

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-526862

(P2013-526862A)

(43) 公表日 平成25年6月27日(2013.6.27)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-----------------------------|--------------|-------------|
| C12Q 1/68 (2006.01) | C12Q 1/68 A | 4B029 |
| C12Q 1/06 (2006.01) | C12Q 1/06 | 4B063 |
| C12M 1/00 (2006.01) | C12M 1/00 A | |
| C12M 1/34 (2006.01) | C12M 1/34 Z | |
| GO1N 33/53 (2006.01) | GO1N 33/53 M | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-508553 (P2013-508553)
 (86) (22) 出願日 平成23年5月4日 (2011.5.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年12月28日 (2012.12.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2011/050874
 (87) 国際公開番号 W02011/138609
 (87) 国際公開日 平成23年11月10日 (2011.11.10)
 (31) 優先権主張番号 1007454.0
 (32) 優先日 平成22年5月4日 (2010.5.4)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 502355761
 キングス カレッジ ロンドン
 イギリス ロンドン ダブリュシー2アール
 2エルエス アン インスティテュー
 ト インコーポレイテッド バイ ロイヤ
 ル チャーター オブ ストランド
 (71) 出願人 512285915
 シャリーテ-ウニヴェリテーツメディツィ
 ン ベルリン
 ドイツ D-10117 ベルリン シャ
 リーテプラッツ 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腎移植寛容を決定する方法

(57) 【要約】

本発明は、幾つかのバイオマーカーのレベルを決定することにより個体の移植寛容を決定する方法に関する。また、本発明は、バイオマーカーのレベルを検出するための試薬を含むキットに関する。また、本発明は、個体の移植寛容を決定するために使用することができる複数の遺伝子の発現レベルを検出するためのセンサーに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腎臓器移植に対する個体の免疫寛容を決定する方法であって、前記個体から得られる試料における、TLR5、PNOC、SH2D1B、CD79B、TCL1A、HS3ST1、MS4A1、FCRL1、SLC8A1、及びFCRL2からなる群から選択される少なくとも2個の遺伝子の発現レベルを決定することを含む方法。

【請求項 2】

SH2D1B、PNOC、CD79B、TCL1A、HS3ST1、MS4A1、FCRL1、及びFCRL2の発現レベルが、免疫寛容を示すとみなされる個体の正常レベルより高く、TLR5及びSLC8A1の発現レベルが、免疫寛容を示すとみなされる個体の正常レベルより低い、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記個体から得られる試料中の遺伝子TLR5、PNOC、及びSH2D1Bの発現レベルが決定される、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

臓器移植に対する個体寛容の陽性予測が、SH2D1B及びPNOCの高レベル発現、及びTLR5の低レベル発現によりなされる、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

以下の遺伝子：CD79B、TCL1A、HS3ST1、MS4A1、FCRL1、SLC8A1、及びFCRL2の1つ又は複数の発現レベルが更に決定される、請求項3に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記方法が、B細胞及びNK細胞のレベルを検出することを含み、そのような細胞のレベル上昇が、免疫寛容を示す、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記方法が、CD4 + CD25^{int} T細胞のレベルを決定することを含み、総CD4 + T細胞と比べたそのような細胞のレベル低減が、免疫寛容を示す、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記方法が、ドナー特異的CD4 + T細胞のレベルを決定することを含み、そのような細胞のレベル低減が、免疫寛容を示す、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記方法が、CD4 + T細胞の - 1, 2 - マンノシダーゼ遺伝子発現レベルに対するFoxP3遺伝子発現レベルの比率を決定することを含み、高い比率が免疫寛容を示す、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記方法が、CD3 + 細胞に対するCD19 + の比率を決定することを含み、高い比率が免疫寛容を示す、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

ベータアクチン及び/又はHRPTの発現レベルが、対照として使用される、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 12】

TLR5、PNOC、SH2D1B、CD79B、TCL1A、HS3ST1、MS4A1、FCRL1、SLC8A1、及びFCRL2からなる群から選択される少なくとも2個の遺伝子の発現レベルを検出するためのセンサー。

【請求項 13】

前記TLR5、PNOC、及びSH2D1B遺伝子の発現レベルを検出するセンサー。

【請求項 14】

以下の遺伝子：CD79B、TCL1A、HS3ST1、MS4A1、FCRL1、SLC8A1、及びFCRL2の1つ又は複数の発現を検出するための、請求項13に記載

50

のセンサー。

【請求項 15】

T L R 5、P N O C、S H 2 D 1 B、C D 7 9 B、T C L 1 A、H S 3 S T 1、M S 4 A 1、F C R L 1、S L C 8 A 1、及び F C R L 2 からなる群から選択される少なくとも 2 個の遺伝子の発現レベルを検出するための試薬を含むキット。

【請求項 16】

前記 T L R 5、P N O C、及び S H 2 D 1 B 遺伝子の発現レベルを検出するための試薬を含むキット。

【請求項 17】

以下の遺伝子：C D 7 9 B、T C L 1 A、H S 3 S T 1、M S 4 A 1、F C R L 1、S L C 8 A 1、及び F C R L 2 の 1 つ又は複数の発現レベルを検出するための試薬を更に含む、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 18】

R T - P C R により前記遺伝子の遺伝子発現レベルを検出するための試薬を含む、請求項 15 ~ 17 のいずれか一項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、幾つかのバイオマーカーのレベルを決定することにより、個体の移植寛容を決定する方法に関する。また、本発明は、バイオマーカーのレベルを検出するための試薬を含むキットに関する。また、本発明は、個体の移植寛容を決定するために使用することができる複数の遺伝子の発現レベルを検出するためのセンサーに関する。

【背景技術】

【0002】

移植寛容は、免疫抑制療法の持続的な非存在下で良好な同種移植片機能を安定して維持することと定義される。臨床分野において、移植寛容は、患者が、全ての免疫抑制を長期間中止したにも関わらず、安定した同種移植片機能を経験する場合にのみ明らかとなる。実効的寛容 (operational tolerance) と定義されるこの状態は、腎移植術ではほとんど報告されておらず (1 ~ 5)、肝移植においてより一般的である (6、7)。現在、腎移植の長期生存は、持続的な薬物誘導性免疫抑制に依存している。しかしながら、これには、主に心血管疾患、日和見感染、及び悪性疾患による罹患率及び死亡率の増加が伴う (8)。現在、我々は、移植に対する寛容を発生させ、したがって免疫抑制の部分的な又は完全な中止から利益を得る可能性のある患者を事前に特定するための手段を有していない。したがって、臨床医が、患者特異的な免疫学的特性に基づき免疫抑制を安全に最小限に抑えることを可能にするアッセイを開発し、バイオマーカーを特定する必要性が存在する。

【0003】

以前の研究により、肝移植レシピエントの寛容に関するバイオマーカーが特定されている。特に、サイトカイン遺伝子多型が、小児レシピエントの集団で研究された。免疫抑制を受けなかった小児の全員及び最小限の免疫抑制を受けた小児の大多数は、維持的免疫抑制を受けた対照患者と比較して、低い腫瘍壊死因子 (T N F) - 特性及び高い / 中程度のインターロイキン (I L) - 10 特性を示した (36)。加えて、2 群間の患者で樹状細胞サブセット比率に違いがあった。維持的免疫抑制を受けた患者と比較して、T ヘルパー (T h) 2 応答を選択的に誘導することが報告されている形質細胞様樹状細胞 (p D C 2) の循環レベルは、免疫抑制を受けないか又は最小限の免疫抑制を受けた患者において、T h 1 タイプ応答を誘導する単球様樹状細胞 (p D C 1) よりも高かった (37)。

【0004】

成人肝移植レシピエントの寛容に関するバイオマーカーを特定する更なる試みが、末梢血遺伝子発現解析及び詳細な血液細胞免疫表現型検査を使用して実施されている。細胞及びナチュラルキラー (N K) 細胞受容体をコードする遺伝子並びに細胞増殖阻止に関与する遺伝子の特徴を用いて、実効的寛容患者を特定することができることが実証され

10

20

30

40

50

た(38)。また、彼らは、上皮組織における免疫調節プロセスに關与するとされている非常に多数の循環中の潜在的制御性T細胞サブセット、 $CD4^+CD25^+$ T細胞、及び T細胞、特に $V\beta 1^+$ サブタイプを、寛容患者中に見出した。興味深いことには、この患者集団では、以前に觀察された樹状細胞サブセット比率の差異を再現することができなかつた。同じ研究グループは、肝移植レシピエントの末梢血中の遺伝子発現特性を研究し、免疫抑制離脱が成功した患者を、離脱プロセスを試みたが免疫抑制の再導入を必要とする急性拒絶に至った患者及び健常対照と比較している(39)。彼らは、寛容同種移植片肝臓レシピエントと非寛容肝臓同種移植片レシピエントと健常非移植対照とを区別する少数の遺伝子(2~7個)を含む3つの別個の遺伝子特徴を特定した。実効的寛容に關するこのゲノムフットプリントは、23人の追加肝移植レシピエントの独立集団で検証されており、NK、 $CD8^+$ 、及び T細胞により発現される様々な細胞表面受容体をコードする遺伝子を上方制御することを主な特徴とする。末梢血中の推定制御性T細胞($CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 、 TCR^+ 、及び $1TCR^+$ T細胞)の増殖が以前に觀察されているが、それは、この新しい群の寛容レシピエントで再現された。まとめると、末梢血の転写解析とフローサイトメトリーとを組み合わせると、薬理的免疫抑制の非存在下で同種移植片を受容することができる肝移植レシピエントを特定することができると考えられる。

【0005】

Souliouらは、5人の実効的寛容腎移植レシピエントのTCRレパートリーを分析し、これら患者では、TCR V鎖の使用頻度に偏りがあり、それは主に $CD8^+$ サブセットで觀察されることを実証した。また、これら細胞は、サイトカイン転写物(IL10、IL2、IL13、IFN-)の減少を特徴としており、低反応性の状態であることを示唆した(40)。更に、寛容患者では、循環中の $CD8^+CD28^-$ エフェクターリンパ球が、慢性同種移植片拒絶反応を示す患者と比較して著しくより少数であり、これら患者における細胞毒性の抑制が示唆された(Baeten et al, 2005 (45))。その後、同じ研究グループは、発現アレイを使用して、実効的寛容腎移植レシピエントを、急性及び慢性同種移植片拒絶反応を示す患者及び健常年齢一致志願者と、特異性高く正確に区別することができる33個の遺伝子のセットを特定した(41)。初期及び後期T細胞活性化の同時刺激遺伝子及びマーカーの発現は、対照と比較して寛容患者では低減され、抗炎症性サイトカイン形質転換増殖因子-(TGF)の発現は、寛容患者では上方制御されなかつたが、多くのTGF調節遺伝子は上方制御された。

【0006】

同じ研究グループは、8人の実効的寛容腎同種移植片レシピエント群の血液細胞表現型及び転写パターンを分析し、循環中B細胞及び制御性T細胞($CD25^{hi}CD4^+$)の絶対数が、慢性拒絶反応を示す対照患者群と比較してより多いこと、慢性拒絶反応を示すレシピエントのFOX P3転写レベルが著しく減少することを実証した(42)。興味深いことには、この研究では、臨床的寛容患者の血液細胞表現型が、健常個体の表現型と異なっておらず、実効的寛容は、制御性T細胞の貯留増加によるものではなく、慢性拒絶反応を示す患者に欠如している天然状態の維持によるものである可能性が示唆された。対照的に、異なる研究グループは、慢性拒絶反応を示す患者、透析患者、及び健常対照と比較して、長期的に安定した腎移植レシピエントではTCR-Vレパートリーがより可変性であり、 $CD4^+CD25^{high}$ の割合がより高いことを報告しており、そのうちの2人は免疫抑制を受けてなかつた(43)。

【0007】

Brouard et al., 2007 (41)では、訓練セットで90%の最大感度を得る49個の遺伝子のセットが使用されている。大部分が異なる33個の遺伝子のセットにより、個体は、寛容患者又は慢性拒絶患者に分類されると言われている。MS4A1は、 $CD20$ としても知られている分子であり、Bリンパ球の表面に発現される。この分子は、Brouard et al, 2007(41)の論文に記載の両遺伝子セットに、つまり33個の遺伝子セット及び49個の遺伝子セットの両方に存在する。更に、Louyet et al, 2005(44)は、MS

10

20

30

40

50

4 A 1 を、ラット動物モデルにおける移植片の寛容と関連するマーカーであると特定した。

【0008】

臓器移植に対する個体の寛容を効果的に決定するための改良方法に対する必要性が存在する。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、腎臓器移植に対する個体の免疫寛容を決定する方法であって、個体から得られる試料における、TLR5、PNOC、SH2D1B、CD79B、TCL1A、HS3ST1、MS4A1、FCRL1、SLC8A1、及びFCRL2からなる群から選択される少なくとも2個の遺伝子の発現レベルを決定することを含む方法を提供する。

10

【0010】

上記で示した決定を行うことにより、個体が臓器移植に対して免疫学的に寛容であるか否かを、高特異性で高感度に決定することが可能であることが見出された。特異性は、本方法において非寛容と特定された真の陰性（非寛容である個体）の割合として定義される。感度は、本方法において寛容と特定された真の陽性（寛容である個体）の割合として定義される。本方法は、ほんの少数のバイオマーカー（つまり、遺伝子発現レベル）を測定するだけで比較的容易に実施することができる高度に正確な検査を提供する。したがって、臓器移植に対する個体の寛容に関する簡便で効果的な検査が提供される。

【0011】

用語「免疫寛容」は、当業者に公知であり、免疫抑制療法の持続的な非存在下で良好な同種移植片機能を安定して維持することを指し、臨床分野では、長期間、例えば少なくとも1年間にわたって全ての免疫抑制を中止したにも関わらず、患者が安定した同種移植片機能を経験する場合にのみ明らかになる。

20

【0012】

本発明の方法を使用して、腎移植に対する個体の寛容を決定することができる。

【0013】

移植臓器に寛容な個体では、SH2D1B、PNOC、CD79B、TCL1A、HS3ST1、MS4A1、FCRL1、及びFCRL2の発現レベルが上昇し、TLR5及びSLC8A1の発現レベルが低下することが見出された。

30

【0014】

上記遺伝子の任意の組み合わせを使用して、臓器移植に対する個体の寛容を決定することができる。10個の遺伝子全てをそのような決定を行うことに使用することができるが、好ましくは、2、3、4、又は5個の遺伝子のみが、そのような決定をなすことに使用され、より好ましくは、3個の遺伝子のみが、そのような決定をなすことに使用される。

【0015】

本発明の方法は、個体から得られる試料における、遺伝子TLR5、PNOC、及びSH2D1Bの発現レベルを決定することを含むことが特に好ましい。臓器移植に対する個体の寛容の陽性予測は、SH2D1B及びPNOCの高レベル発現、及びTLR5の低レベル発現によりもたらされる。当業者であれば理解するだろうが、本発明の方法は、以下の遺伝子CD79B、TCL1A、HS3ST1、MS4A1、FCRL1、SLC8A1、及びFCRL2の1つ又は複数の発現レベルを決定することを更に含んでもよい。

40

【0016】

本発明の方法は、1つ又は複数の好適な対照の発現レベルを決定することを更に含んでもよい。好適な対照には、HPR1、ベータアクチン、及びベータ2ミクログロブリンが含まれる。対照のレベルは、寛容である個体と非寛容である個体との間で著しく異なるべきではない。

【0017】

本発明の特に好ましい実施形態では、個体が寛容である確率（P - Tol）は、下記式

50

により決定される： $P - T o l = e^Z / (e^Z + 1)$

式中、 $Z = -4.4347 + 2.7191 * [SH2DB1] - 4.198733 * [TLR5] + 3.300620 * [PNOC]$ であり、0.11を超えるP - T o lスコアは、個体が寛容であることを示す。

【0018】

この式は、マイクロアレイ解析を使用して決定された遺伝子発現レベルに適用されるように設計されている。他の方法、例えばRT - PCRを使用して遺伝子発現レベルを決定する場合、この式を修正する必要がある場合がある。特に、本発明の特に好ましい実施形態では、RT - PCRを使用して本方法を実施する場合、個体が寛容である確率(P - T o l)は、下記式により決定される： $P - T o l = e^Z / (e^Z + 1)$ 、式中

$Z = -14.457 + 94.156 * [PNOC] + 6.289 * [SH2DB1] + 5.054 * [TLR5] - 1.523 * [PNOC] * [SH2DB1] - 51.584 * [PNOC] * [TLR5] - 2.339 * [SH2DB1] * [TLR5]$ であり、0.0602を超えるP - T o lスコアは、個体が寛容であることを示す。

【0019】

各遺伝子の発現は 2^{-dCT} として表され、dCTは、各遺伝子と対照遺伝子とのCTの差として計算される。

【0020】

実質的に同一の確率尺度を提供する他の式を使用してもよい。そのような代替式は、当業者であれば明らかであり、容易に計算することができる。

【0021】

本発明の方法は、B細胞及びNK細胞のレベルを決定することを更に含んでもよい。B細胞及びNK細胞のレベルを更に決定することにより、本方法の特異性及び感度を更に向上させることができる。特に、移植臓器に寛容な個体では、B細胞及びNK細胞の両方のレベルが上昇することが見出された。

【0022】

本発明の方法は、CD4 + CD25^{int}T細胞のレベルを決定することを更に含んでもよい。CD4 + CD25^{int}T細胞のレベルを更に決定することにより、本方法の特異性及び感度を更に向上させることができる。特に、移植臓器に寛容な個体では、CD4 + CD25^{int}T細胞のレベルが、総CD4 + T細胞と比べて低下することが見出された。

【0023】

本発明の方法は、ドナー特異的CD4 + T細胞のレベルを決定することを更に含んでもよい。ドナー特異的CD4 + T細胞のレベルは、下述のようにインターフェロン(interferon)ガンマELISPotアッセイを使用して決定することができる。ドナー特異的CD4 + T細胞のレベルを更に決定することにより、本方法の特異性及び感度を更に向上させることができる。ドナー特異的CD4 + T細胞のレベルを測定することにより、ドナー臓器に対する個体の応答を決定することができる。特に、移植臓器に寛容な個体では、そのような応答のレベル(つまり、ドナー特異的CD4 + T細胞のレベル)が低下することが見出された。

【0024】

本発明の方法は、CD4 + T細胞の-1, 2 - マンノシダーゼ遺伝子発現レベルに対するFoxP3遺伝子発現レベルの比率を決定することを更に含んでもよい。CD4 + T細胞の-1, 2 - マンノシダーゼ遺伝子発現レベルに対するFoxP3遺伝子発現レベルの比率を更に決定することにより、本方法の特異性及び感度を更に向上させることができる。特に、移植臓器に寛容な個体では、この比率が増加することが見出された。

【0025】

本発明の方法は、CD3 + 細胞に対するCD19 + の比率を決定することを更に含んでもよい。CD3 + 細胞に対するCD19 + の比率を更に決定することにより、本方法の特異性及び感度を更に向上させることができる。特に、移植臓器に寛容な個体では、こ

10

20

30

40

50

の比率が増加することが見出された。

【0026】

本方法は、個体から得られる試料で実施される。試料は、上記で言及されたマーカーを測定することが可能であるあらゆる好適な試料であってもよい。好ましくは、試料は、血液、血清、若しくは他の血液画分、尿、又は移植片生検試料である。最も好ましくは、試料は、末梢血試料である。

【0027】

SH2D1B (タンパク質1Bを含有するSH2ドメイン)は、当業者に周知の標準的用語である。特に、SH2D1Bの多形ヒト型の配列は、NCBIタンパク質データベースの受入番号GI: 42744572、バージョンAAH66595.1; 受入番号GI: 54792745、バージョンNP__444512.2; 受入番号GI: 18490409、バージョンAAH22407.1; 及び受入番号GI: 55960297、バージョンCAI15780.1に示されている。

10

【0028】

TLR5 (トール様受容体5タンパク質)は、当業者に周知の標準的用語である。特に、NCBIタンパク質データベースに示されているTLR5の多形ヒト型の幾つかの例示的な配列は、受入番号GI: 80478954、バージョンAAI09119.1; 受入番号GI: 80475052、バージョンAAI09120.1; 受入番号GI: 13810568、バージョンBAB43955.1; 及び受入番号GI: 222875780、バージョンACM69034.1である。

20

【0029】

PNOC (ノシセプチン)は、当業者に周知の標準的用語である。特に、PNOCの多形ヒト型の配列は、NCBIタンパク質データベースの受入番号GI: 49456885、バージョンCAG46763.1; 及び受入番号GI: 49456835、バージョンCAG46738.1に示されている。

【0030】

CD79B (B細胞抗原受容体複合体関連タンパク質ベータ鎖)は、当業者に周知の標準的用語である。特に、CD79Bの多形ヒト型の配列は、NCBIタンパク質データベースの受入番号GI: 1087009、バージョンAAC60654.1; 及び受入番号GI: 20987620、バージョンAAH30210.1に示されている。

30

【0031】

TCL1A (T細胞白血病リンパ腫1A)は、当業者に周知の標準的用語である。特に、TCL1Aの多形ヒト型の配列は、NCBIタンパク質データベースの受入番号GI: 48145709、バージョンCAG33077.1; 受入番号GI: 148922879、バージョンNP__001092195.1; 受入番号GI: 11415028、バージョンNP__068801.1; 受入番号GI: 13097750、バージョンAAH03574.1; 受入番号GI: 46255821、バージョンAAH14024.1; 及び受入番号GI: 13543334、バージョンAAH05831.1に示されている。

【0032】

HS3ST1 (ヘパラン硫酸(グルコサミン)3-O-スルホトランスフェラーゼ1)は、当業者に周知の標準的用語である。特に、HS3ST1の多形ヒト型の配列は、NCBIタンパク質データベースの受入番号GI: 116283706、バージョンAAH25735.1; 及び受入番号GI: 34785943、バージョンAAH57803.1に示されている。

40

【0033】

MS4A1 (膜貫通4ドメイン、サブファミリーA、メンバー1; Bリンパ球抗原CD20)は、当業者に周知の標準的用語である。特に、MS4A1の多形ヒト型の配列は、NCBIタンパク質データベースの受入番号GI: 23110989、バージョンNP__690605.1; 受入番号GI: 23110987、バージョンNP__068769.2; 及び受入番号GI: 12803921、バージョンAAH02807.1に示されて

50

いる。

【0034】

FCRL1 (本明細書ではTHC2438936とも呼ばれる) (Fc受容体様タンパク質1 (FCRL1) 遺伝子の3'付近) は、当業者に周知の標準的用語である。特に、NCBIタンパク質データベースに示されているFCRL1の多形ヒト型の幾つかの例示的な配列は、受入番号GI: 55662454、バージョンCAH73053.1; 受入番号GI: 55661513、バージョンCAH70234.1; 受入番号GI: 55661511、バージョンCAH70232.1; 受入番号GI: 21707303、バージョンAAH33690.1; 及び受入番号GI: 117606520、バージョンABK41917.1である。

10

【0035】

SLC8A1 (溶質輸送体ファミリー8 (ナトリウム/カルシウム交換体)、メンバー1) は、当業者に周知の標準的用語である。特に、SLC8A1の多形ヒト型の配列は、NCBIタンパク質データベースの受入番号GI: 68087008、バージョンAAH98285.1; 及び受入番号GI: 67514242、バージョンAAH98308.1に示されている。

【0036】

FCRL2 (Fc受容体様タンパク質2) は、当業者に周知の標準的用語である。特に、NCBIタンパク質データベースに示されているFCRL2の多形ヒト型の幾つかの例示的な配列は、受入番号GI: 55662464、バージョンCAH73063.1; 受入番号GI: 55662461、バージョンCAH73060.1; 受入番号GI: 46623042、バージョンAAH69185.1; 及び受入番号GI: 117606518、バージョンABK41916.1である。

20

【0037】

FoxP3 (フォークヘッドボックスP3) は、当業者に周知の標準的用語である。特に、FoxP3の多形ヒト型の配列は、NCBIタンパク質データベースの受入番号GI: 146262391、バージョン番号ABQ15210.1; 受入番号GI: 219518921、バージョンAAI43787.1; 受入番号GI: 219517996、バージョンAAI43786.1; 受入番号GI: 109731678、バージョンI13404.1; 受入番号GI: 109730459、バージョンAAI13402.1; 受入番号GI: 63028441、バージョンAAY27088.1に示されている。

30

【0038】

1, 2-アルファマンノシダーゼは、当業者に周知の標準的用語である。特に、この用語は、1, 2-アルファマンノシダーゼA1型を指す。ヒト型の1, 2-アルファマンノシダーゼの配列は、NCBIタンパク質データベースの受入番号GI: 24497519、バージョン番号NP_005898.2に示されている。

【0039】

疑念を避けるために、上記で言及されたマーカーの特定の配列は、本出願の優先日においてデータベースに存在するバージョンに関して定義されている。マーカーの特定の配列は、例示である。当業者であれば、ヒト集団には多形変異体が存在することを理解するだろう。

40

【0040】

遺伝子の発現レベルを決定するには、ノーザンブロットティング、mRNAマイクロアレイ、RT-PCR法、ディファレンシャルディスプレイ、RNA干渉、レポーター遺伝子解析、及び遺伝子発現の連続解析(SAGE)のようなタグに基づく技術を含む多数の方法が存在する。そのような方法は、当業者に周知であり(例えば、Measuring Gene Expression by Matthew Avison, 2007, published by Taylor & Francis Group; ISBN; 978-0-415-37472-9(書籍版)978-0-203-88987-9(電子版)を参照)、コードされているタンパク質の発現レベルを測定して、遺伝子発現のレベルを決定することもできる。タンパク質発現のレベルを決定する多数の方法が、当業者に周知である。

50

【0041】

更なるバイオマーカーとして本方法で測定することができる種々の細胞タイプのレベルは、任意の好適な方法を使用して検出することができる。例えば、適切な抗体を使用したフローサイトメトリーを使用することができる。そのような方法は、当業者に周知である。

【0042】

CD4 + T細胞のドナー特異的低応答性のレベルは、任意の好適な方法を使用して決定することができる。好適な方法には、ELISA法、Luminex法により、又はフローサイトメトリーを使用した細胞内サイトカイン産生により、IFNガンマ産生を測定することが含まれる。そのような測定を行う場合、本方法は下記ステップを含むことが好ましい：

10

a . レシピエントからあるセット数のCD4 + T細胞を準備するステップ、

b . CD4 + T細胞を、ドナーに由来する細胞又はドナーと同じHLAクラスIIを有する（血清学的精度で）個体に由来する細胞で刺激し、細胞は、放射線照射を受けている（好ましくは、細胞は、T細胞及びNK細胞が枯渇されている（CD2及びTCRgd抗体を使用して）PBMCである）ステップ、

c . CD4 + T細胞を、ドナーとレシピエントとの間に存在する不一致と類似したHLAクラスII不一致を有する「第3の個体」に由来する細胞で刺激する（好ましくは、細胞は、T細胞及びNK細胞が枯渇されている（CD2及びTCRgd抗体を使用して）PBMCである）ステップ、

20

d . CD4 + T細胞を、ドナー及びレシピエントの両方に対して完全なHLAクラスII不一致を有する「第4の個体」に由来する細胞で刺激する（好ましくは、細胞は、T細胞及びNK細胞が枯渇されている（CD2及びTCRgd抗体を使用して）PBMCである）ステップ、及び

e . CD4 + T細胞によりIFNガンマ産生の相対的レベルを決定するステップ。

【0043】

ドナー特異的CD4 + T細胞のレベルを決定するための好適な方法は、本明細書に下述されている。

【0044】

上記で言及したマーカーのレベルが正常レベルより大きい（高い）か又は少ない（低い）かどうかを決定するために、典型的には、非寛容個体の関連集団の正常レベルが決定される。関連集団は、例えば、移植された臓器、免疫抑制剤のレベル及び種類、人種的背景、又は正常なマーカーレベルに影響を及ぼし得るあらゆる他の特徴に基づいて規定することができる。正常レベルが判明したら、測定されたレベルを比較し、標準的統計手法を使用して有意差を決定する。測定レベルと正常レベルとの間にはかなりの違い（つまり、統計的有意差）がある場合、レベルが測定された個体は、免疫学的に寛容であるとみなすことができる。

30

【0045】

本明細書に記載の技術は、移植片（つまり、移植臓器）に対する個体寛容をモニターすることを可能にし、それにより免疫抑制剤の投与を中止することができるか又は免疫抑制剤のレベルを低減することができる個体を特定することができる。また、本技術は、免疫抑制プロトコルの管理及び臓器移植レシピエントの移植後管理を支援することができる。

40

【0046】

また、本発明は、TLR5、PNOC、SH2D1B、CD79B、TCL1A、HS3ST1、MS4A1、FCRL1、SLC8A1、及びFCRL2からなる群から選択される少なくとも2個の遺伝子の発現レベルを検出するためのセンサーを提供する。好ましくは、センサーは、TLR5、PNOC、及びSH2D1B遺伝子の発現レベルを検出するためのものである。マイクロアレイの遺伝子発現レベルをモニターするのに好適なセンサーは、当業者に周知であり、mRNAチップ、タンパク質発現センサー等が含まれる

50

。センサーは、一般的に、センサー表面に付着した、検出しようとする遺伝子に特異的な1つ又は複数の核酸プローブを含む。それにより、核酸プローブは、標的遺伝子に由来する遺伝子転写物の検出を可能にする。好ましくは、センサーは、更に、以下の遺伝子CD79B、TCL1A、HS3ST1、MS4A1、FCRL1、SLC8A1、及びFCRL2の1つ又は複数、好ましくは全ての発現を検出するためのものである。

【0047】

また、本発明は、TLR5、PNOC、SH2D1B、CD79B、TCL1A、HS3ST1、MS4A1、FCRL1、SLC8A1、及びFCRL2からなる群から選択される少なくとも2個の遺伝子の発現レベルを検出するための試薬を含むキットを提供する。好ましくは、キットは、TLR5、PNOC、及びSH2D1B遺伝子の発現レベルを検出するための試薬を含む。好ましくは、キットは、以下の遺伝子CD79B、TCL1A、HS3ST1、MS4A1、FCRL1、SLC8A1、及びFCRL2の1つ又は複数の発現レベルを検出するために試薬を更に含む。遺伝子の発現レベルを検出するための試薬は、好ましくは、RT-PCRにより遺伝子の遺伝子発現レベルを検出するための試薬である。

10

【0048】

また、キットは、個体が寛容である確率を計算するためのアルゴリズムを用いてプログラムされたコンピューター、説明書、及び本明細書に記載の方法の実施に有用な他の品目を含むことができる。

【0049】

本技術の特定の態様は、以下の図を参照し、下記で例により説明されている。

20

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】訓練セット(A~D)及び検査セット(E~H)の末梢血リンパ球サブセットのフローサイトメトリ解析を示す図である。リンパ球サブセットは、B細胞はCD19⁺リンパ球(A、E)として；NK細胞はCD56⁺CD3⁻リンパ球(B、F)として；T細胞はCD3⁺リンパ球(C、G)として定義された。CD19⁺：CD3⁺の比率が示されている(D、H)。中央値及び四分位範囲が示されている。To1-DF患者と他群との間のマン-ホイットニーU検定比較の両側p値が示されている(* * * p < 0.001、* * p < 0.01、又は* p < 0.05)。他の研究群間の比較のp値は、表5に示されている。

30

【図2】訓練セット(A及びB)及び検査セット(C及びD)のCD25の末梢血T細胞発現に関するフローサイトメトリ解析を示す図である。中程度(CD4⁺CD25^{int})及び高(CD4⁺CD25^{hi})CD25発現を示すCD4⁺T細胞のパーセントの中央値及び四分位範囲が示されている。To1-DF患者と残りの群との間のマン-ホイットニーU検定比較の両側p値が示されている(* *) p < 0.01又は(*) p < 0.05)。他の研究群間の比較のp値は、表5に示されている。

【図3】訓練セットで血清ドナー特異的(DSA)及び非特異的(NDSA)抗HLAクラスI(CI)及びクラスII(CII)抗体の陽性検出を示す患者の群毎の割合を示す図である。(B)補体結合(IgG1、IgG3)又は非補体結合(IgG2、IgG4)DSAが、存在した(+ve)又は存在しなかった(-ve)患者の腎機能。中央値及び四分位範囲が示されている。群間のマン-ホイットニーU検定比較の両側p値が表示されている(* p < 0.05)。なお、DSAレベルは、寛容レシピエントには存在しなかった。

40

【図4】(A)訓練セット及び(B)検査セットの患者における直接経路非自己応答の検出に使用したIFN ELISpotsを示す図である。ドナー細胞及び第3の個体の細胞(3rdP)で刺激した際に、レシピエントCD4⁺T細胞中のIFN産生細胞の数を算出して(バックグラウンドを差し引いた)、応答細胞の頻度を取得した。ドナー：3rdP刺激に対する応答頻度の比率の中央値及び四分位範囲が示されており、比率値>1.5は、ドナーに対する低応答性を示す。群間のマン-ホイットニーU検定比較の両側

50

p 値が示されている (* * $p < 0.01$ 、 * $p < 0.05$)。ドナー及び 3_rd P に対する個々の患者の IFN γ ELISpot 応答頻度は図 10 に示されている。 : ドナー及び 3_rd P 頻度間のウイルコクソン検定 $p < 0.05$ 。

【図 5】 FoxP3 及び γ - 1, 2 - マンノシダーゼの末梢血発現の qRT-PCR 遺伝子発現解析を示す図である。 FoxP3 及び γ - 1, 2 - マンノシダーゼの発現値の比率を、訓練セット (A) 及び検査セット (B) の患者について計算した。中央値及び四分位範囲が示されている。 Tol-DF 患者と他群との間のマン-ホイットニー U 検定比較の両側 p 値が示されている (* * * $p < 0.001$ 、 * * $p < 0.01$)。他の研究群間の比較の統計値は、表 6 に示されている。また、 FoxP3 及び γ - 1, 2 - マンノシダーゼの個々の発現値は、それぞれ図 11 A 及び 11 B に示されている。

10

【図 6】最大 10 個の最も高位に順位付けられた遺伝子を使用して生成された、訓練セット (A) 及び検査セット (B) の ROC 曲線 (黒色線) を示す図である。有意な遺伝子発現の差異が、末梢血のマイクロアレイ解析により検出された。2 値回帰モデルを階級化に使用し、ROC 曲線 (Tol-DF 群対非寛容群、HC は除く) を、マイクロアレイデータの 4 階級クラスカル-ワリス分析により特定された上位 10 位に順位付けられた有意な遺伝子を使用して生成した。遺伝子は、1% FDR を用いてそれらの P 値に基づき訓練セット内で順位付けした。同じ 2 階級モデルを使用して、同じ遺伝子が、検査セット内の Tol-DF レシピエントを検出する診断する能力を評価した。

【図 7】マイクロアレイ解析により特定されたクロスプラットフォームバイオマーカー及び遺伝子を使用して生成された、訓練セット (A) 及び検査セット (B) の ROC 曲線を示す図である。2 階級 ROC 曲線 (Tol-DF 群対非寛容群、HC は除く) は、4 個のバイオマーカー: B/T リンパ球比率、% CD4⁺ CD25^{int}、抗ドナー: 抗 3_rd P ELISpot 頻度の比率、及び FoxP3 / γ - 1, 2 - マンノシダーゼ発現の比率を、10 個の最も有意な遺伝子を順次追加することと組み合わせて使用して生成した。寛容のクロスプラットフォームバイオマーカー特徴 (4 個のバイオマーカー + 10 個の遺伝子) に基づいて寛容であると分類された、訓練セット (C) 及び検査セット (D) の各研究群の患者の推定確率を 2 項回帰手順を使用して計算した。

20

【図 8】訓練セット患者及び検査セット患者の末梢血 B 細胞サブセットの分析を示す図である。(A) B 細胞サブセットは、GD19⁺ リンパ球でゲート制御することにより分析し、以下のように定義された: 後期記憶 B 細胞 CD19⁺ CD27⁺ IgD⁻ CD24⁺ CD38⁻ / ^{int}; 未感作/成熟 B 細胞 CD19⁺ CD27⁻ CD24^{int} CD38^{int}; T1/T2 移行性 B 細胞 CD19⁺ CD27⁻ CD24⁺ CD38^{hi}。総 B 細胞のうち未感作 B 細胞 (B)、T1/T2 移行性 B 細胞 (C)、及び記憶 B 細胞 (D) の割合。T1/T2 移行性 B 細胞: 記憶 B 細胞の割合の比率 (E)。中央値及び四分位範囲が示されている。有意である場合、群間のマン-ホイットニー U 検定比較の両側 p 値が示されている (* $p < 0.05$ 、 * * $p < 0.01$)。

30

【図 9】B 細胞サイトカイン産生の分析を示す図である。(A) TGF β 、(B) IL-10、及び (C) IFN γ の B 細胞産生は、ホルボール 12 - ミリステート 13 - アセテート及びイオノマイシンで PBMC を *in vitro* 刺激した後で細胞内サイトカイン染色により評価した。結果は、刺激 (+) 及び未刺激 (-) 培養中のフローサイトメトリーで分析された 1×10^4 個の B 細胞当たりの検出されたサイトカイン産生 B 細胞の数として表されている (CD19⁺ リンパ球でゲート制御した)。各群の中央値及び四分位範囲が示されている。図 (D ~ F) は、各サイトカイン応答の比率として表された、 1×10^4 個の刺激 B 細胞当たりのサイトカイン産生細胞の数を示す。図 G は、 TGF β 及び IFN γ 細胞サイトカイン応答を示し、各患者は、塗りつぶし円により表わされており、黒色の塗りつぶし円は、Tol-DF 患者を表し、Tol-DF 患者の B 細胞が、IFN γ ではなく TGF β を産生するより高い能力を有することを示す。ウイルコクソン-マッチドペア検定 (A ~ C) 及び群間の両側マン-ホイットニー U 検定 (D ~ F) 比較の p 値が示されている (* $p < 0.05$ 、 * * $p < 0.01$ 、及び * * * $p < 0.001$)。試料 n; HC = 8、Tol-DF = 10、s-LP = 8、s-CNI = 16、CR = 4。

40

50

【図10】(A)訓練セット及び(B)検査セットでIFN E L I S p o tによる直接経路非自己応答を検出する細胞機能性アッセイを示す図である。レシピエントCD4⁺T細胞中のIFN 産生細胞の数を算出した。データは、バックグラウンドを差し引いた後の、ドナーAPC(抗ドナー応答)又は等しく不一致の第3の個体のAPC(逆三角形は、抗3_rdP 応答を示す)に対するT細胞応答の頻度(1 応答/n 個細胞)及び群頻度中央値(黒色バー)を示す。ドナー頻度及び3_rdP 頻度間のウィルコクソンマッチドペア検定の両側p 値(* * p < 0 . 0 1)が示されている。

【図11】訓練セット及び検査セットの末梢血試料全体の(A)FoxP3 及び(B)- 1 , 2 - マンノシダーゼのqRT - PCR 解析を示す図である。FoxP3 及び - 1 , 2 - マンノシダーゼの発現レベルは、HPRT の発現と比較した単位として表されている。有意である場合、群間のマン - ホイトニー U 検定比較の両側 p 値が示されている(* p < 0 . 0 5、* * p < 0 . 0 1、* * * p < 0 . 0 0 1)。

【図12】訓練セットで有意に異なる発現を示した遺伝子の幾つかのマイクロアレイ及びqRT - PCR による遺伝子発現の相関性を示す図である(A ~ E)。マイクロアレイの各プローブのシグナル強度データを各患者について計算し、その後、HPRT と比較した発現を、log₂[目的遺伝子] - log₂[HPRT]として各遺伝子について計算した。qRT - PCR データは、単位/HPRT として示されている。ピアソン及びスピアマンの順位相関係数及びp 値が示されている。同じ遺伝子セットのRT - PCR 遺伝子発現データは、F ~ J に示されている。各群の中央値及び四分位範囲が示されている。群間の統計比較は、マン - ホイトニー U 検定により評価した。有意な p 値が示されている(* p < 0 . 0 5、* * p < 0 . 0 1、* * * p < 0 . 0 0 1)。

【図13】検査セットで有意に異なる発現を示した遺伝子の幾つかのマイクロアレイ及びqRT - PCR による遺伝子発現の相関性を示す図である。マイクロアレイの各プローブのシグナル強度データを各患者について計算し、その後、HPRT と比較した発現を、log₂[目的遺伝子] - log₂[HPRT]として各遺伝子について計算した。qRT - PCR データは、単位/HPRT として示されている。ピアソン及びスピアマンの順位相関係数及びp 値が示されている。同じ遺伝子セットのRT - PCR 遺伝子発現データは、F ~ J に示されている。各群の中央値及び四分位範囲が示されている。群間の統計比較は、マン - ホイトニー U 検定により評価した。有意な p 値が示されている(* p < 0 . 0 5、* * p < 0 . 0 1、* * * p < 0 . 0 0 1)。

【図14】選択された組み合わせのバイオマーカーを交差検定するために使用した2 項回帰モデルの結果を示す図である。MSE = 平均2 乗誤差、SD = 標準偏差。

【図15】1 群当たり3 個の遺伝子(SH2DB1、PNOC、及びTLR5)の発現レベルを示すボックスプロットである。

【図16】3 個の遺伝子TLR5、PNOC、及びSH2DB1 間の主要及び相互作用効果を用いてロジスティック回帰分類指標を使用して得られたROC 曲線である。AUC、感度、及び特異性は、この試料の至適カットオフ(つまり、0 . 0 6 0 2)で計算した。

【図17】3 個の遺伝子(SH2DB1、PNOC、及びTLR5)を使用して、ロジスティック回帰分類指標により推定された寛容確率のボックスプロットを示す図である。

【図18】3 個の遺伝子、TLR5、SH2DB1、及びPNOC を用いて推定された分類ツリーを示す図である。この図は、各分岐でのカットオフ、及び各終端ノードに割り当てられた各結果の確率を示す図である(0 - 上段 - 非寛容、1 - 下段 - 寛容)。

【図19】ツリーのカットオフの適用を例示する一連のボックスプロットを示す図である。

【図20】寛容を予測するために3 個の遺伝子を用いた推定分類ツリーを使用して得られたROC 曲線を示す図である。

【図21】分類ツリーにより割り当てられた寛容の確率の頻度の棒グラフを患者群毎に示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0051】

10

20

30

40

50

実施例 材料及び方法

研究対象患者：

訓練セットの説明：

寛容ネットワークインデックス (IOT, Indices of Tolerance network) により募集したこの集団患者は、71人の腎移植レシピエント、及び19人の年齢及び性別一致健常対照 (HC) で構成されていた。5つの患者群には以下の患者が含まれていた：複数年にわたって免疫抑制を全て中止したにもかかわらず機能的に安定している (血清クレアチニン (CRT) < 160 $\mu\text{mol/l}$ 、及び過去12月間に10%未満の上昇) 11人の腎移植レシピエント (To1 - DF)、唯一の免疫抑制剤として10mg/日未満のプレドニゾンで維持された、機能的に安定した腎機能 (同じ基準) を有する11人の患者 (s - LP)、移植以来カルシニューリン阻害剤を用いずに免疫抑制 (アザチオプリン及びプレドニゾン) が維持された10人の患者 (s - nCNI)、標準カルシニューリン阻害剤療法で維持された30人の患者 (s - CNI)、生検で証明された (本研究用に全て再評価した) 免疫主導性の慢性拒絶反応を有する9人の患者 (CR)。患者の臨床的特徴は、表1に記述されている。試料は全て、盲目的様式で処理及び分析した。

10

【0052】

検査セットの説明：

腎移植レシピエントの独立セットは、アメリカ合衆国で募集された (ITN集団)。ITN集団は、以下の患者で構成されていた：(1) 複数年にわたって免疫抑制を全て中止したにもかかわらず機能的に安定している (血清クレアチニン (CRT) が基線の25%以内) 「To1 - DF」 (n = 24) 腎移植レシピエント、(2) ステロイドによる単独療法で維持された安定した腎機能を有する「Mono」 (n = 11) 患者、(3) To1 - DFと同じ基準を使用して3剤免疫抑制投与計画 (カルシニューリン又はmTOR阻害剤、抗増殖剤、及びコルチコステロイドを含む) で維持された臨床的に安定した腎機能を有する「s - CNT」被験者 (n = 34)、及び推定免疫媒介性同種移植片拒絶反応による慢性同種移植片腎症及び腎機能障害 (最初の移植後基線と比較して登録時の基線CRTが50%増加) を有すると定義される「CAN」参加者 (n = 20)。腎疾患/機能不全の既往歴又は急性医学的疾患の根拠のない31人の健常対照志願者 (HC) の群が更に登録された。群の特徴は表3に要約されている。全血mRNA及び凍結PBMCは、記載されている選択された検証アッセイを実施する実験室が受領した。

20

30

【0053】

血液試料：

訓練セット試料は、全ての場合で静脈切開の24時間以内に処理した。PBMCを、リンパ球分離培地 (PAA Laboratories社、サマセット、英国) を使用して、密度勾配遠心分離により得た。細胞を洗浄し、10% DMSO (Sigma社、ドーセット、英国) 及びヒト血清 (BioWest社、フランス) に再懸濁し、直ちに - 80 で凍結した。24時間後、細胞を液体窒素に移し、使用まで液体窒素で維持した。

【0054】

PBMCのフローサイトメトリー：

解凍したPBMCを洗浄し、 1×10^6 / mLで再懸濁した。滴定量の蛍光色素結合モノクローナル抗体を使用して白血球を識別した。リンパ球の場合はCD45⁺ CD14⁻、T細胞の場合はCD3⁺、B細胞の場合はCD19⁺、NK細胞の場合はCD56⁺ CD3⁻、CD4⁺ T細胞の場合はCD4⁺ CD3⁺、CD8⁺ T細胞の場合はCD8⁺ CD3⁺。B細胞サブセットは、以前に記載されているように (30)、以下のように定義した：後期記憶B細胞の場合はCD19⁺ CD27⁺ IgD⁻ CD24⁺ CD38⁻ / i_{nt}、未感作/成熟B細胞の場合はCD19⁺ CD27⁻ CD24^{int} CD38^{int}、T1/T2移行性B細胞の場合はCD19⁺ CD27⁻ CD24⁺ CD38^{hi} (全て、Caltag社製、パーリングム、アメリカ合衆国)。細胞を1%パラホルムアルデヒド/PBSで固定し、48時間以内にFACS Caliburでデータを得た。CD25発現を、(31)に記載のようにCD4⁺ T細胞で研究した。TGFB (R&D system

40

50

s社製)、IL-10、及びIFN (両方ともeBioscience社製、英国)のB細胞産生を、 2μ モネンシン及び $10\mu\text{g}/\text{mL}$ プレフェルジンAの存在下で、 $500\text{ng}/\text{mL}$ ホルボール12-ミリステート13-アセタート及び 1μ イオノマイシンを用いて、37にて5時間in vitro刺激したPBMCの細胞内サイトカイン染色により評価した。各試料につき、最低10,000回のCD19⁺事象を得た。

【0055】

抗ドナー抗体検出：

末梢血を、血液凝固活性化因子バキュテナー (Becton Dickinson社、サンホゼ、アメリカ合衆国)で収集し、最低2時間及び最大24時間凝固させた。試料を遠心分離し、収集した血清を使用まで-80で保管した。

10

【0056】

xMAP (登録商標) (Luminex) 技術 (32) によるあらゆる特異性のIgG抗HLA抗体のスクリーニング。洗浄した後、HLAコーティングLuminexスクリーニングビーズ及び $12.5\mu\text{l}$ の患者血清又は対照血清をプレートに添加し、暗所で30分間ゆっくりと混合した。プレートを3回洗浄し、PE結合ヤギ抗ヒトIgG (1:10)を、各試験ウェルに添加した。プレートを1時間インキュベートし、洗浄緩衝液を添加し、その後、製造業者の推奨に従って、Luminex100機器を使用してデータを収集した。

【0057】

IgGサブクラス及び抗HLA広域特異性のスクリーニング：

20

陽性血清を、IgGサブクラスの特異性、並びにクラスI及びII広域特異性の識別について試験した。スクリーニングは、クラスI及びII Luminex 識別キット (Quest Biomedical社)を使用して実施した。結合患者抗体の検出に使用した二次抗体は以下の通りだった：ビオチンに結合された抗ヒトIgG1 (クローン8c/6-39、Sigma社)、ビオチンに結合された抗ヒトIgG2 (クローンHP-6014、Sigma社)、ビオチンに結合された抗ヒトIgG3 (クローンHP-6050、Sigma社)、ビオチンに結合された抗ヒトIgG4 (クローンHP-6050、Sigma社)、及びストレプトアビジン-フィコエリトリン (Calbiochem社)。

【0058】

30

機能アッセイ用の細胞画分：

PBMCを、アッセイ当日に解凍した。T細胞サブセットCD4⁺及びCD4⁺CD25⁻ (CD25⁺が枯渇したCD4⁺細胞)を、以前に記述されているように(33)、標準的陰性免疫分離を使用して分離した。純度は、フローサイトメトリーで検証した。特に、本発明者らは、蛍光色素が結合された2つの特定のセットのモノクローナル抗体を使用して、単離末梢血単核細胞を染色した。以下の分析には、リンパ球 (前側及びCD45⁺CD14⁻発現で選択された)を使用した。第1のセットは、TCRガンマ/デルタ-FITC、CD25-PE、CD4-APCを含んでいた。CD4⁺T細胞を選択し、このサブセット内でCD25の中間発現を研究して、CD4⁺CD25^{int}のレベルを得た (CD25陰性から、CD4NEG細胞が示したのと同じくらい高いレベルのCD25までと定義した。CD25high細胞は、このゲートから除外する)。第2のセットは、CD3-FITC、CD56-PE、及びCD19-APCを含んでいた。CD19⁺細胞を選択し、その割合をCD3⁺リンパ球の割合で除算して、変数「B.T」を得た。

40

【0059】

ドナー、代用ドナー、及び第3の個体の細胞：

31人の生体腎ドナーに由来する細胞を、訓練セットで71個のドナー特異的細胞アッセイに使用し、28人のドナーに由来する細胞を、検査セットで64個の細胞試料に使用した。ドナー血液が入手できなかった場合、元のドナーと同じHLAクラスII発現を示した代用ドナー細胞を取得した。これら細胞及び同様に不一致の第3の個体の細胞は、以下のものから使用した：Anthony Nolan骨髄登録からの健常志願者、HLA

50

型が決定されている健常志願者、及びロンドンのHammer Smith and Guy's病院で献体時に収集された脾細胞。同様に不一致の第3の個体の細胞は、関連ドナー及びレシピエントと比較した際の、クラスII (HLA-DR及びHLA-DQ)のHLA不一致の数により選択した。

【0060】

ELISpot用のMLR培養：

ヒトIFN-ELISpot_{PRO} (Mabtech社、スウェーデン)キットを使用し、製造業者の説明書に従って発色させた。バックグラウンドを差し引いた陽性スポットを、ELISpotプレート用の自動的画像分析装置(AID社、ドイツ)を使用して計数した。直接経路ドナー特異的応答T細胞頻度の定量的評価は、ドナーPBMC又はHLA型が決定された第3の個体の細胞のいずれかから分離されたT細胞及びNK細胞枯渇PBMC(APC)でレシピエントCD4⁺T細胞を刺激することにより行った。同種MLR培養を24時間にわたって実施した。複製物を、典型的には1ウエル当たり 2×10^5 個の応答細胞から開始した3つの倍加希釈物を用いて準備した。応答細胞に対する刺激因子の比率は、最高希釈物に使用された応答細胞の数、典型的には1ウエル当たり 1×10^5 個の応答細胞と比較して、APCの数が常に半分になるように使用することにより一定に維持した。ドナー反応性は、ドナーに対する頻度及び第3の個体に対する頻度の比率として表した。頻度の逆数をデータベースに記録し(つまり、54,000個の細胞のうち1個は、54,000として記録した)、したがって比率値 > 1.5 は、ドナー刺激に対する低応答を示すと定義した。

10

20

【0061】

遺伝子発現解析用の血液試料採取：

訓練セット集団の場合、末梢静脈血液を、PAXgene Blood RNAチューブ(QIAGEN社、クローリー、英国)に直接採取した。全血RNAを、DNAseI処理を含むPAXgene Blood RNAキット(QIAGEN社)を使用して抽出した。検査セット集団の場合、末梢静脈血を、Tempus(商標)Blood RNAチューブ(Applied Biosystems Inc.社)に直接採取した。全血RNAを、製造業者の説明書に従って抽出した。全RNA試料を、RT-PCR及びマイクロアレイによる遺伝子発現解析にかけた。

30

【0062】

mRNA研究用の試料；

以下のもので構成される訓練セットからの95個の試料を使用した：10人のToll-D患者に由来する13個の試料、11人のs-LP患者に由来する16個の試料、8人のs-nCNI患者に由来する8個の試料、28人のs-CNI患者に由来する40個の試料、9人のCR患者に由来する10個の試料、及び8人のHCに由来する8個の試料。

検査セットとして、以下のもので構成される142個の試料を使用した：23人のToll-D患者に由来する31個の試料、11人のMono患者に由来する14個の試料、34人のs-CNI患者に由来する52個の試料、18人のCAN患者に由来する25個の試料、及び20人のHCに由来する20個の試料。

40

【0063】

RNA品質管理：

PAXgene(登録商標)(訓練セット)及びTempus(商標)(検査セット)で精製したRNAの品質及び完全性を、Agilent 2100バイオアナライザー(Agilent Technologies社製)でAgilent RNA 6000 Nanoキットを使用して決定した。ND-1000分光光度計(NanoDrop Technologies社製)で A_{260nm} を測定することにより、RNAを定量化した。

【0064】

RNA増幅及び標識化：

試料標識化は、「One-Colour Microarray-Based Gene Expression Analysis」プロトコール(バージョン5.5、パー

50

ツ番号G4140-90040)に詳述されるように実施した。手短かに言えば、0.5 μ gの全RNAを、Agilent Low RNA input Linear Ampキット(Agilent Technologies社製)をシアニン3-CTPの存在下で使用した増幅及び標識化ステップに使用した。cRNAの収量及び色素取り込み率を、ND-1000分光光度計で測定した。

【0065】

R I S E T 2 . 0 Agilent社製特注マイクロアレイのハイブリダイゼーション：
全血試料は全て、R I S E T 2 . 0マイクロアレイプラットフォームでハイブリダイズした。これは、三重反復で提供された5,069個のプロープを含む特注Agilent社製8x15K 60merのオリゴヌクレオチドマイクロアレイである。有効なEntrez遺伝子識別記号を有する4607個の遺伝子に対応する選択されたプロープ及び有効なEntrez遺伝子識別記号に割り当てることができなかった更なる407個のプロープは、最適化されたプロープのハイブリダイゼーション特性で、交差ハイブリダイゼーションを回避し、複数の遺伝子転写物変異体の検出に最適化されていた。ハイブリダイゼーション手順は、RNA品質及び完全性を制御した後で、Agilent社製遺伝子発現ハイブリダイゼーションキット(Agilent Technologies社)を使用して、「One-Colour Microarray-Based Gene Expression Analysis」プロトコルに従って実施した。手短かに言えば、ハイブリダイゼーション緩衝液中の0.6 μ gのCy3標識断片化cRNAを、R I S E T 2 . 0マイクロアレイに一晚(17時間、65)ハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション後、マイクロアレイを、Agilent社製遺伝子発現洗浄緩衝液1で1分間室温にて1回洗浄し、その後0.005%のN-ラウロイルザルコシンを含有する予め加温された(37)Agilent社製遺伝子発現洗浄緩衝液2で第2の洗浄を1分間行った。最後の洗浄ステップは、アセトニトリルを用いて30秒間実施した。

10

20

【0066】

走査及びデータ分析：

Agilent社製マイクロアレイスキャナーシステム(Agilent Technologies, Inc.製社)を使用して、Agilent社製マイクロアレイの蛍光シグナルを検出した。Agilent社製特徴抽出ソフトウェア(FES v.9.5.1.1)を使用して、マイクロアレイ画像ファイルを読み取り、処理した。遺伝子発現の差異を決定するために、Rosetta Resolver遺伝子発現データ分析システム(v.7.1.0.2、Rosetta Inpharmatics LLC社)を使用して、FES由来の出力データファイルを更に分析した。最初に、人為的な共通基準を、IOTデータセットに含まれていた全ての試料から計算した。この基線を使用して、各遺伝子及び試料のlog₂比率を計算した。加えて、試料と共通基準との間の観察された差異の信頼性を示すp値を、Rosetta Resolverソフトウェアに実装されている汎用誤差モデルを適用して、各遺伝子について計算した(34)。

30

【0067】

アノテーション濃縮解析：

異なる試料群の間で差別的であり、両研究セットに共通していることが見出された遺伝子のリストを、完全R I S E T 2 . 0マイクロアレイ配置と比較して、生物学的経路アノテーション用語の統計的に有意な濃縮について分析した。予測バックグラウンド分布と比較した用語濃縮は、フィッシャー直接検定を使用してスコア化した。アノテーションは、異なる供給源、例えば、Gene Ontology(GO、www.geneontology.org)、シグナル経路メンバシップ、配列モチーフ、染色体近接性、文献キーワード、及び細胞特異的マーカー遺伝子から導き出した。

40

【0068】

定量的RT-PCR解析；

200ngの全血全RNAを、qPCR1本鎖合成キット(Stratagene社)を使用して逆転写し、合成cDNAをRT-PCR解析にかけた。

50

【0069】

マイクロアレイデータ検証：

マイクロアレイ遺伝子発現解析により特定された選択されたセットの遺伝子を、定量的 RT-PCR で検証した。定量的 RT-PCR は、以下の遺伝子について Applied Biosystems 社製の既製 TaqMan パネルを使用して実施した：Hs01017452__m1 Bリンパ球チロシンキナーゼ (BLK)、Hs00236881__m1 CD79b 分子 (CD79b)、Hs01099196__m1 ヘパラン硫酸 (グルコサミン) 3-O29 スルホトランスフェラーゼ 1 (HS3ST1)、Hs01592483__m1 SH2ドメイン含有 1B (SH2D1B)、Hs00172040__m1 T細胞白血病 (TCL1A)。

10

【0070】

訓練セットでスクリーニングされた他のアッセイ：

本発明者らは、間接経路 IFN ELISpot、並びに直接及び間接経路 trans-vivo DTH アッセイも実施した。サイトカイン遺伝子の RT-PCR 増幅を、ドナー細胞及びレシピエント細胞の直接及び間接経路培養で実施し、TCR レポートリー解析は、TCR-ランドスケープ解析で達成した (データ非表示)。

【0071】

統計：

多くの群比較において $n < 20$ であり、データは正規分布していなかったため、ノンパラメトリック検定を使用して統計的有意差を推定した。ウィルコクソンの符号付順位検定を使用して、同じ患者群内の応答を比較した。マン-ホイットニー U 検定を使用して、患者群間の中央値を比較した。通常はカテゴリデータ及び抗 HLA 抗体の存在又は非存在として記録される臨床変数間の関連性を比較するために、本発明者らは、フィッシャー直接検定を使用した。0.05 未満だった場合、両側 p 値を使用して有意差を示した。

20

【0072】

マイクロアレイ及びバイオマーカーの統計分析：

マイクロアレイにより検出された有意に変更された発現を、4 階級分析、及び 1% 偽陽性率 (FDR、False Discovery Rate) の Benjamini-Hochberg 補正を用いたクラスカル-ワリス検定を使用して統計的に決定した。本発明者らは、データが幾つかの場合に正規性から逸脱すると考えられたため、この解析にはノンパラメトリック検定を選択した。同様の手順を使用して、バイオマーカーを順位付けした (欠測値は、試料全体の平均と同値とし、対数スケールで試験した)。寛容患者を検出する幾つかの変数の予測能力を評価するために、本発明者らは、受信者動作特性 (ROC) 曲線を使用した。これらを構築するために、まず、4 階級分析により、訓練セット内の識別的発現された T o l - D F のプローブを特定し、クラスカル-ワリス検定を使用して順位付けした。その後、最上位の発現が有意に異なるプローブを、2 項回帰モデルに追加し、試料内の階級化を実施するために使用した。2 項回帰手順を使用して、T o l - D F 患者の確率 $p[1]$ 、 \dots 、 $p[n]$ を各被験者について計算した。ROC 曲線は、確率閾値を 0 から 1 の間で変動させることにより生成し、閾値 t の各々の値について、 $p[i] > t$ の場合、被験者 i の実際の階級対予測階級の 2×2 階級化表を「T o l - D F」と同値に設定した。被験者のブートストラップリサンプリングは、試料内階級化結果がロバストであることを示した。検査セットの場合、訓練セット分析と同じプローブを使用した。

30

40

【0073】

寛容腎移植患者のデモグラフィックス：

訓練セットは、71 人のヨーロッパ系腎移植レシピエント及び 19 人の年齢及び性別一致健常対照で構成されていた (表 1)。T o l - D F 群の大部分は献体ドナーであり (11 人中 7 人)、高度の HLA 不一致 (不一致中央値 4.0) は、主に男性であり (11 人中 9 人)、末期腎不全の原因は様々であり、輸血及び以前の移植等の幾つかの感作事象の根拠があった (表 2)。これら患者は、比較的無事象の移植後経過を示しており、1 人の患者のみが急性細胞性拒絶反応 (ACR) の発症が記録されていた。免疫抑制を受けてい

50

ない期間は、1年～21年間と様々であった。検査セットのT o l - D F群(表3)は、24人の患者で構成されており、そのほとんどは、HLAが高度に一致した生体ドナー(不一致中央値0.0)から移植を受けており、免疫抑制を1～32年間中止していた。

【0074】

T o l - D Fレシピエントは、Bリンパ球及びNKリンパ球の数の増加を示した。図1に示されているように、訓練セットのT o l - D F患者は、末梢血B細胞及びNK細胞の割合の増加、及びそれに対応したT細胞の割合の減少を示した。B細胞及びT細胞の割合を比率として表わすと、T o l - D F患者は、HCを含む他の全ての研究群と比較して、最も高い比率を示した。6人のT o l - D F患者及び10人のs - C N I患者の場合、1リンパ球サブセット当たりの細胞の絶対数を計算することも可能だった。これにより、比率の変更は、B細胞及びNK細胞の数の増加によるものであり、T o l - D F群はいずれもリンパ球減少症でなかったため、T細胞数の低減によるものではないことが示された(表2)。訓練セットでの知見と一致して、検査セットのT o l - D F患者も、HCを除く他の全ての群と比較して、末梢血B細胞の割合の上昇及びより高い比率のB:T細胞割合を示した(図1E及びH)。T o l - D F患者で検出された末梢血B細胞の特徴的な増殖を考慮して、B細胞サブセット分析(図8)及びサイトカイン産生(図9)を、両研究セットからの選択された患者で更に評価した。T o l - D F群は、後期記憶貯留が減少し、移行性及び未感作B細胞サブセットが同時に増加するというB細胞サブセット再分布の傾向を示した。B細胞サブセットの割合を比率として検討すると、T o l - D F患者は、C R患者と比較して、有意により低い割合の記憶B細胞及びより高い割合の移行性B細胞を有することが見出された。T o l - D F患者に由来するB細胞のかなりの割合は、i n v i t r o刺激の際に、I L - 10又はF_γではなく、T G F β を産生することが見出された。しかしながら、I L - 10産生の有意差は、いずれの研究群でも検出されなかった。各患者群に由来するB細胞が、刺激の際にいずれかのサイトカインを産生する能力を、各サイトカインを産生するB細胞の数の比率を計算することにより分析した。これにより、T o l - D F患者のB細胞が、偏ったサイトカイン応答を示し、他の研究群に由来するB細胞よりも、T G F β を産生する傾向がより高いことが示唆された。

【0075】

寛容レシピエントは、末梢血中により少数の活性化C D 4⁺T細胞を有していた。C D 4⁺T細胞によるC D 25の発現を、上述のように分析した。訓練セットのT o l - D F患者は、HC、s - L P、s - n C N I、及びC R群と比較して、活性化T細胞であると広く考えられている(9、10)有意により低い割合の循環中C D 4⁺C D 25^{i n t}T細胞を有することが見出された(図2A)。興味深いことには、C D 4⁺C D 25^{h i}制御性T細胞の割合の有意差は、s - C N Iによる完全な免疫抑制を受けた患者と他群との間でのみ検出された(図2B)。検査セットでも同様の結果が見出され、T o l - D F患者は、s - C N I群及びC A N群と比較して、有意により低い割合のC D 4⁺C D 25^{i n t}T細胞を有するが、ここでも、T o l - D Fと他の研究群との間には、C D 4⁺C D 25^{h i}T r e gの割合の差異は検出されなかった(図2C及び2D)。他の群間の統計的比較は、表5に示されている。本発明者らが、ポリクロール刺激により誘導された自己T細胞増殖を抑制する濃縮C D 4⁺C D 25^{h i}T細胞の能力を試験すると、いずれの患者群間又は健常対照間でも有意差は見出されなかった(データ非表示)。更に、T o l - D F患者は、C D 3⁺C D 8⁺C D 28⁻又はC D 3⁺C D 4⁺C D 8⁻T細胞等の、より高い割合の他の制御性T細胞サブセットを示さなかった(データ非表示)。

【0076】

大多数の寛容レシピエントは、検出可能な抗ドナーHLA特異的抗体を有していなかった。血清非ドナー特異的抗体(N D S A)は、L u m i n e x x M A P分析により、訓練セットの全ての研究群に由来する幾人かの患者で検出可能であった(図3A)。この集団内では、T o l - D F患者は、検出可能なドナー特異的抗体(D S A)を有していなかったが、他の全ての群には、検出可能なD S Aを有する患者が幾人が存在し、C R患者のほとんど半分は、検出可能なドナー特異的及び非ドナー特異的抗HLAクラスI及びクラ

10

20

30

40

50

ス I I 抗体を両方とも有していた。訓練セットと同様に、検査セット内の 22 人の T o l - D F 患者中 1 人のみが、検出可能な D S A を有していた（データ非表示）。興味深いことには、一般的に、D S A 陽性患者は、D S A 陰性患者よりも不良な移植機能を有し、推定糸球体濾過率は、D S A 陰性患者の 60（13 ~ 94 の範囲）と比較して、D S A 陽性の患者は 31（17 ~ 87 の範囲）だった。検出された抗ドナー抗体が病原性である可能性を、訓練セットで試験した（図 3 B）。抗クラス I 抗体を有する 20 人の患者中 7 人、及び抗クラス I I 抗体を有する 13 人の患者中 4 人に、本発明者らは、補体結合アイソタイプ（I g G 1 及び I g G 3）を見出し、残りの陽性ケースは、もっぱら非補体結合アイソタイプだった。N D S A 抗クラス I 及び抗クラス I I 抗体の検出は、以前に移植を受けていること、移植の前に検出可能なパネル反応性抗体を有することと有意に関連していた（フィッシャー直接検定、 $p < 0.05$ ）。しかし、過去の妊娠、輸血、移植片機能不全、又は A C R の発症とは関連しなかった。対照的に、D S A 抗クラス I I 抗体は、過去の A C R 発症、及びドナーとレシピエントとの間の H L A 不一致の数と関連していた（フィッシャー直接検定、 $p < 0.05$ ）。

【0077】

寛容患者は、より低頻度の直接経路抗ドナー I F N C D 4 + T 細胞応答を示す。直接経路 C D 4 + T 細胞抗ドナー応答及び抗第 3 の個体（ドナーと等しく不一致）応答の比較を、I F N E L I S p o t により評価した。T o l - D F 患者は、訓練セット内の他の全ての安定患者群と比較して、ドナー特異的低応答性を示す、有意により高い比率の応答抗ドナー頻度：抗第 3 の個体頻度を示した（図 4 A；ドナー及び第 3 の個体に対する個々の応答頻度は、図 10 に示されている）。ドナー特異的低応答性は、応答 T 細胞に由来する C D 2 5 + 細胞の枯渇が、応答頻度の増加をもたらさなかったため、T r e g により媒介されなかった（データ非表示）。検査セットの T o l - D F 群は、ドナーと H L A が完全に一致していた頻度が高かったため、抗ドナー及び抗第 3 の個体 I F N 応答は、一般的に非常に低かった（応答頻度 $> 1 / 200, 000$ ）。それにも関わらず、この T o l - D F 群の抗ドナー応答における傾向は、一般的に再現されたが、他群と比較して有意差は検出されなかった（図 4 B）。

【0078】

寛容レシピエントは、末梢血中で、より高い比率の F o x P 3 及び - 1, 2 - マンノシダーゼ遺伝子の発現を示した。F o x P 3 及び - 1, 2 - マンノシダーゼの全血遺伝子発現レベルは、両方とも移植後の抗ドナー免疫反応性に関連することが示されており（11）、それを q R T - P C R で分析した（図 11）。F o x P 3 及び - 1, 2 - マンノシダーゼ発現の比率を計算すると、訓練セットの T o l - D F 群と C R 群と H C 群との間に、有意差が検出された（図 5 A）。最も高い比率を示す患者群は、H C、s - L P、及び T o l - D F だったが、この比率は、C R では劇的により低かった（T o l - D F 以外の群間比較のマン-ホイットニー U 検定の p 値は、表 6 に示されている）。この比率は、e G F R と有意に関連しており、血清クレアチニンと逆相関した（ピアソン係数：それぞれ、 0.372 $p = 0.002$ 及び -0.299 $p = 0.014$ 、データ非表示）。同じ分析を検査セットで実施すると、T o l - D F 患者での比率は、H C を除く他の全ての患者群での比率より有意に高かった（図 5 B）。訓練セット及び検査セットの結果を組み合わせると、寛容は、高い比率の末梢血 F o x P 3 及び - 1, 2 - マンノシダーゼ発現と関連していることが示される。

【0079】

寛容患者は、特徴的な遺伝子発現プロファイルを示した。移植研究に焦点を置いて設計された R I S E T 2 . 0 特注マイクロアレイを、5,069 個のプロープを含むように構築し、末梢血試料中の 4607 個の遺伝子（有効な E n t r e z 遺伝子識別記号）の発現を分析するために使用した。マイクロアレイデータの 4 階級分析を、訓練セットで実施した（図 6）。T o l - D F 患者と他の比較群、安定レシピエント（s - C N I、s - n C N I、及び s - L P）、C R、及び H C との間で検出された有意に変更された遺伝子発現を、1% 偽陽性率（F D R）で補正したクラスカル-ワリスノンパラメトリック検定（1

10

20

30

40

50

2) を使用して統計的に決定した。他の研究群と比較して、T o l - D F 患者での免疫抑制の欠如を検討するために、H C 群を、この解析に含めた。255個の遺伝子に対応する260個のプロープが、研究群間で発現が有意に異なると特定された。同様の解析を検査セットで実施すると、発現が有意に変更された、1352個の遺伝子に対応する1,378個のプロープが特定され、174個のプロープ(170個の遺伝子)が、訓練セット及び検査セットの両方に共通していたことが見出された(表7)。

【0080】

マイクロアレイ発現を、下方制御されるか又は上方制御されるかのいずれかであることが検出されたプロープを含む、リスト内で高位に順位付けられた幾つかのプロープのq R T - P C R 分析により検証した。全遺伝子の発現は、両アッセイを使用したところ、高度に相関しており(図12A~E)、選択された遺伝子のq R T - P C R で定量化された発現は、研究した遺伝子に依存して、少なくとも1つの他の患者群と有意に異なっていた(図12F~J)。興味深いことには、全ての選択された遺伝子のT o l - D F 患者試料中の発現レベル中央値は、訓練セットと検査セットとの間で非常に類似していたが、検査セットのサンプル数がより多かったため、それらの相関係数は一般的により高かった(図13A~E)。更に、T o l - D F 患者の遺伝子発現は、試験した5個の遺伝子のうちの4個については、他群のほとんどと有意に異なっていた(図12及び13F~J)。上位に順位付けされたプロープのプロープ発現中央値は、表8に示されている。

【0081】

本発明者らは、寛容個体と非寛容個体を区別する有用性を有する、遺伝子発現解析に対するより正確な定量的手法の遺伝子発現診断能力を、マイクロアレイ解析により特定された上位順位の遺伝子を、任意の単一遺伝子の任意の重複プロープを除いて(例えば、2位及び4位に順位付けられたT C L 1 A、4位に順位付けられたプロープを除く)、R O C 曲線を構築するための追加の2項回帰モデルを使用して調査した。これらのプロープを使用して、まず予測階級を生成する(試料内)ことにより、したがって各個体の階級化により、T o l - D F 患者を特異的に特定する遺伝子発現特徴を構築した。この解析の場合、2階級R O C 曲線(寛容対非寛容)は、非寛容比較群のH C 群を含むもの及び含まないものの両方を構築した。これをしたのは、健常対照と寛容個体を比較することは、寛容特異的遺伝子発現を特定するためには興味深い、腎移植患者の寛容に関する臨床診断検査を開発するという状況では、この比較は有用ではないからである。H C を除いて構築され、上位10位に順位付けられた遺伝子の発現に基づく(表4)対応するR O C 曲線(図6A)は、訓練セット内で、0.01の閾値でピーク特異性及び感度が1、対応する陽性的中率(P P V)及び陰性的中率(N P V)が100%であることをもたらした(H C を含むR O C ; 閾値0.2、特異性0.853、感度0.923)。訓練セット内では、良好な寛容患者の識別をもたらすのに3個の遺伝子及び6個の遺伝子で十分だったが、その後の検査セットのR O C 解析の特異性及び感度を向上させたため、上位10位に順位付けられた遺伝子を、使用のために選択した(図6B)。検査セットの試料解析内では、0.35の閾値で0.890の特異性及び0.806の感度、それぞれ71%及び93%のP P V 及びN P V がもたらされた(H C を含むR O C ; 閾値0.23、特異性0.801、感度0.806)。

【0082】

本発明者らは、訓練セットと検査セットとの間で特定された、174個の重複するプロープのセットでアノテーション濃縮解析を実施した。アノテーションされた経路と任意の有意な関連性を有することが見出された遺伝子の大部分は、B細胞関連経路内に濃縮されていた(表9)。これらデータと一致して、10個の遺伝子に対応する上位11位に順位付けられたプロープのうち、6個の遺伝子が、B細胞により発現されると記述されているか、又はB細胞機能に関連すると記述されている(表4)。このプロープリスト内で濃縮されたB細胞関連経路に加えて、タンパク質チロシンキナーゼ、二次シグナル伝達メッセンジャー分子の産生、及び他のT細胞活性化関連経路を含む他の経路も有意だった(表9)。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 3 】

クロスプラットフォームバイオマーカー診断能力。

材料及び方法の項に記載されている全アッセイを、T o l - D F 患者と他の全ての研究群とを区別するそれらの診断能力に関して、並行して試験した。検査セットで実施したアッセイは、訓練セット内で寛容を高度に予測した。それらは上記で考察されている。寛容の存在を示す種々のバイオマーカーを組み合わせることにより、本発明者らは、任意のそのような個別検査の診断能力を著しく向上させることが可能であると予期した。これは、検査セットで実際に観察された。実際、1) B / Tリンパ球サブセットの比率、2) C D 4 + C D 2 5 i n t T細胞の割合、3) 抗第3の個体 E L I S p o t 頻度に対する抗ドナーの比率、4) F o x P 3 / - 1 , 2 - マンノシダーゼ発現の比率、及び5) 上位10位に順位付けられた遺伝子の特徴を使用して、バイオマーカー及びマイクロアレイデータを組み合わせて分析すると、訓練セットの特異性及び感度は、0.01の閾値で1だった。これは、P P V 及び N P V が 1 0 0 % だったことを意味した(図7A)。検査セットを分析すると、0.27の閾値で、0.923のピーク特異性及び0.903の感度が得られ、P P V は 8 0 % 、 N P V は 9 6 % だった(図7B)。これにより、遺伝子発現のみで得られたものと比較して、診断能力が向上した。したがって、クロスプラットフォームバイオマーカー特徴の適用は、遺伝子発現及び表現型解析に加えて、寛容の機械論的基盤の記述とより密接に関連する場合がある個体の免疫学的機能状態を考慮に入れることができるため、真の寛容を特定する能力を向上させた。この点で、患者T細胞及びB細胞応答の研究は有用な手法であり、本発明の中でバイオマーカーとしても使用することもできる。このクロスプラットフォームバイオマーカー特徴の有用性は、知らないうちに実効的寛容である場合がある腎移植患者を特定するその能力にある。図7C及びDに示されているように、検査セットの5人の安定レシピエントが、寛容特徴を有すると特定することができ、したがって、管理された免疫抑制離脱から利益を得ることができる。興味深いことには、検査セットの2人のC A N 患者も、寛容である確率が高いと特定された。訓練セットのC R 群とは異なり、C A N 患者は、免疫媒介性拒絶反応を有することが生検により明らかにならなかつたが、不良な移植片機能に基づいて定義されたため、この知見は、慢性拒絶反応の臨床評価の差異により説明することができる。これら患者の検査に使用したクロスプラットフォームバイオマーカーは、これら2つの患者群間の微妙な差異、これら等の患者を経時的に連続して免疫モニタリングすることにより明らかにされる場合がある特性を検出するのに十分な感度を有することが可能である。

10

20

30

【 0 0 8 4 】

統計データ

統計専門家が、訓練セットを使用して、以下の感度及び特異性を計算した；

【 0 0 8 5 】

【表 1】

| | 閾値 | 特異性 | 感度 |
|-------------------------------|------|----------|----------|
| CD4.CD25 (フローサイトメトリー) | 0.14 | 0.695122 | 0.615385 |
| B.T (フローサイトメトリー) | 0.12 | 0.804878 | 0.692308 |
| FoxP3:1,2a マンノシダーゼ(RT-PCR) | 0.18 | 0.841463 | 0.461538 |
| ドナー特異的 CD4+ (IFN ガンマ ELISpot) | 0.13 | 0.768293 | 0.538462 |

40

【 0 0 8 6 】

その後、検査セットを使用して同じ計算を行った；

【 0 0 8 7 】

【表 2】

| | 閾値 | 特異性 | 感度 |
|-------------------------------|------|----------|----------|
| CD4.CD25 (フローサイトメトリー) | 0.23 | 0.846847 | 0.419355 |
| B.T (フローサイトメトリー) | 0.23 | 0.837838 | 0.548387 |
| FoxP3:1,2a マンノシダーゼ(RT-PCR) | 0.17 | 0.738739 | 0.677419 |
| ドナー特異的 CD4+ (IFN ガンマ ELISpot) | 0.21 | 0.153153 | 0.903226 |

10

【 0 0 8 8 】

統計専門家が、訓練セットを使用して、表にある遺伝子の感度及び特異性を計算した；

【表 3】

| | 閾値 | 特異性 | 感度 |
|------------|------|----------|----------|
| 遺伝子なし | 0 | 0 | 1 |
| CD79B | 0.16 | 0.837838 | 0.923077 |
| TCL1A | 0.14 | 0.783784 | 0.846154 |
| HS3ST1 | 0.15 | 0.810811 | 0.769231 |
| SH2D1B | 0.21 | 0.851351 | 0.923077 |
| MS4A1 | 0.13 | 0.77027 | 0.846154 |
| TLR5 | 0.12 | 0.689189 | 0.923077 |
| THC2438936 | 0.15 | 0.797297 | 0.846154 |
| PNOC | 0.12 | 0.72973 | 0.846154 |
| SLC8A1 | 0.18 | 0.743243 | 0.692308 |
| FCRL2 | 0.11 | 0.716216 | 0.846154 |

20

30

【 0 0 8 9 】

その後、検査セットを使用して同じ計算を行った；

【 0 0 9 0 】

40

【表 4】

| | 閾値 | 特異性 | 感度 |
|------------|------|----------|----------|
| 遺伝子なし | 0 | 0 | 1 |
| CD79B | 0.33 | 0.868132 | 0.806452 |
| TCL1A | 0.24 | 0.813187 | 0.870968 |
| HS3ST1 | 0.28 | 0.802198 | 0.870968 |
| SH2D1B | 0.26 | 0.681319 | 0.741935 |
| MS4A1 | 0.26 | 0.714286 | 0.806452 |
| TLR5 | 0.27 | 0.725275 | 0.741935 |
| THC2438936 | 0.3 | 0.78022 | 0.806452 |
| PNOC | 0.28 | 0.758242 | 0.774194 |
| SLC8A1 | 0.23 | 0.571429 | 0.774194 |
| FCRL2 | 0.29 | 0.769231 | 0.774194 |

10

20

【0091】

最良の予測値並びに良好な一般化可能性を提供する可能性のある遺伝子及び追加バイオマーカーの中で最良のサブセットを選択するために、更なる解析を実施した。最初に、各サイズ（1～14個のバイオマーカー）の最良のサブセットを、赤池の情報量基準に基づいて選択した。各サブセットの選択されたバイオマーカーは、下記の表に示されている。

【0092】

30

【表 5】

| | V1 | V2 | V3 | V4 | V5 |
|----|----------|-------------|--------------------|-------------|--------|
| 1 | SH2D1B | NA | NA | NA | NA |
| 2 | SH2D1B | PNOC | NA | NA | NA |
| 3 | SH2D1B | TLR5 | PNOC | NA | NA |
| 4 | CD4.CD25 | SH2D1B | TLR5 | PNOC | NA |
| 5 | CD4.CD25 | ドナー特異的 CD4+ | SH2D1B | TLR5 | PNOC |
| 6 | CD4.CD25 | TCL1A | SH2D1B | MS4A1 | SLC8A1 |
| 7 | CD4.CD25 | HS3ST1 | SH2D1B | MS4A1 | TLR5 |
| 8 | CD4.CD25 | HS3ST1 | SH2D1B | MS4A1 | TLR5 |
| 9 | CD4.CD25 | TCL1A | HS3ST1 | SH2D1B | MS4A1 |
| 10 | CD4.CD25 | B.T | TCL1A | HS3ST1 | SH2D1B |
| 11 | CD4.CD25 | B.T | CD79B | TCL1A | HS3ST1 |
| 12 | CD4.CD25 | B.T | CD79B | TCL1A | HS3ST1 |
| 13 | CD4.CD25 | B.T | ドナー特異的 CD4+ | CD79B | TCL1A |
| 14 | CD4.CD25 | B.T | FoxP3:1,2a マンノシダーゼ | ドナー特異的 CD4+ | CD79B |

10

20

【 0 0 9 3 】

【表 6】

| | V6 | V7 | V8 | V9 | V10 | V11 | V12 | V13 | V14 |
|----|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------|--------|-------|
| 1 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| 2 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| 3 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| 4 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| 5 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| 6 | FCRL2 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| 7 | SLC8A1 | FCRL2 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| 8 | THC24389 36 | SLC8A1 | FCRL2 | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| 9 | TLR5 | THC24389 36 | SLC8A1 | FCRL2 | NA | NA | NA | NA | NA |
| 10 | MS4A1 | TLR5 | THC24389 36 | SLC8A1 | FCRL2 | NA | NA | NA | NA |
| 11 | SH2D1B | MS4A1 | TLR5 | THC24389 36 | SLC8A1 | FCRL2 | NA | NA | NA |
| 12 | SH2D1B | MS4A1 | TLR5 | THC24389 36 | PNOC | SLC8A1 | FCRL2 | NA | NA |
| 13 | HS3ST1 | SH2D1B | MS4A1 | TLR5 | THC24389 36 | PNOC | SLC8A1 | FCRL2 | NA |
| 14 | TCL1A | HS3ST1 | SH2D1B | MS4A1 | TLR5 | THC24389 36 | PNOC | SLC8A1 | FCRL2 |

30

40

【 0 0 9 4 】

50

2項回帰モデルを、これらサブセットの各々について推定し、検査セット中のオーバーフィッティングを回避するために、交差検定を使用して解の安定性を確立した。図14には、交差検定の結果が示されている。交差検定の結果は、このモデルが追加マーカを包含した検査セットの特定の特徴にオーバーフィッティングし始めると考えられるため、最適解が少数のマーカ（例えば、2～5個、又は好ましくは2～3個）を含むべきであることを示唆した。

これを確認するために、各サイズの最良のサブセットを含む2項回帰モデルを使用して、ROC曲線、並びに訓練セットの対応する最適感度及び特異性を推定した。

【0095】

【表7】

10

| | 閾値 | 特異性 | 感度 |
|----|------|----------|----------|
| 1 | 0.21 | 0.851351 | 0.923077 |
| 2 | 0.12 | 0.932432 | 1 |
| 3 | 0.11 | 0.905405 | 1 |
| 4 | 0.11 | 0.932432 | 1 |
| 5 | 0.34 | 0.986486 | 1 |
| 6 | 0.01 | 1 | 1 |
| 7 | 0.01 | 1 | 1 |
| 8 | 0.01 | 1 | 1 |
| 9 | 0.01 | 1 | 1 |
| 10 | 0.01 | 1 | 1 |
| 11 | 0.01 | 1 | 1 |
| 12 | 0.01 | 1 | 1 |
| 13 | 0.01 | 1 | 1 |
| 14 | 0.01 | 1 | 1 |

20

30

40

訓練セット

【0096】

続いて、各サブセットサイズの訓練セットで得られた係数を使用することにより、検査セットの患者の寛容の確率を推定した。これら確率を最適カットオフ（訓練セットでも推定した）と組み合わせて使用して、検査セットの感度及び特異性を計算した。

【0097】

【表 8】

| | 閾値 | 特異性 | 感度 |
|----|------|----------|----------|
| 1 | 0.21 | 0.758242 | 0.612903 |
| 2 | 0.12 | 0.868132 | 0.677419 |
| 3 | 0.11 | 0.879121 | 0.709677 |
| 4 | 0.11 | 0.923077 | 0.612903 |
| 5 | 0.34 | 0.967033 | 0.387097 |
| 6 | 0.01 | NA | NA |
| 7 | 0.01 | 0.967033 | 0.129032 |
| 8 | 0.01 | 0.967033 | 0.193548 |
| 9 | 0.01 | 0.923077 | 0.645161 |
| 10 | 0.01 | 0.967033 | 0.225806 |
| 11 | 0.01 | 0.846154 | 0.193548 |
| 12 | 0.01 | 0.967033 | 0.193548 |
| 13 | 0.01 | 0.967033 | 0.193548 |
| 14 | 0.01 | 0.967033 | 0.225806 |

10

20

【0098】

30

これら結果により、交差検定の結果が確認され、個々の患者で最良の寛容確率を予測するために、好ましくは、2、3、4、又は5個のバイオマーカー、より好ましくは2又は3個のバイオマーカーを用いたモデルの使用が支持される。

【0099】

考察

本発明者らは、様々な程度の免疫抑制下で安定した腎機能を示す患者、慢性拒絶反応を起こす患者、及び健常対照から寛容な腎移植レシピエントを識別する1セットのバイオマーカーを開発した。寛容患者の訓練セットで特定されたバイオマーカーを、独立検査セットで検証した。本発明者ら、非投薬寛容レシピエントの末梢血中のB細胞及びNK細胞の増殖を見出した。これは、類似患者のより小さな集団での従来の研究結果に類似している(13)。また、マイクロアレイ解析は、Tol-Dfと他群との間で発現が変更された遺伝子が、明白に及び強力にB細胞に偏っていることを明らかにした。特に、SH2D1B、TLR5、及びPNOC遺伝子の組み合わせが、個体の寛容を決定するための非常に有効な検査を提供することが判明した。同種移植片拒絶反応(14及び15)及び寛容(16)の開始及び維持におけるT細胞の役割は、明白に確立されているが、B細胞の役割及びB細胞が寛容状態に寄与することができる機序は、まだ解明されていない。興味深いことには、抗CD45RB療法により誘導された、移植寛容に関するネズミ研究は、B細胞の機能的役割を示している(17)。また、最近のデータは、未感作B細胞には、心臓移植のネズミモデルにおいて、抗原特異的同種相互作用後に、移植片拒絶反応を阻害する制御性T細胞を誘導する能力があることを示している(18)。Br-1(IL-10産

40

50

生B細胞)の著しい増加は、この研究内のいずれの患者群でも検出されなかったが、本明細書で示されたデータは、B細胞移行性集団及び後期記憶集団の比率が変更されたこと、TGF β 産生細胞が相対的に増加したこと、血清ドナー特異的抗体及びドナー特異的直接T細胞低応答性が寛容レシピエントに存在しないことを示す。これらの観察は、腎移植寛容が、T細胞及びB細胞媒介性機能の両方の変更と関連している可能性があるという推測を可能にする。しかしながら、腎移植及び骨髄移植混合レシピエントのB細胞免疫及びT細胞免疫の両方を研究したPorcherayらによる最近の研究は、研究した寛容患者の幾人かでは、T細胞及びB細胞抗ドナー免疫が関連していないことを実証した(19)。この点において、この研究で寛容腎患者に観察されたB細胞特徴は、寛容の促進にB細胞が重要な役割を果たすこと示している可能性がある。

10

【0100】

機能アッセイを使用して抗ドナー応答をモニターすることにより、直接経路T細胞の低応答性は、固形臓器移植後に経時的に発生することが実証されている(20、21)。臨床の状況では、抗ドナーT細胞の頻度を計数することは、ステロイド退薬プロトコールに有用であることが判明している(22)。本研究では、ELISPOTによる抗ドナー直接経路応答を測定することも、有用であることが判明し、ドナーT細胞及び第3の個体のT細胞に対する応答の比率を決定することにより、寛容患者のドナー特異的低応答性が明らかになる。しかしながら、この検査は、ドナー及びレシピエントが、幾つかのHLA不一致を有する場合により有用である。これと同様の研究は、寛容肝臓レシピエント(23、24)の遺伝子解析に注目しており、寛容腎臓レシピエント(25、26)の遺伝子解析にも注目している。これら研究で発現が異なっていた遺伝子のセットは、本明細書で特定されたものとは異なっており、個体が免疫学的に寛容か否かを決定するにはそれほど効果的ではない。これは、使用した臓器、患者群、RNA供給源及び調製プロトコール、又は使用した解析プラットフォームの違いを反映している可能性が高い。実際、この研究で使用したマイクロアレイは、公開及び未公開データの両方に基づき移植用に重点を置いて選択的に設計されており、したがって、かなりの数の免疫応答関連プローブを含んでいた。

20

【0101】

訓練セット内で見出された、最も高位に順位付けされた寛容関連遺伝子のうちの2つ、TCRIA(順位2位)MS4A1(CD20)(順位5位)は、両方ともB細胞関連遺伝子である。MS4A1は、寛容腎移植患者に関連することが、以前にBraudら(25)により特定されている。

30

【0102】

この研究により記述された寛容特徴の考え得る解釈は、検出された免疫学的バイオマーカーは、Tol-D β 群の薬物媒介性免疫抑制の欠如によるものに過ぎないということであり得る。この可能性を検討するために、訓練セットの研究群を、別個の免疫抑制投与計画を受けている安定した腎移植患者、及び免疫抑制を受けていない被験者として健常対照を含むように特に選択した。訓練セットにおいて健常対照とTol-D β 群との間に明白な相違が観察されたが、これらの相違は、検査セットでは再現されなかった。この知見は、寛容の機序が、訓練セットとは対照的に、寛容レシピエントがドナーとHLAが高度に一致している検査セット内でよりわずかである可能性があるという事実に起因する可能性がある。これら研究群を全て考慮に入れたため、本明細書に記載したバイオマーカーの組み合わせは、単に免疫抑制がなかったためではなく、移植寛容に特異的な記述であると考えられる。寛容患者及び健常対照の詳細な比較は、寛容の機構論的基盤についてより多くのことを明らかにすることができるが、臨床の状況では、この比較は関連性がないとするのが妥当である。

40

【0103】

興味深い比較は、訓練セットのTol-D β 及びs-LP患者群の比較であり、それらは、10mg/日のプレドニゾンの使用において異なり、多くの臨床医により疑似生理学的なものともみなされている。s-LP群は、より高い割合の女性レシピエント、より高い

50

割合の献体ドナー、及びT o l - D F群より不良な腎機能を有していた。むしろ直観には反するが、記載されているアッセイのほとんどで、これら2つの群間に、免疫表現型、抗ドナー応答、F o x P 3 / - 1 , 2 - マンノシダーゼ比率、及び遺伝子発現の明白な相違があった。これは、ステロイド単独療法が、バイオマーカーにより明らかにすることができる、患者免疫状態の有意差を誘発することができるという概念を支持する。訓練セット内のT o l - D F患者のうちの1人は、骨髄供与を受けており、その4年前に同じドナーからの腎移植を受けていた。キメラ現象の証拠が検出されたため、この患者の免疫抑制は、初期に中止された。寛容誘発の機序がこの患者では異なる可能性があったため、バイオマーカー及びR O C曲線解析は、この患者を含む場合と含まない場合で実施したが、この患者は、研究されたアッセイのいずれでも寛容群内の外れ値として出現することはなかった。

10

この寛容特徴の有用性は、安全に免疫抑制を離脱することができる移植レシピエントを特定するその能力に依存する。本発明者らは、今や、バイオマーカーの特異的及び高感度のセットを開発した。それらを組み合わせると、寛容腎臓同種移植片レシピエントを特定することができ、免疫抑制剤を受けている幾人かの腎移植レシピエントも特定することができる。これらバイオマーカーの検証は、完全に独立したセットの患者を使用して達成された。この検証は、検査セットが、遺伝的に異なる集団に由来していた事実、並びに検査セット試料及び訓練セット試料の収集及び処理にも相違があったという事実により補強される。バイオマーカーは、臨床設定における決定ツールとして実用化することができる。それは、腎臓同種移植片レシピエントの個別化された安全な臨床的移植後管理を可能にすることができる。

20

【0104】

R T - P C Rを使用した更なる検証

寛容を決定する本方法を更に検証にするために、本発明者らは、異なる患者群で更なる研究(「G A M B I T」研究)を実施した。

【0105】

新しい研究群；

寛容患者：1年を超えて完全に免疫抑制を受けておらず、C R Tの上昇が中止前の基線から10%未満である新しい患者。(I O T研究の指標群に相当する)

【0106】

安定患者；移植してから5年を超えており、任意の免疫抑制療法で維持されており、過去5年間に全体的な安定した腎臓機能(平均e G F R変化が15%未満)を示している、安定的機能を示す成人腎移植レシピエント。(I O T研究の対照群1、2、及び3に相当する)

30

【0107】

慢性拒絶患者：過去3か月に移植片生検を受けており、免疫主導性の慢性同種移植片腎症を有すると分類された、移植後の1年間を超えて機能不全が増加している成人及び小児腎移植レシピエント(I O T研究の対照群4に相当する)。

【0108】

この研究では、本発明者らは、以下の患者群から新しい試料を収集した：

40

安定患者から33個の試料

慢性拒絶患者から12個の試料、及び

寛容患者から5個の試料、

健常対照から1個の試料

寛容を喪失した患者から1個の試料。

【0109】

R T - P C Rを、以下のプロトコールを使用して、選択された10個の遺伝子について実施した。

【0110】

R T - P C Rプロトコール

50

全血を、末梢静脈から、細胞を溶解しmRNAを安定化させる溶液を含有する「Tempus Tube (商標)」(ABI社 カタログ番号: 4342792)に直接収集した。チューブは、使用まで-20 で保管した。

【0111】

全血RNAを、TempusスピンRNA単離キット(ABI社 カタログ番号: 4380204)を使用して抽出した。mRNAの量及び品質を、ND-1000分光光度計(NanoDrop Technologies社)を使用して測定した。その後、RNAを-80 で保管した。

【0112】

1 µgの全血全RNAを、ABI Taqman逆転写合成キット(ABI社 カタログ番号: 4304134)を使用して、cDNAに逆転写し、直ちに使用した。cDNAを、384ウエルプレート(ABI社 カタログ番号: 4306737)の1ウエル当たり20 µl反応容積中で、下記に示したプライマー及びプローブを使用してRT-PCR解析にかけた。

【0113】

【表9】

| 遺伝子名 | ABI Hs# | 非インベントリー配列(供給源: IOT) |
|--------|---------------|--|
| HPRT | N/A | fw: 5'-agtctggcttatatccaacactcg - 3' rev: 5'- gactttgctttccttggcagg - 3' pr: 5'- tttcaccagcaagcttgacacttga -3' |
| SH2D1B | Hs01592483_m1 | N/A |
| TLR5 | Hs00152825_m1 | N/A |
| PNOC | Hs00173823_m1 | N/A |
| CD79B | Hs00236881_m1 | N/A |
| FCRL1 | Hs00364705_m1 | N/A |
| FCRL2 | Hs00229156_m1 | N/A |
| SLC8A1 | Hs00253432_m1 | N/A |
| TCL1A | Hs00172040_m1 | N/A |
| MS4A1 | Hs00544818_m1 | N/A |
| HS3ST1 | Hs01099196_m1 | N/A |

【0114】

健常対照に由来する試料中の遺伝子発現のレベルをチェックし、同じ遺伝子の発現が患者由来の全血試料でも検出されることを実証する最初のRT-PCRステップの後、RT-PCRを、この研究の患者cDNAで実施した。

【0115】

データ前処理ステップ:

- ・データを読み込み、異なるプレートのデータと統合する。
- ・プレートタイプの変化(96ウエルプレート及び384ウエルプレート間)によるバッチ効果をチェックする。バッチ効果は見られなかった。
- ・ウエルを非テンプレート対照でチェックし、プレート汚染の可能性を検出する。
- ・35を超えるCT値を未決定とコード化する。
- ・技術的複製の変動係数をチェックし、3%を超える場合はいかなる場合も警告を喚起する。本発明者は、複製品質が良好であり、懸念の理由はないことを見出した。

- ・ 平均値を使用して複製を総計する。
- ・ dCT を、目的遺伝子と $HPRT$ （制御遺伝子）との間の CT 値の差として算出する。
- ・ 2^{-dCT} を使用して dCT を再スケールして、陽性値のみを得る。
- ・ 過剰レベルの未決定発現による遺伝子 $SLC8A1$ からのデータを排除する。この遺伝子の発現は非常に低く、 $RT-PCR$ による検出は不良である。この遺伝子は、外れ値により元々選択された偽陽性だった可能性が高い。
- ・ 欠測値を有する患者のデータを排除する（安定患者のみが排除された）。

【0116】

データをヒートマップ形式で生成し（非表示）、樹状図は、10又は3個の遺伝子のいずれかを使用した、患者の教師なし階層的クラスタ分析の結果を示す。10個の遺伝子の使用は、寛容患者と一緒にグループ化することを支援しないが、交差検定により選択された3個の遺伝子を使用すると、5人の寛容患者が、樹状図の最後の分岐下の右側に一緒にクラスタ化される傾向があることは明らかである。データ非表示。

10

【0117】

3個の遺伝子 $PNOC$ 、 $SH2DB1$ 、及び $TLR5$ の発現レベルを示すボックスプロットが示されている。図15を参照されたい。

【0118】

当業者であれば明白であろうが、この3個の遺伝子を組み合わせて寛容患者と非寛容患者を区別する分類指標を生成するには、幾つかの方法が可能である。本発明者らは、本明細書において、2つの分類指標：1) 主要及び相互作用効果を用いたロジスティック回帰モデル、及び2) 分類ツリーの結果を示す。

20

【0119】

これらモデルのパラメーターを計算するために、本発明者らは、安定患者、慢性拒絶患者、及び寛容患者のデータを使用した。結果を寛容対非寛容に二分する。

【0120】

ロジスティック回帰フィッティングの結果：

【0121】

【表 10】

係数:

| | 推定 | Std. 誤差 | z 値 | Pr(> z) |
|-------------|---------|---------|--------|----------|
| (切片) | -14.457 | 8.319 | -1.738 | 0.0822 . |
| PNOC | 94.156 | 196.511 | 0.479 | 0.6318 |
| SH2DB1 | 6.289 | 4.337 | 1.450 | 0.1470 |
| TLR5 | 5.054 | 2.628 | 1.923 | 0.0545 . |
| PNOC:SH2DB1 | -1.523 | 58.209 | -0.026 | 0.9791 |
| PNOC:TLR5 | -51.584 | 58.373 | -0.884 | 0.3769 |
| SH2DB1:TLR5 | -2.339 | 1.921 | -1.217 | 0.2234 |

10

20

有意性記号: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 '\ ' 1

(2項ファミリーの分散パラメーターは1に設定した)

Null 逸脱度: 49の自由度で32.508

残差逸脱度: 43の自由度で14.892

AIC: 28.892

【0122】

「推定」列の係数は、寛容確率を計算するために使用した係数である。ロジスティック回帰分類指標を使用して得られたROC曲線については、図16を参照されたい。図17は、ロジスティック回帰分類指標を使用して推定された寛容確率のボックスプロットを示す。

【0123】

この方法を使用すると、単一の慢性拒絶患者が誤って寛容と分類され、5人の安定患者が寛容と分類され、これは、安定集団の15%を構成し、免疫抑制離脱に適している可能性のあると予測された20%以内に入る。

【0124】

回帰アルゴリズム:

$$Z = -14.457 + 94.156 * PNOC + 6.289 * SH2DB1 + 5.054 * TLR5 - 1.523 * PNOC * SH2DB1 - 51.584 * PNOC * TLR5 - 2.339 * SH2DB1 * TLR5$$

$$P(Tol) = e^Z / (e^Z + 1)$$

注意: 各遺伝子の発現は 2^{-dCT} として表されており、dCTは、各遺伝子と対照遺伝子(HPR1)との間のCTの差として計算される。患者は、P(Tol)が>0.0602である場合、寛容と分類される。

【0125】

30

40

50

図18は、3個の遺伝子(PNOC、SH2DB1、及びTLR5)を用いて推定された分類ツリーを示す。分類指標の性能が最適である場合、0より大きな寛容確率を有するあらゆる患者が寛容と分類される。終端ノードのうちの2つが、0より大きな寛容確率と関連した：1) $TLR5 < 3.37$ 及び $SH2DB1 > 1.02$ 及び $TLR5 < 1.58$ を示す患者(寛容確率 = 0.600)；及び2) $TLR5 < 3.37$ 及び $SH2DB1 > 1.02$ 及び $TLR5 > 1.58$ 及び $PNOC < 0.042$ を有する患者(寛容確率 = 0.333)。

【0126】

図19は、分類ツリーのカットオフのボックスプロットを示す。

【0127】

図20は、推定分類ツリーの使用からもたらされたROC曲線を示す。

【0128】

感度、特異性、及びAUCは、0より大きな寛容確率を有するあらゆる患者を寛容と分類することに起因する。図21は、様々な確率に割り当てられた各群の患者の数を示す。

【0129】

1人のCR患者が誤って寛容と分類された(回帰を使用した場合と同じ誤分類)。同様に、5人の安定患者が寛容と分類された。

【0130】

これらの結果は、これら3個の遺伝子を使用して、寛容患者と非寛容患者の区別の成功が得られたことを示す。実施の成功は、異なる分類法を使用して達成することができ、それらのうちの2つは、本明細書で例示されている。

【0131】

10

20

【表 1 1】

| | N | 年齢 ^a | %女性 ^b | Tx後 ^c | eGFR ^d | CRT ^e | リンパ球 ^f | %最初のTx ^g | %CAD ^h | HLA-MM ⁱ | CNI ^j | MMF ^k | Aza ^l | ステロイド ^m | 維持観察 ⁿ |
|--------|----|-----------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|---------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|-------------------|
| HC | 19 | 44 (37-52) | 47 | | | | | | | | | | | | |
| Tot-DF | 11 | 54 (41-58) | 18 | 12 (7-23) | 76.2 (58-69) | 97.0 (88-119) | 1.835 (1.4-2.2) | 64 | 64 | 4.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| s-I-P | 11 | 44 (36-58) | 36 | 12 (9-17) | 58.1 (41-70) | 120.6 (107-141) | 1.980 (1.5-2.3) | 73 | 91 | 4.0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 0 |
| s-nCNI | 10 | 49 (44-57) | 40 | 25 (23-26) | 64.2 (59-74) | 101.5 (87-121) | 1.790 (1.6-1.9) | 70 | 30 | 3.5 | 0 | 0 | 10 | 10 | 0 |
| s-CNI | 30 | 42 (37-47) | 47 | 6 (5-9) | 56.3 (49-63) | 115.0 (106-127) | 1.200 (0.9-1.8) | 86 | 7 | 4.0 | 22 | 11 | 14 | 29 | 5 |
| CR | 9 | 52 (31-54) | 33 | 5 (3-11) | 19.0 (13-31) | 312.0 (208-382) | 1.335 (1.2-1.5) | 78 | 44 | 4.0 | 6 | 4 | 3 | 7 | 5 |
| 全患者 | 71 | 44 (37-56) | 38 | 9 (5-18) | 58.1 (43-70) | 117.0 (98-143) | 1.500 (1.2-1.9) | 77 | 38 | 4.0 | 28 | 15 | 27 | 57 | 13 |

表 1 : 訓練セット (I O T 集団) の臨床及びデモグラフィック特徴

a、c、d、e、f : 群ごとの中央値及び四分位範囲が示されている。

a 年齢 (年) ; b 各群の女性のパーセント ; c 移植後の期間 (年) ; d MDRD 機能を使用した推定糸球体濾過率、http://nephron.org/mdrd_gfr_si ; e 血清クレアチニン値 (正常範囲 $60 \sim 105 \mu\text{mol/L}$) ; f 末梢血リンパ球計数 (1L 当たり $\times 10^9$ 細胞) ; g 最初の移植を受けた患者のパーセント ; h 献体ドナーでの患者のパーセント ; i ドナー及びレシピエント間の HLA A、B、C、DR、及び DQ 不一致の数の中央値 (最大 10) ; j 試料収集時に CNI を受けていた患者数 ; k ミコフェノール酸モフェチルを受容していた患者の数 ; l アザ

10

20

30

40

50

チオプリンを受容していた患者の数； m ステロイドを受容していた患者の数； n 抗体誘発療法により治療された患者の数。 H C、 健常対照； T o l - D F、 寛容薬物非投与
 【 0 1 3 2 】
 【 表 1 2 】

| 年齢 ^a | 性別 | 腎不全の原因 | Tx後 ^b | eGFR ^c | リンパ球 ^d | Fナー型 | HLA-MIM ^e | IS無し ^f の年数 | Tx回数 ^g | 他の発作事象 | 免疫抑制中止の理由 | 国 |
|-----------------|----|---------------|------------------|-------------------|-------------------|------|----------------------|-----------------------|-------------------|---|---------------------------------|--------|
| 40 | 男性 | 糸球体腎炎 | 6 | 79.2 | 1,900 | 献体 | 0 | 5 | 2 | Tr, PRA Pre Tx = 80%, Peak PRA = 92% | 腎癌のため中止 | 英国 |
| 57 | 男性 | 薬物誘発性白血病後療法 | 4 | 76.4 | N/D | 生存血縁 | 0 | 3 | 2 | 記録なし | 腎臓の病に同ドナーから6回Txを受けた。 遠慮キメラ性を示した | 英国 |
| 60 | 男性 | 原因不明 | 18 | 79.6 | 2,540 | 献体 | 8 | 3 | 1 | Tr, PRA Pre Tx = 0%, Peak PRA = 0% | ある期間にわたる自己離脱プロセス | フランス |
| 75 | 男性 | 1eA腎症 | 33 | 45.7 | 1,273 | 献体 | 3 | 21 | 2 | Tr | 4年間にわたる自己離脱プロセス | フランス |
| 56 | 男性 | 機能的腎疾患/多発性嚢胞腎 | 9 | 60.8 | 1,700 | 献体 | 4 | 3 | 1 | Tr, PRA Pre Tx = 0, Peak PRA = 2, ACR IIA | 3週間の局地的洪水による突然の中止 | チェコ共和国 |
| 48 | 男性 | 泌尿器性/神経障害性 | 29 | 76.2 | 1,440 | 献体 | 4 | 11 | 1 | Tr | 自己離脱及び中止 | 英国 |
| 54 | 男性 | 糸球体腎炎 | 18 | 56.0 | 1,855 | 生存血縁 | 2 | 12 | 1 | 記録なし | 自己離脱及び中止 | イタリア |
| 43 | 女性 | 閉塞性/急速性腎炎 | 5 | 72.7 | 1,300 | 献体 | 5 | 3 | 2 | 記録なし | 不明 | フランス |
| 29 | 女性 | ウェグナー肉芽腫症 | 11 | 84.5 | N/D | 献体 | 5 | 2 | 1 | PRA Pre Tx and Peak PRA = 0% | 1.5年にわたる自己離脱プロセス | スイス |
| 34 | 男性 | 高血圧症 | 12 | 50.1 | 2,170 | 生存血縁 | 1 | 2 | 1 | Tr, Peak PRA = 9% | ある期間にわたる自己離脱プロセス | 英国 |
| 59 | 男性 | 糸球体腎炎 | 29 | 84.0 | 2,400 | 生存血縁 | 6 | 2 | 1 | Tr, Peak PRA = 0% | 自己離脱プロセス | 英国 |

表 2：訓練セット (I O T 集団) の T o l - D F 患者の臨床及び病歴の要約。

a 年齢 (年) ； b 移植後の期間 (年) ； c M D R D 機能を使用した推定腎系球体濾過率、 http://nephron.org/mdrd_gfr_si ； d 末梢血リンパ球計数 (1 L 当たり $\times 10^9$ 細胞) ； e ドナー及びレシピエント間の H L A A、 B、 C、 D R、 及び D Q 不一致の数 (最大 1 0) ； f 患者が全ての免疫抑制剤を受容していない年数 ； g 移植回数 ； T r : 複数の移植前輸血を受けていた患者 ； P R A、 パネル反応性抗体 p r e T x : P R A > 移植前に記録された 1 % ； P e a k P R A : 任意

10

20

30

40

50

の既往PRA>記録された1%；ACR IIA：生検で確認されたBanffスコアIIAの急性細胞性拒絶反応の1発症。N/D：データなし。

【0133】

【表13】

| | N | 年齢 ^a | %女性 ^b | Tx後 ^c | CRT ^d | WBC ^e | 最初のTx% ^f | HLA-MM ^g |
|--------|----|-----------------|------------------|------------------|--------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| HC | 31 | (18-55) | | | | | | |
| Tol-DF | 24 | 51 (45-60) | 36 | 19 (13-29) | 88.0 (79-132) | 6.5 (3.6-13.8) | 73 | 0.0 |
| Mono | 11 | 57 (48-63) | 36 | 12 (0-38) | 140.8 (123-158) | 8.0 (4.8-18.9) | 91 | 1.5 |
| s-CNI | 34 | 44 (39-55) | 45 | 6 (3-17) | 123.2 (62-246) | 7.8 (3.7-14.3) | 97 | 4.0 |
| CAN | 20 | 51 (45-57) | 37 | 5 (4-8) | 246.0 (220-299) | 7.1 (2.5-20.4) | 58 | 4.0 |
| 全患者 | 89 | 50 (42-57) | 40 | 8 (0-42) | 132.0 (106-194) | 7.8 (2.5-20.4) | 81 | 3.0 |

10

20

表3：検査セット（ITN集団）の臨床及びデモグラフィック特徴

a、c、d、e：中央値及び四分位範囲は示されている。a 年齢（年）；b 女性のパーセント；c 移植後の期間（年）；d 血清クレアチニン値（正常範囲60～105 μmol/L）；e 白血球数（1L当たり×10⁹細胞）；f 移植を初めて受けた患者のパーセント；g ドナー及びレシピエント間のHLA A、B、及びDR不一致の数の中央値（最大6）。HC、健常対照；Tol-DF、寛容非薬物投与；Mono、単独療法；s-CNI、安定カルシニューリン阻害剤；CAN、慢性同種移植片腎症。

【0134】

【表 1 4】

| 遺伝子 順位 | ToI-DFによる 相対的発現 | 公式記号 | 説明 | 関連特徴 |
|-----------|--------------------|-----------------------|------------------------------------|---|
| 1 | ↑ | CD79B | B細胞抗原受容体複合体関連タンパク質β鎖 | CD79aとのヘテロダイマーを形成する膜タンパク質。表面膜免疫グロブリンと共に、B細胞抗原受容体 (BCR) 複合体を形成し、受容体の主なシグナル伝達成分である。 |
| 2 | ↑ | TCL1A | T細胞白血病/リンパ腫 I A | AKT1の核移行を促進するAKTタンパク質のリン酸化及び活性化に関与するタンパク質。細胞増殖を増強し、ミトコンドリア膜電位を安定させ、細胞生存を促進する。これは、BCRシグナル伝達経路の下流に位置し、記憶B細胞よりも未成熟B細胞でより大量に発現される。TCL1Aの過剰発現は、未成熟B細胞生存を延長する。 |
| 3 | ↑ | H3SST1 | ヘパラン硫酸 (グルコサミン) 3-オースホルトランスフェラーゼ1 | ヘパラン硫酸合成酵素ファミリーのメンバー。これは、ヘパラン硫酸グルコサミン3-オースホルトランスフェラーゼ活性、抗凝固ヘパラン硫酸変換活性を両方とも有しており、抗凝固ヘパリン合成の律速酵素である。 |
| 4 | ↑ | SH2D1B | SH2ドメイン含有タンパク質1B | 単一SH2ドメインアダプターであり、シグナル伝達リンパ球活性化分子 (SLAM) 及び関連受容体の細胞質内尾部の特定ドメイン残基に結合する。それは、CD84の下流にシグナルを伝達し、ヒト記憶B細胞の主要集団で上方制御され、Bリンパ球の同型接着を誘導する。刺激されたB細胞は、SH2D1Bの存在下で早期アポトーシスを起こす。 |
| 5 | ↑ | MS4A1 | Bリンパ球抗原、CD20 | B細胞活性化及び分化に関与するBリンパ球特異的細胞表面分子。汎B細胞抗原CD20に対するモノクローナル抗体であるリツキシマブは、成体及び小児の両方で、悪性及び非悪性免疫増進性障害の管理に使用され成功をおさめている。 |
| 6 | ↓ | TLR5 | トル様受容体5 | TLRファミリーのメンバーは、感染性病原体で発現される病原体関連分子のパターンを認識することによる病原体認識及び先天性免疫の活性化に基本的な役割を果たす。TLR5は、細菌断片の検出を媒介する。これは、MYD88及びTRAF6を介して作用し、NF-κB活性化、サイトカイン分泌、及び炎症応答に結びつく。これは、末梢白血球、特に単球中で高量に発現される。 |
| 7 | ↑ | FCRL1 (THC2438936) | Fc受容体様タンパク質1 (FCRL1) 遺伝子の3'付近 | B細胞共受容体とみなされており、したがってB細胞活性化及びB細胞分化に関与するFCRLファミリーに属する膜タンパク質。成熟B系統細胞により特異的に発現され、記憶B細胞よりも未成熟B細胞でより高度に発現される。 |
| 8 | ↑ | PNOC | ノセプチン | オピオイド受容体様受容体 (OPRL1) に結合する分泌タンパク質。これは、慢性的行動及び運動行動を調節することにより脳の伝達物質として作用する可能性がある。血漿レベルでの変化が、種々の疼痛状態、うつ病、及び肝臓病を有する患者で報告されている。抗炎症に役割を果たすことが、ラットモデルで報告されている。 |
| 9 | ↓ | SLOC1A1 | 溶質輸送体ファミリー8 (ナトリウム/カルシウム交換体)、メンバー1 | 小胞体のCa ²⁺ 再充填に基本的な役割を果たす膜貫通型タンパク質。ヒトマクロファージ及び単球で発現され、TNF-α誘発によるCa ²⁺ 産生を誘導するCa ²⁺ シグナルを回復させる。 |
| 10 | ↑ | FCRL2 (THC2438936) | Fc受容体様タンパク質2 | 脾臓、末梢血、及び骨髄で、記憶B細胞により優先的に発現されるFCRLファミリーに属する膜タンパク質。 |

10

20

30

40

表 4 : 訓練セット及びそれらのアノテーション濃縮内の上位に順位付けられた有意な遺伝子のリスト。

灰色で網掛けした遺伝子は、B細胞関連遺伝子であることを示す。ToI-DFによる相対的発現；ToI-DF群による相対的な遺伝子発現上方制御 () 又は下方制御 () (表 8 に示されている各群の遺伝子発現の倍数差の中央値)

【 0 1 3 5 】

50

【表 15】

| 訓練セット | HC 対 s-LP | HC 対 s-nCNI | HC 対 s-CNI | HC 対 CR | s-LP 対 s-nCNI | s-LP 対 s-CNI | s-LP 対 CR | s-nCNI 対 s-CNI | s-nCNI 対 CR | s-CNI 対 CR |
|--|--------------|----------------|---------------|------------|------------------|-----------------|--------------|-------------------|----------------|------------------|
| % T細胞 | n. s. | 0.044 | n. s. | n. s. | 0.03 | 0.028 | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. |
| % B細胞 | n. s. | 0.001 | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. |
| % NK細胞 | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. |
| 比率B/T | n. s. | 0.002 | n. s. | n. s. | 0.044 | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. |
| % CD4 ⁺ CD25 ^{int} | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. |
| % CD4 ⁺ CD25 ^{hi} | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | 0.026 | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. |

| 検査セット | HC 対 Mono | HC 対 s-CNI | HC 対 CAN | HC 対 CR | Mono 対 s-CNI | Mono 対 CAN | Mono 対 CR | s-CNI 対 CAN | s-CNI 対 CR |
|--|--------------|---------------|-------------|------------|-----------------|---------------|--------------|-------------------|------------------|
| % T細胞 | n. s. | 0.006 | n. s. | n. s. | 0.025 | n. s. | n. s. | 0.033 | n. s. |
| % B細胞 | <0.001 | <0.001 | 0.046 | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. |
| % NK細胞 | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | 0.009 | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. |
| 比率B/T | <0.001 | 0.001 | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. |
| % CD4 ⁺ CD25 ^{int} | 0.016 | 0.002 | 0.005 | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. |
| % CD4 ⁺ CD25 ^{hi} | 0.001 | 0.004 | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. | n. s. |

10

20

30

40

表 5 : フローサイトメトリーにより末梢血リンパ球サブセットの構成比を分析した際に、

50

訓練セット及び検査セットの非寛容患者群間で実施されたマン - ホイットニー U 検定の両側 p 値。

【 0 1 3 6 】
【 表 1 6 】

| | | | | | | | | | | |
|-------|-----------|-------------|------------|----------|---------------|--------------|------------|----------------|-------------|-------------|
| 訓練セット | HC 対 s-LP | HC 対 s-nCNI | HC 対 s-CNI | HC 対 CR | s-LP 対 s-nCNI | s-LP 対 s-CNI | s-LP 対 CR | s-nCNI 対 s-CNI | s-nCNI 対 CR | s-CNI 対 CR |
| P 値 | 0.004 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | n.s. | 0.005 | <0.001 | n.s. | 0.013 | 0.002 |
| 検査セット | HC 対 Mono | HC 対 s-CNI | HC 対 CAN | HC 対 CAN | | Mono 対 s-CNI | Mono 対 CAN | | | s-CNI 対 CAN |
| P 値 | 0.004 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | | n.s. | 0.052 | | | n.s. |

10

20

30

40

表 6 : 両研究集団の非寛容な患者群間の Fox P 3 及び - 1 , 2 - マンノシダーゼ発現の計算された比率に対して実施したマン - ホイットニー U 検定の両側 p 値。

50

【 0 1 3 7 】

表 7 : 4 階級分析後に研究群による発現が有意に異なることが特定された訓練セット及び検査セットの両方に共通する 1 7 4 個のプロープのリスト。1 % の偽陽性率 (F D R) で補正したクラスカル - ワリス検定による p 値で順位付けした。

【表 17 - 1】

| 共通遺伝子リスト | | | |
|----------|------------|---------------------------|---------|
| 訓練セット順位 | 遺伝子名 | プローブ識別記号 | 検査セット順位 |
| 1 | CD79B | A_23_P207201_riset1 | 12 |
| 2 | TCL1A | A_23_P357717_riset1 | 1 |
| 3 | HS3ST1 | A_23_P121657_riset1 | 3 |
| 4 | TCL1A | MIL_PPPID394307780_riset1 | 2 |
| 5 | SH2D1B | A_23_P351148_riset1 | 352 |
| 6 | MS4A1 | MIL_PPPID394453510_riset1 | 57 |
| 7 | TLR5 | A_23_P85903_riset1 | 97 |
| 8 | THC2438936 | A_32_P71876_riset1 | 52 |
| 9 | PNOC | A_23_P253321_riset1 | 53 |
| 10 | SLC8A1 | A_32_P147078_riset1 | 736 |
| 11 | FCRL2 | A_23_P160751_riset1 | 43 |
| 12 | BLK | BLK_riset2 | 111 |
| 13 | PCDH9 | A_24_P187218_riset1 | 9 |
| 14 | CD200 | A_23_P121480_riset1 | 4 |
| 15 | THC2317432 | A_32_P124728_riset1 | 10 |
| 16 | BCL11A | A_24_P402588_riset1 | 251 |
| 17 | TSPAN3 | A_23_P14804_riset1 | 80 |
| 18 | CD79A | CD79A_riset2_piqor | 29 |
| 19 | CASP5 | CASP5_riset2 | 493 |
| 20 | FCRL5 | A_23_P201211_riset1 | 301 |
| 21 | IL1RL2 | A_23_P56604_riset1 | 930 |
| 22 | EBI2 | A_23_P25566_riset1 | 82 |
| 23 | BLNK | A_24_P64344_riset1 | 20 |
| 25 | RNF24 | A_23_P120533_riset1 | 784 |
| 26 | DIMT1L | A_23_P58529_riset1 | 494 |
| 27 | EPO | A_23_P145664_riset1 | 807 |
| 28 | ZAK | A_23_P318300_riset1 | 244 |
| 29 | CD40 | A_23_P57036_riset1 | 205 |
| 31 | IGHM | A_24_P417352_riset1 | 13 |
| 33 | SH2D1B | A_32_P324533_riset1 | 329 |
| 34 | AKR1C3 | A_23_P138543_riset1 | 106 |
| 35 | CASD1 | A_24_P69379_riset1 | 163 |
| 36 | FCRLA | A_23_P46037_riset1 | 56 |
| 37 | BTLA | MIL_PPPID399200354_riset1 | 28 |
| 39 | CLCN5 | CLCN5_riset2 | 959 |

10

20

30

40

【表 17 - 2】

| | | | |
|-----|------------|---------------------------|------|
| 40 | LHFPL2 | A_23_P255104_riset1 | 65 |
| 41 | ARG1 | A_23_P111321_riset1 | 360 |
| 42 | ANXA3 | A_23_P121716_riset1 | 231 |
| 43 | HLA-DOA | A_32_P356316_riset1 | 74 |
| 44 | KLRF1 | A_32_P158966_riset1 | 815 |
| 45 | CD22 | CD22_riset2 | 121 |
| 47 | PLXDC2 | A_32_P187518_rev_riset1 | 60 |
| 48 | BCL7A | A_24_P203056_riset1 | 59 |
| 50 | ADAMTS4 | A_23_P360754_riset1 | 5 |
| 54 | HLA-DOB | A_23_P30736_riset1 | 128 |
| 55 | CD163 | A_23_P33723_riset1 | 637 |
| 56 | FLJ32866 | MIL_PPPID400032869_riset1 | 437 |
| 57 | EBF1 | A_24_P156501_riset1 | 102 |
| 58 | GPR92 | A_23_P204375_riset1 | 1182 |
| 60 | PEX3 | A_23_P259328_riset1 | 413 |
| 62 | CD83 | A_23_P70670_riset1 | 123 |
| 63 | GPR120 | A_24_P129588_riset1 | 833 |
| 66 | ASPH | A_24_P295245_riset1 | 214 |
| 67 | MCTP1 | A_24_P212481_riset1 | 19 |
| 68 | SORT1 | A_23_P201587_riset1 | 83 |
| 70 | TMEM49 | A_32_P9753_riset1 | 58 |
| 71 | MBOAT2 | A_23_P370635_riset1 | 110 |
| 75 | SIRPA | A_24_P267619_riset1 | 778 |
| 76 | PDHX | A_23_P36266_riset1 | 196 |
| 77 | STAT3 | A_23_P100790_riset1 | 1250 |
| 78 | SLPI | A_23_P91230_riset1 | 389 |
| 81 | RET | MIL_PPPID397416187_riset1 | 1074 |
| 82 | GPR84 | A_23_P25155_riset1 | 125 |
| 83 | ITK | ITK_riset2 | 99 |
| 84 | AIM2 | A_32_P44394_riset1 | 218 |
| 87 | TNFAIP8 | TNFAIP8_riset2 | 132 |
| 91 | KCNJ2 | A_23_P329261_riset1 | 112 |
| 92 | BNIP3 | A_23_P138635_riset1 | 85 |
| 93 | GALNT14 | A_23_P67847_riset1 | 333 |
| 94 | TGDS | A_23_P65217_riset1 | 78 |
| 96 | DNAJC19 | A_23_P121396_riset1 | 638 |
| 100 | THC2380706 | A_24_P214556_riset1 | 714 |

10

20

30

【表 17 - 3】

| | | | |
|-----|----------|---------------------------|------|
| 101 | C1ORF19 | A_23_P104022_riset1 | 891 |
| 103 | LITAF | A_23_P3532_riset1 | 1226 |
| 106 | SLC25A37 | A_23_P393115_riset1 | 504 |
| 108 | EDG1 | A_23_P160117_riset1 | 109 |
| 110 | TNFAIP6 | A_23_P165624_riset1 | 496 |
| 112 | TMTC3 | A_24_P944222_riset1 | 331 |
| 113 | MNAT1 | A_23_P32615_riset1 | 541 |
| 114 | ZNF181 | A_23_P50735_riset1 | 770 |
| 115 | MYC | MIL_PPPID404158649_riset2 | 1072 |
| 116 | CLEC5A | A_23_P71165_riset1 | 607 |
| 117 | GPX7 | A_23_P73972_riset1 | 274 |
| 119 | PPIL3 | A_23_P28213_riset1 | 131 |
| 120 | THUMPD1 | A_24_P90878_riset1 | 317 |
| 121 | MAD2L1 | A_23_P92441_riset1 | 300 |
| 122 | SPTLC2 | A_24_P150486_riset1 | 66 |
| 123 | THAP2 | A_24_P350437_riset1 | 310 |
| 125 | C8ORF60 | A_24_P59387_riset1 | 409 |
| 126 | MXD1 | A_23_P408094_riset1 | 732 |
| 130 | SEPT9 | A_23_P106973_riset1 | 248 |
| 131 | PDCD6 | A_23_P218997_riset1 | 433 |
| 133 | IL10RA | A_24_P107303_riset1 | 266 |
| 134 | MAGEH1 | A_23_P34144_riset1 | 98 |
| 136 | SLC25A37 | A_32_P197026_riset1 | 119 |
| 137 | CARD6 | A_23_P41854_riset1 | 926 |
| 138 | ZFP2 | A_23_P133359_riset1 | 1075 |
| 139 | PTMA | A_32_P746413_riset1 | 392 |
| 140 | BACE2 | A_23_P154875_riset1 | 735 |
| 141 | CHST2 | CHST2_riset2 | 359 |
| 143 | BCKDHB | A_24_P239664_riset1 | 335 |
| 144 | MTX2 | A_23_P120335_riset1 | 716 |
| 148 | CD7 | A_23_P118862_riset1 | 804 |
| 149 | ACOT2 | A_23_P3111_riset1 | 577 |
| 153 | CD40LG | A_23_P62220_riset1 | 275 |
| 155 | FANK1 | A_23_P115785_riset1 | 48 |
| 156 | DNMT1 | A_23_P27490_riset1 | 240 |
| 157 | AK3L1 | MIL_PPPID394453462_riset1 | 1122 |
| 158 | RFC4 | A_23_P18196_riset1 | 87 |
| 159 | BTG1 | A_23_P87560_riset1 | 17 |
| 160 | SPON1 | A_32_P133072_riset1 | 103 |

10

20

30

40

【表 17 - 4】

| | | | |
|-----|-------------|---------------------------|------|
| 162 | ATL3 | A_23_P105028_riset1 | 51 |
| 165 | AFF3 | A_23_P373464_riset1 | 690 |
| 166 | MCEE | A_23_P56654_riset1 | 1013 |
| 167 | NLRC4 | A_23_P119835_riset1 | 779 |
| 169 | DTX1 | A_24_P290751_riset1 | 115 |
| 170 | TRIM4 | A_23_P500601_riset1 | 227 |
| 171 | TMEM106B | A_32_P353072_riset1 | 293 |
| 176 | FCAR | A_24_P348265_riset1 | 241 |
| 178 | VCPIP1 | A_32_P74366_riset1 | 509 |
| 179 | SATB1 | SATB1_riset2 | 338 |
| 181 | PDLIM7 | A_24_P41882_riset1 | 162 |
| 184 | IL23A | A_23_P76078_riset1 | 152 |
| 187 | XBP1 | A_23_P120845_riset1 | 443 |
| 188 | SOCS3 | A_23_P207058_riset1 | 831 |
| 189 | SFRS10 | A_24_P145911_riset1 | 209 |
| 190 | TNFSF10 | A_23_P121253_riset1 | 1029 |
| 195 | RNASE2 | A_23_P151638_riset1 | 178 |
| 196 | MAP2K6 | A_23_P207445_riset1 | 1048 |
| 198 | LYRM7 | A_32_P18159_riset1 | 1375 |
| 199 | AK124263 | A_24_P538708_riset1 | 911 |
| 200 | MYT1;PCMTD2 | A_23_P210829_riset1 | 995 |
| 201 | CD96 | A_23_P44154_riset1 | 533 |
| 203 | PCGF6 | A_23_P115703_riset1 | 454 |
| 204 | IGKV3-20 | A_23_P21800_riset1 | 11 |
| 205 | CARD11 | A_23_P82324_riset1 | 502 |
| 206 | IFT80 | A_23_P316150_riset1 | 375 |
| 207 | SLAMF1 | SLAMF1_riset2 | 62 |
| 208 | SIP1 | A_23_P88194_riset1 | 516 |
| 209 | FAIM | A_23_P253932_riset1 | 590 |
| 210 | NEK1 | A_23_P124427_riset1 | 1368 |
| 211 | IL1R2 | A_23_P79398_riset1 | 545 |
| 212 | HOXB2 | A_23_P107283_riset1 | 142 |
| 214 | FLT3 | MIL_PPPID394308044_riset1 | 345 |
| 216 | SLC26A8 | A_23_P30944_riset1 | 264 |
| 219 | FCGR1A | A_23_P63395_riset1 | 318 |
| 220 | LGALS8 | LGALS8_riset2 | 1102 |
| 222 | CLIC3 | A_23_P254654_riset1 | 1317 |
| 223 | BEX4 | A_23_P114391_riset1 | 176 |

10

20

30

【表 17 - 5】

| | | | |
|-----|--------------|---------------------------|------|
| 224 | SLC11A1 | A_32_P436132_riset1 | 1086 |
| 225 | BMP2K | A_24_P86240_riset1 | 27 |
| 226 | SFT2D3 | A_23_P5566_riset1 | 370 |
| 227 | C5ORF28 | A_23_P121875_riset1 | 400 |
| 230 | PHLDB2 | A_24_P240166_riset1 | 1092 |
| 231 | A_23_P399604 | A_23_P399604_riset1 | 401 |
| 232 | GTL3 | A_23_P3514_riset1 | 616 |
| 233 | ITSN2 | MIL_PPPID399200362_riset1 | 733 |
| 234 | ARHGEF12 | A_24_P175783_riset1 | 546 |
| 236 | MUC8 | MUC8_riset2_piqor | 1198 |
| 238 | FLJ22662 | A_23_P87709_riset1 | 267 |
| 239 | APEX1 | A_23_P151649_riset1 | 585 |
| 240 | RPS4Y1 | A_23_P259314_riset1 | 1132 |
| 241 | LCK | LCK_riset2 | 207 |
| 242 | LOC642897 | A_24_P84401_riset1 | 933 |
| 244 | SLC26A8 | A_23_P30950_riset1 | 161 |
| 246 | CD247 | A_23_P34676_riset1 | 16 |
| 247 | UPF3A | A_32_P202778_riset1 | 282 |
| 248 | RGS1 | A_23_P97141_riset1 | 22 |
| 249 | RBM3 | A_23_P148308_riset1_piqor | 619 |
| 250 | POLR3H | A_24_P322847_riset1 | 744 |
| 251 | RHOH | A_23_P58132_riset1 | 49 |
| 254 | LETMD1 | A_23_P117037_riset1 | 137 |
| 257 | LDHB | A_23_P53476_riset1 | 77 |
| 259 | TRA@ | A_23_P258504_riset1 | 312 |

10

20

【 0 1 3 8 】

【表 18】

| 順位 | プローブ | プローブ識別記号 | HC | Tol-DF | 安定 | CR |
|----|----------|---------------------------|---------|--------|---------|---------|
| 1 | CD79B | A_23_P207201_riset1 | 1.024 | 0.618 | -0.2375 | -0.319 |
| 2 | TCL1A | A_23_P357717_riset1 | 1.6525 | 1.062 | -0.41 | 0.0965 |
| 3 | HS3ST1 | A_23_P121657_riset1 | 1.161 | 0.995 | -0.8895 | -1.8945 |
| 4 | TCL1A | MIL_PPPID394307780_riset1 | 1.645 | 0.994 | -0.38 | 0.121 |
| 5 | SH2D1B | A_23_P351148_riset1 | 1.085 | 0.76 | -0.198 | -0.0445 |
| 6 | MS4A1 | MIL_PPPID394453510_riset1 | 0.9025 | 0.763 | -0.2725 | -0.108 |
| 7 | TLR5 | A_23_P85903_riset1 | -0.7895 | -0.341 | 0.1265 | 0.36 |
| 8 | THC24389 | A_32_P71876_riset1 | 1.1145 | 0.517 | -1.2275 | -0.9745 |
| 9 | PNOC | A_23_P253321_riset1 | 0.633 | 0.585 | -0.2725 | 0.0465 |
| 10 | SLC8A1 | A_32_P147078_riset1 | -0.591 | -0.451 | 0.04 | 0.4665 |
| 11 | FCRL2 | A_23_P160751_riset1 | 1.067 | 0.554 | -0.845 | -0.9725 |

40

表 8 : 訓練セットの患者群で検出された発現が異なるプローブの発現における対数倍数変化 (log-fold change) の中央値 (全試料の中央値と比較して)、1% FDR で順位付けした。有意な識別的発現が検出された全ての遺伝子についての、訓練セット及び検査セットの各患者群の発現倍数を示すプロットは、オンライン資料で入手可能で

50

ある。安定；混合群 s - C N I、s - n C N I、s - L P。

【 0 1 3 9 】

【 表 1 9 】

| アノテーション | B細胞 | IGドメイン | 活性化T細胞 | CD3及びTCRゼータ鎖のリン酸化 | 二次メッセンジャー分子の産生 | タンパク質チロシンキナーゼ | TCRシグナル伝達 | B細胞受容体経路による下方制御 | リンパ球 | 造血細胞系統 | 染色体 1q23 |
|----------|----------|----------|----------|-------------------|----------------|---------------|-----------|-----------------|----------|----------|----------|
| 有意性 | 5.00E-06 | 9.50E-05 | 4.42E-04 | 6.90E-04 | 2.01E-03 | 1.17E-02 | 1.87E-02 | 2.59E-02 | 2.71E-02 | 2.56E-02 | 4.49E-02 |
| 計数 | 15 | 21 | 14 | 5 | 6 | 5 | 7 | 10 | 5 | 5 | 7 |
| 名称 | | | | | | | | | | | |
| CD7 | X | X | X | | | | | | X | X | |
| TNFSF10 | | | X | | | | | X | | | |
| CD200 | X | X | X | | | | | | | | |
| RNASE2 | | X | | | | | | | | | |
| FCRL2 | | X | | | | | | | | | X |
| FCRL5 | X | X | | | | | | | | | X |
| CD79B | X | X | | | | | | X | | | |
| IGKV3-20 | | X | | | | | | | | | |
| HLA-DOB | | X | | X | X | | X | | | | |
| CD247 | | | X | X | X | | X | | X | | |
| SH2D1B | | | | | | | | | | | X |
| TCL1A | X | | | | | | | | | | |
| ADAMTS4 | | | | | | | | | | | X |
| CD96 | X | X | X | | | | | | | | |
| FCRLA | | X | | | | | | | | | X |
| IL1RL2 | | X | | | | | | | | | |
| CD40 | X | | X | | | | | X | | | |
| CD40LG | | | X | | | | | | | | |
| FCGR1A | | X | X | | | | | | | X | |
| CD83 | X | X | X | | | | | | X | | |
| IL1R2 | | X | | | | | | X | | X | |
| CARD11 | | | | | | | X | | | | |
| BTG1 | | | | | | | | X | | | |
| MAD2L1 | | | | | | | | X | | | |
| SIRPA | | X | X | | | | | | | | |
| FCAR | X | X | X | | | | | | | | |
| HLA-DOA | | X | | X | X | | X | | | | |
| AIM2 | | | | | | | | | | | X |
| BLK | | | | X | X | X | X | | | | |
| CD22 | X | X | | | | | | X | | X | |
| CD79A | X | X | | | | | | X | X | | |
| ITK | | | | | X | X | X | | | | |
| LCK | | | | X | X | X | X | X | | | |
| FLT3 | X | X | | | | X | | | | | |
| MS4A1 | X | | X | | | | | | X | X | |
| RET | | | | | | X | | | | | |
| BTLA | X | X | X | | | | | | | | |
| MYC | | | | | | | | X | | | |
| SLAMF1 | X | | X | | | | | | | | X |

表 9：有意に異なる発現を示し、訓練セット及び検査セットと共通した遺伝子のアノテーション濃縮。列挙されている遺伝子は、列挙されているアノテーション付経路と有意に関連していると特定された遺伝子である。網掛けした列は、B細胞関連経路であることを示す。

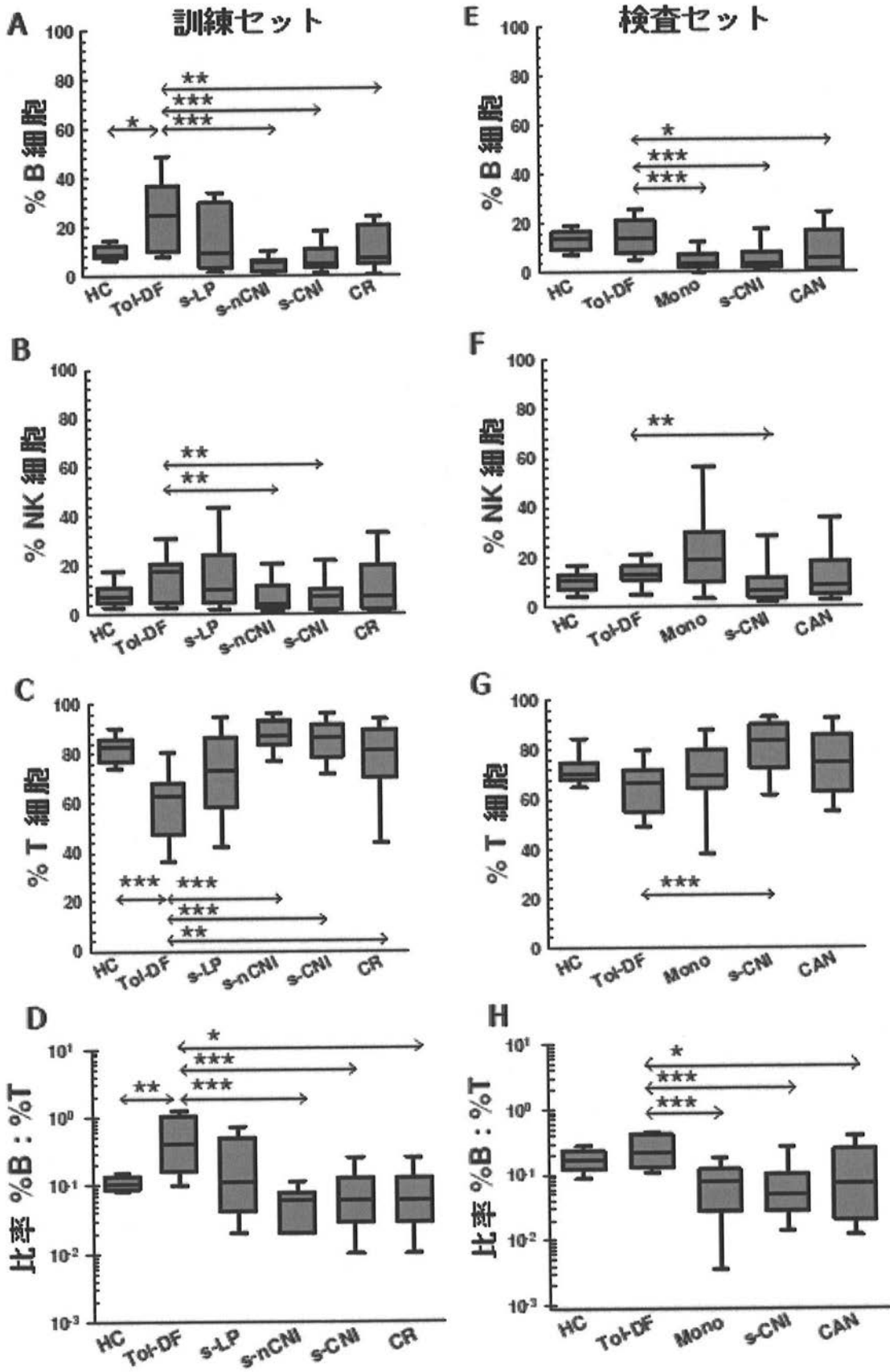
【 0 1 4 0 】

文献

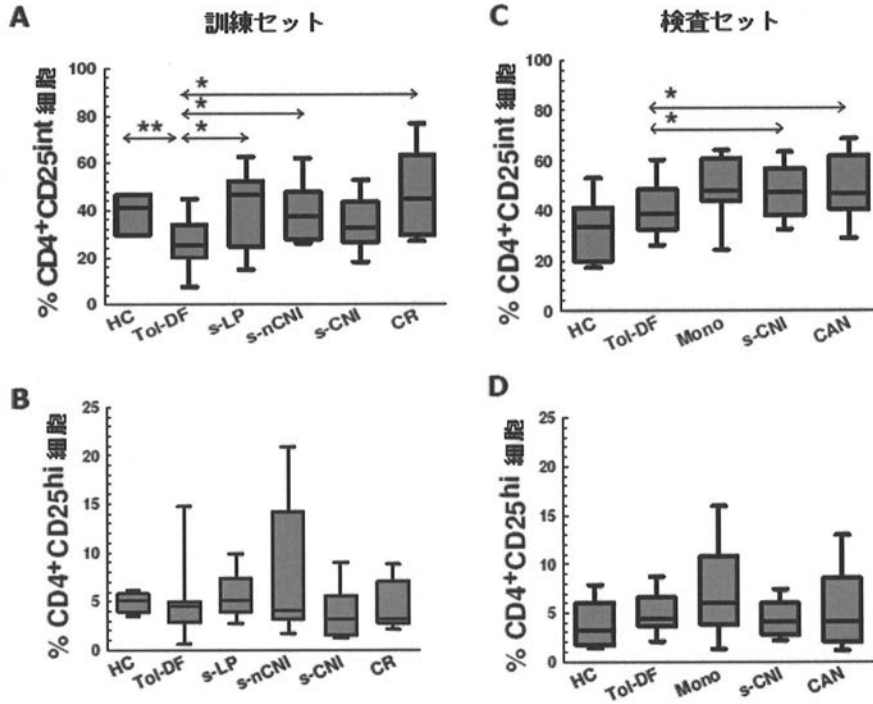
1. Christensen, L.L. et al., Tissue Antigens,51:637-644, 1998.
2. Owens, M.L. et al., Arch Surg., 110:1450-1451, 1975.
3. Roussey-Kesler, G. et al., AM J Transplant, 6:736-746, 2006.
4. Uehling, D.T. et al., Surgery, 79:278-282, 1976.

5. Strober, S. et al., *Transplantation*, 69:1549-1554, 2000.
6. Takatsuki, M. et al., *Transplantation*, 72:449-454, 2001.
7. Lerut, J. et al., *AM J Transplant*, 6:1774-1780, 2006.
8. Padiyar, A. et al., *Prim Care*, 35:433-450, v, 2008.
9. Miyara, M. et al., *Immunity*, 2009 30:899-911.
10. Shevach, E.M. et al., *J Exp Med*, 193:F41-46, 2001.
11. Sawitzki, B. et al., *AM J Transplant*, 7:1091-1102, 2007.
12. Strimmer, K. et al., *BMC Bioinformatics*, 9:303, 2008.
13. Louis, S. et al., *Transplantation*, 81:398-407, 2006.
14. Afzali, B. et al., *Clin Exp Immunol*, 148:32-46, 2007. 10
15. Ely, L.K. et al., *Curr Opin Immunol*, 20:575-580, 2008.
16. Lechler, R.I. et al., *Nat Rev Immunol*, 3:147-158, 2003.
17. Deng, S. et al., *J Immunol*, 178:6028-6032, 2007.
18. Reichardt, P. et al., *Blood*, 110:1519-1529, 2007.
19. Porcheray, F. et al., *AM J Transplant*, 9:2126-2135, 2009.
20. de Haan, A. et al., *Transplantation*, 69:1434-1439, 2000.
21. Hornick, P.I. et al., *Circulation*, 97:1257-1263, 1998.
22. Beik, A.I. et al., *Nephrol Dial Transplant*, 12:1949-1955, 1997.
23. Martinez-Llordella, M. et al., *J Clin Invest*, 118:2845-2857, 2008.
24. Martinez-Llordella, M. et al., *AM J Transplant*, 7:309-319, 2007. 20
25. Braud, C. et al., *J Cell Biochem*, 2007.
26. Brouard, S. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:15448-15453, 2007.
27. Asare, A.L. et al., *BMC Genomics*, 9:474, 2008.
28. Gunther, O.P. et al., *Transplantation*, 88:942-951, 2009.
29. Sawitzki, B. et al., *Curr Opin Organ Transplant*, 14:650-655, 2009.
30. Carsetti, R. et al., *Immunol Rev*, 197:179-191, 2004.
31. Garin, M.I. et al., *Blood*, 109:2058-2065, 2007.
32. Ozawa, M. et al., *Tissue Antigens*, 69 Suppl 1:174-179, 2007.
33. Game, D.S. et al., *J Am Soc Nephrol*, 14:1652-1661, 2003.
34. Weng, L. et al., *Bioinformatics*, 22:1111-1121, 2006. 30
35. Edgar, R. et al., *Nucleic Acids Res*, 30:207-210, 2002.
36. Mazariegos GV. et al., *Transplantation*, 27;73(8):1342-5, 2002.
37. Mazariegos GV. et al., *Am J Transplant*, 3(6):689-96, June 2003
38. Martinez-Llordella M. et al., *Am J Transplant*, 7(2):309-19, February 2007
39. Martinez-Llordella M. et al., *J Clin Invest*, 118(8):2845-57, August 2008.
40. Brouard S. et al., *Am J Transplant*, 5(2):330-40, February 2005.
41. Brouard S. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 25;104(39):15448-53, September 2007. 40
42. Louis S. et al., *Transplantation*, 15;81(3):398-407, February 2006.
43. Velasquez SY. et al., *Transpl Int.*, 23(1):54-63, January 2010.
44. Louvet C. et al., *Am J Transplant*, 5(9):2143-53, September 2005.
45. Baeten et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17: 294-304, 2006

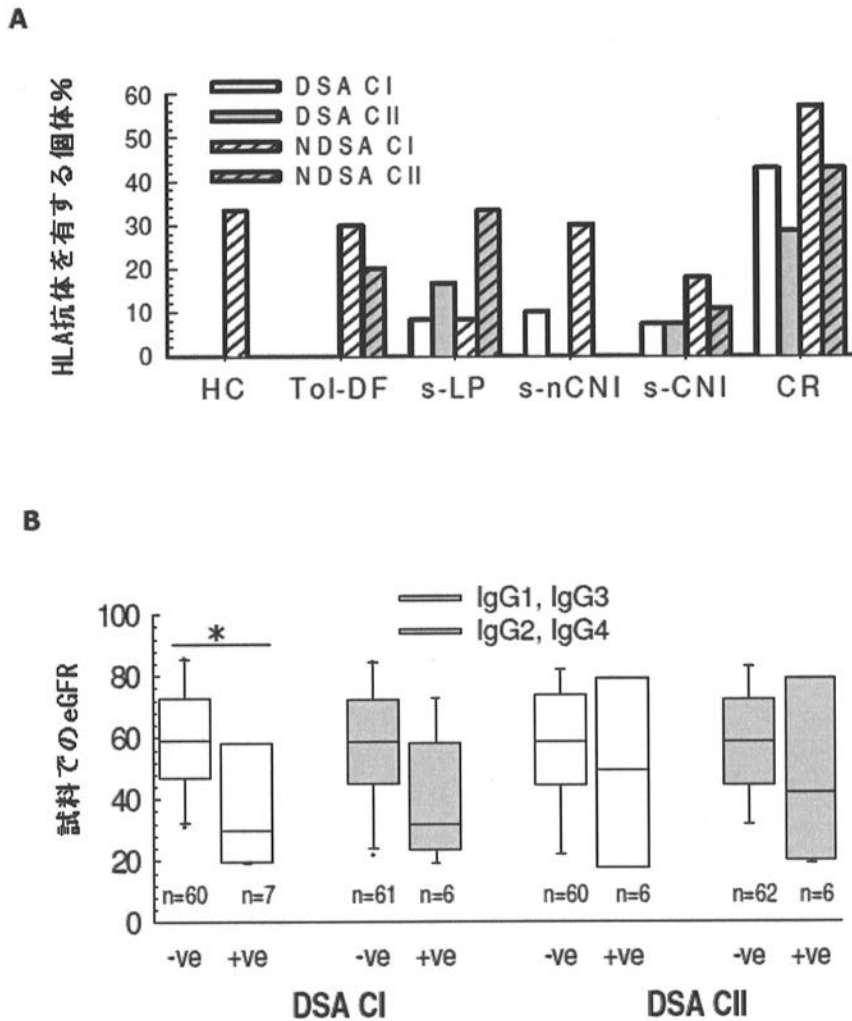
【図1】



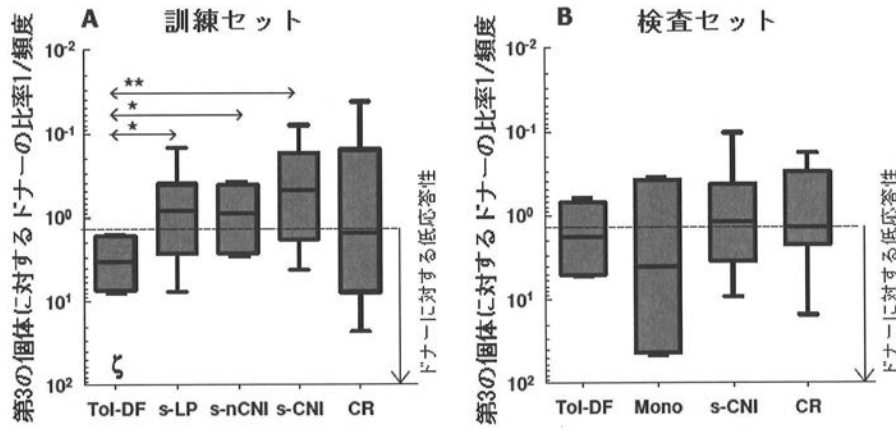
【 図 2 】



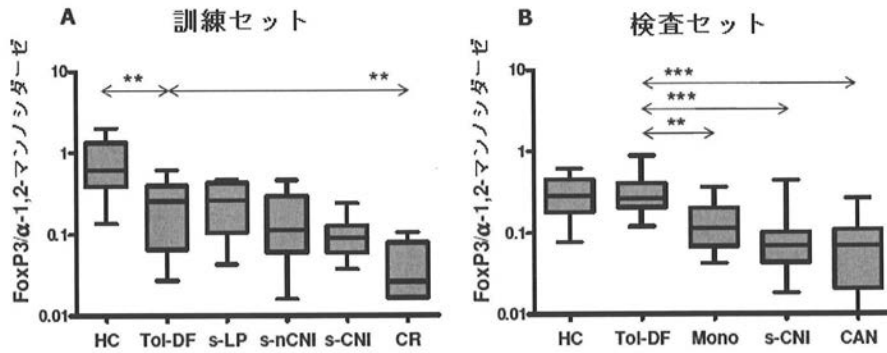
【 図 3 】



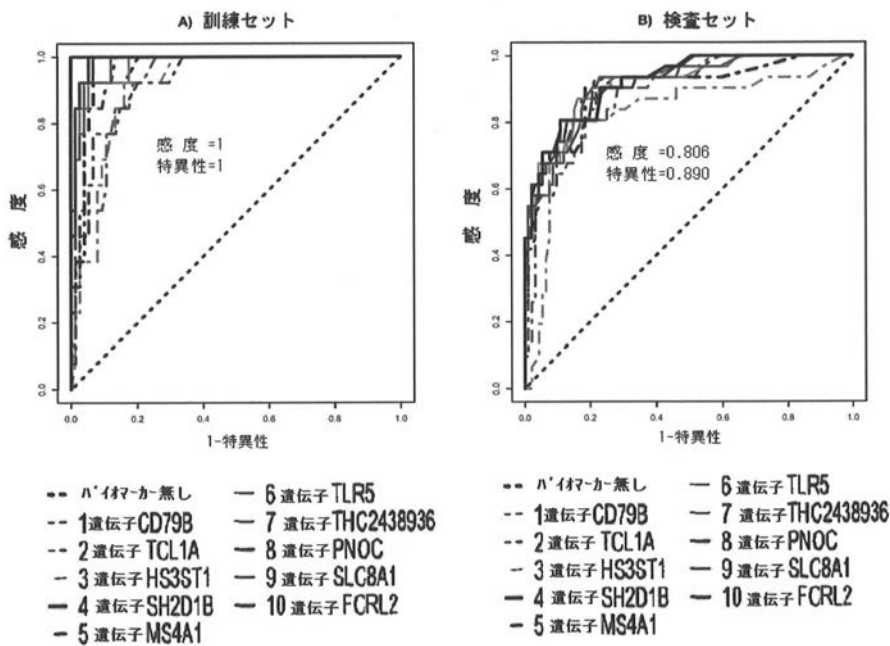
【 図 4 】



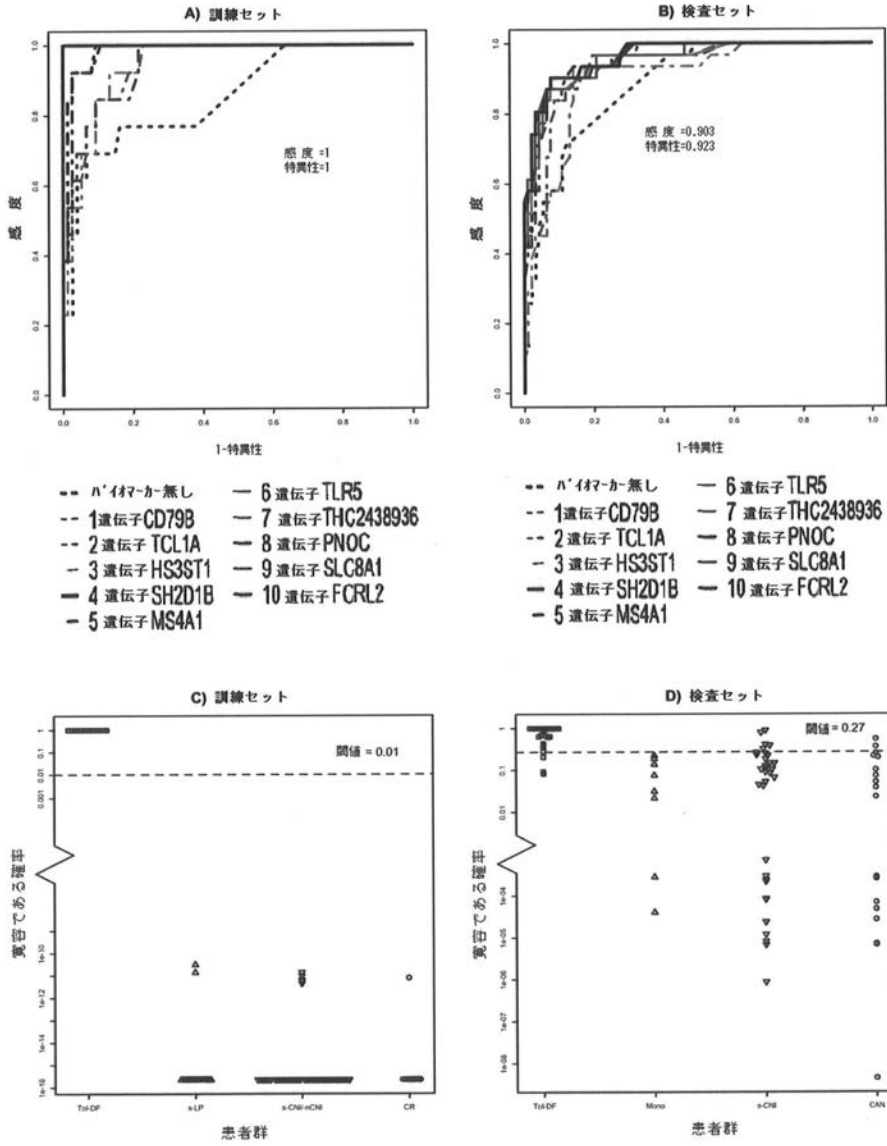
【 図 5 】



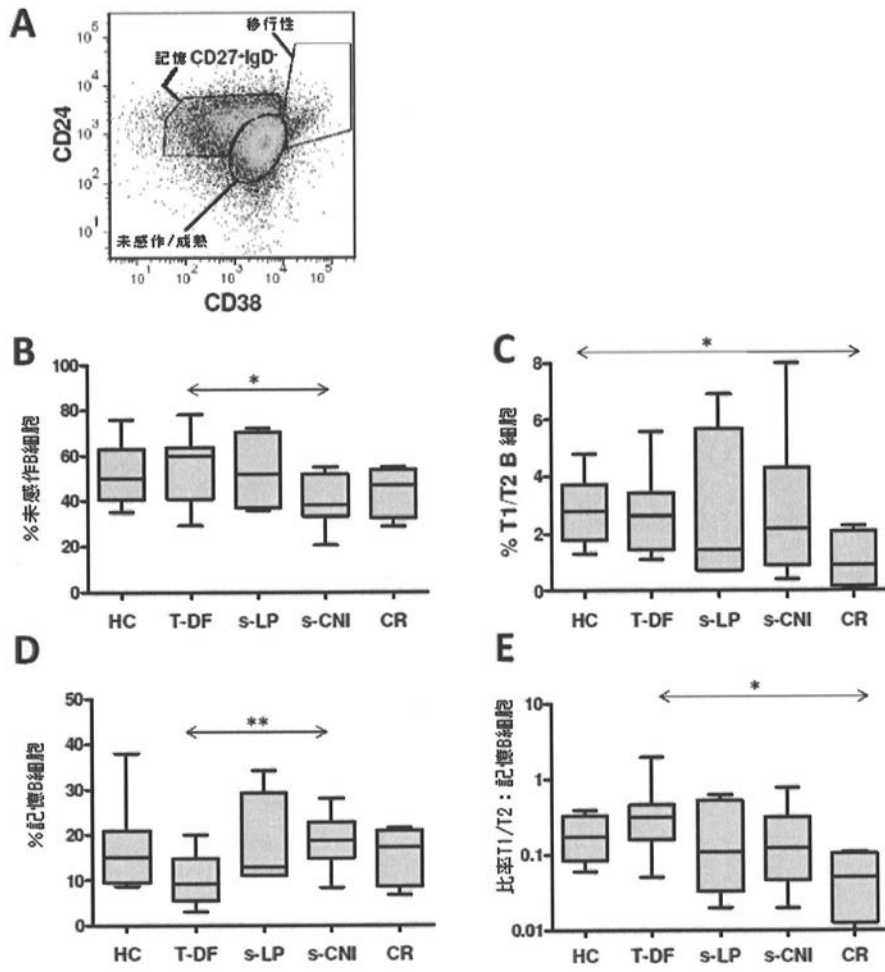
【 図 6 】



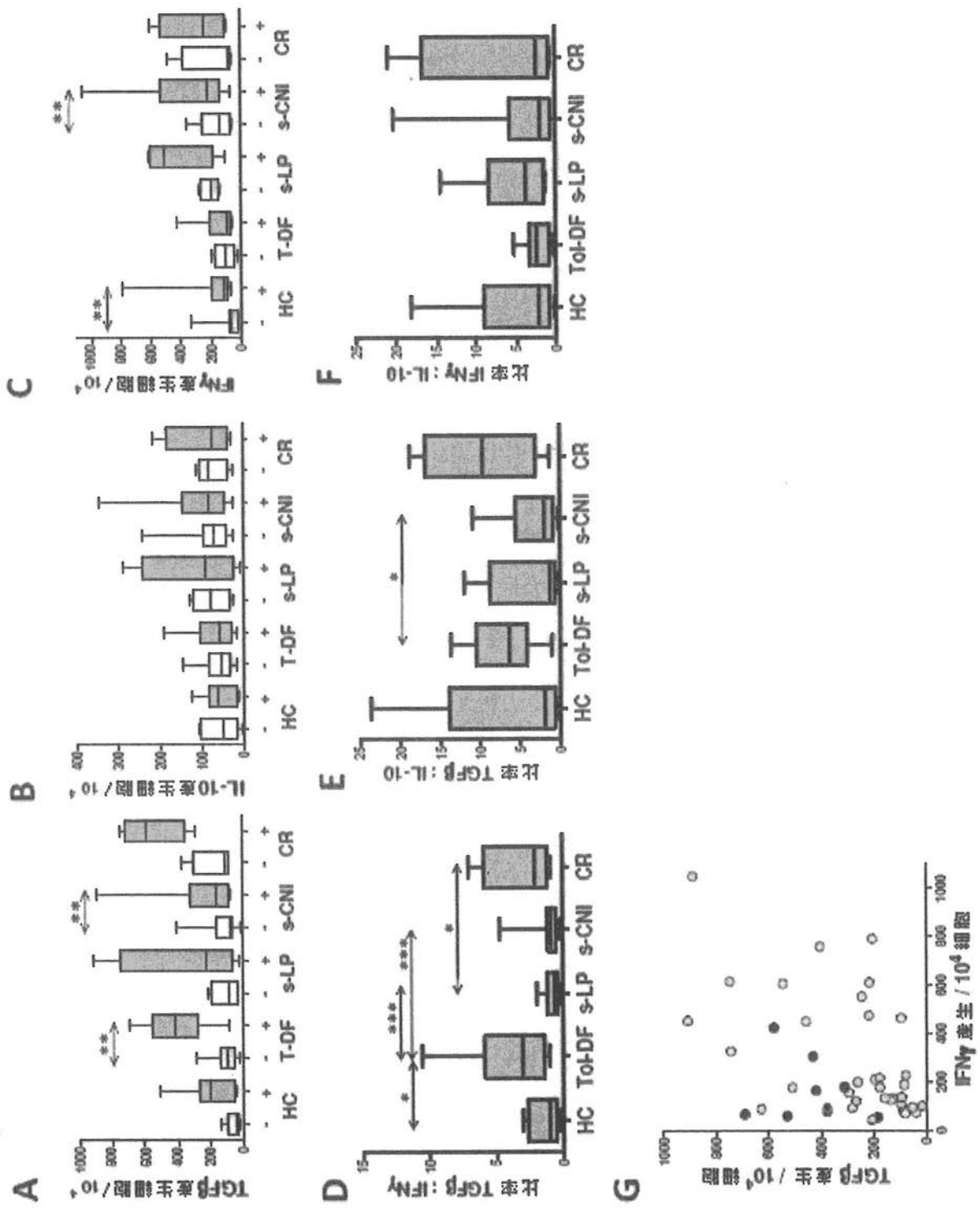
【 図 7 】



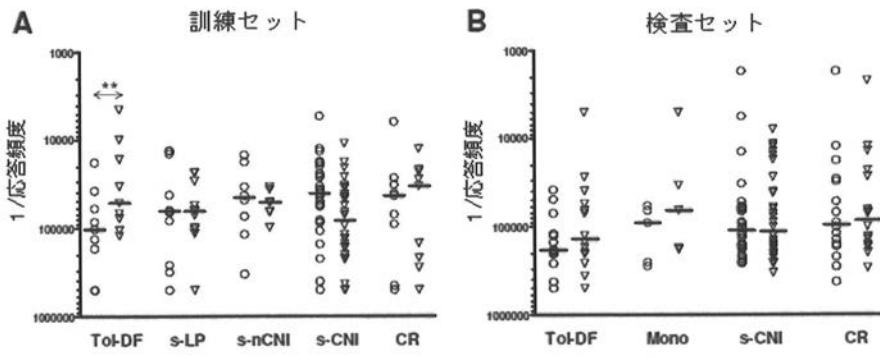
【 図 8 】



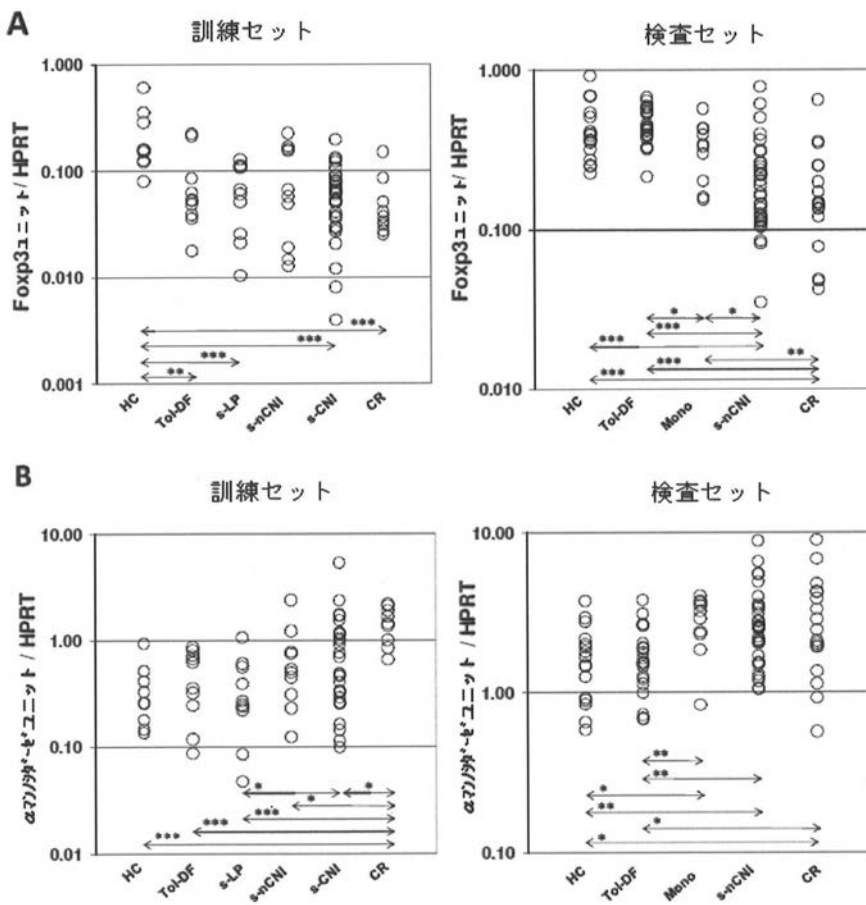
【 図 9 】



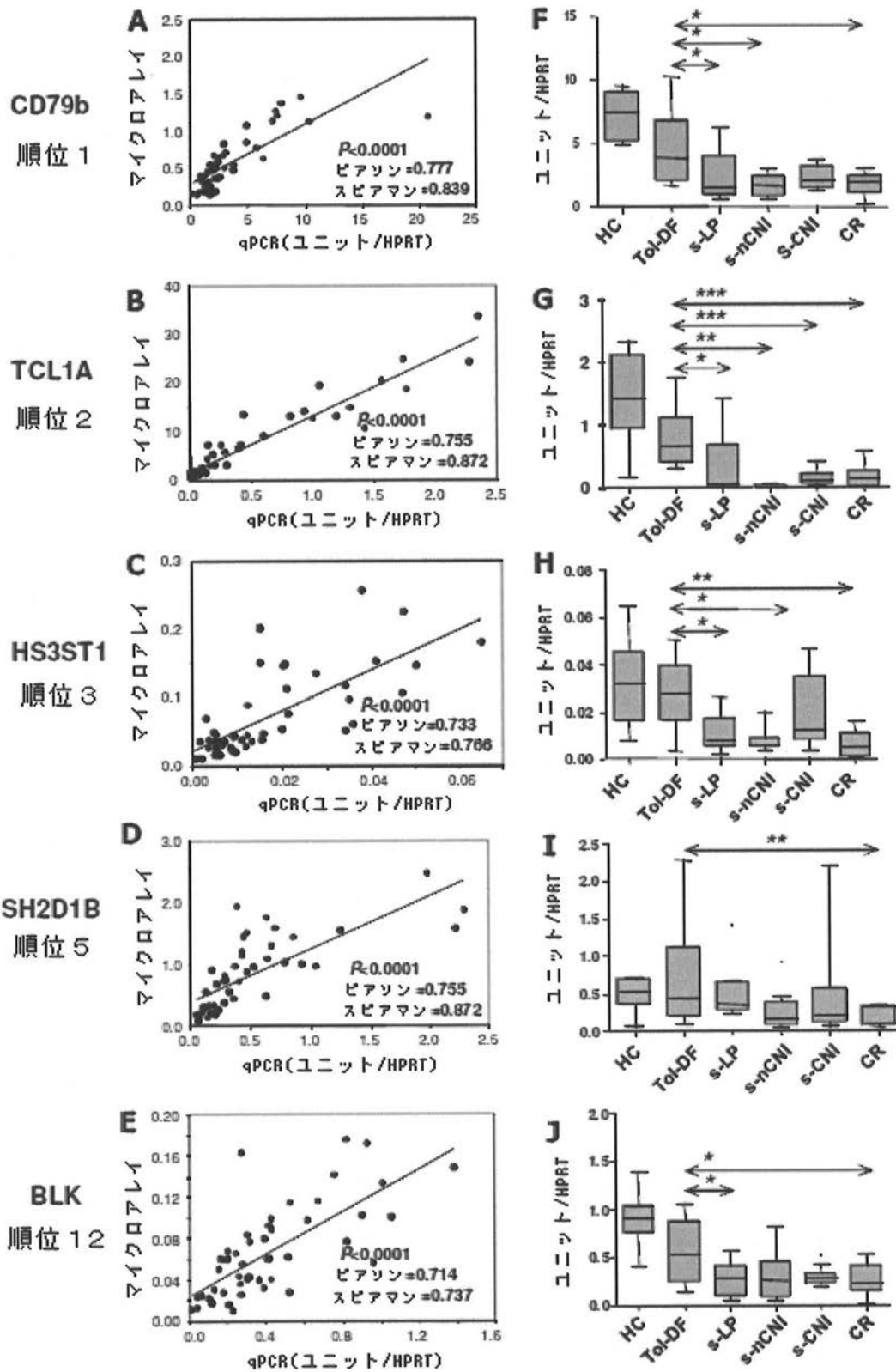
【 図 1 0 】



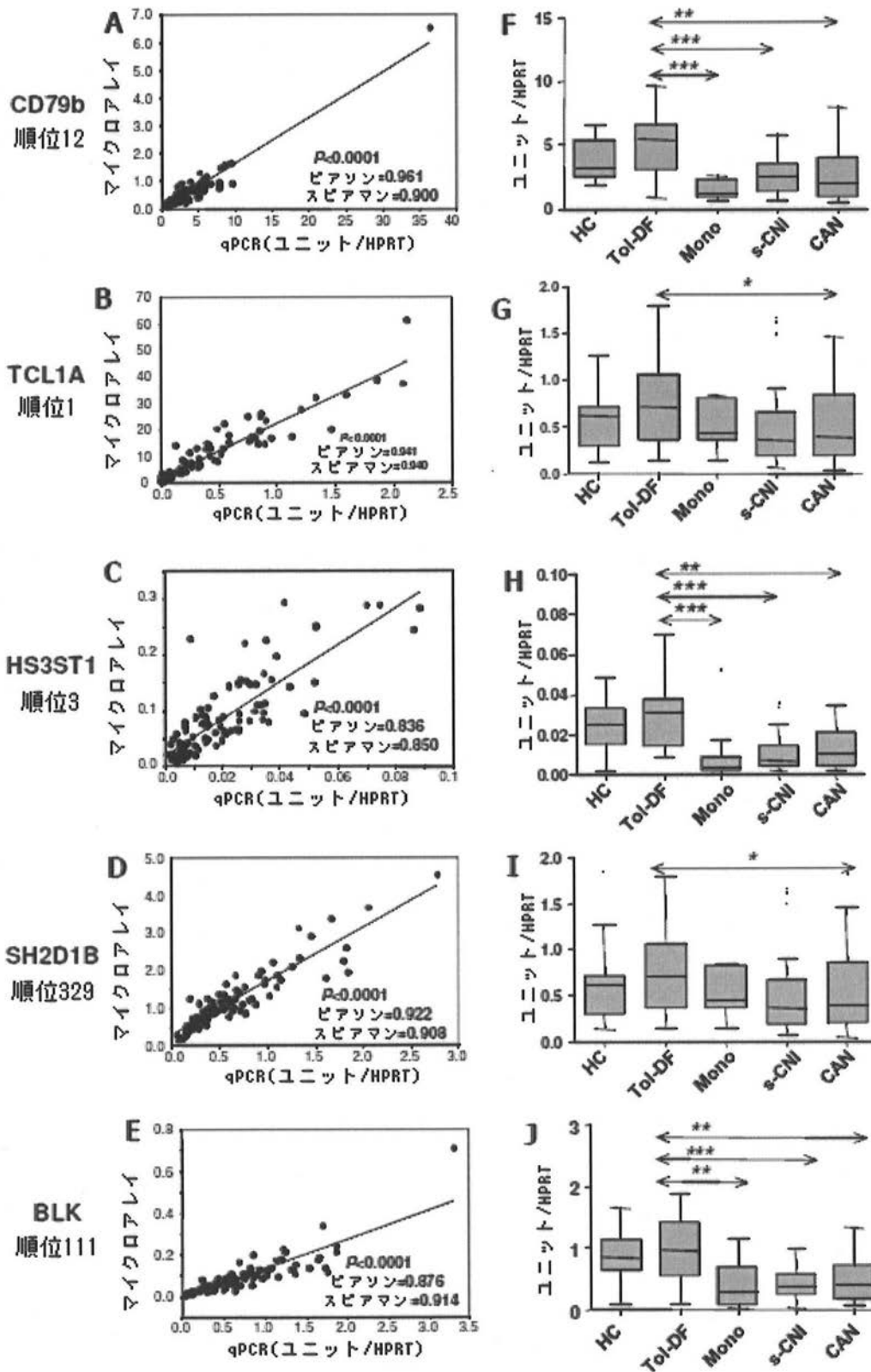
【 図 1 1 】



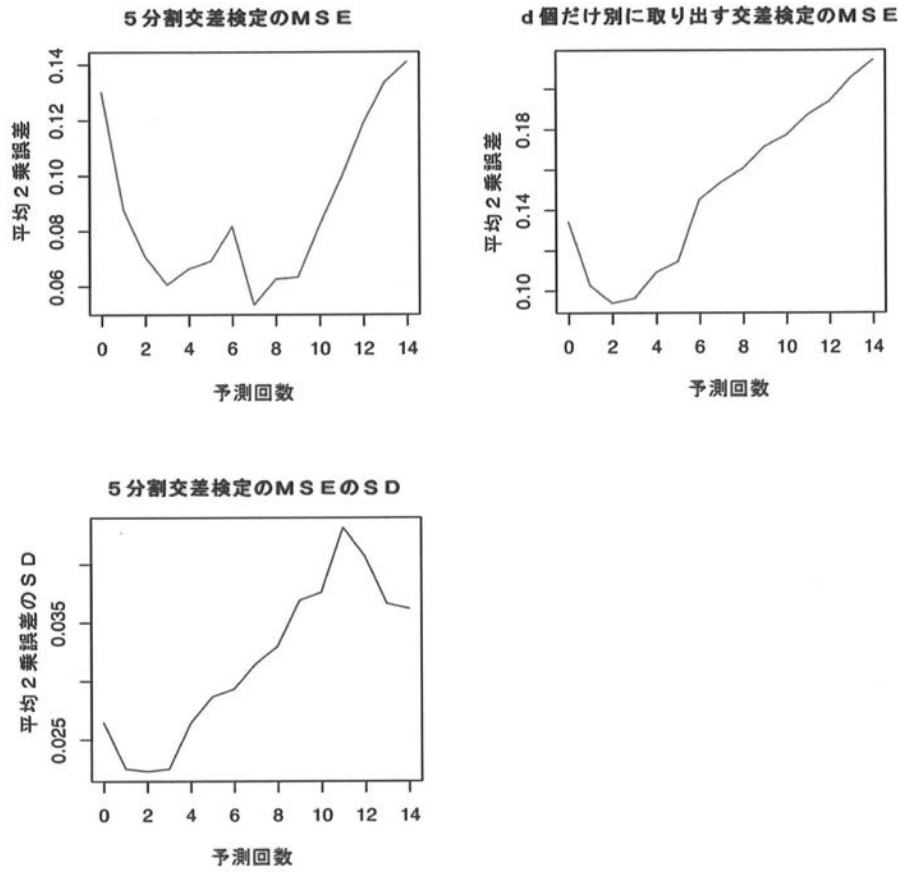
【 図 1 2 】



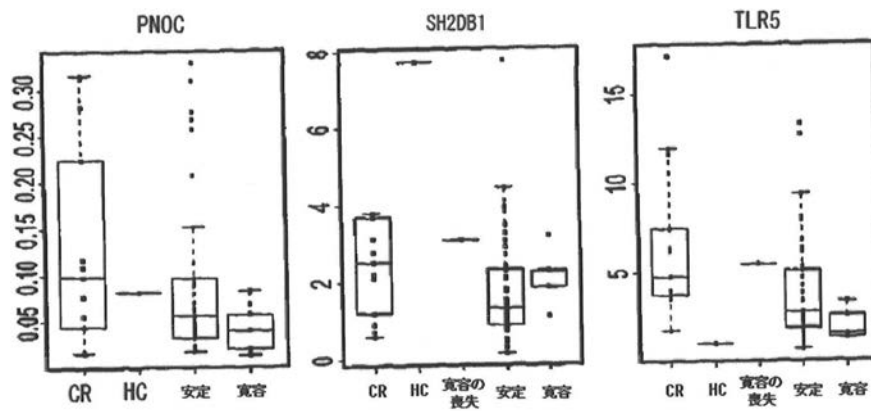
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】

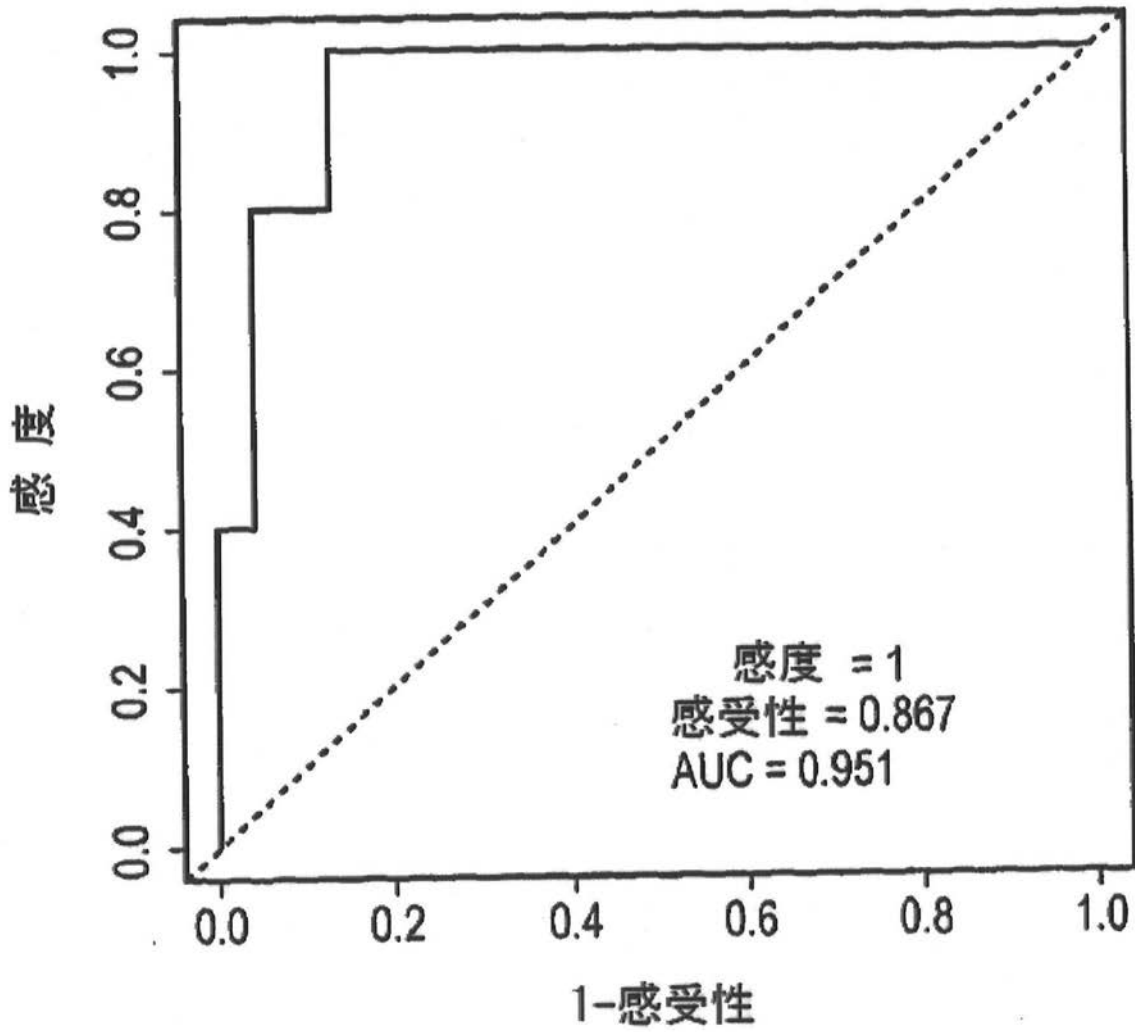


【 図 1 5 】

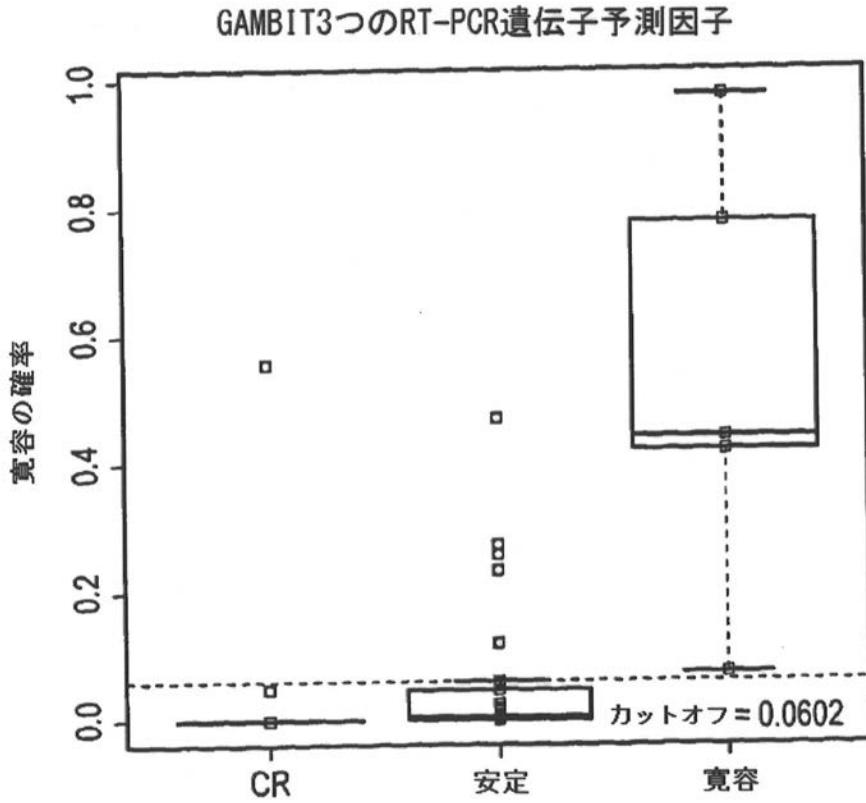


【図16】

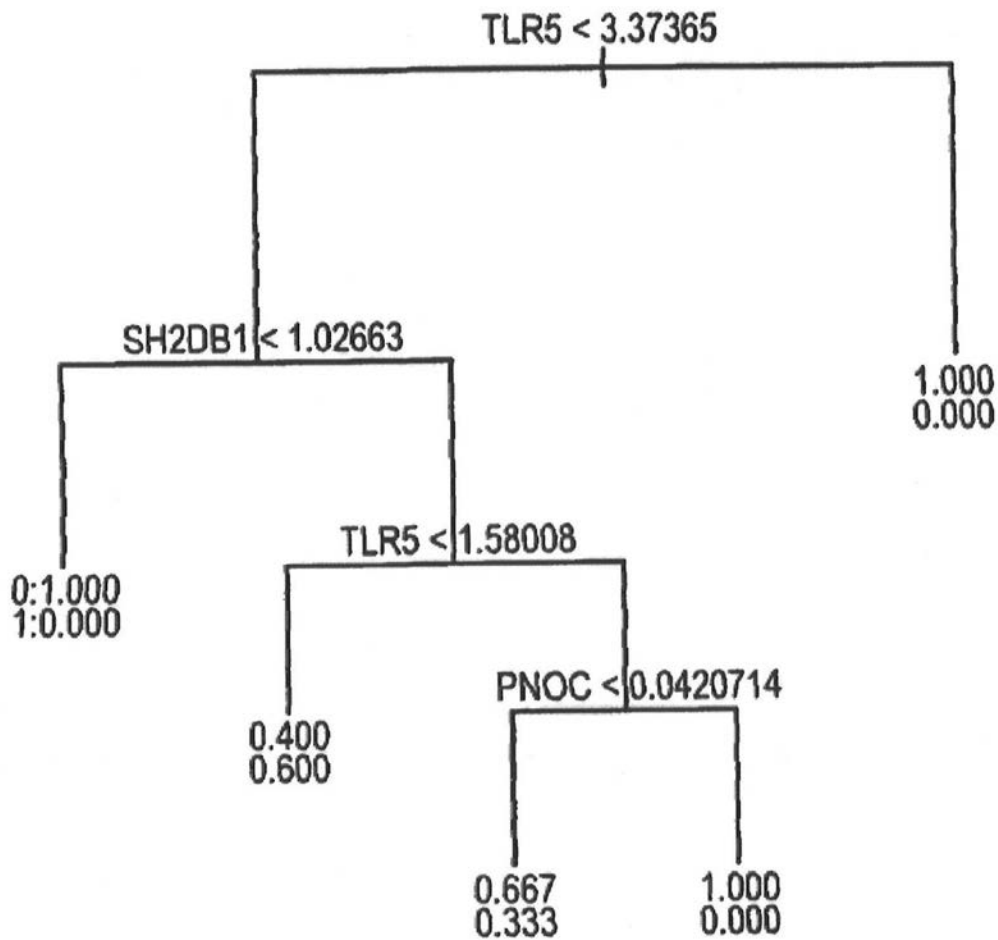
GAMBITにおけるROCの3つの RT-PCR遺伝子予測因子



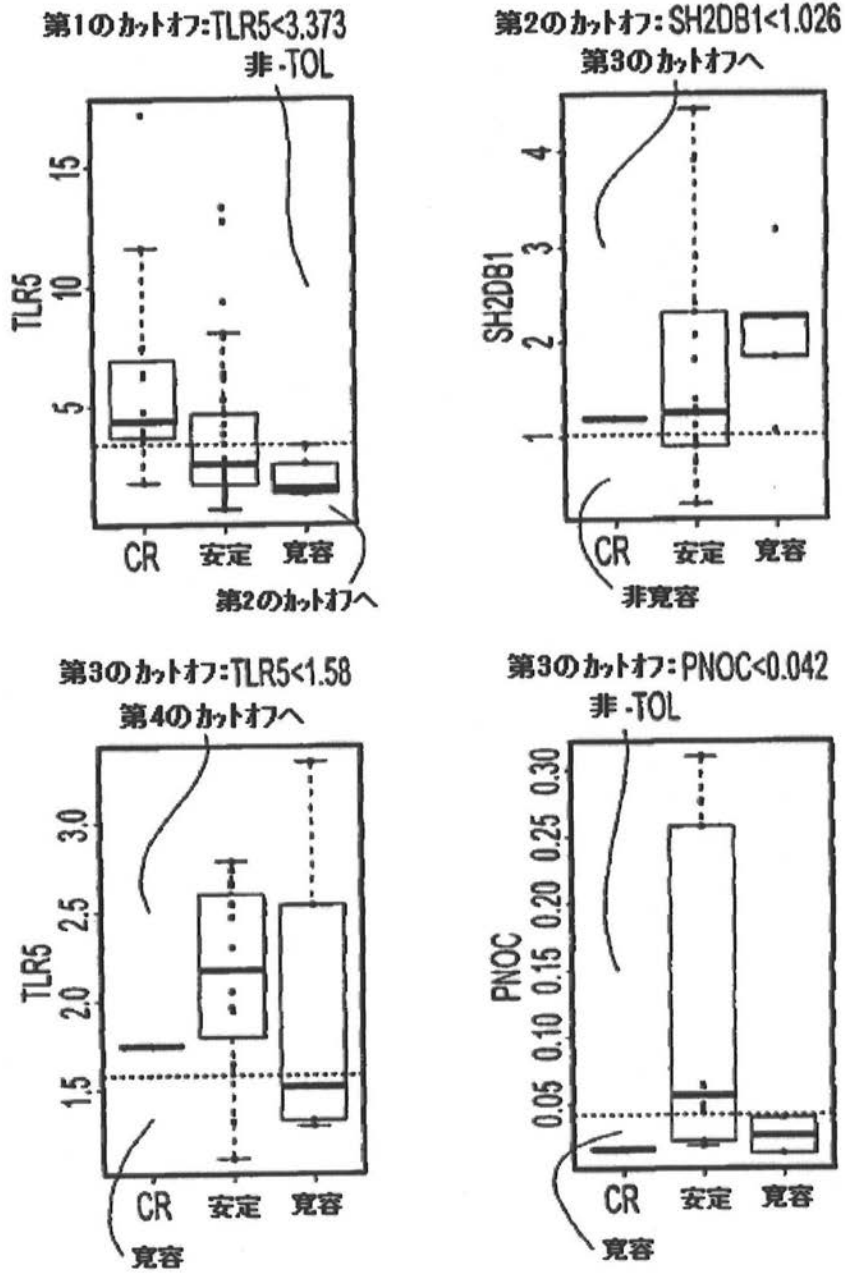
【 図 1 7 】



【 図 1 8 】

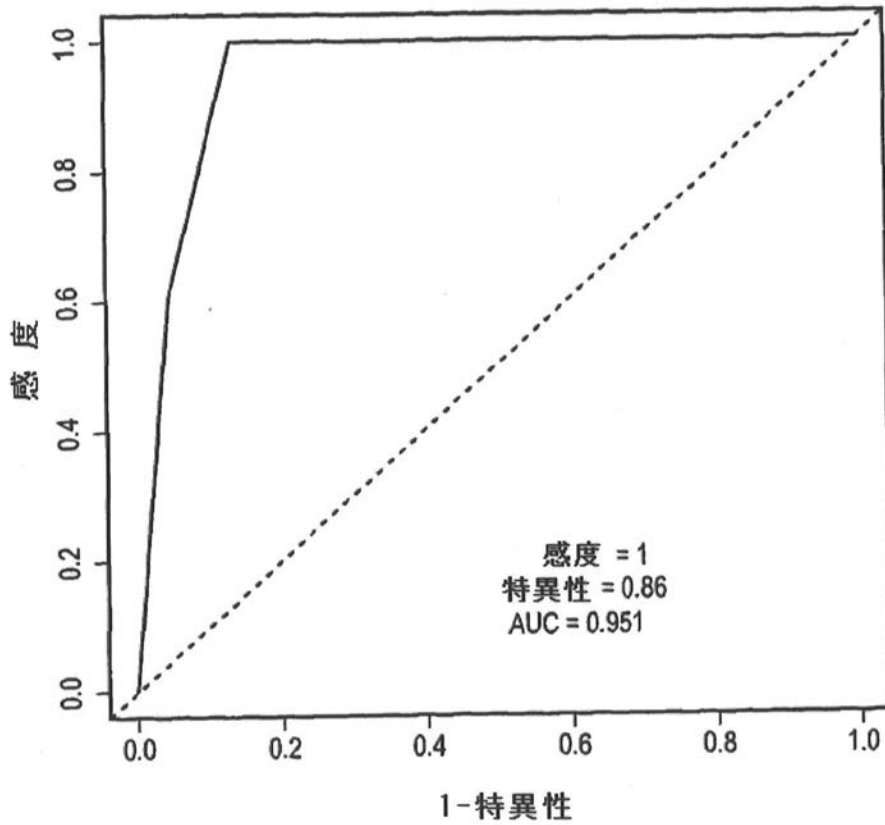


【 図 1 9 】



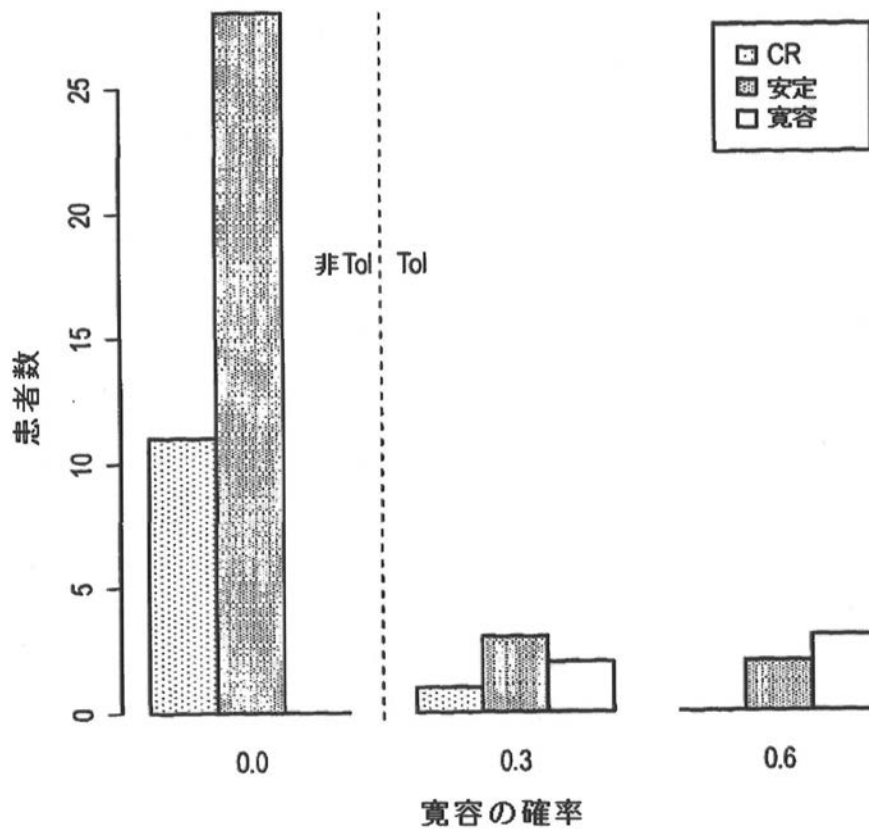
【図 2 0】

GAMBITにおけるROCの3つのRT-PCR遺伝子ツリー予測因子



【図 2 1】

3つのRTPCR遺伝子ツリーモデルによる寛容の確率



【配列表】

2013526862000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/GB2011/050874 |
|---|

| | | |
|---|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 ADD. | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X Y A | WO 2006/131537 A2 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]; BROUARD SOPHIE [FR]; SOULILLOU JEAN-PAUL) 14 December 2006 (2006-12-14) e.g. p. 1, ll. 5-16, p. 4, l. 20 - p. 7, l. 3, Table 1, p. 10; p. 13, ll. 1-7, claim 22 ----- -/-- | 1,12 2,6-11, 13-18 3-5 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 6 September 2011 | | Date of mailing of the international search report 04/10/2011 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Sauer, Tincuta |

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2011/050874

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | BROUARD S ET AL: "Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, WASHINGTON, DC; US, vol. 104, no. 39, 25 September 2007 (2007-09-25), pages 15448-15453, XP002594926, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0705834104 [retrieved on 2007-09-14] | 1,2,12 |
| Y | abstract, p. 3 of Table 4 of Supporting information; p. 15449, col. 1 | 6-11, 13-18 |
| A | ----- | 3-5 |
| X | WANG ZHINING ET AL: "Identification and utilization of inter-species conserved (ISC) probesets on Affymetrix human GeneChip(R) platforms for the optimization of the assessment of expression patterns in non human primate (NHP) samples", BMC BIOINFORMATICS, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 5, no. 1, 26 October 2004 (2004-10-26), page 165, XP021000553, ISSN: 1471-2105, DOI: 10.1186/1471-2105-5-165 | 12-17 |
| A | the whole document | 1-11,18 |
| Y | ----- LOUIS S ET AL: "Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance", TRANSPLANTATION, WILLIAMS AND WILKINS, BALTIMORE US, vol. 81, no. 3, 15 February 2006 (2006-02-15), pages 398-407, XP008087646, ISSN: 0041-1337, DOI: 10.1097/01.TP.0000203166.44968.86 | 1,2,6-18 |
| A | the whole document | 3-5 |
| | ----- -/-- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2011/050874

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | SAWITZKI B ET AL: "Identification of gene markers for the prediction of allograft rejection or permanent acceptance.", AMERICAN JOURNAL OF TRANSPLANTATION : OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF TRANSPLANTATION AND THE AMERICAN SOCIETY OF TRANSPLANT SURGEONS MAY 2007 LNKD- PUBMED:17456197, vol. 7, no. 5, May 2007 (2007-05), pages 1091-1102, XP000002658229, ISSN: 1600-6135 | 1,2,6-18 |
| A | the whole document | 3-5 |
| Y | US 2006/246485 A1 (SARWAL MINNIE S [US] ET AL SARWAL MINNIE M [US] ET AL) 2 November 2006 (2006-11-02) | 1,2,6-18 |
| A | the whole document | 3-5 |
| X,P | para. 11, Table 2 (TCL1A) | |
| X,P | SAGOO PERVINDER ET AL: "Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans.", THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION 1 JUN 2010 LNKD- DOI:10.1172/JCI39922 PUBMED:20501943, vol. 120, no. 6, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 1848-1861, XP000002658230, ISSN: 1558-8238 | 1-18 |
| X,P | the whole document | |
| X,P | figure 7 | |
| X,P | FRED FÄ NDRICH: "Tolerance in clinical transplantation: progress, challenge or just a dream?", LANGENBECK'S ARCHIVES OF SURGERY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 396, no. 4, 17 March 2011 (2011-03-17), pages 475-487, XP019895574, ISSN: 1435-2451, DOI: 10.1007/S00423-011-0757-Z | 1-18 |
| | the whole document | |
| | table 2 | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2011/050874

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 2006131537 A2 | 14-12-2006 | EP 1731620 A1 | 13-12-2006 |
| US 2006246485 A1 | 02-11-2006 | NONE | |

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 37/00 (2006.01) G 0 1 N 33/53 K
 G 0 1 N 37/00 1 0 2

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

- (71)出願人 312000044
 ミルテニー バイオテック ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
 Miltenyi Biotec GmbH
 ドイツ連邦共和国 ベアギッシュ グラートバッハ フリードリヒ - エーバート - シュトラーセ
 6 8
 Friedrich - Ebert - Strasse 6 8 , D - 5 1 4 2 9 Bergisch
 Gladbach , Germany
- (74)代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
- (74)代理人 100126505
 弁理士 佐貫 伸一
- (74)代理人 100131392
 弁理士 丹羽 武司
- (72)発明者 エルナンデス - フェンテス , マリア
 イギリス ロンドン ガイズ ホスピタル キングス カレッジ ロンドン スクール オブ メ
 ディスン メディカル リサーチ カウンシル センター フォー トランスプランテーション
- (72)発明者 メサ , イレーネ
 イギリス ロンドン ガイズ ホスピタル キングス カレッジ ロンドン スクール オブ メ
 ディスン メディカル リサーチ カウンシル センター フォー トランスプランテーション
- (72)発明者 ジャッセン , ウーベ
 ドイツ 5 1 4 2 9 ベルギッシュ グラートバッハ フリードリッヒ - エーバート - シュトラー
 セ 6 8 ミルテニー バイオテック ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
- (72)発明者 トミウク , ステファン
 ドイツ 5 1 4 2 9 ベルギッシュ グラートバッハ フリードリッヒ - エーバート - シュトラー
 セ 6 8 ミルテニー バイオテック ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
- (72)発明者 サウィツキ , ビルギット
 ドイツ ベルリン シャリーテ ユニバーシティ メディスン インスティテュート フォー メ
 ディカル イムノロジー アンド ベルリン - ブランデンブルグ センター フォー リジエネレ
 イティブ メディスン
- (72)発明者 ヴォルク , ハンス - ディーター
 ドイツ ベルリン シャリーテ ユニバーシティ メディスン インスティテュート フォー メ
 ディカル イムノロジー アンド ベルリン - ブランデンブルグ センター フォー リジエネレ
 イティブ メディスン
- (72)発明者 レヒラー , ロバート
 イギリス ロンドン ガイズ ホスピタル キングス カレッジ ロンドン スクール オブ メ
 ディスン メディカル リサーチ カウンシル センター フォー トランスプランテーション

Fターム(参考) 4B029 AA07 AA23 BB11 BB20 FA01 FA11 GA08
4B063 QA18 QA20 QQ02 QQ08 QQ53 QR08 QR32 QR36 QR42 QR50
QR55 QR62 QR72 QR77 QS03 QS25 QS28 QS34 QS36 QS39
QX02

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 确定肾移植耐受性的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2013526862A | 公开(公告)日 | 2013-06-27 |
| 申请号 | JP2013508553 | 申请日 | 2011-05-04 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 伦敦国王学院 シャリーテウニヴェリテーツメディツインベルリン 美天旋GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tsongu 美天旋生物技术有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 伦敦大学国王学院 Sharite - 海胆帆哲媒体寻柏林 美天旋生物技术GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司 | | |
| [标]发明人 | エルナンデスフェンテスマリア メサイレーネ ジャッセンウーベ トミウクステファン サウイツキビルギット ヴォルクハンスディーター レヒラーロバート | | |
| 发明人 | エルナンデス-フェンテス,マリア メサ,イレーネ ジャッセン,ウーベ トミウク,ステファン サウイツキ,ビルギット ヴォルク,ハンス-ディーター レヒラー,ロバート | | |
| IPC分类号 | C12Q1/68 C12Q1/06 C12M1/00 C12M1/34 G01N33/53 G01N37/00 | | |
| CPC分类号 | C12Q1/6837 C12Q1/6883 C12Q2600/158 C12Q1/6876 | | |
| FI分类号 | C12Q1/68.A C12Q1/06 C12M1/00.A C12M1/34.Z G01N33/53.M G01N33/53.K G01N37/00.102 | | |
| F-TERM分类号 | 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB11 4B029/BB20 4B029/FA01 4B029/FA11 4B029/GA08 4B063 /QA18 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063 /QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02 | | |
| 代理人(译) | 川口义行 | | |
| 优先权 | 2010007454 2010-05-04 GB | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及通过确定几种生物标志物的水平来确定个体的移植耐受性的方法。本发明还涉及试剂盒，其包含用于检测生物标志物水平的试剂。本发明还涉及用于检测多种基因的表达水平的传感器，其可用于确定个体的移植耐受性。

| | 閾値 | 特異性 | 感度 |
|-------------------------------|------|----------|----------|
| CD4,CD25 (フローサイトメトリー) | 0.14 | 0.695122 | 0.615385 |
| B.T (フローサイトメトリー) | 0.12 | 0.804878 | 0.692308 |
| FoxP3:1,2a マンノシダーゼ(RT-PCR) | 0.18 | 0.841463 | 0.461538 |
| ドナー特異的 CD4+ (IFN ガンマ ELISpot) | 0.13 | 0.768293 | 0.538462 |