间表达水平不同的防御素1基因。 本发明提供一种以外周血单核细胞中的基因表达水平为指标的变应性疾病的检测方法以及治疗该疾病的化合物的筛选方法。

1に示す。rawデータ測定値 【表1】

無刺激状態	応答群		弱応答群	
	上昇	減少	上昇	減少
健常人	2	0	7	41
応答群	/	/	4	2